

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Rozšíření a formy tetracyklinové rezistence
v životním prostředí**

Tereza Hucková

Školitelka: RNDr. Irena Lichá, CSc.

Praha, 2008

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně s použitím uvedených zdrojů a souhlasím s jejím eventuálním zveřejněním v tištěné nebo elektronické podobě.

V Praze dne 22.4.2008

.....

Tereza Hucková

Děkuji své školitelce RNDr. Ireně Liché, CSc. za vedení této práce, trpělivost a čas, který mi věnovala při odborných konzultacích.

ABSTRAKT

Tetracykliny inhibují elongační fázi syntézy proteinů vazbou na 30S podjednotku ribozomu u velkého množství gram pozitivních i gram negativních bakteriálních druhů. Rezistence vůči tetracyklinu je jednou z nejrozšířenější v životním prostředí a od 50. let 20. století má stoupající tendence. Základními mechanismy rezistence jsou efluxní systém, ochrana ribozomů cytoplazmatickým proteinem a enzymatická inaktivace tetracyklinu. Rezistentní *tet* geny jsou nalézány v různých druzích bakterií izolovaných z člověka, zvířat i životního prostředí. Většina těchto genů je asociována s dalšími mobilními elementy. Mezi nejvíce rozšířené rezistentní geny patří *tet(M)* a *tet(B)*. Tato práce shrnuje dosud známé mechanismy rezistence a rozšíření rezistentních genů v životním prostředí.

KLÍČOVÁ SLOVA

Tetracyklin, rezistence, efluxní geny, RPP, *tet* geny, enzymatická inaktivace, antibiotikum, bakterie

ABSTRACT

Tetracyclines are able to inactivate the elongation phase of the protein synthesis in the wide range of gram-positive and gram-negative bacterial species by binding to the 30S subunit of ribosome. The resistance to tetracycline is one of the most widespread resistances to antibiotics over the environment and from the middle of the 20th century is still increasing. The basic mechanism of tetracycline resistance is the tetracycline efflux, ribosome protection and tetracycline modification. The *tet* genes can be found in various bacteria isolated from humans, animals, and also from the environment. Moreover, most of the *tet* genes are associated with other mobile genetic elements. The most extended genes are *tet(M)* and *tet(B)* genes. This bachelor thesis summarises the known resistance mechanisms and describes the extension of resistant genes incident in the environment.

KEYWORDS

Tetracycline, resistance, efflux genes, RPP, *tet* genes, Enzymatic inactivation, antibiotic, bacteria

Obsah:

1. Seznam zkratk	6
2. Úvod	7
3. Tetracyklin	8
2.1 Průchod membránou	9
4. Rezistence k tetracyklinu	11
4.1 Nomenklatura rezistentních determinantů	12
4.2 Efluxní proteiny	12
4.3 Ribozomální protekční proteiny	15
4.4 Enzymatická inaktivace tetracyklinů	17
4.5 Další mechanismy rezistence	18
5. Regulace rezistence genovou expresí	19
5.1 Efluxní geny	19
5.2 Ochrana ribozomů	21
6. Distribuce a mobilita <i>tet</i> genů	23
6.1 Půdní prostředí	25
6.2 Vodní prostředí	27
6.3 Lidské izoláty	28
7. Závěr	30
8. Použitá literatura	31

1. SEZNAM ZKRATEK

70S, 30S	Sedimentační konstanty ribozomu
CtnDOT	Konjugativní transpozon <i>Bacteroides</i>
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EF-G	Translační elongační faktor G
EF-Tu	Translační elongační faktor (elongation factor thermo unstable)
<i>erm</i> (F)	Gen pro rRNA metylázu
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAD	Flavin adenin dinukleotid
FADH ₂	Redukovaná forma FAD
GDP	Guanosintrifosfát
GTP	Guanosindifosfát
In-1	Integron třídy I
IS	Inzerční element
MFP	Membrane fusion protein
MFS	Major facilitator superfamily
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
OmpC, OmpF	Porinový protein (outer membrane protein C, F)
OMF	Outer membrane protein
ORF	Otevřený čtecí rámec (open reading frame)
<i>otr</i>	Gen oxytetracyklinové rezistence
pH	Vodíkový exponent (potential of hydrogen)
RBS	Ribozomální vazebné místo
RNA	Ribonukleová kyselina
RND	Resistance-nodulation-division family
RPP	Ribozomální protekční protein
rRNA	Ribozomální RNA
SD	Shine-Dalgarno sekvence
<i>S. rimosus</i>	<i>Streptomyces rimosus</i>
<i>tet</i>	Gen tetracyklinové rezistence
TH ₂	Protonovaná forma tetracyklinu
THMg	Komplex tetracyklin a magnesium
Tn916	Konjugativní transpozon Tn916
tRNA	Transferová RNA
ΔG	Změna Gibbsovy volné energie

2. ÚVOD

Problémy spojené s přítomností bakterií rezistentních k antibiotikům dosáhly v nedávných letech epidemických proporcí a jejich rozšíření v prostředí je závislé na přítomnosti a transferu rezistentních genů mezi mikroorganismy, mutacích a selekčním tlaku. Právě selekční tlak je nutný k udržení rezistentních genů v populaci (Bryan *et al.*, 2004). Vysoký podíl rezistentních organismů v životním prostředí má také přímou souvislost s intenzivním užitím antibiotik v lékařské a veterinární praxi během posledních šedesáti let.

Během 50. a 60. let 20. století byl tetracyklin jedním z nejvíce používaných antibiotik. Vzhledem k jeho příznivým antimikrobiálním účinkům a absenci závažných vedlejších účinků se začal intenzivně používat při léčbě lidských i zvířecích infekcí (Bauer *et al.*, 2004) a na subterapeutické úrovni se začal přidávat do zvířecích pokrmů jako růstový faktor. Příznivý účinek na růst zvířat byl poprvé pozorován při přidání chlortetracyklinu (Stockstad *et al.*, 1949). Následně se začal intenzivně přidávat oxytetracyklin a chlortetracyklin do pokrmu prasat a skotu. Zvláště při tomto subterapeutickém použití dochází v gastrointestinálním traktu zvířat k selekci rezistentních druhů bakterií.

Rezistence byla poprvé detekována v 50. letech a stala se ještě více zřejmou v 70. letech 20. století. Do dnešní doby byly determinanty rezistentní vůči tetracyklinu identifikovány u více než 39 gramnegativních a 22 grampozitivních druhů bakterií a užívání tetracyklinů i dalších antibiotik jako růstových faktorů se stává stále více kontroverzní, neboť může přispět ke vzniku rezistence u lidských patogenů (Sawant *et al.*, 2007).

Tato práce mapuje známé mechanismy rezistence k tetracyklinu u gramnegativních a grampozitivních bakterií na molekulární úrovni. Dalším tématem je rozšíření tetracyklinové rezistence v prostředí a mobilita genů.

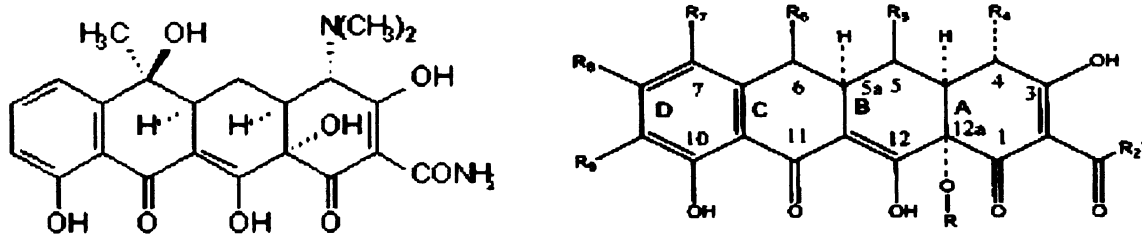
3. TETRACYKLINY

Tetracykliny byly objeveny ve 40. letech 20. století. Tyto široko-spektré agens vykazují aktivitu proti širokému množství grampozitivních i gramnegativních bakterií, atypickým organismům, mykoplasmám, rickettsiím a protozoálním parazitům. Intenzivně jsou používány od 50. let 20. století a mnoho bakteriálních patogenů získalo k tetracyklinu rezistenci (Connel *et al.*, 2003).

Tato rodina antibiotik inhibuje proteosyntézu mikroorganismů tím, že vazbou na 30S podjednotku ribozomu (Manavathu *et al.*, 1990) zastavuje elongační fázi translace. Konkrétně, zabraňuje připojení aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) k ribosomálnímu akceptoru - A místu. Na 30S podjednotce ribozomu bylo nalezeno 6 vazebných míst pro tetracyklin bez výrazných strukturních podobností (Piolletti *et al.*, 2001). Je možné, že ribosomální proteiny, hlavně S7 protein, a některé báze 16 rRNA tvoří část vazebného místa tetracyklinu (Connell *et al.*, 2003).

Prvními popsanými členy tetracyklinové rodiny byly chlortetracyklin a oxytetracyklin, které jsou produkovány *Streptomyces aureofaciens* respektive *S. rimosus*. Další tetracykliny byly identifikovány později, buď jako přirozeně se vyskytující molekuly (tetracyklin z *S. aureofaciens*, *S. rimosus* a *S. viridofaciens*, demetylchlortetracyklin z *S. aureofaciens*) nebo jako produkty semisyntetických metod (např. methacyklin, doxycyklin a minocyklin) (Chopra, 1994). Nedávno objevenými tetracykliny je semisyntetická skupina glycylycyklinů, které jsou nazývány tetracykliny 3. generace (Tally *et al.*, 1995). Tato práce se primárně zabývá rezistencí k tetracyklinu.

Molekula tetracyklinu zahrnuje lineární tetracyklické jádro, ke kterému jsou připojeny funkční skupiny (obr. 1).



Obr. 1: Obecná struktura tetracyklinů (vlevo) a molekula tetracyklinu (vpravo). Převzato Chopra&Roberts, 2001.

Nejdůležitějším prvkem pro antimikrobiální aktivitu je právě zachování lineárně fúzovaného tetracyklu na pozici 4a, 12a, 4 a konzervace keto-enol systému (pozice 11, 12 a 12a) v blízkosti fenolického D kruhu. Tetracykliny jsou silná chelační agens a obě jejich vlastnosti, antimikrobiální a farmakokinetické, jsou ovlivněné chelačními kovovými ionty. Chelační místo zahrnuje β -diketonový systém (pozice 11, 12), enolovou (pozice 1, 3) a karboxamidovou (pozice 2) skupinu na A kruhu (Blackwood, 1985; in Chopra&Roberts, 2001).

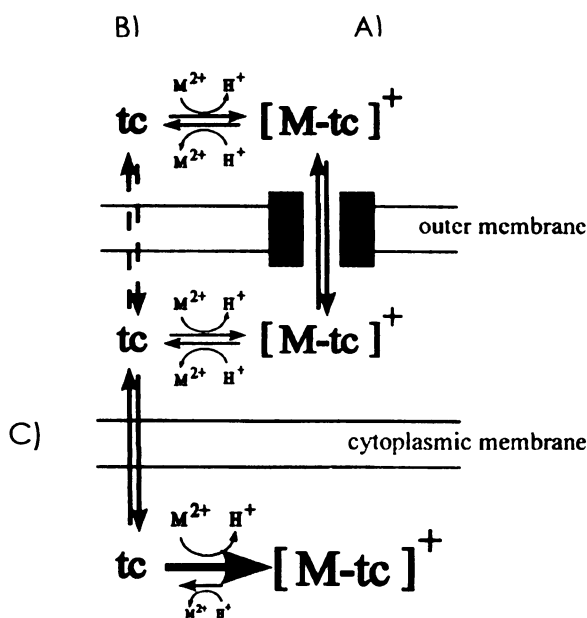
Vzhledem k absenci antieukaryotické aktivity mají tetracykliny selektivní antimikrobiální vlastnosti. Na molekulární úrovni je to způsobeno relativně slabou inhibicí proteosyntézy díky přítomnosti 80S podjednotky eukaryotického ribozomu a nízkou akumulací v savčích buňkách. Na druhé straně, vzhledem k přítomnosti 70S podjednotky, na kterou se tetracyklin může navázat, inhibuje mitochondriální proteosyntézu. Antimikrobiální aktivita je tedy v některých případech (např. *Plasmodium falciparum*) zapříčiněna přítomností mitochondrií v buňce (Pradines *et al.*, 2001).

