



ΠΜΣ Λοιμωξιολογία

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

## Γενετική βάση αντιμικροβιακής αντοχής

Ειρήνη Γαλάνη, Ερευνήτρια Βιολόγος PhD, Ε.ΔΙ.Π, ΕΚΠΑ

22 Οκτωβρίου 2019

# ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ

---

## Ορισμός:

Η ικανότητα ενός μικροοργανισμού να αντιστέκεται στη δράση ενός αντιμικροβιακού παράγοντα

## Ενδογενής αντοχή

- ▶ Χρωμοσωμική
- ▶ Υπάρχει σε όλα τα στελέχη ενός είδους μικροβίων
- ▶ 'Ευαίσθητα' στελέχη δηλώνουν λάθος στην ταυτοποίηση ή στο αντιβιογράμμα

## Επίκτητη αντοχή

- ▶ Είναι αποτέλεσμα είτε μετάλλαξης στο μικρόβιο είτε μεταφοράς ενός γονιδίου αντοχής
- ▶ Υπάρχει σε ορισμένα στελέχη ενός είδους μικροβίων



# Ενδογενής αντοχή

---

## Πού οφείλεται

- ▶ Έλλειψη συγγένειας με τον στόχο
- ▶ Ανικανότητα εισόδου στο κύτταρο
- ▶ Αντλία εξαγωγής
- ▶ Αδρανοποίηση αντιβιοτικού

## Παραδείγματα Ενδογενούς αντοχής

- ▶ Εντεροβακτηριακά
  - ▶ Γλυκοπεπτίδια ή λινεζολίδη
- ▶ Εντερόκοκκοι
  - ▶ Φουσιδικό οξύ
- ▶ *Klebsiella spp.*
  - ▶ Αμπικιλλίνη
- ▶ *P. mirabilis*
  - ▶ Νιτροφουραντοΐνη ή κολιστίνη
- ▶ *Serratia marcescens*
  - ▶ Κολιστίνη
- ▶ *Stenotrophomonas maltophilia*
  - ▶ Καρβαπενέμες
- ▶ Gram-θετικά
  - ▶ Αζτρεονάμη



## Κλινικά όρια ευαισθησίας (clinical breakpoints)

- ▶ Απώτερος σκοπός τους είναι ο διαχωρισμός των στελεχών σε **ευαίσθητα-S** και **ανθεκτικά-R**
- ▶ Είναι δείκτες με κλινική αξία, καθορίζονται από το αποτέλεσμα στον άνθρωπο και σχετίζονται με το δοσολογικό σχήμα και την οδό χορήγησης
  - ▶ **S ή E “Ευαίσθητος, με κανονικό δοσολογικό σχήμα”**
    - ▶ Ο μικροοργανισμός στον οποίο αναμένεται θεραπευτική επιτυχία χορηγώντας τον αντιμικροβιακό παράγοντα σε κανονικό δοσολογικό σχήμα
  - ▶ **I “Ευαίσθητος, σε αυξημένη έκθεση ”**
    - ▶ Ο μικροοργανισμός στον οποίο αναμένεται θεραπευτική επιτυχία, εφόσον εξασφαλίζεται αυξημένη έκθεση στον αντιμικροβιακό παράγοντα είτε λόγω τροποποίησης του δοσολογικού σχήματος είτε λόγω μεγάλης συγκέντρωσης του αντιμικροβιακού παράγοντα στη θέση της λοίμωξης
  - ▶ **R ή A “Ανθεκτικός”**
    - ▶ Ο μικροοργανισμός στον οποίο αναμένεται θεραπευτική αποτυχία, ακόμη και σε αυξημένη έκθεση στον αντιμικροβιακό παράγοντα

# Μικροβιολογική αντοχή και επιδημιολογικές “cut-off” τιμές (ECOFFS)

---

Η μέγιστη MIC που καταγράφεται στον **Wild Type** μικροβιακό πληθυσμό, και διαχωρίζει τον **WT** από τον **Non-Wild Type** πληθυσμό

## Wild type (WT)

- ▶ Φυσικός μικροβιακός πληθυσμός
  - ▶ Στερείται κάθε επίκτητου μηχανισμού αντοχής
- ▶ WT MIC ≤ ECOFF

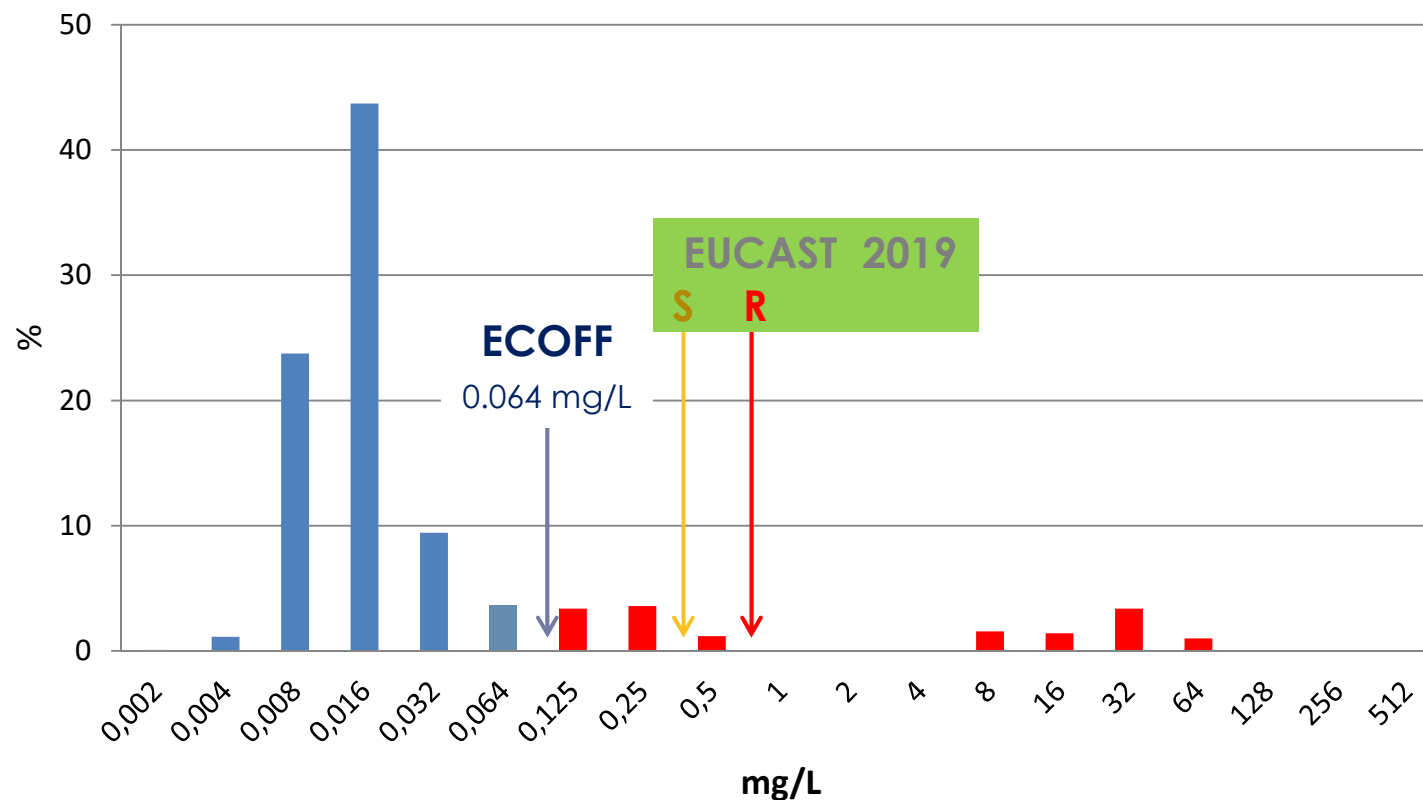
## Non-Wild Type (NWT)

- ▶ Μη φυσικός μικροβιακός πληθυσμός
  - ▶ Παρουσία ενός τουλάχιστον μηχανισμού αντοχής στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό
    - ▶ επίκτητο (μεταφορά γονιδίου)
    - ▶ μεταλλακτικό (μετάλλαξη γονιδίου)
- ▶ NWT MIC > ECOFF



# Μικροβιολογικά και κλινικά όρια ευαισθησίας

Ciprofloxacin / *Escherichia coli*  
International MIC distribution



Clinical breakpoints

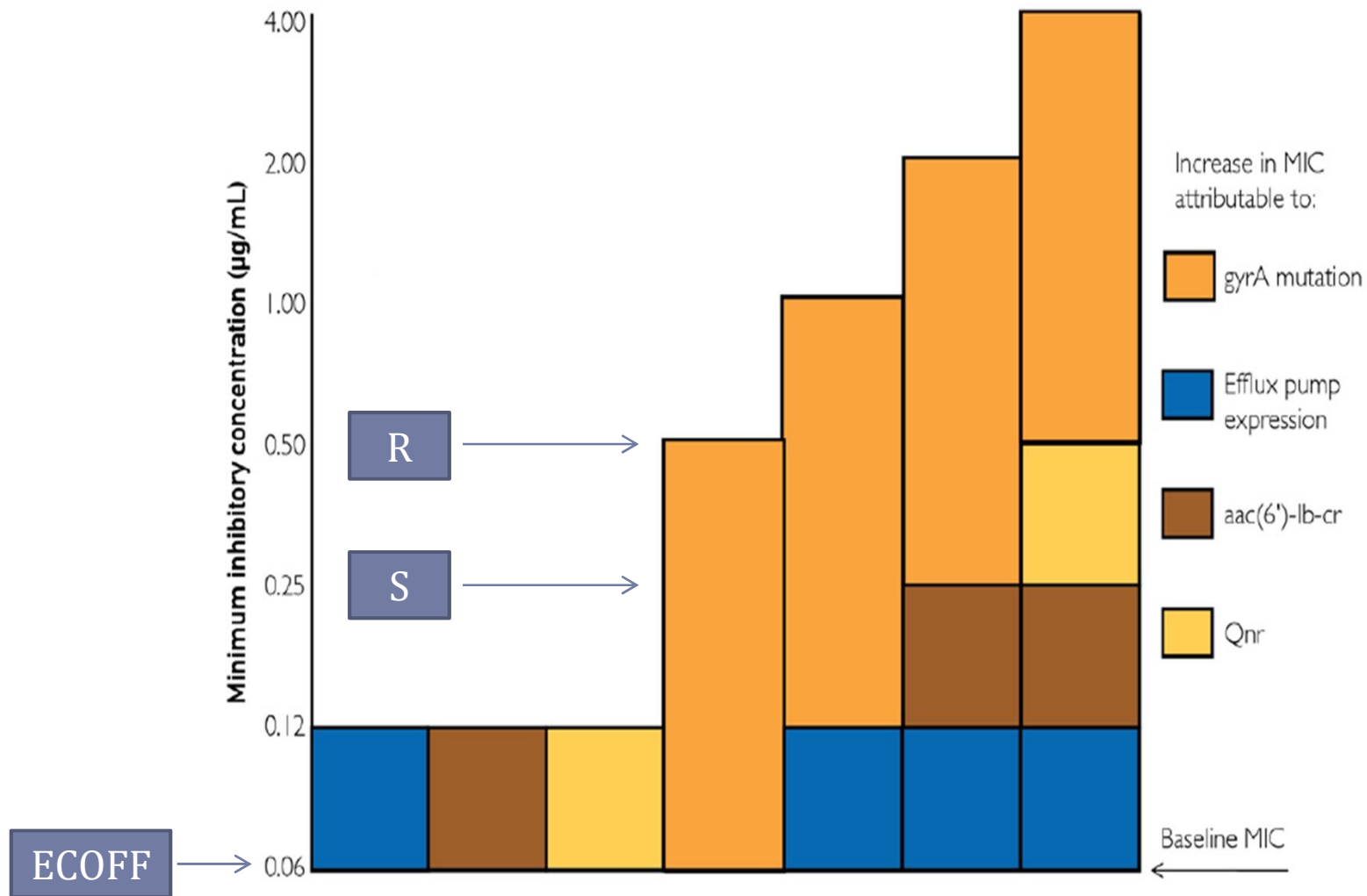
EUCAST  
 $S \leq 0.25$ ,  $R > 0.5$

CLSI  
 $S \leq 0.25$ ,  $R > 0.5$

MIC  
Epidemiological cut-off: 0,064 mg/L  
Wildtype (WT) organisms:  $\leq 0,064$  mg/L

