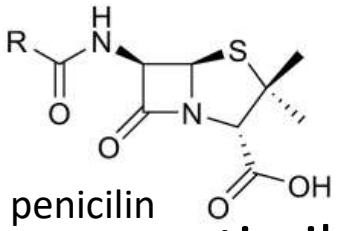
FAKULTA POTRAVINÁŘSKÉ
A BIOCHEMICKÉ TECHNOLOGIE
VŠCHT PRAHA

AKTUÁLNÍ POHLED NA ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE

Viviana Fuchsová, Kamila Zdeňková, Martina Boháčová, Kateřina Demnerová

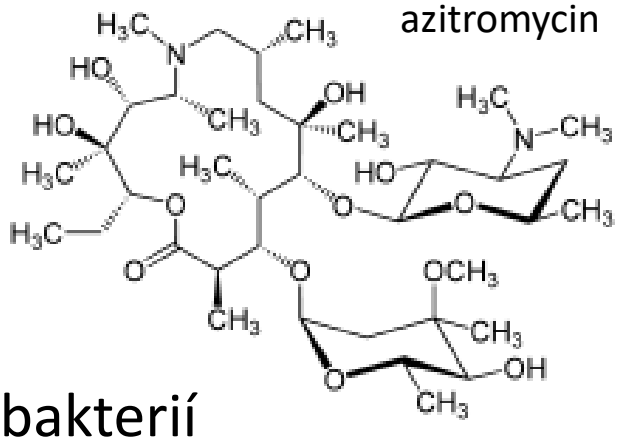


penicilin

Antibiotika

= antimikrobiální látky různé struktury a původu

- látky **přírodního původu** - sekundární metabolity mikromycet a některých bakterií
- látky připravené **chemickou syntézou**


azitromycin

Místo působení:

- syntéza buněčné stěny
- proteosyntéza
- syntéza nukleových kyselin
- cytoplazmatická membrána bakterií

Výsledný efekt:

- bakteriostatický
- baktericidní

Rozvoj rezistencí

- **rok 1928** objev penicilinu (první účinné ATB)
- **rok 1940** počátek „éry antibiotik“
- **současnost** známo přes 10 000 látek s antibiotickým účinkem

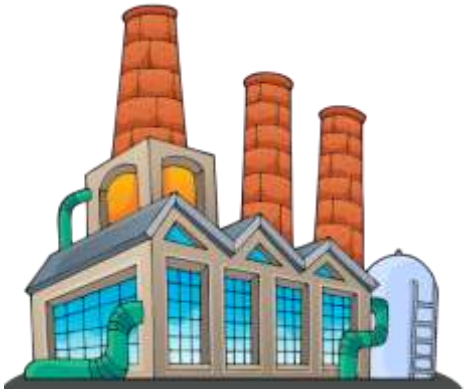
- **počátek existence bakterií** (před 3 miliardami lety) výskyt rezistentních forem
- **rok 2009** ARDB (Antibiotic Resistance Genes Database) zahrnuje 23 137 genů rezistence

Jeskyně Lechuguilla (Nové Mexiko)

- přes 4 miliony let izolovaná
- mikrobiom, zahrnující multirezistentní bakterie

Rozvoj rezistencí

příspěvek lidského působení

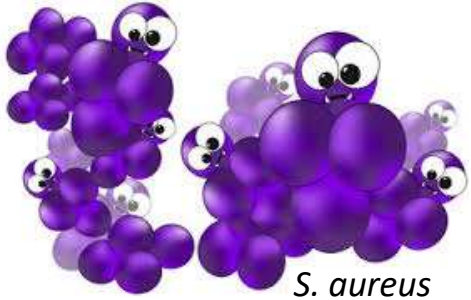


nadprodukce ATB

nadměrné a často neodůvodněné používání ATB

pacient předepsaná ATB nedobere

vysoký výskyt ATB v životním prostředí ve formě odpadu



S. aureus

Multirezistentní nozokomiální bakterie

gram negativní:

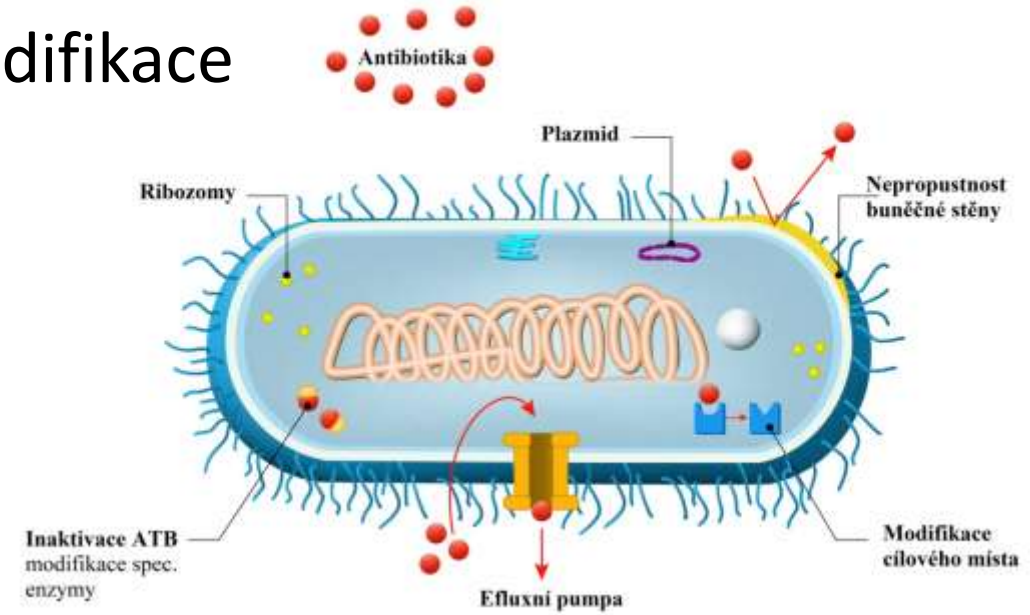
Mycobacterium tuberculosis, Acinetobacter baumannii, Burkholderia cepacia, Citrobacter freundii, Enterobacter spp., *Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Klebsiella pneumoniae, Proteus krabilis, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella* spp., *Serratia* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*

gram pozitivní:

Clostridium difficile, Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis a Streptococcus pneumoniae

Druhy známých rezistencí

- **rezistence vrozené**, tzv. primární
  - přirozeně znesnadněný přístup
  - absence cílového místa pro ATB
- **rezistence získané**, tzv. sekundární
  - molekulární modifikace



https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/wp-content/uploads/sites/9/2016/04/Mechanism-of-antibiotic-resistance-1.jpg

Existující druhy sekundární rezistence

- **modifikace specifickými enzymy**
  - metylace, acetylace, fosforylace, hydrolýzy, oxidace, redukce atd.