Některé analogy tetracyklinu (např. chelokardin, anhydrotetracykliny), nazývané atypické tetracykliny, mají schopnost přímo rozrušit bakteriální cytoplazmatickou membránu. Tato vlastnost souvisí s relativní planaritou B, C a D kruhu, takže převládá lipofilní, neionizovaná molekula (Oliva *et al.*, 1992). Na rozdíl od typických tetracyklinů jsou atypické tetracykliny baktericidní agens, ale vzhledem k vysokému množství vedlejších účinků nejsou tyto molekuly terapeutickými kandidáty. Jejich vedlejší účinky pravděpodobně souvisí se schopností nespecificky interagovat s eukaryotickou i prokaryotickou buněčnou membránou (Chopra, 1994).

3.1 PRŮCHOD MEMBRÁNOU

Aby mohli tetracykliny interagovat s cílovými molekulami, potřebují překonat jeden nebo více membránových systémů, jejichž počet závisí na tom, zda je citlivý organismus grampozitivní nebo gramnegativní. Tetracykliny se mohou nacházet v protonované formě (TH_2), která může difundovat fosfolipidovou dvojitou vrstvou, nebo ve formě komplexu tetracyklin-magnezium (THMg). Mezi cytoplazmou a vnějším prostředím dochází v přítomnosti iontů magnezia (Mg^{2+}) k ustanovení rovnováhy mezi protonovanou formou TH_2 a komplexem THMg . Tato rovnováha je závislá na pH a koncentraci Mg^{2+} . Vyšší pH a vyšší koncentrace magnezia mají za následek vyšší koncentraci komplexu THMg (Yamaguchi *et al.*, 1991).

U gramnegativních bakterií prochází kladně nabitý komplex THMg vnější membránou skrze porinové kanály OmpF a OmpC (obr. 2A). Tomuto průchodu napomáhá Donnanův potenciál, který usnadňuje průchod kationtů vnější bakteriální membránou. V periplazmě dochází k akumulaci tetracyklinu a díky nižšímu pH i k disociaci. Uvolněný nenabítený tetracyklin v periplazmě je slabě lipofilní molekula, která je schopna difuze skrze lipidovou dvojvrstvu vnitřní cytoplazmatické membrány bakterií a není závislá na proteinových kanálech (obr. 2C). Při difuzi tetracyklinu napříč vnitřní cytoplazmatickou membránou je vyžadována energie a celý přenos je poháněn ΔpH komponentou protonmotivní síly (Thanassi *et al.*, 1995). Po vstupu do cytoplazmy je tetracyklin pravděpodobně znovu chelatován. Chelataci dokládají hodnoty intracelulárního pH a koncentrace divalentních metalových iontů, které jsou vyšší, nežli hodnoty v periplazmě (Schnappinger&Hillen, 1996).



Obr 2. Vstup tetracyklinu do buňky.

Ve vnější membráně se nacházejí poriny (A), kterými vstupuje komplex tetracyklin-magnezium (M-tc)⁺ do bakteriální periplazmy. Tetracyklin (tc) může vnější membránou i penetrovat ve své elektricky neutrální formě (B). Vnitřní cytoplazmatickou membránou je tetracyklin schopen difundovat bez závislosti na proteinových kanálech (C) a po vstupu do cytoplazmy je tetracyklin znovu chelatován. Převzato z Schnappinger&Hillen, 1996.

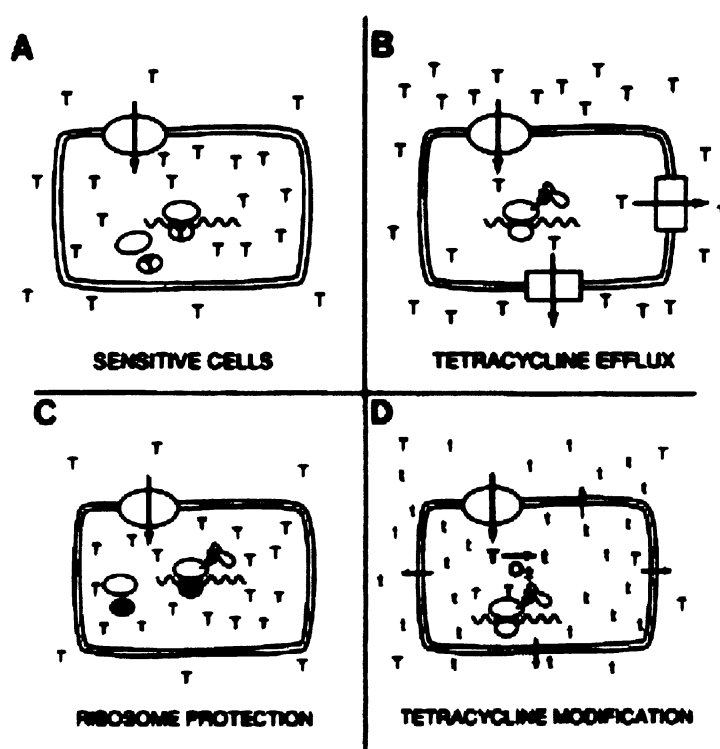
Cytoplazmatickou membránou je schopna penetrovat i elektricky neutrální forma tetracyklinu (obr. 2B) (Schnappinger&Hillen, 1996).

Je pravděpodobné, že aktivní formy, které se vážou na ribozom, jsou znovu THMg komplexy. Vzhledem k tomu, že tato vazba je vratná, působí tetracykliny pouze bakteriostaticky.

4. REZISTENCE K TETRACYKLINU

Rezistence k tetracyklinu je jednou z nejběžnějších bakteriálních antibiotikových rezistencí a první identifikovanou rezistentní bakterií byla v roce 1959 *Shigella dysenteriae* (Roberts, 1996).

Bakteriální rezistence k tetracyklinu je zprostředkována třemi hlavními mechanismy (obr. 3): i) energie-dependentní efluxní systém (Schnappinger&Hillen, 1996) ii) ochrana ribozomů velkým cytoplazmatickým proteinem (Manavathu *et al.*, 1990) iii) přímá enzymatická inaktivace tetracyklinu (Aminov *et al.*, 2001). Všechny tyto mechanismy rezistence byly nalezeny u klinických izolátů.



Obr. 3: Různé mechanismy tetracyklinové rezistence

- U citlivých buněk dochází k akumulaci tetracyklinu (T) a při dostatečně vysoké koncentraci dochází k vazbě tetracyklinu k ribozomu a zastavení translace.
- Bakterie nesoucí efluxní typ rezistence produkují cytoplazmatický membránový protein, který pumpuje tetracyklin ven z buňky takovou rychlostí, jakou prochází dovnitř buňky. To udržuje vnitřní koncentraci tetracyklinu tak nízkou, že nedochází k zastavení translace.
- Bakterie nesoucí ribozom protekční typ rezistence produkují cytoplazmatický protein, který interaguje s ribozomem a dovoluje pokračování translace i při vysoké intracelulární koncentraci tetracyklinu.
- Bakterie nesou gen, jehož produkt modifikuje molekulu tetracyklinu na inaktivní formu, která difunduje membránou ven z buňky. Tato reakce vyžaduje přítomnost NADPH a kyslíku. Převzato Speer, 1992.

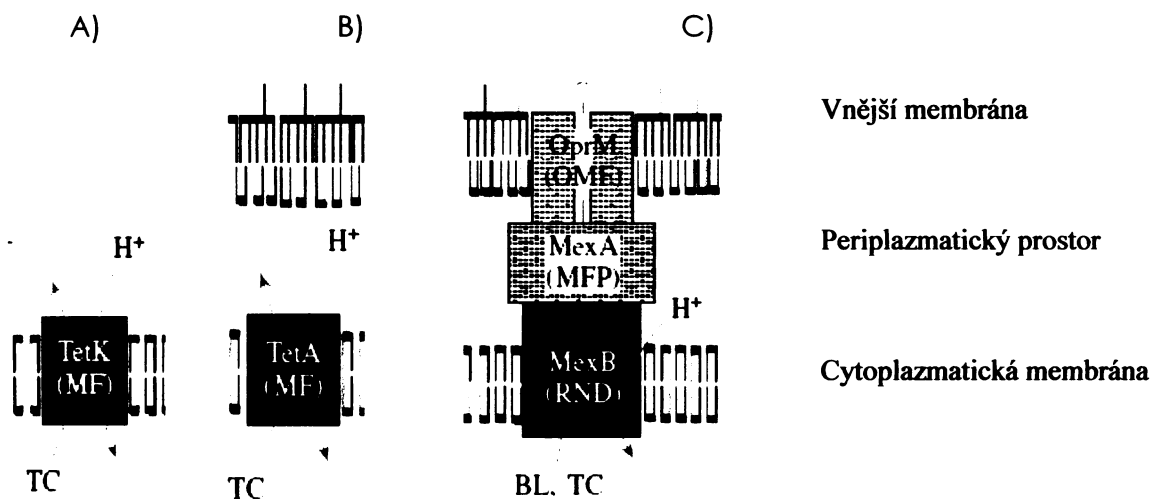
4.1 NOMENKLATURA REZISTENTNÍCH DETERMINANTŮ

V roce 1980 Mendez *et al.* jako první zkoumali genetickou heterogenitu determinantů tetracyklinové rezistence z rezistentních plazmidů (Tc^r) *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonadaceae*. Zatím bylo charakterizováno 35 různých genů tetracyklinové rezistence (*tet*), 3 geny oxytetracyklinové rezistence (*otr*) a 1 *tcr* gen (Cauwerts *et al.*, 2006). Mezi geny tetracyklinové a oxytetracyklinové rezistence není žádný podstatný rozdíl. Geny *tet* jsou nalézány v tetracyklin produkujících *Streptomyces* spp. a *otr* geny u *Mycobacterium* spp. (Pang *et al.*, 1994).

4.2 EFFLUXNÍ PROTEINY

Efluxní proteiny jsou nejlépe prostudované Tet proteiny a vyskytují se u gramnegativních i grampozitivních bakterií. Kódující geny patří do skupiny MFS (major facilitator superfamily) genů, jejichž produkty zahrnují přes více než 300 samostatných proteinů (Paulsen *et al.*, 1996).

Rodina MF exportérů (obr. 4A) je téměř vždy kódována geny přítomnými na mobilních genetických elementech (plazmidy, transpozony, integrony a IS elementy). Geny MF exportérů jsou často nalézány spolu s dalšími rezistentními geny, ačkoliv tyto geny jsou v organismech produkujících tetracyklin často kódovány chromozomálně (Poole, 2005).



Obr. 4: Schematické zobrazení zástupců efluxního systému u gramnegativních a grampozitivních bakterií, zobrazující různé typy pump zapojené v rezistenci k tetracyklinu. TC = tetracyklin; MF = major facilitator family; RND = resistance-nodulation-division family; MFP = membrane fusion protein; OMF = outer membrane factor; A) Efluxní pumpa grampozitivních bakterií lokalizovaná v cytoplazmatické membráně. B) Efluxní pumpa gramnegativních bakterií lokalizována v cytoplazmatické membráně. C) Efluxní multikomponentní pumpa gramnegativních bakterií, která překlenuje buněčný plášť. Převzato z Poole, 2005.

Exkluzivně u gramnegativních bakterií byly nalezeny multikomponentní efluxní proteiny, které protínají vnější i vnitřní bakteriální membránu (obr. 4B). U *E. coli* je efluxní aktivita tohoto typu spojena s tripartitní multidrogovou rezistentní pumpou AcrAB-TolC (de Cristóbal *et al.*, 2006). Tyto multidrogové efluxní pumpy, a hlavně ty patřící k RND (resistance-nodulation-division) rodině, hrají hlavní roli v ustanovení „vlastní nebo získané“ rezistence gramnegativních bakterií k velkému množství toxických sloučenin zahrnujících antibiotika (Poole, 2004; Perez *et al.*, 2007).