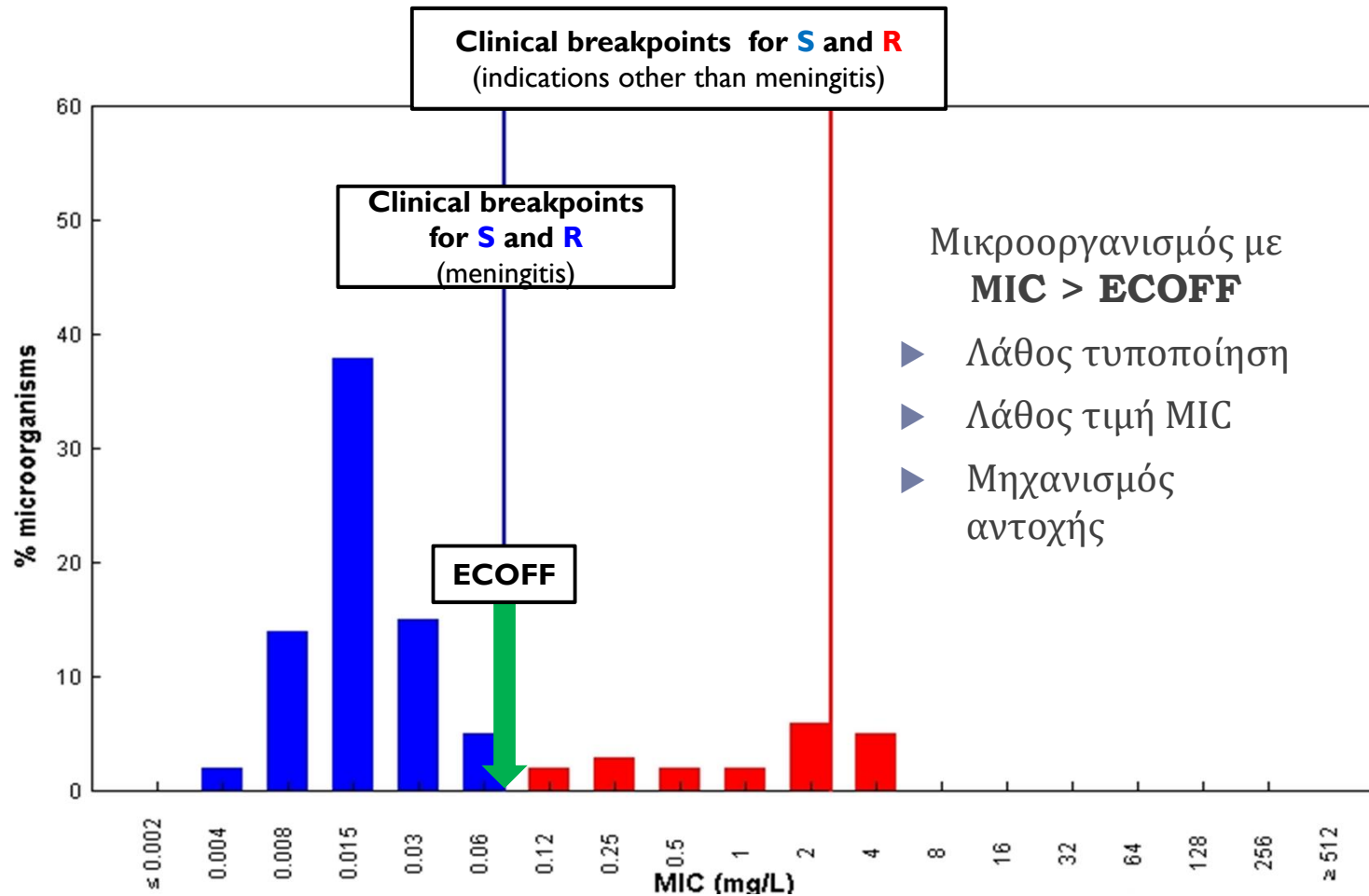
16702 μετρήσεις

# Αντιπροσωπευτικό γράφημα της συνεισφοράς διάφορων μεμονωμένων και συνδυασμένων μηχανισμών αντοχής στις φθοριοκινολόνες



# Benzylpenicillin / *Streptococcus pneumoniae*

## International MIC distribution

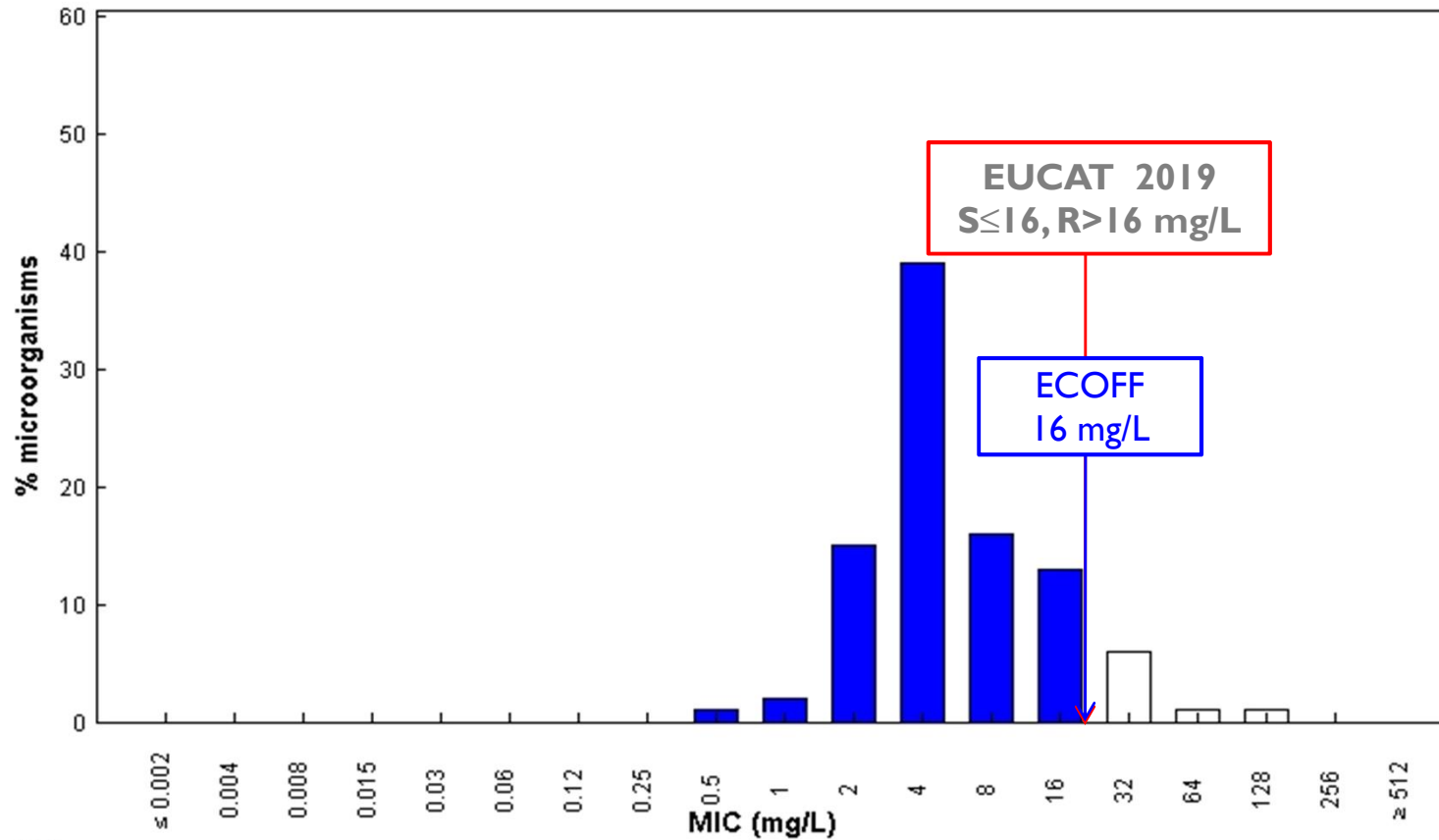


Epidemiological cut-off: 0,064 mg/L  
Wildtype (WT) organisms: ≤0,064 mg/L

37742 μετρήσεις



# Aztreonam / *Pseudomonas aeruginosa* International MIC distribution

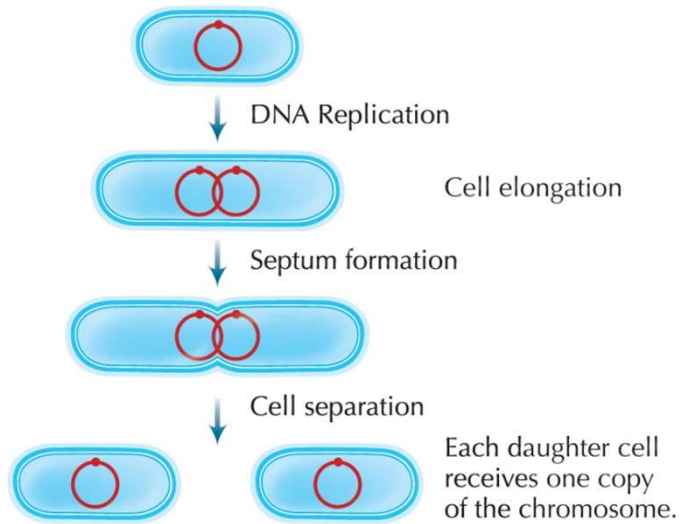


Epidemiological cut-off (ECOFF): 16mg/L  
Wildtype (WT) organisms: ≤16 mg/L

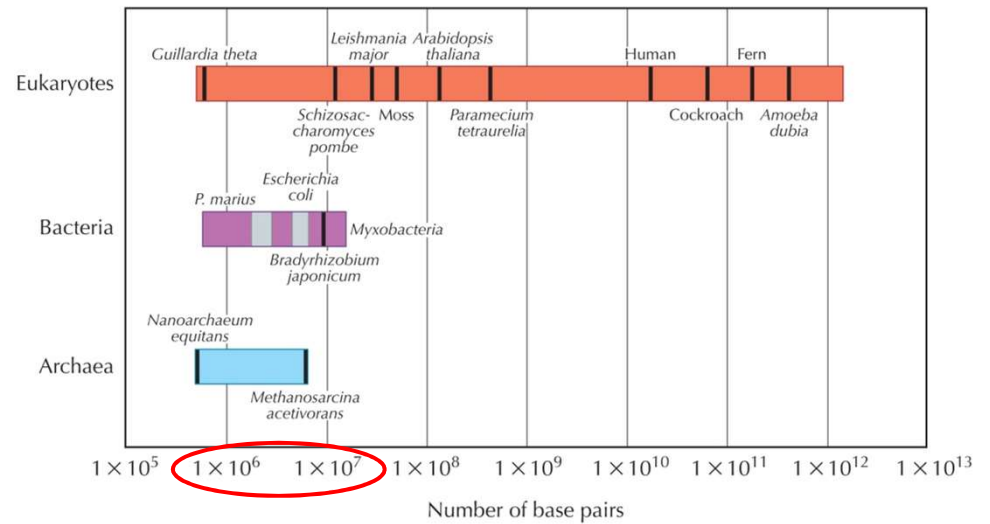
3293 μετρήσεις

# Κυτταρική διαίρεση

## Διχοτόμηση

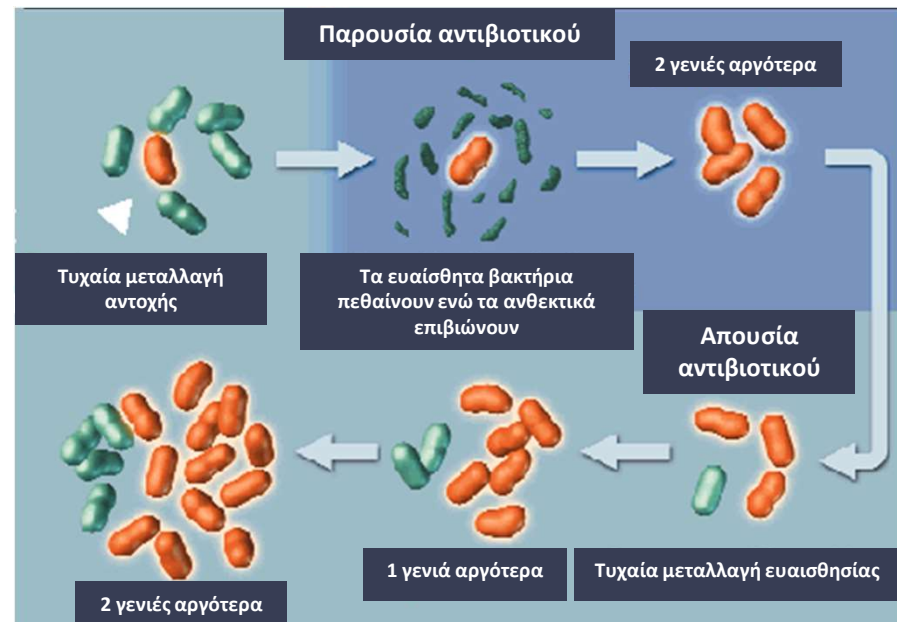


## Μέγεθος γονιδιώματος




# Αυτόματες μεταλλάξεις σε ενδογενή γονίδια

- ▶ Οι μεταλλάξεις αφορούν το χρωμοσωμικό DNA και συμβάλλουν ελάχιστα στην απόκτηση αντοχής
- ▶ Συμβαίνουν σπάνια  $1:10^6$ -  $10^8$  ως τυχαία συμβάντα
- ▶ Επιλέγονται κάτω από την πίεση των αντιβιοτικών και προκαλούν ανθεκτικούς πληθυσμούς (κάθετη μεταβίβαση)



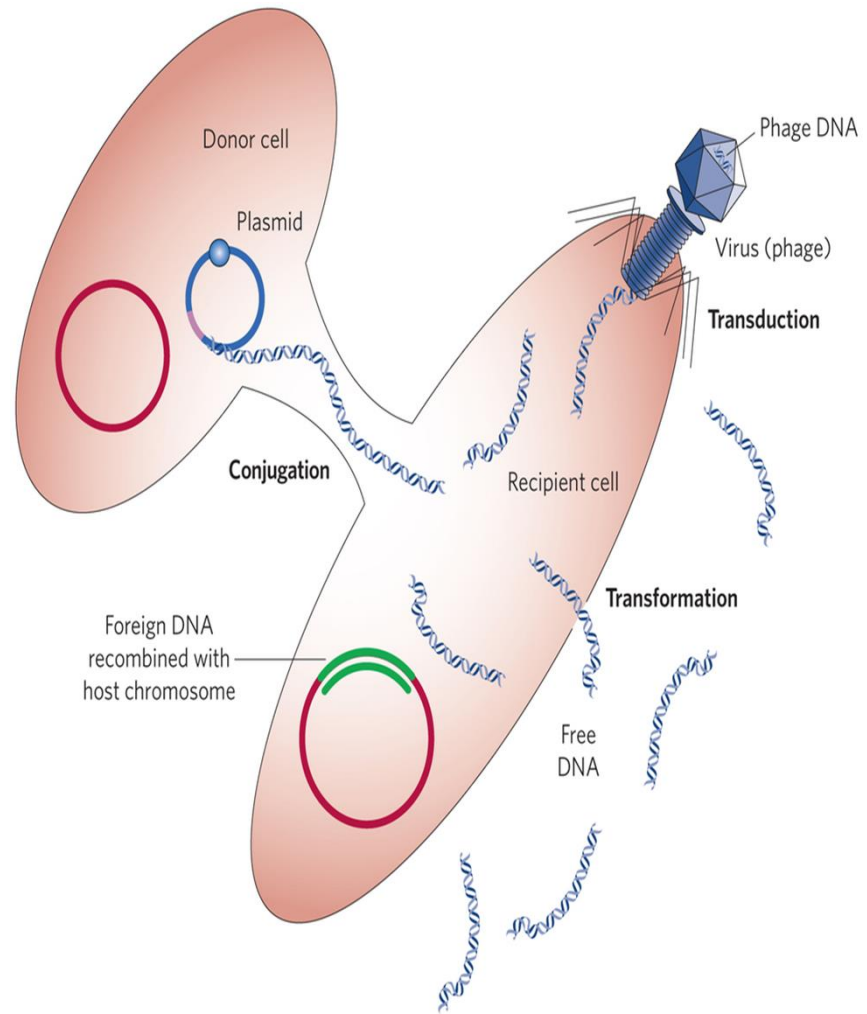
# Αυτόματες μεταλλαγές σε ενδογενή γονίδια

