

ANTYBIOTYKI I BAKTERIE: MECHANIZMY DZIAŁANIA I STRATEGIE OPORNOŚCI

Magdalena Skarżyńska*, Magdalena Zając, Dariusz Wasyl

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy, Polska

Wpłynęło w sierpniu, zaakceptowano w grudniu 2019 r.

Streszczenie: Oporność bakterii na substancje przeciwbakteryjne jest jednym z najistotniejszych problemów epidemiologicznych notowanych w skali globalnej. Powszechne stosowanie w medycynie i weterynarii substancji przeciwbakteryjnych należących do tych samych klas, niejednokrotnie bez potwierdzenia w laboratorium skuteczności zastosowanej substancji czynnej, przyczynia się do selekcji opornych bakterii u ludzi i zwierząt oraz ich rozprzestrzenienia w przyrodzie. Narastająca antybiotykooporność bakterii patogennych prowadzi do poważnych konsekwencji zarówno dla zdrowia ludzi jak i zwierząt. Równie ważna jest oporność bakterii komensalnych, gdyż stanowią one rezerwuar i wektor genów oporności w środowisku. Ekspozycja na środki przeciwbakteryjne należące do różnych klas może prowadzić do oporności krzyżowej i selekcji genów rozprzestrzeniających się horyzontalnie z udziałem ruchomych elementów genetycznych. Alarmujący jest fakt pojawienia się przenoszonej z udziałem plazmidów oporności na substancje o najwyższym poziomie istotności dla medycyny ludzkiej np. karbapenemy czy polimyksyny. Na przykładzie antybiotyków zaliczanych do kategorii „krytycznie istotnych” możliwe jest omówienie niemal wszystkich sposobów działania substancji przeciwbakteryjnych oraz bakteryjnych mechanizmów antybiotykooporności. Do efektywnej walki z rosnącą antybiotykoopornością bakterii niezbędna jest znajomość mechanizmów oporności oraz sposobów ich nabywania przez bakterie. Celem artykułu jest przegląd sposobów w jaki substancje krytycznie istotne z punktu widzenia ochrony zdrowia publicznego działają na komórki bakteryjne oraz przedstawienie złożonych mechanizmów, które odpowiadają za oporność na te substancje oraz genów warunkujących pojawienie się oporności.

1. Wprowadzenie. 2. Substancje przeciwbakteryjne powodujące utratę integralności ściany komórkowej: β -laktamy, glikopeptydy oraz pochodne kwasu fosfonowego. 2.1. Mechanizmy działania substancji przeciwbakteryjnej. 2.2. Mechanizmy oporności. 3. Substancje przeciwbakteryjne wpływające na błony komórek bakteryjnych: polimyksyny i lipopeptydy. 3.1. Mechanizmy działania substancji przeciwbakteryjnej. 3.2. Mechanizmy oporności. 4. Substancje przeciwbakteryjne hamujące syntezę kwasów nukleinowych: chinolony i ansamycyny. 4.1. Mechanizmy działania substancji przeciwbakteryjnej. 4.2. Mechanizmy oporności. 5. Substancje przeciwbakteryjne hamujące syntezę białek: makrolidy, ketolidy, aminoglikozydy, glicylcykliny, oksazolidynony. 5.1. Mechanizmy działania substancji przeciwbakteryjnej. 5.2. Mechanizmy oporności. 6. Podsumowanie

ANTIBIOTICS AND BACTERIA: MECHANISMS OF ACTION AND RESISTANCE STRATEGIES

Abstract: The resistance of bacteria to antimicrobial substances is one of the most serious epidemiological problems present on a global scale. The widespread use of same classes of antimicrobials in human and veterinary medicine, often without laboratory confirmation of the efficacy of active compounds used, contributes to the selection of resistant bacteria in humans and animals, and their spread in nature. The increasing resistance of pathogenic bacteria leads to serious consequences for both human and animal health. However, the resistance of commensal bacteria is equally important as they constitute a reservoir and vector of resistance determinants in the environment. Exposure to antimicrobials belonging to different classes can lead to cross-resistance and the selection of genes that may spread horizontally on mobile genetic elements. The emergence of plasmid-encoded resistance to critically important antibiotics for human medicine e.g. carbapenems or polymyxins is alarming. On the example of antibiotics classified as critically important for human medicine, it is possible to discuss almost all bacterial mechanisms of antimicrobial resistance. For effective combat against the growing antibiotic resistance of bacteria, it is necessary to know the mechanisms of resistance and the methods of their acquisition by bacteria. The aim of the paper is to review the ways that critically important antimicrobials act on bacterial cells and present complex mechanisms that are responsible for resistance to these substances as well as genes conferring for resistance.

1. Introduction. 2. Antimicrobials that cause loss of cell wall integrity: β -lactams, glycopeptides and phosphonic acid derivatives. 2.1. Mechanisms of antimicrobial action. 2.2. Mechanisms of resistance. 3. Antimicrobials affecting the cell membrane: polymyxins and lipopeptides. 3.1. Mechanisms of antimicrobial action. 3.2. Mechanisms of resistance. 4. Antimicrobial substances that inhibit the synthesis of nucleic acids: quinolones and ansamycins. 4.1. Mechanisms of antimicrobial action. 4.2. Mechanisms of resistance. 5. Antimicrobial substances inhibiting protein synthesis: macrolides, ketolides, aminoglycosides, glycyclines, oxazolidinones. 5.1. Mechanisms of antimicrobial action. 5.2. Mechanisms of resistance. 6. Summary

Słowa kluczowe: antybiotyki, geny oporności, mechanizmy oporności, oporność na antybiotyki
Key words: antibiotics, resistance genes, resistance mechanisms, antimicrobial resistance

* Autor korespondencyjny: mgr Magdalena Skarżyńska, Zakład Mikrobiologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: magdalena.skarzynska@piwet.pulawy.pl

1. Wprowadzenie

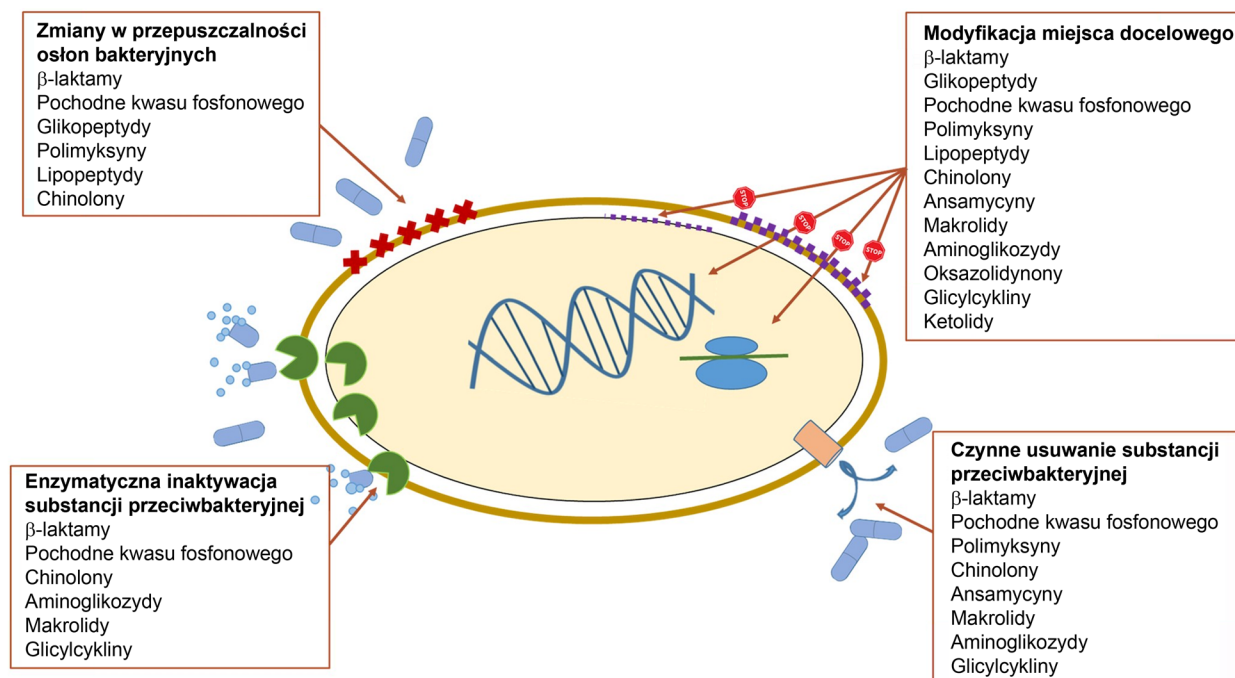
Oporność bakterii na substancje przeciwbakteryjne jest jednym z najistotniejszych problemów epidemiologicznych notowanych w skali globalnej. Każdego roku jest ona przyczyną nawet 700 000 zgonów na świecie [74]. Na podstawie danych z 2015 roku oszacowano, że niepowodzenia w leczeniu zakażeń wywołanych przez wielooporne bakterie są powodem 33 000 przypadków śmiertelnych na terenie Unii Europejskiej (UE) i Europejskiego Obszaru Gospodarczego (EOG) (European Economic Area, EEA) [19]. Straty ekonomiczne związane z tego typu infekcjami w UE opiewają na 1,5 miliarda Euro, natomiast związane z nimi koszty hospitalizacji w samych Stanach Zjednoczonych wynoszą w ciągu roku 20 miliardów USD [22, 33].

Istnieją niezaprzeczalne dowody potwierdzające negatywne konsekwencje powszechnego stosowania substancji przeciwbakteryjnych w medycynie, rolnictwie i weterynarii, które przyczynia się do selekcji opornych bakterii oraz ich rozprzestrzenienia i utrzymywania w środowisku. Występowanie determinant oporności i łatwość ich transmisji między bakteriami w konsekwencji prowadzi do ograniczenia możliwości terapeutycznych wielu zakażeń bakteryjnych. Szczególnie istotna jest oporność patogenów powodujących infekcje o wysokim wskaźniku śmiertelności jak np. *Klebsiella (K.) pneumoniae*, *Pseudomonas (P.) aeruginosa* czy *Acinetobacter (A.) baumannii* [82, 106]. Warto podkreślić znaczenie bakterii komensalnych w szere-

niu oporności na substancje przeciwbakteryjne. Nie tylko są one rezerwuarem i wektorem mechanizmów oporności, ale same mogą również stanowić zagrożenie np. dla osób z obniżoną odpornością.