Dosud známé efluxní geny v tabulce č. 1 kódují proteiny asociované s membránou o velikosti přibližně 46 kDa. Tyto proteiny exportují tetracyklin z bakteriální buňky a základem mechanismu je výměna protonu H⁺ za komplex THMg proti koncentračnímu gradientu. Export snižuje intracelulární koncentraci tetracyklinu na velmi nízkou úroveň, při které nedochází k zastavení translace (Yamaguchi *et al.*, 1999; Vila *et al.*, 2007).

Tab. 1: Efluxní systém
Převzato z Poole 2005

Efluxní systém	Pumpa	Lokace genu	Organismus
Tet(A), Tet(B), Tet(C), Tet(D) Tet(E), Tet(G), Tet(H), Tet(I), Tet(J) Tet(Y), Tet(Z), Tet(30), Tet(39)	MF	Plazmid	Gramnegativní bakterie
Tet(K), Tet(L)	MF	Plazmid	Grampozitivní bakterie
Tet38	MF	Chromozom	<i>S. aureus</i>
Tet(V)	MF	Chromozom	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. fortuitum</i>
MdfA MexAB-OprM, další tříkomponentní pumpy RND rodiny	MF	Chromozom	<i>E. coli</i>

Proteiny byly rozděleny do šesti skupin na základě homologie sekvence aminokyselin (tab. 2). První skupina zahrnuje Tet(A), Tet(B), Tet(C), Tet(D), Tet(E), Tet(G), Tet(H), Tet(Z) a pravděpodobně Tet(I), Tet(J), Tet(30) a Tet(39). Z této skupiny byl pouze Tet(Z) nalezen i u grampozitivních bakterií a byl prvním popsáním grampozitivním efluxním proteinem, který je regulován represorovým proteinem (Tauch *et al.*, 2000). Gen *tet(I)* nebyl zatím sekvenován, ale fenotypové studie naznačují, že také kóduje efluxní pumpu (Gilliane *et al.*, 2004).

Tab. 2: Geny eflux-zprostředkované rezistence

<u>Geny</u>
Eflux
<i>tet(A), tet(B), tet(C), tet(D), tet(E), tet(G), tet(H), tet(I), tet(J), tet(Z), tet(30), tet(39)</i> <i>tet(K), tet(L)</i> <i>otr(B), tcr3¹</i> <i>tetA(P)</i> <i>tet(V)</i> <i>tet(Y)</i> <i>tet(38)</i> <i>tet(31)</i> <i>tet(33)</i>

¹ genu *tcr3* nebylo uděleno nové označení (vychází z označení plazmidu Tc^r)
Převzato z Chopra&Roberts 2001; Poole 2005

Zdá se, že mnoho efluxních proteinů je usazeno v lipidové dvojvrstvě a hydrofilní smyčky vyčnívají do periplazmy a cytoplazmatického prostoru. Syntéza některých (ale ne všech) gramnegativních efluxních pump je pevně regulována přítomností tetracyklinu. Při absenci tetracyklinu je exprese efluxních proteinů regulována represorovým proteinem Tet(R) (Yamaguchi, 1999; Ramos, 2005). Všechny efluxní geny gramnegativních bakterií mají dvě funkční domény, alfa a beta, které korespondují s N- a C- terminálními částmi proteinů (Rubin&Levy, 1991). Mutace v jakékoliv části proteinu eliminují rezistenci, což naznačuje, že rezidua roztroušená napříč proteinem jsou důležité pro jeho funkci (Chopra&Roberts, 2001).

Druhá skupina zahrnuje proteiny Tet(K) a Tet(L), které jsou primárně nalézány u grampozitivních bakterií. Tyto geny jsou nalézány hlavně na malých přenosných plazmidech, které se mohou inkorporovat do chromosomu stafylokoků, *B. subtilis* nebo do velkých stafylokokových plazmidů (Schwarz *et al.*, 1998).

Třetí skupina zahrnuje proteiny Otr(B) a Tcr3, oba nalezené v *Streptomyces*. (Pang *et al.*, 1994)

Čtvrtá skupina zahrnuje protein TetA(P) z *Clostridium* (Bannam&Rood, 1999).

Pátá skupina zahrnuje protein Tet(V) z *Mycobacterium smegmatis* (Chopra&Roberts, 2001).

Šestá skupina zahrnuje nepojmenované determinanty z *Corynebacterium striatum* a jeden protein, který nejspíše preferuje jako zdroj energie ATP nežli protonový gradient (McMurry&Levy, 2000; in Chopra&Roberts, 2001). Nověji popsány geny jsou *tet(Y)* identifikovaný u *E. coli*, *tet(31)* nalezený u *Aeromonas* a *tet(Z)* nalezený u *Corynebacterium* (Gilliane *et al.*, 2004).

Tetracyklinové efluxní proteiny vykazují podobnosti aminokyselinových sekvencí a podobnosti na úrovni struktury proteinů s dalšími efluxními a transportními proteiny (např. transport arabinosy pomocí proteinu AraB u *E. coli*) (Levy, 1992). Gramnegativní efluxní geny mají běžnou genetickou organizaci a vykazují vývojový vztah s regulačními proteiny.

4.3 RIBOZOMÁLNÍ PROTEKČNÍ PROTEINY

Tab. 3: Geny ribozomálních protekčních proteinů

Ochrana ribozomů
<i>tet(M), tet(O), tet(S), tet(W)</i>
<i>tet(Q), tet(T)</i>
<i>otr(A), tetB(P), tet(32), tet(36)</i>

Převzato Chopra, Roberts 2001.

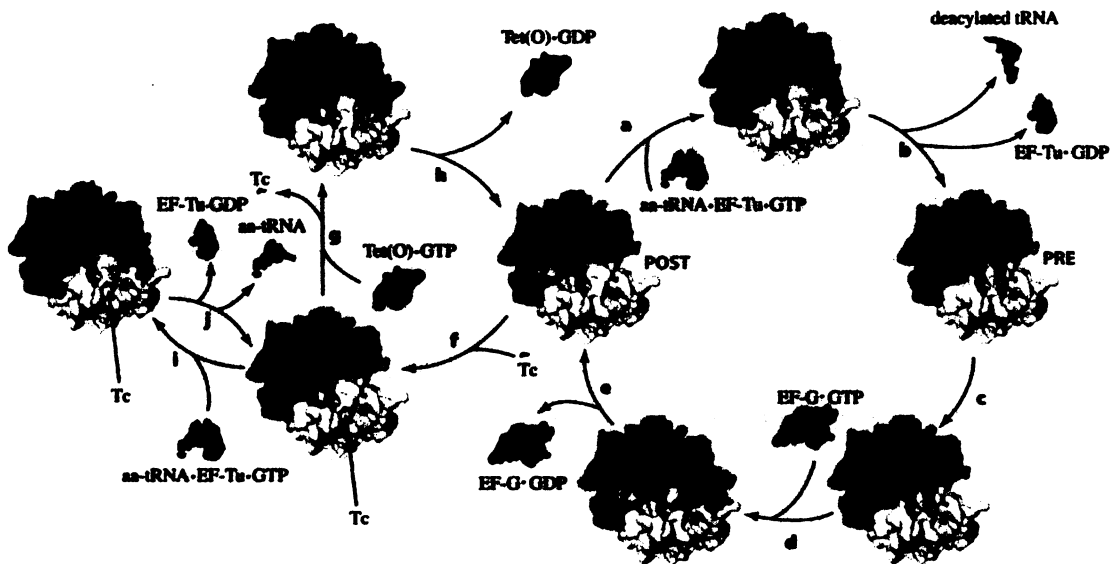
Ochrana ribozomů pomocí ribozomálních protekčních proteinů (RPP) je důležitým mechanismem pro tetracyklinovou rezistenci u grampozitivních a gramnegativních bakterií (Connell *et al.*, 2003). Ribozomální protekční proteiny jsou cytoplazmatické, ochraňují ribozomy před působením tetracyklinu a prokazují širší spektrum rezistence k tetracyklinu, než je viděno u bakterií nesoucí efluxní proteiny (Chopra&Roberts, 2001).

Ribozomální protekční proteiny mají homologii k elongačním faktorům EF-Tu a EF-G (Taylor&Chau, 1996). Kobayashi *et al.* (2007) se ve své studii zabývali evolučním původem RPP. Podle jejich výsledků nejspíše vznikly nezávisle na přítomnosti tetracyklinu a mohou sloužit i jiné funkci než rezistenci k antibiotikům. RPP (tab. 3) mohou poskytovat ochranu i proti dalším chemickým substancím v prostředí.

Nejlépe prostudovanými RPP jsou determinanty Tet(O) a Tet(M), které byly izolovány hlavně z *Campylobacter jejuni* a *Streptococcus spp.*, ačkoliv oba jsou široce distribuovány (Connell *et al.*, 2003). RPP vážou a hydrolyzují GTP ribozom-dependentním způsobem (Burdett, 1996; Connel, 2003). V přítomnosti Tet(M) nebo Tet(O) proteinu a GTP je omezována vazba tetracyklinu k ribozomu, ale k tomuto omezení nedochází v přítomnosti GDP nebo GMP (Trieber *et al.*, 1998). Vazbou RPP k ribozomu dochází ke změně ribozomální konformace, která zabrání vazbě tetracyklinu, aniž by došlo ke změně nebo zastavení translace. energii pro změnu konformace může poskytnout právě molekula GTP. Vzhledem k tomu, že RPP a elongační faktor EF-G mají překrývající se vazebná místa, musí RPP disociovat od ribozomu, aby se mohl navázat EF-G (Brodersen *et al.*, 2000; Connel, 2003).

Spahn *et al.* (2001) popsali model mechanismu tetracyklinové rezistence zprostředkovaný Tet(O) proteinem (Obr. 5 reakce f-j). Při nepřítomnosti tetracyklinu 70S podjednotka ribozomu postupuje přes různá stadia elongačního cyklu (Obr. 5 reakce a-e).

Obr.5: Dráha Tet(O) zprostředkované rezistence



Přirozený elongační cyklus je znázorněn reakcemi a až e. Při vazbě tetracyklinu (reakce f) vstupuje ribozom do neproduktivního cyklu, který je ilustrován reakcemi i a j. V tomto cyklu se snaží komplex aa-tRNA+EF-Tu+GTP vázat aktivovanou tRNA do A místa, které je inhibováno přítomností tetracyklinu. Protein Tet(O) je schopen ribozom odblokovat z neproduktivního cyklu uvolněním tetracyklinu z jeho vazby na 30S podjednotce (reakce g). Po uvolnění tetracyklinu, protein Tet(O) hydrolyzuje navázané GTP a uvolní se z ribozomu (reakce h). Tím se ribozom vrátí k přirozenému elongačnímu cyklu (převzato Spahn *et al.* 2001).

V přítomnosti tetracyklinu dochází k přerušení elongace a ribozom je blokován na posttranslokačním místě, protože následující A místo je inhibováno. Ačkoliv tato blokáce je pravděpodobně v důsledku přímé prostorové srážky mezi tetracyklinem a přicházející aa-tRNA, je možné, že vazba tetracyklinu k ribozomu (Obr. 5 reakce f) je doprovázena strukturálním přeskupením. Kontakt mezi proteinem Tet(O) a ribozomem je zprostředkován hlavně pomocí rRNA, s výjimkou jednoho kontaktu mezi doménou III proteinu Tet(O) a ribozomálního proteinu S12. (Spahn *et al.*, 2001). V roce 2002 Connel *et al.* prokázali dvě místa interakce Tet(O) a 16S podjednotky – nukleotidy C1214 a A1408.

Ačkoliv byly studovány hlavně proteiny Tet(M) a Tet(O), je předpokládáno, na základě podobnosti aminokyselinových sekvencí, že i další proteiny z rodiny RPP (Tet(S), Tet(T), Tet(Q), TetP(B), Tet(W) a Otr(A)) mají GTPázovou aktivitu a interagují s tetracyklinem a ribozomy podobným způsobem (Connel *et al.*, 2003).

