

Oporność bakterii na antybiotyki



PIOTR MARCINIAK

Studenckie Koło Naukowe
Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej
Wydział Farmaceutyczny
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie:

Systematycznie rosnąca liczba szczepów opornych na antybiotyki stwarza problem dla współczesnej terapii zakażeń. Plazmidy bakteryjne stanowią główne źródło ruchomych elementów genetycznych, które wraz z transpozonomami, integronami i kasetami genowymi odpowiadają za rozprzestrzenianie się oporności na antybiotyki. Enzymatyczna hydroliza i modyfikacja cząsteczki antybiotyku, a także efluks i reakcja „by-pass” stanowią najczęściej spotykane mechanizmy oporności, które dzięki horyzontalnemu transferowi genów szybko rozprzestrzeniają się wśród szczepów.

Słowa kluczowe:

oporność, ruchome elementy genetyczne

Summary:

Today's infection therapy has problems with resistant strains which number are still increase. Bacterial plasmids are principal mobile genetic elements which work with transposones, integrones and gene boxes. All of them are involve in propagation of antibiotic resistance. Enzymatic hydrolysis, enzymatic molecule modification, efflux and "by-pass" reaction are the most common mechanism of resistance which propagate horizontal gene transfer.

Key words:

antibiotic resistance, mobile genetic elements

Systematycznie rosnąca liczba szczepów bakterii klinicznych opornych na antybiotyki stwarza coraz większy problem dla lekarzy zajmujących się antybiotykoterapią. Skalę problemu doskonale pokazują statystyki, które mówią, że obecnie w Stanach Zjednoczonych 70 proc. szczepów bakterii związanych z zakażeniami szpitalnymi (zakażeniami wykrytymi po czterdziestu ośmiu godzinach od momentu przyjęcia na oddział) jest opornych na co najmniej jeden lek wykorzystywany wcześniej w leczeniu danej bakterii. To konsekwentnie i systematycznie kieruje antybiotykoterapię w ślepy zaułek, grożący zakończeniem ery antybiotyków [3].

Wszystko zaczęło się na przełomie lat czterdziestych i pięćdziesiątych dwu-

Plazmidy bakteryjne stanowią główne źródło ruchomych elementów genetycznych odpowiedzialnych za rozprzestrzenianie się oporności na antybiotyki.

dziesiątego wieku podczas badań prowadzonych na *Escherichia coli*, kiedy uważano, że po wymieszaniu dwóch szczepów różniących się kilkoma cechami można wyselekcjonować osobniki posiadające własności obu populacji jednocześnie. Innymi słowy, musiało istnieć sposób, w jaki komórki bakterii przekazywały między sobą informacje dotyczące ich cech i właściwości. Przypuszczenia o istnieniu czynnika genetycznego pozwalającego na transfer genów między różnymi osobnikami potwierdziły się dziesięć lat później w czasie epidemii czerwonki w Japonii, gdzie udowodniono, że owe czynniki są odpowiedzialne za błyskawiczne rozprzestrzenianie się tzw. wielorakiej oporności na antybiotyki [2].

W 1952 roku Joshua Lederberg po raz pierwszy użył terminu *plazmid* określając nim wszystkie znane pozachromosomowe cząsteczki genetyczne włączając w to wirusy, pasożyty, organelle. Z czasem wraz z postęпами mikrobiologii uściślono tę definicję, która obecnie charakteryzuje plazmid jako autonomiczny, pozachromosomowy element genetyczny występujący przede wszystkim u bakterii. Plazmidowy DNA zwykle nie koduje kluczowych cech i funkcji zapewniających przeżycie komórce w typowych warunkach, a więc najczęściej nie jest obligatoryjnym elementem wyposażenia komórki bakteryjnej determinującym jej stabilny wzrost i rozwój [15]. Powstaje pytanie, co komórka bakteryjna może dostać w zamian za zapewnienie plazmidowi pakietu enzymów niezbędnych mu do replikacji (kopiowania DNA), których produkcja jest energochłonna i znacznie obciąża metabolizm bakterii [11]. Odpowiedź brzmi: geny

oporności, które pozwolą drobnoustrojom przeciwstawić się presji wywieranej przez antybiotyki.

