

ΠΜΣ Λοιμωξιολογία

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν

Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

Βασικοί και ειδικοί μηχανισμοί αντοχής

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

3 Νοεμβρίου 2020

Στόχοι δράσης αντιβιοτικών

Σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος

Cell Wall Synthesis

Beta Lactams

Penicillins
Cephalosporins
Carbapenems
Monobactams

Vancomycin
Bacitracin

Cell Membrane
Polymyxins

© 2011 TheMedSchool.com

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

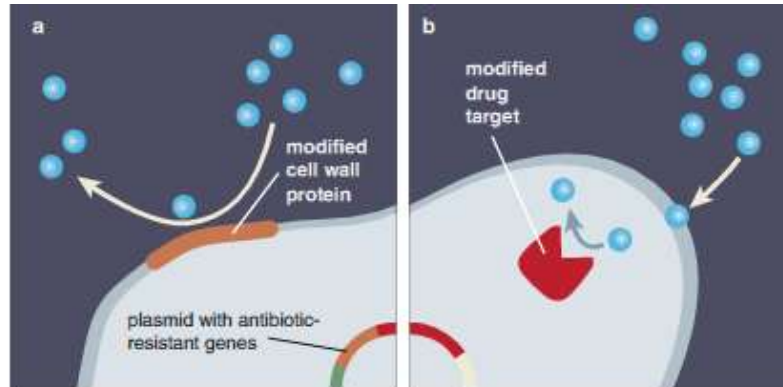
Σύνθεση νουκλεϊκών οξέων

Πρωτεϊνοσύνθεση

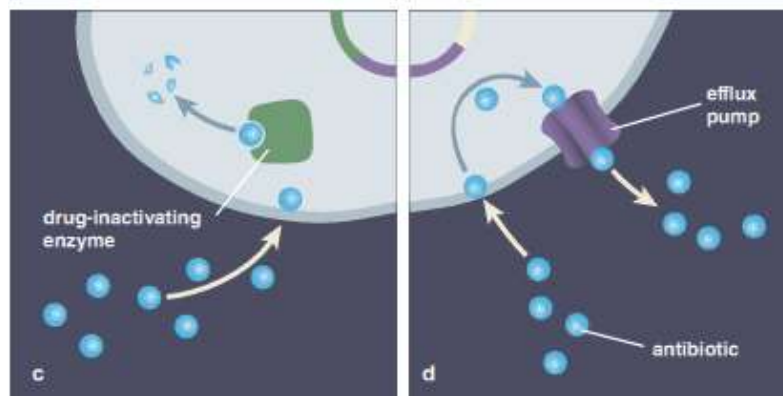


Μηχανισμοί αντοχής

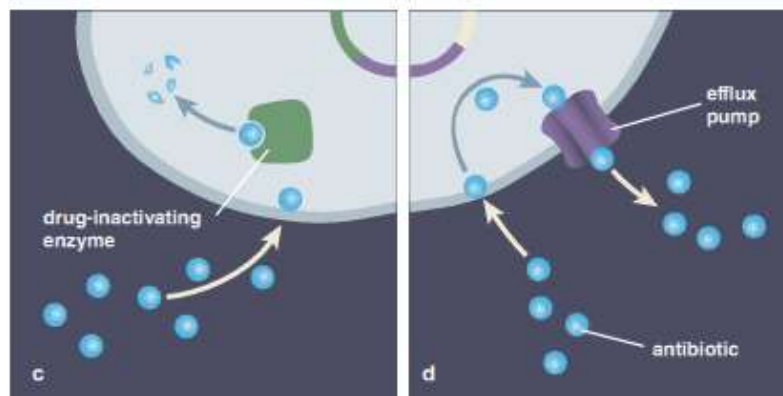
Ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα



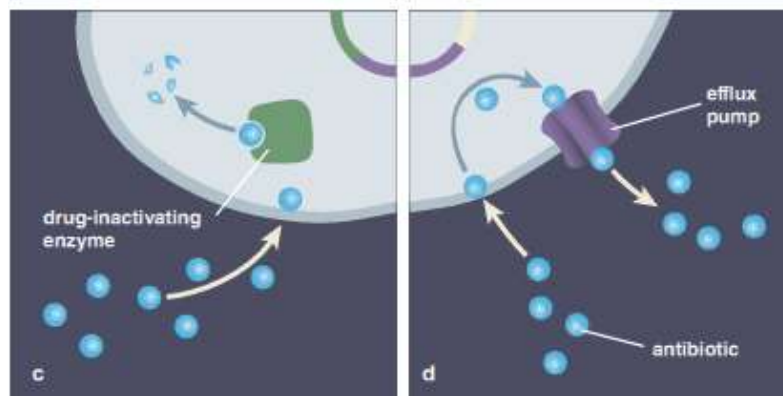
Τροποποίηση του στόχου δράσης



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)	β-λακταμάσες	Τροποποίηση PBPs Παράκαμψη στόχου (<i>mecA S.aureus</i>)	Αντλίες ενεργητικής εκροής Μειωμένη πρόσληψη (πορίνες)
Αμινογλυκοσίδες	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης (πρόσδεση στην 30S υπομονάδα)	Τροποποιητικά ένζυμα αμινογλυκοσιδών	Μεθυλίωση rRNA	Αντλίες ενεργητικής εκροής Μειωμένη πρόσληψη
(Φλουορο) Κιολόνες	Αναστολή τοποϊσομεράσης (σύνθεση DNA)	Τροποποιητικά ένζυμα (AAC(6')-Ib-cr)	Τροποποίηση στόχου <i>gyrA, parC</i>	Αντλίες ενεργητικής εκροής Μειωμένη πρόσληψη (πορίνες)
Γλυκοπεπίδια	Αναστολή της χιαστής σύνδεσης των αλύσεων της πεπτιδογλυκάνης		Τροποποίηση προδρόμου (<i>vanA, vanB, vanD vanC, vanE, vanG</i>)	
Μακρολίδες	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης (πρόσδεση στην 50S υπομονάδα)		Μεθυλίωση rRNA (<i>erm</i>)	Αντλίες ενεργητικής εκροής (<i>mefA</i>)

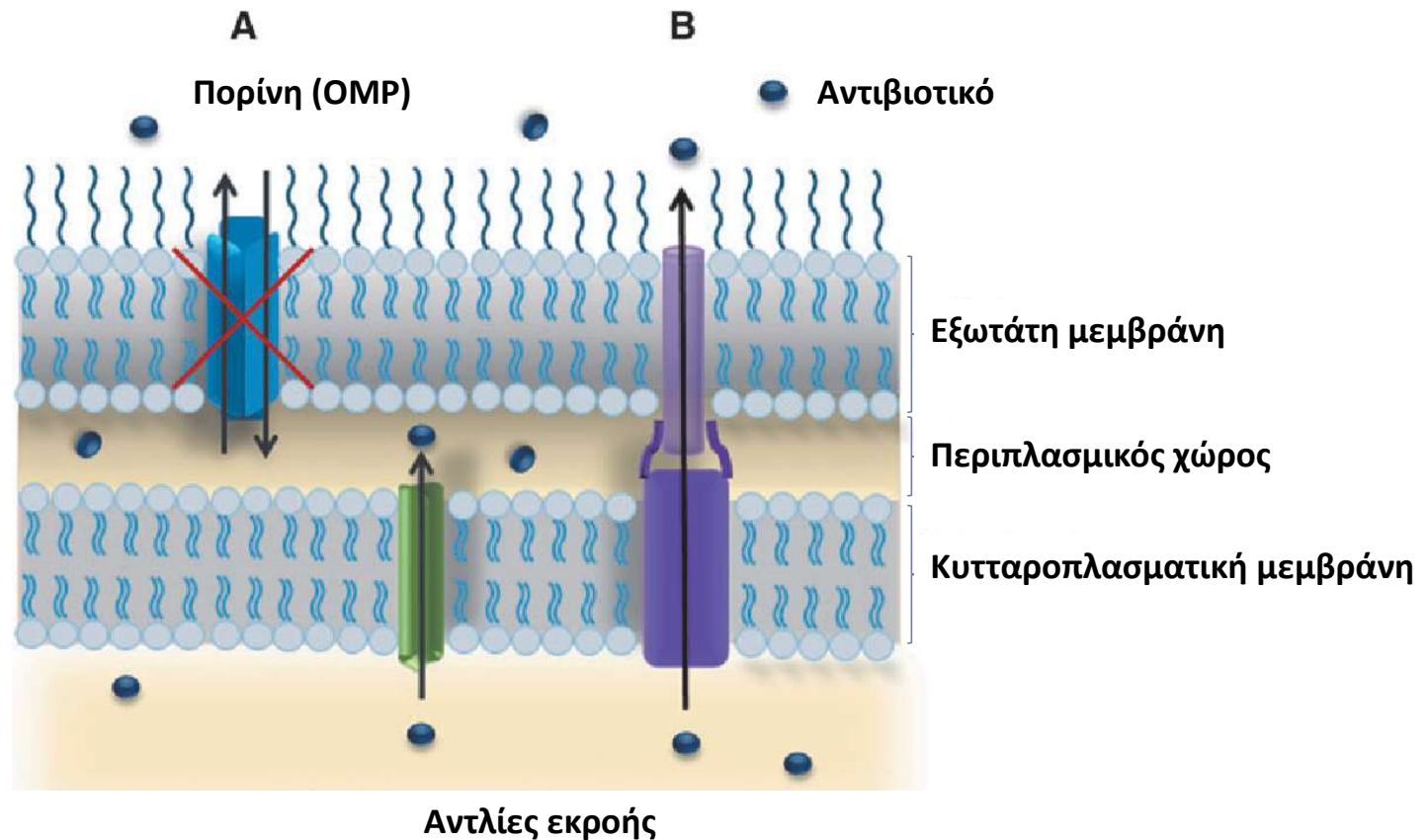


Κύριες ομάδες αντιβιοτικών

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		Τροποποίηση LPS	Τροποποίηση κάψας Αντλία ενεργητικής εκροής KpnEF
Τετρακυκλίνες	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης		Προστασία ριβοσώματος (<i>tetM</i>)	Αντλίες ενεργητικής εκροής (<i>tetA</i>) Μειωμένη πρόσληψη
ΡΙφαμπικίνη	Ενώνεται με την RNA-πολυμεράση και αναστέλλει το σχηματισμό του mRNA		Μεταλλαγές στο <i>groB</i> (RNA πολυμεράση)	Τροποποίηση ριφαμπικίνης (Arr)

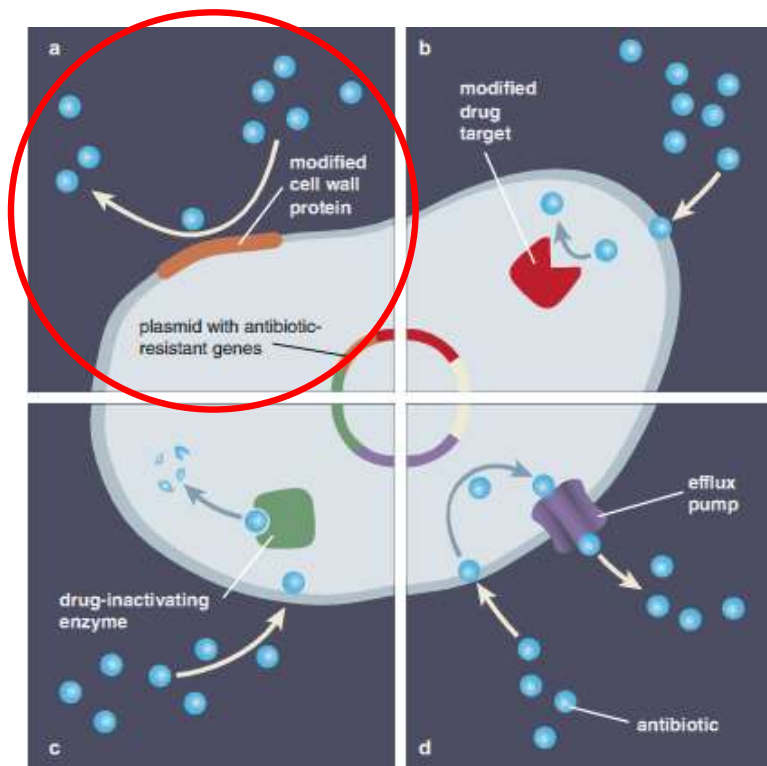


Μεταβολές στη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης των Gram-αρνητικών βακτηρίων



Μεταβολή διαπερατότητας

Μειωμένη είσοδος



▶ Ενδογενής

- ▶ Εντεροβακτηριακά & Γλυκοπεπτίδια

▶ Επίκτητη

- ▶ Απώλεια πορινών μπορεί να συμβεί *in vivo*

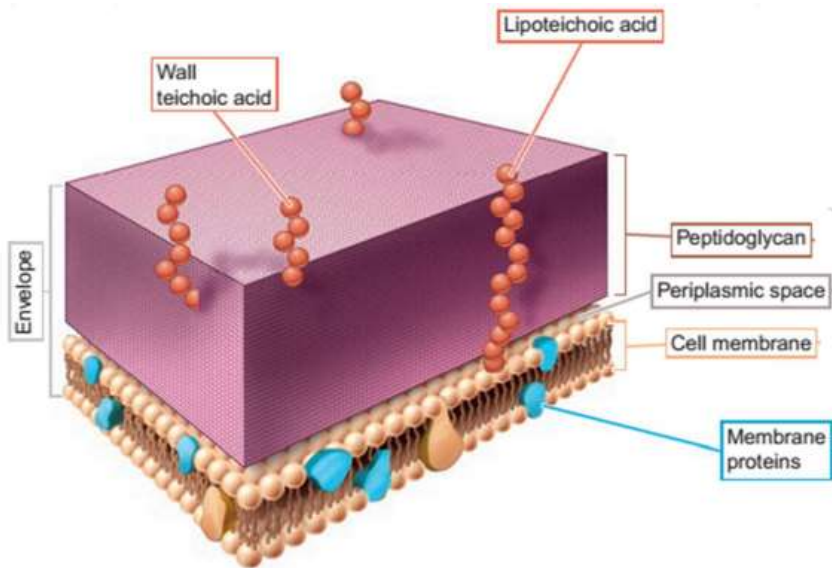
- ▶ IS elements
- ▶ Πρόωρα κωδικόνια λήξης
- ▶ Μετατόπιση πλαισίου

▶ Παραδείγματα:

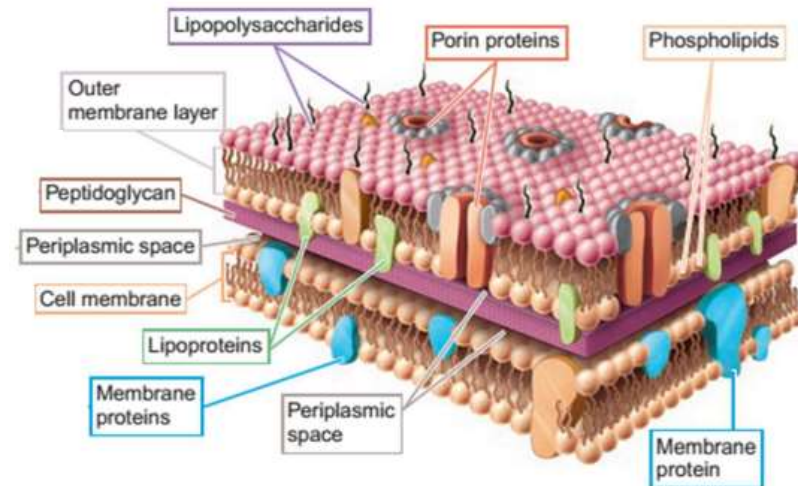
- ▶ *P. aeruginosa* – ιμιπενέμη (OprD)
- ▶ *Klebsiella* spp. – ιμιπενέμη (OmpK35, OmpK36)
- ▶ VISA (*S. aureus*)
- ▶ Gram (-) - κινολόνες (πορίνες)
- ▶ Gram (-) - αμινογλυκοσίδες (LPS)

Κυτταρικό τοίχωμα

Gram-Θετικά

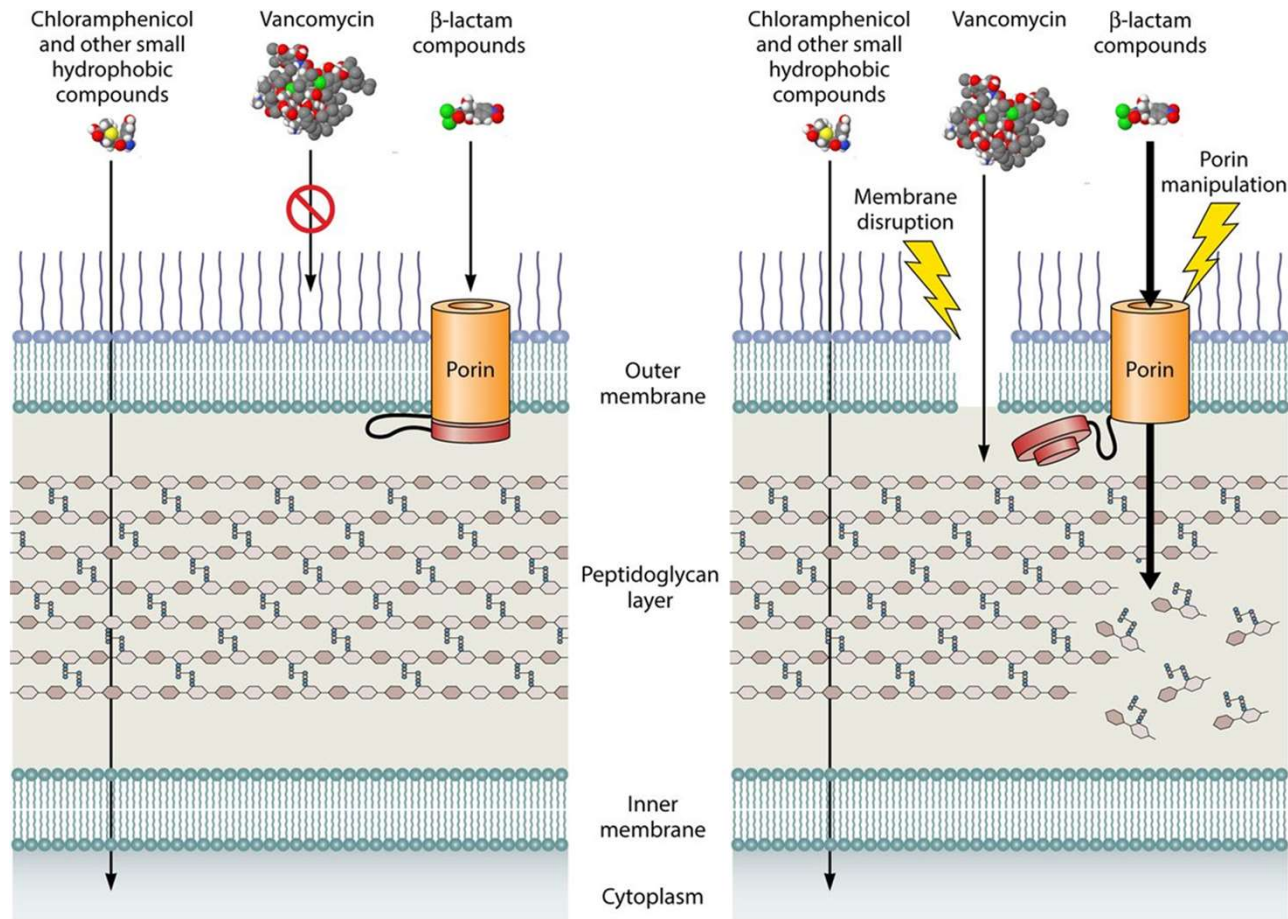


Gram-Αρνητικά

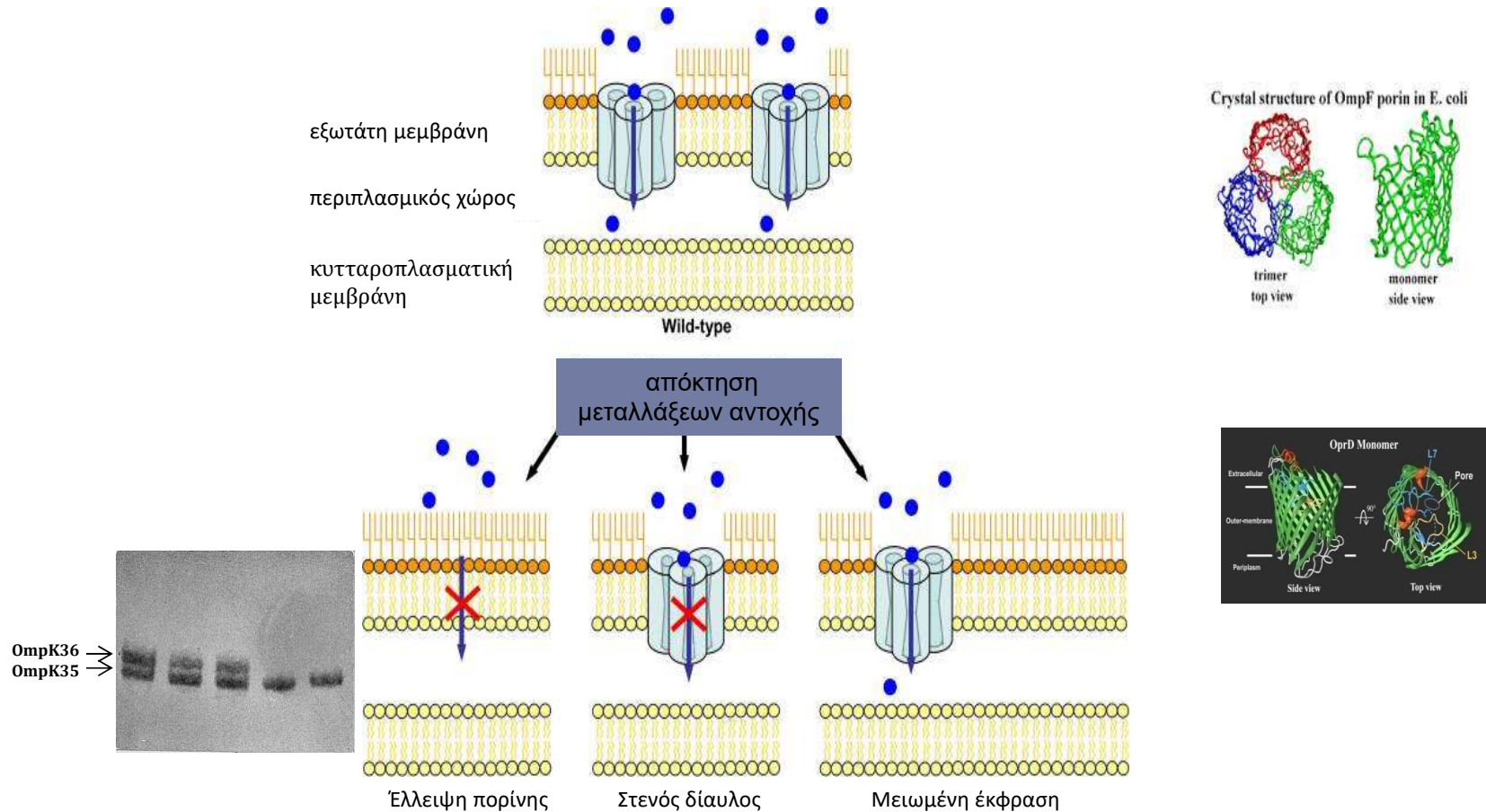


Οι διαφορές στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος σχετίζονται τόσο με την Gram-χρώση, όσο και την φυσική αντοχή των μικροβίων έναντι κάποιων αντιβιοτικών που δεν μπορούν λόγω μεγέθους να διέλθουν από τις πορίνες των Gram-αρνητικών βακτηρίων

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



Ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα – τροποποίηση πορινών



Μεταλλαγές στην OprD που προκλήθηκαν in vitro (έκθεση σε ιμιπενέμη) 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.

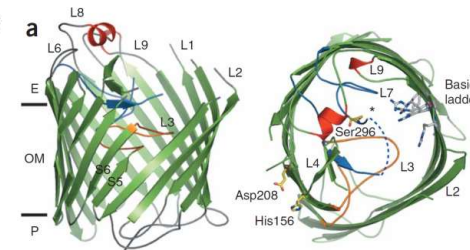
Isolate	MIC (mg/L)		L1		L2			L3				L4			L5			L6			L7		L8																
	IMP	MEM	43	57	59	103	115	120	127	170	181	185	186	189	202	210	230	231	240	244	262	265	267	276	277	278	281	296	301	310	312	315	347	354	359	372/383	403	424	425
PAO1			D	S	S	T	K	Y	V	F	T	E	P	V	E	I	E	D	S	I	N	G	A	T	W	S	A	K	Q	R	G	A	L	G	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																										
3553A	>32	8				S	T			L	Q	G	T																										
P3281	0.5	2				S	T			L	Q	G	T			Q				M																			
3281A	16	2				S	T			L	Q	G	T			Q				M																			
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 aminoacid 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/pl195	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> _{KPC-23}	<i>bla</i> _{KPC-23}	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{KPC-3}	<i>bla</i> _{KPC-3}	-
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

TABLE 1. PORINS OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ASSOCIATED WITH DRUG RESISTANCE

<i>Porin loss</i>	<i>Increased resistance/decreased susceptibility</i>	<i>Reference</i>
OmpK35	Cephameycins, oxyimino-cephalosporins, zwitterionic cephalosporins, and imipenem	14
OmpK36	Cefoxitin, oxyimino-cephalosporins, zwitterionic cephalosporins, carbapenem, and fluoroquinolones	22,23
LamB	Cefepime, piperacillin-tazobactam, cefotaxime, imipenem, meropenem, and ertapenem	26
PhoE	Carbapenems	4
KpnO	Ceftazidime, cefepime, ceftriaxone, tobramycin, streptomycin, spectinomycin, and nalidixic acid tetracycline	28

Αντλίες εκροής

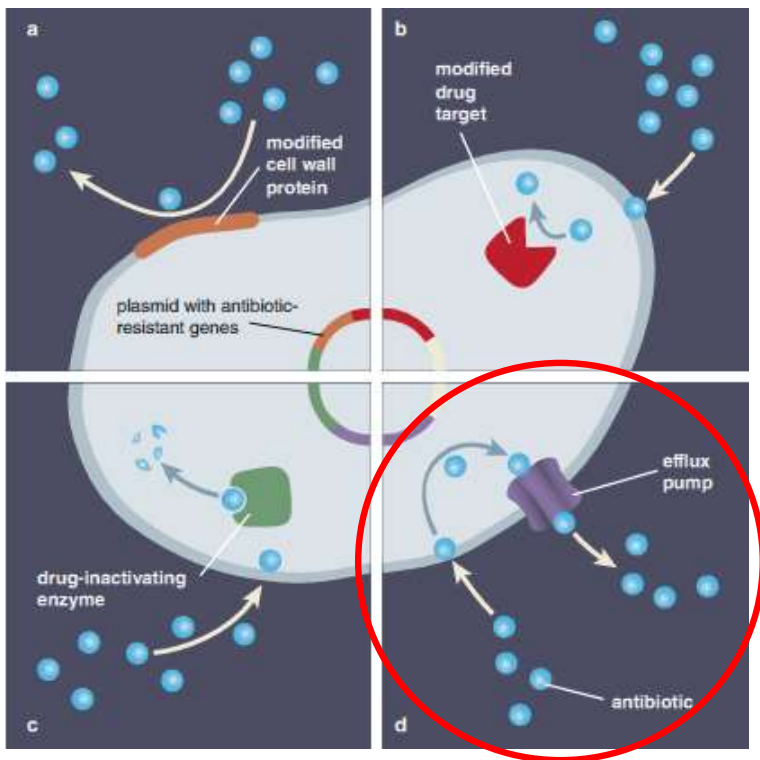
TABLE 2. EFFLUX PUMP OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ASSOCIATED WITH DRUG RESISTANCE

<i>Family of EPs</i>	<i>Components</i>	<i>Increased resistance/decreased susceptibility</i>	<i>Reference</i>
RND	AcrAB, TolC	Fluoroquinolones, erythromycin, tetracycline,	50-55
EPs, efflux pumps; MFS, major facilitator superfamily; RND, resistance-nodulation-division; SMR, small multidrug resistance. ¹⁸	AcrAB, KocC	Erythromycin	56
	KexD	Macrolides	57
	OqxAB	Fluoroquinolones	62
SMR	KpnEF	Cefepime, ceftriaxone, colistin, erythromycin, rifampin, tetracycline, and streptomycin	66
MFS	KmrA	Norfloxacin, kanamycin	67
	KpnGH	Azithromycin, ceftazidime, ciprofloxacin, ertapenem, erythromycin, gentamicin, imipenem, ticarcillin, norfloxacin, polymyxin-B, piperacillin, spectinomycin, tobramycin, and streptomycin	68