Gen *tet(Q)* je podobně jako gen *tet(M)* často asociován s velkým konjugativním transpozonom, který nese gen *erm(F)* kódující metylázu rRNA a prokazující erytromycinovou rezistenci (Chung *et al.*, 1999). Tento transpozon nazvaný CTnDOT byl nalezen v mnoha druzích *Bacteroides* (Wang *et al.*, 2005). Vystříhnutí i transfer CTnDOT je stimulován tetracyklinem a obě funkce jsou zprostředkovány tří-genovým operonem, jež sestává z tetracyklin rezistentního genu *tetQ*, a třech regulačních genů (Wang *et al.*, 2005). Regulační geny zahrnují domnělý senzor *rte(A)*, domnělý regulátor *rte(B)* a *rte(C)*, který stimuluje transfer dosud neznámým způsobem. Rte(A) a Rte(B) jsou nejspíše členy dvoukomponentního regulačního systému a kontrolují expresi genu *rte(C)* (Whittle *et al.*, 2002).

V roce 2003 Whittle *et al.* identifikovali gen *tet(36)* prokazující tetracyklinovou rezistenci u *E. Coli* a dalších *Bacteroides*. Protein Tet(36) je v *E.coli* funkční, pokud je vybavena příslušnou promotorovou sekvencí. Transfer *tet(36)* nebyl v laboratorních podmínkách prokázán, ale je možné, že je nesen na CTn nebo jiných integračních elementech.

4.4 ENZYMATICKÁ INAKTIVACE TETRACYKLINU

Gen *tet(X)* je příkladem rezistence vůči tetracyklinu následkem enzymatické alterace tetracyklinu. Byly popsány 2 těsně související anaerobní *Bacteroides* transpozony obsahující gen *tet(X)*, který je často spojen s genem *erm(F)*. Při sekvenční analýze byla zjištěna aminokyselinová homologie proteinu s dalšími NADPH-dependentními oxidoreduktázami (Speer *et al.*, 1991). Později byl protein Tet(X) charakterizován jako flavin-dependentní monooxygenáza, která místně specificky degraduje tetracyklin a vyžaduje pro své působení NADPH a kyslík (Young *et al.*, 2004). Podle Younga *et al.* (2004) přítomnost prostetické skupiny – flavinu – naznačuje, že inaktivace tetracyklinu může být výsledkem reduktivního transferu elektronů nebo hydroxylační reakce. Vzhledem k nutnosti přítomnosti NADPH a kyslíku dochází pravděpodobně k redukci flavinového kofaktoru pomocí NADPH na FADH₂. Následuje reakce kyslíku s výsledným elektron-bohatým produktem (isoaloxazinem) na formu reaktivního FAD-4a-hydroxyperoxidu. Tetracyklinová inaktivace je tedy spuštěna místně specifickou hydroxylací.

4.5 DALŠÍ MECHANISMY REZISTENCE

Gen *tet(U)* prokazuje tetracyklinovou rezistenci nízké úrovně (Ridenhour *et al.*, 1996). Tento gen kóduje protein obsahující 105 aminokyselin, který je menší než efluxní i ribozomální protein. Existuje 21% podobnost těchto aminokyselin mezi proteiny Tet(U) a Tet(M). Tyto podobnosti nezahrnují shodu GTP-vázající sekvence, která hraje roli v rezistenci u *tet(M)* a příbuzných genů (Chopra&Roberts, 2001).

Mechanismus rezistence *otr(C)* genu ze *Streptomyces*, není známý, neboť nebyl dosud sekvenován (Roberts, 2002).

Unikátní determinant tetracyklinové rezistence, Tet(P), z *Clostridium* sestává ze dvou překrývajících se genů. První, *tetA(P)*, kóduje klasickou efluxní pumpu, a druhý, *tetB(P)*, kóduje protein související s RPP a s vysokou úrovní podobnosti s genem *tet(M)*. Žádný další gen s touto organizací nebyl dosud popsán. I po separaci *tetB(P)* je samotné *tetA(P)* funkční (Bannam&Rood, 1999; Bannam *et al.*, 2004).

U *Helicobacter pylori* není tetracyklinová rezistence spojována s efluxními geny nebo geny ribozomální ochrany, ale s mutací 16S rRNA genu (Nonaka *et al.*, 2005). 16S rRNA je součástí 30S ribozomální podjednotky, která je cílovým místem tetracyklinu. Tento typ rezistence byl poprvé popsán u *Propionobacterium acnes* u něhož byla pozorována mutace G→C na pozici 1058. (Ross *et al.*, 1998; Nonaka *et al.*, 2005). U *H. pylori* je tripl mutace (pozice 965 až 967) lokalizována na smyčce helixu 31, který je komponentou primárního vazebného místa pro tetracyklin. Touto mutací dochází ke snížení afinity ribozomu k tetracyklinu (Dailidienne *et al.*, 2002). Nicméně zatím není známo jak častá je tato mutace a jaká je její klinická důležitost.

Další možností rezistence je alterace porinových proteinů (např. OmpF) u gramnegativních bakterií. Alterace limituje možnost difuze tetracyklinu do periplazmy a snižuje citlivost bakterií k tetracyklinu 16krát až 18krát (Cohen *et al.*, 1989; Speer *et al.*, 1992).

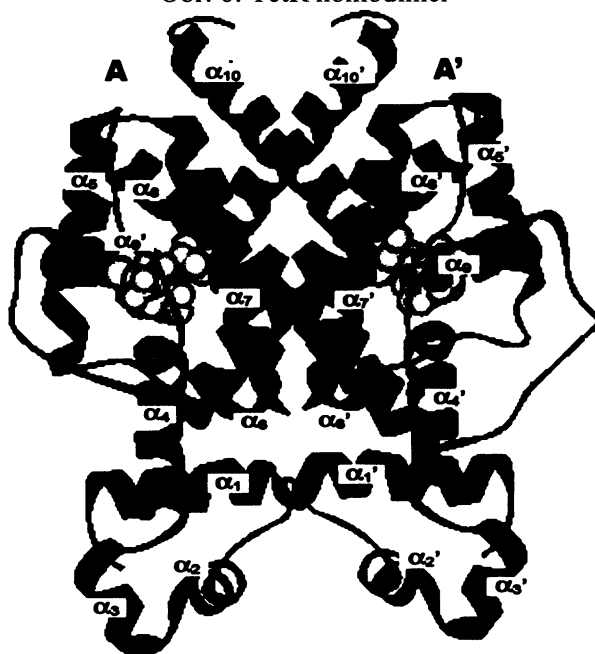
..

5. REGULACE REZISTENCE GENOVOU EXPRESÍ

5.1 EFLUXNÍ GENY

Efluxní determinanty gramnegativních bakterií sestávají ze dvou genů, první kóduje efluxní protein TetA a druhý kóduje represorový protein TetR (Yamaguchi, 1999; Chopra&Roberts, 2001). Oba tyto geny jsou regulovány tetracyklinem (Schnappinger *et al.*, 1998), orientovány divergentně a sdílejí centrální regulační oblast s překrývajícími se promotory a operátory (Ramos *et al.*, 2005). Homodimer Tet(R) (obr. 6) se váže k operátorům, které se nachází v intergenové oblasti mezi geny *tet(R)* a *tet(A)*. Vzhledem k tomu, že operátory překrývají promotory genů *tet(R)* a *tet(A)*, dochází k blokaci exprese obou genů (Ramos *et al.*, 2005). Indukce systému nastává při vstupu komplexu THMg do buňky a jeho vazbě na represorový protein. Touto vazbou dojde ke změně konformace represoru, který se už nemůže vázat na DNA oblast operátoru a tím k transkripci obou genů.

Obr. 6: TetR homodimer

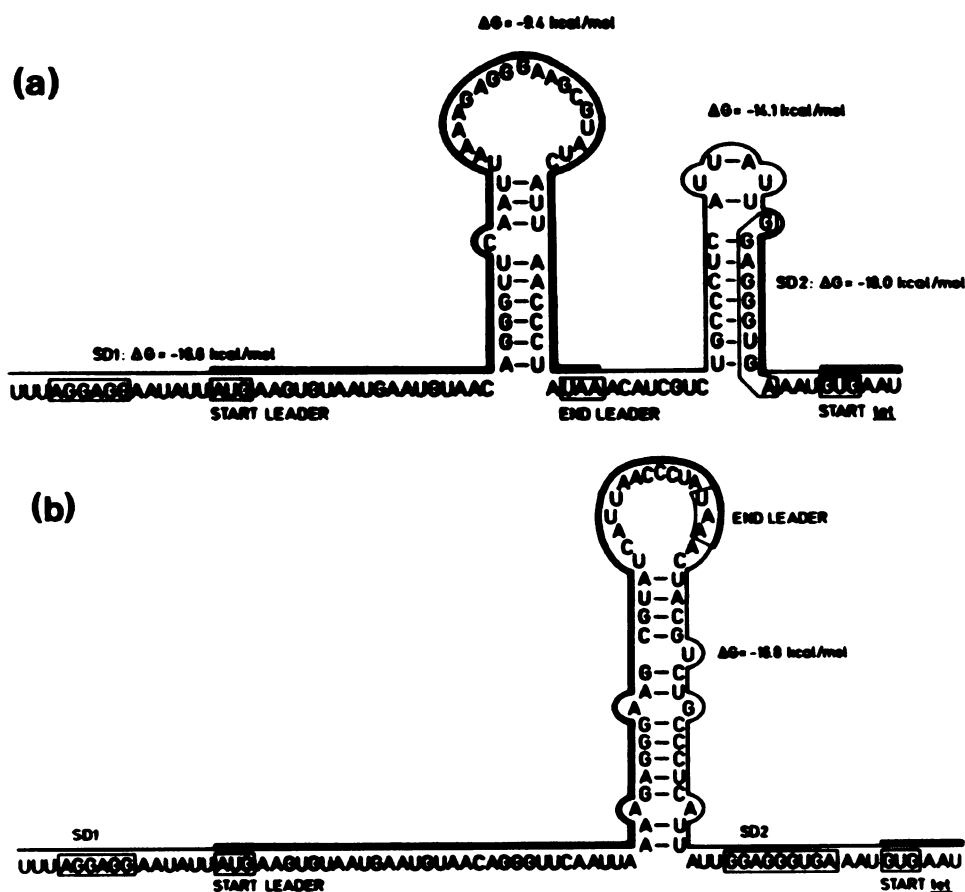


Monomery jsou odlišeny barevně – červená, modrá. Dvě tetracyklinové molekuly, každá se váže k monomeru, jsou zobrazeny šedou barvou. Alfa-šroubovice 2 a 3 a analogicky 2' a 3' představují společnou HTH (helix-turn-helix) DNA-vazebnou doménu. (převzato z Ramos *et al.* 2005).

Pokud je koncentrace tetracyklinu nižší než nanomolární, může se represorový protein znovu navázat na DNA. Tento typ regulace se pravděpodobně vyskytuje u gramnegativních efluxních genů *tet(A)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, a pravděpodobně i u *tet(I)* genu (Chopra&Roberts, 2001).

Odlíšným mechanismem je regulována exprese u grampozitivních rezistentních genů *tet(K)* a *tet(L)*, u kterých nebyl nalezen žádný represorový protein. Regulace těchto genů je pravděpodobně založena na mechanismu translační atenuace. Nad plazmidovým genem *tet(L)* se nalézá leader sekvence s potencionálními smyčkami mRNA se dvěmi vazebnými místy pro ribozom (RBS). Jedna ze smyček překrývá mRNA pro leader peptid a druhá smyčka zakrývá RBS pro strukturální gen (Schwarz *et al.*, 1992). V nepřítomnosti tetracyklinu se ribozom váže na první vazebné místo RBS1, poté je translatován krátký leader peptid a translace končí před vazebným místem RBS2 (obr. 7a).