---

- ▶ **Σιωπηλές (silent mutations)**
    - ▶ Δεν επηρεάζεται η πρωτεΐνη (εκφυλισμένος γενετικός κώδικας)
  - ▶ **Με λάθος νόημα (missense mutations)**
    - ▶ Ένα αμινοξύ αντικαθίσταται από άλλο
  - ▶ **Χωρίς νόημα (Nonsense mutations)**
    - ▶ Ένα αμινοξύ μετατρέπεται σε κωδικόνιο λήξης με αποτέλεσμα τον πρόωρο τερματισμό της πρωτεΐνης
  - ▶ **Μετατόπισης πλαισίου (Frameshift mutations)**
    - ▶ Προσθήκη ή έλλειψη μερικών ή πολλών ζευγών βάσεων
    - ▶ Όλα τα αμινοξέα μετά τη μετάλλαξη είναι διαφορετικά από το αναμενόμενο
    - ▶ Συχνά εμφανίζεται σύντομα ένα κωδικόνιο λήξης
  - ▶ **Ανάδρομες μεταλλάξεις (Reversions)**
    - ▶ Μια δεύτερη μετάλλαξη που αναστρέφει τα αποτελέσματα της πρώτης μετάλλαξης
    - ▶ Ο φαινότυπος ξαναγίνεται φυσιολογικός (σχεδόν)
  - ▶ **Σε δομικά γονίδια**
    - ▶ διευρυμένο φάσμα ενζυμικής δραστηριότητας
      - ▶ π.χ. ESBL
    - ▶ τροποποίηση στόχου
      - ▶ π.χ. γυράση (gyrA)
    - ▶ ελλειμματική μεταφορά
      - ▶ π.χ. πορίνη (OprD)
  - ▶ **Σε ρυθμιστικά γονίδια**
    - ▶ αυξημένη έκφραση
      - ▶ π.χ. αντλίες εκροής
- 
- 

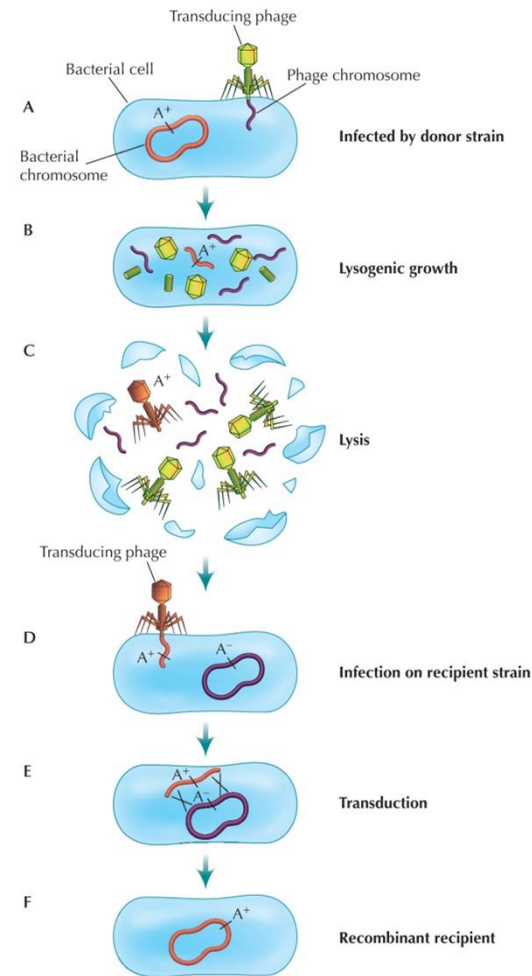
# Απόκτηση εξωγενών γονιδίων (οριζόντια μεταφορά)

- ▶ Τα εξωγενή γονίδια συνήθως κωδικοποιούν:
  - ▶ αδρανοποιητικά ένζυμα ή
  - ▶ τροποποιημένους στόχους
- ▶ Η απόκτηση γίνεται με:
  - ▶ Μεταγωγή
  - ▶ Σύζευξη
  - ▶ Μετασχηματισμό



# Μεταγωγή (transduction)

- ▶ Η μεταβίβαση γενετικού υλικού μέσω βακτηριοφάγων ανάμεσα σε δύο “συγγενή” βακτήρια
- ▶ Οι βακτηριοφάγοι είναι ιοί που προσβάλλουν τα βακτήρια
- ▶ Ο ρόλος των φάγων στη μεταβίβαση της αντοχής είναι περιορισμένος



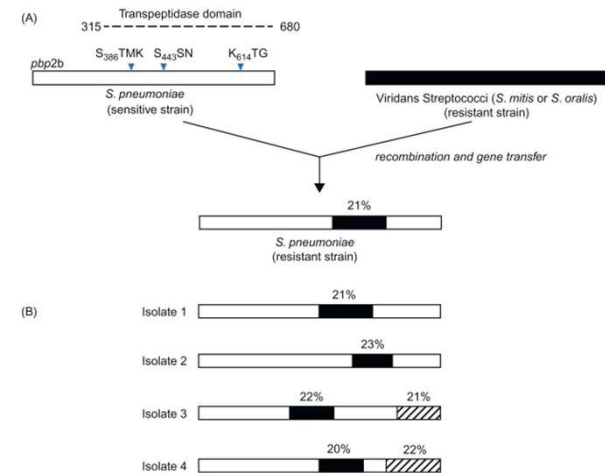
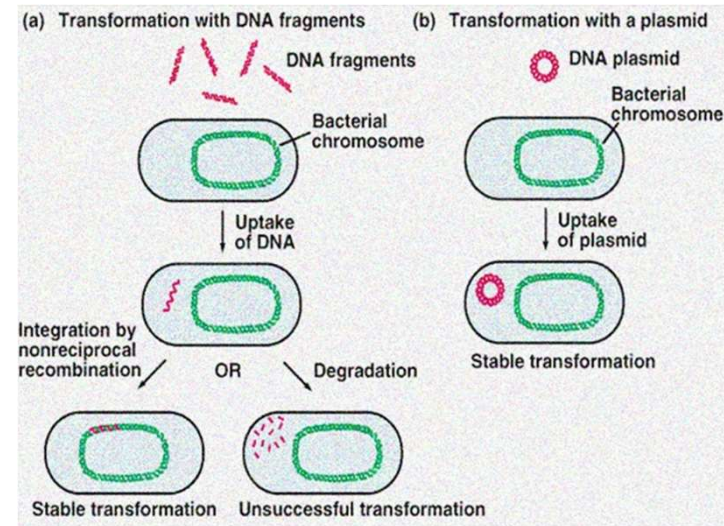
# Μετασχηματισμός (transformation)

- ▶ Η διαδικασία πρόσληψης μορίων DNA, τα οποία έχουν προκύψει από τη λύση άλλων βακτηρίων και βρίσκονται “ελεύθερα” στο περιβάλλον
- ▶ Το ξένο DNA εισέρχεται στο κύτταρο – δέκτη και με ανασυνδυασμό ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα του δότη σχηματίζοντας “μωσαϊκά” γονίδια
- ▶ Η ενσωμάτωση του DNA είναι εφικτή όταν προέρχεται από “συγγενή” βακτήρια
- ▶ Συνήθης διαδικασία σε Gram(+) κόκκους

Π.χ.: *S. pneumoniae*

Τροποποιημένες PBPs: **1a**, 1b, 2a, **2b**, **2x**, 3

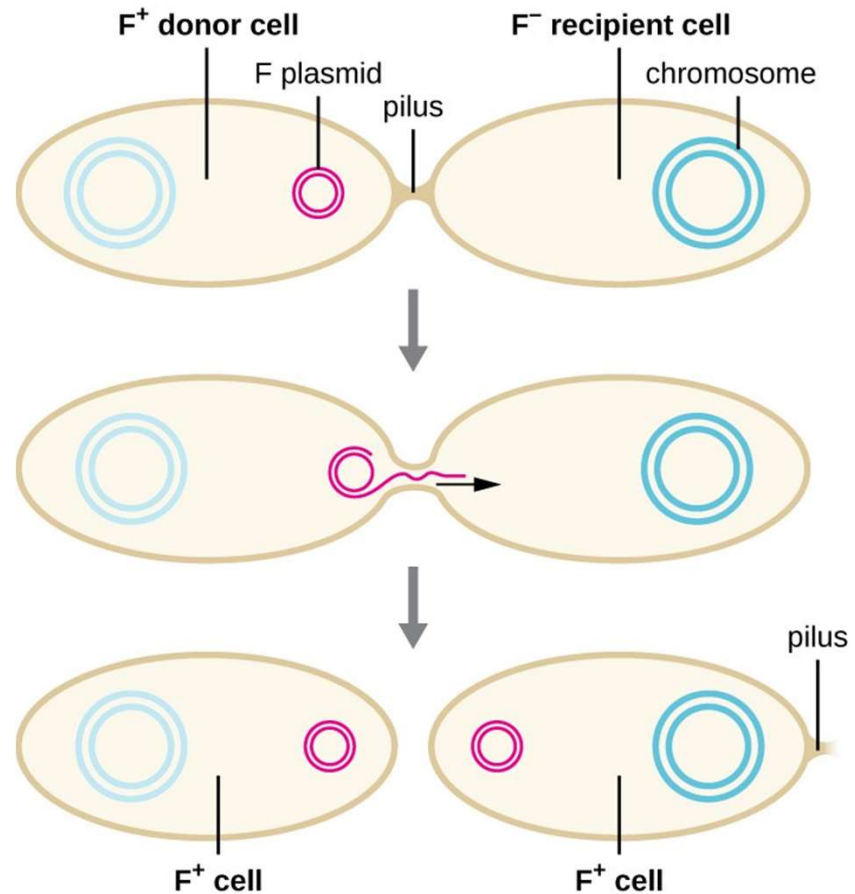
Κωδικοποιούνται από *pbp* “μωσαϊκά” γονίδια που έχουν προκύψει από ενσωμάτωση τμήματος *pbp* από Viridans Streptococci με μετασχηματισμό και ομόλογο ανασυνδυασμό





# Σύζευξη (conjugation)

- ▶ Ο κυριότερος μηχανισμός μεταβίβασης γονιδίων αντοχής στα Gram (-) βακτήρια
- ▶ Η μεταβίβαση του γενετικού υλικού γίνεται με τα πλασμίδια, τα οποία μπορεί να φέρουν ένα ή περισσότερα γονίδια αντοχής (πλασμίδια πολλαπλής αντοχής)
- ▶ Απαιτείται άμεση επαφή μεταξύ δύο βακτηρίων (δότη και δέκτη), η οποία εξασφαλίζεται με ειδικά ινίδια (συζευκτικά -αυτομεταφερόμενα πλασμίδια)



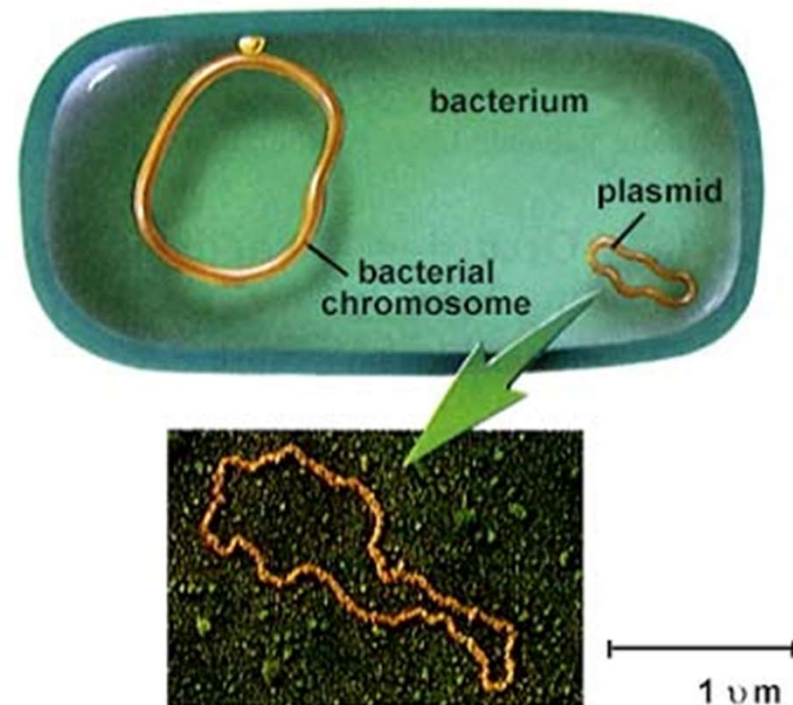


# Φορείς γονιδίων αντοχής

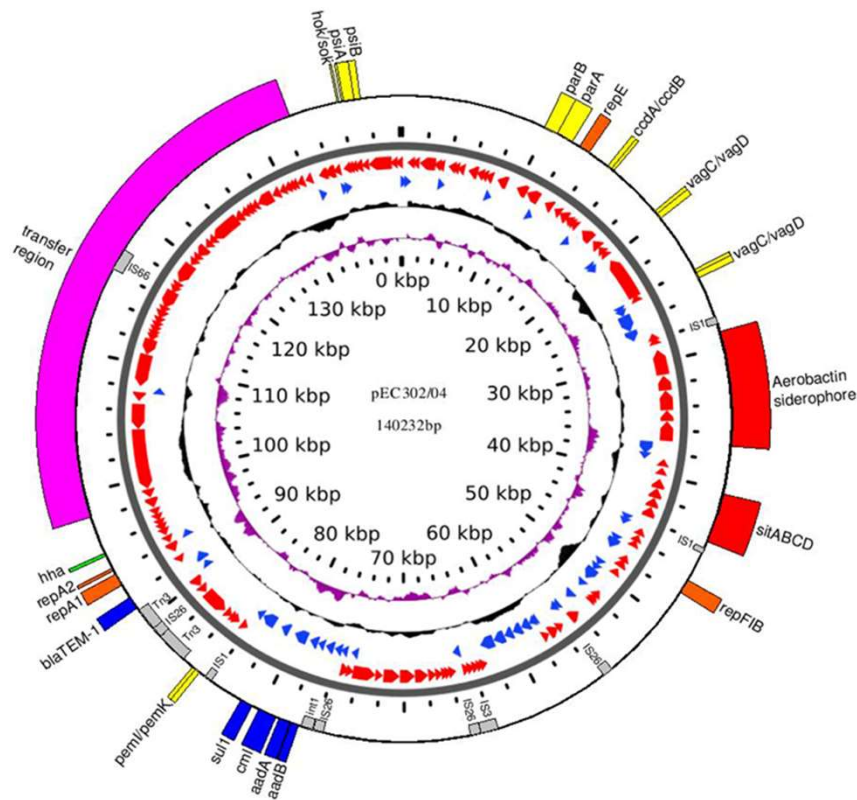
---

Εξωχρωμοσωμικές γενετικές μονάδες (πλασμίδια)