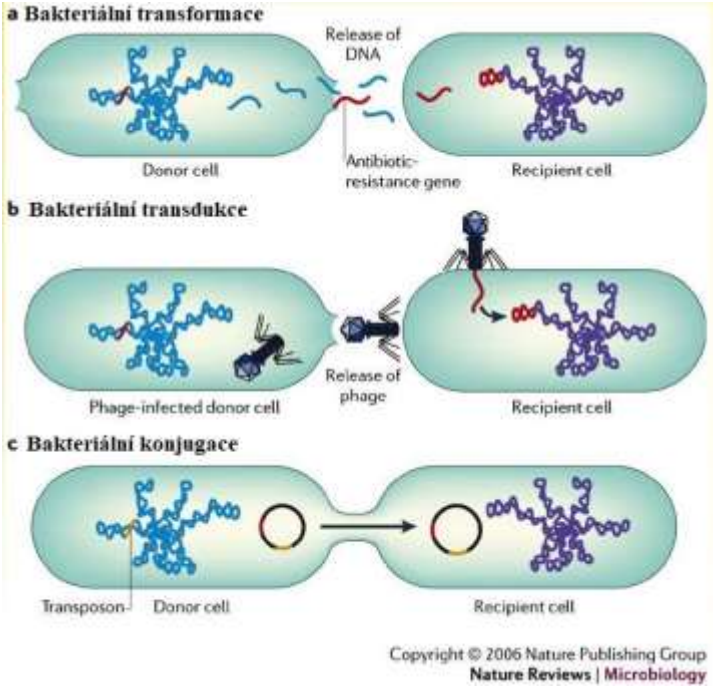
- **genové mutace**

  možný dopad na:
  - afinitu k antimikrobiální látce,
  - penetraci antibiotik do buňky
  - metabolickou dráhu léčiva
  - zvýšení počtu opravných mechanismů
  - narušení tvorby, funkce či struktury cíle

❖ **molekulární pumpy**

❖ **horizontální genový přenos (HGT)**

- plazmidy
- transpozony
- genovými kazetami



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

<u>Dopad subinhibičních koncentrací ATB</u>

- zvýšení konjugativního přenosu plasmidů *S. aureus* s tetracyklinovou rezistencí (β-laktámy)
- zvýšení frekvence přenosu multirezistentního transpozonu Tn 1545 z *Enterococcus faecalis* na *Listeria monocytogenes* (tetracyklin)

Stanovení citlivosti/rezistence některých bakteriálních kmenů ZL ÚBM VŠCHT Praha - disková difúzní metoda

Testované kmeny:

E. coli CCM 3954, CCM 4517, CCM 4787 (O157 avirulentní - neprodukuje shiga toxin a nemá bičíkový antigen)

L. monocytogenes EGDe (ATCC BAA-679), 129, 149, 156, 164, 165

S. aureus CCM 3953, MW2 (ATCC BAA-1707), 105, 816, 1241

Tab. 1. Výčet testovaných antibiotik a cílové místo jejich působení.

Skupina antibiotik	Místo působení	Vybraná ATB
β-laktámová	Syntéza buněčné stěny	Ampicilin ($Amp_{10\,\mu g}$) Penicilin ($PEN_{10\,\mu g}$) Piperacilin ($PIP_{100\,\mu g}$) Oxacilin ($OXA_{1\,\mu g}$) Cefoxitin ($CXT_{30\,\mu g}$) Methicilin ($MET_{5\,\mu g}$)
Glykopeptidy	Biosyntéza buněčné stěny	Vankomycin ($VAN_{30\,\mu g}$)
Aminoglykosidy	Proteosyntéza - 30S ribozomální podjednotky	Gentamicin ($GEN_{10\,\mu g}$)
Tetracykliny	Proteosyntéza - 30S ribozomální podjednotky	Tetracyklin ($TET_{30\,\mu g}$)
Makrolidy	Proteosyntéza - 50S ribozomální podjednotky	Erytromycin ($ERY_{15\,\mu g}$)
Fluorochionolony	Syntéza bakteriální DNA	Ciprofloxacin ($CIP_{5\,\mu g}$)
Pyrimidiny	Syntéza nukleových kyselin	Trimethoprim ($TRI_{5\,\mu g}$)

Tab. 2. Bakteriální kmeny s detekcí rezistence k ampicilinu anebo penicilinu.