Substancje przeciwbakteryjne mogą działać bakteriostatycznie lub bakteriobójczo. W zależności od klasy, do której należą powodują zaburzenia integralności ściany lub błony komórkowej, zahamowanie syntezy kwasów nukleinowych, białek lub zakłócają szlaki metaboliczne. Bakterie wykształciły liczne mechanizmy, dzięki którym stają się odporne na substancje przeciwbakteryjne. Polegają one na modyfikacjach miejsca działania leku, zmianach w przepuszczalności osłon komórkowych, aktywnym wypompowywaniu cząsteczek substancji przeciwbakteryjnej, wytwarzaniu specyficznych enzymów zdolnych do „unieszkodliwienia” antybiotyku lub zmianie szlaków metabolicznych, na które wpływa dana substancja czynna [95]. Mechanizmy te przedstawiono schematycznie w ryc. 1.

Współcześnie, jednym z największych wyzwań w koncepcji „Jedno Zdrowie” jest zachowanie skuteczności działania substancji przeciwbakteryjnych. Problem dotyczy zwłaszcza tych substancji, które są ważne w ochronie zdrowia człowieka. Celem promocji racjonalnego stosowania antybiotyków, Światowa Organizacja Zdrowia (World Health Organization, WHO) wprowadziła hierarchizację wszystkich stosowanych w lecznictwie klas substancji przeciwbakteryjnych. Opracowana na podstawie ściśle określonych kryteriów klasyfikacja dzieli substancje przeciwbak-



Ryc. 1. Schemat mechanizmów oporności na substancje przeciwbakteryjne krytycznie istotne z punktu widzenia zdrowia publicznego (critically important antimicrobials). Bakteryjne mechanizmy oporności wraz z podanymi klasami substancji przeciwbakteryjnych, których dany mechanizm dotyczy.

teryjne na kategorie: „krytycznie istotne” (“critically important”), „bardzo istotne” (“highly important”), lub „istotne” (“important”). Substancje przeciwbakteryjne zaliczane do grupy „krytycznie istotne” stanowią jedyną lub jedną z niewielu dostępnych opcji w leczeniu zagrażających życiu zakażeń bakteryjnych ludzi. Ponadto mogą być stosowane w zwalczaniu infekcji wywołanych przez bakterie pochodzenia odzwierzęcego czy też środowiskowego. W kategorii „krytycznie istotne” wyodrębniono również grupę substancji przeciwbakteryjnych o najwyższej wadze z punktu widzenia ochrony zdrowia publicznego tzw. „highest priority”, obejmującą cefalosporyny od trzeciej do piątej generacji, glikopeptydy, chinolony, makrolidy, ketolidy oraz polimiksyny [106].

Znajomość mechanizmów oporności oraz sposobów ich nabywania przez bakterie jest niezwykle istotna w dobie rosnącej antybiotykooporności i powszechności występowania determinant oporności. Na przykładzie substancji zaliczanych do kategorii „krytycznie istotnych” możliwe jest omówienie niemal wszystkich sposobów działania substancji przeciwbakteryjnych oraz bakteryjnych mechanizmów oporności.

Celem pracy jest przegląd i przedstawienie sposobów w jaki substancje krytycznie istotne z punktu widzenia ochrony zdrowia publicznego działają na komórki bakteryjne, złożonych mechanizmów, które odpowiadają za oporność na te substancje oraz genów warunkujących pojawienie się oporności.

2. Substancje przeciwbakteryjne powodujące utratę integralności ściany komórkowej: β -laktamy, glikopeptydy oraz pochodne kwasu fosfonowego

2.1. Mechanizmy działania substancji przeciwbakteryjnej

β -laktamy, glikopeptydy oraz pochodne kwasu fosfonowego zaburzają integralność ściany komórkowej w różny sposób. β -laktamy stanowiące najlichnieszą grupę substancji stosowanych w leczeniu zakażeń bakteryjnych, a także glikopeptydy działają na białka wiążące penicylinę tzw. PBP (Penicillin Binding Proteins) o aktywności transglikozylaz i transpeptydaz. Białka te odpowiadają za polimeryzację łańcuchów cukrowych i tworzenie peptydowych połączeń między sąsiednimi łańcuchami mureiny w czasie syntezy bakteryjnej ściany komórkowej.

β -laktamy hamują funkcjonowanie D,D-transpeptydaz katalizujących końcowy etap syntezy bakteryjnego peptydoglikanu, polegający na formowaniu mostków peptydowych gwarantujących stabilność ściany komórkowej. Jako analogi strukturalne dwupeptydu D-alanylo-D-alaniny (D-Ala-D-Ala) będącego substratem

D,D-transpeptydaz, β -laktamy łączą się z transpeptydazami prowadząc do ich inaktywacji [31].

Glikopeptydy, w przeciwieństwie do antybiotyków β -laktamowych, nie działają bezpośrednio na enzym, a wiążą się z terminalną D-alanylo-D-alaniną prekursora peptydoglikanu, blokując tym samym etapy transglikozylacji i transpeptydacji [9].

Kolejną klasą substancji przeciwbakteryjnych wywołujących zaburzenia syntezy ściany komórkowej bakterii są pochodne kwasu fosfonowego, do których należy fosfomycyna [6, 34]. Antybiotyk ten łączy się nieodwracalnie z cysteiną, w miejscu aktywnym transferazy (MurA, UDP-N-acetyloglukozamino-enolopirogronotransferazy) katalizującej przyłączanie fosfoenolopirogronianu (PEP) do N-acetyloglukozamino-urydynodifosforanu (UDP-GlcNAc). Fosfomycyna działa jako analog strukturalny PEP zapobiegając powstawaniu kluczowego prekursora peptydoglikanu a tym samym hamuje początkowy etap syntezy bakteryjnej ściany komórkowej [35].

2.2. Mechanizmy oporności

Modyfikacja miejsca działania substancji przeciwbakteryjnej

Oporność bakterii może być wynikiem modyfikacji docelowego miejsca działania substancji przeciwbakteryjnej. Jest to podstawowy mechanizm oporności na omawiane klasy substancji u bakterii Gram-dodatnich [36].

W przypadku β -laktamów na obniżenie wrażliwości wpływają modyfikacje białek PBP. Zmienione PBP zachowują zdolności katalityczne w obecności antybiotyku. Przykładem są L,D-transpeptydazy niewrażliwe na działanie większości antybiotyków β -laktamowych (z wyjątkiem karbapenemów). Wysoki udział tych białek występuje np. w ścianie komórkowej bakterii z rodzaju *Clostridium* spp. oraz *Mycobacterium* spp. Obecność tego typu enzymów potwierdzono również u izolatów *Escherichia (E.) coli* i *Enterococcus (E.) faecium* opornych na β -laktamy [31, 50].

Zmodyfikowane transpeptydazy notowane są również u gronkowców opornych na metycylinę, w tym u *Staphylococcus (S.) aureus* (meticillin-resistant *S. aureus*, MRSA). Enzymy typu PBP 2a (zwane również PBP 2') mają niskie powinowactwo do antybiotyku, dzięki czemu pomimo jego obecności w środowisku bakterie są w stanie syntetyzować właściwie usieciowany peptydoglikan. Geny *mecA* oraz *mecC*, kodujące transpeptydazy PBP 2a, zlokalizowane są w obrębie chromosomalnych kaset genowych SCC*mec* (staphylococcal cassette chromosome *mec*) i z ich udziałem mogą być przenoszone pomiędzy różnymi gatunkami gronkowców [44, 46]. Warto nadmienić, iż u *S. aureus* opisano również występowanie plazmidowego genu *mecB*.

Pierwotnie obecność *mecB* notowano u *Macrococcus caseolyticus* – składnika mikrobiomu skóry zwierząt [8]. Powyższe doniesienia wskazują na możliwość transferu kodowanej przez *mecB* oporności na β -laktamy pomiędzy różnymi rodzajami bakterii. Co więcej, u izolatów *M. caseolyticus* pochodzących od bydła i psów zidentyfikowano nowy gen *mecD*, odpowiadający za oporność na wszystkie antybiotyki β -laktamowe [85].

Podobny mechanizm, będący wynikiem strukturalnej modyfikacji miejsca działania substancji przeciwbakteryjnej a polegający na zmianie D-alanylo-D-alaniny na D-alanylo-D-mleczan (D-Ala-D-Lac) bądź D-alanylo-D-serynę (D-Ala-D-Ser) warunkuje oporność na glikopeptydy u *Enterococcus* spp. (Vancomycin-Resistant *Enterococcus*, VRE) [9]. Za syntezę alternatywnych dwupeptydów odpowiadają operony *Van* np. *VanA*, *VanB*, *VanD*, *VanM* (D-Ala-D-Lac) oraz *VanC*, *VanE*, *VanG*, *VanL*, *VanN* (D-Ala-D-Ser). Warto podkreślić, że operony *VanA*, *VanB*, *VanM* i *VanN* mogą być zlokalizowane na plazmidach i przy ich udziale przenosić się pomiędzy różnymi rodzajami bakterii, czego przykładem jest wyizolowany w 2002 roku, w USA szczep *S. aureus* (vancomycine resistant *S. aureus* VRSA) niosący *VanA* [9, 80].

Mutacje wpływające na zmiany miejsca wiązania enzymu z substancją przeciwbakteryjną mogą również obniżać wrażliwość na fosfomicynę. Wykazano, że bakterie naturalnie odporne na ten antybiotyk np. *Mycobacterium (M.) tuberculosis* posiadają zamiast cysteiny resztę kwasu asparaginowego w miejscu aktywnym enzymu MurA [49]. Dotychczas występowanie tego typu mutacji u izolatów klinicznych stwierdzano incydentalnie np. u *E. coli* [53, 92].

3. Zmiany w przepuszczalności osłon komórkowych

Kolejnym mechanizmem wpływającym na obniżenie wrażliwości na omawiane klasy substancji przeciwbakteryjnych jest zmniejszenie przepuszczalności osłon komórkowych. Przykładem jest substratowo specyficzne białko porynowe u *P. aeruginosa*, kodowane przez gen *oprD*. Białko to pełni rolę kanału zapewniającego przepływ do komórki bakteryjnej niezbędnych aminokwasów i krótkich peptydów. Umożliwia ono również wnikanie do komórki karbapenemów. Mutacje, delecje, insercje skutkujące funkcjonalnymi zmianami bądź utratą aktywności białka OprD prowadzą do zmniejszenia wrażliwości na karbapenemy [61].

