

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Eva Bukáčková**

Mechanismy rezistence *Staphylococcus aureus* k  $MLS_B$  antibiotikům  
u pacientů s cystickou fibrózou

Mechanisms of  $MLS_B$  resistance in *Staphylococcus aureus*  
in patients with cystic fibrosis

Bakalářská práce

Školitel: MVDr. Oto Melter, Ph.D.

Praha, 2012

### **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 23. 8. 2012

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli MVDr. Otovi Melterovi, Ph.D. a rovněž Mgr. Janu Tkadlecovi za jejich vstřícnost, nezměrnou trpělivost a především cenné připomínky při zpracování této bakalářské práce.

## Obsah

Abstrakt.....	2
Seznam zkratek .....	3
1. Úvod.....	4
2. Respirační infekce u pacientů s cystickou fibrózou .....	6
2.1. Defekty imunitního systému u pacientů s cystickou fibrózou.....	6
2.2. Bakteriální původci respiračních infekcí u pacientů s cystickou fibrózou.....	7
2.3. Role <i>Staphylococcus aureus</i> v cystické fibróze .....	8
3. MLS <sub>B</sub> antibiotika a jejich působení.....	9
3.1. Struktura a spektrum účinku MLS <sub>B</sub> antibiotik .....	9
3.2. Mechanismus účinku MLS <sub>B</sub> antibiotik.....	11
3.2.1. Ribozom jako cílová struktura .....	11
3.2.2. Specifická místa působení a charakter blokace .....	12
4. Rezistence k MLS <sub>B</sub> antibiotikům u <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
4.1. Vznik a rozšíření MLS <sub>B</sub> rezistence.....	14
4.2. Mechanismy MLS <sub>B</sub> rezistence .....	14
4.2.1. Metylace ribozomu – geny <i>erm</i> .....	15
4.2.1.1. Inducibilita exprese genů <i>erm</i> .....	16
4.2.1.2. Gen <i>ermC</i> .....	17
4.2.1.3. Gen <i>ermA</i> .....	18
4.2.2. Eflux MLS <sub>B</sub> antibiotik.....	19
4.2.3. Enzymatická modifikace MLS <sub>B</sub> antibiotik .....	20
4.2.4. Mutace způsobující MLS <sub>B</sub> rezistenci .....	21
4.3. Výskyt MLS <sub>B</sub> rezistence v ČR a ve světě .....	22
5. Specifické mechanismy MLS <sub>B</sub> rezistence <i>Staphylococcus aureus</i> u pacientů s cystickou fibrózou...23	
5.1. Trpasličí kolonie (SCV) .....	24
5.2. Hypermutabilita.....	26
6. Závěr .....	29
7. Seznam použité literatury.....	31

## **Abstrakt**

Cílem této práce je shrnout mechanismy rezistence *Staphylococcus aureus* k MLS<sub>B</sub> antibiotikům (makrolidům, linkosamidům a streptograminům typu B), které se uplatňují při respiračních infekcích u pacientů s cystickou fibrózou. Tento podmíněný patogen si postupně vyvinul mnoho rozličných strategií, jak těmto antimikrobním látkám blokujícím proteosyntézu vzdorovat. Mezi nejčastější mechanismy rezistence patří modifikace cílového místa působení MLS<sub>B</sub> antibiotik, modifikace struktury samotného antibiotika či jeho eflux z bakteriální buňky. Vedle těchto mechanismů determinovaných přítomností genů rezistence mohou mít podobný účinek také mutace v některých specifických genech. V plicích pacientů s cystickou fibrózou vzniká kvůli defektům jejich imunitní obrany a dlouhodobé antibiotické léčbě unikátní nika. Tu kolonizuje mimo jiné také *S. aureus*, který se na toto prostředí dobře adaptoval a využívá navíc jiných mechanismů rezistence, jako je hypermutace či konverze k trpasličímu fenotypu umožňujícímu intracelulární perzistenci. MLS<sub>B</sub> antibiotika jsou vedle beta-laktamů lékem volby při respiračních infekcích u pacientů s cystickou fibrózou, a proto má studium této rezistence mimořádný význam.

