

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Mechanismus rezistence mikroorganismů na antibiotika

Markéta Dalecká

Bakalářská práce

2012

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 28. 6. 2012

Markéta Dalecká

Zde bych ráda poděkovala zejména za konzultace Mgr. Alexandře Jantovské, především za její pomoc a cenné rady při zpracování této práce. Děkuji vedoucí mé práce RNDr. Petře Mosio, Ph.D. za profesionální a kritický přístup k mé práci. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za jejich podporu v mém snažení.

ANOTACE

Tato bakalářská práce shrnuje dosavadní poznatky o mechanismech rezistence mikroorganismů k antibiotikům. Zpočátku pojednává o mechanismech působení jednotlivých typů antibiotik, mezi které se řadí inhibice proteosyntézy, inhibice syntézy buněčné stěny, ovlivnění funkce cytoplazmatické membrány, změna syntézy nukleových kyselin a v neposlední řadě kompetitivní inhibice. Větší část práce je zaměřena na jednotlivé mechanismy rezistence, včetně jejího vzniku a přenosu genů kódujících rezistenci. Nachází se zde popis efluxních pump, změn ovlivňujících průchod antibiotika do bakteriální buňky, tvorby bakteriálních enzymů, určených k inaktivaci antibiotik, změny cílových míst a rezistence vůči antimetabolitům. V neposlední řadě je zde zmíněno možné zjišťování citlivosti mikroorganismů na antibiotika, což zahrnuje kvantitativní i kvalitativní metody.

Klíčová slova: antibiotika, citlivost na antibiotika, mechanismy rezistence

TITLE

Mechanisms of resistance of microorganisms to antibiotics

ANNOTATION

This bachelor work summarizes current knowledge about the mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. At first, the mechanisms of action of different types of antibiotics are explained, such as the inhibition of protein synthesis, inhibition of cell wall synthesis, cytoplasmic membrane damage, inhibition of DNA replication and competitive inhibition. Major part of this work is focused on the individual resistance mechanisms, including the development and transfer of resistance genes. There is a description of efflux pumps, changes in the passage of antibiotics into bacterial cells, production of bacterial enzymes that destroy antibiotics, changing the antibiotic's target site and resistance against antimetabolites. Furthermore, the methods of susceptibility testing are also mentioned.

Keywords: antibiotics, susceptibility to antibiotics, resistance mechanisms

Seznam zkratek

ABC	adenosintrifosfát vázající kazeta (z angl. ATP-binding cassette)
ATB	antibiotikum
ATP	adenosintrifosfát
CFU	kolonii tvořící jednotky (z angl. colony forming units)
CoA	koenzym A
DHPS	dihydrofolátsyntáza (z angl. dihydrofolate synthase)
DNA	kyselina deoxyribonukleová
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	kyselina ethylen-diamin-tetraoctová
ESBL	širokospektré beta-laktamázy (z angl. extended-spectrum beta-lactamases)
GISA	na glykopeptidy středně citlivý <i>Staphylococcus aureus</i> (z angl. glycopeptide-intermediate susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>)
GTP	guanosintrifosfát
Ile-glu	glutamyl-isoleucin
JIP	jednotka intenzivní péče
LPS	lipopolysacharid
MATE	z angl. Multidrug and Toxic Compound Extrusion
MBC	minimální baktericidní koncentrace (z angl. minimal bactericidal concentration)
MBL	metalobeta-laktamázy (z angl. metallobeta-lactamases)
MFP	membránový fúzní protein (z angl. membrane fusion protein)
MFS	z angl. major facilitator superfamily
MHA	Mueller-Hintonův agar
MIC	minimální inhibiční koncentrace (z angl. minimal inhibitory concentration)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MRSA	methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
OMP	vnější membránový protein (z angl. outer membrane protein)
PABA	kyselina para-aminobenzoová (z angl. para-aminobenzoic acid)
PBP	penicilin vázající proteiny (z angl. penicillin binding proteins)
RND	z angl. resistance-nodulation-cell division

<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SCC <i>mec</i>	stafylokokové chromozomové kazety <i>mec</i> (z angl. staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i>)
SHV	sulfhydrylová variabilita
SMR	z angl. small multidrug resistance
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
VISA	vankomycin středně citlivý <i>Staphylococcus aureus</i> (z angl. vancomycin intermediate susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>)
VRE	vankomycin rezistentní enterokoky (z angl. vancomycin resistant enterococci)
VRSA	vankomycin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (z angl. vancomycin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)

Obsah

1 ÚVOD	11
2 DEFINICE ANTIBIOTIK.....	11
2.1 TYP ÚČINKU ATB	12
3 MECHANISMUS ÚČINKU ANTIBIOTIK.....	13
3.1 INHIBICE SYNTÉZY BUNĚČNÉ STĚNY	13
3.2 POŠKOZENÍ CYTOPLAZMATICKÉ MEMBRÁNY	15
3.3 INHIBICE PROTEOSYNTÉZY	16
3.4 INHIBICE SYNTÉZY NUKLEOVÝCH KYSELIN	17
3.5 KOMPETITIVNÍ INHIBICE.....	17
4 REZISTENCE NA ANTIBIOTIKA	18
4.1 PRIMÁRNÍ (PŘIROZENÁ) REZISTENCE.....	18
4.2 SEKUNDÁRNÍ (ZÍSKANÁ) REZISTENCE	19
4.2.1 Chromozomální získaná rezistence.....	19
4.2.2 Antibiotiky stimulovaná mutagenese.....	20
4.2.3 Extrachromozomální získaná rezistence.....	20
5 OBECNÉ MECHANISMY REZISTENCE	22
5.1 ZMĚNA CÍLOVÉHO MÍSTA	23
5.2 ZHORŠENÝ PRŮNIK ATB DO BUŇKY	23
5.3 AKTIVNÍ ODČERPÁVÁNÍ ATB.....	23
5.4 BAKTERIÁLNÍ ENZYMY	24
6 TYPY A PRINCIPY MECHANISMŮ REZISTENCE.....	24
6.1 ZMĚNA CÍLOVÝCH STRUKTUR	24
6.2 ZMĚNA PROPUSTNOSTI VNĚJŠÍ MEMBRÁNY	27
6.3 EFLUX	29
6.4 PRODUKCE BAKTERIÁLNÍCH ENZYMŮ	32
6.4.1 Širokospektré beta-laktamázy	34
6.4.2 Metalobeta-laktamázy.....	35
6.4.3 Další bakteriální enzymy	36
6.5 REZISTENCE NA SULFONAMIDY	37
7 TESTOVÁNÍ CITLIVOSTI NA ATB.....	38
7.1 KVALITATIVNÍ METODY	39
7.2 KVANTITATIVNÍ METODY.....	39
8 ZÁVĚR.....	42

SEZNAM LITERATURY	43
ZDROJE OBRÁZKŮ.....	47

1 Úvod

Rezistence na antibiotika se začala objevovat po prvním používání těchto látek. Vznik rezistence je výsledkem přirozeného evolučního vývoje a je tedy nevyhnutelný. Zpočátku byl tento problém pozorován především v nemocničních zařízeních. Později se odolnost bakterií rozšířila mezi běžnou mikrobiální populaci a v dnešní době činí jeden z největších problémů ve zdravotnictví. Základním předpokladem řešení této situace je pochopení stále nově vznikajících mechanismů rezistence. V této práci se snažím shrnout dosavadní poznatky o vzniku rezistence a přenosu genů kódujících rezistenci, dále zde popisuji v dnešní době nejběžnější mechanismy rezistence. Mezi faktory ovlivňující vznik a šíření rezistence je nesprávné a mnohdy také nadměrné používání antibiotik. Správná antibiotická praxe, která zahrnuje zajištění racionální terapie, kontrolu spotřeby a monitorování rezistence, je vhodnou strategií v boji s rezistencí.

2 Definice antibiotik

Jako antibiotika (ATB) se dnes už komplexně označují látky, které působí hlavně proti bakteriím. Mechanismus tohoto působení je různý, obecně ale platí, že zastavují růst a množení bakteriální buňky nebo způsobují její smrt. Jsou označovány také jako antiinfektiva. Pro synteticky vyráběné látky s antibakteriálním účinkem se používá název chemoterapeutika. Čistá ATB jsou přírodního původu, často bývají produkována různými druhy bakterií, plísní, ale i rostlin.

Jako jedna z prvních antimikrobiálních látek přírodního původu byla využita kůra chininovníku, která se stala účinným prostředkem v léčbě malárie díky vysokému obsahu chininu. V roce 1928 Alexandr Fleming pozoroval agar se stafylokoky kontaminovaný plísní *Penicillium notatum*, a zjistil, že bakterie v blízkosti kolonií této plísně nevyrostají. Flemingovi se ale nepodařilo izolovat čistý penicilin využitelný k léčbě. Tento problém vyřešili Florey a Chain začátkem druhé světové války a společně s Alexandrem Flemingem dostali v roce 1945 za objev a přípravu penicilinu Nobelovu cenu. Poslední Nobelova cena v této oblasti byla udělena v roce 1952 Waksmanovi za izolaci streptomycinu (Votava, 2005).

2.1 Typ účinku ATB

Aby byla ATB využitelná v léčbě infekčních onemocnění, je nutné, aby byla takzvaně selektivně toxická – musí usmrcovat nebo inhibovat růst mikroorganismů a zároveň vykazovat co nejnižší toxicitu pro makroorganismus. Selektivní toxicita je vyjádřena chemoterapeutickým indexem, což je vlastně poměr mezi dávkou, která je už toxická pro hostitele a dávkou a která je ještě účinná na mikroorganismus. Z toho vyplývá, že čím vyšší chemoterapeutický index, tím méně je látka toxická pro hostitele.

ATB můžeme rozdělit dle typu účinku do dvou skupin. Do první skupiny patří ATB baktericidní, které mají na mikroorganismy letální účinky. Působí ireverzibilně a jejich účinek se obvykle dostaví do 48 hodin po podání. Druhou skupinou jsou ATB bakteriostatická, která zastavují růst a množení cílových mikroorganismů. Toto působení je však reverzibilní a při předčasném ukončení léčby je možný návrat onemocnění. Jejich efekt je pozorovatelný až po 3-4 dnech po podání.

K určení míry účinnosti testované látky na mikroorganismus se využívá dvou parametrů (Bednář a kol., 1996). Jedním z těchto parametrů je **minimální inhibiční koncentrace** (MIC, z angl. minimal inhibitory concentration). Tato hodnota udává nejnižší koncentraci určité antimikrobiální látky, která zabrání růstu testovaného mikroorganismu. Výsledky se poté udávají jako např. MIC₉₀, což znamená, že daná látka zabrání růstu 90 % testovaných mikroorganismů. Druhou stanovovanou hodnotou je **minimální baktericidní koncentrace** (MBC, z angl. minimal bactericidal concentration). Tato hodnota dává informace o minimální koncentraci ATB, která během 24 hodin usmrtí 99,9 % původní populace testovaných mikroorganismů. Hodnoty MBC jsou jen několikrát vyšší než hodnoty MIC. Látky, které jsou obvykle řazeny mezi bakteriostatické, mohou mít na mikroorganismy i baktericidní účinek. V tomto případě však záleží na koncentraci dané látky, protože ta musí být mnohonásobně vyšší, než je její hodnota pro MIC.

Dalším důležitým faktorem pro volbu vhodného ATB jsou jeho farmakologické vlastnosti. I když jsou hodnoty MIC výhodné pro organismus, tak se může stát, že daná látka bude z organismu vylučována příliš rychle, což by mělo na léčbu negativní vliv (Votava, 2005).