W przypadku fosfomicyny oporność tego typu może być rezultatem defektów funkcjonowania systemów transportu α -glicerofosforanu (GlpT) lub glukoz-6-fosforanu (UhpT), poprzez które antybiotyk trafia do wnętrza komórki bakteryjnej. Zmiany będące wynikiem mutacji w genach strukturalnych *uhpT*, *glpT* bądź regu-

latorowych np. *uhpA*, *uhpB*, *uhpC* tych systemów prowadzą do obniżenia wrażliwości na fosfomicynę [72]. Obecność mutacji dotyczących *uhpT* i/lub *glpT* wykazano u metycyliny-opornych szczepów *S. aureus* [37].

Opisano również zmniejszoną wrażliwość na wancomycynę szczepów *S. aureus* (vancomycin-intermediate *S. aureus*, VISA), której przyczyną była pogrubiona i zmieniona strukturalnie ściana komórkowa stanowiąca mechaniczną barierę utrudniającą wnikanie leku do komórki. Wykazano, że kluczową rolę w syntezie tak zmodyfikowanej ściany komórkowej odgrywają mutacje w regionie *walkR* (znanym również jako *yycGF*, *vicKR*, *micAB*) zaangażowanym w kontrolę jej metabolizmu [48].

Czynne usuwanie cząsteczek substancji przeciwbakteryjnej

Systemy aktywnie wypompowujące cząsteczki z komórki (efflux pumps), mogą powodować obniżenie wrażliwości na szereg substancji przeciwbakteryjnych. Pompy umożliwiają bakteriom usuwanie z komórki rozmaitych szkodliwych związków. Spektrum ich działania obejmuje nie tylko substancje przeciwbakteryjne, ale również sole żółci, toksyny, detergenty, biocydy i in. Co ważne, jeden rodzaj pomp może być aktywny wobec wielu różnych substancji. Geny determinujące obecność pomp wypompowujących zazwyczaj kodowane są chromosomalnie.

Nadprodukcja systemów wypompowujących oraz ich synergistycznie działanie z innymi mechanizmami np. zmniejszoną przepuszczalnością osłon może wpływać na pojawienie się oporności na różne klasy substancji przeciwbakteryjnych. Podwyższenie syntezy pomp jest najczęściej efektem mutacji w genach regulujących ich działanie [60].

Obniżenie wrażliwości na β -laktamy w wyniku zwiększonej syntezy pomp typu AcrAB-TolC opisano np. u klinicznych izolatów *K. pneumoniae* [78]. Mechanizm czynnego usuwania β -laktamów, w tym karbapenemów z udziałem pomp MexAB-OprM notowano także u *P. aeruginosa*. Ponieważ spektrum substratowe systemów Mex obejmuje wiele różnych klas substancji przeciwbakteryjnych, ich podwyższona synteza może przyczyniać się do występowania wielooporności u *Pseudomonas*. Fosfomicyna nie stanowi substratu dla systemów typu Mex, natomiast dowiedziono, że może być usuwana z komórek bakteryjnych przy udziale pompy Tet38 [60, 94].

Enzymatyczna inaktywacja substancji przeciwbakteryjnej

Powszechnym mechanizmem w jaki bakterie nabywają oporność na substancje przeciwbakteryjne jest zdolność do ich enzymatycznego rozkładu. Enzymy te w przypadku bakterii Gram-dodatnich wydzielane są

pozakomórkowo, bądź występują w przestrzeni periplazmatycznej bakterii Gram-ujemnych. Mechanizm ten jest najbardziej rozpowszechnionym spośród mechanizmów oporności na β -laktamy.

β -laktamazy, które odpowiadają za inaktywację tej klasy antybiotyków stanowią bardzo zróżnicowaną grupę enzymów, zarówno ze względu na ich budowę strukturalną, jak i profil substratowy (tj. aktywność wobec penicylin, cefalosporyn czy karbapenemów) [14, 95]

Enzymem o wąskim spektrum, który odpowiada za hydrolizę penicylin u bakterii Gram-dodatnich (np. gronkowców, enterokoków) jest β -laktamaza warunkowana obecnością genu bla_z . Gen bla_z może być zlokalizowany na chromosomie, niemniej jego obecność wykrywano również na plazmidach a nawet w materiale genetycznym fagów bakteryjnych [24]. Enzymy typu ESBL (extended-spectrum beta-lactamases) o rozszerzonym spektrum substratowym są najbardziej rozpowszechnione wśród *Enterobacterales*. Enzymy te hydrolizują penicyliny, cefalosporyny (z wyjątkiem cefamycyn) i monobaktamy. Obecnie często notowane są enzymy ESBL wykazujące aktywność wobec cefotaksymu CTX-M (cefotaximase-Munich), kodowane przez geny bla_{CTX-M} , które u *Enterobacterales* zazwyczaj zlokalizowane są na plazmidach [15]. Do enzymów ESBL zaliczają się także enzymy hydrolizujące karbapenemy: IMI (imipenem hydrolyzing beta-lactamase), NMC (non-metallo-carbapenemase) identyfikowane u *Enterobacter* spp., a także SME notowane u *Serratia marcescens* (*Serratia marcescens* enzyme) [54, 82]. Szeroko rozpowszechnione są należące do tej samej kategorii karbapenemazy KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) kodowane przez geny bla_{KPC} zlokalizowane na plazmidach. Dotychczas zanotowano występowanie bla_{KPC} u wielu Gram-ujemnych pałeczek w tym *Enterobacter* spp. i *Salmonella* spp. [4, 82]. Do ESBL zaliczane są również liczne enzymy OXA (oxacillin-hydrolyzing) hydrolizujące karbapenemy. Występują one głównie u *Enterobacterales* i kodowane są przez plazmidowe geny bla_{OXA} [14, 54].

Kolejną grupę β -laktamaz stanowią cefalosporynazy typu AmpC, warunkujące oporność przede wszystkim na cefalosporyny (z wyjątkiem czwartej generacji), w tym cefamycyny. Spektrum ich aktywności obejmuje również penicyliny, monobaktamy oraz inhibitory β -laktamaz np. kwas klawulanowy. Najczęściej są to enzymy kodowane chromosomalnie, produkowane indukcyjnie. Ich występowanie opisano m.in. u *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. Mutacje w genie *ampD*, jednym z trzech genów regulatorowych odpowiadających za syntezę cefalosporynaz typu AmpC, mogą prowadzić do konstytutywnego wytwarzania tych enzymów np. u *P. aeruginosa* [51, 57]. Podobny skutek mają mutacje genu *ampR* stwierdzone u izolatów *Enterobacter*

cloacae [56]. Kodowane chromosomalnie cefalosporynazy typu AmpC występują również u *E. coli* oraz *Acinetobacter* spp. Nie powodują one oporności ze względu na niski poziom konstytutywnej ekspresji kodujących je genów. Również w tym przypadku mutacje genów regulatorowych mogą powodować podwyższenie ekspresji i wystąpienie oporności. Coraz częściej u *Enterobacterales* notowane są konstytutywne cefalosporynazy typu AmpC, kodowane przez geny bla_{CMY} zlokalizowane na plazmidach [7].

Metallo β -laktamazy (MBL), posiadające w centrum aktywnym cynk, odpowiadają za oporność na większość antybiotyków β -laktamowych, w tym karbapenemy. Geny kodujące te enzymy występują na chromosomie w formie kaset genowych u pałeczek niefermentujących *A. baumannii* czy *P. aeruginosa* [54]. U *Enterobacterales* przenoszone są na plazmidach. Przykładami genów kodujących enzymy MBL są geny bla_{IMP} ("active on imipenem") oraz bla_{VIM} (Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase) zidentyfikowane po raz pierwszy u *P. aeruginosa* oraz bla_{NDM} (New Delhi metallo-beta-lactamase) pochodzące od *A. baumannii*, a rozprzestrzeniające się wśród *Enterobacterales* [54].

Mechanizm enzymatycznej inaktywacji dotyczy również fosfomycyny. Dotychczas opisano występowanie metaloenzymów FosA, FosB, FosX katalizujących rozerwanie pierścienia epoksydowego fosfomycyny. Enzymy te kodowane są zarówno przez chromosomalne jak i przenoszone z udziałem plazmidów geny. Ich występowanie potwierdzono zarówno u bakterii Gram-ujemnych (*P. aeruginosa*) jak i Gram-dodatnich (*S. aureus*, *Listeria monocytogenes*). Za enzymatyczną inaktywację fosfomycyny odpowiadają również kinazy FosC, FomA oraz FomB katalizujące fosforylację jej cząsteczek, a opisane u *Streptomyces* oraz *Pseudomonas syringae* wytwarzających fosfomycynę [20].

3. Substancje przeciwbakteryjne wpływające na błony komórek bakteryjnych: polimyksyny i lipopeptydy

3.1. Mechanizmy działania substancji przeciwbakteryjnej

Aktywność bakteriobójcza polimyksyn i lipopeptydów jest zbliżona do działania związków powierzchniowo czynnych. Spektrum przeciwbakteryjne omawianych klas substancji determinuje ich działanie na określone błony komórek bakteryjnych. Lipopeptydy oddziałują na błonę cytoplazmatyczną bakterii Gram-dodatnich. Polimyksyny natomiast mają wpływ zarówno na błonę zewnętrzną jak i błonę cytoplazmatyczną bakterii Gram-ujemnych.

Polimyksyny reagują elektrostatycznie z cząsteczkami lipopolisacharydu (LPS) oraz fosfolipidami

w błonie zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych. Dodatkowo naładowane reszty kwasu α , γ -diaminomasłowego polimyksyn wchodzi w interakcję z naładowanymi ujemnie grupami fosforanowymi lipidu A LPS. W efekcie dochodzi do wypierania dwudodatnich kationów wapnia i magnezu stabilizujących rozmieszczenie sąsiadujących cząsteczek LPS. Hydrofobowe łańcuchy tłuszczowe polimyksyn wnikają w błonę zewnętrzną, powodując jej strukturalną i funkcjonalną dezorganizację, ułatwiając tym samym wnikanie kolejnych cząsteczek antybiotyku. W rezultacie dochodzi również do utraty integralności błony cytoplazmatycznej, zaburzenia równowagi osmotycznej i śmierci komórki bakteryjnej [43].