Mechanizmy oporności

Antybiotyk oddziałuje na różne elementy strukturalne drobnoustrojów począwszy od ściany i błony komórkowej poprzez enzymy uczestniczące w metabolizmie komórki, a skończywszy na rybosomach odpowiedzialnych za biosyntezę białka. Posiadanie plazmidu niosącego geny oporności daje szansę drobnoustrojowi na przeżycie i przekazanie swoich cech kolejnym generacjom. Aby lepiej zdefiniować i pokazać warianty obrony przed antybiotykami, wyróżniono cztery podstawowe grupy mechanizmów oporności:

- **enzymatyczna hydroliza cząsteczki antybiotyku** powoduje inaktywację antybiotyku poprzez zmianę struktury pierścienia substancji leczniczej np.: hydrolityczny rozkład antybiotyków β -laktamowych (penicylin, cefalosporyn, karbapenemów) przez β -laktamazy (wspomniane wyżej enzymy hydrolityczne wytwarzane m.in. przez *Pseudomonas aeruginosa*, co stanowi najbardziej rozpowszechniony i groźny mechanizm oporności wykształcony przez pałeczkę ropy błękitnej odpowiedzialnej za zakażenia dróg moczowych, dróg oddechowych, kości, opon mózgowo-rdzeniowych, a także wywoływanie posocznicy) [7]. Jest to duży problem powodujący coraz mniejszą użyteczność terapeutyczną β -laktamów uchodzących za najbezpieczniejsze antybiotyki, które z wyjątkiem nielicznych reakcji anafilaktycznych nie dawały poważniejszych działań niepożądanych [5]

● **enzymatyczna modyfikacja cząsteczki antybiotyku** szczególnie osłabiająca działanie aminoglikozydów, których cząsteczka pod wpływem enzymów bakteryjnych ulega podstawieniu grupą acetylową lub adenylową uniemożliwiając oddziaływanie antybiotyku na mniejszą podjednostkę rybosomu i hamowanie biosyntezy białek bakteryjnych [10]. Podobny mechanizm dotyczy chloramfenikolu, blokującego syntezę białka poprzez oddziaływanie na większą podjednostkę rybosomu.

● **efluks** (ang. **efflux**), polegający na aktywnym usuwaniu antybiotyku z komórki za pomocą specyficznej pompy,

replikacji. Aby utrzymać się wewnątrz komórki bakteryjnej i nie zostać wyeliminowanymi w czasie jej podziałów muszą ulokować się (transponować) do chromosomu lub plazmidu [9]. Dopiero wtedy geny oporności obecne na transpozonie mogą ulec ekspresji. Między komórkami, transpozony przemieszczają się zwykle na drodze koniugacji tworząc koliste struktury przypominające plazmidy lub będąc elementami plazmidów. Proces ten przebiega na drodze bezpośredniego kontaktu komórki z komórką za pośrednictwem mostka, przez który następuje wymiana materiału genetycznego [14].

nizmów kontrolujących ich przemieszczania w obrębie elementów genetycznych bakterii, przez co są bardzo dynamiczne. Liczba kaset genowych znajdujących się w obrębie integronu jest ściśle związana z selekcją szczepów opornych na antybiotyki [6].

Horizontalny transfer genów

Klasycznym sposobem na przekazywanie genów jest transfer wertykalny polegający na nabywaniu genów od „rodziców” w wyniku różnego typu rozmnażania. Bakterie wykształciły i rozbudowały tzw. horizontalny transfer genów (HTG) zachodzący pomiędzy osobnikami nie spokrewnionymi [2]. Jak pokazują dotychczasowe doniesienia ma on praktycznie nieograniczony zasięg (zachodzi między gatunkami, rodzajami, a nawet pomiędzy bakteriami Gram-dodatnimi i Gram-ujemnymi) prowadząc coraz częściej do nabywania oporności na wiele antybiotyków [9]. Najgroźniejszym wariantem HTG jest proces koniugacji, który zachodzi szybko i z dużą wydajnością. Może to prowadzić do wyposażenia ogromnej liczby bakterii w całe zestawy elementów genetycznych zawierających geny oporności. Pozostałe warianty HTG (transformacja i transdukcja) wymagają specjalnych warunków i mają znikome znaczenie dla rozwoju oporności [2].

Selekcja opornych szczepów

Za główny czynnik rozwoju oporności uważa się nadmierne przyjmowanie antybiotyków przepisanych bez uzasadnionych wskazań [4], często pod presją pacjenta, który wymusza na lekarzu pierwszego kontaktu przepisanie leku w wątpliwej sytuacji wymagającej obserwacji. Problem ten dotyczy przede wszystkim wirusowych zakażeń górnych dróg oddechowych, które powszechnie mylnie są diagnozowane jako zakażenia bakteryjne. Jeśli kaszel trwa krócej niż 14 dni i początkowo towarzyszy mu wysoka gorączka, znikome wydzielanie wydzielin, a nasilenie objawów choroby następuje w godzinach wieczornych, to najprawdopodobniej mamy do czynienia z infekcją wirusową wymagającą jedynie leczenia objawowego [13]. Lekarz musi więc zwrócić na to szcze-



eliminującej antybiotyku z wnętrza komórki. Omawiany mechanizm szczególnie dotkliwie dotyczy chorych poddawanych terapii tetracyklinami, aktywnie usuwanymi za pomocą kilkudziesięciu różnych pomp białkowych, które do pracy wymagają energii pochodzącej z rozpadu wysokoenergetycznych wiązań fosforowych w ATP albo działają na zasadzie syn- lub antyportera cząstek [12]

● **reakcja „by-pass”** – wytworzenie alternatywnego szlaku metabolicznego, który został zablokowany przez substancję leczniczą. Dla takich chemioterapeutyków jak sulfonamidy i trimetoprim szczególnie charakterystyczna jest modyfikacja szlaku biosyntezy kwasu foliowego niezbędnego do syntezy tymidyny będącej budulcem DNA [2].