3 Mechanismus účinku antibiotik

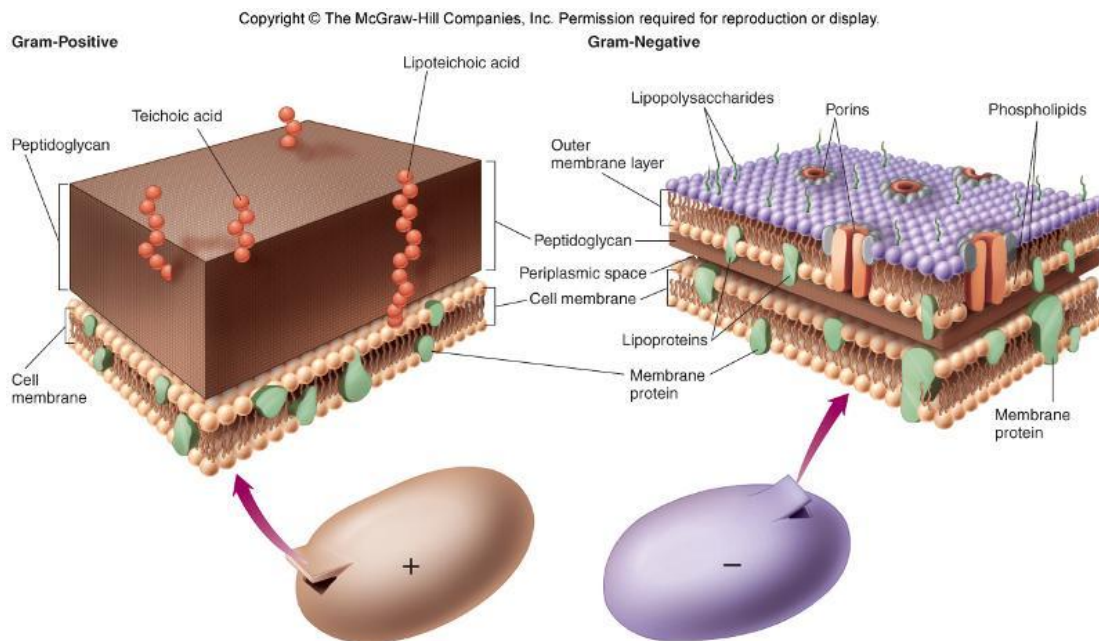
3.1 Inhibice syntézy buněčné stěny

Do této skupiny řadíme ATB, která působí na syntézu bakteriální buněčné stěny. Chemoterapeutický index těchto ATB je vyšší, protože eukaryotické buňky buněčnou stěnu neobsahují.

Bakteriální buněčná stěna má poměrně složitou stavbu (viz obr. 1). Důležitou částí je makromolekula peptidoglykan, která se skládá ze dvou aminosacharidů kyseliny N-acetylmuramové a N-acetylglukosaminu propojených beta-1,4-glykosidickými vazbami. Na COOH- skupině kyseliny N-acetylmuramové jsou navázány krátké řetězce tetrapeptidů, jejichž vzájemné propojení katalyzují enzymy transpeptidázy. Vzniká tak trojrozměrná struktura, která je silná a pevná a určuje tvar a velikost bakteriální buňky. Na základě složení buněčné stěny můžeme rozlišovat gramnegativní a grampozitivní mikroorganismy.

Gramnegativní bakterie mají stavbu buněčné stěny mnohem složitější. Vrstva peptidoglykanu je tenčí a je součástí tzv. periplasmatického prostoru. Nad ním se nachází zevní membrána složená z fosfolipidů, lipopolysacharidů a proteinů. Fosfolipidy jsou uskupeny do dvojvrstvy, stejně jako je tomu v cytoplazmatické membráně, ve které některé bílkoviny mohou vytvářet tzv. poriny (kanálky). Jejich význam spočívá v transportu živin do periplasmatického prostoru. Zevní membrána není tak dobře propustná, takže může bránit průniku řady látek, které snadno pronikají stěnou grampozitivních bakterií. V periplasmatickém prostoru se nacházejí bílkoviny, z nichž některé mohou inaktivovat antibiotika. Jedná se například o beta-laktamázy.

U grampozitivních bakterií je opět základní stavební jednotkou peptidoglykanová vrstva, ve které jsou polysacharidové řetězce uspořádány v několika vrstvách. Tuto vrstvu protínají kolmo k povrchu buňky řetězce kyseliny teichoové, což je polysacharid složený z jednotek glycerolu a ribitolu (Vollmer a Bertsche, 2008).



obr. 1: Struktura buněčné stěny u grampozitivních a gramnegativních bakterií
(Phoenix College, 2012).

Mezi preparáty, které inhibují syntézu buněčné stěny, se řadí: beta-laktamová ATB (peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy a monobaktamy), glykopeptidy (vankomycin a teikoplanin), bacitracin nebo cykloserin.

Beta-laktamová antibiotika se váží enzymy důležité pro syntézu peptidoglykanu (transpeptidázy, karboxypeptidázy a další), tyto enzymy se označují PBP (proteiny vázající penicilin, z angl. penicillin-binding proteins). Tyto enzymy katalyzují reakci, při které se vytváří peptidové a glycinové můstky v peptidoglykanu, čímž se jeho syntéza zastaví. Z uvedeného vyplývá, že beta-laktamy jsou účinné pouze u rostoucích bakteriálních buněk, a na již dospělé buňky nemají žádný vliv. Podle typu účinku se řadí baktericidní ATB a působí tedy ireverzibilně (Pollack a Pollack, 1996).

Na syntézu peptidoglykanu působí také glykopeptidová ATB - vankomycin a teikoplanin. V časně fázi syntézy buněčné stěny je L-alanin přeměňován na D-alanin a poté jsou dvě molekuly D-alaninu připojovány k sobě na konce peptidových řetězců. Glykopeptidy se váží na D-alanyl-D-alanin a tím brání zesílení tvořícího se peptidoglykanu. Jejich účinek je rovněž baktericidní (Nitanai a kol., 2008).

Bacitracin je polypeptidové antibiotikum, jehož mechanismus účinku spočívá v inhibici defosforylace C₅₅-isoprenylpyrofosfátu. Tato reakce je zásadní pro regeneraci

lipidového přenašeče, který se účastní cyklické syntézy peptidoglykanu (Storm, 1974; Hancock a Chapple, 1999).

Do syntézy peptidoglykanu zasahuje rovněž antimikrobiální látka zvaná cykloserin, která je strukturním analogem D-alaninu a díky tomu kompetitivně inhibuje jak enzym alanin-racemázu, který katalyzuje isomerizaci L-alaninu na D-alanin, tak D-alanin-ligázu, která katalyzuje navázání 2 molekul D-alaninu na lipid II za vzniku terminálního D-alanyl-D-alanyl-peptidového konce lipidu II. Tato antimikrobiální látka se používá zejména k terapii tuberkulózy. Dalším antituberkulotikem je např. isoniazid, který narušuje syntézu kyseliny mykolové, která je nezbytná pro buněčnou stěnu mykobakterií (Votava, 2005).

3.2 Poškození cytoplazmatické membrány

Pokud ATB poškozují cytoplazmatickou membránu, tak mají i vyšší toxický účinek na eukaryotické buňky hostitele. Význam cytoplazmatické membrány spočívá hlavně v transportu živin do buňky. Ionty a další důležité látky jsou přes tuto membránu transportovány dovnitř a ven pomocí tzv. aktivního transportu, při kterém buňka vydá určitou část energie k přenosu molekuly. Mezi takto přenášené látky patří aminokyseliny, puriny, pyrimidiny a další. Většinou jde o molekuly důležité pro syntézu DNA a syntézu buněčné stěny.

Pokud ATB poruší funkci cytoplazmatické membrány, tak dojde k nekontrolovanému unikání důležitých iontů a látek z bakteriální buňky. Toto poškození není slučitelné s další existencí bakterie, a proto mají tyto ATB ireverzibilní baktericidní účinek.

Mezi látky, které poškozují cytoplazmatickou membránu bakterií, se řadí polypeptidy, z nichž nejdůležitější jsou polymyxiny (polymyxin B a kolistin). Tyto antimikrobiální látky působí díky svým volným aminoskupinám jako kationické detergenty a rozrušují fosfolipidovou dvojvrstvu cytoplazmatické membrány. Protože polypeptidy působí na již vyvinutou cytoplazmatickou membránu, není potřeba, aby daný mikroorganismus byl ve fázi růstu (Hancock a Chapple, 1999).

Dále se do této skupiny řadí antifungální polyeny (amfotericin B a nystatin) a azoly. Polyeny jsou poměrně toxické látky, protože se vážou na ergosterol, čímž ovlivňují permeabilitu cytoplazmatické membrány i buněčné stěny. Dalšími antifungálními látkami

jsou imidazolová antimykotika, která inhibují syntézu ergosterolu a podobně fungují i triazolová antimykotika (Votava, 2005).

3.3 Inhibice proteosyntézy

Proteosyntéza začíná při transkripci jednoho řetězce dvouvláknové DNA a přenosu informace na mRNA. Dalším krokem je translace mRNA, která probíhá na ribozomech. V syntéze bílkovin u člověka a bakterií jsou podobnosti, ale také se v mnohém liší. Na základě těchto odlišností se zajišťuje selektivita této skupiny ATB. Mezi rozdíly patří např. to, že bakteriální ribozomy disociují na podjednotky 30S a 50S a jejich sedimentační konstanta je 70S, kdežto u vyšších organismů, včetně člověka, mají ribozomy sedimentační konstantu 80S a disociují na podjednotky 40S a 60S. do této skupiny ATB lze zařadit aminoglykosidy, tetracykliny, makrolidy, linkosamidy a chloramfenikol.

Poměrně velkou skupinou jsou aminoglykosidy, mezi které se řadí streptomycin, kanamycin, neomycin, gentamicin a další. Aminoglykosidová ATB pronikají do bakteriální buňky a naváží se na 30S podjednotku ribosomu. Působí na začátku proteosyntézy, protože interferují s vazbou formylmethionyl-tRNA na ribozom. Tímto způsobem zabrání vzniku iniciačního komplexu nutného pro započetí syntézy bílkovin. Účinek aminoglykosidů je poměrně pomalý (Durante-Mangoni, 2009).

Tetracykliny se také vážou na podjednotku ribosomu 30S, kde blokují vazbu komplexu aminoacyl-tRNA na ribozom. Nejpoužívanějším je doxycyklin k terapii respiračních infekcí, infekcí žlučových a močových cest a dalších.

Další skupinou jsou makrolidy, kam patří např. erytromycin, klarithromycin a azithromycin. Tato ATB se vážou na podjednotku 50S ribosomu, čímž inhibují proteosyntézu, protože po vytvoření peptidové vazby brání uvolnění tRNA.

Také linkosamidy (linkomycin, klindamycin) se vážou na 50S podjednotku ribosomu a způsobují předčasné uvolnění peptidyl-tRNA z ribosomu.

Chloramfenikol inhibuje peptidyltransferázu, čímž brání vzniku peptidové vazby v nově vznikajícím proteinu.

Všechna výše popsaná ATB kromě aminoglykosidů mají reverzibilní bakteriostatický účinek (Bednář a kol., 1996; Votava, 2005).

3.4 Inhibice syntézy nukleových kyselin

Látky, které jsou schopny působit na syntézu nukleových kyselin, bývají pro lidský organismus poměrně nebezpečné. Mechanismus syntézy DNA je totiž u obou organismů velmi podobný.

Mezi tyto látky patří chinolonová chemoterapeutika, která se mohou podle průniku do tkání a spektra účinku rozdělit do čtyř generací. Příkladem jsou např. kyselina nalidixová a oxolinová, jejichž účinek byl omezen na gramnegativní tyčinky. V dnešní době se spíše používají fluorochinolony např. ciprofloxacin a ofloxacin, které mají široké spektrum účinku. Mechanismem jejich účinku je inhibice bakteriální gyrázy (topoizomeráza), což vede k inhibici syntézy DNA. Gyráza je enzym, který zodpovídá za správné splétání a rozplétání DNA řetězce v G fázi buněčného cyklu (Drlica a Zhao, 1997; Dougherty a kol., 2001).

Do této skupiny se řadí i rifampicin, který patří mezi ansamycinová ATB. Tato antimikrobiální látka se váže na bakteriální RNA-polymerázu, čímž blokuje transkripci genetické informace do mRNA.

Nitroimidazoly (metronidazol, ornidazol) poškozují bakteriální DNA. V bakteriích s dostatečně nízkým redox potenciálem dochází k jejich redukci na toxické složky, které se váží na DNA a poškozují ji. Vhodné prostředí pro tuto přeměnu se nachází u anaerobních bakterií, na které působí baktericidně (Votava, 2005).

