



ΠΜΣ Λοιμωξιολογία

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

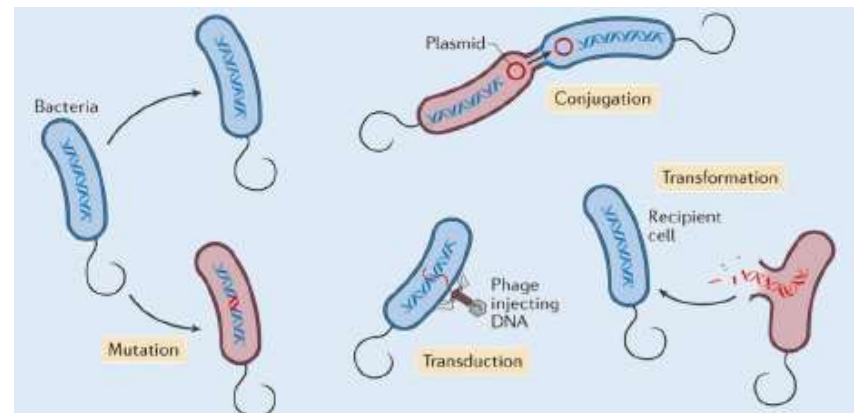
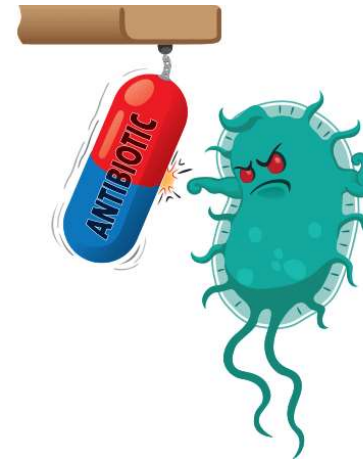
## Γενετική βάση αντιμικροβιακής αντοχής

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

2 Νοεμβρίου 2020

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

- ▶ Ορισμός μικροβιακής αντοχής
  - ▶ Ενδογενής αντοχή
  - ▶ Επίκτητη αντοχή
- ▶ Κλινική αντοχή
- ▶ Μικροβιολογική αντοχή
  - ▶ Επιδημιολογικές “cut-off” τιμές (ECOFFS)
- ▶ Αυτόματες μεταλλάξεις
- ▶ Απόκτηση εξωγενών γονιδίων
  - ▶ Μεταγωγή
  - ▶ Σύζευξη
  - ▶ Μετασχηματισμός
- ▶ Φορείς γονιδίων αντοχής
  - ▶ Πλασμίδια
  - ▶ Μεταθετά στοιχεία
    - ▶ Αλληλουχίες εισδοχής
    - ▶ Transposons
  - ▶ Integrons



# 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  $\leq$  ECOFF

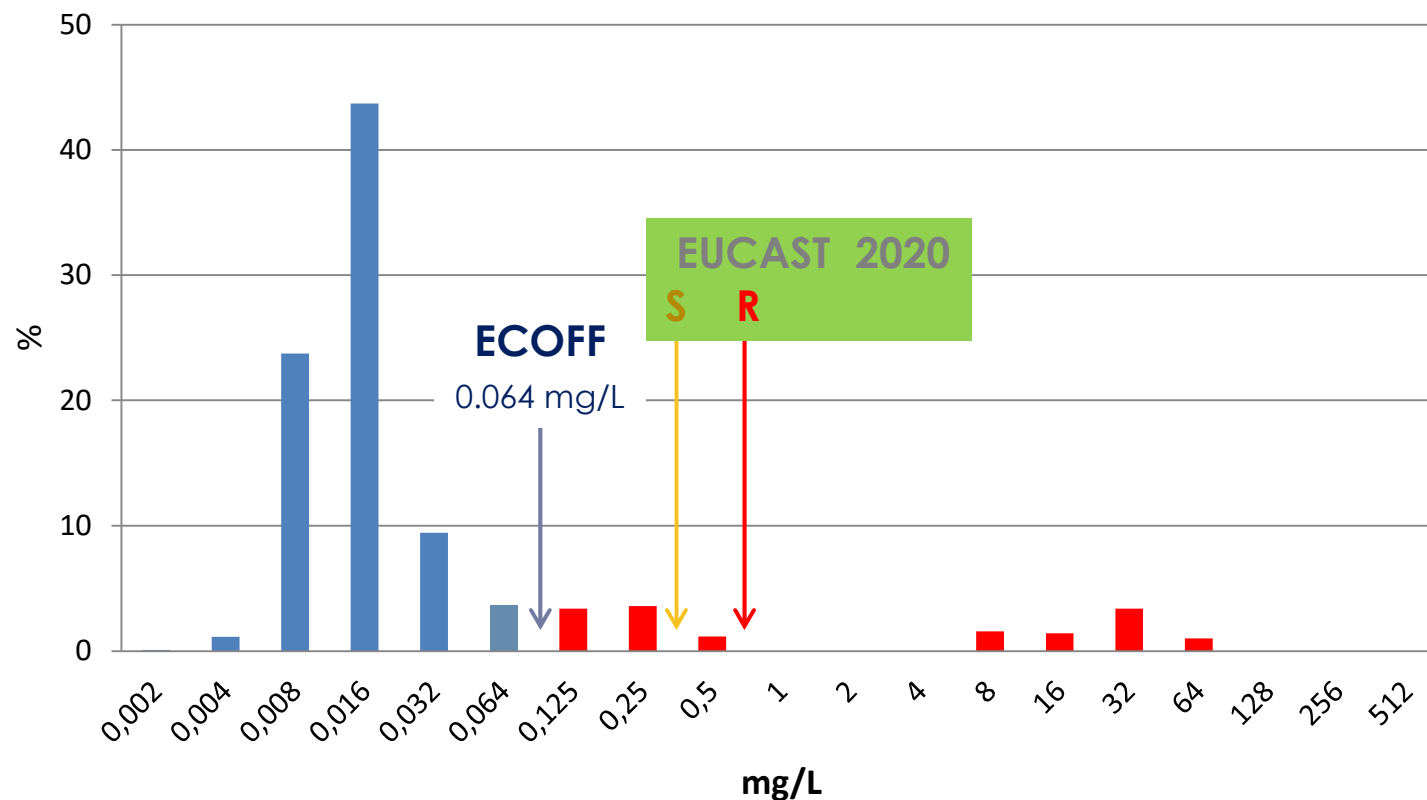
## Non-Wild Type (NWT)