- ▶ **Πλασμίδια**
- ▶ Μεταθετά στοιχεία
  - ▶ Αλληλουχίες εισδοχής
  - ▶ Transposons
- ▶ Integrons



# Εξωχρωσωμικές γενετικές μονάδες (πλασμίδια)



- ▶ Δίκλινα, κυκλικά μόρια DNA
- ▶ 2% της γενετικής πληροφορίας (5-100 γονίδια)
- ▶ Ένα ή περισσότερα πλασμίδια/βακτήριο συνήθως σε 2-50 αντίγραφα /κύτταρο
- ▶ Αντιγράφονται αυτόνομα σε σχέση με το βακτηριακό χρωμόσωμα
- ▶ Ενίοτε ενσωματώνονται στο χρωμόσωμα (επισώματα)
- ▶ Περιέχουν γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά και γονίδια για την μεταφορά τους από το ένα βακτήριο στο άλλο
- ▶ Στα πλασμίδια μπορούν να ενσωματωθούν μεμονωμένα γονίδια αντοχής, τρανσποζόνια (Tn) ή ιντεγκρόνια (Int)

# Φορείς γονιδίων

---

- ▶ Πλασμίδια
- ▶ **Μεταθετά στοιχεία**
  - ▶ Αλληλουχίες εισδοχής
  - ▶ **Transposons**
- ▶ Integrons

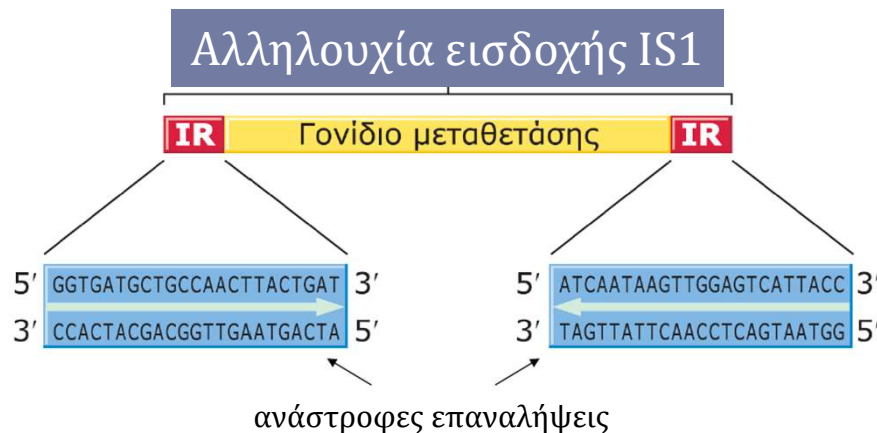
## Μεταθετά στοιχεία

- ▶ Ακολουθίες DNA, οι οποίες μπορούν να μετακινηθούν από μία θέση σε άλλη ή από ένα μόριο DNA σε άλλο (“jumping genes”)
  - ▶ Η παρουσία τους ανακαλύφθηκε αρχικά (1930-1950) στο καλαμπόκι (McClintock Barbara - βραβείο Nobel 1983)
  - ▶ 1960's: Απομόνωση μεταθετών στοιχείων από *Escherichia coli*
  - ▶ Αποτελούν σημαντικό συστατικό όλων των γονιδιωμάτων
  - ▶ Υπάρχουν δύο κατηγορίες μεταθετών στοιχείων στα προκαρυωτικά
    - ▶ Αλληλουχίες εισδοχής
    - ▶ Transposons
- 



# Φορείς γονιδίων

- ▶ Πλασμίδια
- ▶ **Μεταθετά στοιχεία**
  - ▶ **Αλληλουχίες εισδοχής**
  - ▶ Transposons
- ▶ Integrons



## Αλληλουχίες εισδοχής / Insertion sequences (IS elements)

- ▶ Τα απλούστερα μεταθετά στοιχεία
- ▶ Περιέχουν ένα ή δύο γονίδια που είναι απαραίτητα για τη μετακίνησή τους (τρανσποζάση & ρυθμιστική πρωτεΐνη)
- ▶ Πλαισιώνονται από ανεστραμμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (IR)
- ▶ Είναι ευρέως διαδεδομένα, τόσο σε βακτηριακά χρωμοσώματα όσο και σε πλασμίδια
- ▶ Μέγεθος: 700-5000 bp
- ▶ Το συνηθισμένο σύστημα ονομασίας που χρησιμοποιείται, είναι IS $n$ , όπου  $n$  ένας αριθμός (π.χ. IS1, IS2, IS3, IS10, IS50, IS911, IS26 κ.λ.π)
- ▶ Το γονιδίωμα του *E. coli* μπορεί να περιέχει 20 IS elements.

# Φορείς γονιδίων

---

- ▶ Πλασμίδια
- ▶ **Μεταθετά στοιχεία**
  - ▶ Αλληλουχίες εισδοχής
  - ▶ **Transposons**
- ▶ Integrans

## Transposons - Tn

- ▶ Είναι μεγαλύτερα από τα IS elements γιατί περιέχουν και άλλα γονίδια εκτός από τα απαραίτητα για τη μετακίνησή τους
    - ▶ π.χ. γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά
  - ▶ Υπάρχουν δύο τύποι προκαρυωτικών Tn
    - ▶ Σύνθετα Tn
    - ▶ Απλά Tn
  - ▶ Μηχανισμοί μετακίνησης
    - ▶ Συντηρητικός: αποκοπή από την αρχική θέση και ένθεση στη νέα
    - ▶ Αντιγραφικός: δημιουργία αντιγράφου, παραμονή στην αρχική θέση
    - ▶ Σε κάθε περίπτωση συμβαίνει **διπλασιασμός αλληλουχίας στη θέση ένθεσης**
- 



# Τύποι προκαρυωτικών Transposons

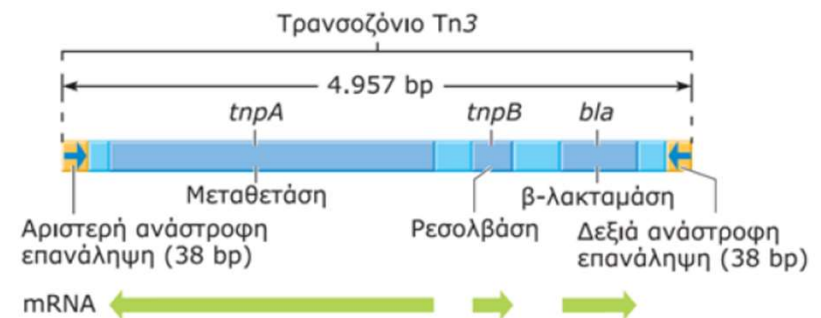
## Σύνθετα Tn

- ▶ Περιέχουν γονίδια συνήθως αντοχής σε αντιβιοτικά που πλαισιώνονται από IS elements σε παράλληλη ή αντιπαράλληλη διάταξη
- ▶ Τα IS elements περιέχουν τα γονίδια για την μετάθεση και τις ακολουθίες αναγνώρισης για τη μετακίνηση



## Απλά Tn

- ▶ Περιέχουν επίσης γονίδια (π.χ. αντοχής σε αντιβιοτικά)
- ▶ Πλαισιώνονται από μικρού μήκους (<50bp) ανάστροφες επαναλήψεις (IR) και όχι από IS elements
- ▶ Περιέχουν το γονίδιο της τρανσποζάσης και της ρεσολβάσης (ένζυμο που μετέχει στη διεργασία του ανασυνδυασμού κατά τη μετακίνηση)



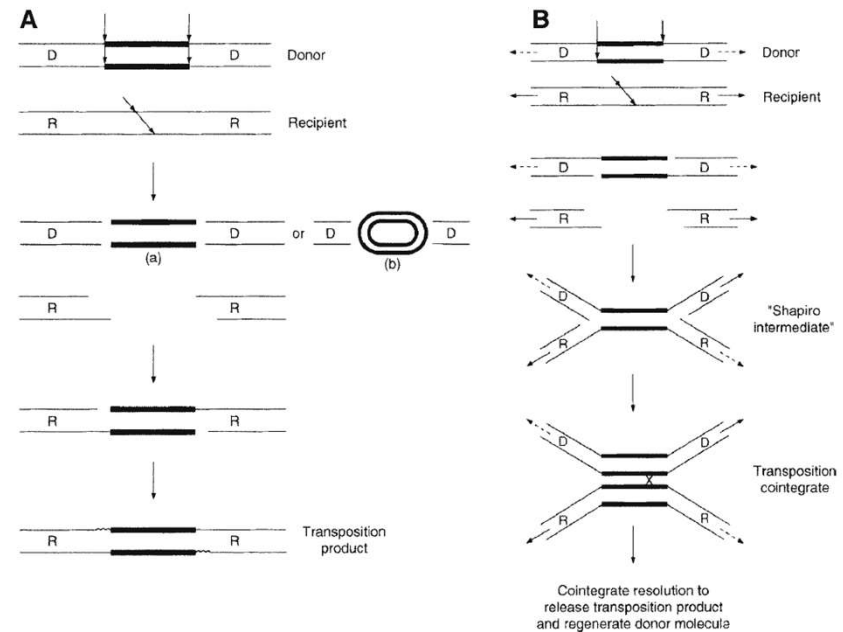
# Διαδικασία μετάθεσης

## Συντηρητική μετάθεση (Cut and paste)

Εκτομή και εισδοχή σε μια νέα θέση

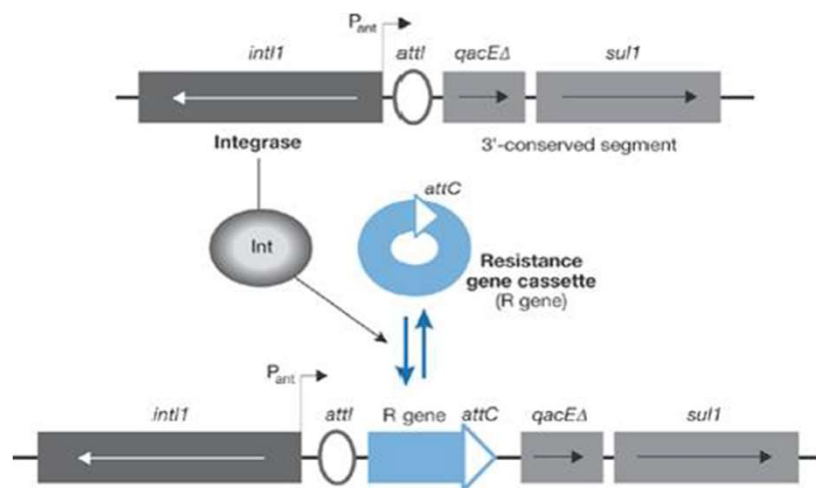
## Μετάθεση με αντιγραφή

Άμεσος ανασυνδυασμός του δότη και της θέσης στόχου, με αποτέλεσμα την αντιγραφή του μεταθετού στοιχείου του δότη



# Φορείς γονιδίων

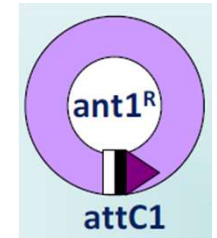
- ▶ Πλασμίδια
- ▶ Μεταθετά στοιχεία
  - ▶ Αλληλουχίες εισδοχής
  - ▶ Transposons
- ▶ **Integrans**



## Integrans

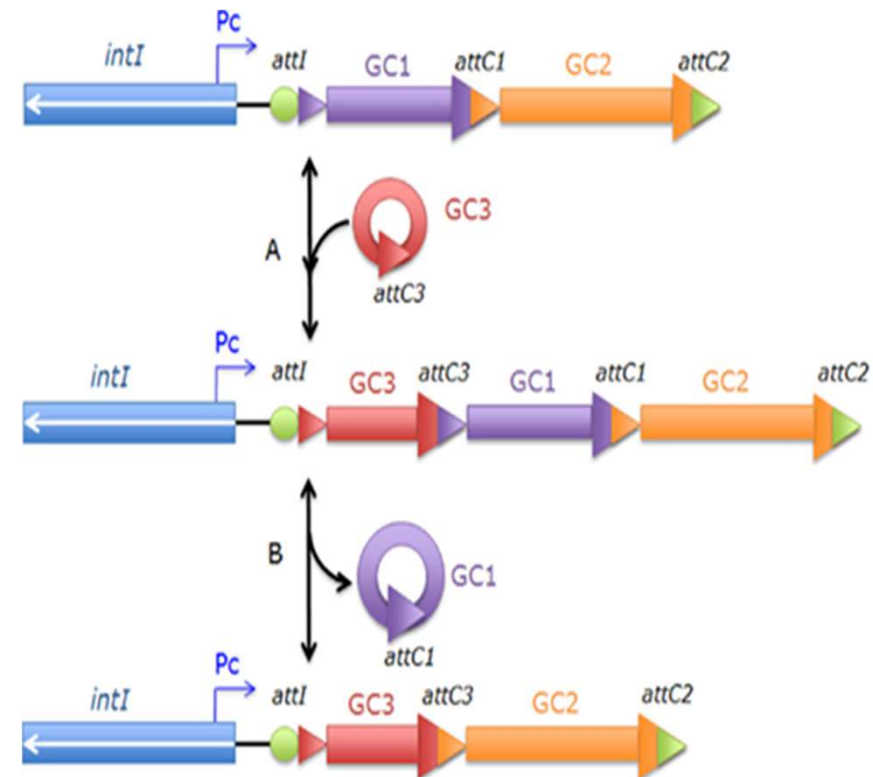
- ▶ Μεταθετά γενετικά στοιχεία ικανά να αναγνωρίζουν και να ενσωματώνουν γονιδιακές κασέτες
- ▶ Χαρακτηρίζονται από την παρουσία τριών δομικών στοιχείων:
  - ▶ την ιντεγκράση (*intI*)
  - ▶ την ειδική θέση ανασυνδυασμού (*attI*) για την ενσωμάτωση της κασέτας
  - ▶ έναν υποκινητή (P) για την έκφραση των ενσωματωμένων γονιδιακών κασετών
- ▶ Οι γονιδιακές κασέτες είναι μικρά μεταθετά στοιχεία, τα οποία περιλαμβάνουν ένα μόνο γονίδιο και μια θέση ανασυνδυασμού (*attC*), γνωστή ως 59-be.
- ▶ Τα ιντεγκρόνια μετακινούνται με πλασμίδια και τρανσποζόνια, ενώ έχουν βρεθεί και στο βακτηριακό χρωμόσωμα