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

Μεταβολή διαπερατότητας

Αυξημένη απέκκριση

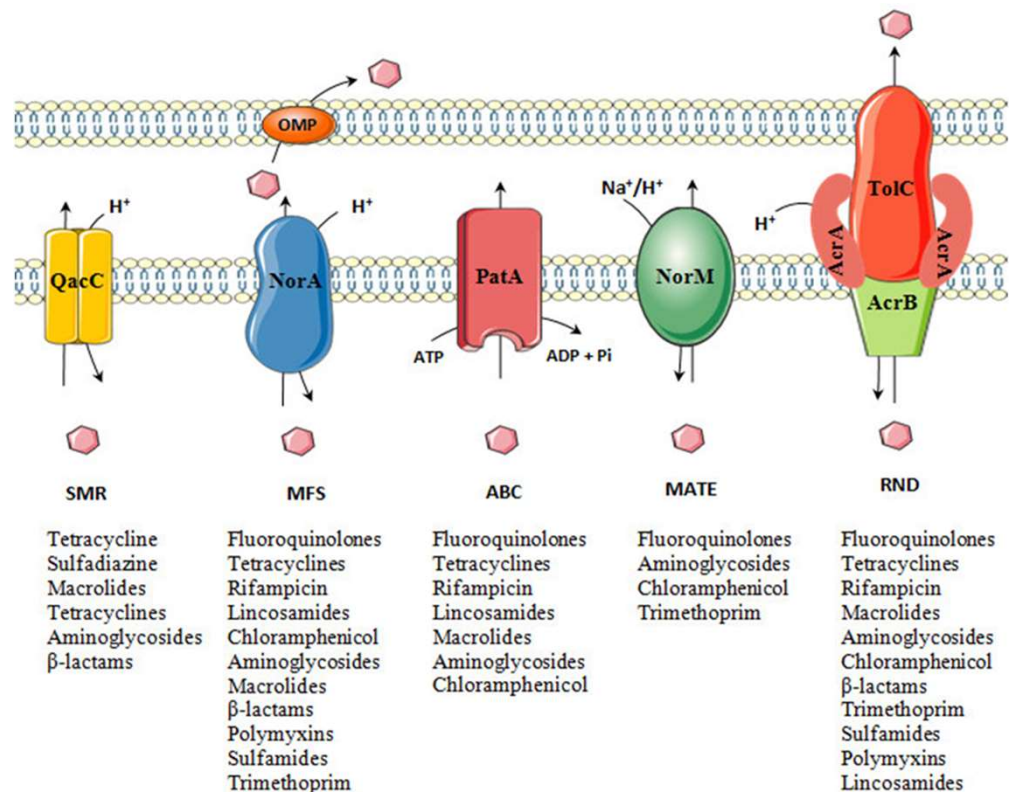


Παραδείγματα

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

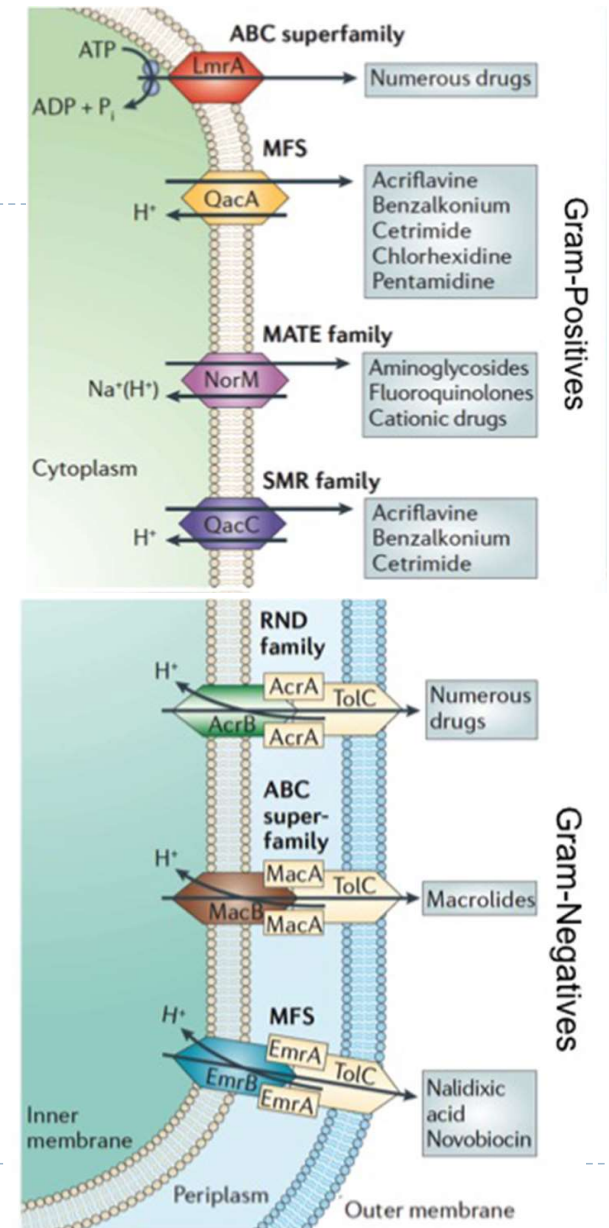
Αντλίες ενεργητικής εκροής (efflux pumps)

- **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)

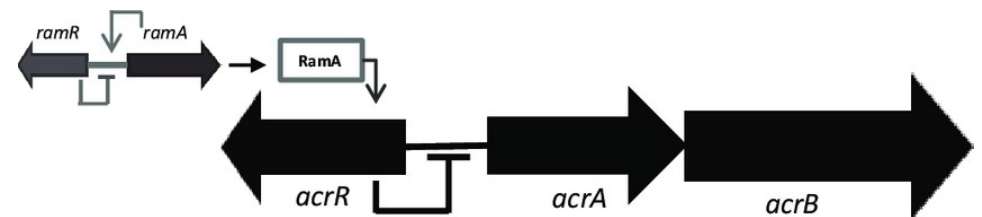


RND Efflux pumps και αντοχή στην τιγκεκυκλίνη

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

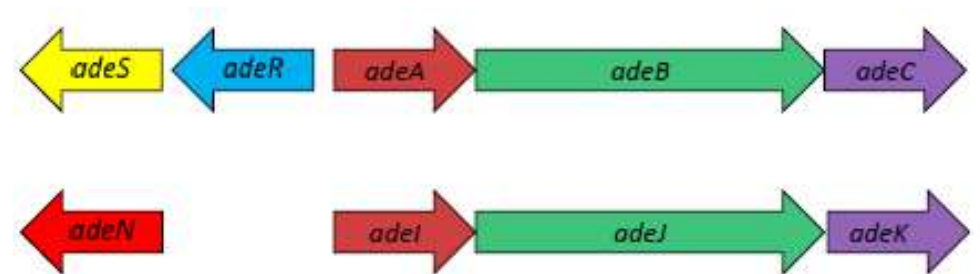
▶ *Klebsiella pneumoniae*

- ▶ 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

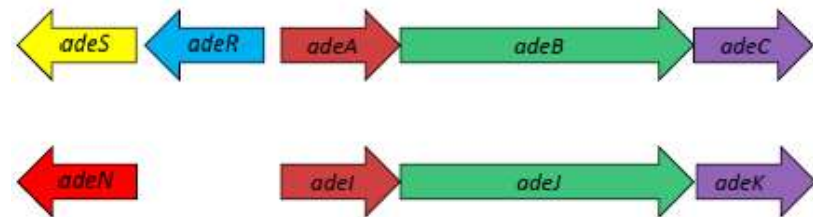


Συμμετοχή των IS elements στη ρύθμιση των efflux pumps του *Acinetobacter*

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	β -Lactams; chloramphenicol; erythromycin; fluoroquinolones; novobiocin; tetracycline; linezolid
		OqxAB ^a –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; β -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 (β -lactams); azithromycin (macrolides); ceftriaxone
	RND	MtrCDE	
		MtrF	Sulfonamides
	MATE	NorM	Hydrophilic fluoroquinolones
<i>Staphylococcus aureus</i>	MFS	NorA	Hydrophilic fluoroquinolones (for example, norfloxacin and ciprofloxacin)
		QacAB ^b	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

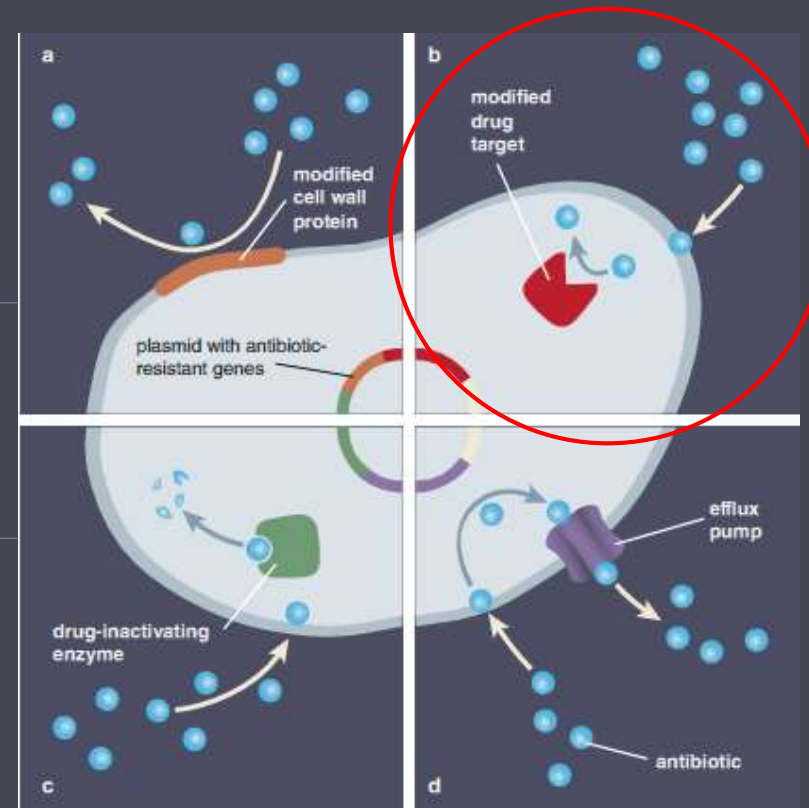
SMR , small drug resistance

^aPumps that are encoded in plasmids, except for *Klebsiella pneumoniae*

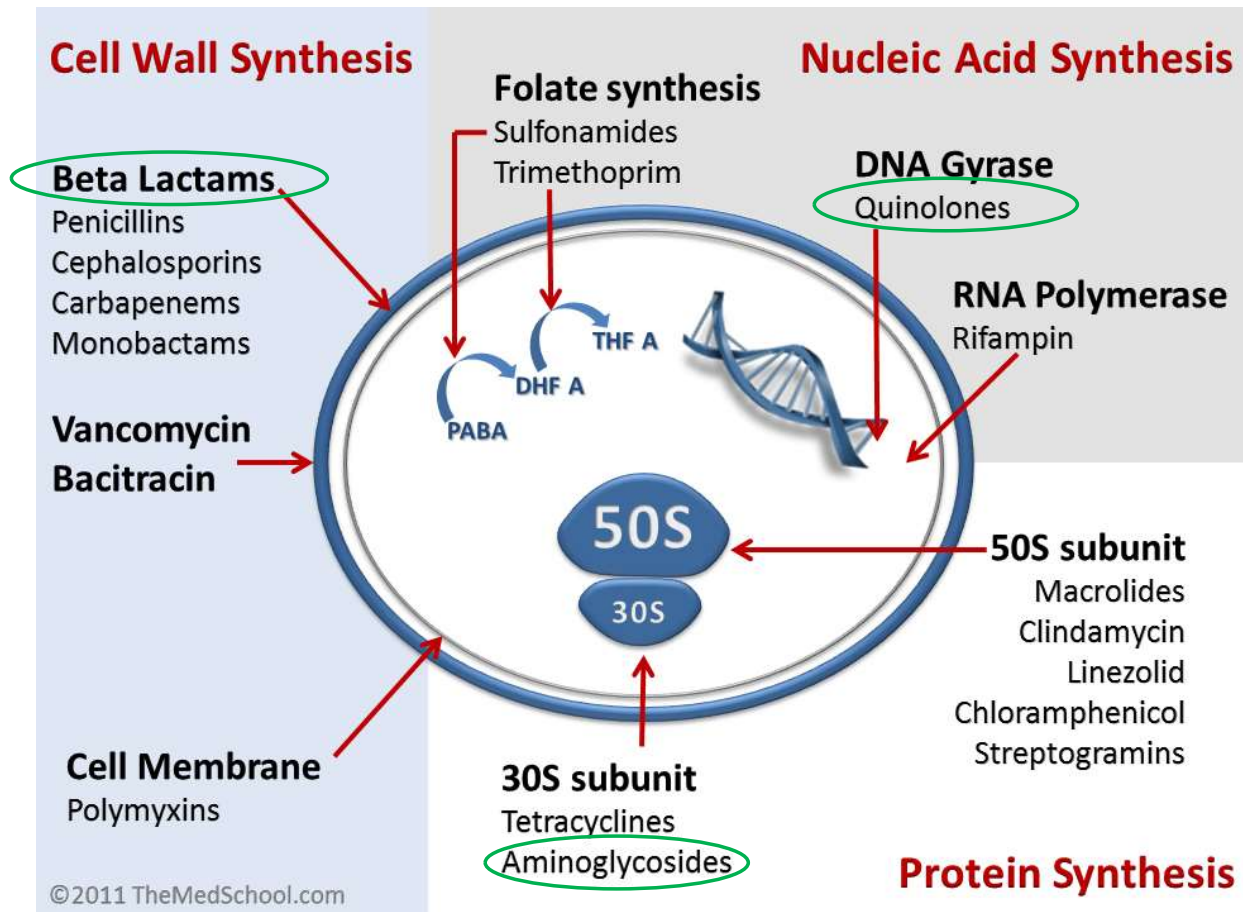
^bQacAB has been described only in *Staphylococcus aureus*

Τροποποίηση στόχου

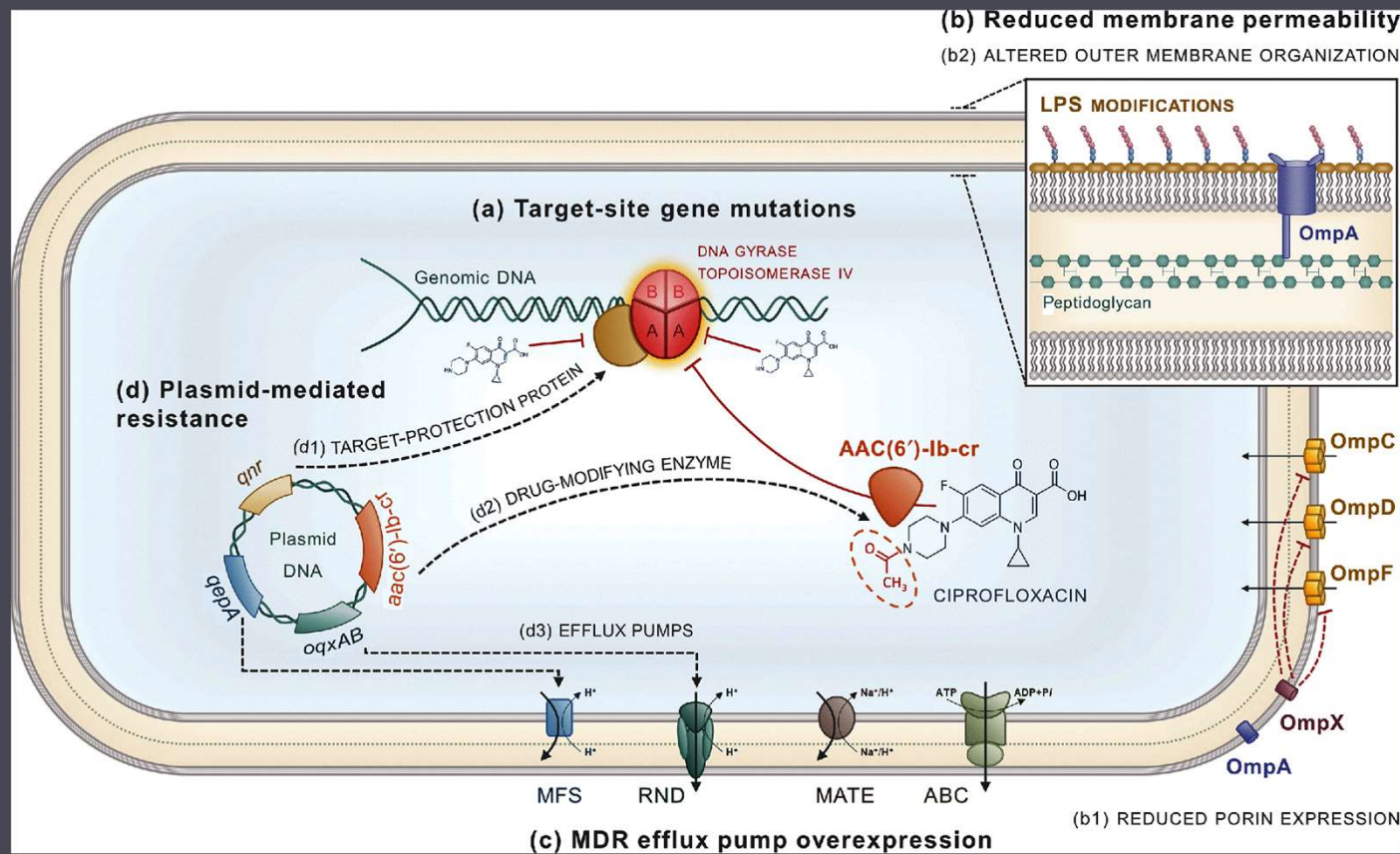
Κινολόνες: μεταλλάξεις στα *gyrA*, *parC*
Αμινογλυκοσίδες: μεθυλίωση 16S rRNA
β-λακτάμες: *mecA* (MRSA)



Στόχοι δράσης αντιβιοτικών

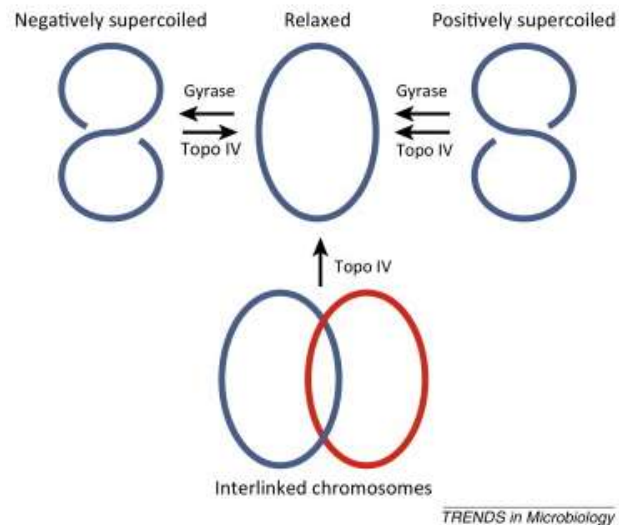


Μηχανισμοί αντοχής στις κινολόνες



Κιολόνες: δράση και μηχανισμοί αντοχής

Δράση των τοποϊσομεράσεων τύπου II

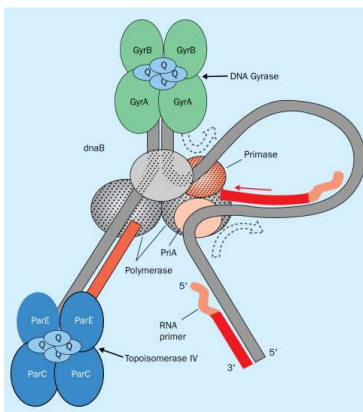


- DNA γυράση → αρνητική υπερελίκωση
- Τοποϊσομεράση IV → θετική υπερελίκωση
→ διαχωρισμό θυγατρικών χρωμοσωμάτων

- ▶ Οι κινολόνες αναστέλλουν την δράση της DNA γυράσης και της τοποϊσομεράσης IV, οι οποίες ελέγχουν την υπερελίκωση του χρωμοσώματος
- ▶ Δημιουργείται ένα σύμπλεγμα κινολόνης-ενζύμου-DNA που οδηγεί σε μειωμένη αντιγραφή του DNA και κυτταρικό θάνατο
- ▶ Ο πρωτεύον στόχος (DNA γυράση ή τοποϊσομεράσης IV) ποικίλλει ανάλογα με το βακτηριακό είδος και την φθοροκινολόνη
- ▶ Γενικά, ο βασικός στόχος στα Gram (-) είναι η DNA γυράση, ενώ στα Gram (+) η τοποϊσομεράση IV

Μηχανισμοί αντοχής στις κινολόνες

- ▶ Η DNA γυράση και η τοποϊσομεράση IV είναι τετραμερή ένζυμα που αποτελούνται από δύο GyrA και δύο GyrB υπομονάδες η πρώτη και δύο ParC και δύο ParE η δεύτερη
- ▶ Αντοχή προκύπτει από μεταλλάξεις στις υπομονάδες
 - ▶ Κυρίως στα *gyrA* και *parC*
 - ▶ Σταδιακή αύξηση του επιπέδου της αντοχής (MIC) προκύπτει από διαδοχικές μεταλλάξεις στους πρωταρχικούς και δευτερεύοντες στόχους



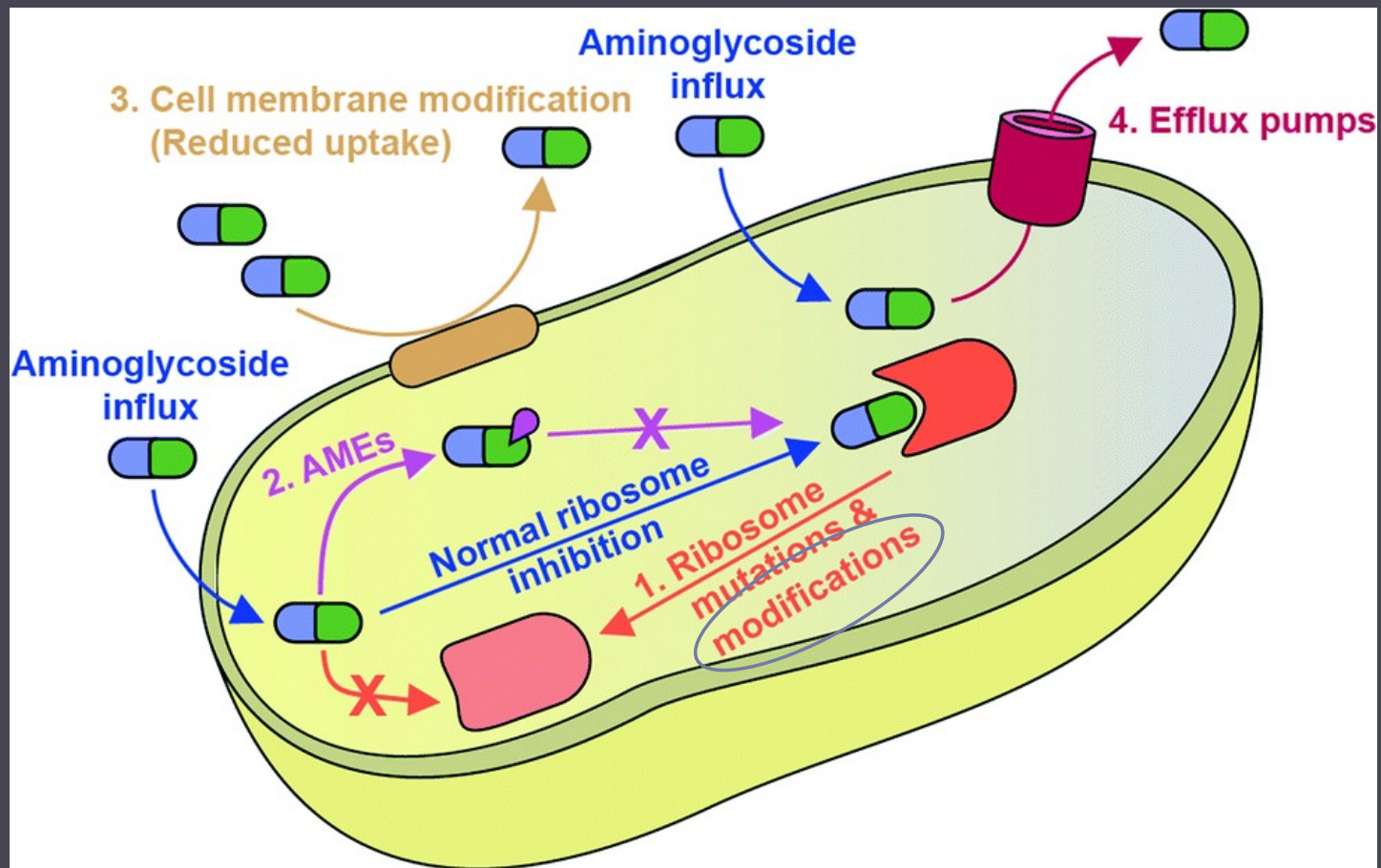
<i>gyrA</i>		<i>parC</i>		MICs (mg/L)	
Ser-83	Asp-87	Ser-80	Glu-84	Nal	Cip
Leu	-	-	-	128	0.25
Leu	-	-	-	64	0.25
Leu	-	-	-	128	0.25
Leu	-	-	-	512	0.25
Leu	-	-	-	512	0.5
Leu	-	-	-	64	0.125
Ile	-	-	-	512	0.5
-	Gly	-	-	128	0.125
-	Tyr	-	-	64	0.125
Leu	Gly	-	-	512	1
Leu	Asn	Ile	-	512	64
Leu	Asn	Ile	-	512	8
Leu	Asn	Ile	-	512	64
Leu	Asn	Ile	-	512	16
Leu	Asn	Ile	-	512	16
Leu	Asn	Ile	-	512	8
Leu	Asn	Ile	-	512	64
Leu	Asn	Ile	-	512	16
Leu	Asn	Ile	-	512	64
Leu	Asn	Ile	-	512	64
Leu	Asn	Ile	-	512	64
Leu	Asn	-	Lys	512	8
Leu	Asn	Ile	Val	512	64
Leu	Asn	Ile	Gly	512	64
Leu	Asn	Ile	Lys	512	64
Ser	Asp	Ser	Glu	4	0.032

Μεταλλαγές που έχουν ανιχνευθεί στα *gyrA*, *gyrB*, *parC* & *parE*

Species	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>	
<i>E. coli</i> *	Tyr50Phe	Asp426Asn	Ala56Thr	Leu116Phe	
	Ala51Val	Lys447Glu	Ser57Thr	Ile444Phe	
	Ala67Ser	Ser492Asn	Asp69Glu	Leu445His/Ile	
	Gly78Cys		Gly78Asp	Ser458Ala/Pro/Thr/Trp	
	Ser80Arg/Ile		Ser80Arg/Ile	Glu460Asp/Lys	
	Gly81Asp/Cys		Ser83Leu	Ile464Phe	
	Asp82Gly		Glu84Ala/Gly/Lys/Val	Ile529Leu	
	Ser83Ala/Ile/Leu/Trp/Tyr/Val		Cys107Trp		
	Ala84Pro/Val		Ala108Thr/Val		
	Asp87Asn/Glu/Gly/His/Tyr/Val				
	Gln106Arg/His				
	Ala119Glu				
	Ala196Glu				
	Arg237His				
	<i>Salmonella</i> spp.†	Ala67Pro	Tyr420Cys	Glu511Lys	Glu453Gly
		Asp72Gly	Gly434Leu	Thr57Ser	Ser458Pro
		Val73Ile	Gly435Ala/Glu/Val	Thr66Ile	Glu459Thr
		Gly81Asp/Cys/His/Ser	Arg437Leu	Gly72Cys	His461Tyr
		Asp82Asn/Gly	Gly447Cys	Gly78Asp	Gly468Cys
Ser83Ala/Ile/Leu/Phe/Thr/Tyr		Ser464Phe/Tyr	Ser80Arg/Ile	Ser493Phe	
Asp87Asn/Gly/Lys/Tyr		Glu466Asp	Glu84Gly/Lys	Ala198Thr	
Leu98Val		Ala468Glu	Phe115Ser	Arg507Ile	
Ala119Glu/Ser/Val		Leu470Met	Ala141Ser	Val512Gly	
Ala131Gly				Lys514Asn	
Glu133Gly					
Gln139Ala					

Species	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ‡	Asp87Ala/Asn/Gln/Glu/Gly/His/Tyr	-	Ser80Arg/Ile/Met	-	
	Ser80Ile		Glu84Gly/Val		
	Ser83Ile/Leu/Phe/Tyr				
	Ser88Ile/Phe/Tyr				
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ,	His70Arg	Arg485Cys		
		Ala74Ser/Glu/Gly/Leu/Val	Ser486Phe		
		Thr80Ala	Asp(472-495-500)Ala/Asn/His		
		Asp84Gly	Gly509Ala		
		Gly88Ala/Cys	Asp505Ala		
		Asp89Asn/Gly	Asn(510-533-538)Asp/Lys/Thr/Ile		
		Ser91Ala/Pro	Thr(500-511-539)Asn/Pro		
		Ile92Met	Glu(501-540)Asp/Val		
Asp94Ala/Asn/Gly/His/Phe/Tyr/Val		Ala(504-515-543)Thr/Val			
Pro102His		Gln549His			
Ala126Arg	Pro592Ser				
Asp500His					
Asp533Ala					
Asn538Asp					
<i>Streptococcus pneumoniae</i> §	Ala17Thr	Val432Asp	Ser52Gly	Asp435Asn	
	Gly54Val	Asp435Asn/Glu/Ile	Gly77Glu	Pro454Ser	
	Val71Ile	Glu474Lys	Asp78Asn	Ile460Val	
	Asp80Ala		Ser79Phe/Tyr	Glu474Lys	
	Glu85Gly/Lys		Asp83Asn/Gly/Tyr		
	Ser81Phe/Tyr		Asn91Asp		
	Trp93Ser		Gly128Asp		
			Glu135Asp		
			Lys137Asn/Asp		
			Ala142Ser		

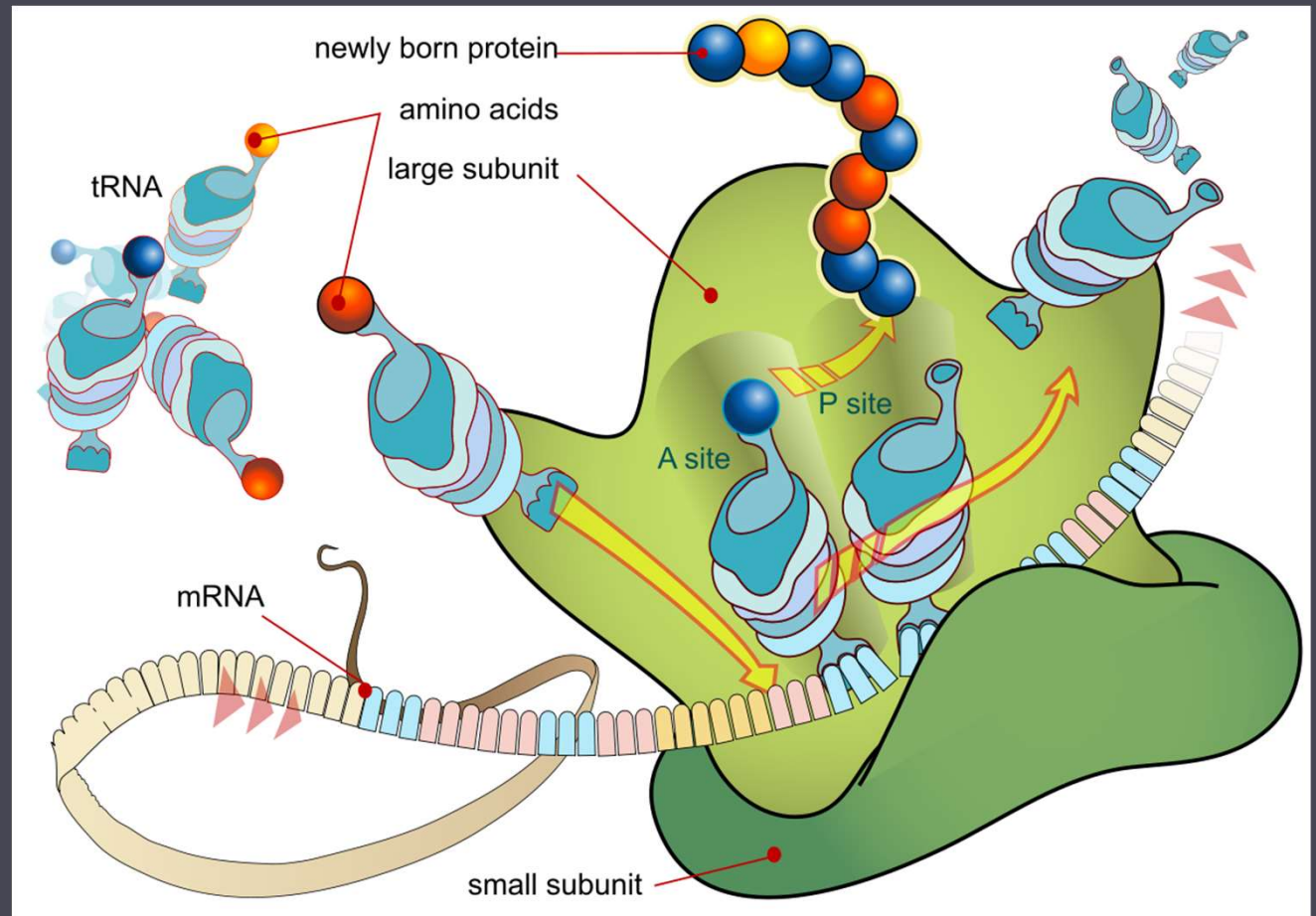
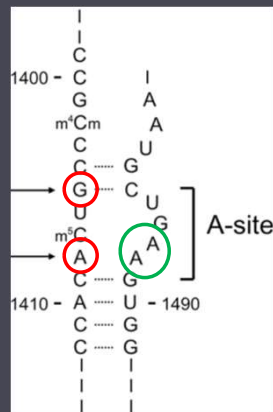
Μηχανισμοί αντοχής στις αμινογλυκοσίδες