- ▶ 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

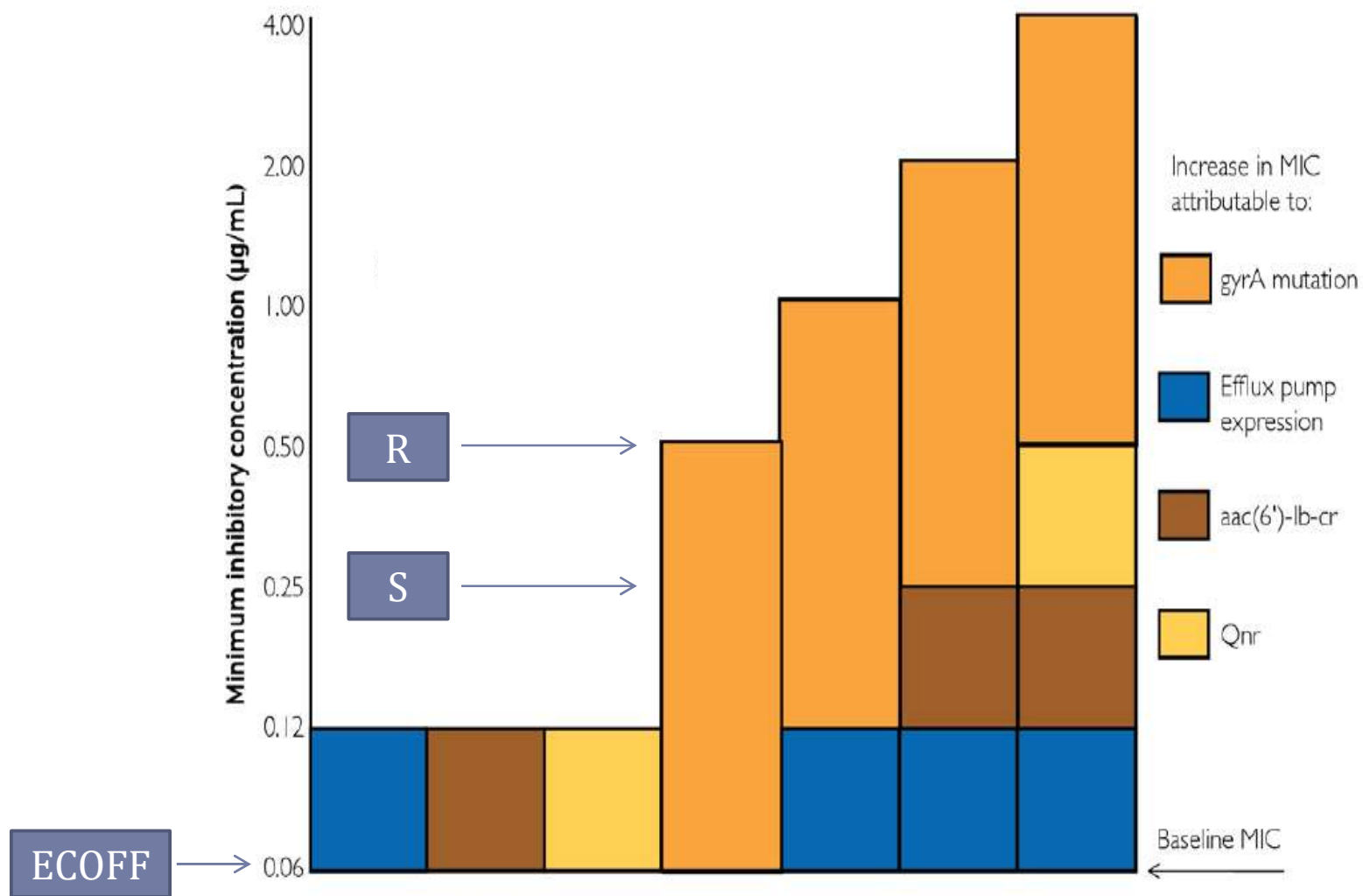
EUCAST  
 $S \leq 0.25$ ,  $R > 0.5$

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

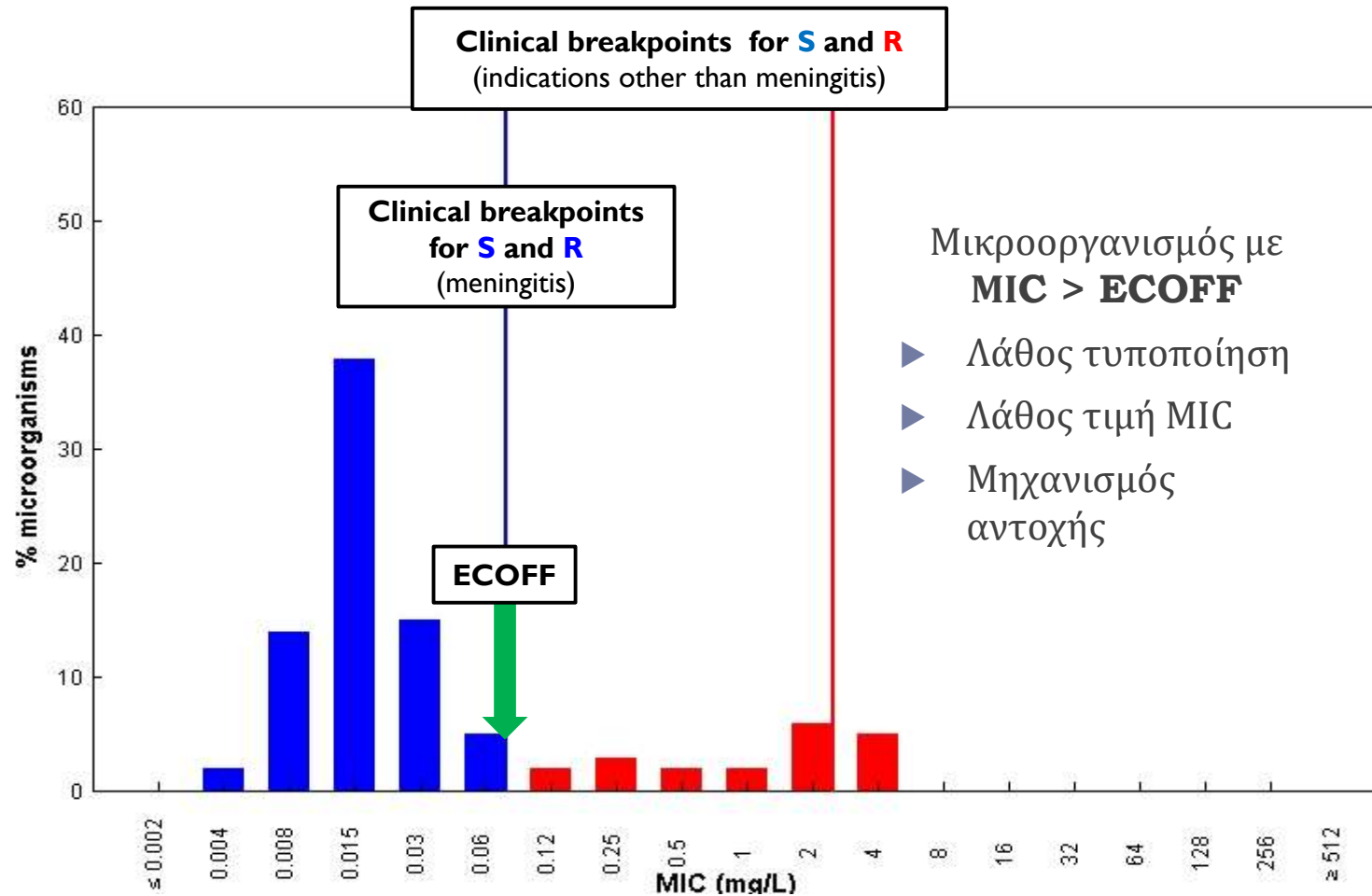
## Αντιπροσωπευτικό γράφημα της συνεισφοράς διάφορων μεμονωμένων και συνδυασμένων μηχανισμών αντοχής στις φθοριοκινολόνες