3.5 Kompetitivní inhibice

Příkladem takto fungujících antimikrobiálních látek jsou sulfonamidy. Brzy po objevení sulfonamidů byla objevena v bakteriálních buňkách kyselina para-aminobenzoová (PABA, z angl. para-aminobenzoic acid), jejímiž antagonisty jsou právě sulfonamidy. Později bylo zjištěno, že tato kyselina je nezbytným prekurzorem při syntéze kyseliny listové. Selektivita sulfonamidů spočívá v tom, že kyselina listová je pro vyšší organismy esenciální, kdežto bakterie si ji samy syntetizují. Organismy, které nejsou schopny syntetizovat kyselinu listovou, jsou tedy k sulfonamidům přirozeně rezistentní. Sulfonamidy mají skoro shodnou stavbu jako PABA, a proto dochází ke kompetici ATB a PABA o vazebné místo na enzymu dihydrofolátsyntáza (DHPS, z angl. dihydrofolate synthase), která katalyzuje kondenzaci PABA a 6-hydroxymetyl-7,8-dihydropterin

difosfátu. Sulfonamidy mají tedy u citlivých bakterií bakteriostatický účinek, aby ho ale dosáhly, musí být podávány v nadbytku. Např. u *Streptococcus (Str.) pyogenes* je potřeba 26000 molekul sulfonamidů na 1 molekulu PABA, protože kyselina PABA je velmi silným antagonistou sulfonamidů (Sköld, 2000; Valderas a kol., 2008).

4 Rezistence na antibiotika

Rezistence je schopnost mikroorganismů odolávat působení látek s antimikrobiálním účinkem. Tyto vlastnosti mají bakterie přirozeně nebo je získají během svého vývoje. Problém s rezistencí se objevil velmi brzy po zahájení léčby infekčních nemocí ATB. Dnes představuje tento celosvětový problém a obrovskou výzvu pro oblast humánní a veterinární medicíny, výzkumné laboratoře i další odvětví. Původně byla rezistence spojována zejména se zdravotnickými zařízeními, ale v dnešní době je tento problém celoplošný.

Mikrobiální rezistence na ATB se projevuje změnami v propustnosti ATB do buňky, změnou cílových molekul, enzymatickým odbouráváním ATB a aktivním odčerpáváním antimikrobiálních látek z cytosolu bakteriální buňky (Wright, 2003).

4.1 Primární (přirozená) rezistence

S tímto typem rezistence se setkáváme poměrně málo, ale přesto se u některých druhů mikroorganismů může vyskytovat. Tato schopnost je dána druhem mikroorganismu a jeho vlastnostmi (Votava, 2005).

Vrozená rezistence se vyskytuje např. u zástupců třídy *Mollicutes*, kteří jsou přirozeně rezistentní k beta-laktamovým ATB. Tuto schopnost mají díky absenci pevné buněčné stěny, která je v jejich případě nahrazena pružnou třívrstevnou membránou tvořenou bílkoviny, fosfolipidy a cholesterolem (Julák, 2006).

U gramnegativních bakterií je popisována nižší citlivost k penicilinu a podobným ATB než je grampozitivních. Tato vlastnost je způsobena odlišnou stavbou buněčné stěny. Gramnegativní bakterie mají buněčnou stěnu složenou z tenké vrstvy peptidoglykanu, která je kryta zevní membránou z fosfolipidů a lipopolysacharidů. Proto tyto bakterie hůře propouštějí ATB, která působí na peptidoglykan (např. beta-laktamy, glykopeptidy a další).

Dále se přirozená rezistence může vyskytovat u bakterií, které žijí v určitém prostředí (půda, voda), kde se určité typy přírodních ATB vyskytují přirozeně. Příkladem takových mikroorganismů je *Pseudomonas (P.) aeruginosa*, u které se předpokládá, že byla rezistentní na řadu ATB ještě před jejich použitím v léčbě infekčních onemocnění.

Toho, že některé mikroorganismy jsou přirozeně rezistentní na některé typy ATB, lze využít k přípravě selektivních půd. Na těchto půdách vyrostou požadovaný druh, ale neporostou zde mikroorganismy, které jsou k danému ATB citlivé. Příkladem může být přidání bacitracinu do kultivačního média pro izolaci hemofilů nebo vankomycinu s kolistinu do půd určených k záchytu patogenních neisserií (Votava, 2005).

4.2 Sekundární (získaná) rezistence

Bakterie, které byly původně citlivé na určitý typ ATB, se stávají odolnými nebo mají k danému ATB sníženou citlivost. Tato rezistence vzniká důsledkem mutací, které se vytváří v genomu bakterie a předávají se na potomstvo. Mutací vznikne genetická informace kódující rezistenci, což v konečném důsledku vede k tomu, že ATB na bakterii nepůsobí žádoucím způsobem (Votava, 2005).

Bakterie může získat rezistenci také tzv. extrachromozomálně - přenosem genů kódujících rezistenci pomocí plasmidů, transpozonů nebo pohybem genových kazet (Julák, 2006).

Kmeny rezistentní na ATB v přítomnosti daného ATB přežívají a díky působení ATB na vnímavou populaci (selekční tlak) se brzy přemnoží. K tomu často dochází v nemocničních zařízeních, kde se pak rezistentní kmeny mohou šířit mezi pacienty i personálem.

4.2.1 Chromozomální získaná rezistence

U tohoto typu rezistence dochází k mutacím (bodovým i rozsáhlejším) na chromozomech, a proto se tyto informace předávají z mateřských buněk na dceřiné při replikaci buňky. Mutace vedou ke změnám ve struktuře nově syntetizovaných bílkovin, takže může docházet ke vzniku produktů, které mají sníženou schopnost vázat ATB.

Většinou tento typ rezistence nesouvisí s předchozím působením ATB na daný mikroorganismus, pokud ovšem bude na tento mikroorganismus dané ATB působit, bude

se vytvářet tzv. selekční tlak. Selekční tlak zvyšuje frekvenci vzniku rezistencí. Vzniká v důsledku nadměrného a nevhodného používání ATB k léčbě nemocí, které tento zásah nevyžadují (Bednář a kol., 1996; Votava, 2005).

4.2.2 Antibiotiky stimulovalá mutagenese

Pokud je bakteriální buňka vystavována různým stresům, dochází v ní ke zvýšení frekvence vzniku mutací. ATB jsou jistou formou těchto stresů, které působí na buňky, a tudíž podněcují vznik dalších mutací, které mohou vést ke vzniku rezistence. ATB (mitomycin-C), která navyšují počet mutací, jsou převážně ta, která poškozují DNA bakteriální buňky (Heinemann, 1999).

Podobný efekt mají také antibiotika, která ovlivňují translaci. Heinemann (1999) uvádí, že u divokých kmenů *Escherichia (E.) coli* dochází mnohem častěji ke vzniku mutací během kultivace za přítomnosti streptomycinu, než pokud jsou kultivovány v médiu bez něj. Pravděpodobným vysvětlením častějšího vzniku mutací je tvorba špatně fungujících DNA-polymeráz, ev. dalších důležitých enzymů. Jedná se o děj reverzibilní, protože časem dojde k obnovení funkce ribozomů a syntéze plně funkčních enzymů (Heinemann, 1999).

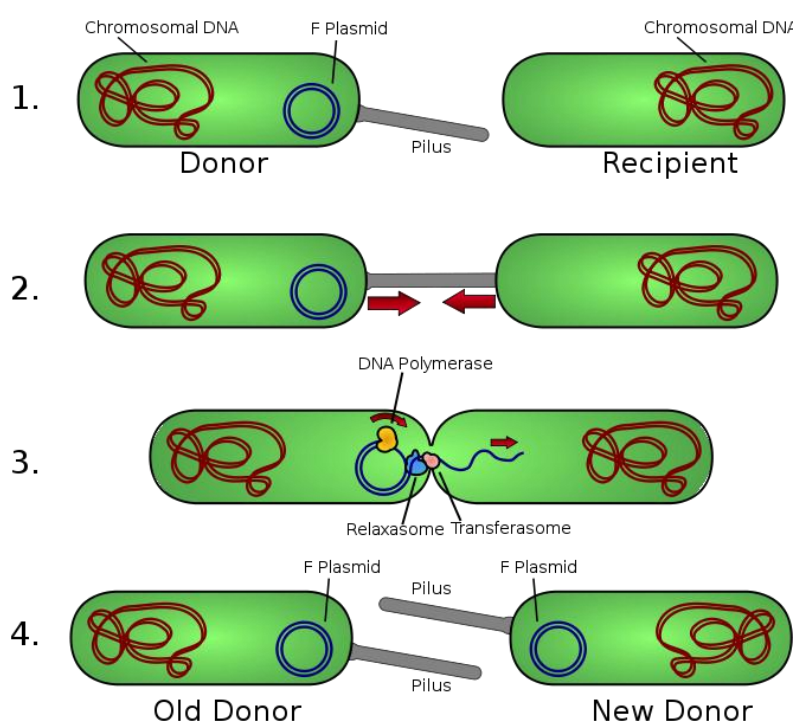
4.2.3 Extrachromozomální získaná rezistence

Genetická informace kódující rezistenci na ATB může být přenesena pomocí plasmidu, transpozonů nebo genových kazet.

Plasmidy

Jsou to malé, cirkulární molekuly DNA schopné samostatné replikace, uložené v cytoplasmě. Nesou poměrně málo genů, které nejsou pro bakterii nezbytné. Jedná se geny, které bakterii zvýhodní v určitých situacích např. o geny kódující rezistenci na ATB, desinfekční prostředky, těžké kovy, ale také geny kódující různé faktory virulence. Počet genů kódovaných na plasmidech se pohybuje od 2-3 až po 400. Buňka může obsahovat jednu nebo více kopií jednoho plasmidu, může také plasmidy získat, ale i ztratit. Proces, kdy buňka ztrácí své plasmidy se nazývá „curing“. Plasmidy můžeme rozdělit na konjugativní a nekonjugativní, podle toho, zda je možný jejich přenos na jinou bakteriální buňku. Přenos plasmidů je kontrolován produkty tzv. *tra* genů (transferové) (Atlas, 1997; Bennet, 2008).

Konjugativní plasmidy obsahují kromě genů kódujících rezistenci na antibiotika také genetickou informaci, která umožní samotný proces konjugace (přenos mezi buňkami). Jde o jednosměrný přenos, který je v přírodě poměrně běžný a spočívá ve spojení donorové a recipientní buňky. U gramnegativních bakterií je toto spojení zprostředkováno vláknitými výběžky z buněčné stěny, které se nazývají sex-pili. Po propojení dochází k přenosu DNA plasmidu, včetně všech genů, které nese. V donorové i recipientní buňce se následně dosyntetizuje chybějící řetězec DNA (viz obr. 2). Konjugativní plasmidy grampozitivních bakterií jsou menší, což zřejmě souvisí s odlišným mechanismem propojení buněk (Grohmann a kol., 2003; Bennet, 2008).



obr. 2: Proces konjugace (Jones, 2009).

U enterokoků byl popsán přenos konjugativních plasmidů závislých na produkci tzv. sex-feromonů. Jedná se o termostabilní peptidy produkované recipientními buňkami, které jsou specifické pro donory nesoucí různé konjugativní plasmidy. Donorová buňka odpovídá na stimulaci tvorbou adhezínů, které pak obě buňky propojí (Grohmann a kol., 2003).

Konjugativní plasmidy se mohou přenášet jednak mezi podobnými bakteriálními druhy, ale také mezi druhy odlišnými. Bennet (2008) uvádí také možnost experimentálního přenosu plasmidu z gramnegativní do grampozitivní bakterie.

Fragmenty plasmidové DNA mohou být přeneseny rovněž mechanismem transdukce nebo transformace (Bednář a kol., 1996).

Transposony

Transposony se často označují jako skákající geny. Jsou to krátké úseky DNA, které se mohou pohybovat v rámci jedné molekuly DNA nebo mohou přeskakovat z této molekuly na jinou, např. z jednoho plasmidu na jiný, nebo z plasmidu na bakteriální chromozom a naopak (Julák, 2006; Bennet, 2008).

Transpozony mohou nést celou řadu genů kódujících rezistenci, např. transposon Tn5 nese geny kódující rezistenci na kanamycin a streptomycin, nebo transposon Tn10 geny pro rezistenci na tetracykliny. Buňky, které obsahují tyto transposony lze jednoduše vyselektovat na médiu s obsahem daného ATB. Na příslušné půdě pak vyrostou pouze buňky obsahující transposony Tn5 nebo Tn10 (Atlas, 1997; Bennet, 2008).