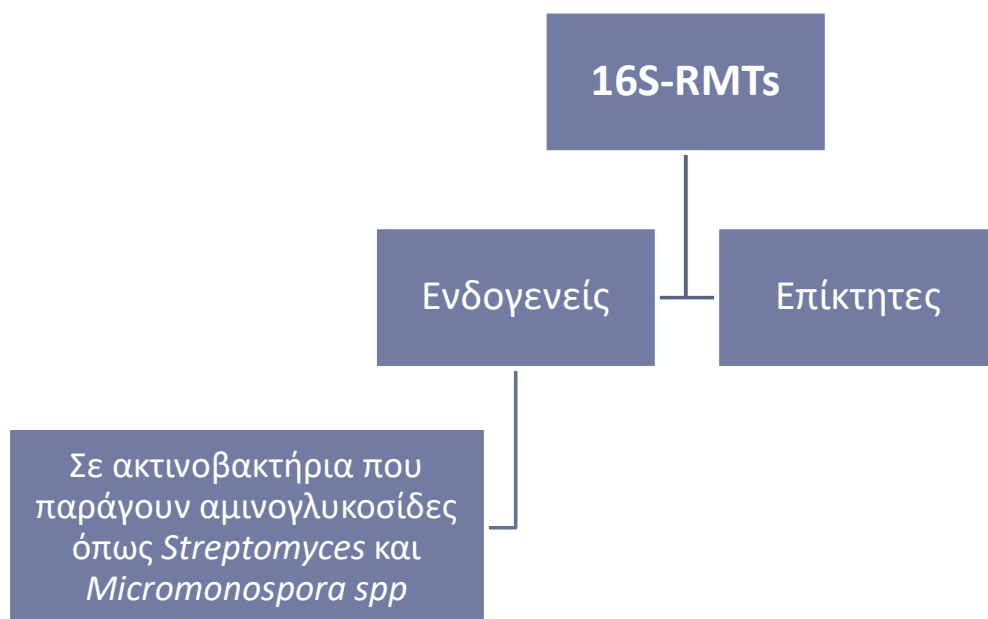
Μεθυλίωση του 16S rRNA

Οι αμινογλυκοσίδες προσδένονται στην 30S υπομονάδα του βακτηριακού ριβοσώματος και εμποδίζουν τη μεταφορά του tRNA από την θέση A στη θέση P, αποτρέποντας την επιμήκυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας

Οι 16S rRNA μεθυλάσες μεθυλιώνουν συγκεκριμένα νουκλεοτίδια στην A θέση του 16S rRNA με αποτέλεσμα να μην μπορούν να προσδεθούν οι αμινογλυκοσίδες



16S rRNA μεθυλάσεις



Ταξινόμηση των ενδογενών 16S rRNA Μεθυλασών

- **N7-G1405*** (Kgm)16S-RMTases
 - ❑ **KgmB** (kanamycin-gentamicin methyltransferase)(*Streptoalloteichus tenebrarius*)
 - ❑ **GrmA** (gentamicin-resistance methyltransferase) (*Micromonospora echinospora*)
 - ❑ **Sgm** (sisomicin-gentamicin methyltransferase) (*Micromonospora zionensis*)
 - ❑ **Krm** (kanamycin-resistance methyltransferase) (*Frankia* sp)
- **N1-A1408*** (Kam)16S-RMTases
 - ❑ **KamA** (kanamycin-apramycin methyltransferase) (*Streptomyces tenjimariensis*)
 - ❑ **KamB** (*Streptoalloteichus tenebrarius*)
 - ❑ **KamC** (*Saccharopolyspora hirsuta*)

* nucleotide position to be modified at the A-site of 16S rRNA

Πρώτη περιγραφή πλασμιδιακής εξωγενούς 16S rRNA μεθυλάσης (RmtA)

MECHANISMS OF DISEASE

Mechanisms of disease

Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*

Keiko Yokoyama, Yohei Doi, Kunikazu Yamane, Hiroshi Kurokawa, Naohiro Shibata, Keigo Shibayama, Tetsuya Yagi, Haru Kato, Yoshichika Arakawa

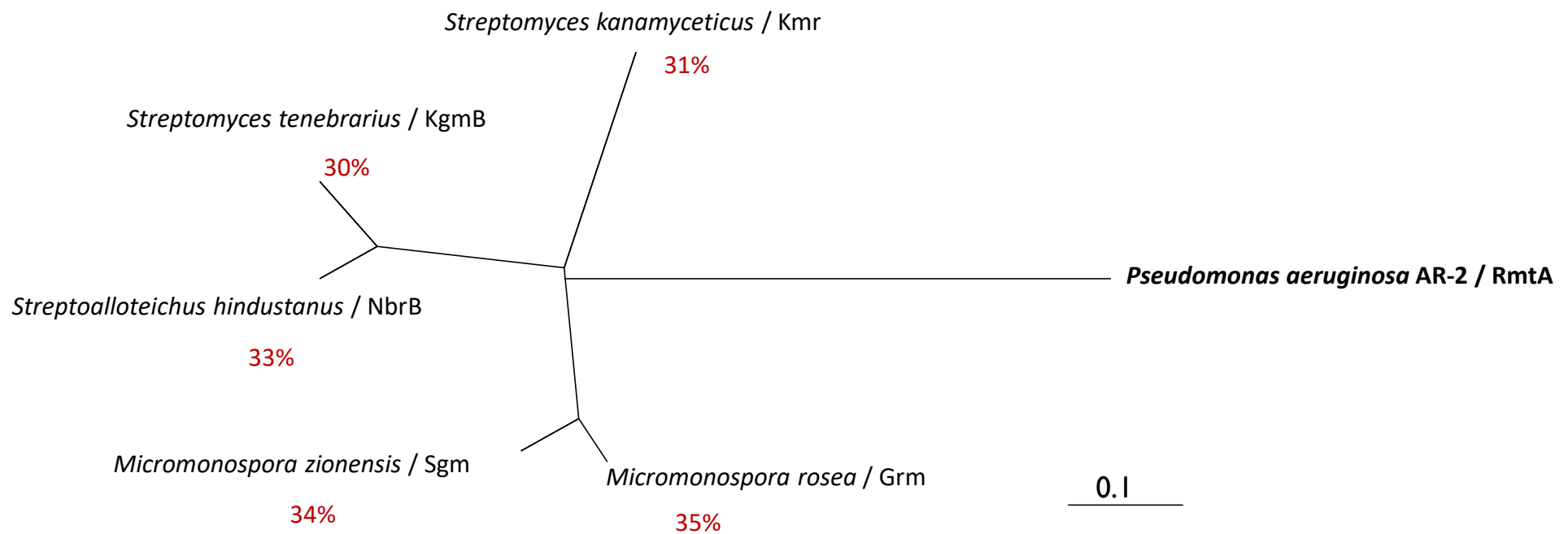
THE LANCET • Vol 362 • December 6, 2003 • www.thelancet.com

- ▶ Το στέλεχος *P. aeruginosa* AR-2 απομονώθηκε από ένα κλινικό δείγμα (πτύελα) το 1997
- ▶ Το στέλεχος *P. aeruginosa* έδειχνε πολύ υψηλού επιπέδου αντοχή σε όλες τις κλινικά χρησιμοποιούμενες αμινογλυκοσίδες

	<i>P. aeruginosa</i> AR-2	<i>E. coli</i> XL1-blue			<i>P. aeruginosa</i> PAO1		<i>P. aeruginosa</i>	
		pBCH9	pBCH9-13	pBC-SK+	pTORmtA	pT0001	Transconjugant	105*
4,6-substituted deoxystreptamine antimicrobials								
Kanamycin groups								
Arbekacin	>1024	>1024	>1024	0.5	>1024	1	>1024	4
Amikacin	>1024	>1024	>1024	1	>1024	8	>1024	4
Kanamycin	>1024	>1024	>1024	2	>1024	128	>1024	>1024
Tobramycin	>1024	>1024	512	1	>1024	1	>1024	256
Gentamicin groups								
Gentamicin	>1024	>1024	1024	0.5	>1024	256	>1024	>1024
Sisomicin	>1024	512	>1024	0.5	>1024	256	>1024	>1024
Isepamicin	>1024	>1024	>1024	0.5	>1024	4	>1024	8
4,5-substituted deoxystreptamine antimicrobials								
Neomycin	>1024	4	>1024	4	512	16	>1024	>1024
Other aminoglycosides								
Streptomycin	128	4	2	4	32	32	>1024	>1024
Hygromycin B	1024	64	2	32	512	512	1024	512
Others								
Ceftazidime	2	0.5	0.25	0.25	ND	ND	128	32
Imipenem	1	0.25	0.25	0.125	ND	ND	16	16
Ciprofloxacin	0.25	0.125	0.125	0.125	ND	ND	64	64

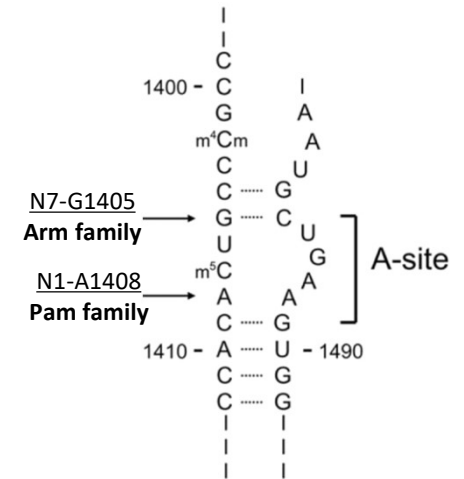
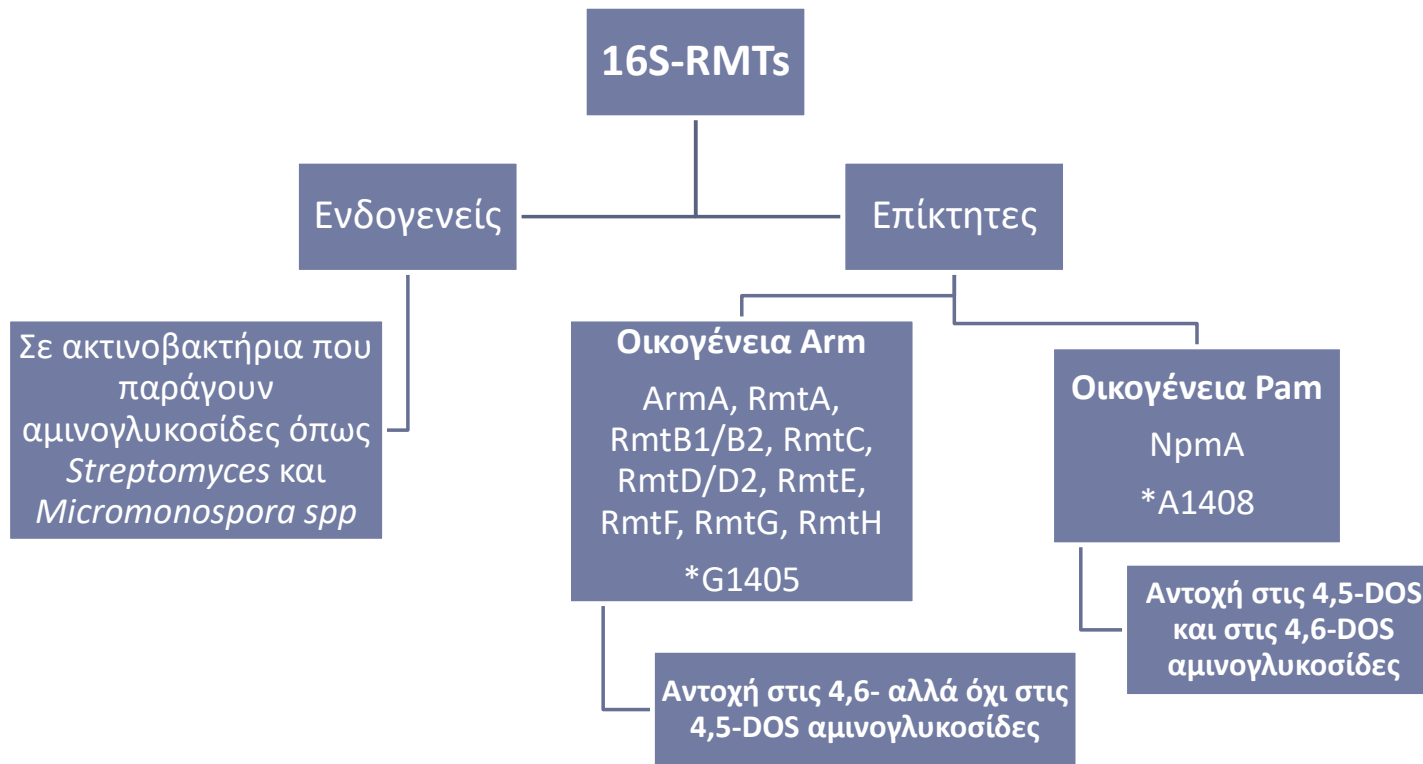
Οι συγγραφείς ανέφεραν έναν εντελώς νέο μηχανισμό για την αντοχή στις αμινογλυκοζίδες - την ενζυμική μεθυλίωση του 16S rRNA σε Gram-αρνητικά βακτήρια

Πρώτη περιγραφή πλασμιδιακής εξωγενούς 16S rRNA μεθυλάσης (RmtA)



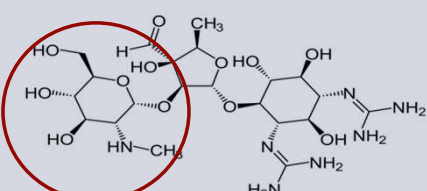
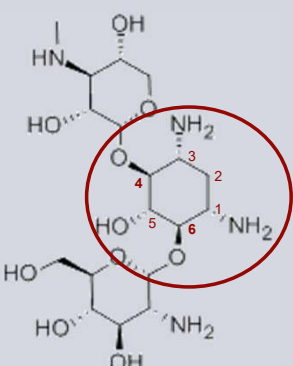
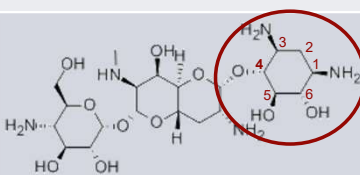
- ▶ Το προϊόν του γονιδίου *rmtA*, η RmtA, έδειξε σημαντική ομοιότητα με τις 16S rRNA μεθυλάσες που προστατεύουν το 16S rRNA στους ακτινομύκητες που παράγουν αμινογλυκοσίδες όπως τα *Streptomyces spp* και *Micromonospora spp*.

16S rRNA μεθυλάσες

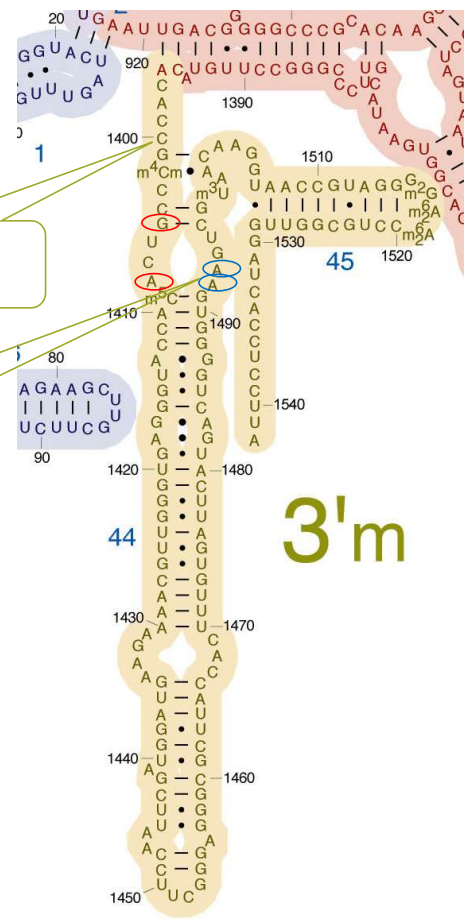


4,6 DOS	4,5 DOS
<ul style="list-style-type: none"> <u>Kanamycin</u> Tobramycin Amikacin <u>Gentamicin</u> Sisomicin Netilmicin Plazomicin 	<ul style="list-style-type: none"> <u>Neomycin</u>

Δομική Ταξινόμηση Αμινογλυκοσιδών

Aminoglycoside-aminocyclitols		
Streptidine	2-deoxystreptamine (DOS)	
	4,5 disubstituted	4,6 disubstituted
Streptomycin 	<u>Neomycin</u> Paromomycin Butirosin (A,B) Ribostamycin Lividomycin	<u>Kanamycin</u> Tobramycin Amikacin Dibekacin Arbekacin <u>Gentamicin</u> Sisomicin Netilmicin Isepamicin Plazomicin 
	Monosubstituted	
	Apramycin 	

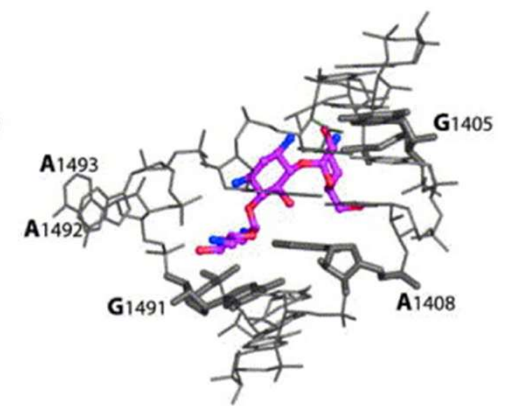
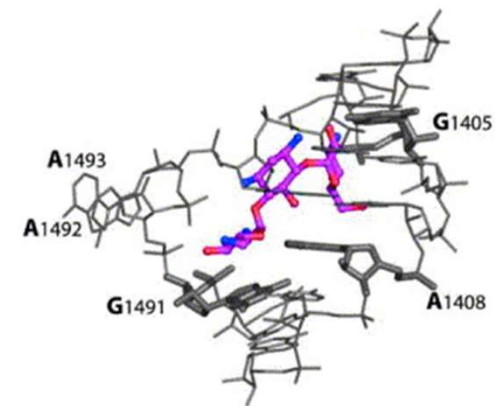
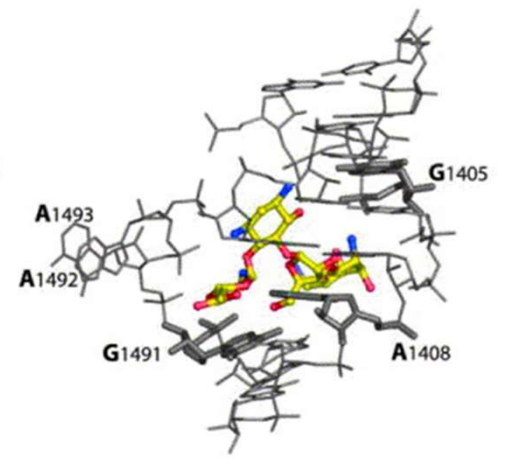
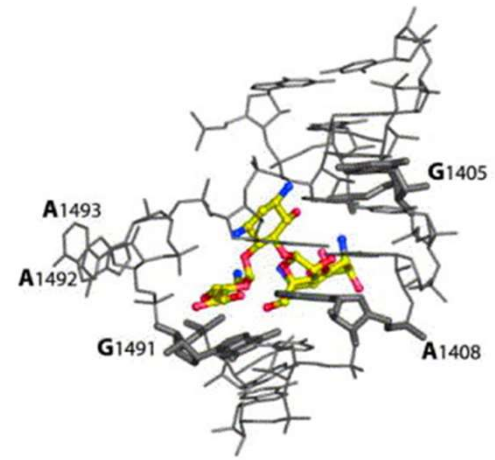




Domain IV

P site nucleotides

A-site nucleotides (A1492 and A1493)



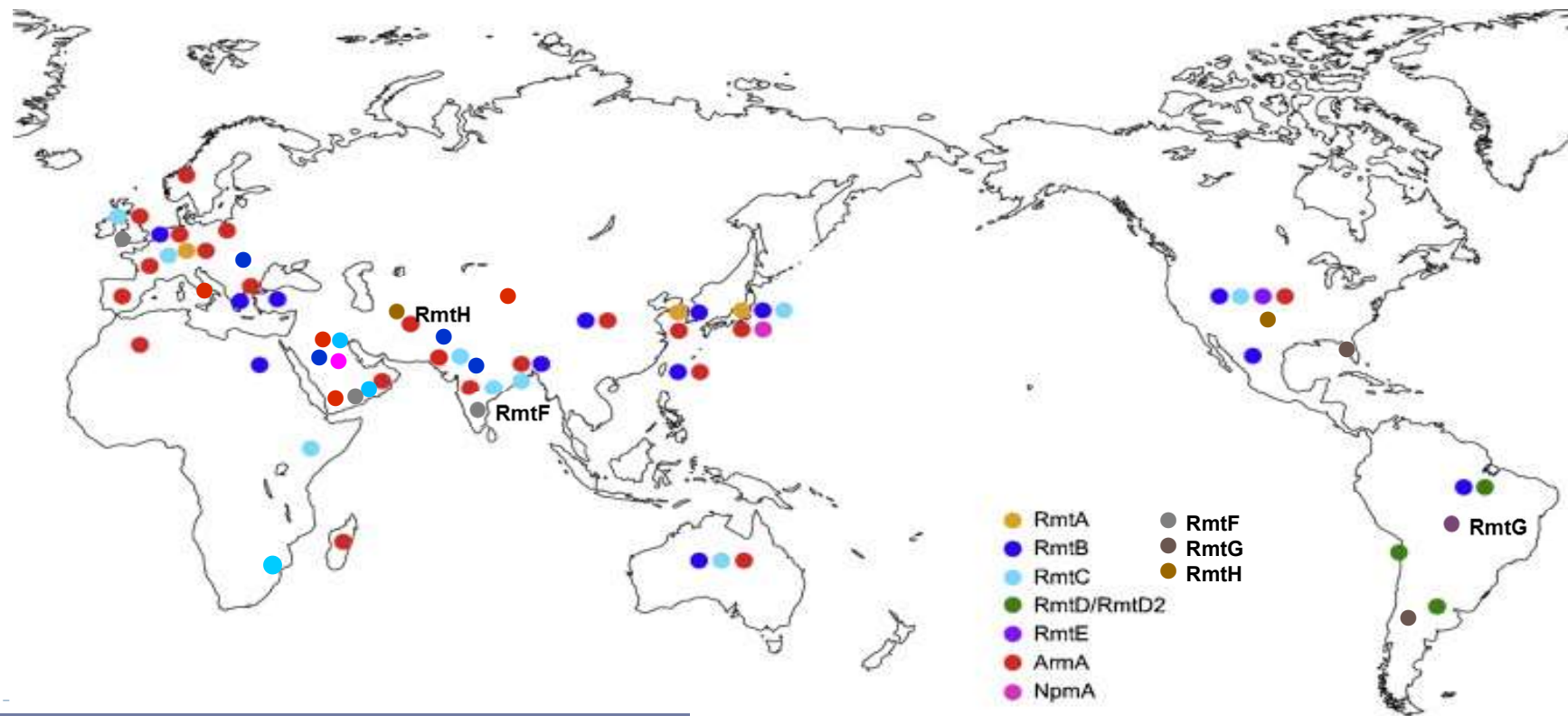
Πρώτη απομόνωση Gram-αρνητικών βακτηρίων που παρήγαγαν επίκτητη 16S-rRNA μεθυλάση

Date	16S-RMT	Bacterial species	Country	Specimen	Mobile element	Coexisting resistance genes	Reference
1996	<i>armA</i>	<i>C.freundii</i>	Poland	Clinical isolate	ISCR1	<i>bla</i> _{CTX-M-3'} , <i>bla</i> _{TEM-1'} , <i>aacC2</i> , <i>aadA2</i> , <i>dfrA12</i> , <i>sul1</i>	Golebiewski et al, 2007
1997	<i>rmtA</i>	<i>P.aeruginosa</i>	Japan	Sputum	κγ		Yokoyama et al, 2003
2002	<i>rmtB</i>	<i>S.marcescens</i>	Japan	Sputum	Tn3	<i>bla</i> _{TEM-1'} , <i>aadA2</i>	Doi et al, 2004
2003	<i>rmtC</i>	<i>P.mirabilis</i>	Japan	Throat swab	ISEcp1	<i>aphA1</i>	Wachino et al, 2006
2003	<i>npmA</i>	<i>E.coli</i>	Japan	Urine	IS26		Wachino et al, 2007
2005	<i>rmtD</i>	<i>P.aeruginosa</i>	Brazil	Urine		<i>bla</i> _{SPM-1}	Doi et al, 2007
2007	<i>rmtD2</i>	<i>E.aerogenes</i>	Argentina	Not reported	ISCR14	<i>cat</i> , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>sul1</i>	Tijet et al, 2011
2010	<i>rmtE</i>	<i>E.coli</i>	USA	Cattle		<i>aph(3')-Ia</i> , <i>aphA7</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i>	Davis et al, 2010
2011	<i>rmtF</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Réunion Island	Clinical isolate	ISCR5	<i>bla</i> _{NDM-1'} , <i>bla</i> _{OXA-1'} , <i>aac(6')-Ib</i>	Galimand et al, 2012
2011	<i>rmtG</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Brazil	Clinical isolates		<i>bla</i> _{KPC-2'} , <i>bla</i> _{CTX-M-15'}	Bueno et al, 2013
2009	<i>rmtH</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Iraq	Trauma	ISCR2	<i>bla</i> _{CTX-M-15'} , <i>bla</i> _{SHV-1'} , <i>bla</i> _{OXA-1'}	O'Hara et al, 2013

Τροποποιούν τον στόχο των αμινογλυκοσιδών (16S rRNA)

Παγκόσμια εξάπλωση των 16S-rRNA μεθυσών

Συνήθως <1%, στην Ανατολική Ασία 5-10%



Επικράτηση των 16SrRNA μεθυλασών στα Εντεροβακτηριακά

RESEARCH NOTE

Prevalence of 16S rRNA methylase genes in Enterobacteriaceae isolates from a Greek University Hospital

I. Galani, M. Souli, T. Panagea, G. Poulakou,
K. Kanellakopoulou and H. Giamarellou*

4th Department of Internal Medicine, Infectious Disease Laboratory, Molecular
Biology Section, Athens University School of Medicine, Chaidari, Greece

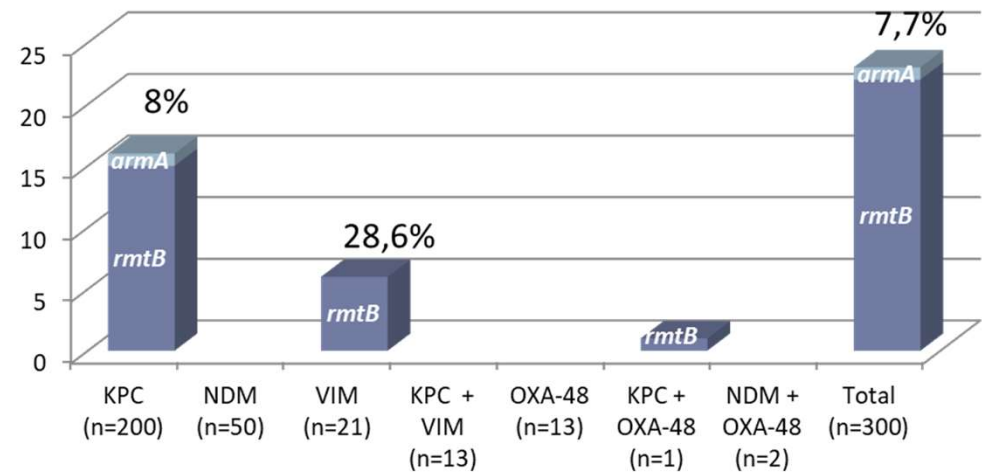
- ▶ Νοέμβριος 2007 – Οκτώβριος 2009 (2 χρόνια)
- ▶ *Klebsiella pneumoniae* (n = 1534)
 - ▶ 3 στελέχη (0.2%) με *rmtB*
 - ▶ 2 KPC-2, 1 DHA-1
- ▶ *E. coli* (n = 1398)
- ▶ *Proteus mirabilis* (n = 734)
 - ▶ 3 στελέχη (0.4%) με *rmtB*
 - ▶ 1 VIM-1
- ▶ *Enterobacter spp.* (n = 414)

Επικράτηση των 16SrRNA μεθυλασών στα Gram αρνητικά στελέχη

Σε 5 νοσοκομεία του λεκανοπεδίου / πρώτο εξάμηνο του 2016

- ▶ Στελέχη *A.baumannii* με *armA*: 64.8%
- ▶ Στελέχη *P.stuartii* με *rmtB*: 55.1 %
- ▶ Στελέχη *K.pneumoniae* με *rmtB* ή *armA*: 3.9%
- ▶ Ένα στέλεχος *E.coli* με *rmtB*: 0.2%
- ▶ Όλα τα θετικά στελέχη παρήγαγαν καρβαπενεμάση

Επικράτηση των 16SrRNA μεθυλασών στις CP- *K.pneumoniae* πανελλαδικά





Letter to the Editor

Nosocomial dissemination of *Providencia stuartii* isolates producing extended-spectrum β -lactamases VEB-1 and SHV-5, metallo- β -lactamase VIM-1, and RNA methylase RmtB