Obr. 7: Pravděpodobná stem-loop konfigurace mRNA transkribovaná z *tet(L)* kontrolního regionu



- Možná sekundární struktura mRNA v nepřítomnosti tetracyklinu. $\Delta G = -9,4$ kcal/mol, $\Delta G = -16,1$ kcal/mol
- Možná sekundární struktura mRNA v přítomnosti tetracyklinu. $\Delta G = -16,8$ kcal/mol

SD = Shine-Dalgarno sekvence = RBS. ORF (otevřený čtecí rámeček) je znázorněn černou silnější čarou. Start a stop kodony jsou ohraničeny rámečkem. Převzato Schwarz *et al.*, 1992

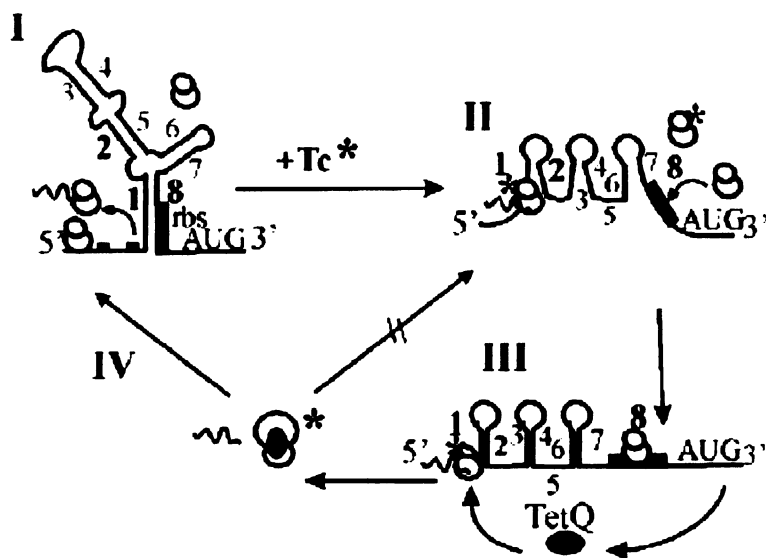
Naopak v přítomnosti tetracyklinu jsou ribozomy pravděpodobně zastaveny během translace leader peptidu. Zastavení může vést ke konformační změně mRNA na termodynamicky více stabilní stem-loop strukturu (ΔG -16.8 kcal/mol) (obr. 7b) a touto změnou je poskytnut přístup ribozomu k RBS2 místu a syntézu Tet proteinu (Schwarz *et al.*, 1992).

5.2 RIBOZOMÁLNÍ OCHRANA

Expres proteinů Tet(M) a Tet(O) je pravděpodobně regulována, ale o kontrolním mechanismu není známo příliš mnoho informací. Je známo, že pro expresi genu *tet(O)* je nutný asi 400 bp dlouhý region proti směru kódující oblasti, ačkoliv funkce tohoto regionu není dosud známá. Podobně i u genu *tet(M)* je nejspíše region proti směru kódující oblasti velmi důležitý pro regulaci genové exprese. U regionu po směru kódující oblasti jsou nalézány poměrně velké variability a zatím nebyla popsána žádná jeho role pro regulaci exprese genu (Wang&Taylor, 1991; Chopra&Roberts, 2001).

Známý mechanismus regulace genové exprese popsali v roce 2005 Wang *et al.* u genu *tet(Q)*. Produkce proteinu Tet(Q) je pravděpodobně kontrolována translační atenuací (viz obr.8). Za normálních okolností translatuje ribozom krátký leader peptid a opouští mRNA. Při vstupu tetracyklinu do buňky může být část ribozomů zastavena na mRNA v oblasti leader peptidu a dochází k formaci Hp1-Hp2 vlásenky. Délka leader peptidu na mRNA ovlivňuje bazální úroveň produkce proteinů. Pokud je leader peptid delší, zvyšuje se i bazální úroveň produkce proteinů.

Obr.8: Regulace *tetQ-rteA-rteB* operonu



V nepřítomnosti tetracyklinu (**krok I**) se ribozomy vážou na mRNA a translatují leader tripeptid. Region obsahující domnělé ribozom-vazebné místo pro *tet(Q)* (rbs) je svázán v Hp1-Hp8 vlásence a vazba ribozomu není možná. V přítomnosti tetracyklinu ribozomy, které mají navázán tetracyklin, zastaví na mRNA v oblasti leader peptidu (**krok II**) – poté dochází ke změně struktury mRNA na formu, kdy je rbs dostupné pro Tet(Q). Gen *tetQ* může být poté translatován, podle všeho těmi ribozomy, které nemají navázán tetracyklin (**krok III**). Jakmile je translatován Tet(Q), dojde ke změně konformace ribozomu a dojde k uvolnění navázaného tetracyklinu (**krok IV**). Tyto konformační změny redukuje počet ribozomů, které tetracyklin mohou vázat.

Efekt modifikovaných ribozomů na translaci, naznačen šipkou (krok IV), je návratem k situaci v kroku I. Protože ribozomy již nejsou citlivé k tetracyklinu, struktura mRNA, která zakotvuje rbs, může být reformována. U změněných struktur, v kroku II a III, je opět zamezeno přetváření. Procento ribozomů zabezpečené interakcí s Tet(Q) může tedy předurčit úroveň pozorované modulace promotoru. Tento fakt může vysvětlit proč koncentrace Tet(Q) produkovaného z multikopiového vektoru může mít silnější negativní regulační efekt, nežli množství Tet(Q) produkovaného z jedné kopie *tet(Q)* na chromosomu.

Převzato Wang *et al.* 2005.

6. DISTRIBUCE A MOBILITA *tet* GENŮ

Geny *tet* jsou nalézány v různých druzích bakterií izolovaných z člověka, zvířat i životního prostředí (tab. 4, 5, 6). Většina *tet* genů je asociována s dalšími konjugativními nebo mobilními elementy, které mohou částečně vysvětlit širokou distribuci mezi bakteriálními druhy (Jones *et al.*, 1992). Široká distribuce specifických *tet* genů, jako je *tet(B)* nebo *tet(M)*, podporuje hypotézu, že *tet* geny jsou vyměňovány bakteriemi z různých ekosystémů a dále mezi lidmi, domácími zvířaty a hospodářskými zvířaty. Stejně typy *tet* genů jsou nalézány u bakteriálních patogenů, oportunistických mikrobů a členů normální střevní flory. Výjimkou není ani přítomnost *tet* genů typických pro grampozitivní bakterie u gramnegativních druhů bakterií. To podporuje hypotézu, že grampozitivní geny jsou v přírodě zavedeny do oběhu a udržovány v gramnegativních druzích (Chopra&Roberts, 2001).

Tab. 4 : Rozšíření genů tetracyklinové rezistence mezi gramnegativními bakteriemi. Převzato z Chopra&Roberts, 2001.

Efluxní geny			
Jeden gen		Dva a více genů	
Rod	Gen	Rod	Geny
<i>Actinobacillus</i>	<i>tet(B)</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>tet(A), tet(D)</i>
<i>Erwinia</i>	<i>tet(B)</i>	<i>Providencia</i>	<i>tet(B), tet(E), tet(I)</i>
<i>Moraxella</i>	<i>tet(B)</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>tet(A), tet(B), tet(D)</i>
<i>Pantoea</i>	<i>tet(B)</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>tet(B), tet(C), tet(D)</i>
<i>Treponema</i>	<i>tet(B)</i>	<i>Mannheimia</i>	<i>tet(B), tet(G), tet(H)</i>
<i>Yersinia</i>	<i>tet(D)</i>	<i>Proteus</i>	<i>tet(A), tet(B), tet(C), tet(J)</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>tet(E)</i>	<i>Serratia</i>	<i>tet(A), tet(C), tet(E), tet(G)</i>
<i>Eubacterium</i>	<i>tet(K)</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>tet(A), tet(B), tet(C), tet(D)</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>tet(30)</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>tet(A), tet(B), tet(C), tet(D)</i>
		<i>Shigella</i>	<i>tet(A), tet(B), tet(C), tet(D)</i>
		<i>Salmonella</i>	<i>tet(A), tet(B), tet(C), tet(D), tet(G)</i>
		<i>Aeromonas</i>	<i>tet(A), tet(B), tet(D), tet(E), tet(31)</i>
		<i>Vibrio</i>	<i>tet(A), tet(B), tet(C), tet(D), tet(E), tet(G)</i>
		<i>Escherichia</i>	<i>tet(A), tet(B), tet(C), tet(D), tet(E), tet(I), tet(Y)</i>

Tab. 5 : Rozšíření genů tetracyklinové rezistence mezi grampozitivními bakteriemi. Převzato z Chopra&Roberts, 2001.

Geny ribozomální ochrany a/nebo efluxní geny			
Jeden gen		Dva a více genů	
Rod	Gen	Rod	Geny
<i>Eikenella</i>	<i>tet(M)</i>	<i>Butyrivibrio</i>	<i>tet(O), tet(W)</i>
<i>Kingella</i>	<i>tet(M)</i>	<i>Mitsuokella</i>	<i>tet(Q), tet(W)</i>
<i>Neisseria</i>	<i>tet(M)</i>	<i>Selenomonas</i>	<i>tet(Q), tet(W)</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>tet(Q)</i>	<i>Porphyromonas</i>	<i>tet(Q), tet(W)</i>
<i>Capnocytophaga</i>	<i>tet(Q)</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>tet(M), tet(Q), tet(X)</i>
<i>Prevotella</i>	<i>tet(Q)</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>tet(L), tet(M), tet(W)</i>
		<i>Haemophilus</i>	<i>tet(B), tet(M), tet(Q)</i>
		<i>Veillonella</i>	<i>tet(L), tet(M), tet(Q)</i>
		<i>Pasteurella</i>	<i>tet(B), tet(D), tet(H), tet(G), tet(M)</i>

Tab. 6 : Rozšíření genů tetracyklinové rezistence mezi grampozitivními bakteriemi, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Nocardia*, *Streptomyces* a *Ureaplasma*. Převzato z Chopra&Roberts, 2001.

Jeden determinant		Dva determinanty		Tři a více determinantů	
Rod	Gen	Rod	Geny	Rod	Geny
<i>Abiotrophia</i>	<i>tet(M)</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>tet(L), tet(M)</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>tet(K), tet(M), tet(Q)</i>
<i>Bacterionema</i>	<i>tet(M)</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>tet(M), tet(O)</i>	<i>Bacillus</i>	<i>tet(K), tet(L), tet(M)</i>
<i>Gemella</i>	<i>tet(M)</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>tet(M), tet(W)</i>	<i>Listeria</i>	<i>tet(K), tet(L), tet(M), tet(S)</i>
<i>Mycoplasma</i>	<i>tet(M)</i>	<i>Gardnerella</i>	<i>tet(M), tet(Q)</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>tet(K), tet(L), tet(M), tet(O)</i>
<i>Ureaplasma</i>	<i>tet(M)</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>tet(O), tet(Q)</i>	<i>Clostridium</i>	<i>tet(K), tet(L), tet(M), tet(P), tet(Q)</i>
<i>Nocarida</i>	<i>tet(K)</i>	<i>Mobiluncus</i>	<i>tet(O), tet(Q)</i>	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>tet(K), tet(L), tet(M), tet(O), tet(Q)</i>
		<i>Corynebacterium</i>	<i>tet(M), tet(Z)</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>tet(K), tet(L), tet(M), tet(O), tet(S), tet(U)</i>
				<i>Streptococcus</i>	<i>tet(K), tet(L), tet(M), tet(O), tet(Q), tet(T)</i>
				<i>Mycobacterium</i>	<i>tet(K), tet(L), tet(V), otr(A), otr(B)</i>
				<i>Streptomyces</i>	<i>tet(K), tet(L), otr(A), otr(B), otr(C), tcr3, tet</i>

Gramnegativní efluxní geny jsou široce distribuovány a obvykle asociovány s velkými plazmidy, z nichž je mnoho konjugativních. Plazmidy pochází z množství rozmanitých nekompatibilních skupin (Jones *et al.*, 1992) a často nesou další rezistentní geny pro antibiotika, rezistenci na těžké kovy nebo faktory patogenity např. toxiny. Selektce pro jakýkoliv z těchto faktorů poté selektuje celý plazmid. Tento fenomén cross-selektce přispěl k dramatickému vzestupu množství multi-rezistentních bakterií v posledních čtyřiceti letech (Levy, 1992; Vila *et al.*, 2007). U grampozitivních bakterií jsou efluxní geny asociovány většinou s malými plazmidy (Schwarz *et al.*, 1998).