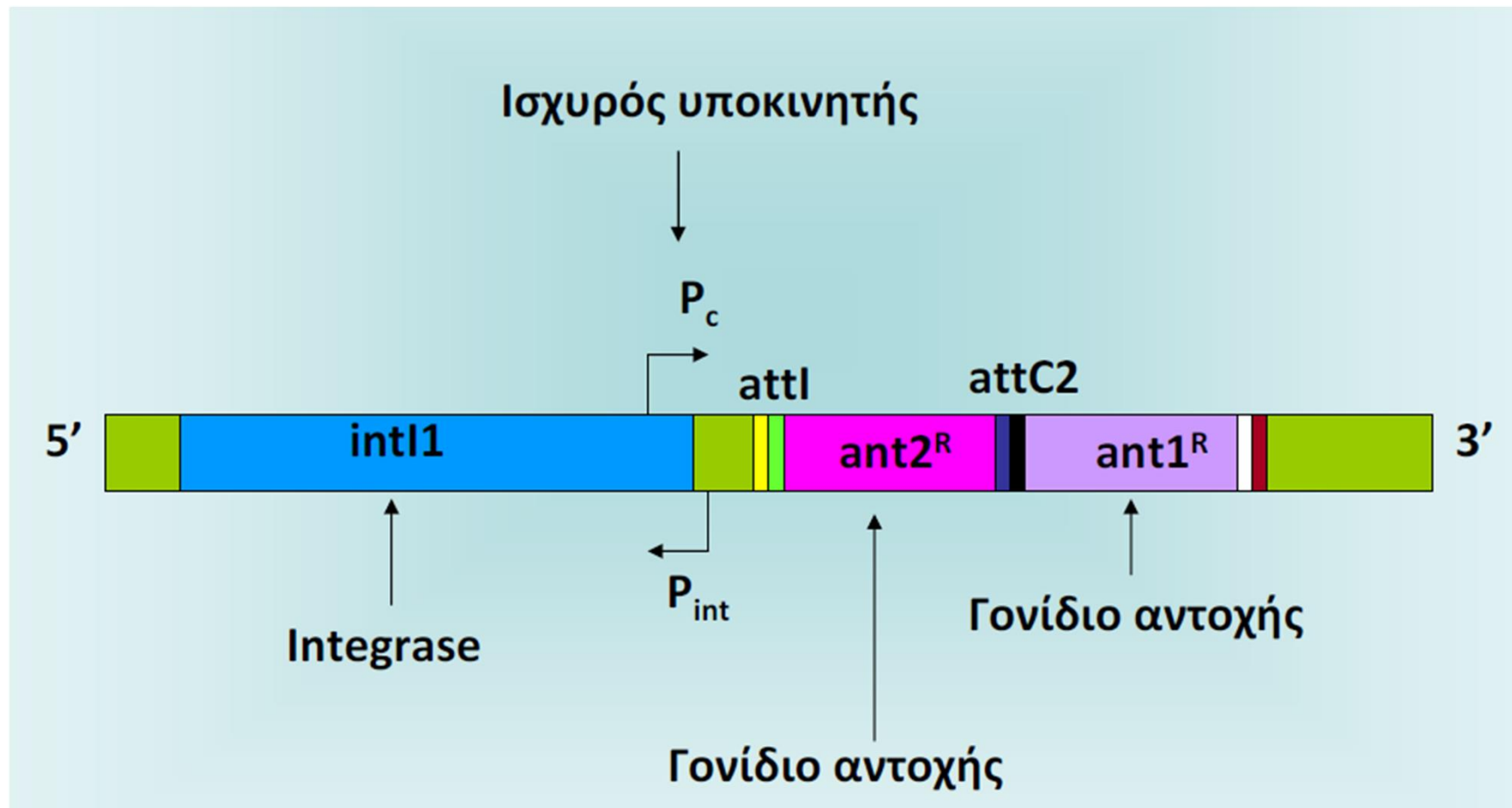


# Απόκτηση γονιδιακής κασέτας

- ▶ Τα integrons αποκτούν νέες γονιδιακές κασέτες με ανασυνδυασμό μεταξύ της *attC* θέσης της κασέτας και της θέσης *attI* του integron.
- ▶ Κάθε γονίδιο που ενσωματώνεται στην *attI* περιοχή ακολουθείται από μια ένα 59bp (*attC*).
- ▶ Τα «νέα» γονίδια ενσωματώνονται προς την 5' περιοχή, μεταξύ δηλαδή των ήδη ενσωματωμένων και του υποκινητή).
- ▶ Οι γονιδιακές κασέτες φέρουν γονίδια για παραγωγή β-λακταμασών, αντοχή σε αμινογλυκοσίδες, χλωραμφαινικόλη, τριμεθοπρίμη, κ.ά.
- ▶ Οι κασέτες μπορούν επίσης να αφαιρεθούν ως κυκλικά μόρια με ανασυνδυασμό των θέσεων *attI* & *attC* ή *attC* & *attC*.



# Ολοκληρωμένη μορφή ενός **integron**



# Ερωτήσεις?

---





ΠΜΣ Λοιμωξιολογία

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

# Βασικοί μηχανισμοί αντοχής

Ειρήνη Γαλάνη, Ερευνήτρια Βιολόγος PhD, Ε.ΔΙ.Π, ΕΚΠΑ

22 Οκτωβρίου 2019

# Στόχοι δράσης αντιβιοτικών

Σύνθεση  
κυτταρικού  
τοιχώματος

## Cell Wall Synthesis

### Beta Lactams

Penicillins  
Cephalosporins  
Carbapenems  
Monobactams

**Vancomycin**  
**Bacitracin**

**Cell Membrane**  
Polymyxins

## Folate synthesis

Sulfonamides  
Trimethoprim

PABA  
DHF A  
THF A

## Nucleic Acid Synthesis

**DNA Gyrase**  
Quinolones

**RNA Polymerase**  
Rifampin

50S  
30S

**50S subunit**  
Macrolides  
Clindamycin  
Linezolid  
Chloramphenicol  
Streptogramins

**30S subunit**  
Tetracyclines  
Aminoglycosides

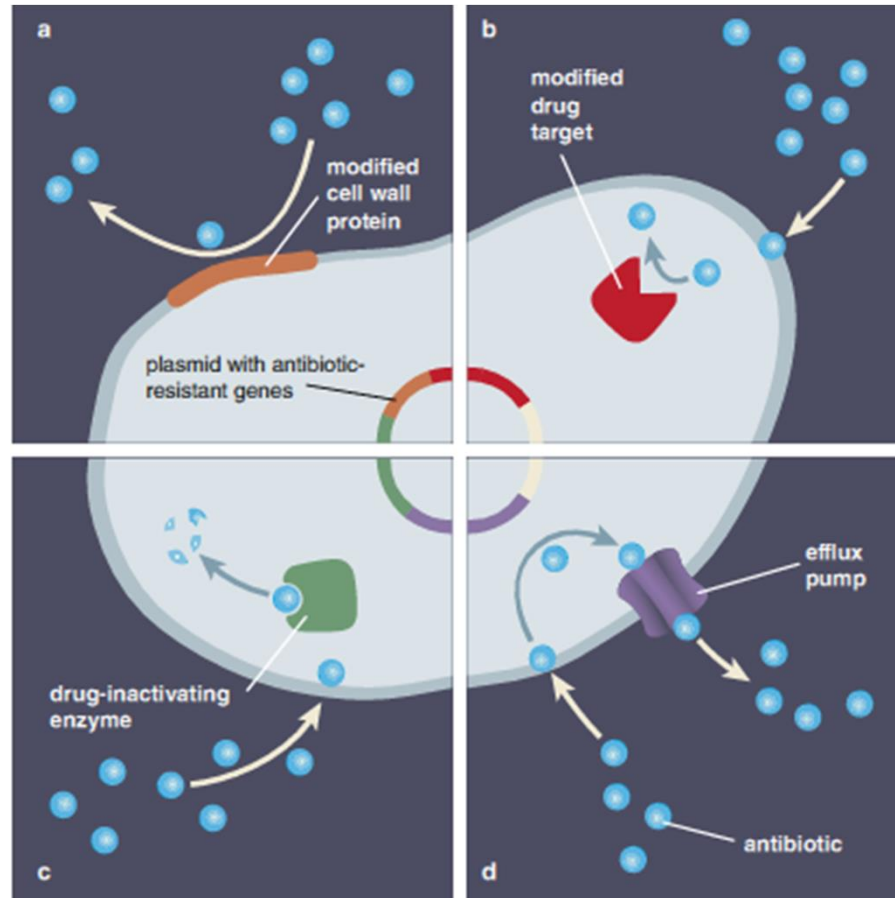
## Protein Synthesis

Σύνθεση  
νουκλεϊκών  
οξέων

Πρωτεϊνο-  
σύνθεση

# Μηχανισμοί αντοχής

Ελαττωμένη  
κυτταρική  
διαπερατότητα



Τροποποίηση του  
στόχου δράσης

Παραγωγή  
ενζύμων που  
εξουδετερώνουν  
τα αντιβιοτικά

Ταχεία εκροή του  
αντιβιοτικού (μέσω  
αντλιών efflux)



# Κύριες ομάδες αντιβιοτικών

Αντιβιοτικό	Μηχανισμός δράσης	Κύριοι μηχανισμοί αντοχής		
		Ενζυμική αδρανοποίηση	Τροποποίηση στόχου	Άλλο
β-Λακτάμες	Αδρανοποιούν τις PBPs (σύνθεση πεπτιδογλυκάνης)	<b>β-λακταμάσες</b>	Τροποποίηση PBPs Παράκαμψη στόχου ( <i>mecA S.aureus</i> )	Αντλίες ενεργητικής εκροής Μειωμένη πρόσληψη (πορίνες)
Αμινογλυκοσίδες	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης (πρόσδεση στην 30S υπομονάδα)	<b>Τροποποιητικά ένζυμα αμινογλυκοσιδών</b>	<b>Μεθυλίωση rRNA</b>	Αντλίες ενεργητικής εκροής Μειωμένη πρόσληψη
(Φλουоро) Κιολόνες	Αναστολή τοποϊσομεράσης (σύνθεση DNA)	Τροποποιητικά ένζυμα (AAC(6')-Ib-cr)	<b>Τροποποίηση στόχου</b> <i>gyrA, parC</i>	Αντλίες ενεργητικής εκροής Μειωμένη πρόσληψη (πορίνες)
Γλυκοπεπτίδια	Αναστολή της χιαστής σύνδεσης των αλύσεων της πεπτιδογλυκάνης		<b>Τροποποίηση προδρόμου</b> ( <i>vanA, vanB, vanD vanC, vanE, vanG</i> )	
Μακρολίδες	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης (πρόσδεση στην 50S υπομονάδα)		<b>Μεθυλίωση rRNA</b> ( <i>erm</i> )	<b>Αντλίες ενεργητικής εκροής</b> ( <i>mefA</i> )

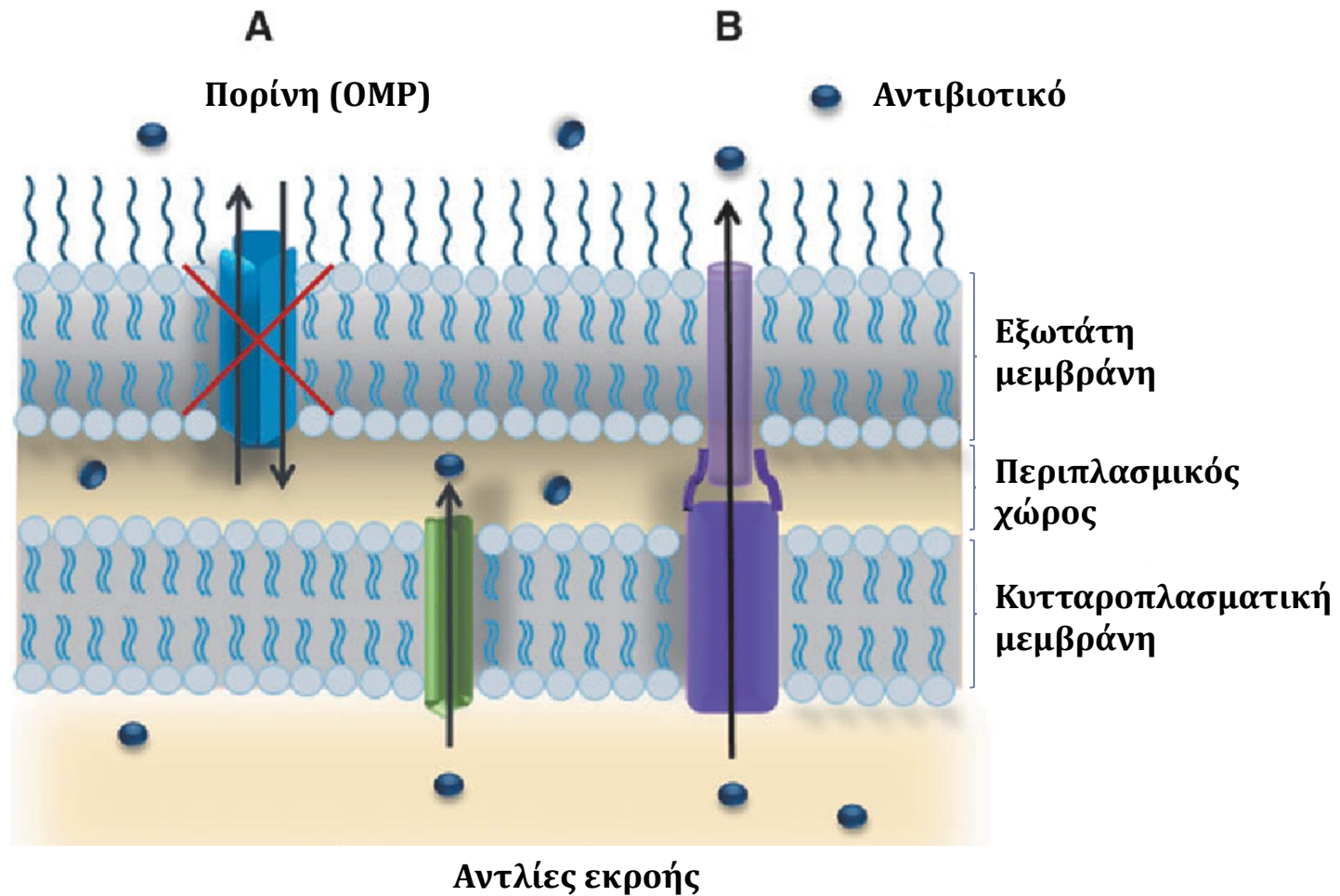
# Κύριες ομάδες αντιβιοτικών

Αντιβιοτικό	Μηχανισμός δράσης	Κύριοι μηχανισμοί αντοχής		
		Ενζυμική αδρανοποίηση	Τροποποίηση στόχου	Άλλο
Λινεζολίδη	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης (23S rRNA) Τροποποίηση θέσης σύνδεσης του tRNA – Αναστολή σχηματισμού αρχικού συμπλέγματος 70S		Σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο του 23S (συχνότερη η G2576T)	Αντλίες ενεργητικής εκροής Gram (-), εγγενής αντοχή
Κολιστίνη	Αποδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης Αναστολή αναπνευστικών ενζύμων NDH2		<b>Τροποποίηση LPS</b>	Τροποποίηση κάψας Αντλία ενεργητικής εκροής KpnEF
Τετρακυκλίνες	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης		Προστασία ριβοσώματος ( <i>tetM</i> )	<b>Αντλίες ενεργητικής εκροής (<i>tetA</i>)</b> Μειωμένη πρόσληψη
ΡΙφαμπικίνη	Ενώνεται με την RNA-πολυμεράση και αναστέλλει το σχηματισμό του mRNA		<b>Μεταλλαγές στο <i>groB</i></b> (RNA πολυμεράση)	Τροποποίηση ριφαμπικίνης ( <i>Arr</i> )