Integrony a genové kazety

Bakteriální integrony obsahují gen pro enzym integrázu a místo, na které jsou pomocí integrázy včleňovány pohyblivé sestavy genů, tzv. genové kazety. Jedná se o malé, cirkulárně uspořádané DNA molekuly, bez schopnosti samostatné replikace. Často obsahují pouze jeden gen, který kóduje rezistenci na určitý typ ATB. Genové kazety se mohou přemisťovat v rámci jednoho integronu nebo z jednoho integronu na druhý. Integron může přijímat i více genových kazet, což může být podkladem vzniku multirezistentních bakteriálních kmenů.

V současnosti je popsáno 50-60 genových kazet kódujících rezistenci na různé skupiny antibiotik. Jedná se například o geny pro tvorbu metalobeta-laktamáz IMP a VIM, které způsobují rezistenci na karbapenemová ATB imipenem a meropenem. Integrony a s nimi i geny kódující rezistenci se mohou včleňovat do plasmidů a šířit se tak v bakteriální populaci (Hall a Collins, 1998; Bennet, 2008).

5 Obecné mechanismy rezistence

Jednotlivé mikroorganismy mají své mechanismy, které jim umožňují odolávat působení antimikrobiálních látek. Obecně je známo několik základních typů těchto mechanismů, které se dále odlišují podle typu bakterie a ATB.

5.1 Změna cílového místa

Tento mechanismus je založen na změně místa působení daného ATB. Klíčovou vlastností cílových míst je jejich nepostradatelná role pro život bakteriální buňky. Když se ATB na takové místo naváže, způsobí to u bakterií buď zastavení růstu, nebo smrt.

Příkladem tohoto typu rezistence může být odolnost vůči již zmíněným beta-laktamům, jejichž cílovým místem jsou transpeptidázy. Dalším příkladem jsou transglykosylázy, cílová místa pro glykopeptidy (Lambert, 2005 ; García-Álvarez a kol., 2011).

5.2 Zhoršený průnik ATB do buňky

U tohoto mechanismu záleží na druhu bakterie, protože grampozitivní a gramnegativní bakterie mají odlišnou stavbu buněčné stěny. Buněčná stěna a cytoplasmatická membrána jsou pro buňku životně důležité, protože zajišťují výměnu látek s okolím a přísun živin. Mají také za úkol bakterii chránit, ale pro ATB tyto obaly neznámají žádnou překážku.

Grampozitivní bakterie mají buněčnou stěnu silnější, ale ATB do nich procházejí snáze než do gramnegativních bakterií. Je to díky vrstvě lipopolysacharidu (LPS), která se nachází v buněčné stěně gramnegativních bakterií. LPS se skládá z lipidu A, vnitřního polysacharidu a O-antigenu. Hydrofobní konce molekul LPS směřují ven z buňky a lipofilní konce dovnitř. S tímto složením souvisí odlišná průchodnost hydrofobních a hydrofilních ATB do gramnegativních bakterií. Hydrofobní ATB tak mohou do buněk přecházet přes lipidovou vrstvu, ale její gelovitý charakter může mechanicky zabránit vstupu ATB. Většina ATB je ale hydrofilní (beta-laktamy, chloramfenikol a fluorochinolony), tato přecházejí do gramnegativních buněk pomocí membránových bílkovin tzv. porinů. Záleží tedy na množství těchto porinů, které přímo ovlivňují rezistenci na hydrofilní ATB u gramnegativních bakterií (Kumar a Schweizer, 2005).

5.3 Aktivní odčerpávání ATB

Dalším obecným mechanismem vzniku rezistence je aktivní odčerpávání ATB z buňky (eflux) pomocí speciálních membránovými bílkovinami, a to aniž by došlo ke

změně antibiotika nebo jeho degradaci. Eflux je podkladem rezistence na makrolidy, fluorochinolony, tetracyklin, chloramfenikol a další (Kumar a Schweitzer, 2005).

5.4 Bakteriální enzymy

Díky mutacím bakterie získaly schopnost produkovat různé enzymy, které mohou zneškodnit ATB, která prostoupila do bakteriální buňky nebo jsou přítomny v jejich okolí. Geny pro tyto enzymy jsou přenášeny pomocí plasmidů, transponů a integronů.

Příkladem jsou různé typy beta-laktamáz, které rozkládají beta-laktamový kruh penicilinových ATB. Místo účinku beta-laktamáz souvisí s druhem bakterie. U grampozitivních bakterií ATB snadno vstupují do buňky, a proto jsou aktivní enzymy vyplavovány do prostředí, kde ATB ničí. V optimálním případě jedna molekula enzymu dokáže zničit až 100 000 molekul penicilinu za minutu. U gramnegativních bakterií se beta-laktamová ATB dostávají do buňky pomocí porinů a jsou ničena beta-laktamázami v periplasmatickém prostoru (Kotra a Mobashery, 1998).

Obdobným mechanismem způsobují bakterie rozklad chloramfenikolu nebo aminoglykosidových ATB (Julák, 2006).

6 Typy a principy mechanismů rezistence

6.1 Změna cílových struktur

Penicilin vázající proteiny

Methicilin rezistentní *S. aureus* (MRSA) je označení pro kmeny *S. aureus*, které jsou rezistentní na methicilin a další beta-laktamová ATB. Tato rezistence je způsobena získáním genu *mecA*. Tento gen kóduje tzv. penicilin-binding protein 2a (PBP2a), který patří do skupiny biosyntetických enzymů účastnících se syntézy peptidoglykanu.

Gen *mecA* je součástí tzv. stafylokokové chromozomové kazety *mec* (SCC*mec*, z angl. staphylococcal cassette chromosome *mec*). V současnosti je známo pět typů SCC*mec* označovaných I-V, které se liší složením a pořadím genů v kazetě.

Interakce mezi beta-laktamovými ATB a PBP spočívá v rychlé, ale vratné tvorbě nekovalentního komplexu. Poté následuje reakce mezi kyslíkovým atomem na vedlejším

řetězci serinového zbytku na aktivním místě enzymu. Vzniká tak relativně stabilní kovalentní komplex, ve kterém je serin acylován hydrolyzovaným beta-laktamem.

Existují však beta-laktamová ATB, která se mohou na PBP2a vázat, aniž by ztratily svou aktivitu. Jedná se o modifikované cefalosporiny a karbapenemy (Lambert, 2005).

Rezistence na beta-laktamová ATB je u *Str. pneumoniae* je způsobena sníženou afinitou PBP pro tato ATB. Rezistence na třetí generaci cefalosporinů je ale spojována s produkcí změněných forem PBP1 a PBP2x, kdežto rezistence na penicilin je způsobena změnami PBP2b. K přenosu genetické informace, na jejichž podkladě dochází k tvorbě změněných PBP, se odehrává mechanismem transformace. *Str. pneumoniae* tak získává rezistenci od příbuzných druhů streptokoků (Lambert, 2005).

U *Neisseria gonorrhoeae* se vyskytují PBP 1-4, pouze PBP1 a 2 jsou důležité pro existenci bakteriální buňky, a proto jsou cílovým místem působení antibiotik. Změna PBP2 je podmíněna přítomností genu *penA*, který je zodpovědný za rezistenci gonokoků na penicilin. Mutace v genu pro PBP1 také přispívají k rezistenci na beta-laktamová ATB. V případě gonokoků je však tento mechanismus rezistence kombinován ještě s dalšími, a to efluxem a změnou membránových porinů (Lambert, 2005).

Snížená citlivost enterokoků na beta-laktamy vzniká v důsledku přirozené tvorby nízkoafinitivních PBP. Analýza struktury PBP5 u *Enterococcus faecium* odhalila změny na aktivním místě enzymu, které vykazují určitou podobnost s nízkoafinitivními PBP2a kmenů MRSA. Aktivní místo PBP5 obsahuje také hydrofobní valinové zbytky, které mohou ztěžovat přístup beta-laktamových ATB (Lambert, 2005).

Modifikace PBP je popsána také u dalších bakteriálních druhů, jako jsou *Haemophilus influenzae* (změna PBP3), *Helicobacter pylori*, *Str. pyogenes* (změna PBP5, nový PBP2a'), *Listeria monocytogenes* (změna PBP3), *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii* a *Pseudomonas aeruginosa* (změna PBP2) (Lambert, 2005).

Zvýšené množství peptidoglykanu v buněčné stěně a změna jeho struktury

Glykopeptidy (vankomycin nebo teikoplanin) inhibují syntézu buněčné stěny grampozitivních bakterií nekovalentní vazbou na peptidyl-D-alanyl-D-alanin konec prekursorů peptidoglykanu. Kmeny *S. aureus* rezistentní na vankomycin (VRSA; z angl. vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*) byly poprvé izolovány v Japonsku, a poté v několika dalších zemích. Vzhledem k heterogenní podstatě rezistence bývají kmeny

označovány také jako vankomycin středně citlivý *S. aureus* (VISA, z angl. vancomycin intermediate susceptible *Staphylococcus aureus*), a ke glykopeptidům středně citlivý *S. aureus* (GISA, z angl. glycopeptide intermediate susceptible *Staphylococcus aureus*). Ve srovnání s vankomycin citlivými kmeny *S. aureus*, vykazují tyto kmeny výrazné změny ve struktuře buněčné stěny. Tyto změny zahrnují až 2x silnější buněčnou stěnu, zvýšený podíl peptidů tvořících peptidoglykan, které obsahují neamidované glutaminové zbytky a v neposlední řadě také sníženou míru zesíťování peptidoglykanu.

Gramnegativní bakterie jsou díky stavbě své buněčné stěny na glykopeptidy přirozeně rezistentní. (Wright, 2003; Lambert, 2005).

Modifikace prekurzorů peptidoglykanu

Nejčastější příčina vzniku rezistence na glykopeptidová ATB u enterokoků je podmíněna přítomností genových klastrů *vanA* a *vanB*. Tyto klastry kódují enzymy, které produkují modifikované prekursory peptidoglykanu končící D-alanyl-D-laktátem, na které se glykopeptidy váží s nižší afinitou. Tento mechanismus rezistence je indukován přítomností glykopeptidových antibiotik.

Genové klastry *vanA* a *vanB* jsou lokalizovány na transposonech a mechanismem transpozice a konjugace došlo k jejich rozšíření na další druhy enterokoků. Genové klastry *vanD*, *vanE* a *vanG* jsou vzácnější.

V roce 2002 byly popsány první kmeny MRSA rezistentní k vankomycinu, které získaly genový klaster *vanA* od vankomycin-rezistentních enterokoků (VRE, z angl. vancomycin resistant enterococci). Jeden kmen tak může nést dva různé mechanismy rezistence ke glykopeptidům - *SCCmecA* na chromozomu a *vanA* na plasmidu, což vede k řadě změn ve složení peptidoglykanu.

Stále dochází k vývoji nových látek, které byly účinné na kmeny VRE, MRSA a VISA. Příkladem je nová generace semi-syntetických glykopeptidových ATB jako je oritavancin (derivát chloroeremomycinu, což je analog vankomycinu (Wright, 2003; Lambert, 2005; Hill a kol. 2010).

Změna DNA-gyrázy a topoizomerázy IV

Oba enzymy nutné pro syntézu buněčné DNA jsou cílem působení fluorochinových ATB.

Fluorochinolony interagují s komplexem, který se vytváří mezi DNA a jedním z enzymů, což vede ke konformačním změnám a inhibici normální aktivity těchto enzymů (Drlica a Zhao, 1997; Lambert, 2005).

Rezistence na fluorochinolony může vznikat díky chromosomálním mutacím, které se projeví u obou enzymů. V důsledku mutací v genu *gyrA* kódujícím DNA gyrázu, dochází ke snížení afinity fluorochinolonů k změněnému komplexu gyráza-DNA. Na tomto podkladu vzniká častěji rezistence u gramnegativních bakterií. U grampozitivních bakterií (*S. aureus* a *Str. pneumoniae*) jsou častější mutace v genu pro topoizomerázu IV.

I v tomto případě se stále hledají nové léky, dnešní experimentální chinolony si zachovávají inhibiční účinky u *S. pneumoniae* (rezistentní na penicilin) a MRSA navzdory mutacím způsobujícím změnu cílových míst a efluxu (Willmott a kol., 1993; Lambert, 2005).