Aktywność należącej do antybiotyków lipopeptydowych daptomycyny jest wynikiem złożonego mechanizmu, którego początkowy etap stanowi depolaryzacja błony cytoplazmatycznej w procesie zależnym od jonów wapnia. Wapń wpływa na zmiany konformacyjne daptomycyny, prowadząc do powstawania miceli, które wnikają w błonę. Jony Ca^{2+} ułatwiają ten proces wiążąc się z ujemnie naładowanymi grupami lipidu błonowego – fosfatydyloglicerolu (PG) [68, 89]. Po wniknięciu w membranę następuje agregacja cząsteczek daptomycyny i tworzenie porów transbłonowych, powodujących utratę potasu z komórki. Rezultatem są zmiany zawartości lipidów błonowych, zakłócenie procesów związanych z błoną cytoplazmatyczną oraz zaburzenie syntezy składników ściany komórkowej. Dochodzi również do zatrzymania syntezy kwasów nukleinowych, białek a ostatecznie zahamowania podziału i śmierci komórki [89, 93].

3.2. Mechanizmy oporności

Modyfikacja miejsca działania substancji przeciwbakteryjnej

Najczęstszą przyczyną oporności na omawiane klasy substancji przeciwbakteryjnych są zmiany ładunku bakteryjnych osłon komórkowych, których skutkiem jest zmniejszenie powinowactwa substancji do miejsca działania. W przypadku polimyksyn do zmniejszenia wrażliwości prowadzą modyfikacje lipidu A np. poprzez przyłączenie dodatkowo naładowanych cząsteczek 4-amino-4-deoksy-L-arabinozy (L-Ara4N) bądź fosfoetanolaminy (pEtN). Większość bakterii wykazujących naturalną oporność na polimyksyny np. *Proteus* spp., posiada LPS, który zawiera cząsteczki L-Ara4N. Oporność nabyta, występująca między innymi u *Salmonella enterica*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, wiąże się z modyfikacją, za którą odpowiadają dwuskładnikowe systemy regulatorowe PmrA/PmrB i PhoP/PhoQ. Systemy te kontrolują i aktywują reakcje komórki bakteryjnej na czynniki zewnętrzne np. jony Mg^{2+} czy obecność antybiotyku oraz regulują kaskadę reakcji prowadzących do modyfikacji lipidu A [76].

Aktywacja dwuskładnikowych systemów może być również wynikiem mutacji prowadzących do konstytutywnej ekspresji kodujących je genów. Potwierdzono szereg mutacji genów kodujących białka omawianych systemów np. u *Salmonella* spp., *A. baumannii* (*pmrA*, *pmrB*), *K. pneumoniae* czy *E. coli* (*phoP*, *phoQ*) oraz genów regulujących ich funkcjonowanie np. *mgrB* u *Klebsiella* spp. [28, 76]. Kodowana chromosomalnie oporność na polimyksyny, w tym kolistynę ogranicza się do klonalnego pojawiania się opornych szczepów. W 2015 roku po raz pierwszy opisano występowanie plazmidowego genu *mcr-1* kodującego transferazę fosfoetanolaminy katalizującą przyłączenie pEtN do lipidu A u *E. coli*. Zakrojone na szeroką skalę badania wykazały, iż szczepy posiadające gen *mcr-1* izolowane są nie tylko od zwierząt ale również ze środowiska, z żywności jak i od ludzi [28, 87]. Występowanie genu *mcr-1* potwierdzono dotychczas u *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella* spp. oraz *Enterobacter* spp. a nawet u izolatów *E. coli* pochodzących z 1980 roku [65, 87]. Wkrótce po odkryciu *mcr-1* zidentyfikowano kolejne geny oporności na kolistynę przenoszone z udziałem plazmidów: *mcr-2* – *mcr-9* [1, 10, 17, 18, 107, 110, 111]. Kolistyna jest lekiem ostatniej szansy w przypadku zakażeń wywołanych przez wielooporne bakterie wykazujące oporność również na karbapenemy. Warto nadmienić, iż pojawiły się już doniesienia o szczepach *K. pneumoniae* izolowanych zarówno od ludzi jak i zwierząt, u których opisano równoczesne występowanie genu *mcr-8* oraz *bla_{NDM}* [99].

Oporność izolatów klinicznych na daptomycynę notowana jest incydentalnie, a jej przyczyną mogą być zmiany ładunku membran powodowane zmniejszeniem ilości zawartego w nich fosfatydyloglicerolu [68]. Różnice w składzie lipidowym błony bakterii tłumaczą spektrum bójczej aktywności daptomycyny. Błony komórkowe bakterii Gram-dodatnich zawierają znaczne ilości fosfatydyloglicerolu (u *S. aureus* stanowi on 58%) natomiast u bakterii Gram-ujemnych większość składu lipidowego błony stanowi dodatnio naładowana fosfatydyloetanolamina (około 80% u *E. coli*). Zmniejszenie ujemnego ładunku błon może być skutkiem mutacji w genach odpowiedzialnych za syntezę fosfolipidów błonowych. Mutacje genu *pgsA* kodującego enzym syntazę fosfatydyloglicerolu, prowadzące do zmniejszenia ilości PG w membranach stwierdzono dotychczas np. u opornych na daptomycynę izolatów *Bacillus subtilis* i *S. aureus*.

Obniżoną wrażliwość powoduje również wzrost zawartości błonowej kardiolipiny związany z mutacjami genu *cls*. Tego typu mutacje opisano u *S. aureus* i *E. faecalis* [68]. Sugeruje się, iż kardiolipina zapobiega tworzeniu przez cząsteczki daptomycyny porów transbłonowych [114].

U *S. aureus* wykazano także zmniejszoną wrażliwość na daptomycynę, której przyczyną były mutacje genu

kodującego dwufunkcyjny enzym MprF (multiple peptide resistance factor). Enzym ten modyfikuje PG powodując zmianę ładunku jego cząsteczki, dodatkowo ponieważ posiada aktywność flipazy, przenosi tak zmodyfikowany PG do warstwy zewnętrznej membrany [68].

Oporność może być także konsekwencją całkowitej utraty docelowego miejsca działania substancji czynnej. Znakomitym przykładem są odporne na kolistynę izolaty *A. baumannii*, u których mutacje w obrębie genów *lpxA*, *lpxC*, i *lpxD* odpowiadających za początkowe etapy biosyntezy lipidu A, doprowadziły do całkowitej utraty LPS [71, 76].

Zmiany w przepuszczalności osłon komórkowych

Kolejnym przykładem mechanizmu oporności na polimyksyny i lipopeptydy jest tworzenie bariery osłaniającej komórkę bakteryjną przed antybiotykiem. Wykazano zmniejszoną wrażliwość na polimyksyny u izolatów *K. pneumoniae* wytwarzających otoczki polisacharydowe. Naładowane ujemnie polisacharydy, wiążąc cząsteczki polimyksyn, ograniczają interakcję substancji przeciwbakteryjnej z miejscem docelowym. Mniejsza liczba cząsteczek antybiotyku docierająca do powierzchni komórki bakteryjnej przyczynia się do osłabienia skuteczności jego działania [76].

Oporność na daptomycynę może wiązać się ze zmianami funkcjonowania systemów regulatorowych biorących udział w utrzymaniu homeostazy ściany komórkowej [93], a także ze zwiększeniem jej grubości [27]. Dowiedziono, że synteza zmodyfikowanej, pogrubionej ściany komórkowej, będąca wynikiem mutacji w regionie *walkR*, wspominanym już przy mechanizmach oporności na wankomycynę, prowadzi również do zmniejszenia wrażliwości na daptomycynę u *S. aureus* [48].

Czynne usuwanie cząsteczek substancji przeciwbakteryjnej

Nadprodukcja systemów wypompowujących także może przyczyniać się do obniżenia wrażliwości na polimyksyny. Przykładem mogą być pompy typu efflux zidentyfikowane u *K. pneumoniae*, czy *E. coli* kodowane przez operon *acrAB* oraz notowane u szczepów *P. aeruginosa* systemy MexAB-OprM [112].

4. Substancje przeciwbakteryjne hamujące syntezę kwasów nukleinowych: chinolony i ansamycyny

4.1. Mechanizmy działania substancji przeciwbakteryjnej

Bakteryjne DNA oraz RNA stanowią cel działania chinolonów i ansamycyn. Chinolony wpływają na syntezę i zmiany struktury bakteryjnego DNA poprzez

działanie na enzymy bakteryjne: topoizomerazę typu II – gyrazę oraz topoizomerazę IV. Enzymy te odgrywają zasadniczą rolę w prawidłowym przebiegu procesów wymagających dostępu do informacji genetycznej zawartej w DNA m.in. replikacji [3, 23, 55]. Determinują one stopień skręcenia podwójnej helisy DNA. Topoizomerazy powodują powstanie tymczasowych pęknięć nici DNA, jednocześnie zabezpieczają je łącząc się odwracalnie z nowo powstałymi końcami DNA. Przecięcie umożliwia swobodny obrót wokół kolejnego wiązania heliksu DNA, prowadząc do zmniejszenia napięcia torsyjnych. Topoizomerazy katalizują również ponowne połączenie nici heliksu po rozpleceniu [3].

Chinolony łącząc się z kompleksem topoizomeraza-DNA, hamują zdolność enzymów do ligacji przeciętych nici kwasu nukleinowego. Konsekwencjami są zaburzenia replikacji, zahamowanie syntezy DNA a ostatecznie śmierć komórki bakteryjnej [5]. Gyraza jest preferowanym miejscem działania chinolonów u bakterii Gram-ujemnych, natomiast topoizomeraza IV u Gram-dodatnich [55]. U gatunków, które nie posiadają topoizomerazy IV np. *M. tuberculosis*, *Helicobacter pylori* czy *Treponema pallidum* gyraza stanowi jedyny cel działania chinolonów [47].

Ansamycyny, a wśród nich rifampicyna wykazują szeroki zakres aktywności biologicznych. Stanowią one grupę substancji przeciwbakteryjnych hamujących transkrypcję. Rifampicyna przyłącza się do podjednostki β polimerazy RNA. W obecności antybiotyku aktywność polimerazy RNA zostaje zablokowana, tym samym nie dochodzi do transkrypcji genów niezbędnych do funkcjonowania komórki, czego następstwem jest śmierć bakterii [12].

4.2. Mechanizmy oporności

Modyfikacja lub ograniczenie dostępności miejsca działania substancji przeciwbakteryjnej

Częstą przyczyną oporności na chinolony są mutacje prowadzące do zmniejszenia powinowactwa substancji przeciwbakteryjnej, do miejsca docelowego. Są to mutacje w tzw. regionach determinujących oporność na chinolony QRDR (quinolone resistance determining region) co najmniej jednego z genów kodujących podjednostki topoizomerazy II (*gyrA*, *gyrB*) lub IV (*parC*, *parE*). Skutkiem mutacji są zmiany strukturalne enzymów, które uniemożliwiają przyłączenie substancji przeciwbakteryjnej [25]. Najczęściej identyfikowane są mutacje w podjednostkach GyrA i ParC topoizomeraz. Wysoki poziom oporności u niektórych izolatów bakteryjnych jest skutkiem występowania kilku mutacji, często dotyczących obydwu enzymów [25, 102].