# Benzylpenicillin / *Streptococcus pneumoniae*

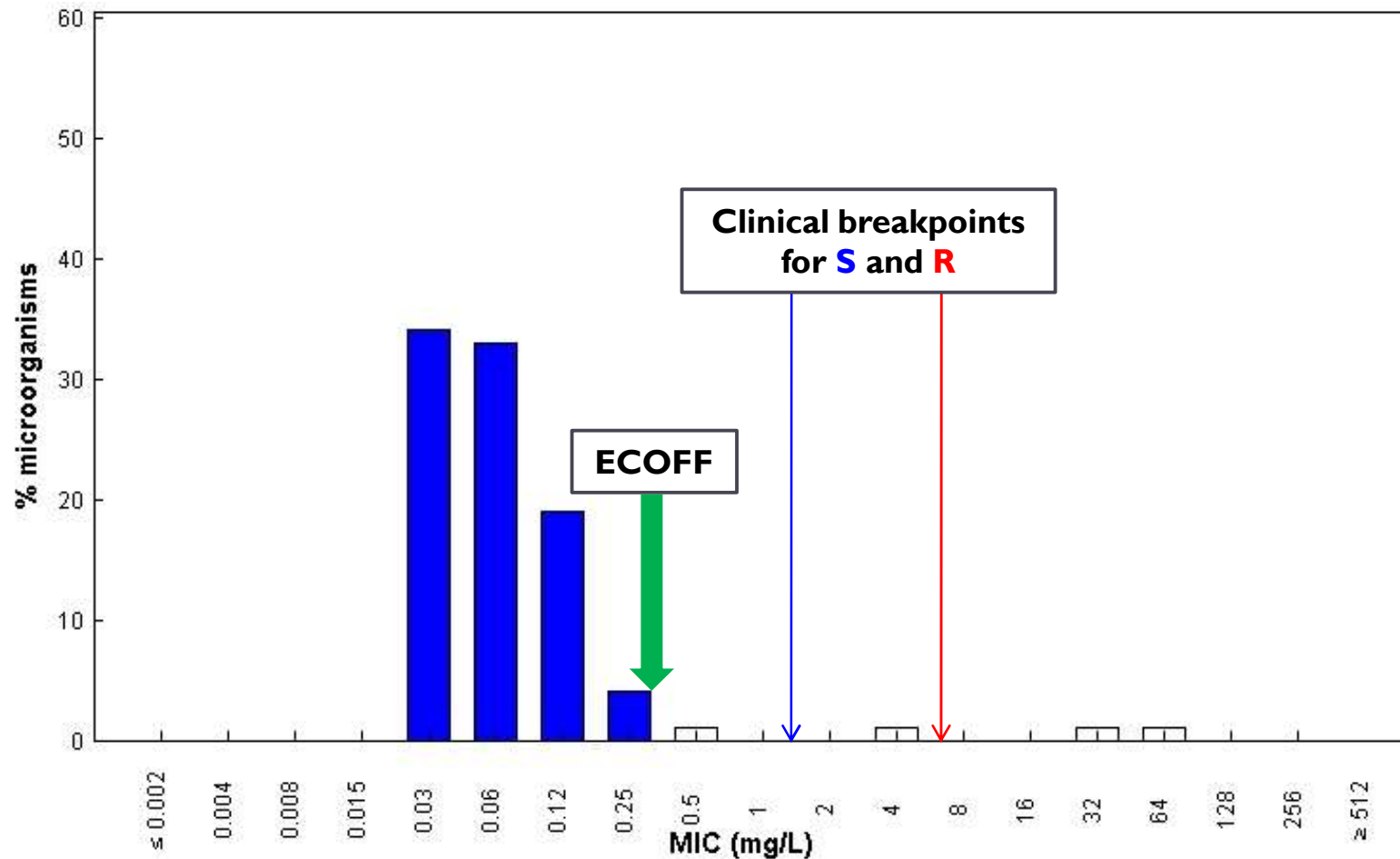
## International MIC distribution



Epidemiological cut-off: 0.064 mg/L  
Wildtype (WT) organisms: ≤0.064 mg/L

37742 μετρήσεις

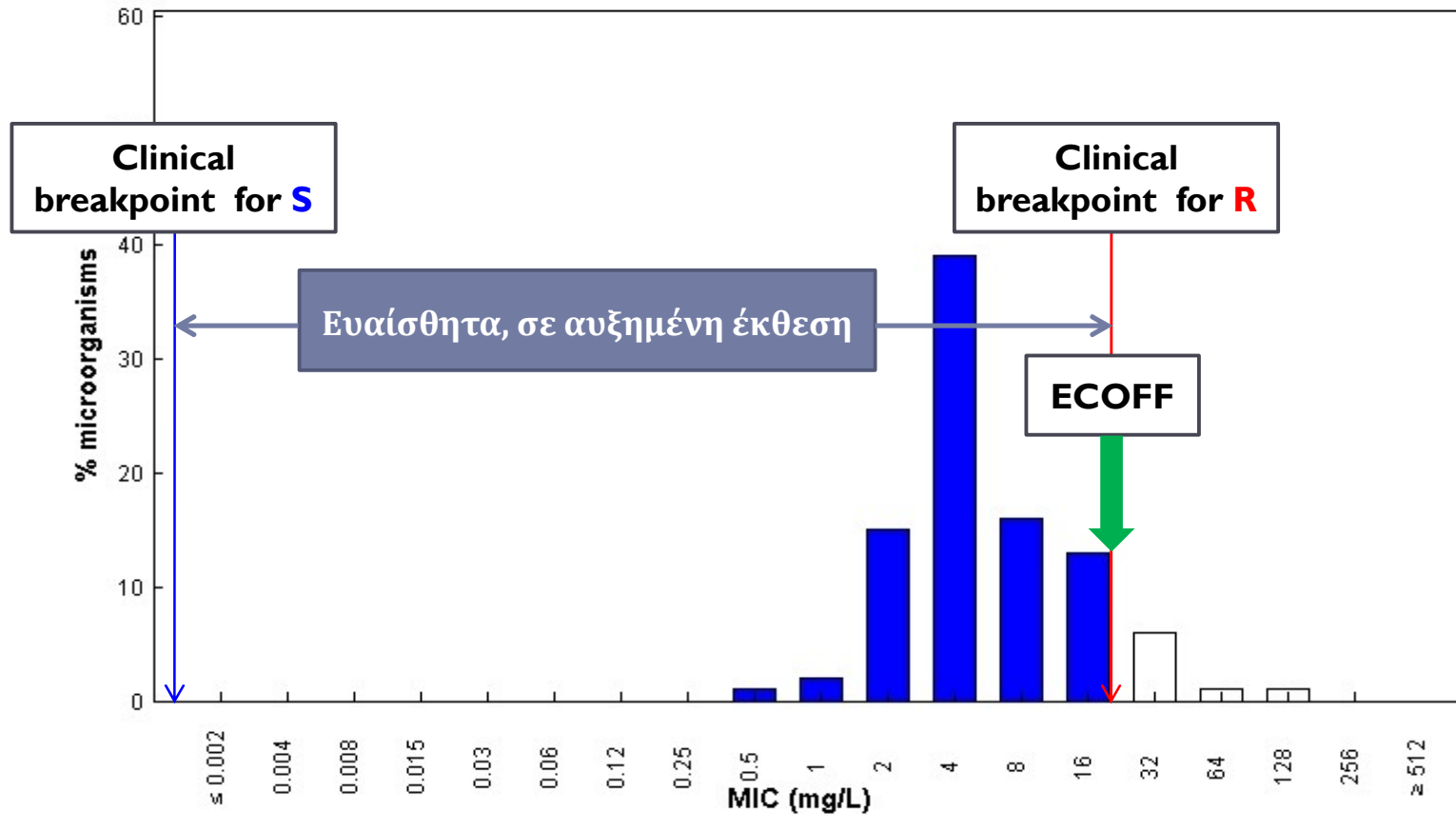
# Aztreonam / *Escherichia coli* International MIC distribution