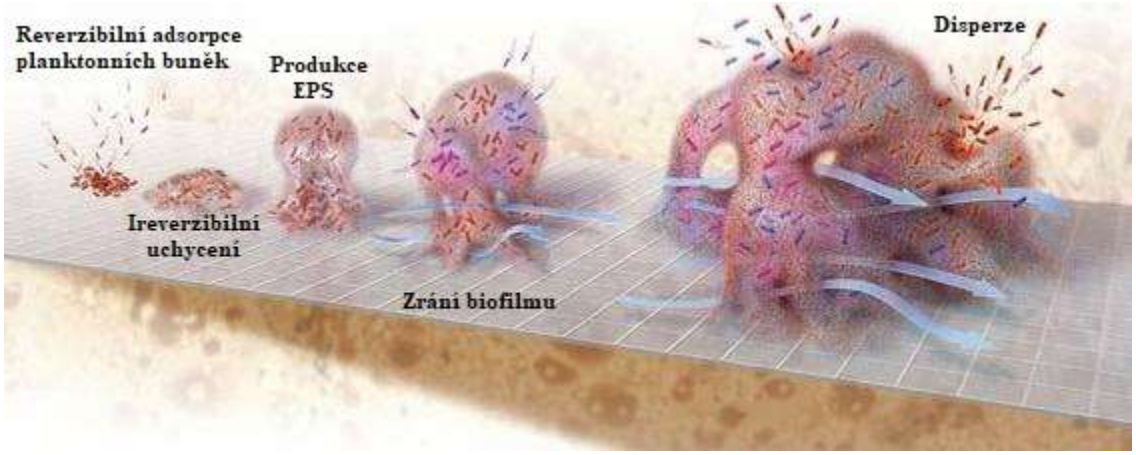
Druh antibiotika	Bakteriální druh	Bakteriální kmeny
$Amp_{10\mu g}$	*S. aureus*	MW2, 1241
	E. coli	IV
$PEN_{10\mu g}$	*S. aureus*	MW2, 1241
	E. coli	CCM 3954, CCM 4517, CCM 4787 (avirulentní kmen 0157), IV

Úloha biofilmů v rezistencích

- mnohobuněčné konsorcium mikroorganismů, adherované k určitému povrchu
- obaleno matricí – voda a komplex extracelulárních polymerních substancí (angl. extracellular polymeric substances, EPS)

složení EPS:

- ❖ polysacharidy
- ❖ proteiny
- ❖ lipidy
- ❖ kovové ionty
- ❖ extracelulární DNA (eDNA)



Obr. 1. Rozdílná stádia růstu biofilmu. Costerton J. W., Stoodley P.: *Dimensions of Dental Hygiene.* 2003. 1, 36-38 (2003).

Problémy a nebezpečí spojené s biofilmy

- změny fenotypu a fyziologie, vysoká stabilita a rezistence
  => **obtížná detekce a degradace**
- biofilm tvoří většina bakterií - i **bakterie patogenní**
- **výskyt na různorodých površích**:
  zdravotních pomůcek a průmyslových pracovních ploch =>
  - kontaminace a kažení potravin
  - alimentární intoxikace
  - chronická onemocnění