Lamprini Galani ^a, Irene Galani ^a, Maria Souli ^a, Ilias Karaiskos ^a, Emanouella Katsouda ^b, Eleni Patrozou ^c, Fotini Baziaka ^a, Charalampos Paskalis ^b, Helen Giamarellou ^{a,*}

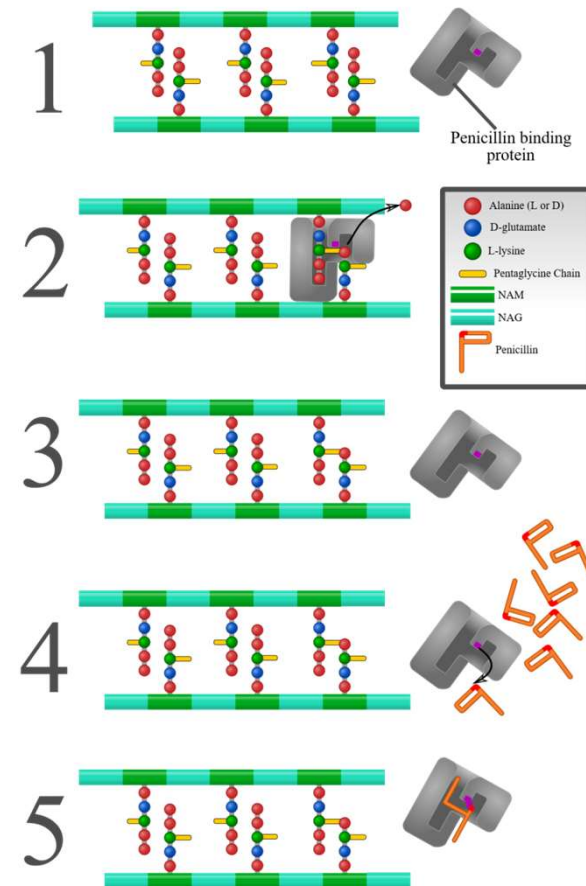
- ▶ Giakkoupi P, Tryfinopoulou K, Polemis M, Pappa O, Miriagou V, Vatopoulos A. Circulation of a multiresistant, conjugative, IncA/C plasmid within the nosocomial *Providencia stuartii* population in the Athens area. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015; 82: 62-4
- ▶ Douka E, Perivolioti E, Kraniotaki E, Fountoulis K, Economidou F, Tsakris A, Skoutelis A, Routsis C. Emergence of a pandrug-resistant VIM-1-producing *Providencia stuartii* clonal strain causing an outbreak in a Greek intensive care unit. *Int J Antimicrob Agents*. 2015; 45: 533-6
- ▶ Oikonomou O, Liakopoulos A, Phee LM, Betts J, Mevius D, Wareham DW. *Providencia stuartii* Isolates from Greece: Co-Carriage of Cephalosporin (bla_{SHV-5} , bla_{VEB-1}), Carbapenem (bla_{VIM-1}), and Aminoglycoside (*rmtB*) Resistance Determinants by a Multidrug-Resistant Outbreak Clone. *Microb Drug Resist*. 2016; 22: 379-86



Μηχανισμός αντοχής του *S.aureus* στη μεθικιλίνη

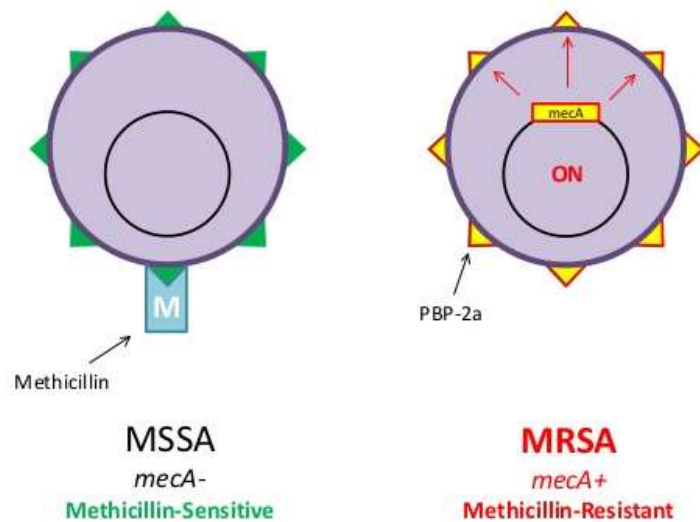
β-λακτάμες - PBPς

- ▶ Ο στόχος δράσης των β-λακταμών είναι οι PBPς στις οποίες προσδένονται, αναστέλλοντας τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης
- ▶ Οι PBPς δρουν ως τρανσπεπτιδάσες που καταλύουν την χιαστί σύνδεση των αλύσεων της πεπτιδογλυκάνης
- ▶ Τροποποίηση του στόχου δράσης–PBPς
- ▶ Απαντάται συνήθως στα Gram (+) βακτήρια και συμβαίνει με:
 - ▶ Απόκτηση νέων – ξένων PBPς (*mecA*-PBP-2a)
 - ▶ Ανασυνδυασμό των PBPς
 - ▶ Σημειακές μεταλλαγές στις υπάρχουσες PBPς
 - ▶ Υπερπαραγωγή PBP (σχετικά σπάνια)

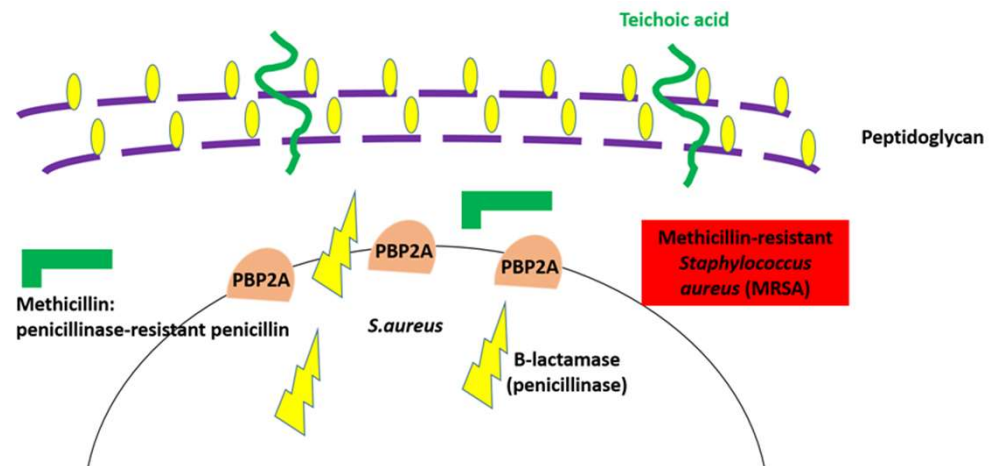


Μηχανισμός αντοχής του *S. aureus* στη μεθικιλίνη (MRSA)

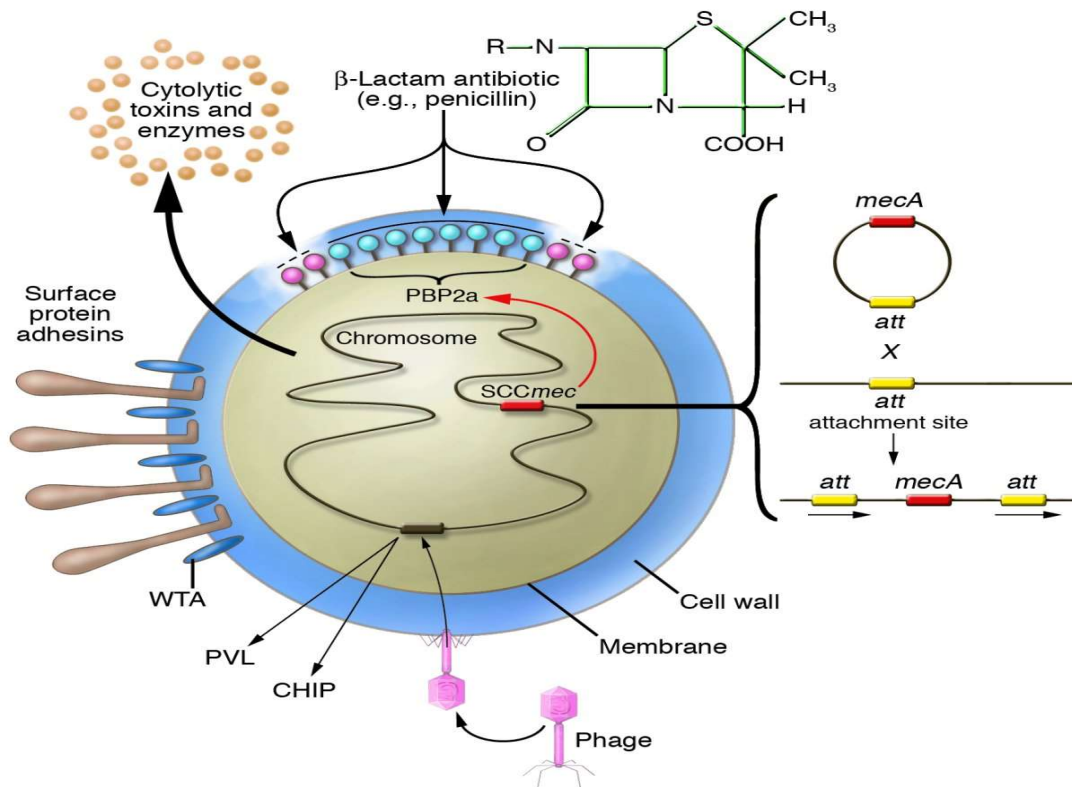
mecA-encoded Methicillin Resistance



- ▶ Ο MRSA παράγει PBP-2a που κωδικοποιείται από το *mecA*
- ▶ Η PBP-2a έχει χαμηλή συγγένεια για όλες τις β-λακτάμες



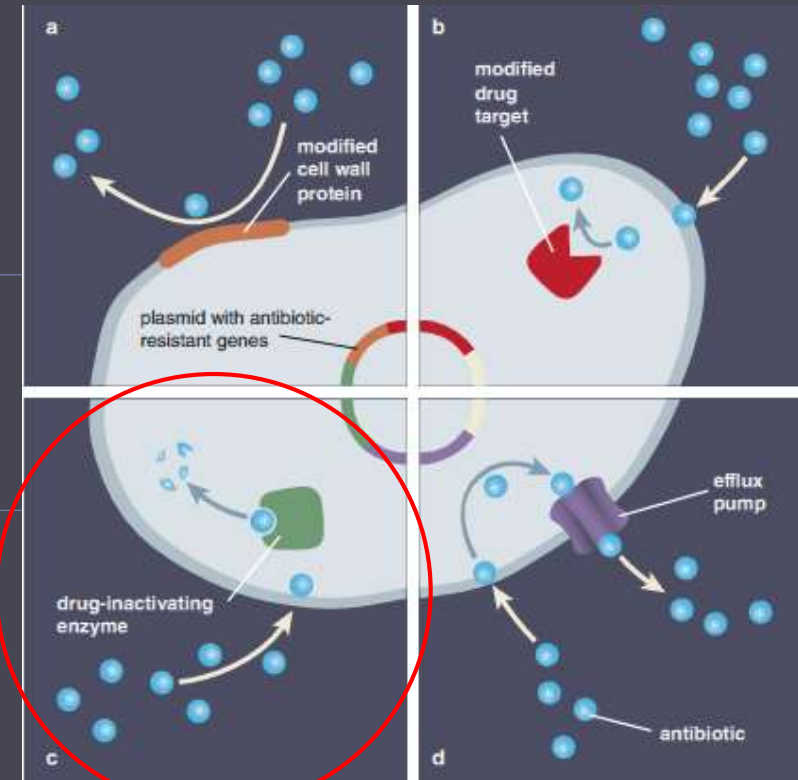
Staphylococcus aureus: Απόκτηση αντοχής στη μεθικιλίνη



- ▶ Οριζόντια μεταφορά στοιχείου DNA που ονομάζεται SCCmec
- ▶ Η ενσωμάτωση στο χρωμόσωμα γίνεται με τοποειδικό ανασυνδυασμός στη θέση *att*
- ▶ Το γονίδιο *mecA* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PBP2α
- ▶ Η PBP2α είναι μια 78 KDa PBP – ικανή να συνθέτει κυτταρικό τοίχωμα
- ▶ Η PBP2α έχει χαμηλή συγγένεια για όλες τις β-λακτάμες

Ενζυμική αδρανοποίηση

β-λακτάμες: β-λακταμάσες
Αμινογλυκοσίδες: τροποποιητικά ένζυμα



Αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά

▶ β-Λακταμάσες

Κυρίαρχος στα
Gram-αρνητικά

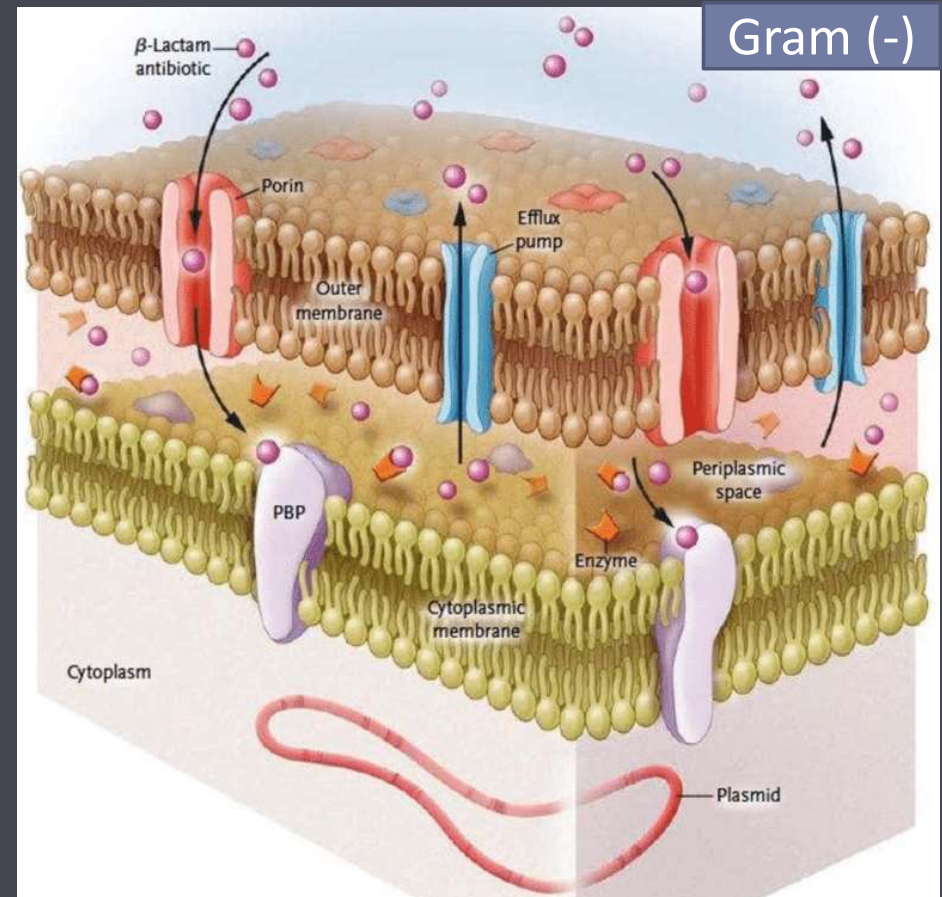
▶ Μειωμένη διαπερατότητα

- ▶ Αντλίες ενεργητικής εκροής
- ▶ Μειωμένη πρόσληψη (πορίνες)

▶ Τροποποίηση PBPs

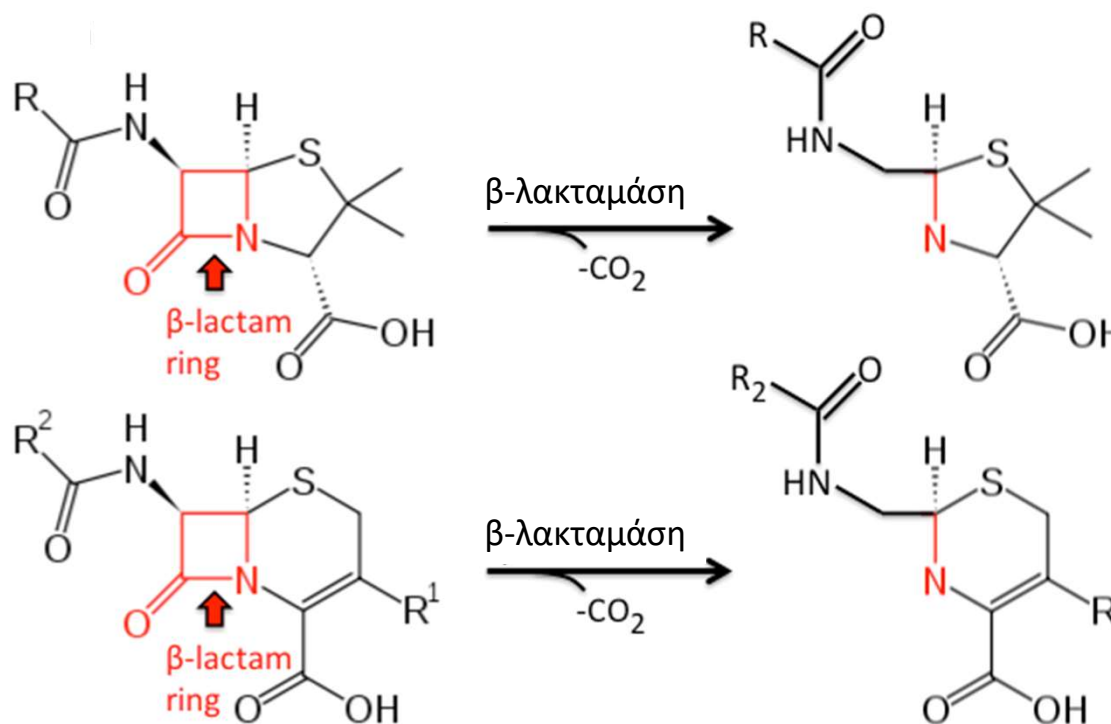
Κυρίαρχος στα
Gram-θετικά

- ▶ Παράκαμψη στόχου (*mecA S.aureus*)



Δομή πυρήνα β-λακταμών & υδρόλυση από β-λακταμάση

Πενικιλίνη

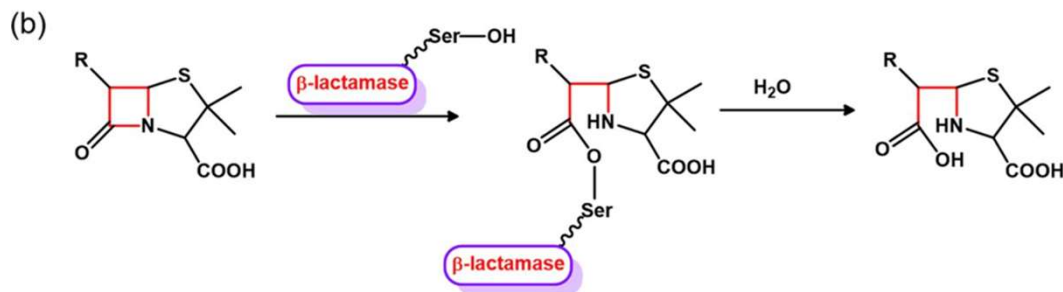
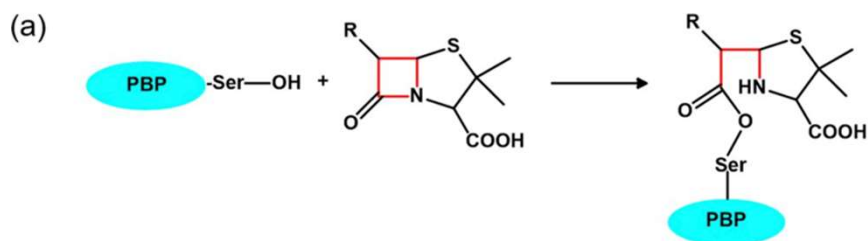


Κεφαλοσπορίνη

αδρανή προϊόντα υδρόλυσης

Οι β-λακταμάσες είναι ένζυμα που αδρανοποιούν τις β-λακτάμες, υδρολύοντας τον αμιδικό δεσμό O=C-N του β-λακταμικού δακτυλίου

Μηχανισμός δράσης των β-λακταμών και των β-λακταμασών



a. Οι β-λακτάμες συνδέονται μη αναστρέψιμα με τις PBPs, εμποδίζοντας τα βακτήρια να συνθέσουν το κυτταρικό τους τοίχωμα

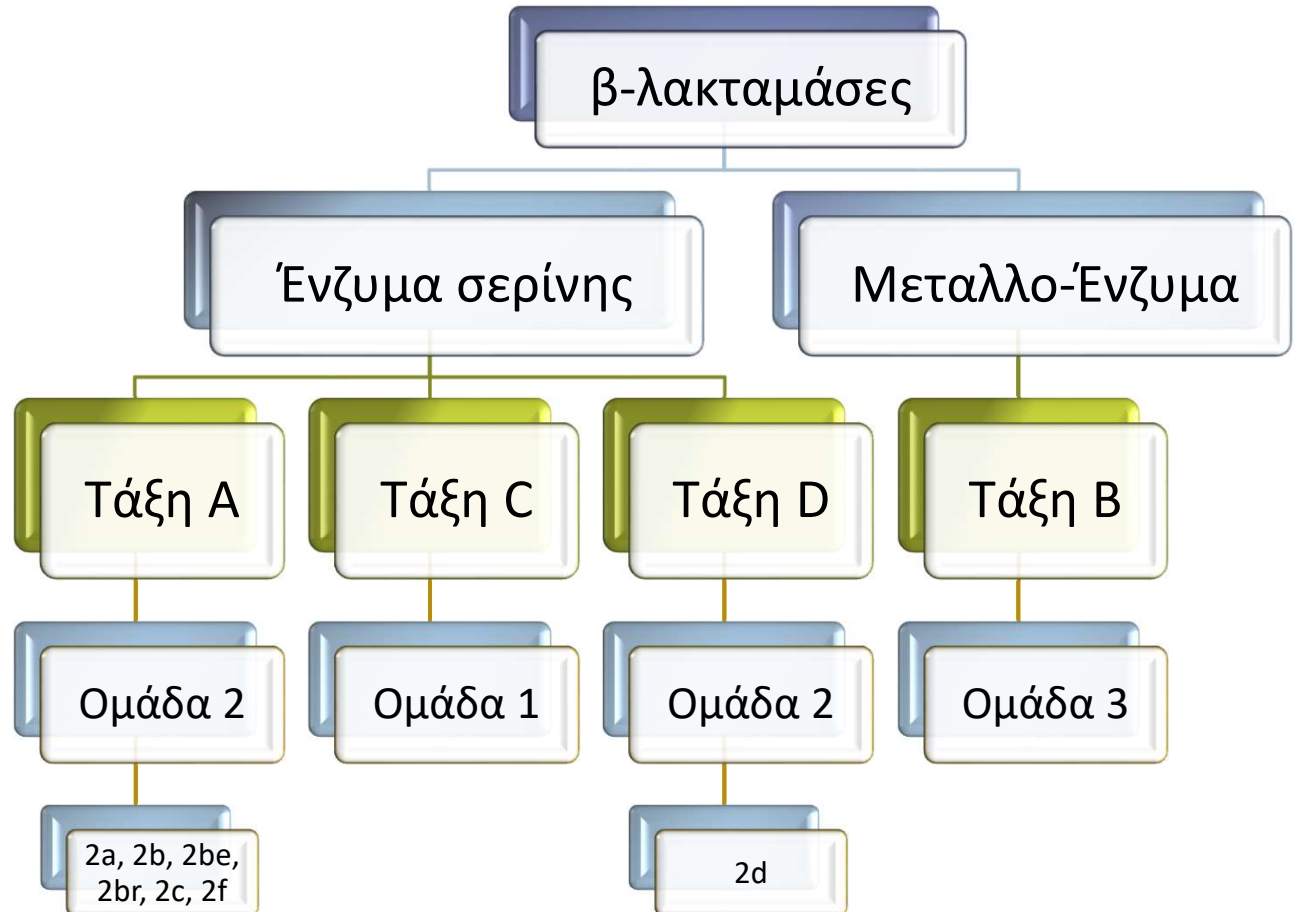
b. Οι β-λακταμάσες αλληλεπιδρούν με τις β-λακτάμες αλλά σχηματίζουν μόνο έναν προσωρινό δεσμό, οδηγώντας σε υδρόλυση

Ταξινόμηση β-λακταμασών

Ενεργό κέντρο

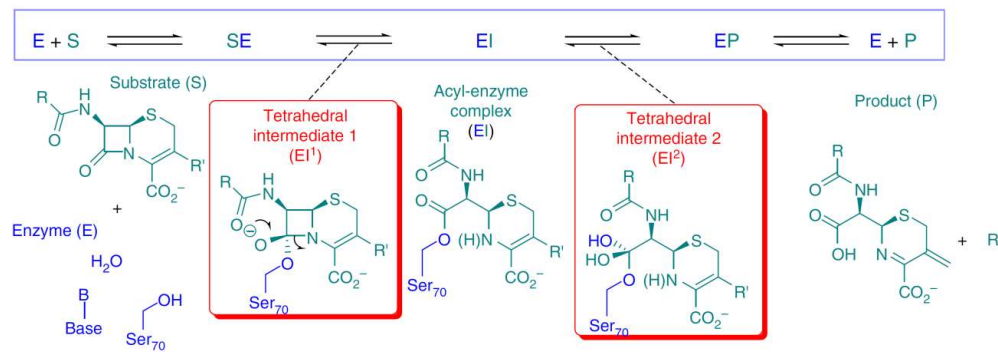
Αμινοξική αλληλουχία
κατά *Ambler*

Λειτουργικές ομάδες
κατά *Bush et al*

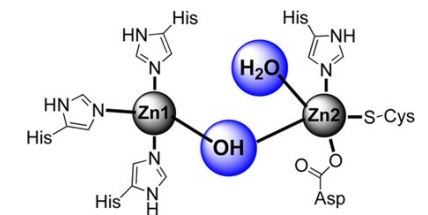
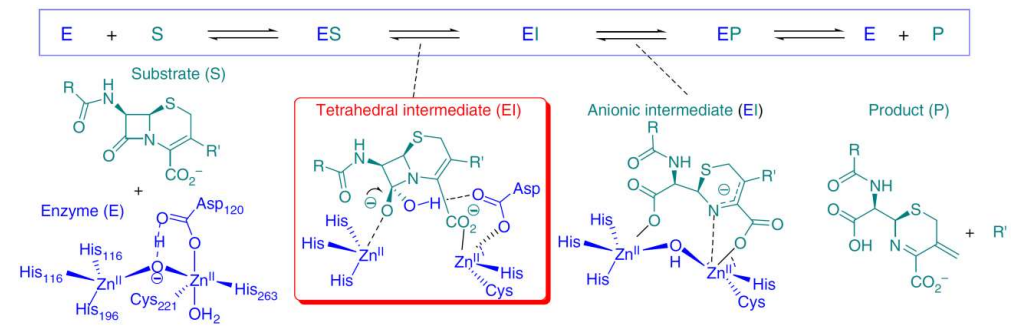