Epidemiological cut-off (ECOFF): 0.25mg/L  
Wildtype (WT) organisms: ≤0.25 mg/L

3192 μετρήσεις

# Aztreonam / *Pseudomonas aeruginosa* International MIC distribution

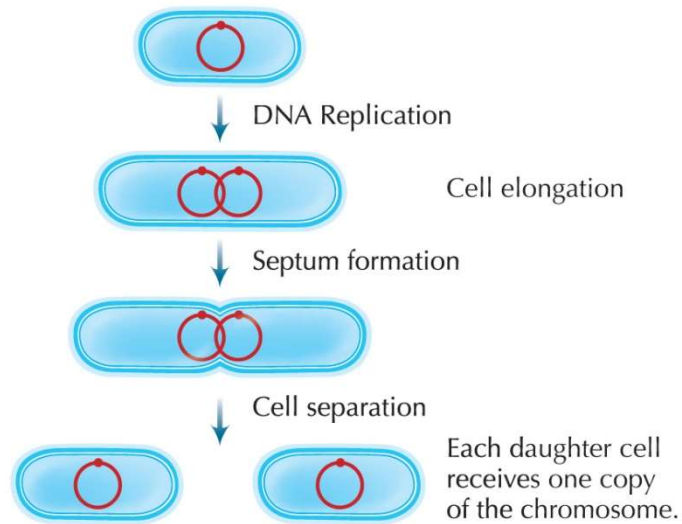


Epidemiological cut-off (ECOFF): 16mg/L  
Wildtype (WT) organisms: ≤16 mg/L

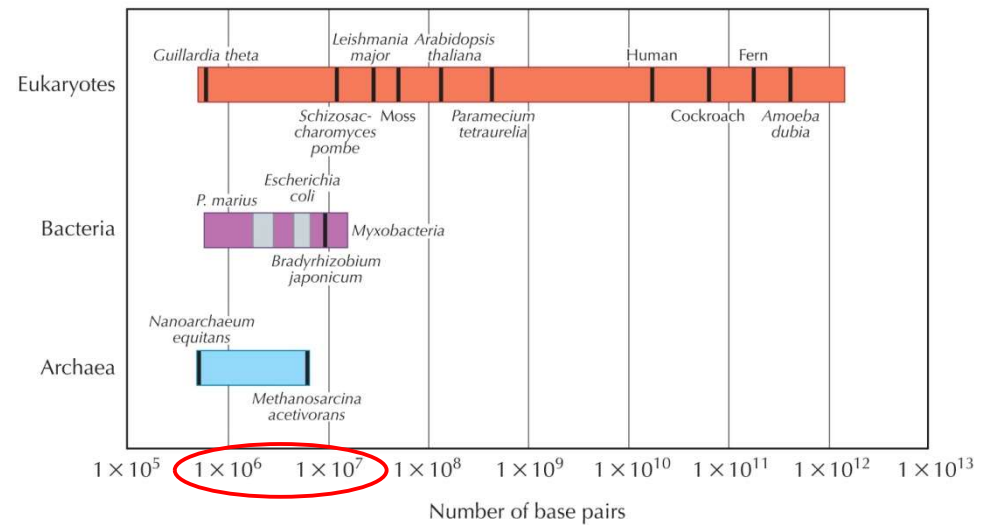
3293 μετρήσεις

# Κυτταρική διαίρεση

## Διχοτόμηση

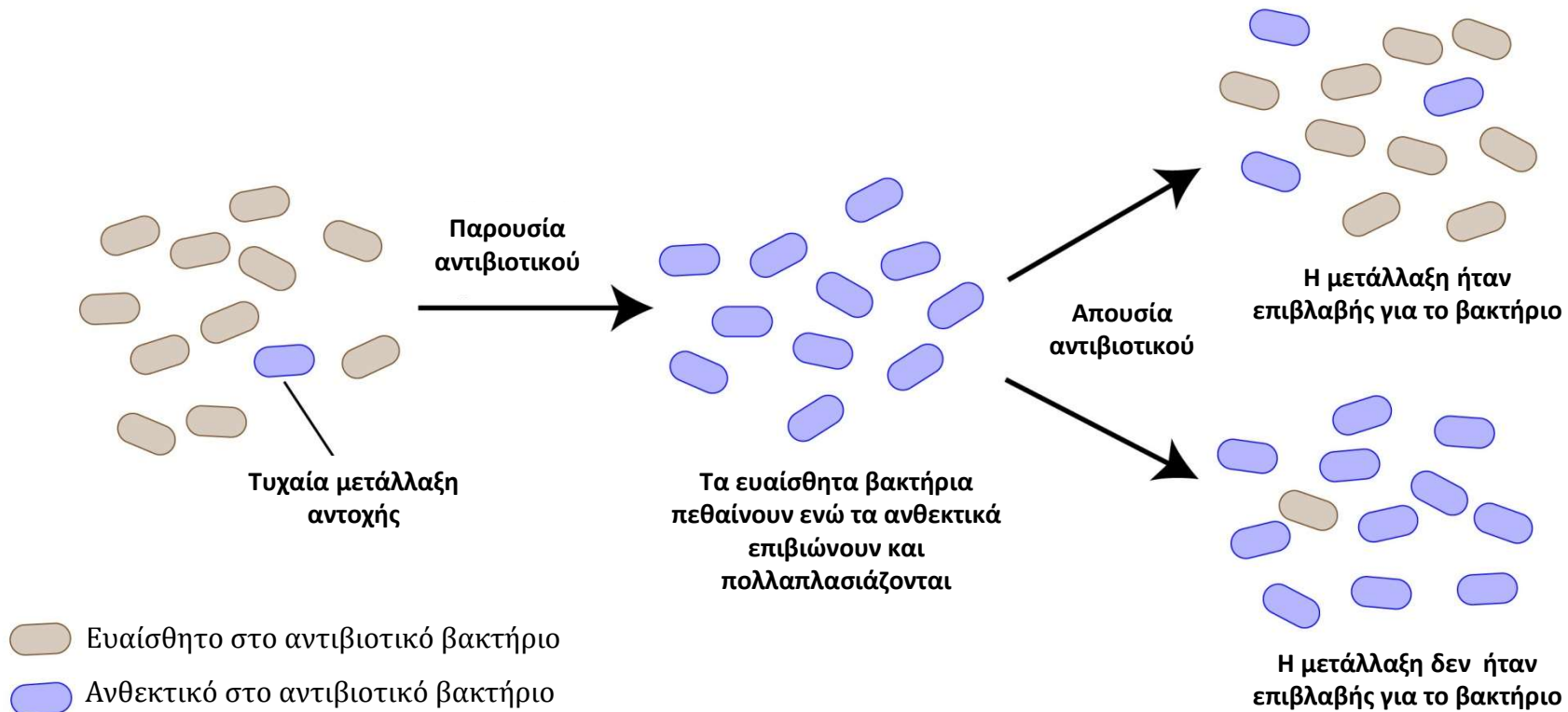


## Μέγεθος γονιδιώματος



# Αυτόματες μεταλλάξεις σε ενδογενή γονίδια

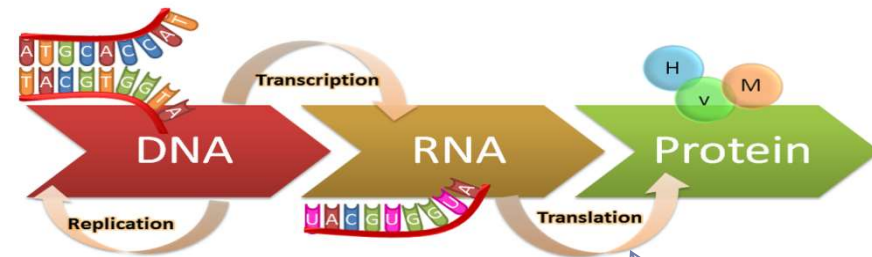
- ▶ Οι μεταλλάξεις συμβαίνουν σπάνια  $1:10^6 - 10^8$  ως τυχαία συμβάντα, αφορούν το χρωμοσωμικό DNA και συμβάλλουν ελάχιστα στην απόκτηση αντοχής
- ▶ Επιλέγονται κάτω από την πίεση των αντιβιοτικών και προκαλούν ανθεκτικούς πληθυσμούς (κάθετη μεταβίβαση)