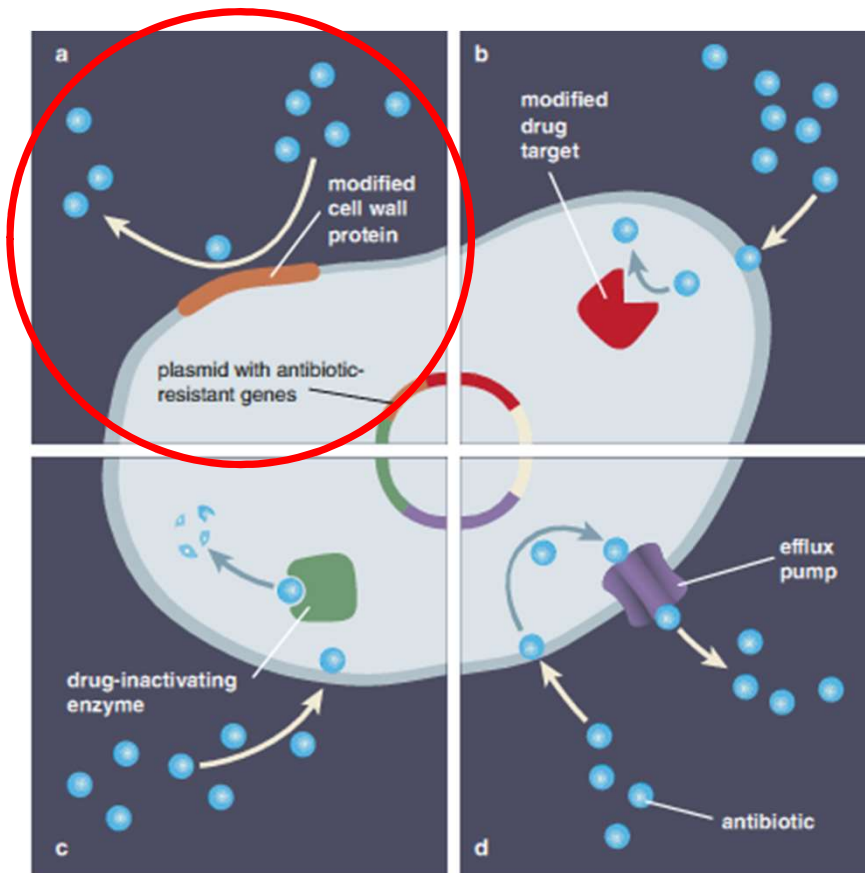


# Μεταβολές στη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης των Gram-αρνητικών βακτηρίων



# Μεταβολή διαπερατότητας

## Μειωμένη είσοδος



### ▶ Ενδογενής

- ▶ Εντεροβακτηριακά & Γλυκοπεπτιδία

### ▶ Επίκτητη

- ▶ Απώλεια πορινών μπορεί να συμβεί in vivo

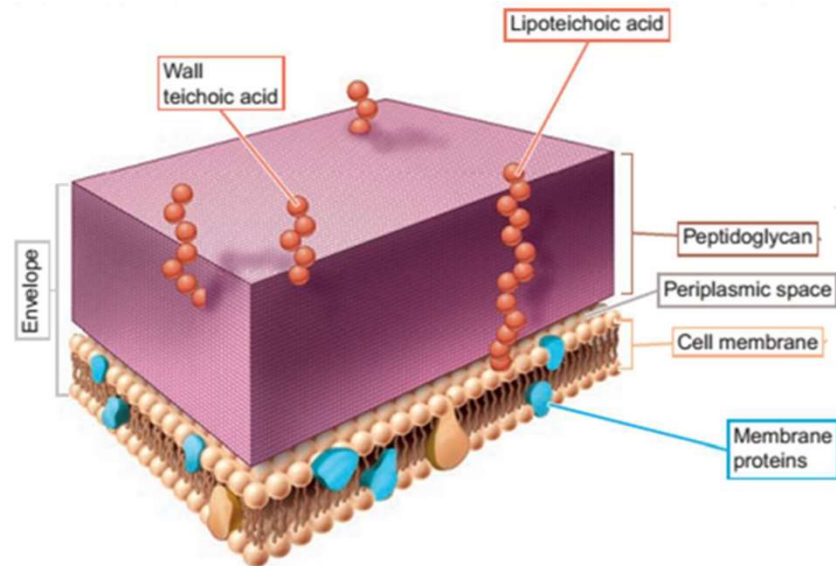
- ▶ IS elements
- ▶ Πρόωρα κωδικόνια λήξης
- ▶ Μετατόπιση πλαισίου

### ▶ Παραδείγματα:

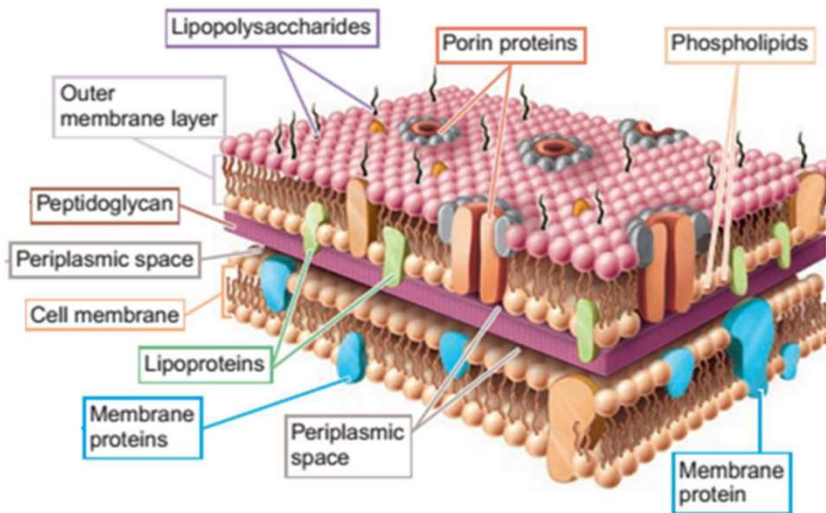
- ▶ *P. aeruginosa* – ιμιπενέμη (OprD)
- ▶ *Klebsiella* spp. – ιμιπενέμη (OmpK35, OmpK36)
- ▶ VISA (*S. aureus*)
- ▶ Gram (-) - κινολόνες (πορίνες)
- ▶ Gram (-) - αμινογλυκοσίδες (LPS)

# Κυτταρικό τοίχωμα

## Gram-Θετικά

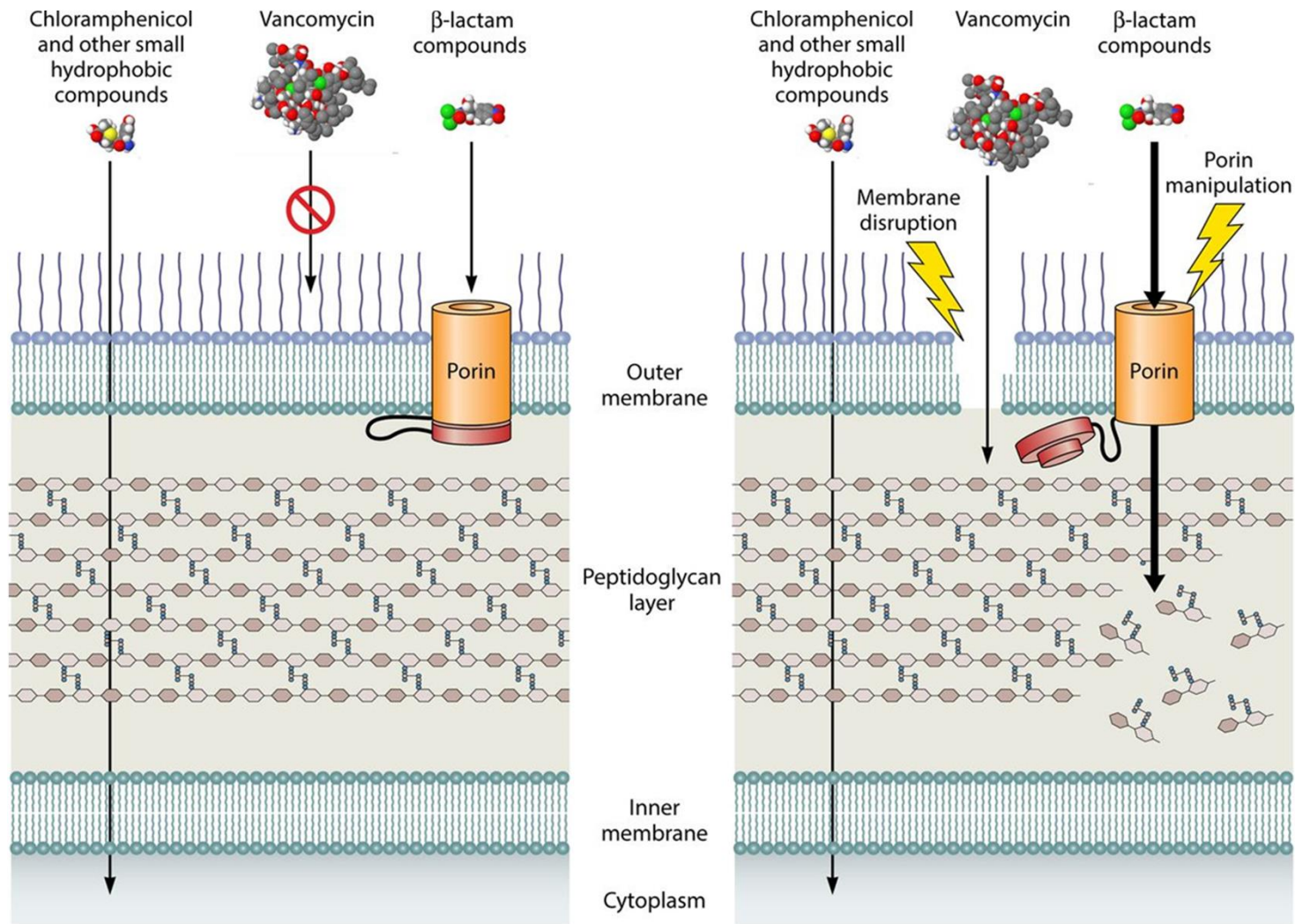


## Gram-Αρνητικά



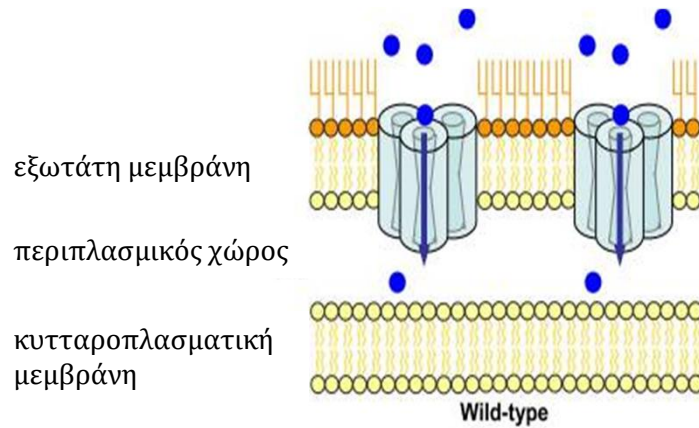
Οι διαφορές στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος σχετίζονται τόσο με την Gram-χρώση, όσο και την φυσική αντοχή των μικροβίων έναντι κάποιων αντιβιοτικών που δεν μπορούν λόγω μεγέθους να διέλθουν από τις πορίνες των Gram-αρνητικών βακτηρίων

# Η διάχυση μέσω της ΟΜ επιτρέπει σε υδρόφοβες ενώσεις να φθάσουν τους ενδοκυττάριους στόχους τους

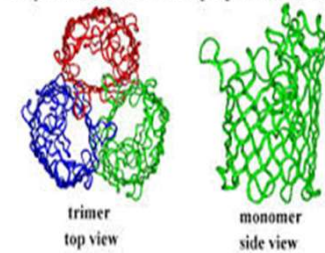




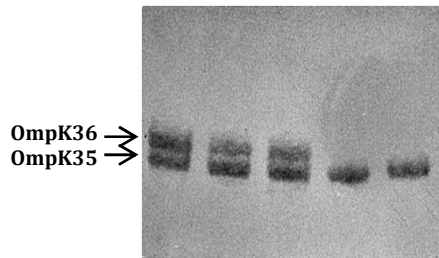
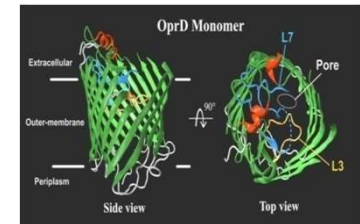
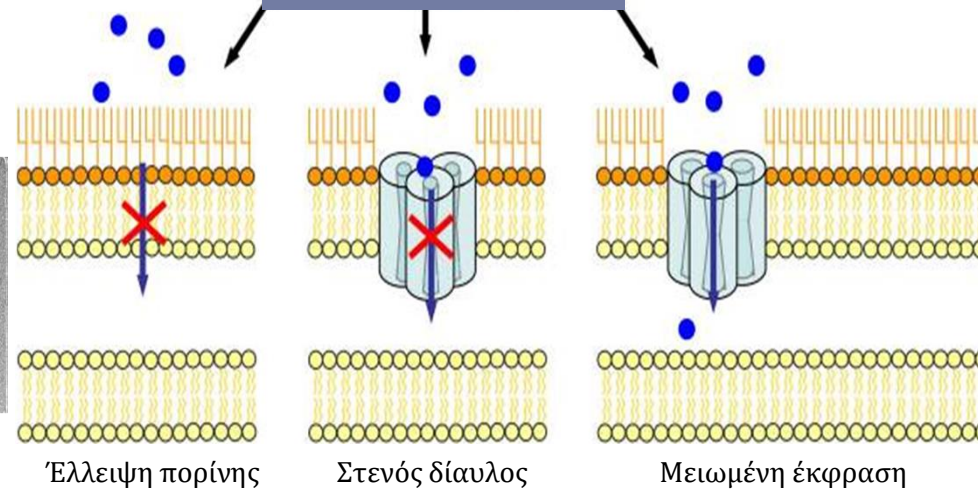
# Ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα – τροποποίηση πορινών



Crystal structure of OmpF porin in *E. coli*



απόκτηση μεταλλάξεων  
αντοχής



# Μεταλλαγές στην OprD που προκλήθηκαν in vitro (έκθεση σε μιπενέμη) σε κλινικά στελέχη *P.aeruginosa*

**Table 4**  
OprD allelic variants compared to PAO1 of the 13 *P. aeruginosa* clinical isolates, ATCC27853 and their isogenic persistent or mutated strains obtained during determination of MPCs.