Τρόπος δράσης

Serine-β-lactamase catalysis

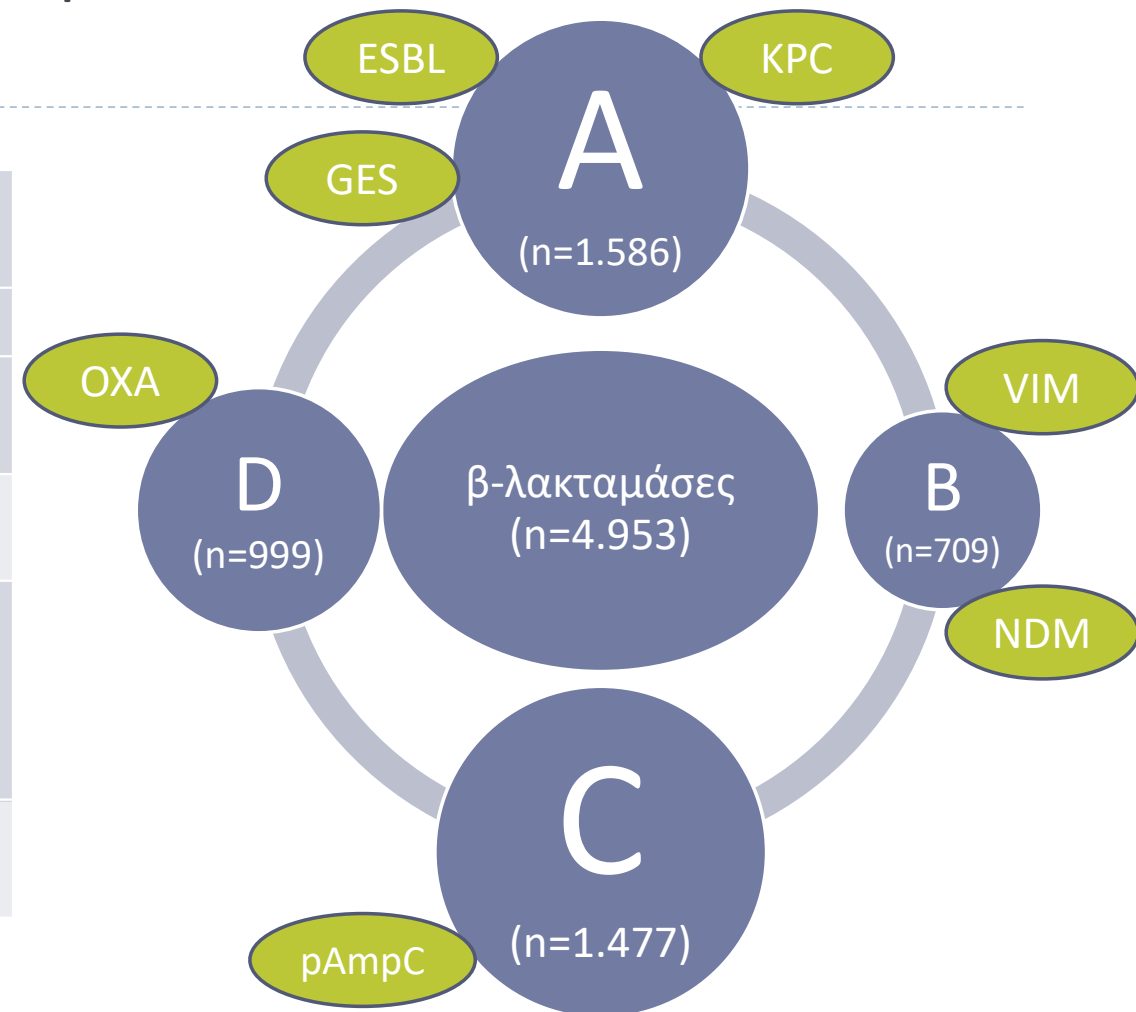


Metallo-β-lactamase catalysis

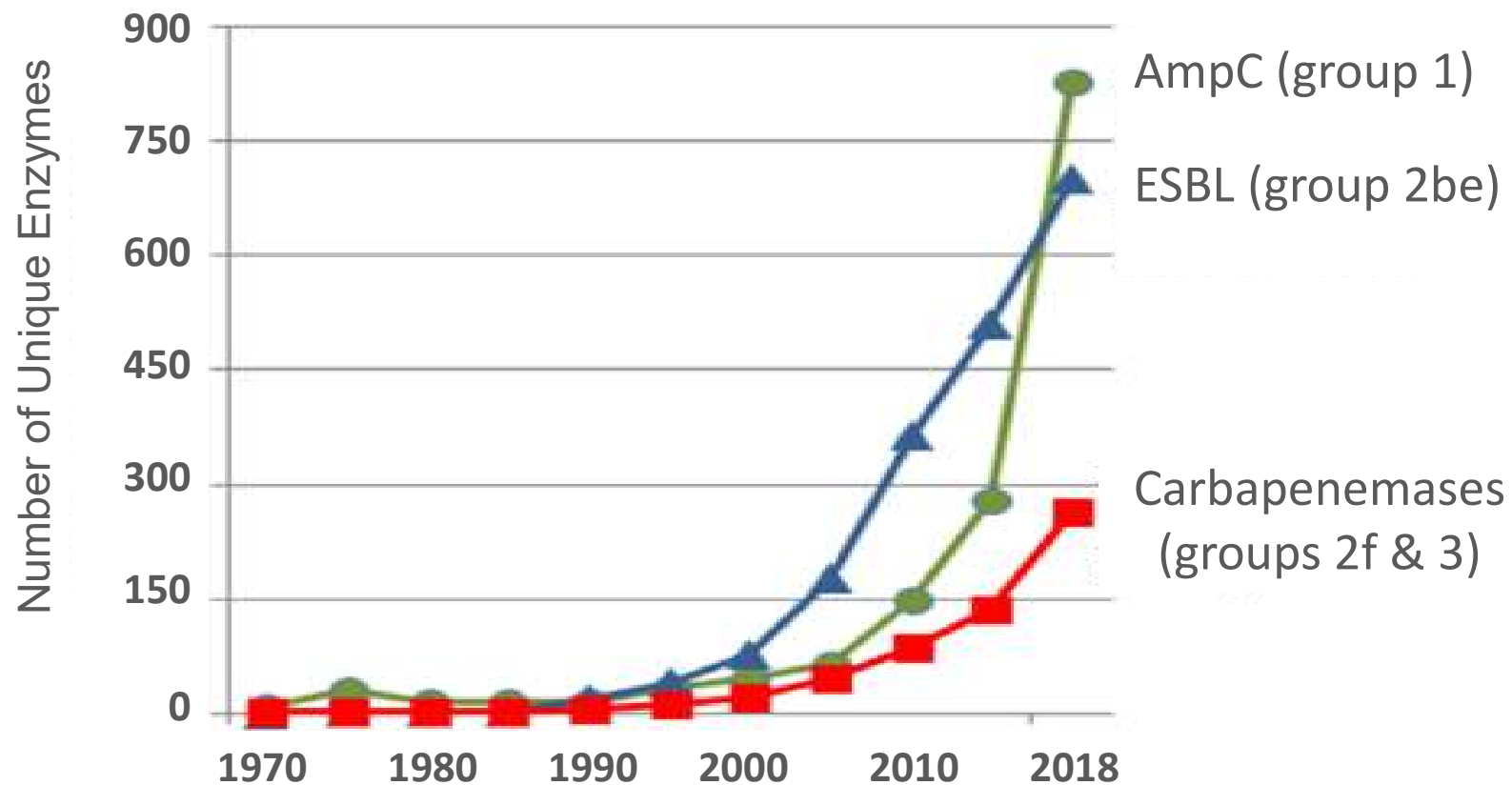


Μοριακή ταξινόμηση των β-λακταμασών κατά Ambler

A	TEM, SHV, CTX-M πλασμιδιακές β-λακταμάσες
	Σταφυλοκοκκικές πενικιλινάσες
	Χρωμοσωμιακές των <i>Klebsiella</i> , <i>P.vulgaris</i> , <i>B.fragilis</i>
B	Μεταλλο-β-λακταμάσες
C	Χρωμοσωμιακές κεφαλοσπορινάσες των Gram-αρνητικών
D	OXA-τύπου πλασμιδιακές β-λακταμάσες

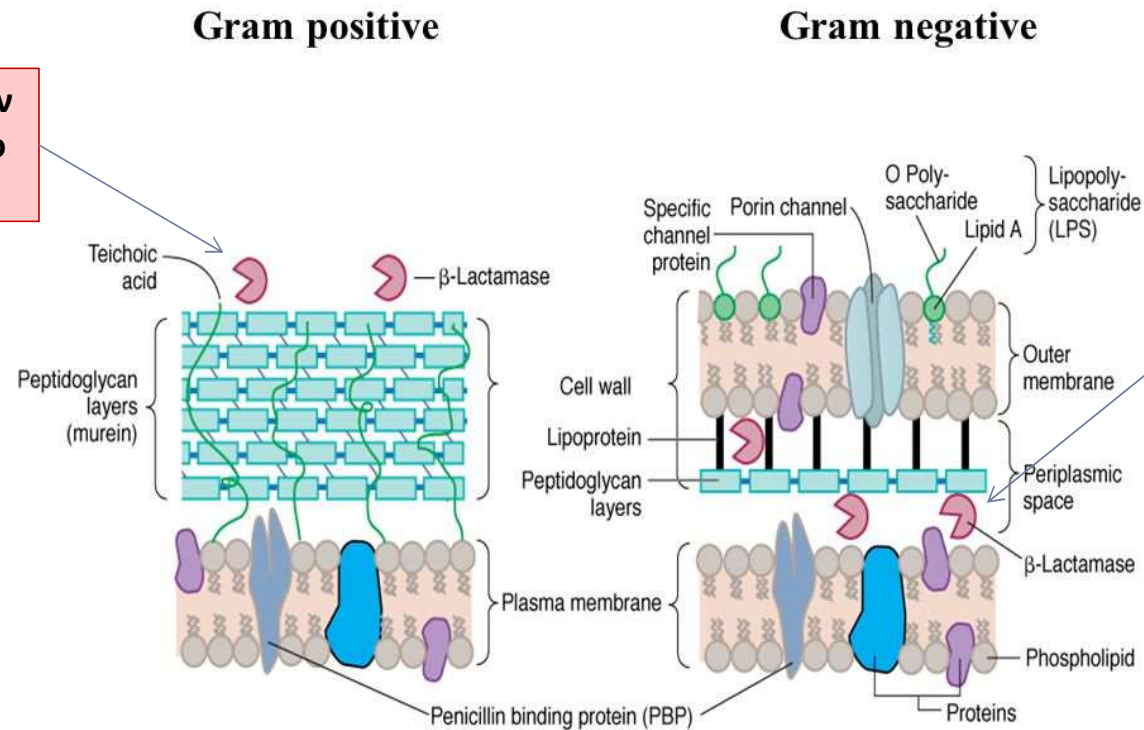


Αύξηση του αριθμού των β-λακταμασών (ESBL, carbapenemases, AmpC) από το 1970 έως σήμερα



Η θέση δράσης των β-λακταμασών

β-λακταμάσες στον
εξωκυττάριο χώρο
(εξωένζυμα)

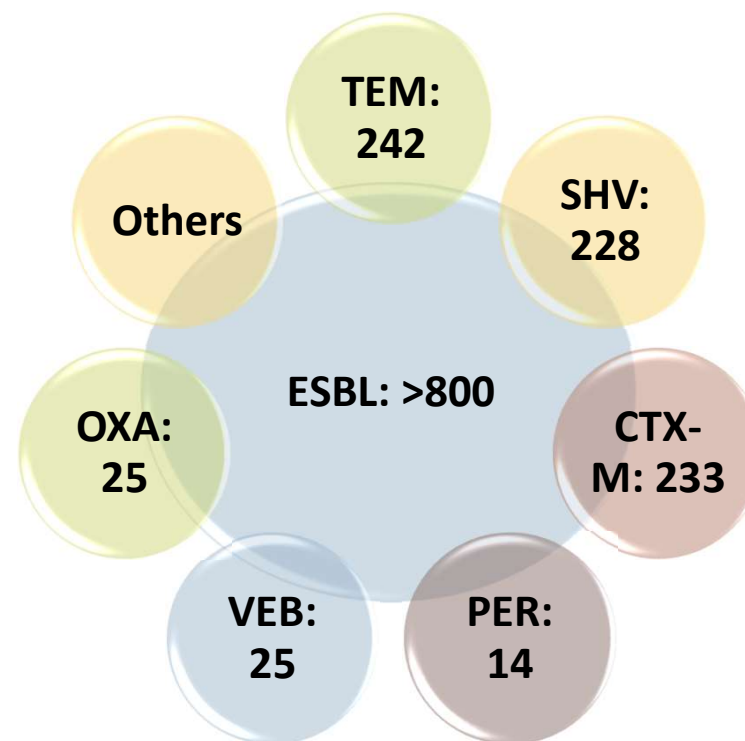


β-λακταμάσες στον
περιπλασμικό χώρο

Αντοχή στις β-λακτάμες

Ευρέως φάσματος β-λακταμάσες (ESBL)

- ▶ Προσδίδουν αντοχή στις πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες 1^η- 4^η γενιάς, και στις μονοβακτάμες, όχι όμως στις καρβαπενέμες και τις κεφαμυσίνες
- ▶ Αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ
- ▶ Προέρχονται από τις β-λακταμάσες ομάδας A: TEM-1 και SHV-1. Άλλες κύριες ομάδες: CTX-M, VEB, PER,... αλλά και OXA
- ▶ Διαφέρουν από τους προγόνους τους με 1-5 αμινοξέα



Η Ιστορία του πρώτου *E. coli* ανθεκτικού στην αμπικιλίνη

- ▶ Ιούνιος 1964: Πρώτη κυκλοφορία της αμπικιλίνης στην Ευρώπη
- ▶ Δεκέμβριος 1964: Ανίχνευση του πρώτου στελέχους *E. coli* ανθεκτικού στην αμπικιλίνη
- ▶ Κα Temoneira (Αθήνα, Ελλάδα):
 - ▶ *E. coli* από ουρολοίμωξη
 - ▶ Παρήγαγε β-λακταμάση (TEM-1)
 - ▶ Το γονίδιο της β-λακταμάσης βρισκόταν σε πλασμίδιο

PENICILLINASE SYNTHESIS CONTROLLED BY INFECTIOUS R FACTORS IN ENTEROBACTERIACEAE

By DR. NAOMI DATTA

Department of Bacteriology, Postgraduate Medical School, London

AND

DR. POLYXENI KONTOMICHALOU

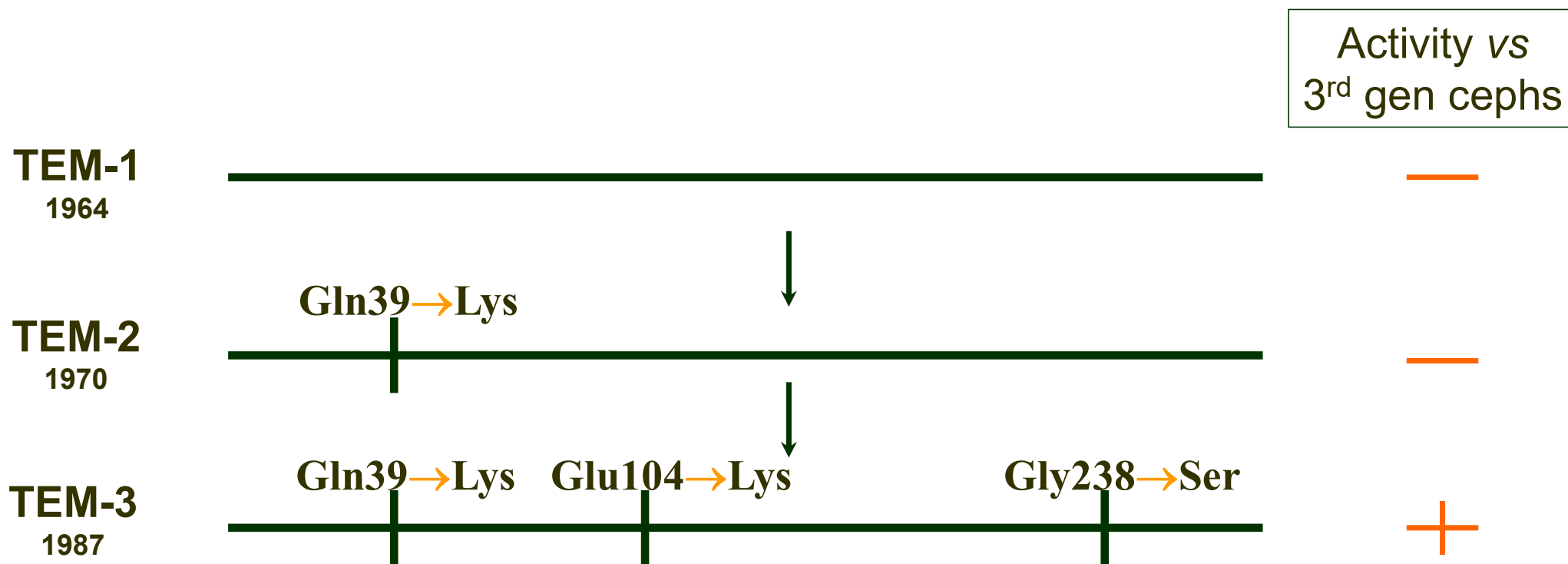
Department of Bacteriology, Clinic of Therapeutics, University of Athens

RESISTANCE to antibacterial drugs may be transferred from one bacterium to another among the Enterobacteriaceae by direct cell-to-cell contact (conjugation). This transferable resistance was discovered in Japan¹⁻³ and later reported in Britain⁴ and in Germany⁵. The infectious agents which mediate the transfer are known as resistance factors (*R* factors) and have been shown to be extra-chromosomal genetic elements, or plasmids, consisting of deoxyribonucleic acid^{9,6}. *R* factors are transferred by conjugation between cells of many genera—all the Enterobacteriaceae⁷ as well as other Gram-negative bacilli such as *Vibrio*⁸, *Serratia*⁸ and *Pasteurella*¹⁰. The resistance conferred by the *R* factors first described was against the four drugs streptomycin, tetracycline, chloramphenicol and sulphonamides, usually to all four together, but sometimes against three, two or one of them. Lebek⁴ described an *R* factor which conferred resistance to neomycin and kanamycin, as well as to the original four drugs.

That genetic information for resistance to penicillins, including ampicillin, could be carried on *R* factors was found independently in Britain¹¹, in Greece (Kontomichalou, unpublished data) and in Switzerland (Lebek, personal communication). Preliminary experiments¹¹ suggested that infectious resistance to penicillins was dependent on the production of a penicillin-destroying enzyme. We now report that this enzyme is penicillinase (*EC* 3.5.2.6), since on incubation with benzylpenicillin it liberates penicilloic acid. We therefore present evidence that the genetic information for the biosynthesis of penicillinase is carried on the *R* factor.

R factors and host bacteria. The *R* factors we have studied are listed in Table I. The host bacteria in which penicillin resistance was studied were *Escherichia coli* K12, *E. coli* strain TEM the *R* factor of which had been eliminated by acriflavine treatment¹², and *Salmonella typhi* strain 152, a drug-sensitive strain isolated in Greece in 1962.

Εξέλιξη των ESBL



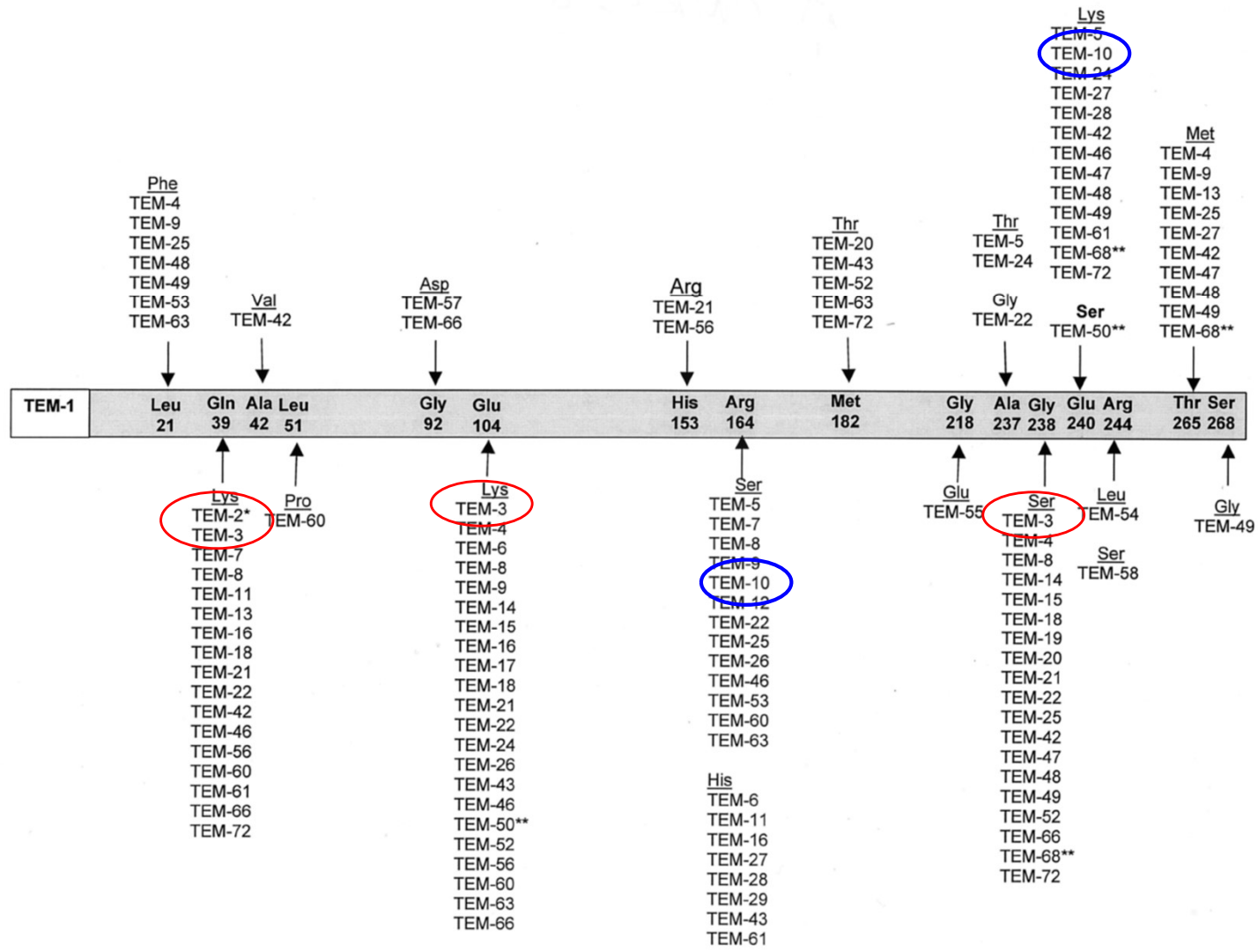
Novel Plasmid-Mediated β -Lactamase (TEM-10) Conferring Selective Resistance to Ceftazidime and Aztreonam in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*

JOHN P. QUINN,^{1*} DEBORAH MIYASHIRO,¹ DANIEL SAHM,¹ ROBERT FLAMM,² AND KAREN BUSH²

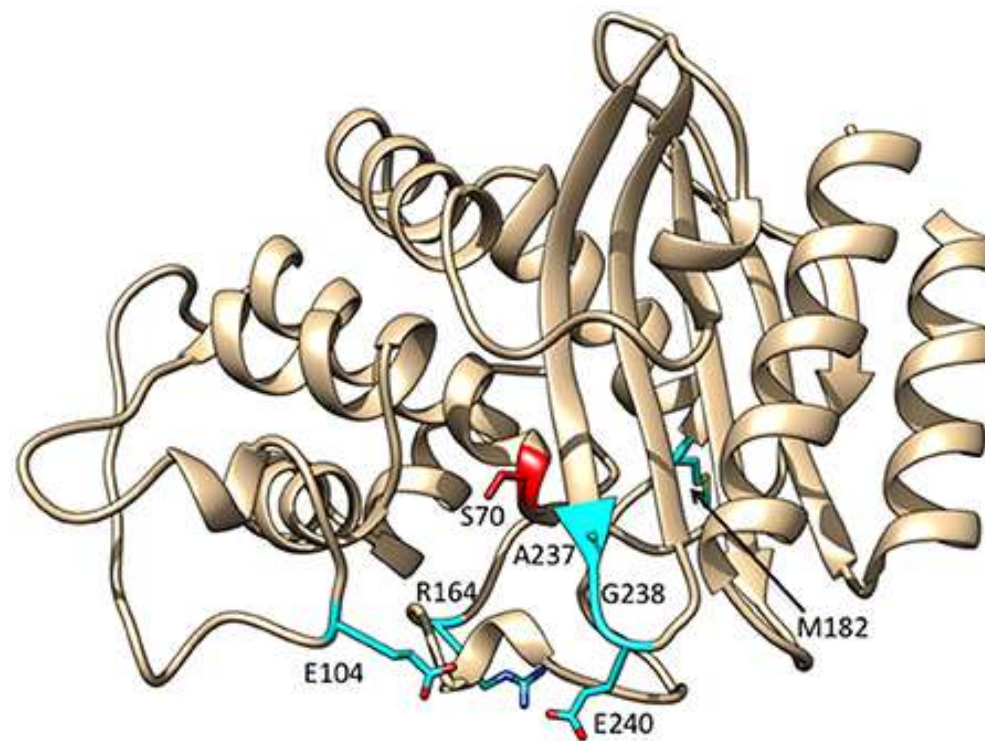
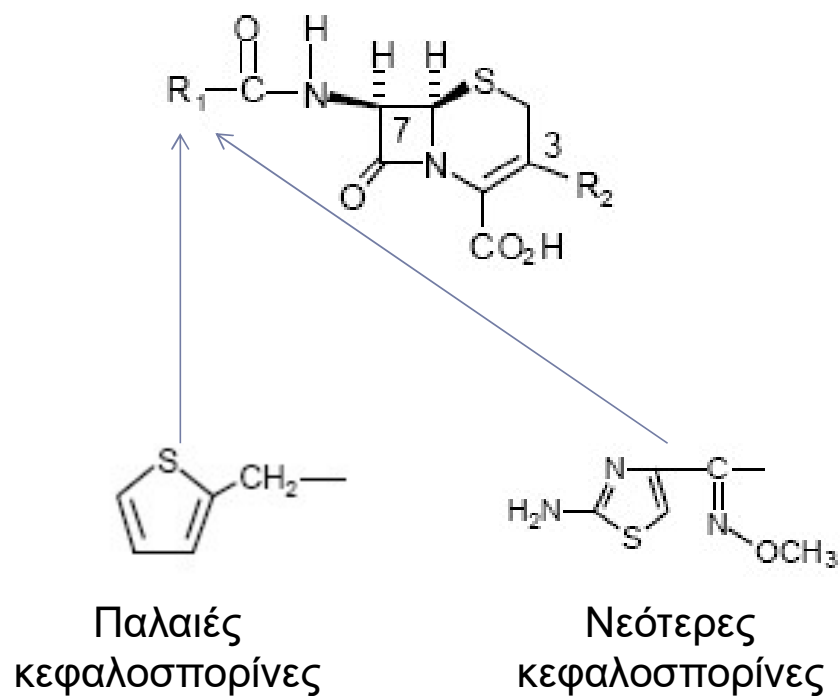
MICs (mg/L) των ESBL- θετικών *E. coli*

	R-	TEM-1+	TEM-3+	TEM-10+
Amoxicilin	2	1024	>2048	1024
Piperacillin	1	128	256	>128
Piperacillin/ Tazobactam 4mg/L	0.5	1	2	2
Cefotaxime	0.03	0.03	8	0.25
Ceftazidime	0.25	0.5	16	128
Aztreonam	0.06	0.12	8	64
Cefoxitin	4	4	8	4
Imipenem	0.12	0.12	0.12	0.12
Meropenem	0.03	0.03	0.03	0.03





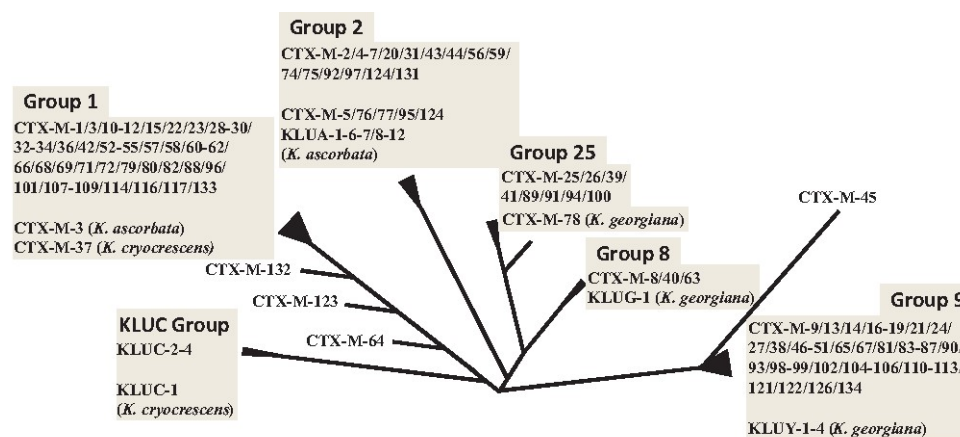
Οι αμινοξικές αλλαγές στις ESBL διευρύνουν το ενεργό κέντρο ώστε να “χωράει” την οξυιμινο-ομάδα των νεότερων κεφαλοσπορινών



Ευρέως φάσματος β-λακταμάσες (ESBL)

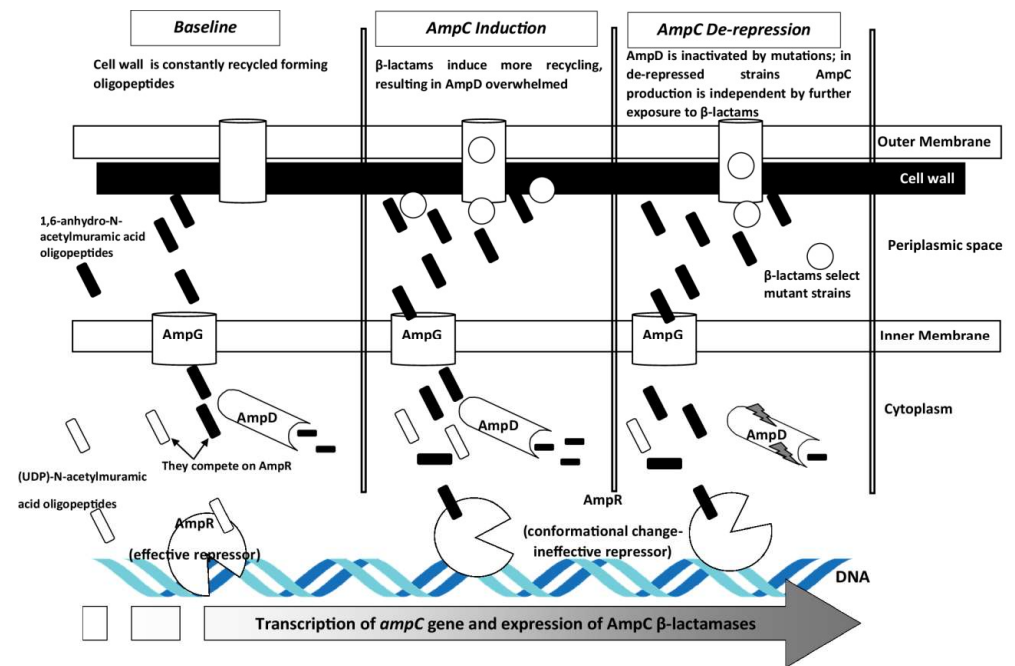
CTX-M-1 έως CTX-M-226

- Προέρχονται από το είδος *Kluyvera* (κινητοποίηση χρωμοσωμικών γονιδίων σε πλασμίδια με φορείς μεταθετά στοιχεία)
- Ομαδοποιούνται σε έξι ομάδες (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25, CTX-M-45) με βάση την ομοιότητα της αμινοξικής αλληλουχίας
- Το πρώτο ένζυμο τύπου CTX-M κλινικής προέλευσης, περιγράφηκε σε εντεροβακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν στην Ευρώπη στα τέλη της δεκαετίας του 1980
- Υδρολύουν περισσότερο την κεφταξίμη και την κεφεπίμη, σε σχέση με την κεφταζιδίμη (εξαιρούνται οι CTX-M-15, -16, -27)
- Αναστέλλονται από την ταζομπακτάμη και λιγότερο από το κλαβουλανικό
- Έχουν διασπαρεί στην κοινότητα



Χρωμοσωμικές κεφαλοσπορινάσες AmpC

- ▶ Ανήκουν στην Τάξη C (κατά Ambler) και στην ομάδα 1 (κατά Bush)
- ▶ Κωδικοποιούνται κυρίως από χρωμοσωμικά γονίδια πολλών ειδών κυρίως Εντεροβακτηριακών
- ▶ Υδρολύουν όλα τα β-λακταμικά, εκτός της κεφεπίμης και των καρβαπενεμών
- ▶ Είναι ανθεκτικές στις κεφαμυσίνες (κεφοξιτίνη)
- ▶ Δεν αναστέλλονται από κλαβουλανικό, ταζομπακτάμη
- ▶ Η παραγωγή τους είναι
 - ▶ Ιδιοσυστασιακή (constitutive)
 - ▶ Επαγωγήμη (inducible) – αναστρέψιμη κατάσταση
 - ▶ Αποκατεσταλμένη (derepressed) – μόνιμη υπερπαραγωγή
- ▶ Η σύνθεση και παραγωγή τους ελέγχεται από ένα σύστημα γονιδίων *ampC-ampG-ampD-ampR*