# Αυτόματες μεταλλάξεις 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)

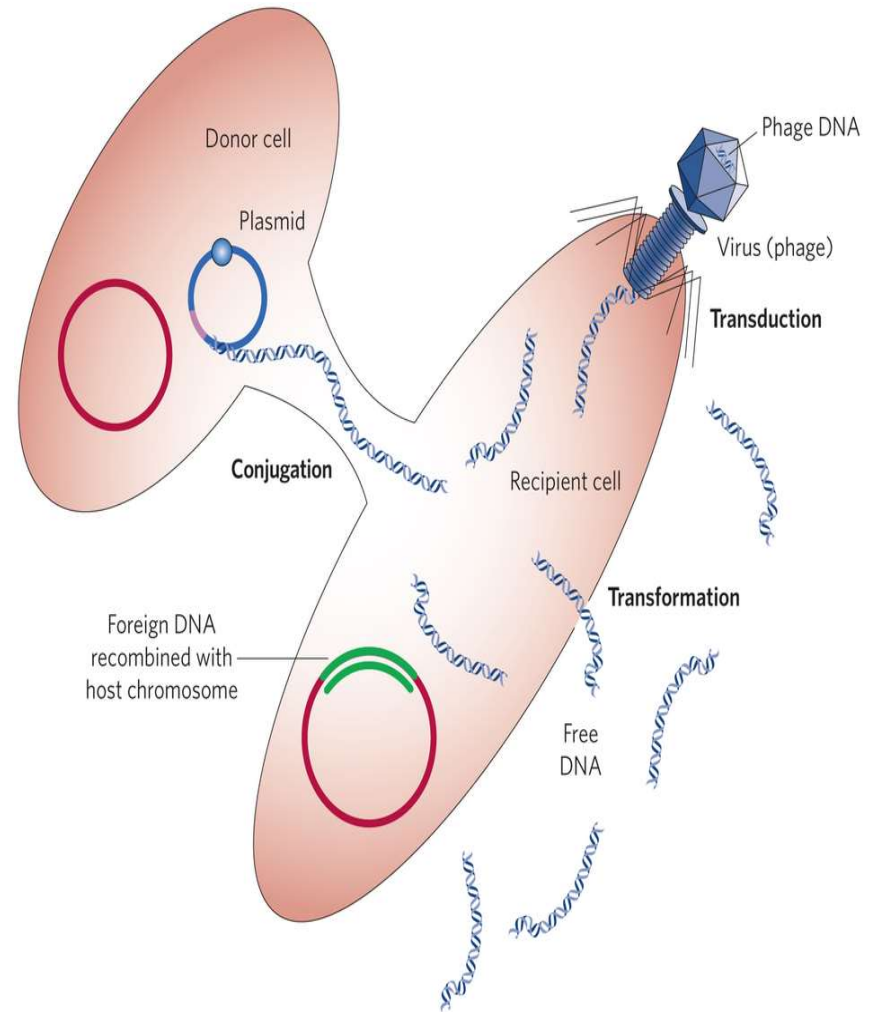
- ▶ Σε δομικά γονίδια
  - ▶ διευρυμένο φάσμα ενζυμικής δραστηριότητας
    - ▶ π.χ. ESBL
  - ▶ τροποποίηση στόχου
    - ▶ π.χ. γυράση (gyrA)
  - ▶ ελλειμματική μεταφορά
    - ▶ π.χ. πορίνη (OprD)
- ▶ Σε ρυθμιστικά γονίδια
  - ▶ αυξημένη έκφραση
    - ▶ π.χ. αντλίες εκροής



		ΔΕΥΤΕΡΟ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟ				Τ C A G
		T	C	A	G	
T	TTT	TCT	TAT	TGT	T C A G	
	TTC	TCC	TAC	TGC		
	TTA	TCA	TAA	TGA		
C	CTT	CCT	CAT	CGT	T C A G	
	CTC	CCC	CAC	CGC		
	CTA	CCA	CAA	CGA		
A	ATT	ACT	AAT	AGT	T C A G	
	ATC	ACC	AAC	AGC		
	ATA	ACA	AAA	AGA		
G	GTT	GCT	GAT	GGT	T C A G	
	GTC	GCC	GAC	GGC		
	GTA	GCA	GAA	GGG		

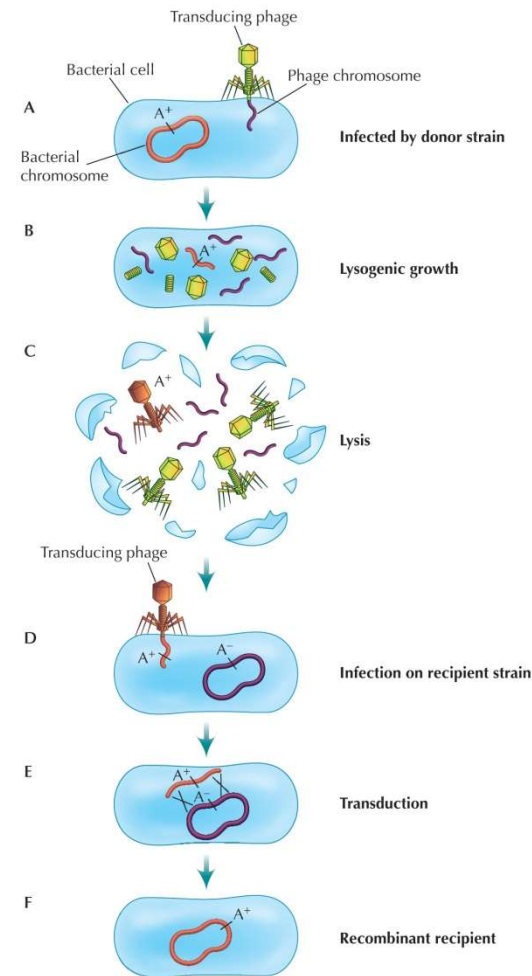
# Απόκτηση εξωγενών γονιδίων (οριζόντια μεταφορά)