Isolate	MIC (mg/L)		L1		L2				L3				L4				L5				L6				L7		L8													
	IMP	MEM	43	57	59	103	115	120	127	170	181	185	186	189	202	210	230	231	240	244	262	265	267	276	277	278	281	296	301	310	312	315	347	354	359	372/383	403	424	425	
PAO1			D	S	S	T	K	Y	V	F	T	E	P	V	E	I	E	D	S	I	N	G	A	T	W	S	A	K	Q	R	G	A	L	G	V	S	Q	G		
U4131	2	2																																						
4131A	8	4						-																																
U4145	2	2																																						
4145A	8	8																																						
b3553	1	4				S	T			L		Q	G	T																										A
3553A	>32	8				S	T			L		Q	G	T																										
P3281	0.5	2				S	T			L		Q	G	T																										A
3281A	16	2				S	T			L		Q	G	T																										
3267	1	0.5							L			Q	G	T	Q	A	K	T																						
3267A	8	16							L			Q	G	T	Q	A	K	T																						
U4185	2	0.12							L			Q	G	T	Q	A	K	T																						
4185A	16	8							L			Q	G	T	Q	A	K	T																						
b3546	2	2	N	E	R																																			
3546A	16	16	N	E	R																																			
P3322	2	0.5	N	E	R																																			
3322A	16	16	N	E	R																																			
b3201	1	0.25	N	E	R																																			
3201A	16	4	N	E	R																																			
ATCC27853	2	0.5	N	E	R																																			

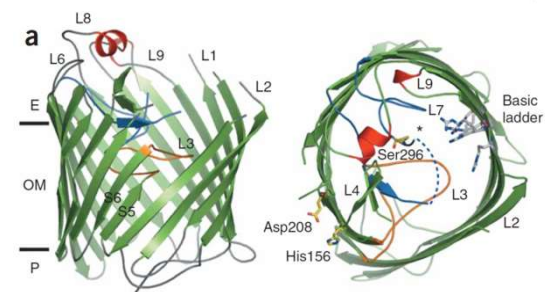
Loop L1, amino acids 47-61; Loop L2, amino acids 93-127; Loop L3, amino acids 153-192; Loop L4, amino acids 221-233; Loop L5, amino acids 260-274;

Loop L6, amino acids 304-317; Loop L7, amino acids 352-392; Loop L8, amino acids 418-431

\* Short L7 Loop: Stop codon, Frameshift

Gray shaded: OprD amino acid changes in mutated isolates compared to their isogenic clinical isolates.

aa change



## Συνεισφορά των μεταλλάξεων στις OmpK35 και OmpK36 στην αντοχή στις καρβαπενέμες και στον νέο αναστολέα των KPC “vaborbactam”

Antimicrobial agent	MIC (mg/L)						
	KP-90	TOP10/pl90	KP-128	TOP10/pl128	KP-95	TOP10/pl95	TOP10
Ceftazidime-avibactam	16	8	2	1	2	1	0.5
Imipenem	512	16	128	16	32	8	0.25
Meropenem	512	8	512	8	32	4	0.06
Meropenem-vaborbactam	4	0.06	16	0.06	0.06	0.06	0.03
Doripenem	>64	8	>64	8	32	4	≤0.06
Carbapenemase gene	<i>bla</i> <sub>KPC-23</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC-23</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	-
Major porin	OmpK35	FS_aa89	WT	FS_aa89	WT	FS_aa89	WT
mutation	OmpK36	WT	WT	GD	WT	WT	WT

*FS\_aa89*: Μετατόπιση πλαισίου λόγω εισδοχής νουκλεοτιδίου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία κωδικωνίου λήξης στο αμινοξύ 89  
*OmpK36-WT*: Πορίνη χωρίς μεταλλάξεις (WP\_002913005.1)  
*GD*, Διπλασιασμός των αμινοξέων γλυκίνης (G) και ασπαρτικού (D) στις θέσεις 136 και 137

# Πορίνες στην *Klebsiella pneumoniae*

## Πορίνες

<i>Porin loss</i>	<i>Increased resistance/decreased susceptibility</i>
OmpK35	Cephamecins, oxyimino- cephalosporins, zwitterionic cephalosporins, and imipenem
OmpK36	Cefoxitin, oxyimino- cephalosporins, zwitterionic cephalosporins, carbapenem, and fluoroquinolones
LamB	Cefepime, piperacillin–tazobactam, cefotaxime, imipenem, meropenem, and ertapenem
PhoE	Carbapenems
KpnO	Ceftazidime, cefepime, ceftriaxone, tobramycin, streptomycin, spectinomycin, and nalidixic acid tetracycline

## Αντλίες εκροής

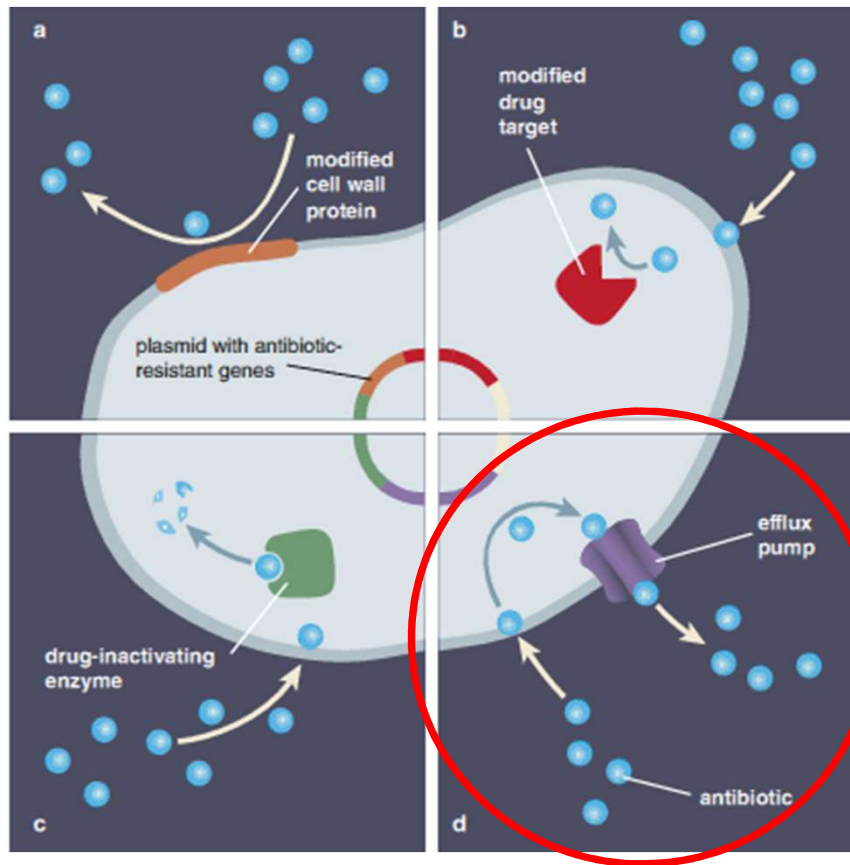
<i>Family of EPs</i>	<i>Components</i>	<i>Increased resistance/decreased susceptibility</i>
RND	AcrAB, TolC	Fluoroquinolones, erythromycin, tetracycline, chloramphenicol, macrolides, and β-lactams
	AcrAB, KocC KexD OqxAB KpnEF	Erythromycin Macrolides Fluoroquinolones
SMR		Cefepime, ceftriaxone, colistin, erythromycin, rifampin, tetracycline, and streptomycin
MFS	KmrA KpnGH	Norfloxacin, kanamycin Azithromycin, ceftazidime, ciprofloxacin, ertapenem erythromycin, gentamicin, imipenem, ticarcillin, norfloxacin, polymyxin-B, piperacillin, spectinomycin, tobramycin, and streptomycin

EPs, efflux pumps; MFS, major facilitator superfamily; RND, resistance–nodulation–division; SMR, small multidrug resistance.



# Μεταβολή διαπερατότητας

## Αυξημένη απέκκριση

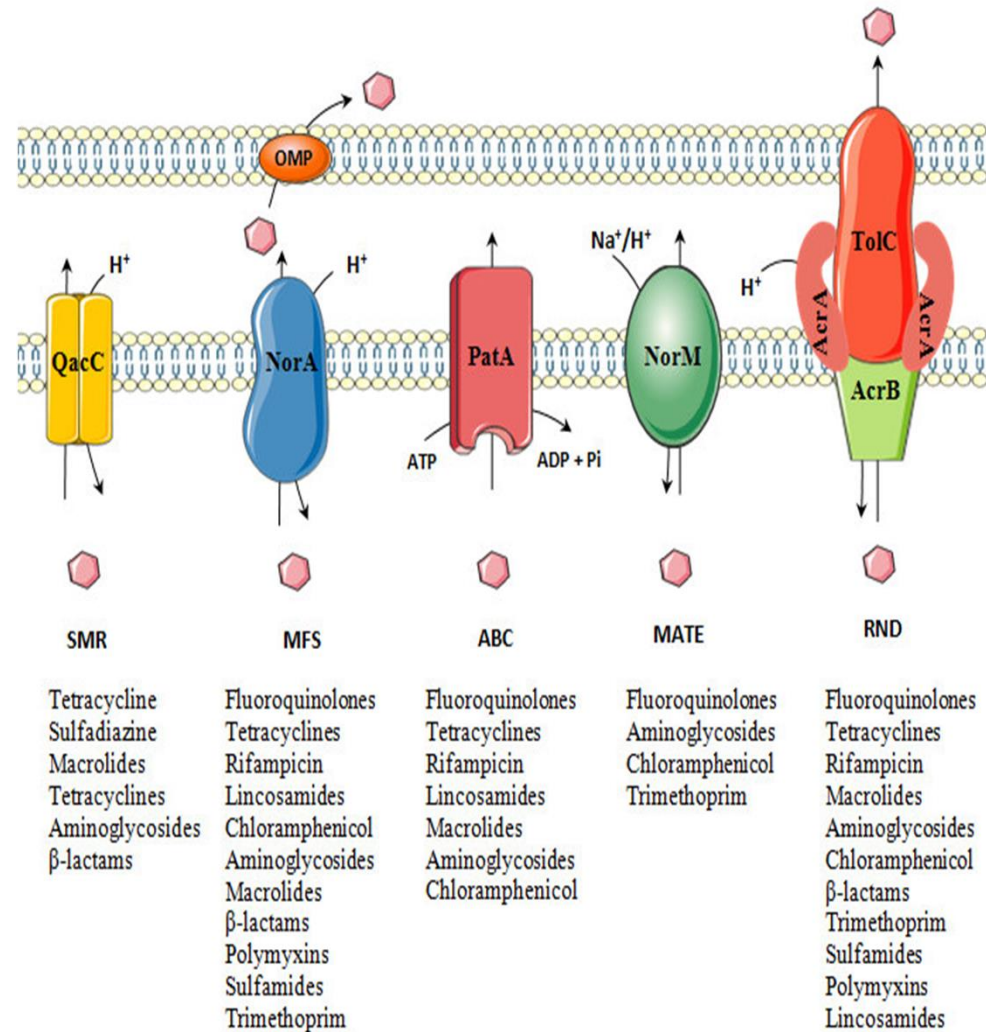


## Παραδείγματα

- ▶ *Enterobacterales* – τετρακυκλίνες
  - ▶ Ο κύριος μηχανισμός αντοχής στην τιγκεκυκλίνη
  - ▶ Η αντοχή δημιουργείται
    - Κατά τη διάρκεια της θεραπείας με τιγκεκυκλίνη
    - Χωρίς προηγούμενη χρήση της τιγκεκυκλίνης
- ▶ *Enterobacterales* – χλωραμφαινικόλη
- ▶ *Staphylococci* – μακρολίδες
- ▶ *S. aureus*, *S. pneumoniae*, Gram (-) - κινολόνες