Změna RNA polymerázy

Dalším cílem ATB je RNA polymeráza, na kterou působí rifampicin, významný lék pro terapii tuberkulózy. Vzhledem k tomu, jak rychle se k němu rozvíjí rezistence, není vhodný k monoterapii, ale v kombinaci s dalšími ATB je vhodný k léčbě závažných infekcí způsobených grampozitivními i gramnegativními bakteriemi. Cílovým místem rifampicinu je β -podjednotka RNA polymerázy, kódovaná *rpoB* genem. Rezistence *Mycobacterium tuberculosis* na rifampicin vzniká na podkladě bodových mutací, inzercí a delecí v oblasti *rpoB* (Lambert, 2005).

6.2 Změna propustnosti vnější membrány

Propustnost vnější membrány a s ní spojená rezistence je důležitá zvláště u gramnegativních mikroorganismů. Jejich buněčná stěna je díky tomuto uspořádání nepropustná pro celou řadu substrátů a transport skrz ni se uskutečňuje několika mechanismy: prostupem přes poriny, difúzí přes dvojvrstvu fosfolipidů nebo vlastním podporovaným vychytáváním. To, jak léky budou do buňky vstupovat, značně závisí na jejich chemickém složení. Např. hydrofilní sloučeniny přecházejí do periplasmatického prostoru díky porinům (beta-laktamy) nebo díky vychytávání (aminoglykosidy) (Nikaido, 2003; Kumar a Schweitzer, 2005).

Role LPS v rezistenci na ATB

Za neprostupnost zevní membrány pro hydrofobní látky jako jsou ATB a detergenty je z větší části zodpovědný LPS, který se skládá z lipidu A, vnitřního polysacharidu a O-antigenu. Gelový charakter lipidové vrstvy, záporně nabitý O-antigen a zesíťování vnitřního polysacharidu také přispívá k nízké permeabilitě LPS.

Role LPS jako bariéry proti ATB je velmi dobře zdokumentována. U kmenů *E.coli* a *Salmonella enterica* ssp. *enterica* sérovar Typhimurium majících defekt v syntéze lipidu A a vnitřního polysacharidu byla prokázána 4x vyšší citlivost k erytromycinu, roxitromycinu, klaritromycinu a azithromycinu než u divokých kmenů. Mutace v LPS způsobující vysokou citlivost byly popsány také u *Pseudomonas aeruginosa* a *Vibrio cholerae*.

Nejčastějším mechanismem rezistence k polymyxinu B a aminoglykosidům je modifikace lipidu A, která byla popsána u *Salmonella enterica* ssp. *enterica* sérovar Typhimurium. Přítomnost aminoarabinózy efektivně snižuje negativní náboj zevní membrány a tím snižuje pronikání polymyxinů (Kumar a Schweitzer, 2005).

Role porinů v rezistenci na ATB

Jak již bylo uvedeno, některá ATB pronikají do buňky gramnegativních bakterií díky kanálům v zevní membráně, tzv. poriny. Mezi taková ATB patří zejména beta-laktamy, chloramfenikol a fluorochinolony. Z toho vyplývá, že rychlost difúze ATB do buňky bude záviset na počtu porinů, jejich velikosti a selektivitě.

Jeden z prvních případů rezistence způsobený chyběním porinů byl popsán u kmenů *Serratia marcescens* izolovaných z klinického materiálu, které vykazovaly rezistenci na aminoglykosidová a beta-laktamová antibiotika. Následně bylo prokázáno tento mechanismus rezistence u *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae* a *Enterobacter aerogenes*. Rezistence v důsledku absence porinů bývá často spojena s produkcí beta-laktamázy, jak je tomu u *Enterobacter aerogenes*. Rezistence však může být vyvolána také mutací v genu kódujícím poriny, která vede k jejich zúžení.

Mikroorganismus *Pseudomonas aeruginosa* má mnohem menší propustnost vnější membrány v porovnání např. s *E. coli*, ale zároveň propouští mnohem větší molekuly než *E. coli*. Disponuje také řadou specifických porinů, které mohou přispívat k rezistenci

na ATB. Mezi ně patří porin OprD, který usnadňuje vstup malých beta-laktamových ATB (imipenem). Po expozici imipenemu dochází u *Pseudomonas aeruginosa* ke snížení množství porinů, což vede k rezistenci na toto ATB. Absence porinu OprE je podkladem rezistence této bakterie k chinolonům a cefalosporinům (Lambert, 2002; Kumar a Schweitzer, 2005).

6.3 Eflux

Eflux je mechanismus, kterým se bakterie zbavuje široké škály chemicky a strukturně odlišných sloučenin (ATB, čisticí a dezinfekční prostředky), aniž by docházelo k jejich změně nebo degradaci. Často se také vyskytuje tzv. zkřížená rezistence, která vzniká po vystavení bakterie jedné látce, která patří mezi profilové substráty pro danou efluxní pumpu. Dojde k nadměrné expresi této pumpy a tím i k rezistenci na ostatní substráty pumpy, které mohou zahrnovat klinicky důležitá ATB. Příkladem takové rezistence může být MexAB systém u *P. aeruginosa*. Mutanty buněk se zvýšenou expresí MexAB jsou méně citlivé, ne-li zcela odolné k řadě ATB (fluorochinolony, beta-laktamy, chloramfenikol, trimetoprim), ale jsou rezistentní také k triklosanu, který je běžně používaným biocidem (Webber a Piddock, 2003; Kumar a Schweitzer, 2005).

Většinou jsou efluxní přenašeče kódovány chromozomálně, nicméně existují i případy, kdy se genetická informace kódující přenašeče nachází na mobilních elementech. Odhaduje se, že 5-10 % všech bakteriálních genů kóduje informace o transportu a velká část z nich kóduje právě efluxní pumpy.

Efluxní přenašeče můžeme rozdělit na ty, které přenášejí jednu sloučeninu nebo jich přenášejí více. První skupina přenašečů umožňuje přenos sloučenin přes cytoplasmatickou membránu. Druhá se vyskytuje u gramnegativních bakterií a v součinnosti s dalšími proteiny vyskytujícími se v periplasmatickém prostoru a na zevní membráně umožňují přenos sloučenin přes celou buněčnou stěnu.

Bakteriální efluxní přenašeče jsou v současné době řazeny do pěti rodin, které jsou graficky znázorněny na obr. 3. Jedná se o tyto:

- a) MFS (z angl. major facilitator superfamily)
- b) ABC superrodina (z angl. ATP-binding cassette)
- c) SMR rodina (z angl. small multidrug resistance)

- d) RND superrodina (z angl. resistance-nodulation-cell division)
- e) MATE rodina (z angl. multidrug and toxic compound extrusion) (Hooper, 2002; Kumar a Schweizer, 2005).

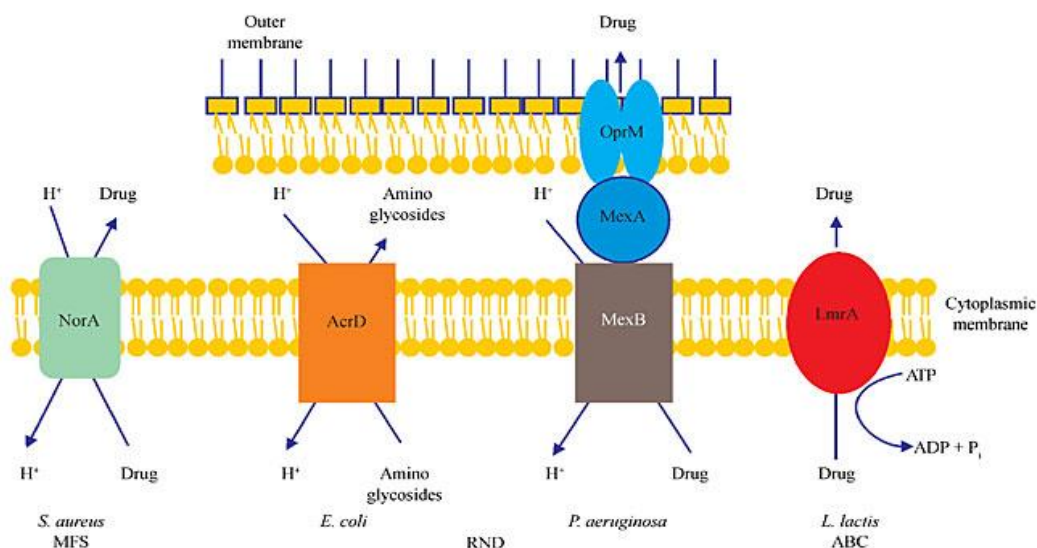


Figure 1. Schematic illustration of the main types of bacterial drug efflux pumps shown in *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Lactobacillus lactis*. Illustrated are NorA, a member of the major facilitator superfamily (MFS); AcrD and MexAB-OprM, two members of the resistance-nodulation-division (RND) family and LmrA, a member of the ATP-binding cassette (ABC) family. All systems extrude drugs in an energy-dependent manner, either by using proton motif force or ATP. The two other types of efflux systems found in bacteria, multidrug and toxic compound extrusion (MATE), and small multidrug resistance (SMR), look structurally similar to the MFS but are designated as distinct families, based on phylogenetic diversity (MATE) or size (SMR).

Obr. 3: Hlavní rodiny bakteriálních efluxních přenašečů u *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Lactobacillus lactis* (Schweizer, 2003).

MFS

MFS je poměrně stará a rozmanitá superrodina efluxních přenašečů. Jednotliví zástupci této rodiny je zajišťují transportu cukrů, metabolitů, aniontů a léků (makrolidy, tetracykliny). Pumpy patřící do této skupiny jsou většinou jednosložkové. Vnitřní membránové proteiny pump, transportujících léky, jsou obvykle složeny z 12 nebo 14 transmembránových segmentů.

Tetracyklinové efluxní přenašeče patří k nejlépe popsaným zástupcům MSF rodiny. Nacházejí se jak u grampozitivních, tak gramnegativních bakterií (van Bambeke a kol., 2000; Kumar a Schweitzer, 2005).

ABC superrodina

Do této superrodiny patří přenašeče umožňující transport cukrů, aminokyselin, iontů, léků, polysacharidů a proteinů. Tyto přenašeče jsou proteinové komplexy složené z integrálních membránových komplexů a cytoplasmatických proteinů s ATPázovou

aktivitou. Přenašeče jsou přímo závislé na přítomnosti glutathionu, jehož role však zatím není plně objasněna. Pravděpodobně sám aktivuje přenašeč nebo je transportován společně s lékem. Je také možné, že je glutathion přímo s lékem konjugován.

Efluxní přenašeče patřící do této superrodiny se u bakterií vyskytují poměrně vzácně. Nejlépe popsány jsou LmrA pumpy u bakterie *Lactobacillus lactis* (van Bambeke a kol., 2000; Kumar a Schweitzer, 2005).

SMR rodina

Efluxní přenašeče spadající do této rodiny byly dříve považovány za trimery. Pozdější studie ukázaly, že se vyskytují i ve formě tetramerů. Mechanismus přenosu léků těmito přenašeči funguje na principu výměny léku za proton (tzv. antiport), přičemž zbytek odpovědný za tuto výměnu může být glutamát. Příkladem těchto pump je Smr pumpa u *S. aureus* a EmrE pumpa u *E.coli* (van Bambeke a kol., 2000; Kumar a Schweitzer, 2005).

RND superrodina

RND efluxní přenašeče bývají většinou kódovány chromosomálně, ale vyskytují se i případy, kdy jsou jejich geny lokalizovány na plasmidech. Všichni členové této rodiny katalyzují efluxní substráty pomocí substrát/H⁺ antiportu. RND pumpy hrají důležitou roli jak v získané, tak i přirozené rezistenci gramnegativních bakterií. U těch fungují pumpy na principu vytváření komplexů s dalšími proteiny vyskytujícími se v periplasmatickém prostoru a na zevní membráně.

V dnešní době jsou nejlépe prozkoumány pumpy AcrAB-TolC u *E.coli* a MexAB-OprM u *P. aeruginosa*, které z buňky odčerpávají ATB, těžké kovy, barviva, detergenty, rozpouštědla a mnoho dalších substrátů (Schweizer, 2003; Kumar a Schweitzer, 2005).