Některé RPP geny jsou transportovány plazmidy a konjugativními transpozony, a proto mohou být přenášeny do taxonomicky divergentních bakterií. RPP jsou nalézány u streptomycét, které produkují tetracyklin, a to napovídá, že existuje možnost laterálníhoho

genového transferu ze streptomycét do dalších bakterií. Nicméně neexistuje žádný důkaz tohoto transferu RPP založený na shodné sekvenční informaci (Kobayashi *et al.*, 2007).

Geny ribozomální ochrany, *tet(S)* a *tet(O)* se mohou nalézat na konjugativních plazmidech nebo chromosomech (Luna&Roberts, 1998) a geny *tet(M)* a *tet(Q)* jsou asociovány především s konjugativními chromosomálními elementy, které kódují geny pro svůj vlastní přenos (Salyers *et al.*, 1995; Chopra&Roberts, 2001). Geny *tet(Q)* operonu byly identifikovány jako zprostředkovatelé excize a cirkularizace diskrétních nesousedících segmentů chromosomální DNA *Bacteroides*. V blízkosti středu jednoho z konjugativních transpozonů *Bacteroides* bylo lokalizováno místo počátku transferu *oriT* (Li *et al.*, 1995; Hinerfeld&Hurchward, 2001).

Existují důkazy o tom, že geny *tet(W)* a *tet(32)* jsou asociovány s konjugativními chromosomálními elementy, ačkoliv ty nejsou ještě dobře charakterizovány (Villedieu *et al.*, 2003).

6.1 PŮDNÍ PROSTŘEDÍ

O vlivu užívání antibiotik na prevalenci rezistentních genů v životním prostředí je stále málo poznatků. Hlavní cestou šíření antibiotik do půdního prostředí je nejspíše používání mrvy hospodářských zvířat, která byla ošetřována antibiotiky, na hnojení zemědělské půdy (Halling–Sørensen *et al.*, 1998; in Schmitt *et al.*, 2005). Antibiotika ve zvířecím krmivu pro podporu růstu, kontrolu a prevenci chorob byly široce používány od 50. let 20. století. Při tomto používání dochází u zvířat k vylučování tetracyklinu v aktivní formě močí a exkrementy. Následkem toho mohou být detekovány fekální bakterie nesoucí rezistentní geny v mrvě a hnojených půdách. Tyto geny se vyskytují pravděpodobně na mobilních elementech a mohou být následně horizontálně přenášeny do půdních bakterií (Sengeløv *et al.* 2003).

V roce 1993 se Lee *et al.* zabývali detekcí *tet* genů ze tří prasečích stád s různou minulostí v užívání antibiotik. Z izolátů enterických bakterií získali čtyři rezistentní determinanty Tet(A), Tet(B), Tet(C) a Tet(E). Více než 84% ze všech izolátů neslo plazmid a determinanty na plazmidech byly ve vyšší míře nalézány u stád, která byla vystavena působení tetracyklinu. Na plazmidech byly detekovány efluxní geny *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)* a na chromosomech geny *tet(B)* a *tet(E)*. Převládajícím determinantem byl Tet(B), který byl nalezen u 68% izolovaných druhů rezistentních vůči tetracyklinu. Gen *tet(B)* na plazmidu byl dominantním genem v izolátech ze stád, která byla vystavena vlivu antibiotik, zatímco geny *tet(C)* a *tet(E)* byly nejběžnějšími u stáda, které nebylo vystaveno účinkům tetracyklinu v posledních 146

měsících. Pouze jeden izolát nesl gen *tet(A)* a jeden izolát nesl zároveň geny *tet(A)* a *tet(B)*. Právě gen *tet(B)* je všeobecně velmi rozšířeným, vyskytuje se u poměrně velkého množství rodů bakterií.

V roce 2005 se Schmitt *et al.* ve své studii zabývali diverzitou rezistentních tetracyklinových a sulfonamidových genů v půdním mikrokosmu ovlivněném hnojením prasečí mrvou. Hnojivo vykazovalo vysokou diverzitu rezistentních genů bez ohledu na to, zda bylo sebráno z farmy s vysokou nebo nízkou regulací použití antibiotik. V půdě mikrokosmu došlo vlivem hnojení touto mrvou k vzestupu množství rezistentních genů. Rezistentní RPP geny *tet(T)*, *tet(W)* a efluxní gen *tet(Z)* se vyskytovali všude v půdě i mrvě, zatímco RPP geny *tet(Q)*, *tet(S)* a efluxní geny *tet(Y)*, *tet(C)* a *tet(H)* byly do mikrokosmu zavedeny hnojením. Hnojivo je tedy prokazatelně určujícím faktorem diverzity rezistentních genů v mikrokosmu. V kontrastu, u polních lokací (ve Švýcarsku a Německu) neprokázali jasný vliv hnojení mrvou na diverzitu genů. Hlavním důvodem byla podobnost rezistentních genů mezi mrvou a zemědělskou půdou, takže další vstup genů z hnojiva se dal obtížně pozorovat.

Agersø a Sandvang (2005) upozornili svou studií, že půdní bakterie, které jsou v úzkém kontaktu s mrvou nebo vepří, mohou hrát velmi důležitou roli v horizontálním rozšíření rezistence (nejen tetracyklinové, ale i multidrokové) způsobené přítomností *tet* genů a integronů třídy I (*in-1*). Integrony třídy I přispívají k šíření rezistentních genů a byly nalezeny u *Enterobacteriaceae* a dalších gramnegativních bakterií. Při analýze vzorků půdy a fekálií byla nalezen *in-1* u 5% gramnegativních a 12% grampozitivních půdních vzorků, 33% gramnegativních a 17% grampozitivních fekálních vzorků. U těchto vzorků poté identifikovali efluxní geny *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)* a *tet(33)*. Bylo zjištěno, že *in-1* se nachází na konjugativním plazmidu, na kterém se může nalézat rezistentní gen *tet(A)*. U izolátu *Pseudomonas* byl experimentálně prokázán kotransfer *tet* genů a *in-1* do *E. coli* nebo *P. putida*. Horizontální kotransfer *tet(A)* a *in-1* byl již dříve pozorován a sladkovodních *Aeromonas* (Schmidt *et al.*, 2001; Agersø&Sandvang, 2005)

Koike *et al.* (2007) monitorovali dlouhodobý výskyt, distribuci a kvantitu rezistentních genů v odpadové a spodní vodě v podloží kalového zadržovacího zařízení prasečích farem. Opakovaně detekovali 7 *tet* genů (*tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(W)* kódující RPP a *tet(C)*, *tet(H)*, *tet(Z)* kódující efluxní pumpu). Geny se vyskytovaly na obou místech po třech letech monitorování bez jasného časového vzorce ve frekvenci detekce nebo množství kopií libovolného specifického genu. Prokázali, že prosakování kontaminované vody do spodní vody má tedy na rozšíření rezistentních genů.

6.2 VODNÍ PROSTŘEDÍ

Hlavním důvodem šíření rezistentních genů ve vodním prostředí je chov ryb, které jsou ošetřovány antibiotiky. Například Chile, s velmi intenzivním chovem ryb, je druhým největším producentem lososů na světě (Miranda *et al.*, 2003) a tetracykliny (hlavně oxytetracyklin) jsou v chilském chovatelství ryb nejfrekventovaněji používané antimikrobiální agens. To má za následek vzrůst tetracyklinové rezistence u gramnegativních bakterií, které jsou spojené všemi aspekty chovu ryb. I když je před prodejem ryb ukončeno podávání antibiotik, Samuelsen *et al.* (1992) prokázali perzistenci rezistentních bakterií v sedimentu rybích farem po více než 18 měsících po ukončení chemoterapie.

V roce 2003 provedli Furushita *et al.* studii na rybích farmách v Japonsku. Ze třech farem izolovaly 66 bakteriálních druhů rezistentních vůči tetracyklinu. Nejvíce izolátů obsahovalo rezistentní gen *tet(B)* a další izoláty geny *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(G)* a *tet(Y)*, které kódují efluxní pumpu.

V roce 2007 izolovali Agersø a Petersen z thajských integrovaných farem rezistentní bakterie vůči tetracyklinu z rodu *Acinetobacter*. Integrované farmy sestávají z malých jednotek s poměrně nízkou výměnou vody a produkce ryb je spojena s chovem zvířat. Izoláty pocházely ze 4 integrovaných rybích (vzorky vody) a kuřecích farem (vzorky hnojiva). U 75% vzorků vody a hnojiva prokázali efluxní gen *tet(39)* a v 6,8% gen *tet(A)*. Naopak žádný z izolátů neobsahoval gen *tet(B)*. Prokázali, že gen *tet(39)* byl široce distribuován mezi vzorky z vodního prostředí i hnoje a často byl asociován s horizontálně přenosným plazmidem. Tento plazmid může *tet(39)* distribuovat mezi rodem *Acinetobacter* a nejspíše i dalšími druhy bakterií.

Diverzitou rezistentních genů u australských akvakultur se v roce 2007 zabývali Akinbowale *et al.* U 20 vzorků byla prokázána rezistence k tetracyklinu. Deset z těchto izolátů obsahovalo gen *tet(M)* kódující RPP, devět gen *tet(E)*, sedm gen *tet(A)* a tři izoláty gen *tet(D)*.

Andersen *et al.* v roce 1994 informovali o diverzitě genů u čistého a znečištěného mořského sedimentu v Dánsku a Norsku. U 63% izolátů prokázali gen *tet(E)*, který byl nejvíce rozšířeným determinantem. Naopak gen *tet(A)* byl nalezen pouze u 5% izolátů a gen *tet(D)* u 4% izolátů. Ve srovnání se studií Akinbowaleho byla frekvence izolovaných genů *tet(E)*, *tet(A)*, *tet(D)* u Andersena podobná. Je tedy evidentní, že rezistentní geny *tet(E)*, *tet(A)*, *tet(D)* jsou přítomné v akvakulturách v Austrálii a vyskytují se i v dalších geografických regionech.

6.3 LIDSKÉ IZOLÁTY

Léčba lidí (i zvířat) antibiotiky nepůsobí pouze na cílové patogenní bakterie, ale také na komplex komenzálních mikrobiálních komunit obývajících kůži a slizniční membrány. Vývoj rezistence mezi komenzálními bakteriemi je důležitým vedlejším efektem užívání antibiotik v medicíně, protože komenzálové mohou způsobit extraintestinální infekci (Karami *et al.*, 2006), šířit se do dalších hostitelů (Orskov&Orskov, 1985; in Karami *et al.*, 2006) nebo přenášet rezistenci genetickými elementy do jiných mikrobiálních členů (Levy, 2000). Zatím není příliš jasně prokázáno, zda rezistence k antibiotiku ovlivňuje schopnost daných druhů přetrvávat v normální mikrobiální flóře nebo zda rezistentní geny jsou udržovány nebo mizí během kolonizace (Karami *et al.*, 2006).

V normální lidské střevní mikroflóře se vyskytuje lidský oportunní patogen rodu *Bacteroides*. Z předchozích studií lidských klinických a střevních izolátů vyplývá vysoký vzestup tetracyklinové rezistence. Před rokem 1970 Shoemaker *et al.* zjistili, že 30% lidských střevních izolátů *Bacteroides* je rezistentní k tetracyklinu. Po roce 1990 se podíl rezistence u izolátů zvýšil na 80%. Stejný vzestup v incidenci tetracyklinové rezistence byl shledán u klinických i komenzálních izolátů *Bacteroides*. To znamená, že komenzální bakteriální druhy, které tvoří střevní mikroflóru, jsou ovlivněné užíváním antibiotik stejně tak jako bakterie způsobující infekce (Shoemaker *et al.*, 2001). Nejrozšířenějším rezistentním genem u *Bacteroides* je *tet(Q)*, který kóduje RPP (Whittle *et al.*, 2003).