Πλασμιδιακές AmpC βλακταμάσες

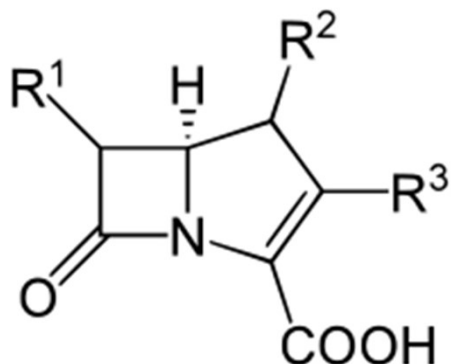
- ▶ Αναφέρονται όλο και περισσότερο παγκοσμίως (από το 1989)
- ▶ Προήλθαν από τα χρωμοσωμικά γονίδια των Εντεροβακτηριακών που παράγουν AmpC
- ▶ Κατατάσσονται σε τουλάχιστον πέντε φυλογενετικές ομάδες
- ▶ Εκφράζονται συνήθως ιδιοσυστατικά, παρέχοντας αντοχή παρόμοια με εκείνη των αποκατασταλμένων cAmpCs
- ▶ Εξαίρεση αποτελούν μερικά *ramrC*, όπως το *bla*_{DHA-1}, που είναι επαγώγιμα, με ρυθμιζόμενη έκφραση παρόμοια με εκείνη των χρωμοσωμικών γονιδίων
- ▶ Τα συναντάμε σε *E. coli*, *K. pneumoniae* και *P. mirabilis*, αλλά και σε *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica* και *Shigella spp.*

Phylogenetic Group	Family	Members
<i>Enterobacter</i> group	MIR	22
	ACT	68
<i>Citrobacter freundii</i> group	CMY-2-like	157
	LAT	1
	CFE	2
<i>Morganella morganii</i> group	DHA	28
<i>Hafnia alvei</i> group	ACC	7
<i>Aeromonas</i> group	CMY-1-like	14
	FOX	16
	MOX	12



Καρβαπενεμάσες

- ▶ Ένζυμα που υδρολύουν τις καρβαπενέμες
 - ▶ Και τις περισσότερες β-λακτάμες
- ▶ Κωδικοποιούνται από χρωμοσωμικά αλλά πιο συχνά από πλασμιδιακά γονίδια



Είδη καρβαπενεμασών

Μοριακή Ομάδα*	Καρβαπενεμάση
A	KPC
	BIC, GES, IMI, NMC, SME
B (MBL)	IMP, VIM , NDM
	AIM, DIM, GIM, SIM, SPM, TMB
C	-
D	OXA-48-like
	OXA-23, -40, -58, -143, -235

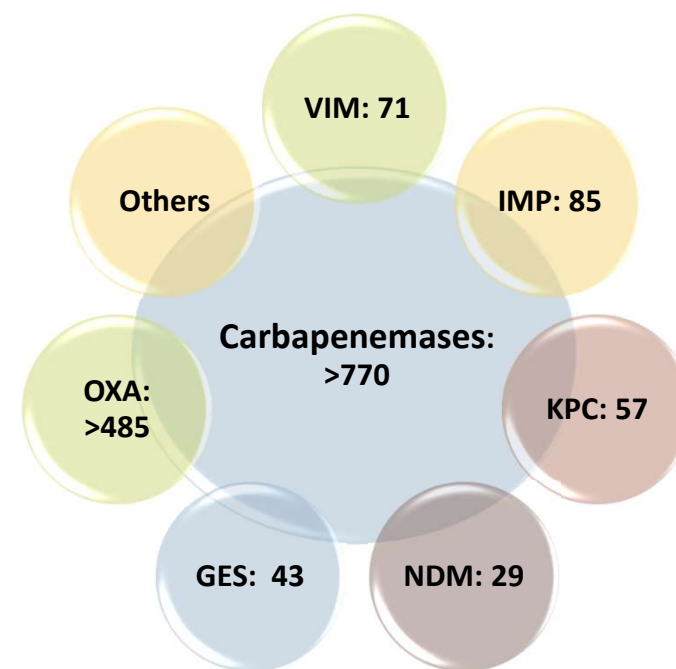
* Βασίζεται στην ομολογία της αμινοξικής αλληλουχίας

Enzyme family	Ambler Class	Pathogens	β-lactamases group
Serine-β-lactamases	A	Enterobacteriaceae	KPC-enzymes
		<i>P. aeruginosa</i>	GES-enzymes
			SME
			IMI
		Enterobacteriaceae	NMC-A
			SHV-38
			SFC-1
Serine-β-lactamases	D		OXA 23 group
		<i>Acinetobacter</i>	OXA 24 group
			OXA 58 group
			OXA 51/66 group
		Enterobacteriaceae	OXA 48 group
		<i>B. fragilis</i>	Ccr A
Metallo-β-lactamases	B	<i>Pseudomonas</i>	IMP-enzymes
		<i>Acinetobacter</i>	VIM-enzymes
		Enterobacteriaceae	NDM-enzymes
			SPM-1
		<i>Pseudomonas</i>	GIM-1
		<i>Pseudomonas</i>	SIM-1
		<i>Acinetobacter</i>	

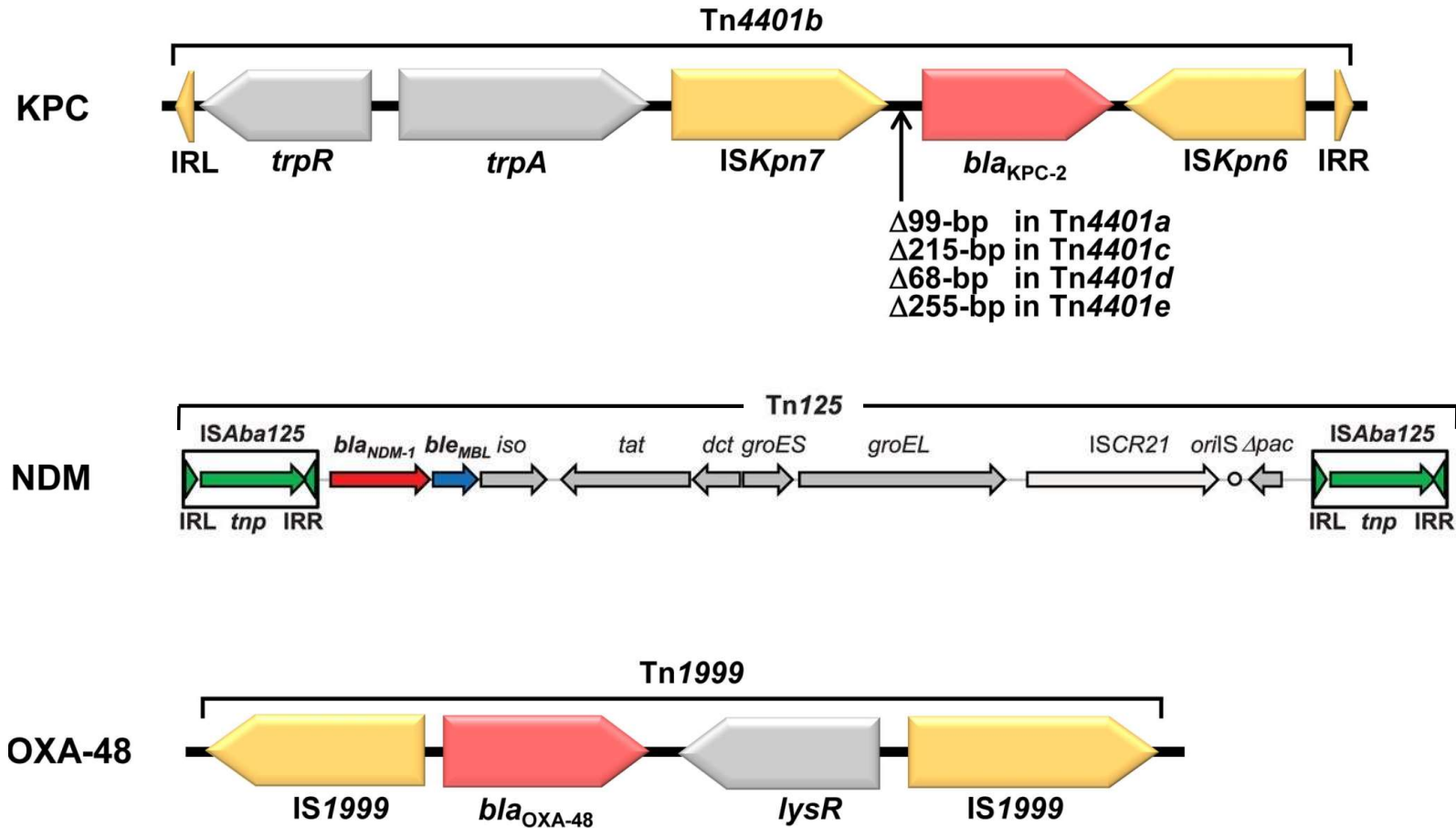
Επίκτητες καρβαπενεμάσες

26 Αυγούστου 2020

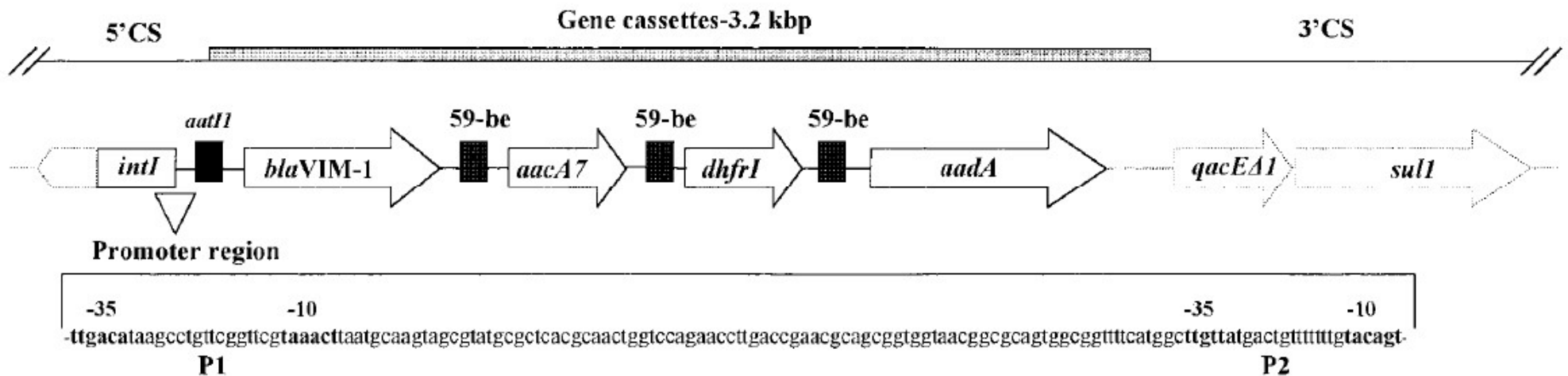
BLDB <http://bldb.eu>



Το γενετικό περιβάλλον των bla_{KPC-2} , bla_{NDM-1} και bla_{OXA-48}

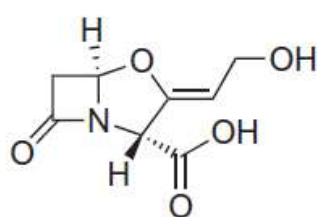


Σχηματική αναπαράσταση του integron ομάδας 1 που περιέχει το *bla*_{VIM-1} και περιέχεται στο πλασμίδιο p541

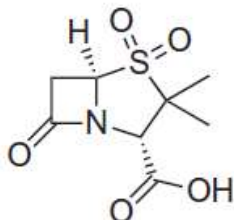


Αναστολείς β-λακταμασών

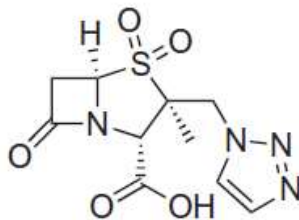
Αναστολείς με β-λακταμικό δακτύλιο



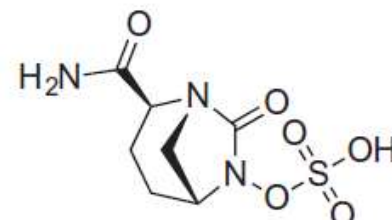
Clavulanic acid (1)



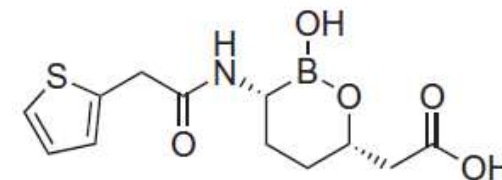
Sulbactam (2)



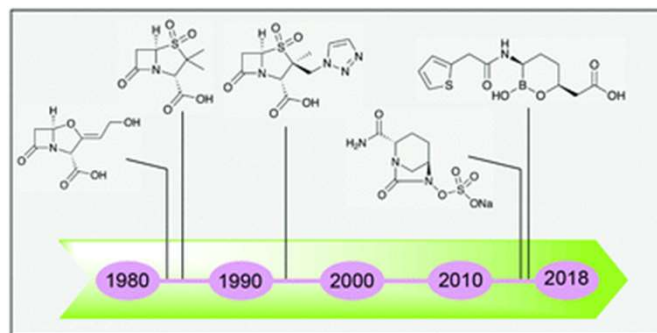
Tazobactam (3)



Avibactam (4)



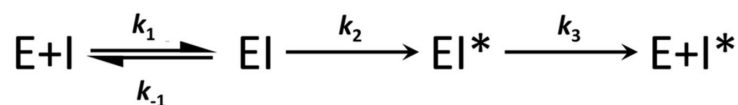
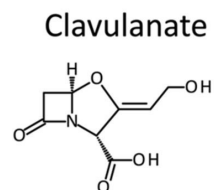
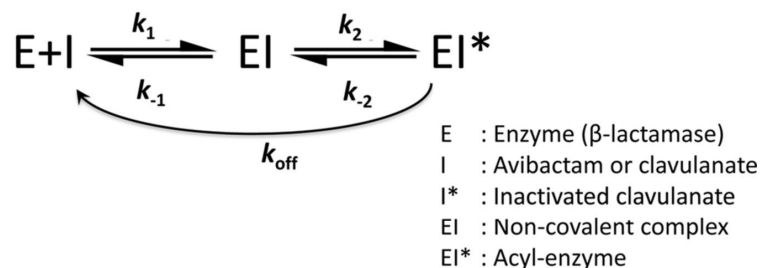
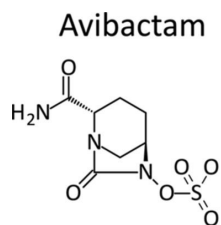
Vaborbactam (5)



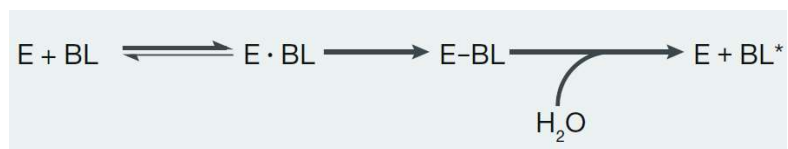
Αναστολείς χωρίς β-λακταμικό δακτύλιο

- ❖ Χωρίς β-λακταμικό δακτύλιο
- ❖ Το φάσμα αναστολής επεκτείνεται και στις KPC
- ❖ Αρκετές από τις οξακιλινάσες (class D) και όλες οι MBL (class B) είναι ανθεκτικές

Αναστολή β-λακταμασών



β-λακτάμη



BL : β-λακτάμη
 BL* : αδρανοποιημένη β-λακτάμη

- ▶ Οι αναστολείς συνδέονται με την σερίνη που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο των β-λακταμασών (όπως συνδέονται και οι β-λακτάμες).
- ▶ Στην περίπτωση της αβιπακτάμης η ακυλίωση είναι αναστρέψιμη, ενώ στην περίπτωση του κλαβουλανικού είναι μη αναστρέψιμη.
- ▶ Συνεπώς, η αποτελεσματικότητα της αναστολής των β-λακταμασών από την αβιπακτάμη εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ των φυσικών (ενεργών) και ακυλιωμένων (ανενεργών) μορφών του ενζύμου.

Ταξινόμηση β-λακταμασών

Ambler class ⁸ : catalytic site (spectrum)	Bush–Jacoby–Medeiros group ⁹ : catalytic site (spectrum)	Substrates	Inhibited by	Examples
A: serine (variable)	2a: serine (penicillinases)	Penicillins	Clavulanate, avibactam and other newer inhibitors ^a	Penicillinases from Gram-positive bacteria
	2b: serine (penicillinases)	Penicillins and narrow-spectrum cephalosporins	Clavulanate, avibactam and other newer inhibitors	TEM-1, TEM-2 and SHV-1
	2be: serine (ESBLs)	Penicillins and cephalosporins, including extended-spectrum	Clavulanate, avibactam and other newer inhibitors	SHV-2, TEM-10, CTX-M and GES-1
	2br: serine (inhibitor-resistant)	Penicillins	Avibactam and other newer inhibitors	TEM-30 and SHV-72
	2c: serine (penicillinases)	Penicillins and carbenicillin	Clavulanate, avibactam and other newer inhibitors	PSE (CARB)
	2f: serine (carbapenemases)	Penicillins, cephalosporins and carbapenems	Avibactam and other newer inhibitors	KPC, SME, NMC-A and GES-2
B: metallo (carbapenemase)	3: metallo (carbapenemases)	Most β-lactams, including carbapenems, but not monobactams	Chelating agents (EDTA) and ANT431	IMP, VIM and NDM
C ^b : serine (cephalosporinases)	1: serine (cephalosporinases)	Penicillins and cephalosporins	Cloxacillin, avibactam and other newer inhibitors	Chromosomal AmpC, CMY, ACT-1 and DHA
D ^c : serine (oxacillinases)	2d: serine (oxacillinases)	Penicillins and cloxacillin; some include cephalosporins and/or carbapenems	Sodium chloride; some by clavulanate, avibactam and other newer inhibitors	OXA-1/30, OXA-10, OXA-23 and OXA-48

“Νέοι” αναστολείς

Anibactam

- ▶ Συνδυάζεται με κεφταζιδίμη (Zavicefta)
- ▶ Δραστικό έναντι ESBLs (A), KPC (A), OXA-48, AmpC (C)
- ▶ Δεν είναι δραστικό έναντι των MBLs (B)
- ▶ Σημαντική δραστικότητα έναντι *P. aeruginosa*
- ▶ Ανάπτυξη αντοχής υπό αγωγή



24 Ιουνίου
2016

Vaborbactam

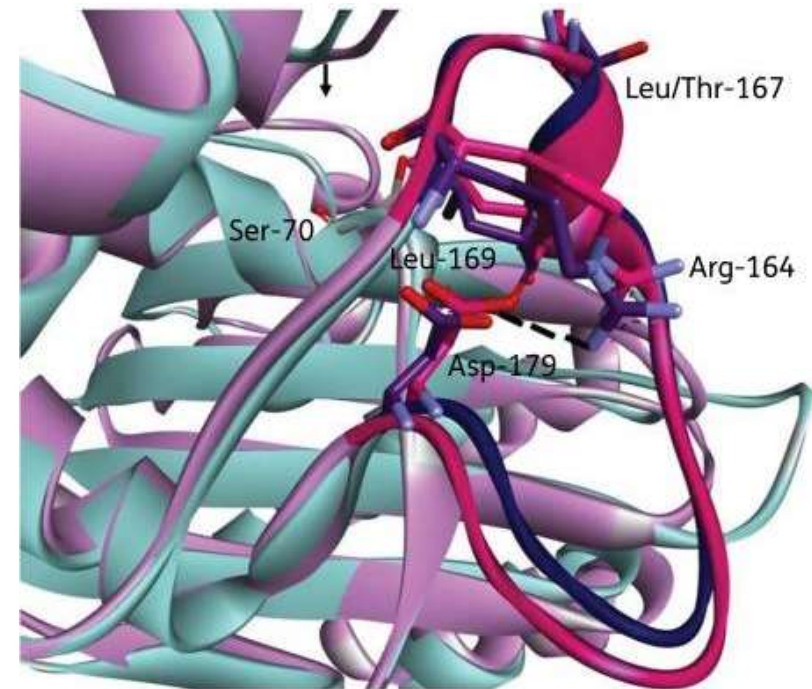
- ▶ Συνδυάζεται με μεροπενέμη (Vabomere)
- ▶ Δραστικό έναντι ESBLs (A), KPC (A), AmpC (C)
- ▶ Δεν είναι δραστικό έναντι των MBLs (B)
- ▶ Αντοχή έχει αναφερθεί σε στελέχη με μεταλλαγές στις πορίνες



2018

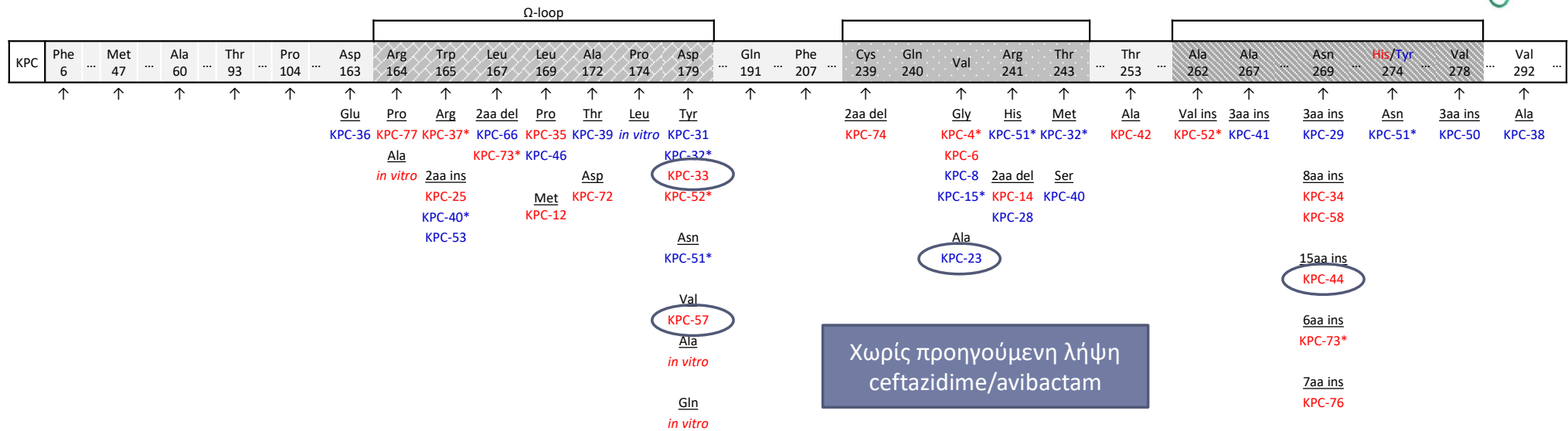
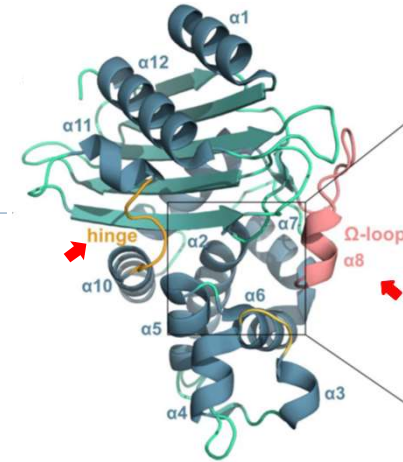
Ο βρόγχος Ω (Ω-loop) των β-λακταμασών τάξης A

	R164	L169	D179
SHV-1	D R W E T E L N E A L P G D A R D		
KPC-2	D R W E L E L N S A I P G D A R D		
CTXM-15	D R T E P T L N T A I P G D P R D		
TEM-1	D R W E P E L N E A I P N D E R D		



- ▶ "Hotspot" περιοχή στην οποία αμινοξικές αλλαγές επεκτείνουν το φάσμα υδρόλυσης πολλών ενζύμων
- ▶ Η περιοχή 164-179 σχηματίζει το "πάτωμα" του ενεργού κέντρου
- ▶ Αμινοξικές αλλαγές στις θέσεις 164, 169 και 179 της SHV-1 και της KPC-2 αύξησαν την MIC της κεφταζιδίμης

Αμινοξικές αλλαγές στην KPC που σχετίζονται με αντοχή στην κεφταζιδίμη/ αβιπακτάμη



Επικρατεί η D179Y (KPC-31, KPC-33).
Επαναφορά της δραστικότητας της μεροπενέμης

Χωρίς προηγούμενη λήψη
ceftazidime/avibactam

Επαναφορά της δραστικότητας
των καρβαπενεμών

▶ Αμινοξική αλληλουχία σύμφωνα με Ambler et al, 1991
* KPCs με παραπάνω από μια αμινοξικές αλλαγές

Με κόκκινο οι παραλλαγές της KPC-2
Με μπλε οι παραλλαγές της KPC-3

Μηχανισμοί αντοχής στην κεφταζιδίμη/αβιμπακτάμη

Μεταλλάξεις στις β-λακταμάσες

- ▶ στην KPC
 - ▶ στην CTX-M
 - ▶ CTX-M-14 (P170S *in vivo*)
 - ▶ CTX-M-15 (L169Q +S130G, D182Y *in vitro*)
 - ▶ στην OXA-48 (*in vitro*)
 - ▶ στην VEB (*in vivo*)
 - ▶ στην OXA-2
 - ▶ OXA-539 (διπλασιασμός του D149 *in vivo*)
 - ▶ στην AmpD (*in vitro*)
 - ▶ ή ελλείψεις στην AmpC (*in vitro*)
- K. pneumoniae*
E. coli
- P. aeruginosa*
- P. aeruginosa*
E. cloacae
C. freundii

Άλλοι Μηχανισμοί

- ▶ Υπερέκφραση β-λακταμασών
 - ▶ KPC-3 (*K. pneumoniae in vivo*)
 - ▶ AmpC (*P. aeruginosa*)
- ▶ Ενισχυμένη εκροή (efflux)
 - ▶ RamR (*K. pneumoniae in vivo*)
 - ▶ MexAB-OprM (*P. aeruginosa*)
- ▶ Μειωμένη πρόσληψη
 - ▶ OprK35
 - ▶ OprK36
 - ▶ OprK37

Έλλειψη, μειωμένη έκφραση
(μεταλλάξεις, εισδοχές, ελλείψεις)
K. pneumoniae in vivo
- ▶ OprD – έλλειψη (*P. aeruginosa*)



VEB-25 (Lys234Arg) ST147, ST258 VEB-14 (T216del) ST39

RAPID COMMUNICATION

Detection in two hospitals of transferable ceftazidime-avibactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* due to a novel VEB β -lactamase variant with a Lys234Arg substitution, Greece, 2019

E. Voulgari¹, S.D. Kotsakis¹, P. Giannopoulou², E. Perivolioti³, L.S. Tzouvelekis^{1,4}, V. Miriagou¹

1. Laboratory of Bacteriology, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece
2. Department of Clinical Microbiology, Thriassio General Hospital, Elefsina, Greece
3. Department of Clinical Microbiology, Evangelismos General Hospital, Athens, Greece
4. Department of Microbiology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece

Correspondence: Vivi Miriagou (miriagou@pasteur.gr)

Citation style for this article:

Voulgari E., Kotsakis S.D., Giannopoulou P., Perivolioti E., Tzouvelekis L.S., Miriagou V., Detection in two hospitals of transferable ceftazidime-avibactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* due to a novel VEB β -lactamase variant with a Lys234Arg substitution, Greece, 2019. Euro Surveill. 2020;25(2):pii=1900766. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.2.1900766>

Article submitted on 27 Dec 2019 / accepted on 16 Jan 2020 / published on 16 Jan 2020

RAPID COMMUNICATIONS

Outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* endowed with ceftazidime-avibactam resistance mediated through a VEB-1-mutant (VEB-25), Greece, September to October 2019

Irene Galani¹, Ilias Karaiskos², Maria Souli¹, Vassiliki Papoutsaki³, Lamprini Galani², Aikaterini Gkoufa², Anastasia Antoniadou¹, Helen Giamarellou²

1. Infectious Diseases Laboratory, 4th Department of Internal Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece
2. 1st Internal Medicine & Infectious Diseases Department, Hygeia General Hospital, Athens, Greece
3. Infectious Diseases Laboratory, Hygeia General Hospital, Athens, Greece

Correspondence: Irene Galani (egalani@med.uoa.gr)

Citation style for this article:

Galani Irene, Karaiskos Ilias, Souli Maria, Papoutsaki Vassiliki, Galani Lamprini, Gkoufa Aikaterini, Antoniadou Anastasia, Giamarellou Helen. Outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* endowed with ceftazidime-avibactam resistance mediated through a VEB-1-mutant (VEB-25), Greece, September to October 2019. Euro Surveill. 2020;25(3):pii=2000028. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000028>

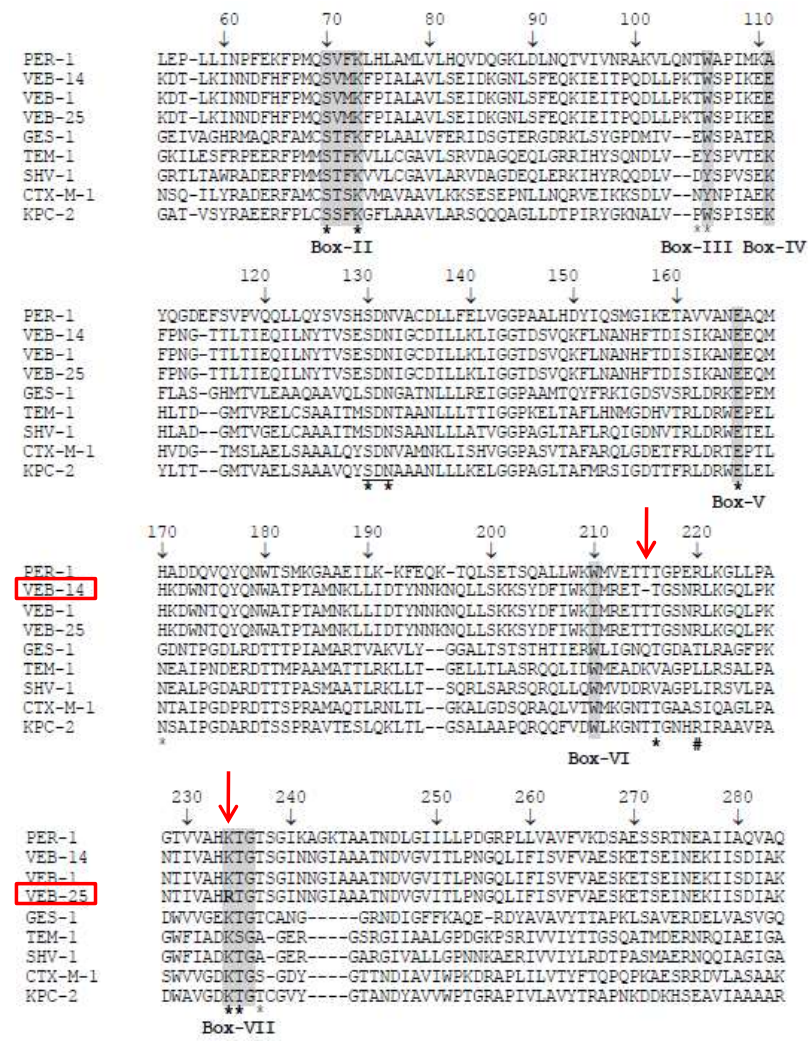
Article submitted on 11 Jan 2020 / accepted on 23 Jan 2020 / published on 23 Jan 2020