**Klíčová slova:** cystická fibróza, rezistence, MLS<sub>B</sub> antibiotika, *Staphylococcus aureus*, SCV, hypermutabilita, geny *erm*

## **Abstract**

The aim of this thesis is to summarize the mechanisms of resistance of *Staphylococcus aureus* to MLS<sub>B</sub> antibiotics (macrolides, lincosamides and streptogramins B type) which are used to treat respiratory infections in cystic fibrosis patients. This pathogen evolved during time many various strategies of resistance to these proteosynthesis inhibitors. The most common mechanisms are target site modification, modification of the antibiotic itself or antibiotic eflux out of the bacterial cell. Apart from these mechanisms based on acquisition of genes, a mutation of specific genes can also result in resistance of the strain. In the lungs of CF patients, long-term antibiotic treatment together with immune system defects result in development of a unique niche. It is colonized (besides other bacteria) by *S. aureus*, which is well adapted to this environment and also uses different mechanisms of resistance as hypermutation or switching to dwarf phenotype (small colony variants) enabling intracellular persistence. MLS<sub>B</sub> antibiotics as well as beta-lactams are being applied as the treatment of choice for respiratory infections in CF patients. Studying the mechanisms of MLS<sub>B</sub> resistance is therefore of extraordinary importance.

**Key words:** cystic fibrosis, resistance, MLS<sub>B</sub> antibiotics, *Staphylococcus aureus*, hypermutability, small colony variants, *erm* genes

## Seznam zkratek

ABC	ATP-binding cassette	ATP-vazebná kazeta
ATP	adenosin triphosphate	adenosintrifosfát
CF	cystic fibrosis	cystická fibróza
CFTR	cystic fibrosis conductance transmembrane regulator	regulátor transmembránové vodivosti
<i>ere</i>	erythromycin esterase gene	gen pro esterázu erytromycinu
<i>erm</i>	erythromycin ribosome methylase gene	gen pro metylázu ribozomu
MLS <sub>B</sub>	macrolide-lincosamide-streptogramin B	makrolidy-linkosamidy- streptograminy B
<i>mph</i>	macrolide 2' phosphotransferase gene	gen pro makrolidovou 2' fosfotransferázu
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
MRSA	methicilin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i> rezistentní k meticilinu
MS <sub>B</sub>	macrolide-streptogramin B	makrolidy-streptograminy B
<i>msr</i>	macrolide-streptogramin resistance gene	gen pro efluxní pumpu
MSSA	methicilin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i> citlivý k meticilinu
<i>mut</i>	mutator gene	mutátorový gen
NCV	normal colony variants	normální kolonie
PTC	peptidyl transferase center	centrum peptidyltransferázy
<i>rpl</i>	ribosomal protein gene of large subunit	gen pro protein velké podjednotky ribozomu
<i>rrl</i>	ribosomal RNA gene of large subunit	gen pro rRNA velké podjednotky ribozomu
<i>rrn</i>	ribosomal RNA operon	operon genů pro rRNA
rRNA	ribosomal RNA	ribosomální RNA
SCV	small colony variants	„trpasličí“ kolonie
tRNA	transfer RNA	transferová RNA
<i>vgb</i>	virginiamycin B lyase gene	gen pro lyázu virginiamycinu

## 1. Úvod

Cystická fibróza (CF) je geneticky podmíněné autozomálně recesivní onemocnění. Jde o nejvíce rozšířené smrtelné onemocnění svého druhu v kavkazské populaci (frekvence 1/2500). Příčinou jsou mutace genu *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), který leží na dlouhém raménku chromozomu 7 a kóduje stejnojmenný protein. Mutací tohoto genu je dnes známo více než 1500; podle jejich fenotypového projevu se dělí do pěti tříd (I–V). Podle závažnosti mutace dochází buď k poruše funkce CFTR proteinu (III, IV), k jeho snížené syntéze (V) nebo k jeho úplné absenci v membráně epitelové buňky (I, II). Ve většině případů je příčinou tohoto onemocnění mutace  $\Delta F508$  (delece tří nukleotidů, jejímž výsledkem je chybějící fenylalanin v pozici 508) ze třídy II, způsobující nesprávné složení proteinu a následně jeho předčasnou degradaci proteázami (Riordan *et al.* 1989). CFTR je chloridový kanál typu ABC přenašeče lokalizovaný na membráně epitelů. Jeho defekt (nefunkčnost či snížená funkčnost) se projevuje narušeným transportem iontů v epitelálních buňkách – dochází k zadržování chloridových iontů v buňce a tím ke zvýšené absorpci vody. Nejzávažnějším důsledkem je abnormálně viskózní hlen znemožňující samočistící procesy na epitelech dýchacích cest, což je předpokladem pro kolonizaci bakteriemi. Tyto bakterie později často způsobují akutní či chronické respirační infekce a jsou zásadní pro rozvoj klinické symptomatologie pacientů s CF. Prvotní zhoršení respiračních funkcí plic může vést až k fibróze plicního parenchymu a následnému selhání funkce plic, což je nejčastější příčina úmrtí pacientů s CF. Patologické změny se projevují také v některých žlázách s vnější sekrecí (potní žlázy, pankreas, chánovody a žlučová soustava), častým projevem CF je proto produkce potu s vyšší koncentrací NaCl, malnutrice v důsledku nedostatečné produkce trávicích enzymů, neplodnost u mužů (tzv. obstruktivní azoospermie), diabetes, cirhóza jater či osteoporóza. Přestože molekulární podstata onemocnění je známá, léčba se zatím zaměřuje pouze na zmírňování symptomů CF (hlavně pro dýchací a trávicí soustavu). Pacienti se každodenně podrobují inhalacím a fyzioterapii, jsou jim podávána různá antibiotika (i preventivně), mukolytika, léky s protizánětlivými účinky a trávicí enzymy. Situace v jejich plicích musí být sledována několikrát ročně na pravidelných kontrolách. Komplikací je nutnost vzájemné izolace těchto pacientů, neboť mezi nimi dochází k přenosu bakteriálních patogenů.