Mutacje, których skutkiem jest oporność na rifampicynę zwykle dotyczą genu *rpoB* kodującego

podjednostkę β polimerazy RNA. Wpływają one na zmiany konformacji polimerazy i utratę powinowactwa do antybiotyku. Mutacje te dotyczą głównie rejonu determinującego oporność na rifampicynę tzw. RRDR (Rif-resistance determining region), a ich występowanie potwierdzono m.in. u opornych izolatów *M. tuberculosis* i *E. faecium* [32, 41]. Do mutacji może dochodzić nie tylko w obecności substancji przeciwbakteryjnej, ale również pod wpływem niekorzystnych warunków środowiskowych. Pojawienie się mutacji genu *rpoB*, jako efektu stresu temperaturowego, opisano np. u *E. coli*. Ponieważ mutacje wpływały na adaptację do warunków stresowych ich obecność była korzystna dla bakterii [84].

Nieco inny mechanizm, ale również dotyczący działania substancji przeciwbakteryjnej w miejscu docelowym dotyczy chinolonów. Polega on na syntezie białek kodowanych przez geny *qnr*. Jest to jeden z mechanizmów oporności na chinolony przenoszonych plazmidowo (PMQR – plasmid-mediated quinolone resistance). Białka Qnr przyłączają się do topoizomeraz blokując możliwość ich połączenia z bakteryjnym DNA. Tym samym zmniejsza się liczba dostępnych kompleksów topoizomeraza-DNA stanowiących cel działania chinolonów [47]. Dotychczas opisano występowanie genów *qnrA* [67], *qnrB* [52], *qnrC* [98], *qnrD* [21], *qnrS* [45], *qnrVC* [108] oraz *qnrE1* [2].

Zmiany w przepuszczalności osłon komórkowych

Wzrost oporności na chinolony bywa skutkiem zmian przepuszczalności osłon komórkowych. Chinolony wnikają do wnętrza komórek bakteryjnych poprzez domeny lipidowe zarówno błony zewnętrznej jak i błony cytoplazmatycznej. W przypadku bakterii Gram-ujemnych transport przez błonę zewnętrzną odbywa się również z udziałem białek porynowych. Dyfuzja przez dwuwarstwą fosfolipidową jest bardziej wydajna w przypadku cząsteczek o większej hydrofobowości natomiast efektywność transportu drogą porynową jest większa dla cząsteczek hydrofilowych np. ciprofloksacyny, norfloksacyny [13, 25]. Zarówno zmiany organizacji błony komórkowej jak i zmniejszenie syntezy białek porynowych: OmpA, OmpF, OmpC, OmpD, LamB i Tsx (dotyczy tylko Gram-ujemnych), mogą prowadzić do wzrostu oporności na tę klasę substancji przeciwbakteryjnych [25].

Czynne usuwanie cząsteczek substancji przeciwbakteryjnej

Aktywne wypompowywanie chinolonów z komórki zwykle jest wynikiem mutacji w obrębie genów kodujących białka regulatorowe wpływające na funkcjonowanie pomp. Wiele tego typu pomp odpowiada za usuwanie chinolonów z komórek *Enterobacterales* np.

AcrAB-TolC u *E. coli* czy *Salmonella* spp. Jest to również najczęściej notowany mechanizm oporności na chinolony u *P. aeruginosa* (pompy MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM) [81]. Zidentyfikowano także pompy kodowane przez plazmidowe geny *qepA* i *oqxAB*. Ich występowanie opisano zarówno u bakterii komensalnych *E. coli* (*qepA*, *oqxAB*) [109] jak i patogennych *Salmonella* spp. i *K. pneumoniae* (*oqxAB*) [79, 105]. Aktywne wypompowywanie chinolonów z komórki stwierdzono również u bakterii Gram-dodatnich. Nadekspresja genów kodujących transportery NorA, NorB, NorC, MdeA u *S. aureus* [26], a także genu *pmrA* kodującego pompę u *Streptococcus pneumoniae*, skutkuje między innymi obniżeniem wrażliwości na omawianą klasę substancji przeciwbakteryjnych [40].

Mechanizm oporności z udziałem pomp aktywnie usuwających cząsteczki leku z komórki dotyczy także rifampicyny. Przykładem mogą być systemy Rv2937, Rv1258, Rv0783c, zidentyfikowane u prątków gruźlicy wykazujących obniżoną wrażliwość na rifampicynę [66].

Enzymatyczna inaktywacja substancji przeciwbakteryjnej

Odnotowano również występujący u *Enterobacterales* mechanizm enzymatycznej inaktywacji chinolonów. Ten przenoszony z udziałem plazmidów mechanizm polega na modyfikacji antybiotyku i unieczynnieniu go z udziałem enzymu acetylotransferazy aminoglikozydowej, kodowanej przez gen *aac(6')-Ib-cr*. Spektrum aktywności enzymu obejmuje zarówno aminoglikozydy jak również fluorochinolony hydrofilowe: ciprofloksacynę i norfloksacynę [54].

5. Substancje przeciwbakteryjne hamujące syntezę białek: makrolidy, ketolidy, aminoglikozydy, glicylcykliny, oksazolidynony

5.1. Mechanizmy działania substancji przeciwbakteryjnej

Makrolidy, ketolidy, aminoglikozydy, glicylcykliny i oksazolidynony hamują syntezę białek na różnych etapach. Makrolidy oraz wywodzące się od nich ketolidy np. telitromycyna działają w podobny sposób, reagując z podjednostką 50S rybosomów bakteryjnych, a dokładnie z rybosomalnym 23S rRNA. Makrolidy wiążą się z domeną V cząsteczki rRNA, ketolidy dodatkowo z domeną II 23S rRNA w pobliżu białek rybosomalnych L4 oraz L22. Substancje te blokują tzw. kanał wyjściowy, poprzez który powstające peptydy opuszczają rybosom. Tym samym dochodzi do zahamowania elongacji w wyniku przedwczesnej dysocjacji krótkich peptydylo-tRNA z rybosomu tuż po inicjacji translacji [38, 64]. Antybiotyki wymienionych klas mogą także

zmieniać allosterycznie właściwości centrum katalitycznego rybosomu prowadząc do zatrzymania translacji, bądź powodować zmianę ramki odczytu, czego skutkiem jest nieprawidłowa synteza białek [38, 88].

Linezolid należący do oksazolidynonów łączy się z rybosomalnym 23S rRNA podjednostki 50S w centrum peptydylotransferazy rybosomu (PTC). Doniesienia opisujące dokładny mechanizm działania linezolidu wymieniają zmiany konformacyjne PTC [103], blokadę właściwego przyłączania tRNA do rybosomu [63] i tworzenia wiązań peptydowych oraz hamowanie powstawania kompleksu inicjującego złożonego z podjednostki 30S rybosomu, fMet-tRNA, czynników inicjujących (IF2, IF3) i mRNA [11].

Glicylcykliny, a także aminoglikozydy wpływają na podjednostkę 30S rybosomu. Tigecyklina należąca do glicylcyklin, wiąże się odwracalnie z podjednostką 30S, hamując syntezę białka poprzez blokowanie wiązania aminoacylo-tRNA. Zapobiega tym samym włączaniu kolejnych aminokwasów do powstającego peptydu [42]. Aminoglikozydy hamują translację przyłączając się do rybosomalnego 16S rRNA podjednostki 30S. Różne antybiotyki tej klasy mogą wiązać się w nieco inny sposób z 16S RNA, niemniej skutkiem tego jest zahamowanie translokacji tRNA, zaburzenia rozpoznawania kodonów co sprzyja włączaniu niewłaściwych aminokwasów w powstający peptyd [39, 70].

Sugeruje się, że bójcze działanie aminoglikozydów w odróżnieniu od pozostałych substancji przeciwbakteryjnych hamujących syntezę białek, wynika z indukcji wytwarzania nieprawidłowych białek błonowych prowadzącej do upośledzenia transportu transbłonowego [39, 83].

5.2. Mechanizmy oporności

Modyfikacja lub ochrona miejsca działania substancji przeciwbakteryjnej

Zmiany wpływające na zmniejszenie powinowactwa leku do miejsca jego działania stanowią częstą przyczynę oporności na wymienione antybiotyki. W przypadku makrolidów i linezolidu ten mechanizm oporności związany jest z mutacjami w obrębie domen 23S rRNA oraz mutacjami genów kodujących białka rybosomalne [63]. Tego typu mutacje stwierdzano np. u opornych na makrolidy szczepów *S. pneumoniae* oraz enterokoków i gronkowców opornych na linezolid [16, 38, 63]. Opisano także mutację dotyczącą białka rybosomalnego S10 podjednostki 30S rybosomu, warunkującą oporność na tigecyklinę u izolatów *K. pneumoniae* produkujących karbapenemazy [96].

Szeroko rozpowszechnione są również enzymatyczne modyfikacje miejsca działania substancji czynnej prowadzące do oporności na omawiane klasy antybiotyków. Metylacja rybosomalnego 23S rRNA z udziałem

metylotransferaz kodowanych przez geny *erm* prowadzi do oporności na makrolidy. Dotychczas opisano kilkadziesiąt genów *erm* kodowanych chromosomalnie lub plazmidowo. Ich występowanie notowane jest zarówno u bakterii Gram-ujemnych np. *Salmonella* spp. jak i Gram-dodatnich np. *Staphylococcus*, *Streptococcus* [58, 95]. Ponieważ miejsce wiązania makrolidów z rybosomem nakłada się z miejscem wiązania linkozamidów i streptogramin B, obecność konstytutywnych genów *erm* warunkuje oporność również na te dwie klasy substancji [38, 58, 64]. Taki fenotyp oporności, określane jako MLS_B, jest często notowany u *Enterococcus* spp [69].

Ketolidy (np. telitromycyna) wiążą się silniej z podjednostką 50S rybosomu, dlatego często pozostają aktywne wobec szczepów, których oporność na makrolidy jest efektem ekspresji indukcyjnych genów *erm*. Niemniej stopień metylacji (dimetylacja) może determinować oporność także na tę klasę substancji przeciwbakteryjnych [104].