Opisane mechanizmy posiadają wiele odmian i modyfikacji, które dodatkowo utrudniają skuteczną terapię i walkę z opornymi drobnoustrojami.

Plazmidy, choć powszechne w świecie bakterii, nie posiadają wyłączności na przenoszenie genów oporności. Transpozony odkryte u bakterii w latach sześćdziesiątych przez Barbarę McClintock, posiadają umiejętność przemieszczania się w obrębie cząsteczki DNA. W odróżnieniu od plazmidów, transpozony nie są zdolne do niezależnej

Integrony stanowią stosunkowo nową grupę ruchomych elementów genetycznych odkrytą w 1989 roku. Unikalną własnością integronów jest umiejętność wylapywania tzw. kaset genowych i włączania ich do swojej struktury dzięki obecności enzymu – integrazy. Może to prowadzić do skumulowania wielu genów kodujących rozmaite mechanizmy oporności na krótkim odcinku DNA. Dzięki obecności promotora, informacja genetyczna umieszczona na integronie może ulec ekspresji. Pewnym utrudnieniem jest brak możliwości samoprzenoszenia między cząsteczka-

Prowadząc racjonalną antybiotykoterapię oraz zmniejszając szanse drobnoustrojów na tworzenie rezerwuarów wzajemnej wymiany informacji można zminimalizować transfer genów oporności

mi DNA, ale dzięki możliwości przyłączenia do plazmidu lub transpozonu, integrony stają się mobilne [16].

Wspomniane wyżej kasety genowe są najmniejszymi znanymi ruchomymi elementami genetycznymi. Zawierają pojedyncze geny. Nie posiadają mecha-

gólną uwagę podczas wywiadu i przepisywania leków, a farmaceuta podczas rozmowy z pacjentem w aptece, wybierając jeden z dwóch wariantów: samo-leczenie lub skierowanie pacjenta do konsultacji lekarskiej.

Innym niepokojącym problemem jest przerwanie terapii pod wpływem ustania najbardziej uporczywych objawów takich jak np.: gorączka [8], co uniemożliwia całkowitą eliminację patogenu.

Podobny negatywny efekt występuje przy stosowaniu zbyt niskich dawek antybiotyku, co uniemożliwia osiągnięcie stężenia terapeutycznego gwarantującego całkowite wyleczenie. W konsekwencji drobnoustroje uzyskują czas na wykształcenie mechanizmów oporności i skuteczny transfer genów między różnymi osobnikami [9].

„Koszt” antybiotykooporności dla bakterii

Posiadanie wielu genów oporności na antybiotyki bywa niekiedy zgubne dla drobnoustrojów. W momencie braku presji antybiotycznej, ekspresja genów niosących oporność staje się balastem obciążającym metabolizm komórki, prowadzącym do upośledzenia wzrostu drobnoustrojów w porównaniu z bakteriami wrażliwymi, nie zawierającym genów oporności na antybiotyki [1]. Szczególnie kłopotliwe są geny kodowane na plazmidach występujących niekiedy w ogromnej liczbie kopii, co wymaga od komórki gospodarza wydatkowania dużej dawki energii zużywanej na cały aparat enzymatyczny uczestniczący w transkrypcji i translacji [11].

Podsumowanie

Powyższe opracowanie nakreśla udział ruchomych elementów gene-

tycznych w rozwoju oporności na antybiotyki. Prowadząc racjonalną antybiotykoterapię oraz zmniejszając szanse drobnoustrojów na tworzenie rezerwuarów wzajemnej wymiany informacji można zminimalizować transfer genów oporności oddalając problem braku skutecznych i bezpiecznych antybiotyków.