- ▶ 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





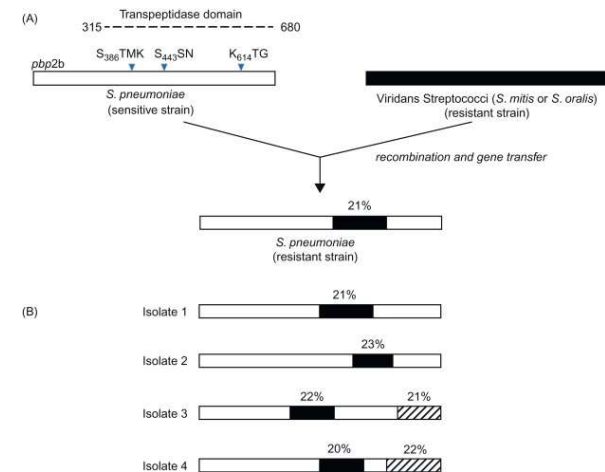
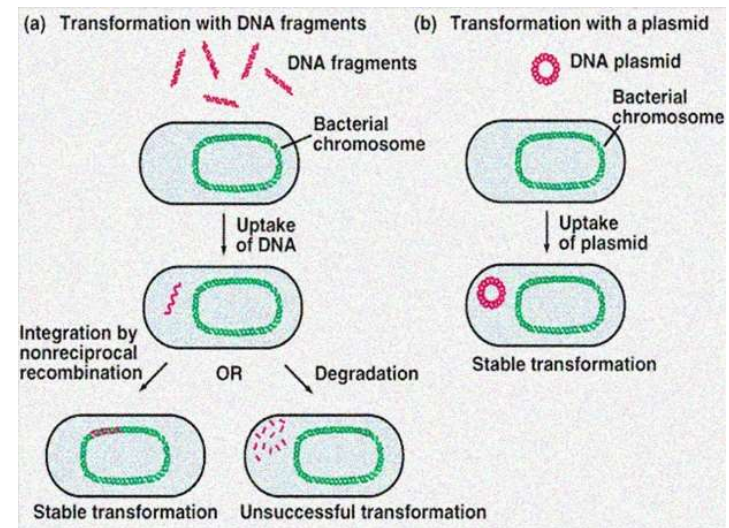
# Μετασχηματισμός (transformation)

- ▶ 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*

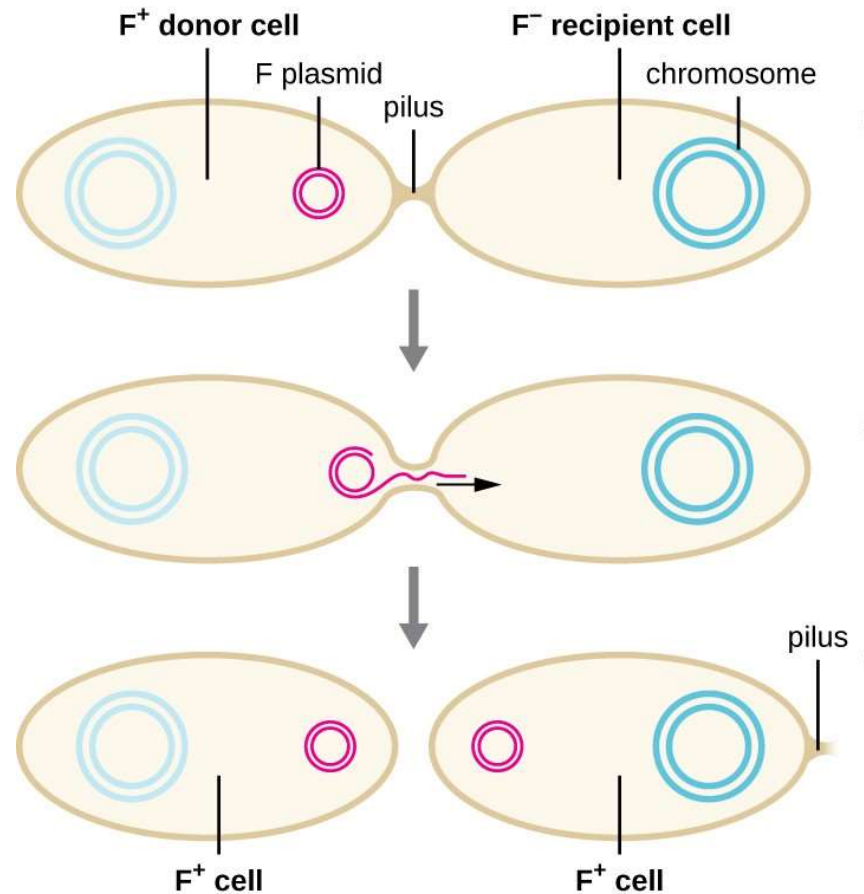
Τροποποιημένες PBPs: **1a**, 1b, 2a, **2b**, **2x**, 3

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)