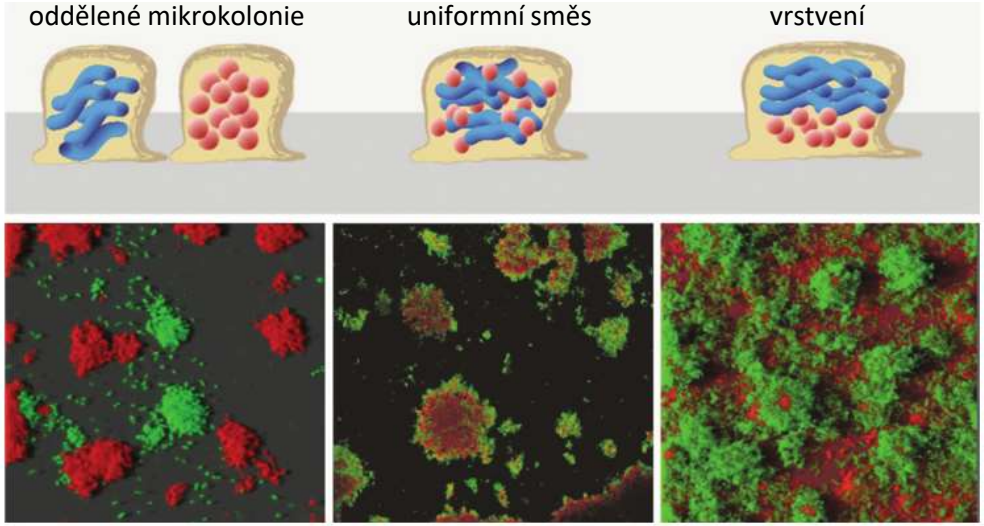
Biofilmové rezistence

- **Neustálý tok nutrientů a změny chemického mikroprostředí**

- **Soužití více druhů mikroorganismů,**

  více-druhové biofilmy a srovnání s jedno-druhovými

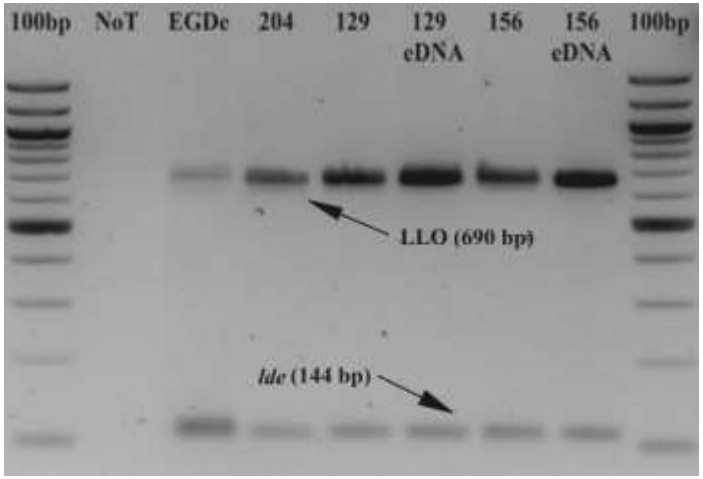
  - více komplexní
  - více divergentní
  - více stabilní
  - více virulentní
  - více rezistentní



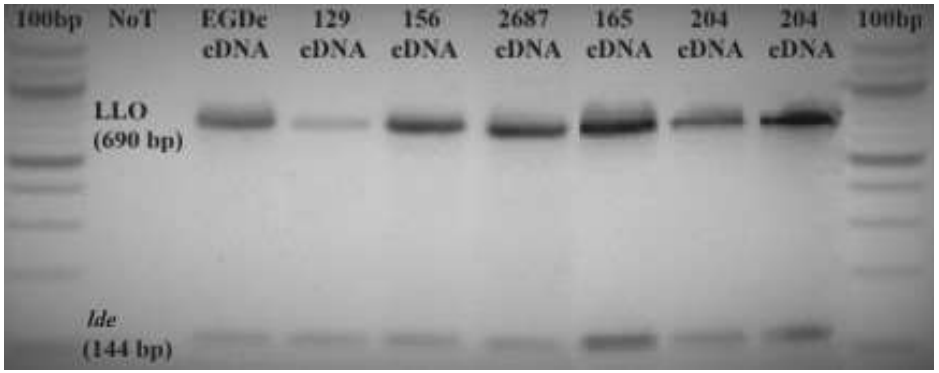
Obr. 2: Druhy prostorového uspořádání vícedruhových biofilmů. Elias S., Banin E.: *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 990 (2012).