Enterokokové jsou přirozeným společenstvem gastrointestinálního systému savců, ale mohou se vyskytovat v půdě a fekáliemi znečištěných povrchových vodách nebo na rostlinách a zelenině (Niemi *et al.*, 1993; Huys *et al.*, 2004). Vzhledem k jejich vysoké převaze v gastrointestinálním traktu mnoha zvířat, je nevyhnutelné, že tyto organismy vstupují do lidského potravního řetězce skrze kontaminované syrové mléko nebo syrové maso (Huys *et al.*, 2004). U rodu *Enterococcus* je tetracyklinová rezistence jednou z nejběžnějších (Peters *et al.*, 2003). Byly rozpoznány dvě hlavní skupiny *tet* genů u *Enterococcus*. První skupina zahrnuje geny ribozomální ochrany *tet(M)*, *tet(O)* a *tet(S)*, druhá skupina efluxní geny *tet(K)* a *tet(L)* (Huys *et al.*, 2004).

E. coli je běžnou fakultativní bakterií v intestinální mikrobiální flóře lidí a dalších zvířat. Tetracyklin se nepoužívá na ošetření infekcí *E. coli* u lidí, ale rezistence je právě u *E. coli* běžná (Calva *et al.*, 1996; Karami *et al.*, 2006).

Další bakterií gastrointestinálního traktu vykazující rezistenci k tetracyklinu je *Bifidobacterium*. Rezistentní geny, patřící ke genům ribozomální ochrany, nalezené u

bifidobakterií byly pouze *tet(M)* a *tet(W)* (Lacroix *et al.*, 1995; Aires *et al.*, 2007), přičemž studie mezi druhy *Bifidobacterium* prokázala širší distribuci genu *tet(W)* (Aires *et al.*, 2007). Aires *et al.* (2007) prokázali vysokou prevalenci a širokou distribuci získané tetracyklinové rezistence mezi lidskými izoláty *Bifidobacteria* a třemi druhy v životním prostředí. Tyto nálezy poukazují, že bifidobakterie mají přístup k tetracyklinovým rezistentním genům a mohou být zapojené v jejich rozšíření.

Tetracykliny se běžně používají v stomatologické praxi jako profylaktické agens a pro ošetření ústních infekcí. V roce 2003 bylo ze vzorků slin a plaku izolováno 105 tetracyklin rezistentních bakterií. Většina nesla rezistenci zprostředkovanou RPP (Villedieu *et al.*, 2003). V ústní dutině člověka je tetracyklinová rezistence nejčastěji zprostředkována genem *tet(M)*, který je často asociován s transpozonem Tn916 nebo blízkými příbuznými elementy (Lancaster *et al.*, 2004; Villedieu *et al.*, 2007). Dalšími nejčastěji izolovanými rezistentními geny ústní dutiny jsou geny *tet(W)* a následně *tet(O)* a *tet(Q)* a *tet(S)*. Vzhledem k široké rozmanitosti rezistentních genů je zřejmé, že orální bakterie mají možnost kontaktu s dalšími bakteriemi z jiných částí těla a jsou rezervoárem rezistentních genů.

Z těchto studií vyplývá, že gen *tet(M)* je velmi rozšířeným u lidských izolátů a vyskytuje se u bakterií v ústní dutině i střevní mikroflóře.

7. ZÁVĚR

Tetracykliny byly objeveny před více než šedesáti lety. Jsou to relativně levná antibiotika s širokým spektrem aktivity, která inhibují bakteriální elongační fázi syntézy proteinů. Proto došlo k jejich intenzivnímu užití v profylaxi, infekčních terapiích a také jako růstových faktorů při chovu zvířat. Selekcí tlak následkem užívání tetracyklinu v těchto prostředích měl za následek vznik rezistentních organismů. První rezistentní organismus byl objeven v roce 1959 a od té doby dochází k šíření rezistence u gramnegativních i grampozitivních druhů bakterií. Dramatický vzestup v množství rezistentních druhů vedl ke snížení účinnosti a poté i snížení užívání tetracyklinu pro terapii mnoha chorob.

Pro potenciální využití v klinické praxi jsou nyní zkoumány nové deriváty tetracyklinů jako glycylycykliny, dactylocykliny a další analogy s velkými hydrofóbními skupinami. Tento výzkum je dán snahou obejít mechanismy tetracyklinové rezistence mikroorganismů. Bakteriální rezistence k novým derivátům může vzniknout za velmi krátkou dobu, a proto je nutné, aby další strategie brala bakteriální rezistenci v úvahu a došlo k vývoji derivátů s unikátními antimikrobiálními vlastnostmi.

V životním prostředí existuje poměrně vysoká diverzita rezistentních genů. Rozšíření je spojeno s výskytem genů na mobilních elementech a výměna těchto genů mezi bakteriemi. Základními rezistentními mechanismy jsou u bakterií efluxní pumpy, ribozomální protekční proteiny a přímá enzymatická inaktivace tetracyklinu. Efluxní pumpy jsou rozšířené hlavně u gramnegativních bakterií a efluxní geny se vyskytují u bakterií v různých prostředích i lidských izolátech. U grampozitivních bakterií se vyskytuje převážně mechanismus ribozomální ochrany cytoplazmatickým proteinem a rozšířeny jsou především geny *tet(M)* a *tet(Q)*. Velmi rozšířeným genem je *tet(B)* kódující efluxní pumpu, který je nacházen ve vodním i půdním prostředí. Největší množství různých *tet* genů nese rod *Escherichia* a *Vibrio* spp., *Streptomyces* spp.

Proměnná povaha rezistentních genů naznačuje, že rezistence vůči tetracyklinu v přirozené a ovlivněné populaci mikroorganismů je dynamickým úkazem vystaveným fluktuaci v organech, migraci genů, přetrváváním mikrobiálních populací a selekcí tlaku.

8. POUŽITÁ LITERATURA

1. **Agersø Y. , Sandvang D.** 2005. Class 1 Integrons and Tetracycline Resistance Genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas* spp. Isolated from Pigsties and Manured Soil. Applied and environmental microbiology. p. 7941–7947.
2. **Aires J., Doucet-Populaire F., Butel M. J.** 2007. Tetracycline Resistance Mediated by *tet(W)*, *tet(M)*, and *tet(O)* Genes of *Bifidobacterium* Isolates from Humans. Applied and environmental microbiology. P. 2751–2754.
3. **Akinbowale O. L., Peng H., Barton M. D.** 2007. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia. Journal of Applied Microbiology 103 2016–2025.
4. **Aminov R. I., Garrigues-Jeanjean N., Mackie R. I.** 2001. Molecular Ecology of Tetracycline Resistance: Development and Validation of Primers for Detection of Tetracycline Resistance Genes Encoding Ribosomal Protection Proteins. Applied and environmental microbiology. P. 22–32 Antimicrobial drug resistance.
5. **Andersen S. R., Sandaa R. A.** 1994. Distribution of tetracycline resistance determinants among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. Appl Environ Microbiol 60, 908–912.
6. **Bannam T. L., Johanesen P. A., Salvado C. L., Pidot S. J. A., Farrow K. A., Rood J. I.** 2004. The *Clostridium perfringens* TetA(P) efflux protein contains a functional variant of the Motif A region found in major facilitator superfamily transport proteins. Microbiology 150, 127-134.
7. **Bannam T. L., Rood J. I.** 1999. Identification of structural and functional domains of the tetracycline efflux protein TetA(P) from *Clostridium perfringens*. Microbiology, 145, 2947–2955.
8. **Bauer G., Berens C., Projan S. V., Hillen W.** 2004. Comparison of tetracycline and tigecycline binding to ribosomes mapped by dimethylsulphate and drug-directed Fe²⁺ cleavage of 16S rRNA. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 53, 592–599.
9. **Blackwood, R. K.** 1985. Structure determination and total synthesis of the tetracyclines. In J.J. Hlavka and J. H. Boothe (ed.), Handbook of experimental pharmacology, vol. 78.
10. **Brodersen, D. E., Clemons W. M., Carter A. P., Morgan-Warren R. J., Wimberly B. T., Ramakrishnan V.** 2000. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. Cell 103:1143–1154.
11. **Burdett, V.** 1996. Tet(M)-promoted release of tetracycline from ribosomes is GTP dependent. J. Bacteriol. 178:3246–3251.
12. **Calva, J. J., Sifuentes-Osornio J., Ceron C.** 1996. Antimicrobial resistance in fecal flora: longitudinal community-based surveillance of children from urban Mexico. Antimicrob. Agents Chemother. 40:1699–1702.
13. **Cohen, S. P., McMurry L. M., Hooper D. C., Wolfson J. S., Levy S. B.** 1989. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple antibiotic resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol. Antimicrob. Agents Chemother. 33:1318-1325.
14. **Connel R. S., Trieber C. A., Stelzl U., Einfeldt E., Taylor D. E., Nierhaus K. H.** 2002. The tetracycline resistance protein Tet(O) perturbs the conformation of the ribosomal decoding centre. Molecular Microbiology .45 (6), 1463–1472.
15. **Connell R. S., Tracz D.,M., Nierhaus K. H., Taylor D.,E.** 2003, Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy, Dec. 2003, p. 3675–3681.

16. **Dailidienė, D., Bertoli M. T., Miciuleviciene J., Mukhopadhyay A. K., Dailidė G., Pascasio M. A., Kupcinskis L., Berg D. E.** 2002. Emergence of tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*: multiple mutational changes in 16S ribosomal DNA and other genetic loci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3940–3946.
17. **De Cristóbal R. E., Vincent P. A., Salomón R., A.** 2007. Multidrug resistance pump AcrAB-TolC is required for high-level, Tet(A)-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **58**, 31–36.
18. **Furushita M., Shiba T., Maeda T., Yahata M., Kaneoka A., Takahashi Y., Torii K., Hasegawa T., Ohta M.** 2003. Similarity of Tetracycline Resistance Genes Isolated from Fish Farm Bacteria to Those from Clinical Isolates. *Applied and environmental microbiology*, p. 5336–5342.
19. **Halling-Sørensen B., Nielsen S., Lanzky P. F., Ingerslev F., Lützhøft H. C., Jørgensen S. E.** 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment. *Chemosphere* **36**: 357–393.
20. **Hinerfeld D., Churchward G.** 2001. Specific Binding of Integrase to the Origin of Transfer (*oriT*) of the Conjugative Transposon Tn916. *J Bacteriol.* **183**(9): 2947–2951.
21. **Huys G., D'Haene K., Collard J.-M., Swings J.** 2004. Prevalence and Molecular Characterization of Tetracycline Resistance in *Enterococcus* Isolates from Food. *Applied and environmental microbiology*, p. 1555–1562.
22. **Chopra I., Howe T. G. B.** 1978. Bacterial Resistance to the Tetracyclines. *Microbiological reviews*, p. 707-724.
23. **Chopra I., Roberts M.** 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, p. 232–260.
24. **Chopra I.** 1994. Tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:637–640.
25. **Chung W. O., Young K., Leng Z., Roberts M. C.** 1999. Mobile elements carrying *ermF* and *tetQ* genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**:329–335.
26. **Jones C. S., Osborne D. J., Stanley J.** 1992. Enterobacterial tetracycline resistance in relation to plasmid incompatibility. *Mol. Cell. Probes.* **6**:313–317.
27. **Cauwerts K., Pasmans F., Devriese L. A., Haesebrouck F., Decostere A.** 2006. Cloacal *Lactobacillus* Isolates from Broilers Often Display Resistance Toward Tetracycline Antibiotics. *Microbial Drug Resistance.* **12**(4): 284-288.
28. **Karami N., Nowrouzian F., Adlerberth I., Wold A. E.** 2006. Tetracycline Resistance in *Escherichia coli* and Persistence in the Infantile Colonic Microbiota. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p. 156–161.
29. **Kobayashi T., Nonaka L., Maruyama F., Suzuki S.** 2007. Molecular Evidence for the ancient origin of the ribosomal protection protein that mediates tetracycline resistance in bacteria. *J Mol Evol* **65**:228–235.
30. **Koike S., Krapac I. G., Oliver H. D., Yannarell A. C., Chee-Sanford J. C., Aminov R. I., Mackie R. I.** 2007. Monitoring and Source Tracking of Tetracycline Resistance Genes in Lagoons and Groundwater Adjacent to Swine Production Facilities over a 3-Year Period. *Applied and environmental microbiology*, p. 4813–4823.
31. **Lacroix J. M., Walker C. B.** 1995. Detection and incidence of the tetracycline resistance determinant *tet(M)* in the microflora associated with adult periodontitis. *J. Periodontol.* **66**:102–108.