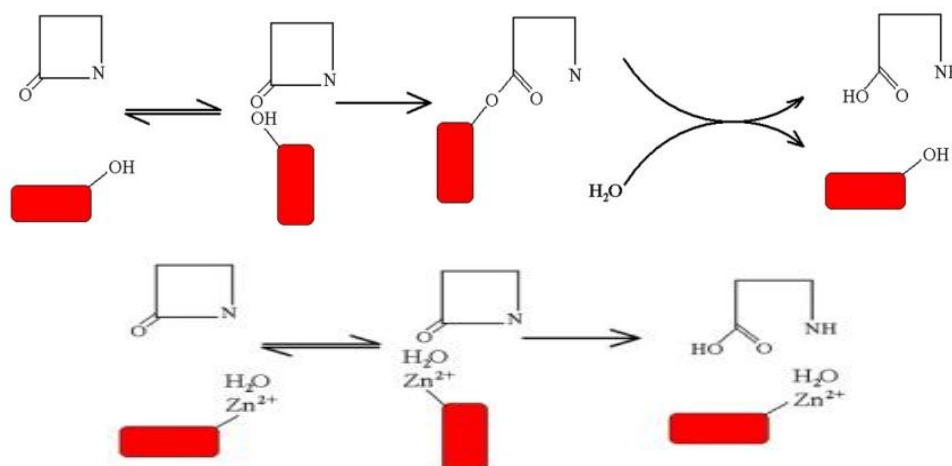
MATE rodina

Původně se zástupci této rodiny řadili mezi MFS. Protože však i přes určitou podobnost nejsou sekvenční homology, byla pro ně vytvořena skupina nová. Příkladem efluxních přenašečů patřících do této rodiny je NorM u *Vibrio parahaemolyticus* a jeho homolog a dále YdhE u *E.coli*. Proteiny této rodiny využívají k transportu Na⁺ gradient jako energického zdroje pro eflux zejména kationických barviv a fluorochinolonů (van Bambeke a kol., 2000; Kumar a Schweitzer, 2005).

6.4 Produkce bakteriálních enzymů

Jedním z dalších mechanismů rezistence je produkce speciálních enzymů, které degradují pro mikroorganismy toxické látky, jako jsou např. ATB. Mezi nejrozšířenější a nejprobádanější enzymy patří beta-laktamázy.

Beta-laktamová ATB patří mezi nejstarší a nejrozšířenější používaná ATB. Mechanismem jejich účinku je inaktivace enzymů odpovědných za syntézu peptidoglykanu, které označujeme PBP. Dnes už je známo, že beta-laktamázy jsou v evolučním smyslu úzce příbuzné s PBP. Principem působení těchto enzymů je hydrolýza amidové vazby v beta-laktamovém kruhu beta-laktamových ATB. Donorem molekuly vody pro hydrolýzu je serin v aktivním místě beta-laktamázy nebo dvojmocný kationt v případě metalobeta-laktamáz (obvykle Zn^{2+}), jak zobrazuje obr. 4 (Buynak, 2006).



obr. 4: Mechanismus působení beta-laktamáz a metalobeta-laktamáz
(Betalaktamázy.cz).

Klasifikace beta-laktamáz

Jako první klasifikoval rezistentní kmeny koliformních bakterií produkující tyto enzymy Ayliffe v roce 1963. V dnešní době se nejvíce využívá klasifikace dle Amblera a nebo ta, kterou navrhli Bush, Jacoby a Medeiros.

Ambler navrhl klasifikaci na základě molekulárních typů beta-laktamáz. Podle jeho rozdělení se tyto enzymy dělí do čtyř skupin A-D. Penicilinázy, jejichž důležitým aktivním místem jsou serinové zbytky, které se účastní katalytického procesu, spadají do skupiny A. Tyto enzymy byly nalezeny jak u grampozitivních, tak u gramnegativních bakterií. Třída B jsou metalo-enzymy, které jsou velmi strukturně odlišné od skupiny A. Do skupiny C

se řadí také serin dependentní enzymy. Rozdíl oproti skupině A je jejich schopnost dobře hydrolyzovat cefalosporiny. Do třídy D se řadí serin dependentní oxacilin-hydrolyzující beta-laktamázy (OXA-ty) (Kotra a Mobashery, 1998).

Novější a komplexnější systém klasifikace, kterou navrhl Bush, Jacoby a Medeiros. Tato klasifikace byla později rozšířena na všechny známé beta-laktamázy (okolo 190 enzymů). Systém této klasifikace je založen na preferenci různých substrátů a inhibičních charakteristikách různých beta-laktamáz. Podle tohoto systému byly čtyři používané třídy reorganizovány.

Cefalosporinázy, které nejsou inhibovány kyselinou klavulanovou patří do skupiny 1. Do skupiny 2 patří penicilinázy, jež jsou blokovány inhibitory beta-laktamáz. Tato skupina je dále organizována do podskupin 2a, 2b až 2f jejich schopnosti hydrolyzovat karbenicilin, kloxacilin, ceftazidim, cefotaxim nebo aztreonam. Enzymy, které jsou inhibovány EDTA (kyselina ethylen-diamin-tetraoctová), což jsou převážně metalobeta-laktamázy, spadají do skupiny 3. Poslední skupina číslo 4 je složena z beta-laktamáz, které nejsou inhibovány kyselinou klavulanovou (Kotra a a Mobashery, 1998).

První beta-laktamáza kódovaná na plasmidu byla popsána u *E.coli* a byla označena TEM-1, protože tento kmen byl izolován v Řecku z krve pacienta, který se jmenoval Temoniera. O pár let později byla nalezena TEM-1 beta-laktamáza i u volně žijících bakterií. Další plasmidem kódovanou beta-laktamázou je SHV-1 nalezená u *E.coli* a *Klebsiella pneumoniae* (Bradford, 2001).

Inhibitory beta-laktamáz

Jako reakce na výskyt beta-laktamáz byly vyvinuty inhibitory těchto enzymů. Tyto inhibitory se používají vždy v kombinaci s beta-laktamovým ATB, protože samy nemají antibakteriální účinek. Většina inhibitorů serinových beta-laktamáz funguje na principu vytváření stabilního esteru.

Mezi příklady inhibitorů beta-laktamáz patří kyselina klavulanová, sulbaktam a tazobaktam. Jak je výše zmíněno, inhibitory jsou vždy kombinovány s vhodným ATB např. amoxicilin+kyselina klavulanová tvoří kombinaci nazývanou Augmentin™. Tyto komerční kombinace bývají účinné zejména proti mikroorganismům, které produkují beta-laktamázy spadající do třídy A (dle Amblera) (Buynak, 2006).

6.4.1 Širokospektré beta-laktamázy

ESBL (z angl. extended-spectrum beta-lactamases) jsou produkovány některými kmeny gramnegativních bakterií, které jsou pak schopny hydrolyzovat cefalosporiny s rozšířeným spektrem účinku jako je např. cefotaxim, ceftazidim, dále také monobaktamy. Naopak nehydrolyzují cefamyciny (cefoxitin). Tyto enzymy mají serinové aktivní místo a mohou být inhibovány inhibitory beta-laktamáz. Podle těchto poznatků se řadí většina ESBL podle Amblera do skupiny A (menší část do skupiny D) nebo podle Bushe do skupin 2b a 2d. Nejčastěji se tento typ enzymů vyskytuje u druhů jako je *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* a dalších příslušníků čeledi *Enterobacteriaceae*, pseudomonád a acinetobakterů (Bradford, 2001; Hrabák a kol., 2007).

Skupina TEM

Tato skupina tvoří nejpočetnější skupinu beta-laktamáz. Mutacemi a změnami v pořadí aminokyselin došlo ke vzniku odvozených enzymů s odlišným fenotypem. To se projeví v odlišné schopnosti hydrolyzovat cefalosporiny.

Nejčastěji se ESBL typu TEM nachází u *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, ale mohou se vyskytovat i u dalších zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* nebo u *Pseudomonas aeruginosa* (Jacoby a Medeiros, 1991; Bradford, 2001).

Skupina SHV

Tato skupina enzymů se nejčastěji vyskytuje u *Klebsiella pneumoniae*. SHV-1 je plasmidem kódovaný enzym, který zapříčiňuje až 20 % veškeré plasmidem kódované rezistence na ampicilin u tohoto druhu. SHV-1 enzymy jsou kódovány genem *bla_{SHV-1}*, který může být součástí bakteriálního chromozomu. Tato skupina není tak početná jako TEM, protože na kódujícím genu nedochází k tolika mutacím (Bradford, 2001).

Skupina CTX-M

Tato skupina je poměrně mladá a patří mezi plasmidem kódované beta-laktamázy, zahrnující okolo 50 enzymů. Příslušníci této skupiny jsou typičtí hydrolýzou cefotaximu a nachází se nejčastěji u *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium a *E.coli*. Obecně se předpokládá, že tato skupina je odvozena od beta-laktamáz, které se nacházejí u rodu *Kluyvera* (Bradford, 2001; Bonnet, 2004).

Skupina OXA

Tato skupina se označuje OXA, protože enzymy, spadající do této skupiny jsou schopny hydrolyzovat oxacilin a kloxacilin. Díky nim získávají bakterie také odolnost k ampicilinu a cefalotinu. Podle Amblerovy klasifikace spadají tyto enzymy do skupiny D a podle klasifikace Bush, Jacoby a Medeiros do skupiny 2d. Tyto enzymy jsou také velmi málo inhibovány kyselinou klavulanovou. Pro tuto skupinu je typická slabá genotypová podobnost (homologie mezi jednotlivými enzymy může být menší než 20 %). Několik typů OXA enzymů je odvozeno od OXA-10 a nejčastěji můžeme tyto enzymy nalézt u *P. aeruginosa*.

Zmíněné čtyři skupiny ESBL patří mezi hlavní, ale existují také další skupiny, jejichž které zatím nejsou tak významné. Mezi menší skupiny patří např. PER, kdy PER-1 beta-laktamáza byla poprvé izolována z kmene *P. aeruginosa* vykultivovaného od pacienta v Turecku. Zkratka vznikla buď z angl. *Pseudomonas* extended resistance nebo také z iniciál objevitelů: Patrice, Esthel a Roger (Bradford, 2001; Jacoby 2006).

6.4.2 Metalobeta-laktamázy

Tyto enzymy jsou produkovány některými gramnegativními bakteriemi a znamenají největší problém v oblasti rezistence k beta-laktamovým ATB. Tento problém je díky jejich schopnosti hydrolyzovat peniciliny, karbapenemy a cefalosporiny všech generací, tudíž vyřazují z použití většinu beta-laktamových ATB. Jedinou výjimkou jsou monobaktamy, jako je aztreonam, u kterých bývá efekt zachován.

Tato skupina enzymů byla objevena před více než 40 lety E. P. Ambrahamem na Univerzitě v Oxfordu u kmene *Bacillus cereus*. Okolo roku 1985 byly známy dvě metalobeta-laktamázy (MBL, z angl. metallo-beta lactamase), ale v dnešní době už je jich 20. Podle Amblerovy klasifikace se MBL řadí do skupiny B a podle klasifikace Bush, Jacoby a Medeiros patří do skupiny 3. Tyto enzymy způsobují hydrolýzu výše uvedených ATB, přičemž donorem molekuly vody je dvojmocný kationt (většinou Zn^{2+}), který je navázán v aktivním místě enzymu. Nejsou inhibovány inhibitory beta-laktamáz, ale jejich funkci lze blokovat chelatačními činidly, jako je např. EDTA, kyselina 2-merkaptopropionová, *p*-chloromerkuribenzoát apod.

Tyto enzymy představují velký problém v nemocničních zařízeních, kde dochází k horizontálnímu přenosu kódujících genů mezi různými druhy bakterií. Tento přenos

probíhá např. z nefermentujících gramnegativních tyček na enterobakterie. Přenos je navíc umocněn podáváním cefalosporinů vyšší generace a hospitalizacemi na oddělení JIP (jednotka intenzivní péče). Poměrně častý výskyt MBL je u *Pseudomonas aeruginosa*, kdy v České republice byla v roce 2005 a 2006 celá 1/3 všech kmenů rezistentní ke karbapenémům (Page, 2002; Hrabák a kol., 2007).