- **Existence řady přímých a nepřímých interakcí**
  - kooperace druhů:
    - kometabolismus
    - kokolonizace (*L. monocytogenes/L. lactis*)
    - koagregace (*S. aureus*/*P. aeruginosa*)
    - koinfekce (*C. albicans*/*S. aureus, S. aureus*/*P. aeruginosa*)
    - koexistence (aerobní bakterie/anaerobní bakterie)
  - kompetice - boj o živiny, produkce toxických látek, změna pH
  - reakce signálních molekul systému quorum sensing
  - HGT přenos – účast i eDNA

a



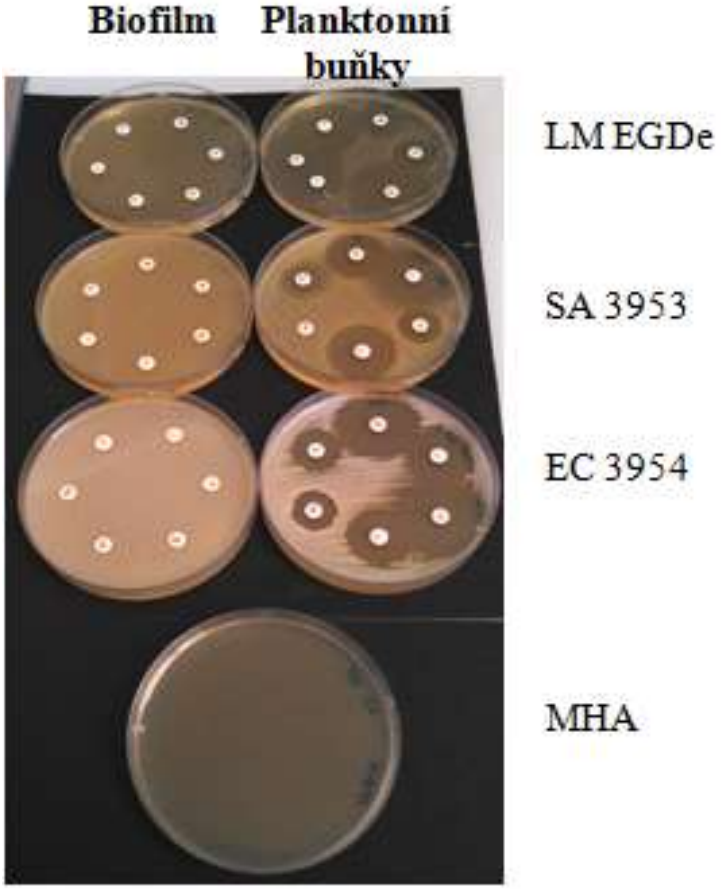
b



Obr. 3. Průkaz přítomnosti úseků genu *lde* a genu proteinu listeriolysinu O (LLO), specifického pro *L. monocytogenes*. Pořadí vzorků z leva doprava: **a** Genomová DNA *L. monocytogenes* kmenů EGDe, 204, 129 a 156. Pro kmeny 129 a 156 byla testována i eDNA (více vpravo). **b** eDNA *L. monocytogenes* kmenů EGDe, 129, 156, 2687, 165 a 204

- **snížená penetrace antibiotik**
  - díky elektrostaticky nabité matrici
  - bariéra, daná společným soužitím mikrobů (*S. aureus*/*C. albicans*)

- **cílená syntéza mobilních elementů**
  - např. membránových torz fosfolipidů



Obr. 4. Mueller - Hinton Agar No. 2 (MHA) s aplikovanými disky vybraných antibiotik ($TET_{30\ \mu g}$, $GEN_{10\ \mu g}$, $VAN_{30\ \mu g}$, $TRI_{5\ \mu g}$, $Amp_{10\ \mu g}$, $CIP_{5\ \mu g}$) na planktonní buňky (sloupec vpravo) a 24 h biofilm (sloupec vlevo) bakterie *L. monocytogenes*, *S. aureus* a *E. coli* (v pořadí ze shora dolů). Spodní Petriho miska na fotografii znázorňuje prázdné médium.

Antibiotická bakteriální rezistence - závěr

= jeden z hlavních celosvětových problémů

- příčina úmrtí 700 000 lidí ročně
- stoupající trend výskytu rezistentních mikroorganismů, nárůstu multirezistentních kmenů a počtu antibiotiky neléčitelných onemocnění

Alternativy léčby:

- fágová terapie
- stimulace imunity
- modifikované protilátky

Děkuji za pozornost!