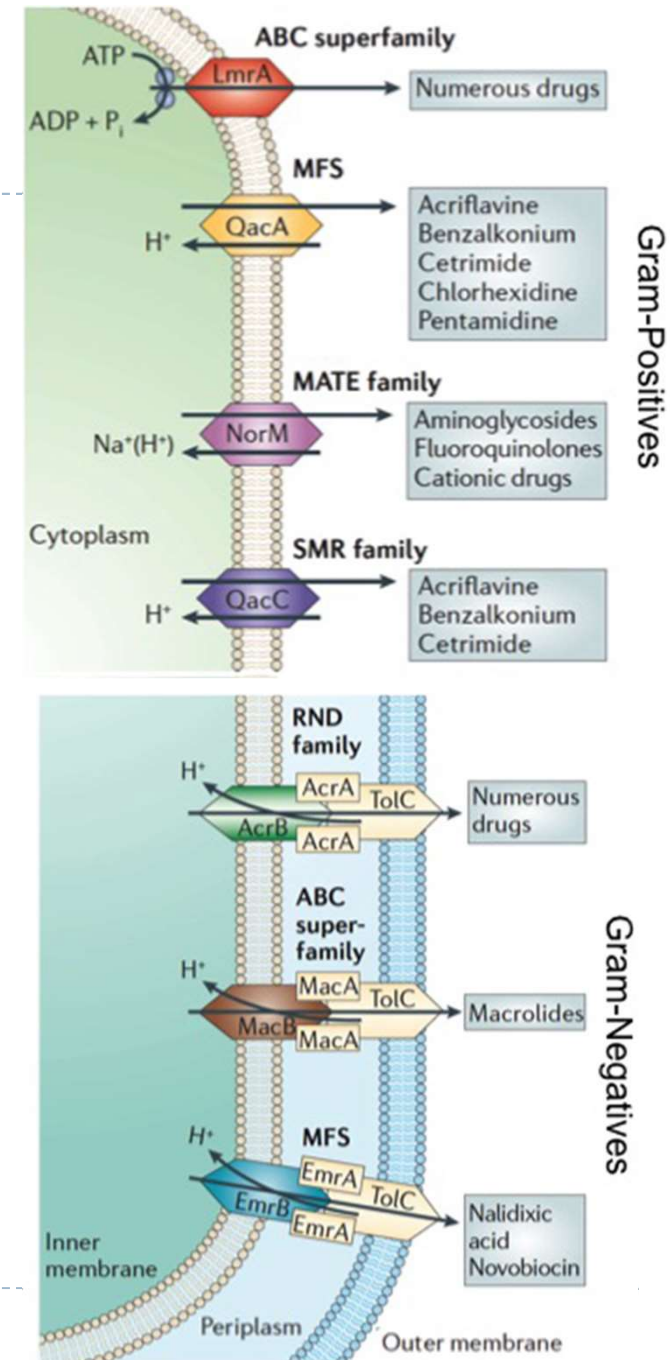
# Αντλίες ενεργητικής εκροής (efflux pumps)

- **SMR:** the small multidrug resistance family
- **MFS:** the major facilitator superfamily
- **ABC:** ATP-binding cassette superfamily
- **MATE:** the multidrug and toxic compound extrusion family
- **RND:** the resistance-nodulation-division family



# Αντλίες ενεργητικής εκροής (efflux pumps)

- ▶ Είναι πρωτεΐνες που εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη όλων των οργανισμών για την αποβολή τοξικών ουσιών
- ▶ Κωδικοποιούνται από σύστημα γονιδίων οργανωμένων σε ένα οπερόνιο
- ▶ Η έκφραση τους είναι ιδιοσυστασιακή, επαγωγίμη ή σιωπηλή
- ▶ Συνήθως αφορούν πολλές ομάδες αντιβιοτικών
- ▶ Μπορεί να συνυπάρχουν διάφοροι τύποι αντλιών, οπότε προκαλείται υψηλού επιπέδου αντοχή
- ▶ Απαιτούν μια πηγή ενέργειας για να εκτελέσουν τη λειτουργία τους
- ▶ Ταξινομούνται με βάση την αμινοξική αλληλουχία και την πηγή ενέργειας που χρησιμοποιούν (ATP ή διαφορά δυναμικού)

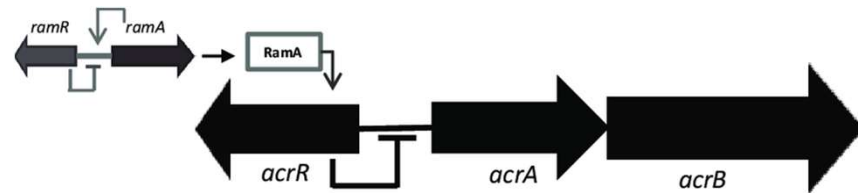


# RND Efflux pumps και αντοχή στην τιγκεκυκλίνη

- ▶ Η αντοχή οφείλεται σε μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τους ρυθμιστές των αντλιών
- ▶ Η μετάλλαξη του ρυθμιστή οδηγεί σε υπερέκφραση των αντλιών

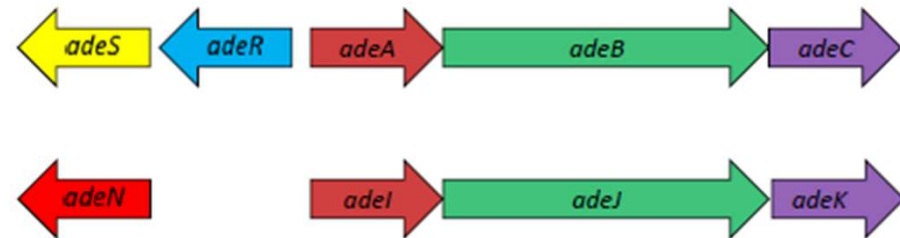
## ▶ *Klebsiella pneumoniae*

- ▶ RamA ενεργοποιεί την αντλία AcrAB
  - ▶ Από το AcrAB εκρέουν οι τετρακυκλίνες, οι β-λακτάμες, η χλωραμφενικόλη και οι κινολόνες



## ▶ *Acinetobacter baumannii*

- ▶ AdeRS ρυθμίζει την AdeABC
- ▶ AdeN ρυθμίζει την AdeIJK
  - ▶ Από τα AdeABC & AdeIJK εκρέουν οι τετρακυκλίνες, οι αμινογλυκοσίδες, η χλωραμφενικόλη, οι κινολόνες και η τριμεθοπρίμη



# Συμμετοχή των IS elements στη ρύθμιση των efflux pumps του *Acinetobacter*

**Table 4.** Overview of ISs and other differences in the efflux pump regulators *adeS* and *adeN* in tigecycline-resistant (MIC >2 mg/L) *A. baumannii* isolates

Genetic modification	Number of isolates	
	<i>adeS</i>	<i>adeN</i>
IS <i>Aba1</i>	3	18
IS <i>Aba27</i>	0	1
IS <i>Aba125</i>	0	1
IS <i>Aba1</i> insertion in intergenic region of <i>adeRS</i>	1	0
<i>adeRSABC</i> missing or truncated	2	0
1-nucleotide deletion	0	6
6-nucleotide insertion	0	2
Premature stop codon	0	3

Η εισδοχή ενός IS στο γονίδιο του ρυθμιστή έχει σαν αποτέλεσμα το “σπάσιμο” του, που οδηγεί σε ελεύθερη έκφραση της αντλίας



Microorganism	MDR efflux pump family	Efflux system	Drug resistance phenotype
<i>Acinetobacter baumannii</i>	RND	AdeABC	Aminoglycosides; cefotaxime; chloramphenicol; erythromycin; fluoroquinolones; tetracyclines; tigecycline; trimethoprim
	SMR	AbeS	Chloramphenicol; ciprofloxacin; erythromycin
<i>Burkholderia</i> sp.	RND	BpeEF-OprC	Trimethoprim
<i>Enterobacteriaceae</i>	RND	AcrAB-TolC	$\beta$ -Lactams; chloramphenicol; erythromycin; fluoroquinolones; novobiocin; tetracycline; linezolid
		OqxAB <sup>a</sup> -TolC	Cetrimide; chloramphenicol; fluoroquinolones; quinolones; nitrofurantoin
	MFS	EmrAB-TolC	Novobiocin; fluoroquinolones
	ABC	MacAB-TolC	Macrolides
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MFS	EfpA	Isoniazid; fluoroquinolones; rifampicin; tetracycline; clofazimine
		Rv1258c	Quinolones
	RND	MmpS5-MmpL5	Isoniazid; diarylquinolones; rifampicin
	SMR	Mmr	Ofloxacin; rifampicin
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RND	MexAB-OprM	Aminoglycosides; amphenicols; $\beta$ -lactams (except imipenem); fluoroquinolones; macrolides; novobiocin; sulfonamides; tetracyclines; thiolactomycin; tigecycline; trimethoprim
		MexCD-OprJ	Chloramphenicol; fluoroquinolones; macrolides; zwitterionic cephalosporins; tetracyclines; trimethoprim
		MexEF-OprN	Chloramphenicol; fluoroquinolones; tetracycline; trimethoprim
		MexXY-OprM	Aminoglycosides; fluoroquinolones; macrolides; tetracyclines; tigecycline; zwitterionic cephalosporins
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	SMR	EmrE	Aminoglycosides; penicillin ( $\beta$ -lactams); azithromycin
	RND	MtrCDE	(macrolides); ceftriaxone
		MtrF	Sulfonamides
	MATE	NorM	Hydrophilic fluoroquinolones
<i>Staphylococcus aureus</i>	MFS	NorA	Hydrophilic fluoroquinolones (for example, norfloxacin and ciprofloxacin)
		QacAB <sup>b</sup>	Biocides and antiseptics (for example, quaternary ammonium benzalkonium salts, chlorhexidine, etc.)
	ABC	MsrA	Macrolides; streptogramins
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	MFS	PmrA	Fluoroquinolones
	ABC	PatAB	Fluoroquinolones
	MATE	PdrM	Chloramphenicol Erythromycin

## Clinically relevant MDR efflux pumps

ABC, ATP- binding cassette

MFS, major facilitator superfamily

MATE, multidrug and toxin extrusion

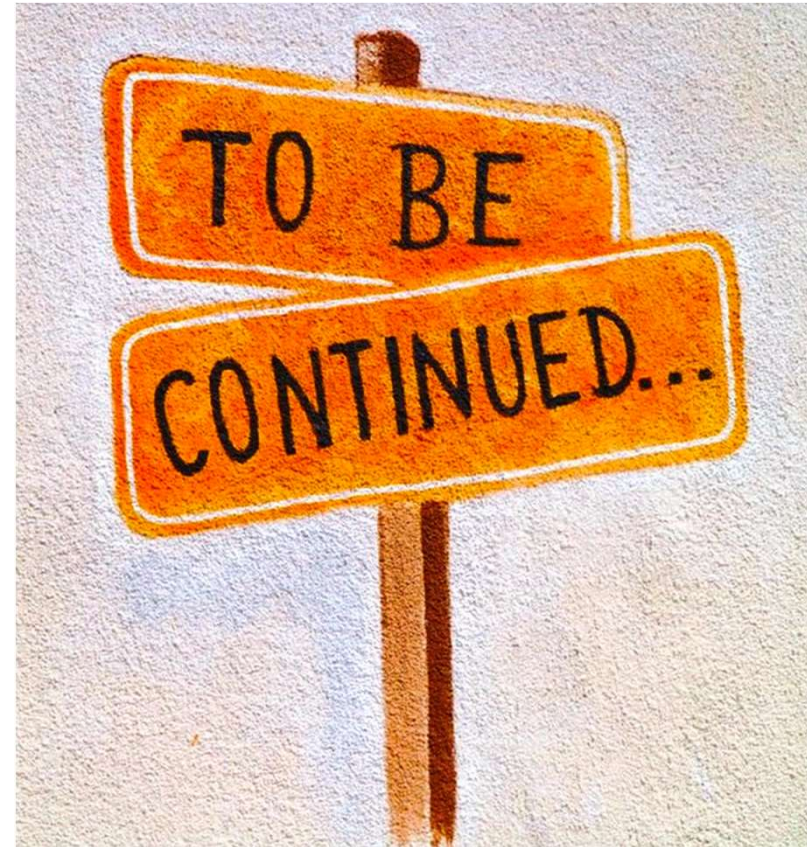
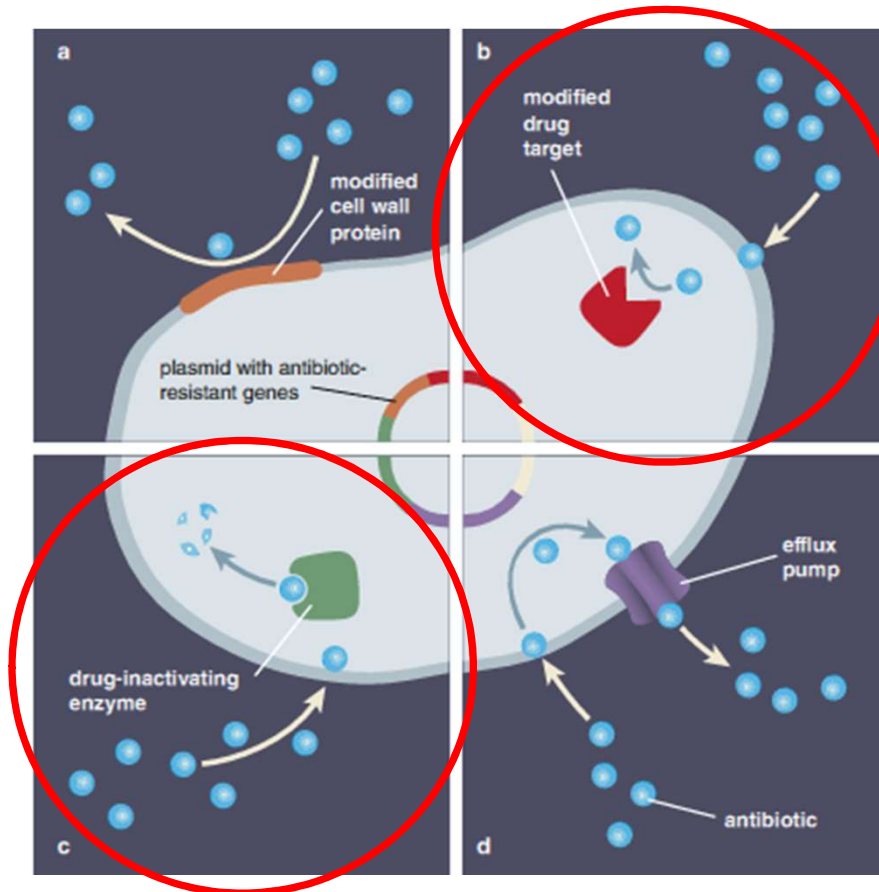
RND, resistance- nodulation- cell division families

SMR , small drug resistance

<sup>a</sup>Pumps that are encoded in plasmids, except for *Klebsiella pneumoniae*

<sup>b</sup>QacAB has been described only in *Staphylococcus aureus*

# Ειδικοί μηχανισμοί αντοχής



Παρασκευή 25 Οκτωβρίου 2019 17:30

Ερωτήσεις?

---