6.4.3 Další bakteriální enzymy

Enzymy modifikující aminoglykosidy

Aminoglykosidy jsou často používanými ATB a jejich efekt spočívá v inhibici proteosyntézy. Řada bakterií si ale vytvořila schopnost produkovat enzymy, které tato ATB pozměňují. Plasmidem kódované N-acetyltransferázy atakují všechny klinicky využívané aminoglykosidy a jsou tak hlavní příčinou rezistence gramnegativních bakterií k těmto ATB. Byla zaznamenána i chromozomálně kódovaná 6'-N-acetyltransferáza u kmenů *Salmonella enterica* ssp. *enterica* izolovaných z klinických vzorků (Vetting a kol., 2004).

N-acetyltransferázy acylují aminoskupinu ATB pomocí kofaktoru acetyl-CoA. Tento kofaktor poskytuje acetátovou skupinu. Jsou kódovány *acc* geny, které jsou lokalizovány na plasmidech, transpozonech nebo uvnitř integronů. Různé druhy acetyltransferáz se liší spektrem svého účinku.

Fosfotransferázy fosforylují hydroxylovou skupinu aminoglykosidů a ATP využívají jako donor fosfátové skupiny. Fosfotransferázy jsou kódovány geny *aph* a dle Schwarze a Chaslus-Dancly (2001) bylo známo 11 variant těchto enzymů.

Nukleotidyltransferázy adenylují hydroxylovou skupinu aminoglykosidů a ATP využívají jako donor adenylové skupiny. Tyto enzymy bývají kódovány geny *ant* (Schwarz a Chaslus-Dancly, 2001).

Chloramfenikol acetyltransferáza

Další enzym si bakterie vytvořily k zajištění odolnosti k chloramfenikolu. Toto ATB nikdy není lékem první volby, ale často se k jeho použití lékaři přiklánějí. Léčba chloramfenikolu se zavedla hlavně v nemocnicích kvůli vysoké prevalenci multirezistentních kmenů enterokoků. Mechanismus jeho účinku spočívá v inhibici proteosyntézy. Až 50 % těchto bakterií však je rezistentní i k tomuto ATB především díky

produkci chloramfenikolacetyltransferázy. Tento enzym způsobuje acetylaci hydroxylové skupiny chloramfenikolu, který se poté nemůže navázat na ribozomální podjednotku. Geny kódující tento enzym se označují *cat* a bývají lokalizovány většinou na plasmidech, není však výjimkou i lokalizace na bakteriálním chromozomu. *Cat* geny se vyskytují především u enterokoků, streptokoků a stafylokoků, což vede k domněnce horizontálního přenosu genu (Shaw a kol., 1993; Frolková 2010).

6.5 Rezistence na sulfonamidy

Sulfonamidy jsou velmi selektivní ATB, protože jejich cílem je DHPS. Tento enzym katalyzuje kondenzaci PABA a 6-hydroxymetyl-7,8-dihydropterin difosfátu nutnou pro syntézu kyseliny tetrahydrolistové. Jejich selektivita spočívá právě v DHPS. Jelikož savčí buňky tento enzym nemají, nejsou schopny syntézy kyseliny listové. Proto využívají foláty z potravy (Sköld, 2000).

Sulfonamidy byly zavedeny do klinické praxe v roce 1993 a i díky své příznivé ceně se začaly hojně využívat. Díky tomuto používání se začala objevovat celá řada mikroorganismů rezistentních k těmto ATB. V dnešní době se už používání omezilo a podávají se převážně v kombinaci s trimetoprimem (Dolejská, 2006).

Chromozomálně kódovaná rezistence

Streptokokové infekce byly prvním onemocněním, které bylo efektivně léčeno sulfonamidy. U dvou nejvíce rezistentních kmenů byla nalezena velmi pozměněná DHPS. Tyto změny jsou velmi rozsáhlé na to, aby vznikly díky nahromadění mutací, proto se předpokládá, že gen kódující rezistenci byl do bakterie zaveden transformací. Tato domněnka je podpořena i vzniklými změnami v sousedním genu *folE* (kódující GTP cyklohydrolázu) (Sköld, 2000).

U *Str. pneumoniae* dochází ke spontánním mutacím jak u laboratorních kmenů, tak i u kmenů izolovaných z klinického materiálu. Rozdíl je v charakteru změny v genu *dhps*. Šíření rezistence nastává díky horizontálnímu přenosu nebo transformací (Maskell a kol., 1997; Sköld 2000).

U *E. coli* dochází ke spontánním mutacím v genu *dhps* (někdy označován i *folP*). Těmito změnami dochází k poruše kondenzace PABA. Změny ve struktuře jsou pouze

drobné, ale je jimi zapříčiněna rezistence k sulfonamidům, protože cílové místo těchto ATB bylo pozměněno a i přes to, že dále plní svoji funkci (Sköld, 2000).

Další změny DHPS byly zaznamenány u *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *Campylobacter jejuni*, *Pneumocystis carinii*, *Mycobacterium leprae* a *Neisseria meningitidis* (Gibreel a Sköld, 1999; Sköld, 2000).

Plasmidem kódovaná rezistence

Tento typ rezistence se často vyskytuje u gramnegativních střevních bakterií. Vzniká díky genům kódujícím rezistenci, které se nachází na plasmidech. Tyto geny poté kódují DHPS rezistentní vůči sulfonamidům.

Geny kódující tento typ rezistence se označují *sul* a byly popsány v 60. letech minulého století. Jsou přítomny na R-plasmidech. Celkem můžeme u bakterií rozlišit tři typy *sul* genů. Nejdůležitějšími jsou však geny *sul1* a *sul2*, ty se vyskytují velmi hojně a mají vysokou schopnost šířit se. Např. DHPS kódovaná genem *sul2* má vysokou rozlišovací schopnost pro normální PABA substrát a sulfonamidy. Tímto mechanismem je zajištěna dokonalá odolnost k těmto typům ATB (Sköld, 2000).

7 Testování citlivosti na ATB

Informace o tom, zda testovaný kmen je na dané antibiotikum citlivý nebo rezistentní, je velmi důležitá. Metody testování citlivosti na ATB můžeme rozdělit na kvalitativní a kvantitativní metody.

Testování citlivosti se provádí na Mueller-Hintonově agaru (MHA) nebo v Mueller-Hintonově bujónu (MHB). Tato kultivační média obsahují dostatek živin a zároveň minimální množství inhibitorů. Ve srovnání s jinými vhodnými půdami je také nejlevnější. Půda dle Mueller-Hintona také obsahuje vhodnou koncentraci iontů vápníku (20-25 mg/l) a hořčíku (10-15 mg/l). Jiné koncentrace by mohly způsobit zkreslení výsledků citlivosti k tetracyklinu u všech bakterií a k aminoglykosidům u *P. aeruginosa*. Pro kultivaci náročných mikroorganismů lze půdy obohatit s 5 % ovčí krve (pneumokoky, streptokoky atd.), lyzátem z koňské krve, ev. dalšími suplementy (Urbášková, 1998).

7.1 Kvalitativní metody

Ke kvalitativnímu určení citlivosti se nejvíce využívá **diskový difúzní test**. Na MHA se hustě naočkuje suspenze testovaného mikrobiálního kmene odpovídající hustotě 0,5-1 McFarlanda ($1,5-3,0 \times 10^8$ buněk na ml). Takto připravená půda se inkubuje dle nároků daného mikroorganismu (většinou 24 hodin při 37 °C). Během inkubace dochází k difuzi ATB z disku do kultivačního média a případné inhibici růstu testovaného mikroorganismu (v závislosti na jeho citlivosti). Po proběhlé inkubaci se odečítá průměr inhibiční zóny, který se porovnává hodnotami zjištěnými pro citlivé kmeny. Testovaný kmen se označuje za citlivý, pokud je jeho zóna inhibice stejná nebo větší než u kontrolního kmene. Za rezistentní se označuje ten, který má zónu inhibice menší než kontrolní kmen. Aby byly výsledky testování spolehlivé, je nutné přesně dodržet předepsaný postup. (Urbášková, 1998; Hudzicki, 2009).

7.2 Kvantitativní metody

Ke kvantitativnímu stanovení se využívá dilučních metod, kterými lze určit hodnotu MIC dané antimikrobiální látky. Diluční metody mohou být agarové nebo bujónové.

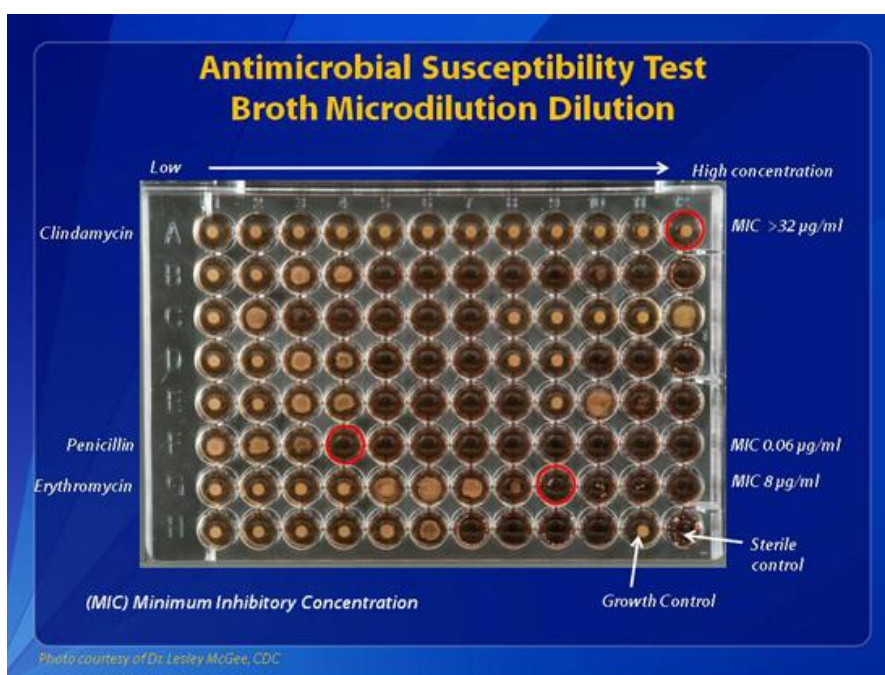
Referenční metodou pro stanovení hodnoty MIC je **agarová diluční metoda**. Pro tuto metodu se nanáší definované množství suspenze, což odpovídá 0,5-1 McFarlanda, přímo na MHA obsahující různé koncentrace testovaného ATB. Poté probíhá inkubace 24 hodin při 37°C. Po proběhlé inkubaci se odečítá koncentrace odpovídající MIC, která se porovnává hodnotami zjištěnými pro citlivé kmeny.

Výhodou této metody je, že s její pomocí lze vyšetřit citlivost velkého souboru bakterií za stejných podmínek, je také spolehlivá při testování nových ATB a dobře odhaluje kontaminaci. Lépe také detekuje heterorezistenci než mikrodiluční metoda. Nevýhodou je časová náročnost a pracnost metody, proto není vhodné používat ji pro vyšetření malého počtu kmenů (Urbášková, 1998; Wiegand a kol., 2008).

Ke stanovení MIC se nejčastěji využívá **mikrodiluční metoda**. Test se provádí v mikrotitračních destičkách, kde jsou jednotlivé jamky naplněny MHB. Každá jamka obsahuje určitou koncentraci ATB. Inokulum odpovídající 0,5-1 McFarlanda se jehlovým inokulátorem nebo multikanálovou pipetou aplikuje do jednotlivých jamek. Po inkubaci se odečítá hodnota MIC, která odpovídá jamce s nejnižší koncentrací ATB, ve které

vyšetřovaný mikroorganismus již nenarostl (zákal, sediment). Hodnocení této metody dokumentuje obr. 5 (Wiegand a kol., 2008).

Výsledky této metody jsou velmi shodné s agarovou diluční metodou, lze snadno připravit velké množství destiček s různými půdami, ATB a bakteriemi. Patří mezi nejjednodušší metody při testování hodnoty MIC a výsledky lze automaticky vyhodnocovat a odečítat. Tyto výhody doprovází i negativa, což je poměrně vysoká cena zařízení, dále při přípravě destičky v laboratoři může dojít k chybě v ředění, což znehodnotí celou destičku. Špatně se touto metodou detekuje kontaminace a nelze ji použít pro kmeny, které v tekutém prostředí autolyzují (Urbášková, 1998).



obr. 5: Bujónová mikrodiluční metoda. V řadách (A-H) jsou koncentrační řady testovaných antibiotik a ve všech jamkách je naočkován testovaný mikroorganismus, sloupec č. 12, jamka H je negativní kontrola, jamka H ve sloupci 11 je kontrola růstu. MIC je určena podle poslední jamky, kde mikroorganismus ještě naroste. Na obrázku jsou tyto jamky znázorněny červeným kolečkem (Centers for Disease Control and Prevention, 2010).