Modyfikacje rybosomalnego 23S rRNA z udziałem metylotransferazy kodowanej przez przenoszony plazmidowo gen *cfr* determinują oporność na linezolid. Wykazano, że obecność genu *cfr* oprócz oksazolidynonów warunkuje dodatkowo oporność na fenikole, linkozamidy, pleuromutyliny i streptograminy A. W odróżnieniu od enzymów kodowanych przez geny *erm*, metylacja będąca wynikiem ekspresji genu *cfr* nie powoduje oporności na makrolidy. Opisany fenotyp oporności (PhLOPS_A) stwierdzono np. u szczepów *S. aureus* i *E. coli* [62].

Przyczyną oporności na aminoglikozydy mogą być mutacje chromosomalne wpływające na zmiany konformacyjne miejsca wiązania antybiotyku jak i modyfikacja 16S rRNA z udziałem metylaz. Dotychczas opisano występowanie przenoszonych plazmidowo metylaz 16S rRNA, kodowanych przez geny *armA* i *rmtB* [39, 95].

Oporność na makrolidy warunkowana jest również obecnością białek kodowanych przez geny *msr* [95]. Do niedawna sugerowano, że działają one jako pompy, jednakże ostatnie doniesienia dowodzą, iż pełnią one raczej funkcję białek ochronnych. Białka te wiążąc się do rybosomu powodują odłączenie zakotwiczonego już antybiotyku [75, 86].

Do tej samej rodziny należy kodowane przez przenoszony plazmidowo gen *optrA* białko warunkujące oporność na oksazolidynony (linezolid, tedizolid) oraz fenikole (chloramfenikol, florfenikol). Występowanie genu *optrA* potwierdzono dotychczas u opornych izolatów *Enterococcus* [101]. Mechanizm działania OptrA wpływający na oporność nie jest do końca wyjaśniony. Postuluje się, że białko to chroni rybosom przed przyłączeniem antybiotyku [100].

Najlepiej poznanymi białkami ochronnymi są proteiny będące produktami genów *tet(M)* i *tet(O)*, które

determinują oporność na tetracykliny. Tetracykliny mają to samo miejsce działania co tigeocyklina. Wiążąc się z rybosomem białka Tet(M) i Tet(O) powodują zmianę jego konformacji i wypieranie zakotwiczonej tetracykliny [77]. Tigeocyklina jest niewrażliwa na działanie białek ochronnych ponieważ łącząc się z podjednostką 30S przyjmuje inną organizację przestrzenną niż tetracykliny. Tworzy ona przeszkodę uniemożliwiającą przyłączenie się białek ochronnych typu TetM i TetO [42, 77, 113].

Czynne usuwanie cząsteczek substancji przeciwbakteryjnej

Aktywne wypompowywanie substancji czynnej z komórki również prowadzi do zmniejszenia wrażliwości na omawiane substancje. Oporność na makrolidy może być wynikiem syntezy pomp kodowanych przez geny *mef* i stwierdzanych najliczniej u bakterii Gram-dodatnich w tym *Streptococcus*, *Staphylococcus*, a nawet beztlenowców z rodzaju *Clostridium* [95]. Oporność determinowana obecnością genów *mef* występuje także u bakterii Gram-ujemnych jak *Escherichia* czy *Pseudomonas* [38, 95].

Mechanizm aktywnego wypompowywania leku z komórki jest zwykle nieefektywny w odniesieniu do ketolidów gdyż kumulują się one w komórkach bakteryjnych znacznie szybciej niż makrolidy. Ponadto silniejsze wiązanie ze strukturami rybosomu oraz ich słabe działanie jako czynników indukujących oporność sprawia, że w większości przypadków ketolidy zachowują aktywność wobec szczepów niewrażliwych na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B [30, 59].

Podwyższona synteza pomp MexXY występujących u *Pseudomonas*, może przyczyniać się do obniżenia skuteczności działania aminoglikozydów [60].

Oporność na glicylcykliny, w tym tigeocyklinę może być również związana z nadprodukcją systemów wypompowujących. Ich występowanie stwierdzono dotychczas u *A. baumannii* (AdeABC), *Proteus mirabilis*, (AcrAB) [91]. Tigeocyklina ma znacznie większe powinowactwo do rybosomu aniżeli tetracykliny i minocykliny posiadające to samo miejsce wiązania i prawdopodobnie z tego powodu jest aktywna wobec szczepów opornych na tetracykliny, posiadających pompy kodowane przez liczne geny *tet* np. *tet*(B), *tet*(C), *tet*(K) [73, 91, 113].

Enzymatyczna inaktywacja substancji przeciwbakteryjnej

Modyfikacje cząsteczek substancji przeciwbakteryjnej bądź ich rozkład z udziałem enzymów również prowadzi do oporności na omawiane klasy substancji czynnych.

Eraazy kodowane przez plazmidowe geny *ere* powodują hydrolityczną inaktywację makrolidów o 14 bądź 15 atomowym rdzeniu laktonowym [38, 58].

W przypadku tych substancji przeciwbakteryjnych wymieniane są również modyfikacje przez fosfotransferazy, które prowadzą do zaburzenia interakcji ich cząsteczek z rybosomem. Geny *mph* kodujące fosfotransferazy makrolidowe zwykle zlokalizowane są w obrębie ruchomych elementów genetycznych, często w sąsiedztwie genów determinujących oporność na inne klasy substancji przeciwbakteryjnych. Enzymy te rozpowszechnione są u bakterii Gram-ujemnych, zwłaszcza należących do *Enterobacteriales*. Coraz więcej doniesień dotyczy pojawiania się wymienionych genów u bakterii Gram-dodatnich np. *Staphylococcus* [38, 58, 95].

Mechanizm oporności polegający na enzymatycznej modyfikacji dotyczy również tigeocykliny. Hydroksylacja z udziałem monooksygenazy flawinowej kodowanej przez *tet*(X) powoduje inaktywację jej cząsteczek, jak również tetracyklin pierwszej i drugiej generacji [29, 91, 97]. Warto nadmienić, iż wykazano jednoczesne szerzenie się kodowanych plazmidowo genów *tet*(X4) i *mcr-1* u *E. coli* pochodzenia odzwierzęcego i środowiskowego [90].

Występowanie enzymów odpowiadających za acetylację, acetylację i fosforylację stanowi najważniejszy ze sposobów w jaki bakterie nabywają oporność na aminoglikozydy. Skutkiem ich aktywności jest zmniejszone powinowactwo cząsteczek antybiotyku do miejsca docelowego, czyli 16S rRNA. Enzymy odpowiedzialne za modyfikacje aminoglikozydów charakteryzują się różnym profilem substratowym. Geny determinujące ich występowanie najczęściej przenoszone są z udziałem mobilnych elementów genetycznych.

Aminoglikozydo N-acetylotransferazy (AAC) są wśród licznych enzymów tego typu notowane najczęściej, zwłaszcza u bakterii Gram-ujemnych. Enzymy te katalizują acetylację grup aminowych w cząsteczkach antybiotyków, a ze względu na różne miejsca modyfikacji klasyfikowane są jako AAC(1), AAC(2'), AAC(3) oraz AAC(6') [39, 83]. Najbardziej rozpowszechnione są acetylotransferazy klasy AAC(6'), których profil substratowy obejmuje wiele klinicznie ważnych aminoglikozydów m. in. gentamycynę [39, 83]. Występowanie genów kodujących enzymy AAC(6') opisano np. u *Escherichia* spp. (*aac*(6')-Ia, *aac*(6')-Im), *Salmonella* spp. (*aac*(6')-IIa, *aac*(6')-Iy), *Acinetobacter* spp. (*aac*(6')-Is) [95].

Kolejną grupę enzymów odpowiadającą za modyfikacje tej klasy substancji przeciwbakteryjnych stanowi fosfotransferazy APH (kinazy aminoglikozydowe). Podobnie jak acetylotransferazy podzielono je na klasy w zależności od miejsca ich działania: APH(2''), APH(3'), APH(3''), APH(4), APH(6), APH(7'') oraz APH(9) [95]. Większość fosfotransferaz aminoglikozydowych zaliczana jest do klasy APH(3'), a ich obecność warunkuje oporność m. in. na kanamycynę i neomycynę. Proteiny należące do grupy APH(2'') odgrywają znaczącą rolę w oporności bakterii Gram-dodatnich na

gentamycynę. Determinanty kodujące obecność enzymów APH wykryto np. *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. (*aph(3'')-III*), ale też u *Salmonella* spp. (*aph(3'')-Ia*, *aph(6'')-Id*) [83, 95].

Ostatnią grupę enzymów mających znaczenie w epidemiologii oporności na aminoglikozydy stanowią nukleotydylotransferazy ANT (adenylotransferazy), które dzielone są na pięć klas. Enzymy ANT(2''), ANT(3'') częściej notowane są u Gram-ujemnych bakterii, natomiast ANT(4''), ANT(6), ANT(9) dominują u bakterii Gram-dodatnich [83, 95].

Zidentyfikowano także nieliczne enzymy dwufunkcyjne (tj. posiadające dwie różne domeny katalityczne) warunkujące oporność na aminoglikozydy. Dotychczas opisano np. enzym odpowiadający za adenylację i acetylację kodowany przez *ant(3'')-Ih/aac(6'')-IId* u *Serratia marcescens*. Zidentyfikowano również enzym powodujący acetylację i fosforylację warunkowany obecnością genu *aac(6'')-aph(2'')*, którego występowanie stwierdzono np. u *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. czy *Streptococcus* spp. [95].

6. Podsumowanie

Poznanie mechanizmów oporności na środki przeciwbakteryjne jest niezbędne do efektywnej walki z rosnącą antybiotykoopornością bakterii. Szereg aspektów wpływa na pojawianie się i rozprzestrzenianie tego zjawiska. Łatwość przenoszenia mechanizmów oporności w wyniku horyzontalnego transferu genów z udziałem ruchomych elementów genetycznych np. plazmidów, transpozonów, a nawet fagów bakteryjnych, wpływa na szerzenie oporności pomiędzy różnymi gatunkami i rodzajami bakterii, także niespokrewnionymi filogenetycznie. Ekspozycja na substancje przeciwbakteryjne należące do różnych klas może prowadzić do oporności krzyżowej i selekcji genów przenoszonych właśnie z udziałem ruchomych elementów genetycznych. Doskonały przykład stanowią omówione geny *cfr* i *optrA*.