TABLE 1

Characteristics of the ceftazidime-avibactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains detected in a general hospital^a as well as their transconjugants and one previously characterised transconjugant producing VEB-1, Greece, 2018 and 2019 (n = 6 strains)

Isolate	<i>K. pneumoniae</i> ST39 strain (KP121)	<i>E. coli</i> ^b RC85-pl121	<i>K. pneumoniae</i> ST147 outbreak strain (KP67585)	<i>E. coli</i> ^c RC85-pl67585	<i>E. coli</i> ^d RC85-pl52	<i>E. coli</i> RC85
Type						
KPC-type	KPC-2	None	KPC-2	None	None	None
VEB-type	VEB-14	VEB-14	VEB-25	VEB-25	VEB-1	None
Antibiotics tested	Minimum inhibitory concentration in mg/L					
Ampicillin-sulbactam	>16	>16	>16	>16	>16	≤2
Piperacillin-tazobactam	>64	32	>64	>64	>64	≤4
Cefoxitin	>32	≤4	>32	≤4	≤4	≤4
Ceftazidime	2,048	4,096	1,024	512	512	0.25
Ceftazidime-avibactam	64	256	64	16	0.25	0.25
Ceftriaxone	>32	32	>32	8	32	≤1
Cefepime	>32	>32	>32	2	2	≤1
Aztreonam	>32	>32	>32	>32	>32	≤1
Imipenem	64	0.12	32	0.12	0.12	0.12
Imipenem-relebactam	0.5	0.12	0.5	0.12	0.12	0.12
Meropenem	>64	0.06	64	0.06	0.06	0.06
Meropenem-vaborbactam	0.5	0.06	0.25	0.06	0.06	0.06
Amikacin	>32	>32	>32	>32	>32	≤2
Gentamicin	>8	>8	>8	>8	>8	≤1
Ciprofloxacin	>2	≤0.25	>2	≤0.25	≤0.25	≤0.25
Levofloxacin	>4	≤0.12	>4	≤0.12	≤0.12	≤0.12
Tigecycline	>4	1	2->4	2	≤0.5	≤0.5
Fosfomycin	64	≤16	128	≤16	≤16	≤16
Colistin	2	0.5	64	0.5	0.5	0.5
Trimethoprim-sulfamethoxazole ^e	>8	>8	>8	>8	>8	≤1
Chloramphenicol	>128	128	>128	32	32	8
Other β-lactamase genes						
β-lactamase genes	<i>bla</i> _{SHV-11} , <i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{TEM-1B}	<i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{TEM-1B}	<i>bla</i> _{SHV-11} , <i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{TEM-1B}	<i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{TEM-1B}	<i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{TEM-1B}	None
Major porin mutation						
OmpK35	WT	ND	PSC_aa173	ND	ND	ND
OmpK36	v3 variant	ND	v3 variant	ND	ND	ND
OmpK37	PSC_aa251	ND	WT	ND	ND	ND



Κεφιντεροκόλη : Σχέση δομής και δραστικότητας



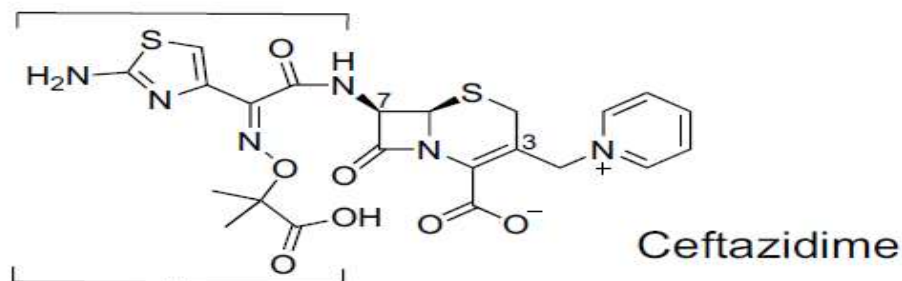
October 16, 2019



23/04/2020

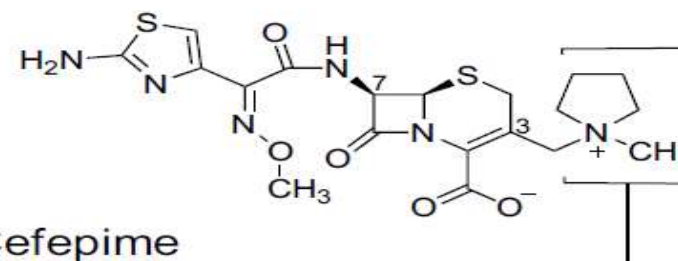
C-7 side chain

ενισχύει τη σταθερότητα έναντι των β-λακταμασών

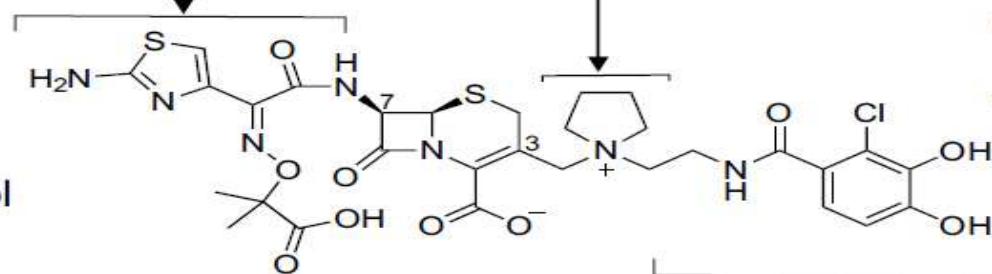


C-3 side chain

εμποδίζει την αναγνώριση από τις β-λακταμάσες (π.χ. μεταλλο-β-λακταμάσες)

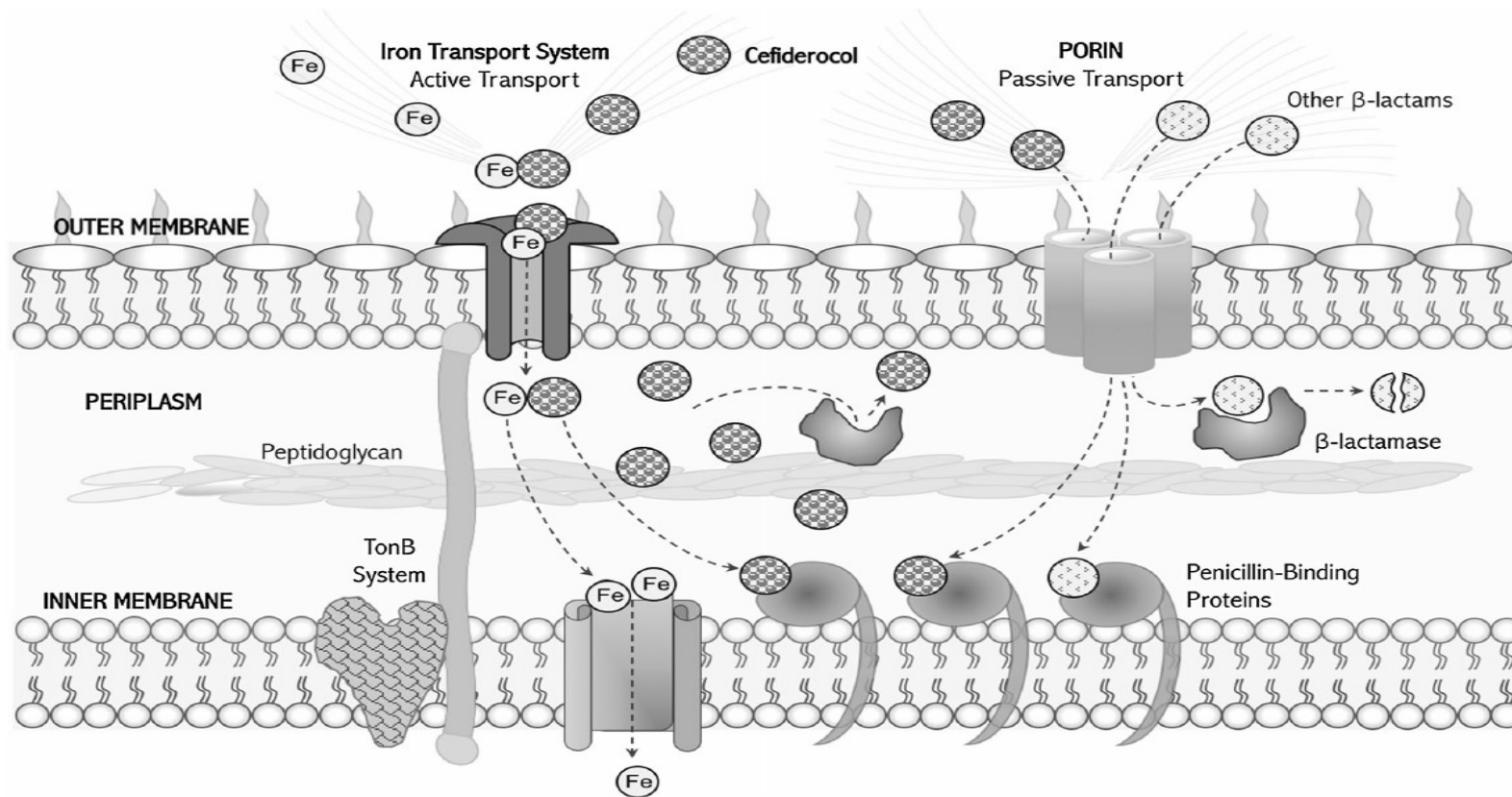
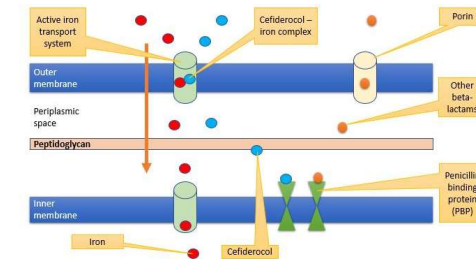


Cefiderocol



- Επιπλέον σταθερότητα έναντι των β-λακταμασών
- Δεσμεύεται με ελεύθερο σίδηρο

Μηχανισμός δράσης της cefiderocol έναντι των Gram-αρνητικών βακτηρίων



Cefiderocol

Μηχανισμός αντοχής

Ανεπάρκεια του μεταφορέα σιδήρου
λόγω μετάλλαξης ή εξάλειψης των:

- PiuA στην *P. aeruginosa* ή
- CirA και Fiu στην *E. coli*

προκαλεί 16πλάσια αύξηση στην MIC της cefiderocol

➔ Συμβολή των μεταφορέων σιδήρου στη διείσδυση της cefiderocol από την εξωτερική μεμβράνη

Δημιουργήθηκε για λοιμώξεις από Gram (-) ανθεκτικά στις καρβαπενέμες

- ▶ Σταθερή σε διάφορους τύπους καρβαπενεμασών KPC, OXA, IMP, VIM και NDM
- ▶ Δραστική έναντι των Gram (-) συμπεριλαμβανομένων των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες

Acinetobacter baumannii

Pseudomonas aeruginosa

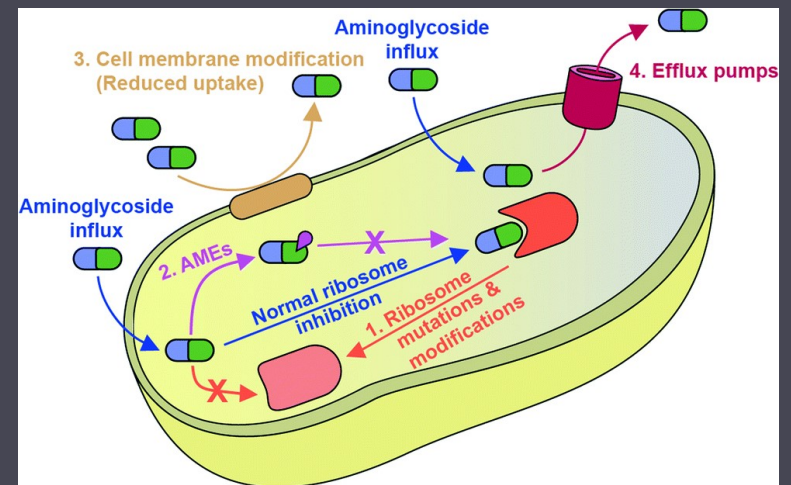
Escherichia coli

Klebsiella pneumoniae

Stenotrophomonas maltophilia

- ▶ Δεν είναι δραστική στα Gram (+) και στα αναερόβια

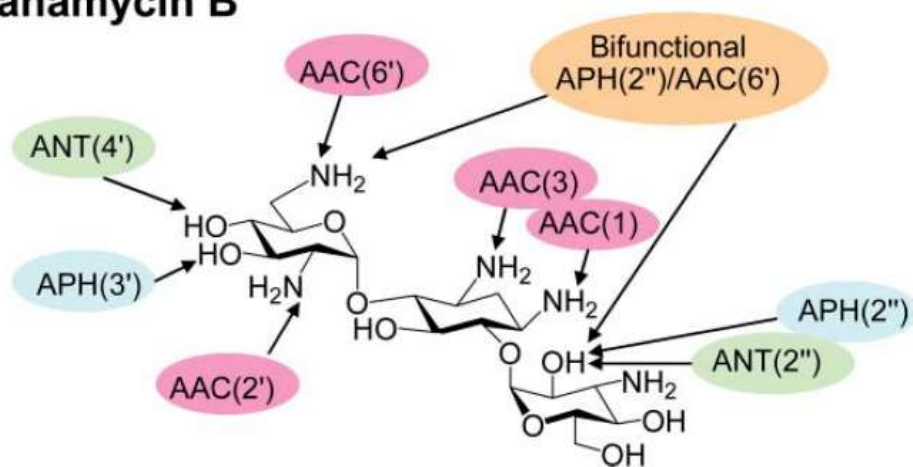
Τροποποιητικά Ένζυμα των Αμινογλυκοσιδών



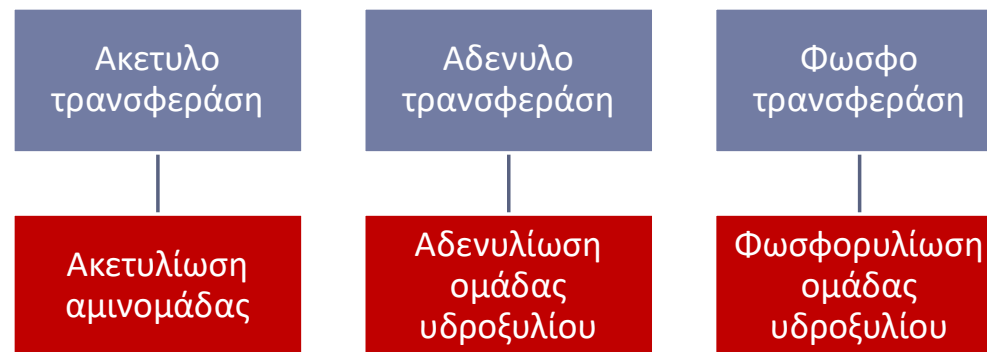
Αδρανοποίηση των αντιβιοτικών

Τροποποιητικά ένζυμα των αμινογλυκοσιδών

Κανamycin B

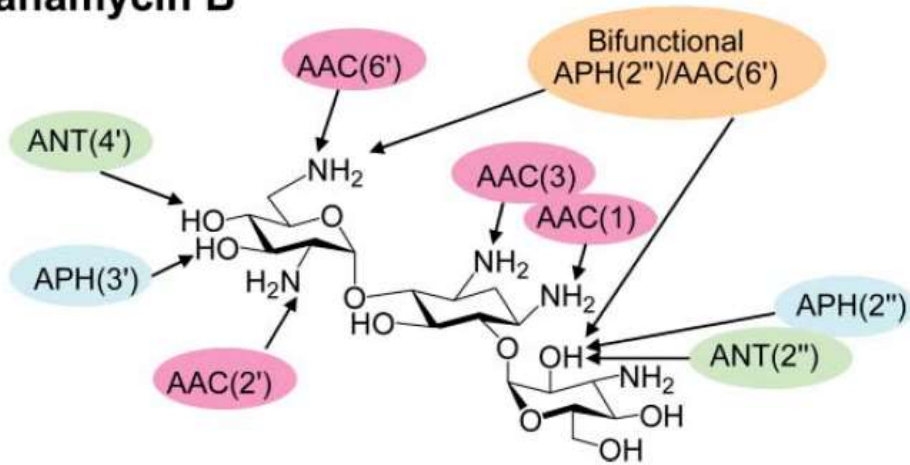


Με βάση τον μοριακό μηχανισμό τους, διαίρουνται σε 3 ομάδες

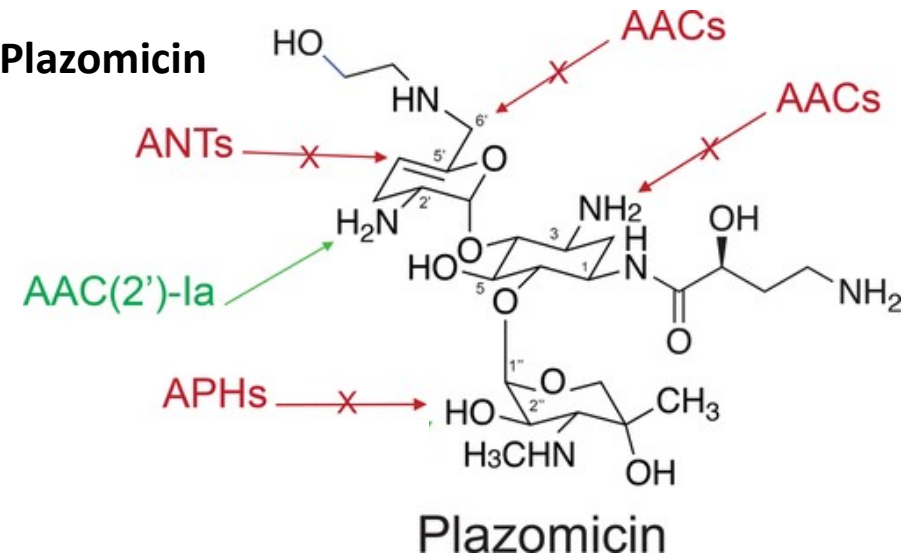


Νέες αμινογλυκοσίδες

Kanamycin B

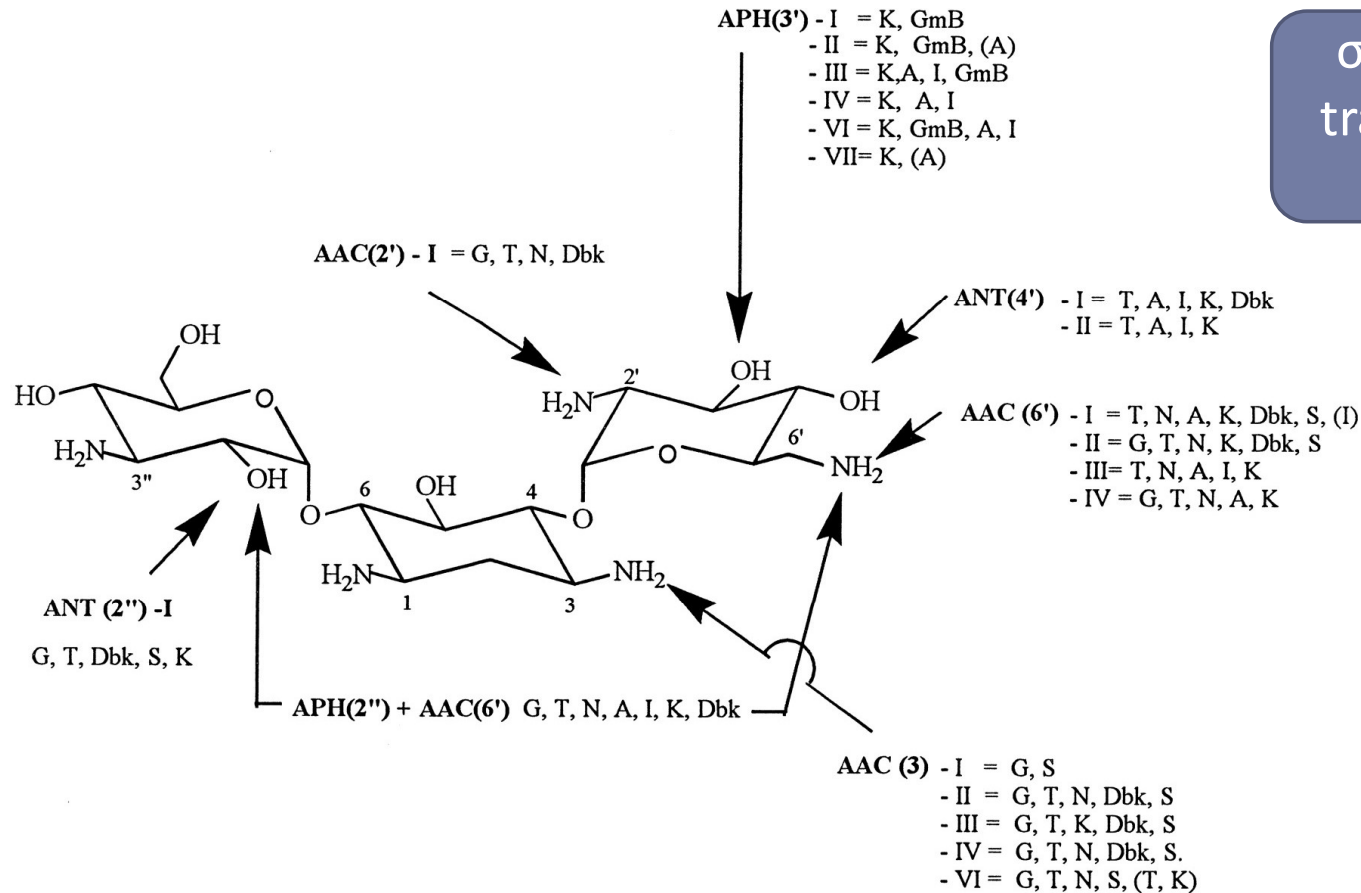


Plazomicin



Τροποποιητικά ένζυμα των αμινογλυκοσιδών

σε integrons,
transposons &
πλασμίδια



Φαινότυπος που προσδίδεται από τα ένζυμα που τροποποιούν τις αμινογλυκοσίδες

	APR	FOR	GEN	TOB	AMK	ISE	NET	KAN	NEO
Perm/Efflux	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AAC(2')-I			+	+			+		+
AAC(3)-I		+	+						
→ AAC(3)-II			+	+			+	±	
AAC(3)-III			+	+				+	
AAC(3)-IV	+		+	+			+		
AAC(3)-VI			+	±			±	±	
→ AAC(6')-I			±	+	+	±	+	+	
AAC(6')-II			+	+			+	+	
ANT(2'')-I			+	+				+	
ANT(4')-II				+	+	+		+	
APH(3')-VI					+	+		+	+

+ : σημαντική αύξηση της MIC σε σχέση με το wild-type; ± : Αύξηση της MIC παρατηρείται όταν το ένζυμο υπερεκφράζεται.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



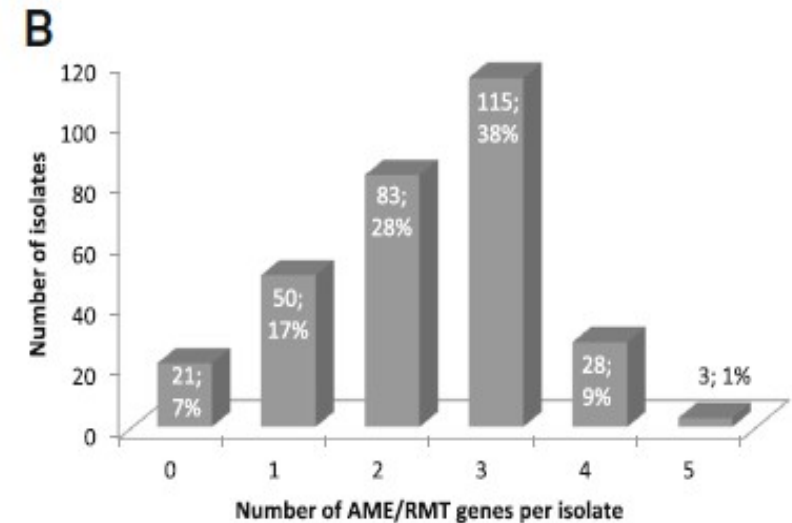
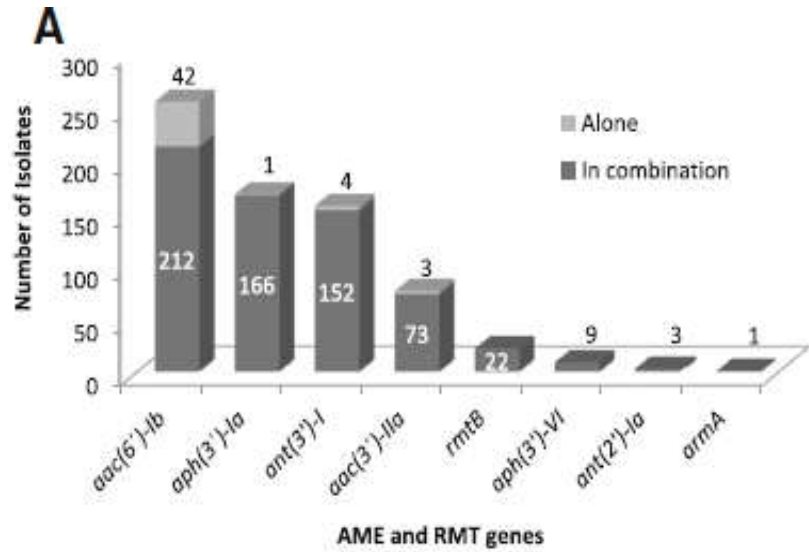
Nationwide epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Greek hospitals, with regards to plazomicin and aminoglycoside resistance

Irene Galani^{1,3*}, Konstantina Nafplioti^{1†}, Panagiota Adamou¹, Ilias Karaiskos², Helen Giamarellou², Maria Souli¹ and Study Collaborators

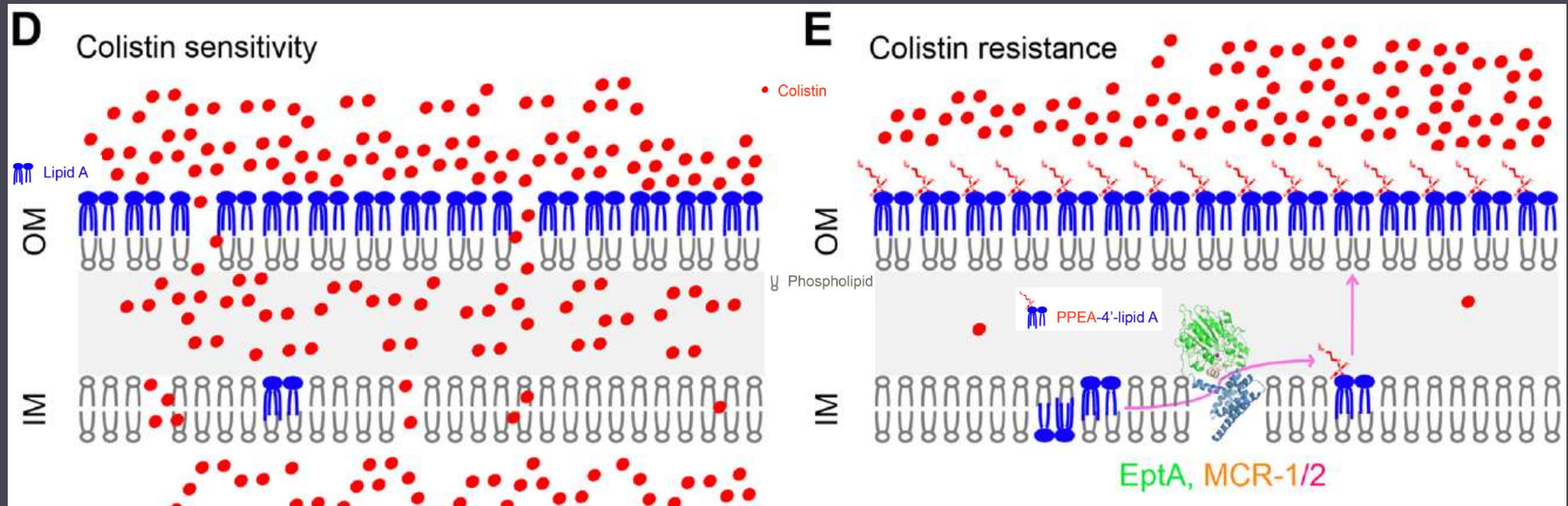
Table 5 Aminoglycoside MICs in relation to the presence of aminoglycoside-modifying enzyme gene combination (excluding the presence of *ant(3)-I* and *aph(3)-I*)

AME gene(s)	No. (%) of isolates	Expected resistance phenotype ^a	Amikacin			Gentamicin			Tobramycin			Plazomicin		
			Range	MIC _{50/90}	% NS	Range	MIC _{50/90}	% NS	Range	MIC _{50/90}	% NS	Range	MIC _{50/90}	% NS ^b
None	28 (93)	Susceptible	1-8	2/8	0.0	0.25-4	1/2	7.1	0.25-8	1/4	10.7	≤0.125-4	0.5/4	14.3
<i>aac(6)-Ib</i>	168 (66)	A,T,N	2-256	32/128	91.7	0.25->256	2/16	47.0	2->256	32/64	99.4	≤0.125-8	0.5/2	4.2
<i>aac(3)-IIa</i>	6 (2.0)	G,T,N	2-8		0.0	64-256		100.0	8-64		100.0	≤0.125-1		0.0
<i>aac(6)-Ib + aac(3)-IIa</i>	64 (21.3)	A,G,T,N	4-256	32/64	90.6	1->256	64/256	81.3	4->256	64/128	100.0	≤0.125-8	0.5/1	4.7
<i>aac(6)-Ib + aph(3)-VI</i>	6 (2.0)	A,T,N	32-128		100.0	2-64		66.7%	4-256		100.0	0.25-4		33.3
<i>aac(6)-Ib + aac(3)-IIa + aph(3)-VI</i>	3 (1.0)	A,G,T,N	32-256		100.0	128->256		100.0	32-256		100.0	0.25-1		0.0
<i>aac(6)-Ib + ant(2)-Ia</i>	2 (0.7)	A,G,T,N	16-128		100.0	8		100.0	32		100.0	0.25-2		0.0
<i>rmtB</i> or <i>armA</i> ± any AME	23 (7.7)	A,G,T,N,P	>256	>256	100	128->256	>256	100.0	64->256	>256	100.0	64->256	>256	100.0