Další kvantitativní metodou je **E-test**. Na půdu, která je očkovaná jako u diskového difuzního testu se přikládá inertní proužek, který je napuštěný vzrůstající koncentrací ATB. Při inkubaci ATB difunduje z proužku do MHA a vytváří koncentrační gradient. Zóna inhibice po inkubaci má tvar kapky, jejíž hrot protíná proužek v místě, které odpovídá MIC. Rozdíl mezi E-testem a diskovým difúzním testem je možné vidět na obr. 6.

Tento test je poměrně rychlý a jednoduchý na provedení, slouží ke snadnému určení hodnoty MIC pro dané ATB. Tento test lze provádět na různých půdách, proto

je vhodný i pro náročné mikroorganismy. Lépe odhaluje kontaminaci a heterorezistenci než předchozí mikrodiluční metoda. E-test je dražší v porovnání s předchozími technikami a výsledky této metody významně ovlivňuje koncentrace inokula. (Urbášková, 1998; Letournel-Glomaud a kol., 2003).



obr. 6: Srovnání E-testu a diskového difúzního testu (Centers for Disease Control and Prevention, 2010).

8 Závěr

Z výše popsaných mechanismů je jasné, že bakterie jsou velmi schopné měnit svůj genotyp, aby mohly lépe odolávat antimikrobiálním látkám. Proto se rezistence stále vyvíjí a rozšiřuje po celém světě. Bakterie si umí vytvořit jiné cílové struktury, umí ovlivnit průchod antibiotika do vlastní buňky, produkovat různorodé enzymy k jejich ničení a aktivně tyto škodlivé látky odčerpávat. Jsou tedy schopné vyvinout si odolnost prakticky k jakémukoliv antibiotiku.

Proto je cílem mnoha laboratoří na celém světě alespoň částečné ovlivnění tohoto stavu a sledování vývoje nových i stávajících mechanismů rezistence. Výzkum prováděný v těchto laboratořích vede k tvorbě a vývoji nových antibiotik, která by bakterie efektivně ničila a byla schopna eliminovat některé infekční nemoci, které stále sužují svět.

Velkým problémem dnešní doby je nevhodné využívání antibiotika i k terapii onemocnění, která nemají bakteriální původ. Výsledkem je vznik nových kmenů rezistentních na antibiotika. Doufejme, že se bude dařit nová antibiotika vytvářet. Otázkou však zůstává, jak dlouho budou tyto nové látky fungovat.

Seznam literatury

ATLAS, R. M. *Principles of microbiology*. 2. vyd. Kentucky : William C Brown Publishing, 1996. 1298 s.

BEDNÁŘ, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. Praha : Marvil, 1996. 558 s.

BENNET, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 2008, roč. 153, č. 1, s. S347-S357.

BONNET, R. Growing Group of Extended-Spectrum b--Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*, 2004, roč. 48, č. 1, s. 1-14.

BRADFORD, P. Extended-spectrum- β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, roč. 14, č. 4, s. 933-951.

BUYNAK, J. D. Understanding the longevity of the b-lactam antibiotics and of antibiotic/b-lactamase inhibitor combinations. *Biochemical Pharmacology*, 2006, roč. 71, č. 7, s. 930-940.

DOLEJSKÁ, M. *Antibiotická rezistence a distribuce genů rezistence u izolátů Escherichia coli a koliformních bakterií z potravního řetězce člověka*. Brno : Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta. 2006. Diplomová práce.

DOUGHERTY, T. J.; BEAULIEU, D. a BARRETT, J. F. New quinolones and the impact on resistance. *Drug Discovery Today*, 2001, roč. 6, č. 10, s. 529-536.

DRLICA, K. a ZHAO, X. DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1997, roč. 61, č. 3, s. 377–392.

DURANTE-MANGONI, E. a kol. Do we still need the aminoglycosides? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2009, roč. 33, č. 3, s. 201-205.

FROLKOVÁ, P. *Antibiotická rezistence Enterococcus spp. u ferálních holubů*. Brno : Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta. 2010. Rigorózní práce.

GARCÍA-ÁLVAREZ, L. a kol. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2011, roč. 11, č. 8, s. 595–603.

- GIBREEL, A. a SKOLD, O. Sulfonamide Resistance in Clinical Isolates of *Campylobacter jejuni*: Mutational Changes in the Chromosomal Dihydropteroate Synthase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, roč. 43, č. 9, s. 2156–2160.
- GROHMAN, E.; MUTH, G. a ESPINOSA, M. Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, roč. 67, č. 2, s. 277-301.
- HALL, R. M. a COLLINS, C. M. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resistance Updates*. 1998, roč. 1, č. 2, s. 109-119.
- HANCOCK, R. E. W. a CHAPPLE, D. S. Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, roč. 43, č. 6, s. 1317-1323.
- HEINEMANN, J. A. How antibiotics cause antibiotic resistance. *Drug Discovery Today*, 1999, roč. 4, č. 2, s. 72-79.
- HILL, C. M. a kol. Specificity of Induction of the *vanA* and *vanB* Operons in Vancomycin-Resistant Enterococci by Telavancin. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*, 2010, roč. 54, č. 7, s. 2814–2818.
- HOOPER, D. C. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *The Lancet Infectious Diseases*, 2002, roč. 2, č. 9, s. 530-538.
- HRABÁK, J. a kol. Průkaz metalo- β -laktamáz (MBL) u gramnegativních bakterií. *ZPRÁVY CEM (SZÚ, PRAHA)*, 2007, roč. 16, č. 9, s. 417-422.
- HUDZICKI, J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. In: *Microbe Library* [online]. 2009 [vid. 2012-04-18]. Dostupné na [www: http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol](http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol).
- JACOBY, G. A. a MEDEIROS, A. A. More Extended-spectrum β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1991, roč. 35 č. 9, s. 1697-1704.
- JACOBY, G. A. β -Lactamase nomenclature. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2006, roč. 50, č. 4, s. 1123-1129.
- JULÁK, J. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006. 406 s.
- KOTRA, L. P. a MOBASHERY, S. β -Lactam antibiotics, β -Lactamases and bacterial resistance. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1998, roč. 96, č. 3, s. 139-150.

- KUMAR, A. a SCHWEIZER, H. P. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, roč. 57, č. 10, s. 1487-1502.
- LAMBERT, P. A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 2002, roč. 95, č. 41, s. 22-26.
- LAMBERT, P. A. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005, roč. 57, č. 10, s. 1472-1479.
- LETOURNEL-GLOMAUD, C. a kol. E-test antibiotics susceptibility of strict anaerobic bacteria. *Anaerobe* 9, 2003, roč. 9, č. 6, s. 281-284.
- MASKELL, J. P., SEFTON, A. a HALL, L. M. Mechanism of Sulfonamide Resistance in Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997, roč. 41, č. 10, s. 2121–2126.
- NIKAIDO, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, roč. 67 č. 4, s. 593-656.
- NITANAI, Y. a kol. Crystal Structures of the Complexes between Vancomycin and Cell-Wall Precursor Analogs. *Journal of Molecular Biology*, 2008, roč. 385, č. 5, s. 1422-1432.
- PAGE, M. I. Understanding Metallo β -Lactamases: A major role of zinc in these enzymes is to act as a Lewis acid rather than providing a nucleophile when hydrolyzing β -lactam antibiotics. *American Society For Microbiology* [online]. 2002 [cit. 2012-05-09]. Dostupné z www: <http://newsarchive.asm.org/may02/feature1.asp>.
- POLLACK, E. S. a POLLACK, C. V. Antibiotic use in emergency department: I. The penicillins and cephalosporins. *The Journal of Emergency Medicine*, 1996, roč. 14, č. 2, s. 213-222.
- SHAW, K. J. a kol. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Micribiological Reviews*, 1993, roč. 57, č. 1, s. 138-163.
- SCHWARZ, S. a CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*, 2001, roč. 32, č. 3-4, s. 201-225.
- SCHWEIZER, H. P. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genetics and Molecular Research*, 2003, roč. 2, č. 1, s. 48-62.

- SKÖLD, O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates*, 2000, roč. 3, č. 3, s. 155-160.
- STORM, D. R. Mechanisms of bacitracin action: a specific lipid-peptide interaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1974, roč. 235, s. 387-398.
- URBÁŠKOVÁ, P. *Rezistence bakterií k antibiotikům-vybrané metody*. Praha : Trios, 1998.
- VALDERAS, M. W. a kol. Examination of intrinsic sulfonamide resistance in *Bacillus anthracis*: A novel assay for dihydropteroate synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, roč. 1780, č. 5, 848–853.
- VAN BAMBEKE, F. a kol. Antibiotic Efflux Pumps. *Biochemical Pharmacology*, 2000, roč. 60, č. 4, s. 457-470.
- VETTING, M. W. a kol. A Bacterial Acetyltransferase Capable of Regioselective N-Acetylation of Antibiotics and Histones. *Chemistry & Biology*, 2004, roč. 11, č. 4, s. 565-573.
- VOLLMER, W. a BERTSCHE, U. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, roč. 1778, č. 9, s. 1714-1734.
- VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. vyd. Brno: Neptun, 2005. 351 s.
- WEBBER, M. A. a PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, roč. 51, č. 1, s. 9-11.
- WIEGAND, I., HILPERT, K. a HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 2008, roč. 3, č. 2, s. 163-175.
- WILLMOTT, C. J. R. a MAXWELL, A. A Single Point Mutation in the DNA Gyrase A Protein Greatly Reduces Binding of Fluoroquinolones to the Gyrase-DNA Complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1993, roč. 37, č. 1, s. 126-127.
- WRIGHT, G. D. Mechanisms of resistance to antibiotics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, roč. 7, č. 5, s. 563-569.

Zdroje obrázků

Obr. 1: Struktura buněčné stěny u grampozitivních a gramnegativních bakterií. Phoenix College, Arizona, USA [online]. [vid. 2012-06-14]. Dostupné z [www: http://www.pc.maricopa.edu/Biology/rcotter/BIO%20205/LessonBuilders/Chapter%204%20LB/cow95289_04_14.jpg](http://www.pc.maricopa.edu/Biology/rcotter/BIO%20205/LessonBuilders/Chapter%204%20LB/cow95289_04_14.jpg).

Obr. 2: Proces konjugace. Jones [online]. 2009 [vid. 2012-06-26]. Dostupné z [www: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Conjugation.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Conjugation.svg).

Obr. 3: Hlavní rodiny bakteriálních efluxních přenašečů u *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Lactobacillus lactis*. Schweizer, H. P. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genetics and Molecular Research*, 2003, roč. 2, č. 1, s. 48-62. Dostupné na [www: http://funpecr.com.br/gmr/year2003/vol1-2/imagens/sim0002fig1.jpg](http://funpecr.com.br/gmr/year2003/vol1-2/imagens/sim0002fig1.jpg).

Obr. 4: Mechanismus působení beta-laktamáz a metalobeta-laktamáz. [Betalaktamázy.cz](http://www.betalaktamazy.cz) [online]. [vid. 2012-06-14]. Dostupné z [www: http://www.betalaktamazy.cz/file.php/1/Poznatky/Mechanismus_betalakt.jpg](http://www.betalaktamazy.cz/file.php/1/Poznatky/Mechanismus_betalakt.jpg).

Obr. 5: Bujónová mikrodiluční metoda. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA [online]. [vid. 2012-06-14]. Dostupné z [www: http://www.cdc.gov/groupbstrep/images/lab-susceptibilityTest-lg.jpg](http://www.cdc.gov/groupbstrep/images/lab-susceptibilityTest-lg.jpg).

Obr. 6: Srovnání E-testu a diskového difúzního testu. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA [online]. [vid. 2012-06-14]. Dostupné z [www: http://www.cdc.gov/groupbstrep/images/lab-antimicrobial-lg.jpg](http://www.cdc.gov/groupbstrep/images/lab-antimicrobial-lg.jpg).