PIOTR MARCINIAK
marciniakpiotr@poczta.onet.pl

Bibliografia:

- [1] ANDERSSON D.I., LEVIN B.R. *The biological cost of antibiotic resistance* Curr. Opin. Microbiol. 2, 489-493 (1999)
- [2] BAJ J., MARKIEWICZ Z. *Biologia molekularna bakterii* Wyd. Naukowe PWN Warszawa (2006)
- [3] GILMAN A., GOODMAN L. *Farmakologia Goodmana & Gilmana* Wyd. Czelej (2007)
- [4] GOULD I.M. *A review of the role of antibiotic policies in the control of antibiotic resistance* J. Antimicrob. Chemother. 43, 459-465 (1999)
- [5] JANIEC W., KRUPIŃSKA J. *Farmakodynamika Podręcznik dla studentów farmacji* Wyd. Lekarskie PZWL Warszawa (2002)
- [6] KAWALEC M. *Poszukiwanie i analiza plazmidów i integronów w nieklinicznych szczepach Enterobacteriaceae* Praca Magisterska Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM Warszawa (2008)
- [7] LAUDY A.E., STAROŚCIAK B.J. *β-laktamazy pałeczek z rodziny pseudomonadaceae* Postępy mikrobiologii 39, 99-132 (2000)
- [8] LECLERCQ R. *Safeguarding future antimicrobial options: strategies to minimize resistance* Clin. Microbiol. Infect. 7 (Suppl. 3), 18-23 (2001)
- [9] MARKIEWICZ Z., KWIATKOWSKI Z.A. *Bakterie, antybiotyki, lekooporność* Wyd. Naukowe PWN Warszawa (2006)
- [10] MINGEOT-LECLERCQ M.P., GLUBCZYŃSKI Y., TULKENS P.M. *Aminoglycosides: activity and resistance* Antimicrob. Agnet Chemother. 43, 727-737 (1999)
- [11] POTRYKUS J. *Oporność na antybiotyki związana z genami obecnymi na plazmidach* Kosmos 3(256): 331-342 (2002)

[12] ROBERTS M.C. *Tetracycline resistance determinants: mechanism of action, regulation of expression, genetic mobility and distribution* FEMS Microbiol. Rev. 19, 1-24 (1996)

[13] RUTTER P. *Opieka farmaceutyczna. Objawy, rozpoznanie i leczenie* Wyd. Urban & Partner Wrocław (2006)

[14] TOUSSAINT A., MERLIN C. *Mobile elements as a combination of functional modules* Plasmid 47, 26-35 (2002)

[15] WŁODARCZYK M. *Co to jest plazmid?* Kosmos 3(256): 231-240 (2002)

[16] WOLINOWSKA R., MASNY A., PŁUCIENICZAK A. *Integrony* Kosmos 3(256) 353-364 (2002)

Pytania testowe

(Zaznacz jedną prawidłową odpowiedź)

1. Ruchomym elementem genetycznym spotykanym wśród bakterii nie jest:

- a) plazmid
- b) transpozon
- c) efluks
- d) kasetta genowa

2. Podstawowym mechanizmem odpowiedzialnym za rozwój oporności na sulfonamidy jest:

- a) enzymatyczna hydroliza antybiotyku
- b) efluks
- c) enzymatyczna modyfikacja antybiotyku
- d) reakcja „by pass”

3. Najmniejszymi znanymi ruchomymi elementami genetycznymi są:

- a) kasety genowe
- b) plazmidy
- c) integrony
- d) transpozony

4. Prawdą jest że:

- a) plazmidy występują w każdej komórce bakteryjnej
- b) Barbara McClintock po raz pierwszy użyła terminu plazmid
- c) plazmidy nie kodują enzymów modyfikujących cząsteczkę antybiotyku
- d) najgroźniejszym wariantem HTG jest proces koniugacji

(Odpowiedzi szukaj w numerze)

Zasady publikowania artykułów naukowych w „Gazecie Farmaceutycznej”

- Publikowane są artykuły z zakresu farmacji i medycyny
- Prace zgłaszane do druku winny zawierać: cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, wykaz piśmiennictwa
- Prace powinny być zaopatrzone w krótkie streszczenie i zbiór podstawowych słów kluczowych w języku polskim i angielskim
- Objętość pracy nie może przekraczać 20 tys. znaków, łącznie z tabelami, wykresami i piśmiennictwem
- Piśmiennictwo może zawierać co najwyżej 20 pozycji najistotniejszych dla publikowanej pracy, ułożonych wg kolejności cytowań z odpowiednio ponumerowanymi odsyłaczami, zgodnymi z zamieszczonymi w tekście
- Prace (tekst, tabele, rysunki, fotografie) powinny być przesłane w formie elektronicznej, opatrzone następującymi danymi: nazwisko i imię, stopień naukowy i stanowisko, miejsce pracy, nr telefonu/faksu/e-mail, adres do korespondencji. Ponadto powinna być załączona zgoda autorów na opublikowanie pracy w wersji elektronicznej „Gazety Farmaceutycznej”
- Nadesłane prace recenzowane są anonimowo przez niezależnych ekspertów
- Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzania sródtytułów, niezbędnych poprawek stylistycznych i ew. zmniejszania objętości lub niepublikowania nadesłanych materiałów
- © Gazeta Farmaceutyczna.