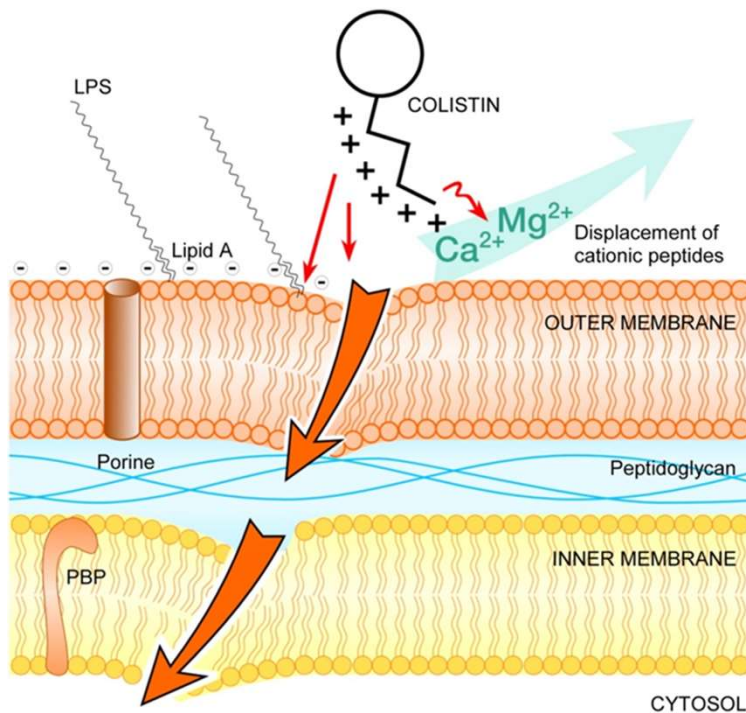
^a A, resistance to amikacin; G, resistance to gentamicin; T, resistance to tobramycin; N, resistance to netilmicin; P, resistance to plazomicin
^b According the recently approved FDA breakpoint



Αντοχή στην κολιστίνη



Κολιστίνη – Πολυμυξίνη Ε

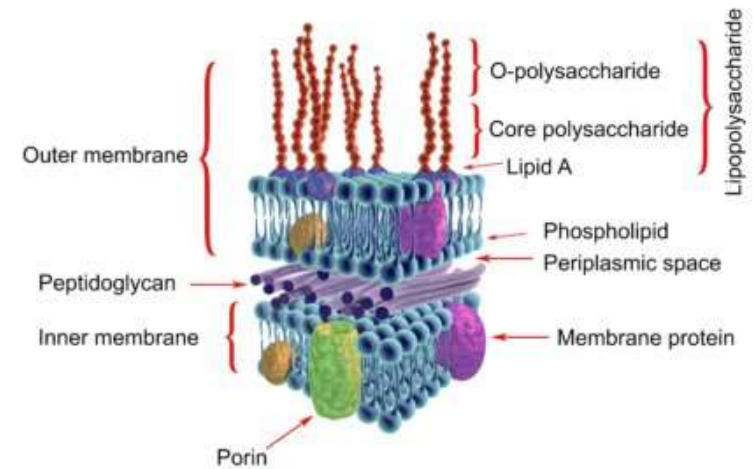
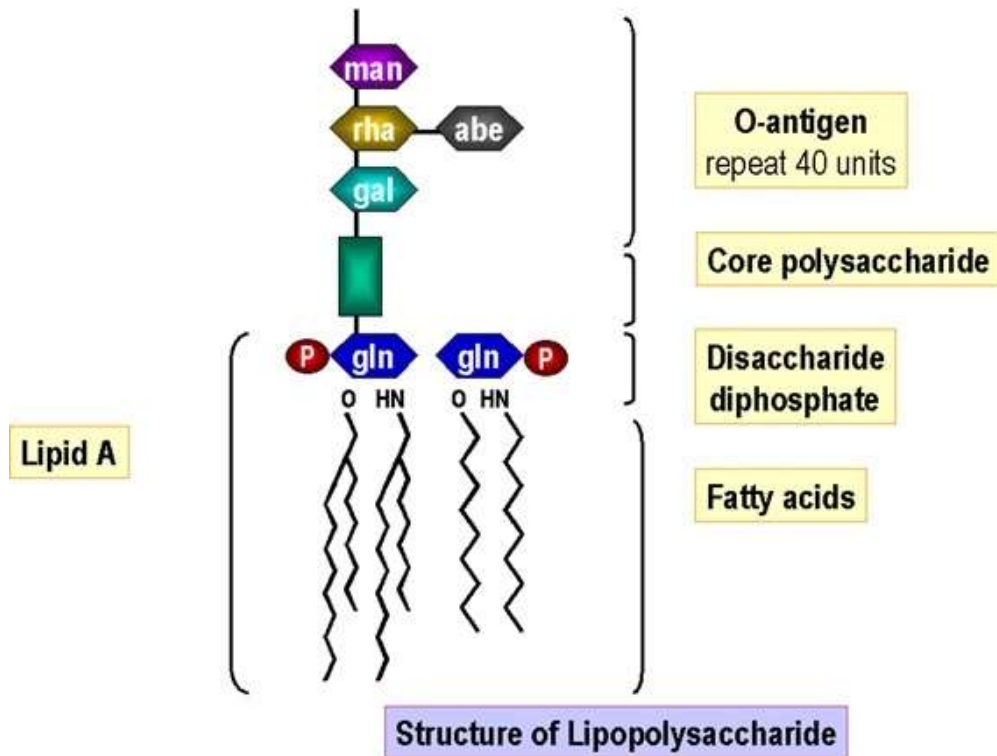


Martis et al, 2014. J Infect;69:1-12

Μηχανισμός δράσης

- ▶ Αναστέλλει τη λειτουργία της εξωτερικής μεμβράνης
- ▶ Η θετικά φορτισμένη κολιστίνη μετατοπίζει τα δισθενή κατιόντα που γεφυρώνουν τα γειτονικά μόρια LPS
- ▶ Αποσταθεροποίηση της εξωτερικής μεμβράνης
- ▶ Διείσδυση στην εσωτερική μεμβράνη και αναστολή του αναπνευστικού ενζύμου NDH-2

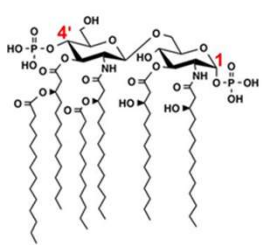
Δομή Λιποπολυσακχαρίτη



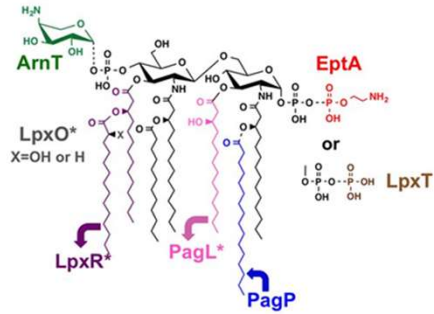
Μηχανισμός αντοχής

Τροποποίηση του λιπιδίου A

Unmodified *E. coli*



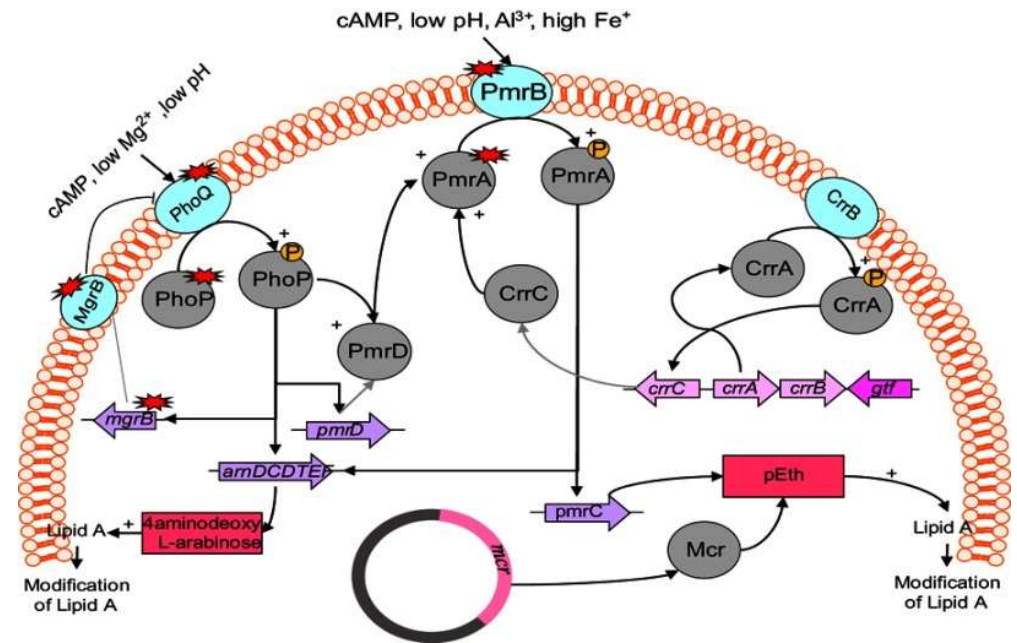
Modified *E. coli/Salmonella*



pEtN: φωσφο-αιθανολαμίνη

L-Ara4N: 4-αμινο-4 δεοξυ-L-αραβινόζη

Ρυθμιστικό σύστημα



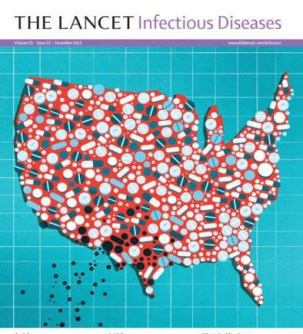
Επίκτητοι και ενδογενείς μηχανισμοί αντοχής των Gram-αρνητικών βακτηρίων στην κολιστίνη

Genes	Gene function	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>C. freundii</i>	<i>Protrus mirabilis</i>	<i>Serratia marcescens</i>	References
<i>pmrA/pmrB</i>	Modification of lipid A by <i>amBCADTEF</i> operon, <i>pmrC</i> and <i>pmrE</i> genes	+	+	+	+	-	-	-	65,68,69,129,130
<i>phoP/phoQ</i>	Modification of lipid A by activation of the <i>pmrHfJKLM</i> operon/activation of <i>pmrAB</i> by <i>pmrD</i>	+	+	+	+	-	-	-	50,78,131,132
<i>amBCADTEF</i>	Modification of lipid A by pEtN and L-4AraN	+	+	+	+	-	+	+	9,45,69,129-131
<i>mgrB</i>	Overexpression of <i>phoPQ</i> and activation of <i>pmrHfJKLM</i>	+	+	-	-	-	-	-	51,79
mutation									
<i>ramA</i>	Modulates lipid A biosynthesis	-	+	-	-	-	-	-	110
<i>csrB</i>	Modification of lipid A by upregulation of <i>pmrAB</i> /activation of the glycosyltransferase	-	+	-	-	-	-	-	52
mutation									
<i>mcr1</i>	Phosphoethanolamine transferase	+	+	+	+	+	-	-	85,94,101,133,134
<i>mcr2</i>	Phosphoethanolamine transferase	+	-	-	+	-	-	-	55,135
<i>mcr3</i>	Phosphoethanolamine transferase	+	-	-	+	-	-	-	102,136
<i>mcr4</i>	Phosphoethanolamine transferase	+	-	+	+	-	-	-	103,137,138
<i>mcr5</i>	Phosphoethanolamine transferase	+	-	+	+	-	-	-	104,139
<i>mcr6</i>	Phosphoethanolamine transferase	-	-	-	-	-	-	-	105
<i>mcr7</i>	Phosphoethanolamine transferase	-	+	-	-	-	-	-	106
<i>mcr8</i>	Phosphoethanolamine transferase	+	+	-	-	-	-	-	107
<i>acrB</i>	Efflux pump	+	+	-	-	-	-	-	36
mutation									
<i>KpnEF</i>	Efflux pump	-	+	-	-	-	-	-	117
mutation									
<i>sojABCDF</i>	Efflux pump	-	-	-	-	-	+	-	42
mutation									

Πλασμιδιακά γονίδια

3 συστήματα efflux

Ενδογενής αντοχή



Lancet Infect Dis 2015

Published Online
November 18, 2015
[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)

Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study



Yi-Yun Liu*, Yang Wang*, Timothy R Walsh, Ling-Xian Yi, Rong Zhang, James Spencer, Yohei Doi, Guobao Tian, Baolei Dong, Xianhui Huang, Lin-Feng Yu, Danxia Gu, Hongwei Ren, Xiaojie Chen, Luchao Lv, Dandan He, Hongwei Zhou, Zisen Liang, Jian-Hua Liu, Jianzhong Shen

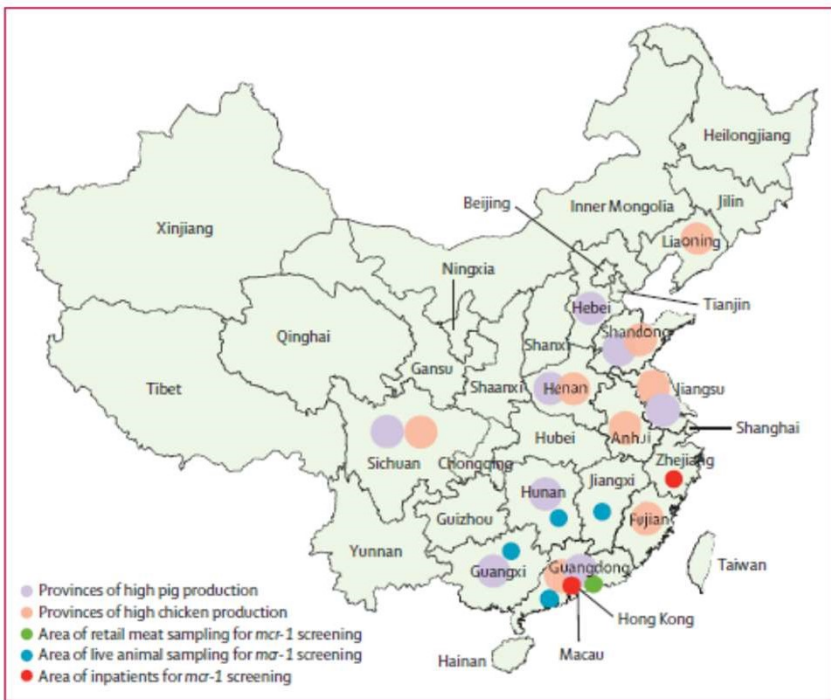
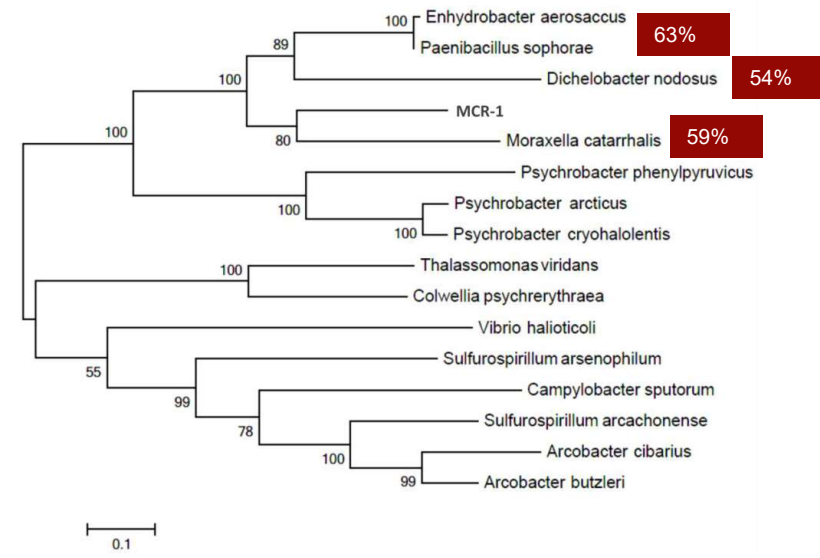
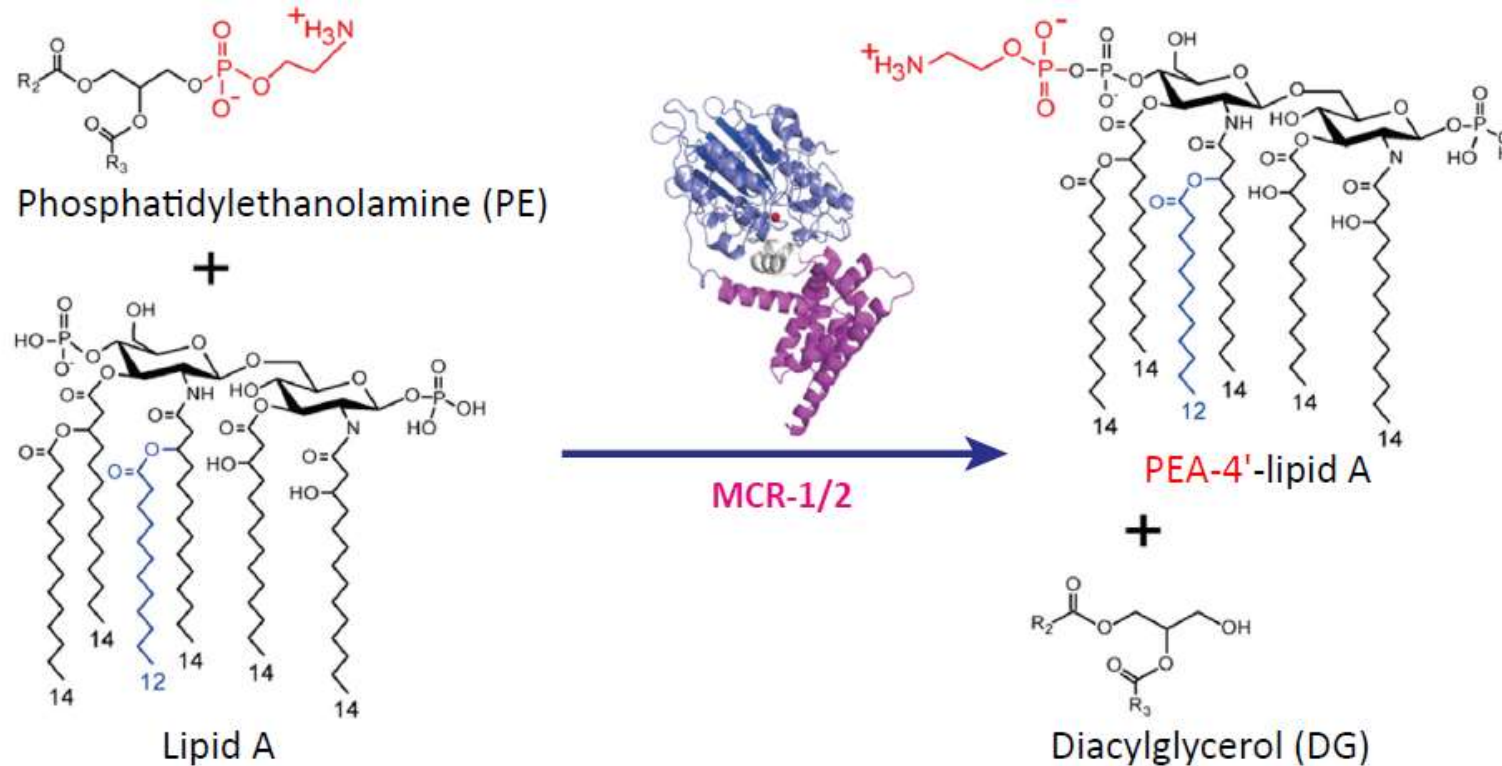


Figure 1: Map of China



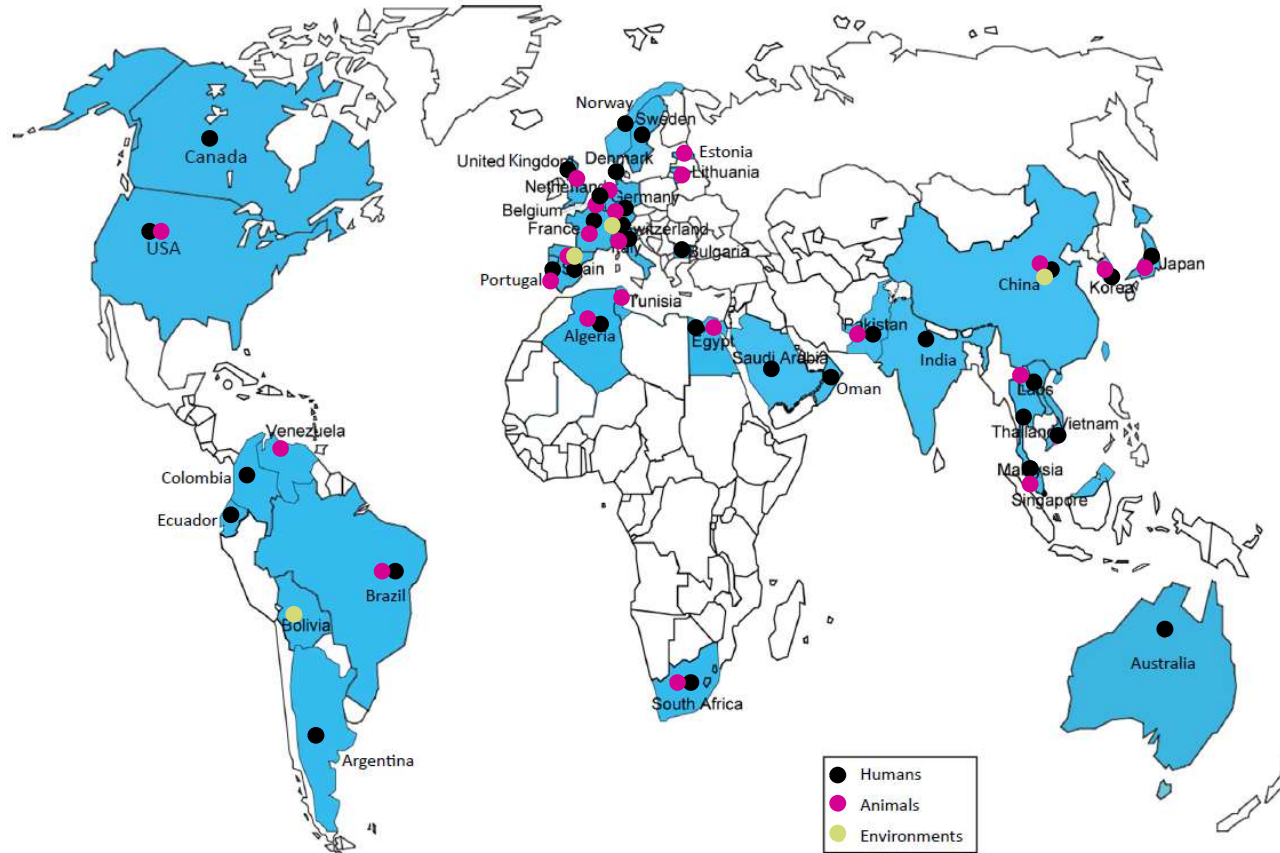
Πιθανή μεταφορά του *mcr-1* από το χρωμόσωμα αγνώστου βακτηρίου που παράγει πολυμυξίνη στο *E. coli*

Η MCR-1 είναι μια τρανσφεράση φωσφο-αιθανολαμίνης (pEtN)



- ▶ Αύξηση της MIC των πολυμυξινών (κολιστίνη και πολυμυξίνη Β) κατά 16 φορές
- ▶ Από 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (*E. coli* - δέκτης) σε 8 $\mu\text{g/ml}$ (μετασυζευγμένο)

Χώρες όπου ανιχνεύθηκε το γονίδιο *mcr-1* (με μπλε χρώμα)



Trends in Microbiology

mcr-1 στην Ελλάδα



J. Dairy Sci. 103:852–857
<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17320>

© American Dairy Science Association®, 2020.

Short communication: Bovine mastitis caused by a multidrug-resistant, *mcr-1*-positive (colistin-resistant), extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* clone on a Greek dairy farm

George Filioussis,¹  Melina Kachrimanidou,²  Georgios Christodoulopoulos,³  Maria Kyritsi,⁴ Christos Hadjichristodoulou,⁴ Maria Adamopoulou,⁵ Athanasia Tzivara,³ Spyridon K. Kritas,¹  and Alex Grinberg^{6*} 

¹Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Science, Aristotle University of Thessaloniki, University Campus, 54124 Thessaloniki, Greece

²First Department of Microbiology, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece

³Department of Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, University of Thessaly, PO Box 199, Gr-43100 Karditsa, Greece

⁴Laboratory of Hygiene and Epidemiology, Department of Medicine, School of Health Science, University of Thessaly, 41500 Larissa, Greece

⁵Microbiology Laboratory, Department of Biomedical Sciences, University of West Attica, Athens 12243, Greece

⁶Infectious Diseases Group, School of Veterinary Science, Massey University, Palmerston North, 4442 New Zealand



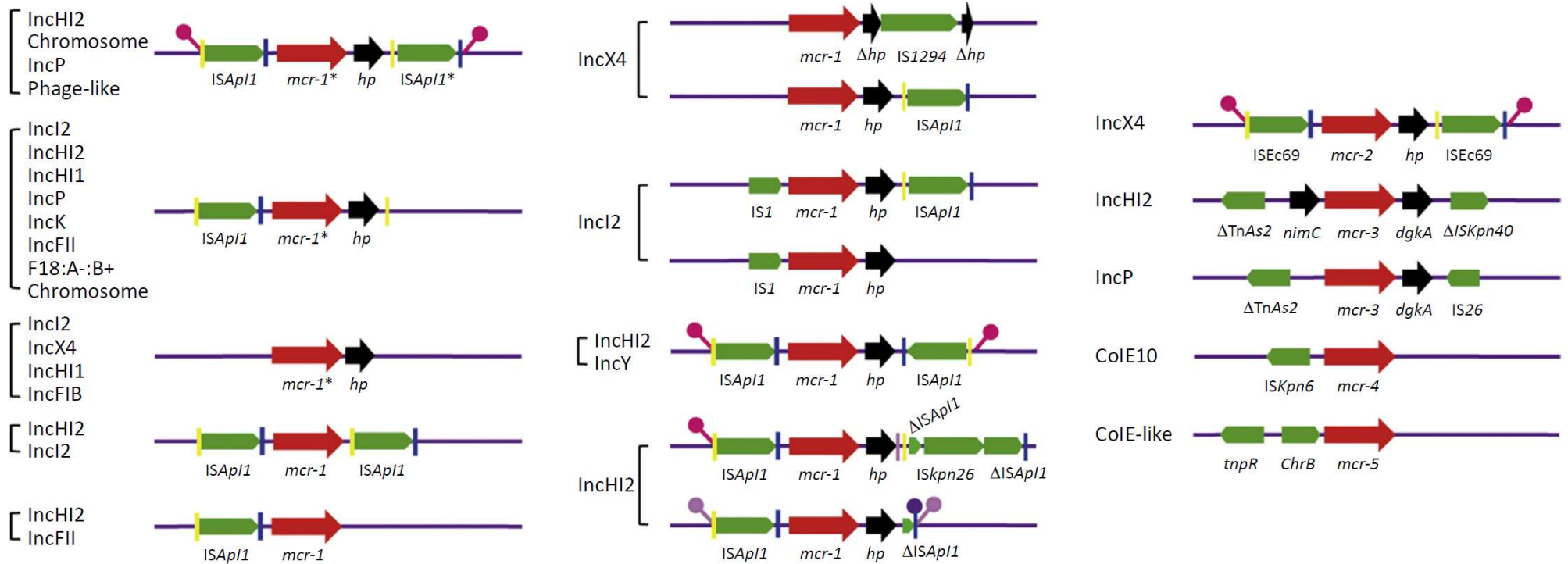
ESBL - *E. coli* απομονώθηκαν το 2015-2016 με *mcr-1* (ST666)

Table 2. Colistin MIC, antibiogram, and occurrence of resistance genes in 6 extended-spectrum-β-lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from bovine mastitis cases¹

Isolate designation	Colistin MIC	Antimicrobial resistance	Antimicrobial susceptibility	Reference NCBI accession numbers for nucleotide sequences and % similarity
VNF ₀₁	4 mg/L	STX, SMN, CEQ, AMC, ATM, AMP, PIR	NAL, CIP, GEN, IMI	<i>bla</i> _{TEM-1} (MH742416.1; 100%) <i>bla</i> _{CTX-M} (MH190876.1; 100%) <i>mcr-1</i> (CP031550.1; 100%)
VNF ₀₂	4 mg/L	STX, SMN, CEQ, AMC, ATM, AMP, PIR	NAL, CIP, GEN, IMI	<i>bla</i> _{TEM-1} (MH742416.1; 100%) <i>bla</i> _{CTX-M} (MH190876.1; 98%) <i>mcr-1</i> (CP031550.1; 100%)
VNF ₀₃	4 mg/L	STX, SMN, CEQ, AMC, ATM, AMP, PIR	NAL, CIP, GEN, IMI	<i>bla</i> _{TEM-1} (MH742416.1; 100%) <i>bla</i> _{CTX-M} (MH190876.1; 100%) <i>mcr-1</i> (CP031550.1; 100%)
VNF ₀₄	4 mg/L	STX, SMN, CEQ, AMC, ATM, AMP, PIR	NAL, CIP, GEN, IMI	<i>bla</i> _{TEM-1} (MH742416.1; 100%) <i>bla</i> _{SHV} (MF993523.1; 99%) <i>mcr-1</i> (CP031550.1; 100%)
VNF ₀₅	4 mg/L	STX, SMN, CEQ, AMC, ATM, AMP, PIR	NAL, CIP, GEN, IMI	<i>bla</i> _{TEM-1} (MH742416.1; 100%) <i>bla</i> _{SHV} (MF993523.1; 100%) <i>mcr-1</i> (CP031550.1; 100%)
VNF ₀₆	8 mg/L	CEQ, AMC, ATM, AMP, PIR	NAL, CIP, GEN, IMI, SXT, SMN	<i>bla</i> _{SHV} (MF993523.1; 100%) <i>mcr-1</i> (CP031550.1; 100%)

¹AMC = amoxicillin-clavulanic acid; AMP = ampicillin; ATM = aztreonam; CEQ = cefquinome; CIP = ciprofloxacin; GEN = gentamicin; IMI = imipenem; NAL = nalidixic acid; PIR = piperacillin; SMN = streptomycin; STX = trimethoprim and sulfamethoxazole.

Ποικιλομορφία στις γενετικές περιοχές που περιβάλλουν τα *mcr*



Ερωτήσεις?