32. **Lancaster H., Roberts A. P., Bedi R., Wilson M., Mullany P.** 2004. Characterization of Tn916S, a Tn916-like element containing the tetracycline resistance determinant *tet(S)*. *J. Bacteriol.* 186:4395–4398.
33. **Lee C., Bruce E. L., Dawson K. A.** 2003. Detection of Tetracycline Resistance Determinants in Pig Isolates from Three Herds with Different Histories of Antimicrobial Agent Exposure. *Applied and Environmental Microbiology*, May 1993, P. 1467-1472.
34. **Leng Z., Riley D. E., Berger D. E., Kneger J. N., Roberts M. C.** 1997. Distribution and mobility of the tetracycline resistance determinant Tet Q. *J. Antimicrob. Chemother.* 40:551–559.
35. **Levy, J.** 2000. The effects of antibiotic use on gastrointestinal function. *Am. J. Gastroenterol.* 95:S8–S10.
36. **Levy, S. B.** 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:695–703.
37. **Li L.-Y., Shoemaker N. B., Salyers A. A.** 1995. Location and characteristics of the transfer region of *Bacteriodes* conjugative transposon and regulation of transfer genes. *J. Bacteriol.* 177:4992–4999.
38. **Luna, V. A., Roberts M. C.** 1998. The presence of the *tetO* gene in a variety of tetracycline resistant *Streptococcus pneumoniae* serotypes from Washington State. *J. Antimicrob. Chemother.* 42:613–619.
39. **Manavathu E. K., Fernandez C. L., Cooperman B. S., Taylor D. E.** 1990. Molecular studies on the mechanism of tetracycline resistance mediated by Tet(O). *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:71–77.
40. **McMurry L. M., Levy S. B.** 2000. Tetracycline resistance in grampositive bacteria. *In* V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferretti, D. A. Portnoy, and J. I. Rood (ed.), *Gram-positive pathogens*. American Society for Microbiology, Washington D.C.
41. **Mendez B., Tachibana C., Levy S. B.** 1980. Heterogeneity of tetracycline resistance determinants. *Plasmid* 3:99–108.
42. **Miranda C. D., Kehrenberg C., Ulep C., Schwarz S., Roberts M. C.** 2003. Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Bacteria from Chilean Salmon Farms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p. 883–888.
43. **Niemi R. M., Niemela S. I., Bamfort D. H., Hantula J., Hyvärinen T., Forsten T., Raateland A.** 1993. Presumptive fecal streptococci in environmental samples characterized by one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 59(7): 2190–2196.
44. **Nonaka L., Connel S. R., Taylor D. E.** 2005. 16S rRNA Mutations That Confer Tetracycline Resistance in *Helicobacter pylori* Decrease Drug Binding in *Escherichia coli* Ribosomes. *Journal of bacteriology*, p. 3708–3712.
45. **Oliva B., Gordon G., McNicholas P., Ellestad G., Chopra I.** 1992. Evidence that tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome cause lysis of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:913–919.
46. **Orskov I., Orskov F.** 1985. *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. *J. Hyg.* 95:551–575.
47. **Pang Y., Brown B. A., Steingrube V. A., Wallace Jr. J.R., Roberts M. C.** 1994. Tetracycline Resistance Determinants in Mycobacterium and Streptomyces Species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, June 1994, p. 1408-1412.
48. **Paulsen I. T., Brown M. H., Skurray R. A.** 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* 60:575–608.

49. Pérez A., Canle D., Latasa C., Poza M., Beceiro M., Tomás M. del Mar, Fernández A., Mallo S., Peréz S., Molina F., Villanueva R., Lasa I., Bou G. 2007. Cloning, Nucleotide Sequencing, and Analysis of the AcrAB-TolC Efflux Pump of *Enterobacter cloacae* and Determination of Its Involvement in Antibiotic Resistance in a Clinical Isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p. 3247–3253.
50. Peters J., Mac K., Wichmann-Schauer H., Klein G., Ellerbroek L. 2003. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *Int. J. Food Microbiol.* **88**:311–314.
51. Pioletti, M., Schlunzen F., Harms J., Zarivach R., Gluhmann M., Avila H., Bashan A., Bartels H., Auerbach T., Jacobi C., Hartsch T., Yonath A., Franceschi F. 2001. Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *EMBO J.* **20**:1829–1839.
52. Poole K. 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**:12–26.
53. Poole K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **56**, 20–51.
54. Pradines B., Rogier C., Fusai T., Mosnier J., Daries W., Barret E., Parzy D. 2001. In vitro activities of antibiotics against *Plasmodium falciparum* are inhibited by iron. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1746-1750.
55. Ramos J.L, Martínez-Bueno M., Molina-Heranes A. J., Terán W., Watanabe K. Zhang X., Gallegos M. T., Brennan R., Tobes R. 2005. The TetR Family of Transcriptional Repressors. *Microbiology and molecular biology reviews*, p. 326–356.
56. Ridenhour M. B., Fletcher H. M., Mortensen J. E., Daneo-Moore L. 1996. A novel tetracycline-resistant determinant, *tet(U)*, is encoded on the plasmid pKQ10 in *Enterococcus faecium*. *Plasmid* **35**:71–80.
57. Roberts M. C. 2002. Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes. *Molecular Biotechnology*. Vol. 20. 1073-6085.
58. Roberts, M. C. 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol. Rev.* **19**:1–24.
59. Ross J. I., Eady E. A., Cove J. H., Cunliffe W. J. 1998. 16S rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1702–1705.
60. Salyers A. A., Shoemaker N. B., Stevens A. M., Li L. Y. 1995. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol. Rev.* **59**:579–590.
61. Samuelson O. B., Torsvik V., Ervik A. 1992. Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance toward oxytetracycline in a fish farm sediment after medication. *Sci. Total Environ.* **114**:25–36.
62. Sawant A. A., Hegde N. V., Straley B. A., Donaldson S. C., Love B. C, Knabel S. J., Bhushan M. J. 2007. Antimicrobial-resistant enteric bacteria from dairy cattle. *Applied and environmental microbiology*, p. 156–163.
63. Sengeløv G., Agersø Y., Halling-Sørensen B., Baloda S. B., Andersen J., Jensen L.B. 2003. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a results of treatment with pig manure slurry. *Environ Int* **28**: 587–595.
64. Shoemaker N. B., Vlamakis H., Hayes K., Salyers A. A. 2001. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:561–568.
65. Schmidt A. S., Bruun M. S., Dalsgaard I., Larsen J. L. 2001. Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance

- genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5675–5682.
66. **Schmitt H., Stoob K., Hamscher G., Smit E., Seinen W.** 2005. Tetracyclines and Tetracycline Resistance in Agricultural Soils: Microcosm and Field Studies. *Microbial Ecology*. Volume 51, 267–276.
 67. **Schnappinger D., Schubert P., Pfeleiderer K., Hillen W.** 1998. Determinants of protein–protein recognition by four helix bundles: changing the dimerization specificity of Tet repressor. *The EMBO Journal* Vol.17 No.2 pp.535–543.
 68. **Schnappinger, D., and W. Hillen.** 1996. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch. Microbiol.* 165:359–369.
 69. **Schwarz, S., Roberts M. C., Werckenthin C., Pang Y., Lange C.** 1998. Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic and pet animals. *Vet. Microbiol.* 63:217–228.
 70. **Schwarz S., Cardoso M., Wegener H. C.** 1992. Nucleotide sequence and phylogeny of *tet(L)* tetracycline resistance determinant encoded by plasmid pSTE1 from *Staphylococcus hyicus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:580–588.
 71. **Spahn C., Blaha G., Agrawal R. K., Penczek P., Grassucci R. A., Triber C. A., Connell S. R., Taylor D. E., Nierhaus K. H., Frank J.** 2001. Localization of the ribosomal protection protein Tet(O) on the ribosome and the mechanism of tetracycline resistance. *Mol. Cell* 7:1037–1045.
 72. **Speer B. S., Bedzyk L., Salyers A. A.** 1991. Evidence that a novel tetracycline resistance gene found on two *Bacteroides* transposons encodes an NADP-requiring oxidoreductase. *J. Bacteriol.* 173:176–183. subunit. *Cell* 103:1143–1154.
 73. **Stockstad E. L. R., Jukes T. H., Pierce J., Page A. C., Franklin A. L.** 1949. The multiple nature of the animal protein factor. *J. Biol. Chem.* 180:647–654.
 74. **Tally F. T., Ellestad G. A., Testa R. T.** 1995. Glycylcyclines: a new generation of tetracyclines. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 35, 449–452.
 75. **Tauch A., Puhler A., Kalinowski J., Thierbach G.** 2000. TetZ, a new tetracycline resistance determinant discovered in gram-positive bacteria, shows high homology to gram-negative regulated efflux systems. *Plasmid* 44:285–291.
 76. **Taylor D. E., Chau A.** 1996. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:1–5.
 77. **Thanassi D. G., Suh G. S. B., Nikaïdo H.** 1995. Role of Outer Membrane Barrier in Efflux-Mediated Tetracycline Resistance of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, p. 998–1007.
 78. **Trieber C. A., Burkhardt N., Nierhaus K. H., Taylor D. E.** 1998. Ribosomal protection from tetracycline mediated by Tet(O): Tet(O) interaction with ribosomes is GTP-dependent. *Biol. Chem.* 379:847–855.
 79. **Vila J., Martí S., Sánchez-Céspedes J.** 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 59(6):1210–5.
 80. **Villedieu A., Diaz-Torres M. L., Hunt M., McNab R., Spratt D.A., Wilson M., Mullany P.** 2003. Prevalence of Tetracycline Resistance Genes in Oral Bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Mar. 2003, p. 878–882.
 81. **Villedieu A., Roberts A. P., Allan E., Hussain H., McNab R., Spratt D. A., Wilson M., Mullany P.** 2007. Determination of the Genetic Support for *tet(W)* in Oral Bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. P. 2195–2197.
 82. **Wang Y., Rotman E. R., Shoemaker N. B., Salyers A.** 2005. Translational Control of Tetracycline Resistance and Conjugation in the *Bacteroides* Conjugative Transposon CTnDOT. *Journal of bacteriology*, p. 2673–2680 Vol. 187, No. 8.

83. **Wang Y., Taylor D. E.** 1991. A DNA Sequence Upstream of the tet(O) Gene Is Required for Full Expression of Tetracycline Resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p. 2020-2025.
84. **Whittle G., Whitehead T. R., Hamburger N., Shoemaker N. B., Cotta M. A., Salyers A. A.** 2003. Identification of a New Ribosomal Protection Type of Tetracycline Resistance Gene, *tet(36)*, from Swine Manure Pits. *Applied and environmental microbiology*, July 2003, p. 4151-4158.
85. **Whittle G., Shoemaker N. B., Salyers A. A.** 2002. Characterization of genes involved in modulation of conjugal transfer of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. *J. Bacteriol.* 184:3839-3847.
86. **Yamaguchi A., Ohmori H., Kaneko-Okdera M., Nomura T., Sawai T.** 1991. Δ pH-dependent accumulation of tetracycline in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:53-56.
87. **Yamaguchi A., Ono N., Akasaka T., Noumi T., Sawai T.** 1999. Metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* encoded by a transposon, Tn10. *J. Biol. Chem.* 265:15525-15530.
88. **Young W., Moore I.F., Koteva K.P., Bareich D.C., Hughes D. W., Wright W.G.** 2004. TetX Is a Flavin-dependent Monooxygenase Conferring Resistance to Tetracycline Antibiotics. *The journal of biological chemistry* Vol. 279, No. 50, pp. 52346-52352.