Różnorodne czynniki działające na komórki bakteryjne mogą wpływać na pojawianie się oporności. Obecność pestycydów, metali ciężkich, detergentów, dezynfektantów przyczynia się do selekcji szczepów opornych. Stres środowiskowy, nawet przy nieobecności substancji przeciwbakteryjnej, sprzyja powstawaniu mutacji, które w efekcie mogą skutkować obniżeniem wrażliwości. Warto wspomnieć o zdolności bakterii do tworzenia biofilmów umożliwiających komórkom bakteryjnym przetrwanie w niesprzyjających warunkach środowiskowych, w tym również w obecności antybiotyków.

Obfitość rozmaitych mechanizmów oporności świadczy o ogromnych zdolnościach adaptacyjnych bakterii. Fakt wykrycia genu warunkującego oporność

na kolistynę (*mcr-1*) u izolatów *E. coli* z roku 1980, podczas gdy został on po raz pierwszy opisany pod koniec 2015 roku, nasuwa pytanie jak wielu występujących w przyrodzie mechanizmów oporności dotychczas jeszcze nie zidentyfikowano.

Mając na względzie złożoność i skalę zjawiska oporności, zachowanie skuteczności działania substancji przeciwbakteryjnych, zwłaszcza istotnych w aspekcie zdrowia publicznego, staje się poważnym wyzwaniem i priorytetem. Ranga problemu wymaga podjęcia kompleksowych działań obejmujących przede wszystkim propagowanie rozsądnego stosowania antybiotyków oraz ograniczenie nadużywania substancji przeciwbakteryjnych zarówno w rolnictwie, weterynarii jak i medycynie.

Piśmiennictwo

1. AbuOun M., Anjum M.F. i wsp.: *mcr-1* and *mcr-2* (*mcr-6.1*) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *J. Antimicrob. Chemother.* **73**, 2904 (2018)
2. Albornoz E., Martino F., Tijet N., Corso A., Belder D.D., Gomez S., Melano R.G., Petroni A.: *qnrE1*, a member of a new family of plasmid-located quinolone resistance genes, originated from the chromosome of *Enterobacter* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, 1:e02555–16 (2017)
3. Aldred K.J., Kerns R.J., Osheroff N.: Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, **53**, 1565–1574 (2014)
4. Arnold R.S., Thom K.A., Sharma S., Phillips M., Johnson J.K., Morgan D.J.: Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing bacteria. *South. Med. J.* **104**, 40–45 (2011)
5. Bambeke F.V., Michot J.-M., Eldere J.V., Tulkens P.M.: Quinolones in 2005: an update *Clin. Microbiol. Infect.* **11**, 256–280 (2005)
6. Banerjee S., Sengupta M., Sarker T.K.: Fosfomicyn susceptibility among multidrug-resistant, extended-spectrum beta-lactamase-producing, carbapenem-resistant uropathogens. *Indian. J. Urol.* **33**, 149–154 (2017)
7. Batchelor M., Hopkins K.L., Threlfall E.J., Clifton-Hadley F.A., Stallwood A.D., Davies R.H., Liebana E.: Characterization of AmpC-mediated resistance in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans during the period 1992 to 2003 in England and Wales. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2261–2265 (2005)
8. Becker K., van Alen S., Idelevich E.A., Schleimer N., Seggewiss J., Mellmann A., Kaspar U., Peters G.: Plasmid-encoded transferable *mecB*-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 242–248 (2018)
9. Binda E., Marinelli F., Marcone G.L.: Old and new glycopeptide antibiotics: action and resistance *Antibiotics*, **3**, 572–594 (2014)
10. Borowiak M., Fischer J., Hammerl J.A., Hendriksen R.S., Szabo I., Malorny B.: Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 3317–3324 (2017)
11. Bozdogan B., Appelbaum P.C.: Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **23**, 113–119 (2004)

12. Brodolin K.: Antibiotics targeting bacterial RNA polymerase. *Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance*, **12**, DOI/10.1002/9783527659685.ch12 (2013)
13. Bryan L.E., Bedard J.: Impermeability to quinolones in gram-positive and gram-negative bacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10**, 232–239 (1991)
14. Bush K., Jacoby G.A.: Updated functional classification of β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 969–976 (2010)
15. Canton R., Coque T.M.: The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 466–475 (2006)
16. Canu A., Malbrun B., Coquemont M., Davies T.A., Appelbaum P.C., Leclercq R.: Diversity of ribosomal mutations conferring resistance to macrolides, clindamycin, streptogramin, and telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 125–131 (2002)
17. Carattoli A., Villa L., Feudi C., Curcio L., Orsini S., Luppi A., Pezzotti G., Magistrali C.F.: Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill.* **22**(31), 30589. DOI/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589 (2017)
18. Carroll L.M., Gaballa A., Guldemann C., Sullivan G., Henderson L.O., Wiedmann M.: Identification of novel mobilized colistin resistance gene *mcr-9* in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate. *mBio*, **10** (3) e00853–19; DOI: 10.1128/mBio.00853-19 (2019)
19. Cassini A., Monnet L.D. I wsp.: Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect. Dis.* **19**, 56–66 (2019)
20. Castañeda-García A., Blázquez J., Rodríguez-Rojas A.: Molecular mechanisms and clinical impact of acquired and intrinsic fosfomicin resistance. *Antibiotics*, **2**, 217–236 (2013)
21. Cavaco L.M., Hasman H., Xia S., Aarestrup F.M.: *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 603–608 (2009)
22. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats In The United States, 2013, 1–114, <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf> (26.11.2019)
23. Champoux J.J.: DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 369–413 (2001)
24. Chancey S.T., Zahner D., Stephens D.S.: Acquired inducible antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria. *Future Microbiol.* **7**, 959–978 (2012)
25. Correia S., Poeta P., Hebraud M., Capelo J.L., Igrejas G.: Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *J. Med. Microbiol.* **66**, 551–559 (2017)
26. Costa S.S., Viveiros M., Amaral L., Couto I.: Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *Open. Microbiol. J.* **7**, 59–71 (2013)
27. Cui L., Tominaga E., Neoh H.M., Hiramatsu K.: Correlation between reduced daptomycin susceptibility and vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1079–1082 (2006)
28. Dalmolin T.V., Lima-Morales D.d., Barth A.L.: Plasmid-mediated Colistin Resistance: What Do We Know? *J. Infectiology*, **1**, 16–22 (2018)
29. Deng M., Li L.J. i wsp.: Molecular epidemiology and mechanisms of tigecycline resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a Chinese university hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 297–303 (2014)
30. Edelstein P.H.: Pneumococcal resistance to macrolides, lincosamides, ketolides, and streptogramin B agents: molecular mechanisms and resistance phenotypes. *Clin. Infect. Dis.* **38 Suppl 4**, S322–327 (2004)
31. Edoó Z., Arthur M., Hugonnet J.-E.: Reversible inactivation of a peptidoglycan transpeptidase by a β -lactam antibiotic mediated by β -lactam-ring recyclization in the enzyme active site. *Sci. Rep.* **7**, DOI:10.1038/s41598-017-09341-8
32. Enne V.I., Delsol A.A., Roe J.M., Bennett P.M.: Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 203–207 (2004)
33. European Centre for Disease Prevention and Control/European Medicines Agency: Joint Technical Report: The bacterial challenge: time to react. 2009 https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf (26.11.2019)
34. Falagas M.E., Kastoris A.C., Kapaskelis A.M., Karageorgopoulos D.E.: Fosfomicin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum β -lactamase producing, *Enterobacteriaceae* infections: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* **10**, 43–50 (2010)
35. Falagas M.E., Vouloumanou E.K., Samonis G., Konstantinos Z. Vardakasa: Fosfomicin *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 321–347 (2016)
36. Fisher J.F., Mobashery S.: beta-Lactam Resistance Mechanisms: Gram-Positive Bacteria and *Mycobacterium tuberculosis*. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a025221 (2016)
37. Fu Z., Ma Y., Chen C., Guo Y., Hu F., Liu Y., Xu X., Wang M.: Prevalence of Fosfomicin Resistance and Mutations in *murA*, *glpT*, and *uhpT* in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Blood and Cerebrospinal Fluid Samples. *Front. Microbiol.* **6**, 1544 (2015)
38. Fyfe C., Grossman T.H., Kerstein K., Sutcliffe J.: Resistance to macrolide antibiotics in public health pathogens. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**, 6(10), a025395. DOI: 10.1101/cshperspect.a025395 (2016)
39. Garneau-Tsodikova S., Labby K.J.: Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *Medchemcomm.* **7**(1): 11–27. DOI:10.1039/C5MD00344J (2016)
40. Gill M.J., Brenwald N.P., Wise R.: Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 187–189 (1999)
41. Goldstein B.P.: Resistance to rifampicin: a review. *J. Antibiot.* **67**, 625–630 (2014)
42. Greer N.D.: Tigecycline (Tygacil): the first in the glycylicycline class of antibiotics. *Proc. (Bayl Univ Med Cent)*. **19**, 155–161 (2006)
43. Gupta S., Govil D., Kakar P.N., Prakash O., Arora D., Das S., Govil P., Malhotra A.: Colistin and polymyxin B: a re-emergence. *Indian J. Crit. Care. Med.* **13**, 49–53 (2009)
44. Hanssen A.M., Ericson Sollid J.U.: SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **46**, 8–20 (2006)
45. Hata M., Suzuki M., Matsumoto M., Takahashi M., Sato K., Ibe S., Sakae K.: Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 801–803 (2005)
46. Hawkey P.M.: The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ*, **317**, 657–660 (1998)
47. Hooper D.C., Jacoby G.A.: Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, 1–22 (2016)
48. Howden B.P., Stinear T.P. i wsp.: Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component regulator WalKR. *PLoS Pathog.* **7**, e1002359 (2011)