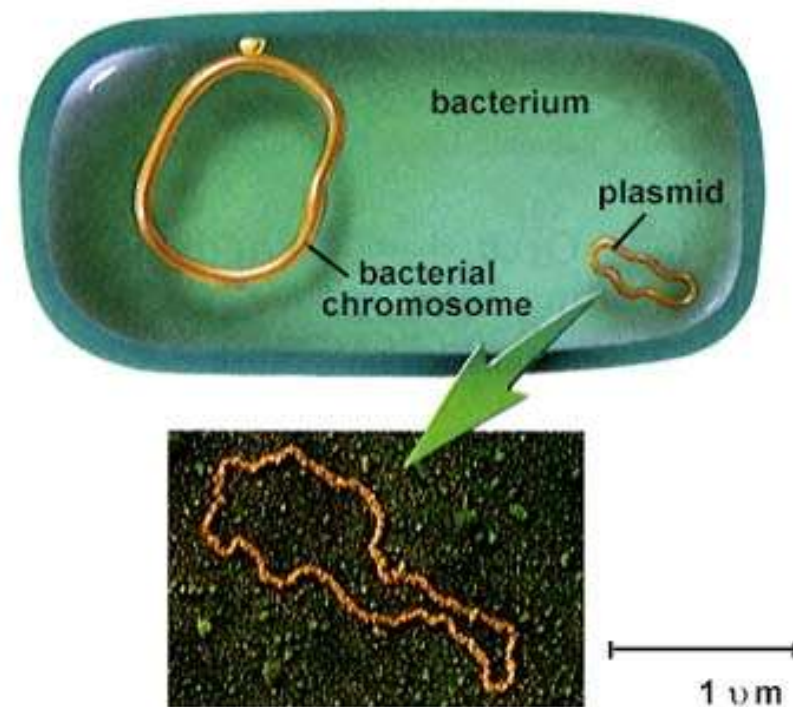


# Φορείς γονιδίων αντοχής

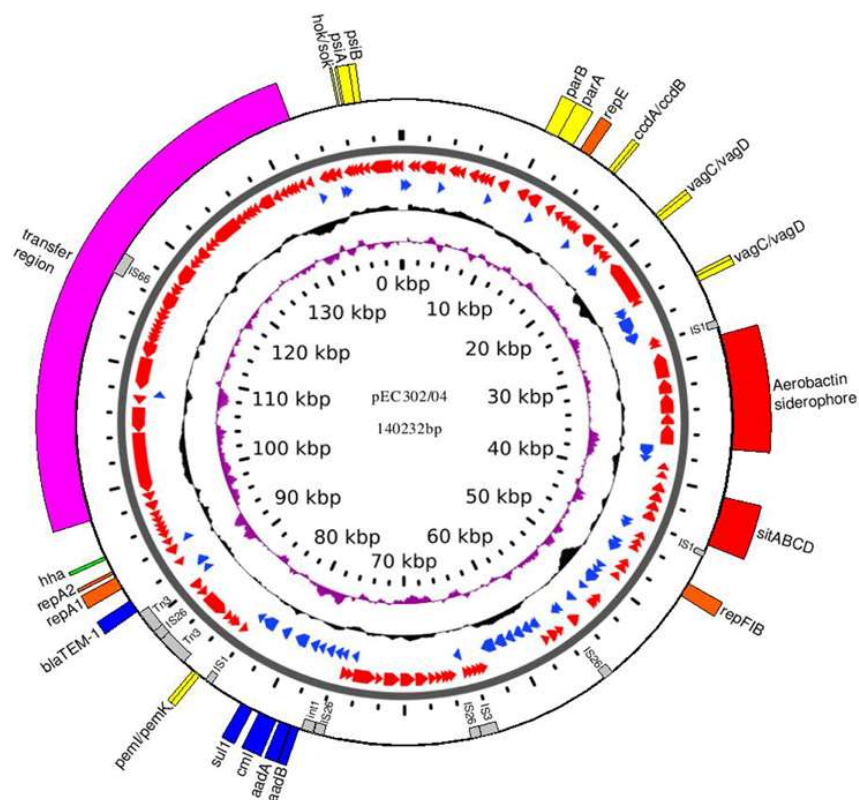
---

Εξωχρωμοσωμικές γενετικές μονάδες (πλασμίδια)

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



# Εξωχρωσωμικές γενετικές μονάδες (πλασμίδια)



- ▶ Δίκλιωνα, 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

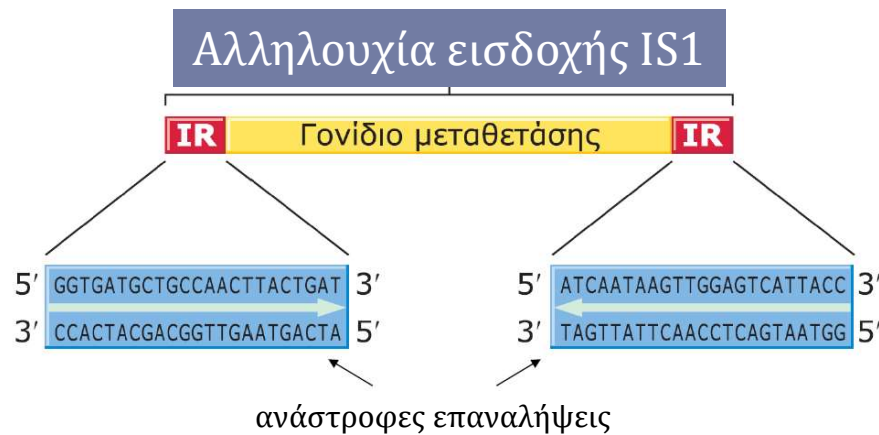
## Μεταθετά στοιχεία

- ▶ 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

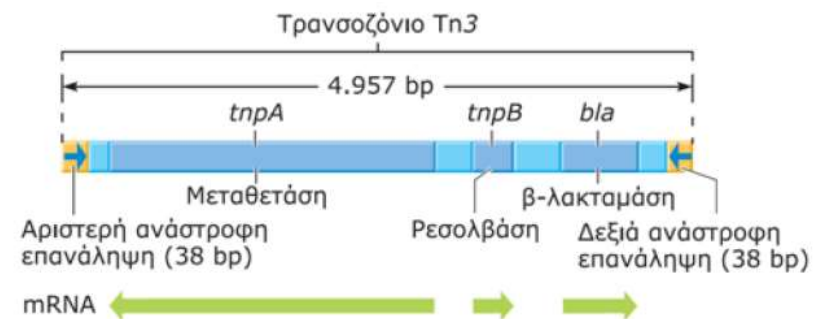
## Σύνθετα Tn

- ▶ 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)





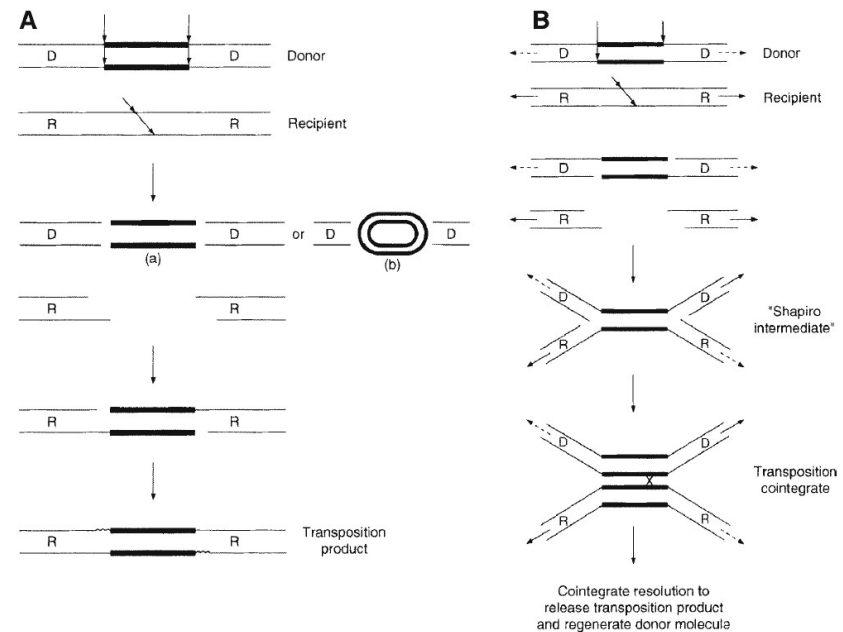
# Διαδικασία μετάθεσης

## Συντηρητική μετάθεση (Cut and paste)

Εκτομή και εισδοχή σε μια νέα θέση

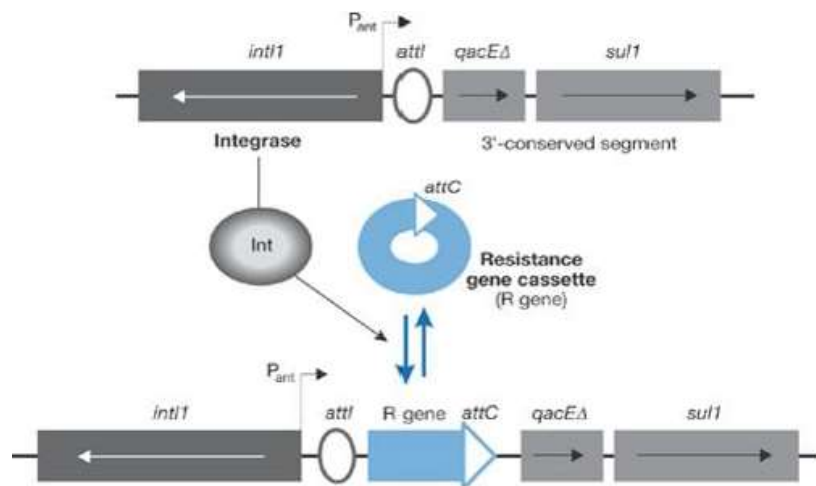
## Μετάθεση με αντιγραφή

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



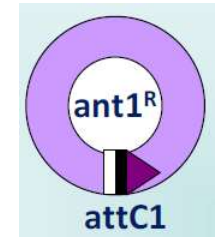
# Φορείς γονιδίων

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



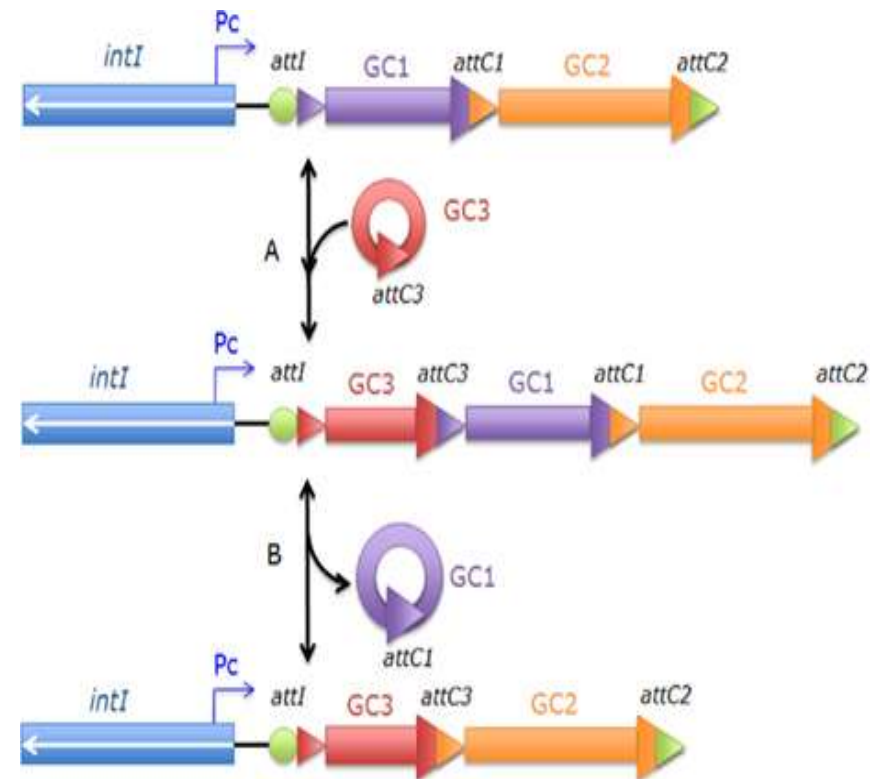
## Integrans

- ▶ 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

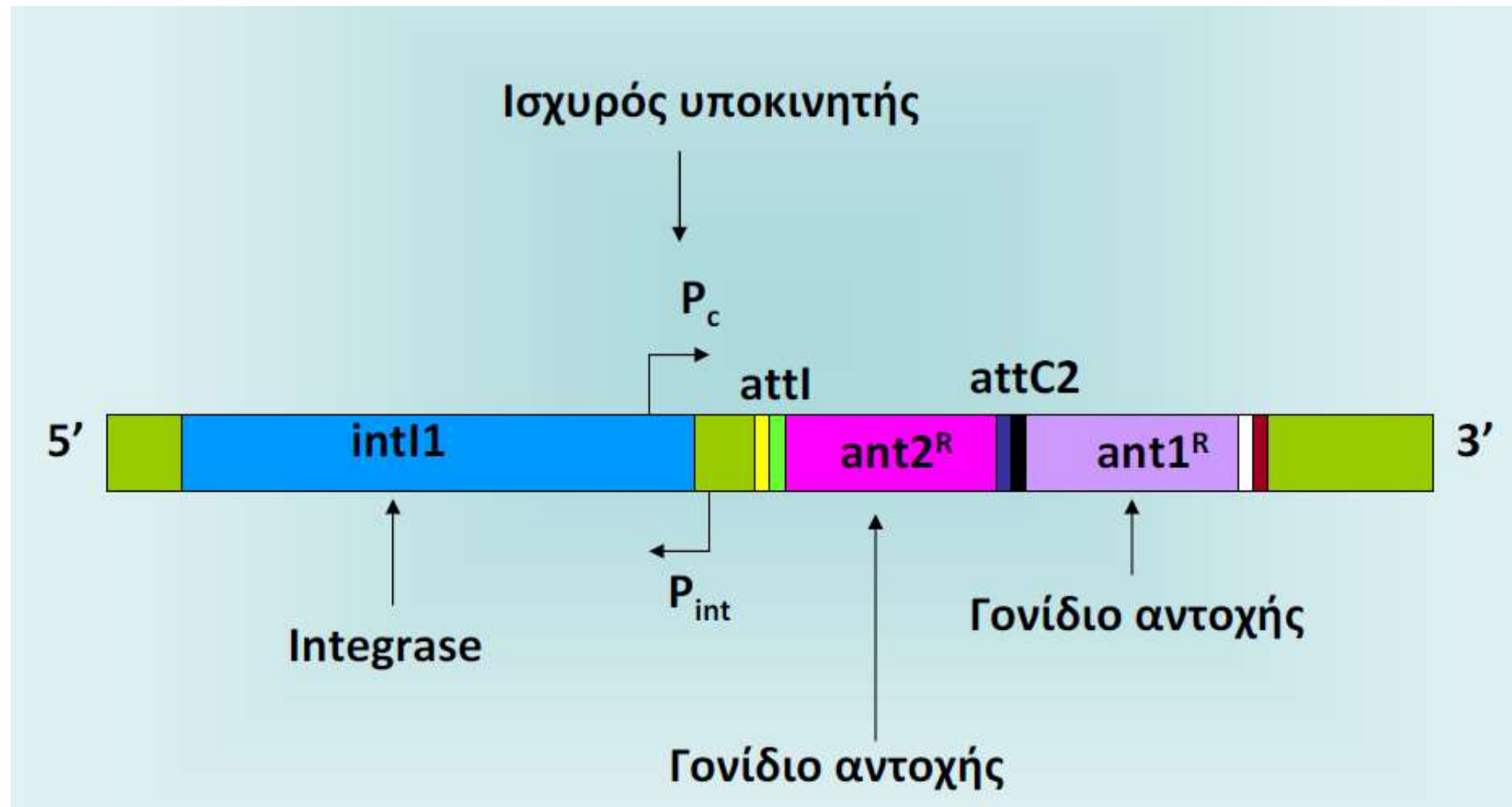


# Απόκτηση γονιδιακής κασέτας

- ▶ 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**



# Γενετική βάση της αντιμικροβιακής αντοχής

---

➤ Τα βακτήρια αποκτούν αντοχή σε έναν αντιμικροβιακό παράγοντα με διάφορους μηχανισμούς

1. Μεταλλάξεις

2. Γενετική μεταφορά  
Μετασηματισμός  
Μεταγωγή  
Σύζευξη

Φορείς γονιδίων αντοχής

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

3. Βιοχημικοί μηχανισμοί

Μειωμένη πρόσληψη

Επίτευξη εναλλακτικών μονοπατιών

Παραγωγή ενζύμων

Ενδογενής αντοχή

---

# Ερωτήσεις?

---