49. Hrast M., Sosic I., Šink R., Gobec S.: Inhibitors of the peptidoglycan biosynthesis enzymes MurA-F. *Bioorg. Chem.* **55**, 2–15 doi: 10.1016/j.bioorg.2014.03.008 (2014)
50. Hugonnet J.E., Arthur M. i wsp.: Factors essential for L,D-transpeptidase-mediated peptidoglycan cross-linking and beta-lactam resistance in *Escherichia coli*. *Elife*, **5**, e19469 (2016)
51. Jacoby G.A.: AmpC beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 161–182 (2009)
52. Jacoby G.A., Walsh K.E., Mills D.M., Walker V.J., Oh H., Robicsek A., Hooper D.C.: *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1178–1182 (2006)
53. Kim D.H., Lees W.J., Kempell K.E., Lane W.S., Duncan K., Walsh C.T.: Characterization of a Cys115 to Asp substitution in the *Escherichia coli* cell wall biosynthetic enzyme UDP-GlcNAc enolpyruvyl transferase (MurA) that confers resistance to inactivation by the antibiotic fosfomycin. *Biochemistry*, **35**, 4923–4928 (1996)
54. Kocsis B., Szabó D.: Antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. In: Mendez-Vilas, A., ed., *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education, Spain: Formatex Research Center*, 251–257 (2013)
55. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Collins J.J.: How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 423–435 (2010)
56. Kuga A., Okamoto R., Inoue M.: *ampR* gene mutations that greatly increase class C beta-lactamase activity in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 561–567 (2000)
57. Langaee T.Y., Dargis M., Huletsky A.: An *ampD* gene in *Pseudomonas aeruginosa* encodes a negative regulator of AmpC beta-lactamase expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 3296–3300 (1998)
58. Leclercq R.: Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin. Infect. Dis.* **34**, 482–492 (2002)
59. Leclercq R., Courvalin P.: Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2727–2734 (2002)
60. Li X.-Z., Nikaido H.: Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. *Drugs*, **69**, 1555–1623 (2009)
61. Lister P.D., Wolter D.J., Hanson N.D.: Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 582–610 (2009)
62. Long K.S., Poehlsaard J., Kehrenberg C., Schwarz S., Vester B.: The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2500–2505 (2006)
63. Long K.S., Vester B.: Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 603–612 (2012)
64. Lonks J.R., Goldmann D.A.: Telithromycin: a ketolide antibiotic for treatment of respiratory tract infections. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 1657–1664 (2005)
65. MacNair C.R., Stokes J.M., Carfrae L.A., Fiebig-Comyn A.A., Coombes B.K., Mulvey M.R., Brown E.D.: Overcoming *mcr-1* mediated colistin resistance with colistin in combination with other antibiotics. *Nat. Commun.* **9**, 1–8 (2018)
66. Malinga L.A., Stoltz A., Walt M.v.d.: Efflux pump mediated second-line tuberculosis drug resistance. *Mycobact. Dis.* **6**, 1–9 (2016)
67. Martinez-Martinez L., Pascual A., Jacoby G.A.: Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, **351**, 797–799 (1998)
68. Miller W.R., Bayer A.S., Arias C.A.: Mechanism of action and resistance to daptomycin in *Staphylococcus aureus* and Enterococci. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a026997 (2016)
69. Miller W.R., Munita J.M., Arias C.A.: Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **12**, 1221–1236 (2014)
70. Mingeot-Leclercq M.P., Glupczynski Y., Tulkens P.M.: Aminoglycosides: Activity and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 727–737 (1999)
71. Moffatt J.H., Harper M., Harrison P., Hale J.D.F., Vinogradov E., Seemann T., Henry R., Crane B., Michael F.S., Cox A.D. et al.: Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4971–4977 (2010)
72. Nilsson A.I., Berg O.G., Aspevall O., Kahlmeter G., Andersson D.I.: Biological costs and mechanisms of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2850–2858 (2003)
73. Noskin G.A.: Tigecycline: a new glycolcycline for treatment of serious infections. *Clin. Infect. Dis.* **41 Suppl 5**, S303–314 (2005)
74. O'Neill J.: Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. . Review on Antimicrobial Resistance, (2014)
https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf (26.11.2019)
75. Ojo K.K., Striplin M.J., Ulep C.C., Close N.S., Zittle J., Luis H., Bernardo M., Leitao J., Roberts M.C.: *Staphylococcus efflux msr(A)* gene characterized in *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, and *Pseudomonas* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1089–1091 (2006)
76. Olaitan A.O., Morand S., Rolain J.M.: Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* **5**, 643 (2014)
77. Olson M.W., Ruzin A., Feyfant E., Rush T.S., 3rd, O'Connell J., Bradford P.A.: Functional, biophysical, and structural bases for antibacterial activity of tigecycline. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2156–2166 (2006)
78. Pages J.M., Lavigne J.P., Leflon-Guibout V., Marcon E., Bert E., Noussair L., Nicolas-Chanoine M.H.: Efflux pump, the masked side of beta-lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *PLoS One*, **4**, e4817 (2009)
79. Perez F., Bonomo R.A. i wsp.: OqxAB, a quinolone and olamoxindox efflux pump, is widely distributed among multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates of human origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 4602–4603 (2013)
80. Perichon B., Courvalin P.: VanA-Type Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 4580–4587 (2009)
81. Poole K.: Efflux-Mediated Resistance to Fluoroquinolones in Gram-Negative Bacteria *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2233–2241 (2000)
82. Queenan A.M., Bush K.: Carbapenemases: the Versatile B-Lactamases *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 440–458 (2007)
83. Ramirez M.S., Tolmasky M.E.: Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist. Updat.* **13**, 151–171 (2010)
84. Rodriguez-Verdugo A., Gaut B.S., Tenaillon O.: Evolution of *Escherichia coli* rifampicin resistance in an antibiotic-free environment during thermal stress. *BMC Evol. Biol.* **13**, 50 (2013)
85. Schwendener S., Cotting K., Perreten V.: Novel methicillin resistance gene *mecD* in clinical *Macrococcus caseolyticus* strains from bovine and canine sources. *Sci. Rep.* **7**, 43797 (2017)
86. Sharkey L.K.R., Edwards T.A., O'Neill A.J.: ABC-F proteins mediate antibiotic resistance through ribosomal protection. *mBio*, **7**, e01975–15 (2016)

87. Shen Z.Q., Wang Y., Shen Y.B., Shen J.Z., Wu C.M.: Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. *Lancet Infect. Dis.* **16**, 293–293 (2016)
88. Sothivelvam S., Mankin A.S. i wsp.: Macrolide antibiotics allosterically predispose the ribosome for translation arrest. *PNAS USA*, **111**, 9804–9809 (2014)
89. Straus S.K., Hancock R.E.W.: Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *BBA-Biomembranes*, **1758**, 1215–1223 (2006)
90. Sun J., Liu Y.H. i wsp.: Plasmid-encoded *tet(X)* genes that confer high-level tigecycline resistance in *Escherichia coli*. *Nat. Microbiol.* **4**, 1457–1464 (2019)
91. Sun Y., Cai Y., Liu X., Bai N., Liang B., Wang R.: The emergence of clinical resistance to tigecycline. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **41**, 110–116 (2013)
92. Takahata S., Ida T., Hiraishi T., Sakakibara S., Maebashi K., Terada S., Muratani T., Matsumoto T., Nakahama C., Tomono K.: Molecular mechanisms of fosfomicin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **35**, 333–337 (2010)
93. Tran T.T., Munita J.M., Arias C.A.: Mechanisms of drug resistance: daptomycin resistance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1354**, 32–53 (2015)
94. Truong-Bolduc Q.C., Wang Y., Hooper D.C.: Tet38 Efflux Pump Contributes to Fosfomicin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, e00927–18 (2018)
95. van Hoek A.H.A.M., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A.P., Aarts H.J.M.: Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front. Microbiol.* **2**, 203 doi: 10.3389/fmicb.2011.00203 (2011)
96. Villa L., Feudi C., Fortini D., Garcia-Fernandez A., Carattoli A.: Genomics of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 512 Clone Highlights the Role of RamR and Ribosomal S10 Protein Mutations in Conferring Tigecycline Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 1707–1712 (2014)
97. Volkens G., Palm G.J., Weiss M.S., Wright G.D., Hinrichs W.: Structural basis for a new tetracycline resistance mechanism relying on the TetX monooxygenase. *FEBS Lett*, **585**, 1061–1066 (2011)
98. Wang M., Guo Q., Xu X., Wang X., Ye X., Wu S., Hooper D.C., Wang M.: New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1892–1897 (2009)
99. Wang X., Wang Y., Zhou Y., Li J., Yin W., Wang S., Zhang S., Shen J., Shen Z., Wang Y.: Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg. Microbes Infect.* **7**, 122 (2018)
100. Wang Y., Li X., Wang Y., Schwarz S., Shen J., Xia X.: Intracellular accumulation of linezolid and florfenicol in *oprA*-producing *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, **23**, e3195 (2018)
101. Wang Y., Shen J. i wsp.: A novel gene, *oprA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 2182–2190 (2015)
102. Wasyl D., Hoszowski A., Zajac M.: Prevalence and characterisation of quinolone resistance mechanisms in *Salmonella* spp. *Vet Microbiol*, **171**, 307–314 (2014)
103. Wilson D.N., Schluenzen F., Harms J.M., Starosta A.L., Connell S.R., Fucini P.: The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *PNAS USA*, **105**, 13339–13344 (2008)
104. Wolter N., Smith A.M., Farrell D.J., Northwood J.B., Douthwaite S., Klugman K.P.: Telithromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* is conferred by a deletion in the leader sequence of *erm(B)* that increases rRNA methylation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 435–440 (2008)
105. Wong M.H., Chen S.: First detection of *oqxAB* in *Salmonella* spp. isolated from food. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 658–660 (2013)
106. World Health Organization.: Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision 2018. 1–45 (2019)
107. Xavier B., Lammens C., Ruhel R., Kumar-Singh S., Butaye P., Goossens H., Malhotra-Kumar S.: Identification of a novel plasmid-mediated colistin resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill.* **21**, e30280 (2016)
108. Xia R., Guo X., Zhang Y., Xu H.: *qnrVC*-like gene located in a novel complex class 1 integron harboring the ISCR1 element in an *Aeromonas punctata* strain from an aquatic environment in Shandong Province, China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3471–3474 (2010)
109. Yamane K., Wachino J., Suzuki S., Kimura K., Shibata N., Kato H., Shibayama K., Konda T., Arakawa Y.: New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3354–3360 (2007)
110. Yang Y.Q., Li Y.X., Lei C.W., Zhang A.Y., Wang H.N.: Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **73**, 1791–1795 (2018)
111. Yin W., Zhang R., Li H., Shen Y., Walsh T.R., Liu Z., Shen J., Wang S., WangmBio Y., 8:e00543–17: Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio*, **8**, e00543–00517 (2017)
112. Yu Z., Qin W., Lin J., Fang S., Qiu J.: Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. *Biomed Res. Int.* **2015**, 679109 (2015)
113. Zhanel G.G., Karlowsky J.A., Rubinstein E., Hoban D.J.: Tigecycline: a novel glycylicycline antibiotic. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **4**, 9–25 (2006)
114. Zhang T.H., Muraih J.K., Tishbi N., Herskowitz J., Victor R.L., Silverman J., Uwumarenogie S., Taylor S.D., Palmer M., Mintzer E.: Cardiolipin Prevents Membrane Translocation and Permeabilization by Daptomycin. *J. Biol. Chem.* **289**, 11584–11591 (2014)