Mezi nejvýznamnější bakteriální původce infekcí respiračního traktu u pacientů s cystickou fibrózou patří *Staphylococcus aureus*. Je zástupcem rodu *Staphylococcus*, který zahrnuje grampozitivní, fakultativně anaerobní, nepohyblivé a nesporulující koky kolonizující povrchy těl a sliznice zvířat i člověka. Jeho kolonie na agaru jsou hladké bílé až žlutavé kvůli produkci žlutavého karotenového pigmentu (odtud pojmenování „aureus“), pod mikroskopem se jeví jako kulovité buňky o průměru asi 1  $\mu\text{m}$  uspořádané do hroznovitých kolonií (odtud název „Staphylococcus“, z řeckého „stáphylé“ = hrozen). *S. aureus* je rovněž oportunním patogenem. Jeho patogenita je podmíněna oslabenou imunitou infikovaného jedince nebo vysokou infekční dávkou

silně virulentního kmene. Pravděpodobnost stafylokokové infekce se zvyšuje také po prodělaném chirurgickém zákroku nebo po úrazu, při imunitní nedostatečnosti či s přítomností cizích těles jako jsou např. umělé náhrady kloubů a chlopní, stehy nebo katetry. *S. aureus* může způsobit akutní až chronické hnisavé infekce od banálních kožních zánětů až po smrtelné sepse.

*S. aureus* kóduje ve své genové výbavě bohaté spektrum faktorů virulence, od extracelulárních enzymů a povrchových struktur až po toxiny. K nejvýznamnějším faktorům virulence patří alfa-hemolysin (na krevním agaru způsobuje hemolýzu) a PVL (Panton-Valentinův leukocidin vyvolávající destrukci leukocytů). *S. aureus* je také producentem řady toxických proteinů značně komplikujících infekci, jako jsou toxin syndromu toxického šoku (TSST), enterotoxiny (způsobující otravu z potravin) či epidermolytické toxiny (exfoliatiny). Enzymy fibrinolysin a hyaluronidáza umožňují průnik tkáněmi, infekci navíc komplikuje fakt, že jsou stafylokoky poměrně odolné vůči lysozymu a dokážou dočasně perzistovat v makrofázích. Kódují rovněž plazmakoagulázu, která sráží fibrinogen z krevní plazmy na tuhý fibrin, posléze typicky ohraničující okolí stafylokokové infekce.

Antibiotika první volby pro léčbu stafylokokových respiračních infekcí nejen při cystické fibróze jsou beta-laktamy. V současné době si však přibližně 90% kmenů *S. aureus* kóduje penicilinázu, což je činí odolnými proti běžným penicilinům. Proto byly vyvinuty polosyntetické penicilináza-rezistentní peniciliny (meticilin, oxacilin, kloxacilin, flukloxacilin), nicméně postupem času už nejsou ani k nim všechny stafylokoky citlivé, jako v případě kmenů *S. aureus* rezistentních k meticilinu (MRSA). S rostoucím rozšířením beta-laktamové rezistence stoupá význam alternativních antibiotik, jako jsou např. právě MLS<sub>B</sub> antibiotika zahrnující makrolidy, linkosamidy a streptogramin B. Tato antibiotika efektivně potlačují růst většiny gram pozitivních bakterií, ale také gram negativních koků a intracelulárních bakterií, jako jsou chlamydie nebo rickettsie. Některé (nejen) stafylokokové kmeny vykazují ale rezistenci už i k MLS<sub>B</sub> antibiotikům.

Cílem této práce je shrnout nejen klasické mechanismy rezistence *S. aureus* k MLS<sub>B</sub> antibiotikům, ale také speciální mechanismy uplatňující se ve zvýšené míře právě u pacientů s cystickou fibrózou.

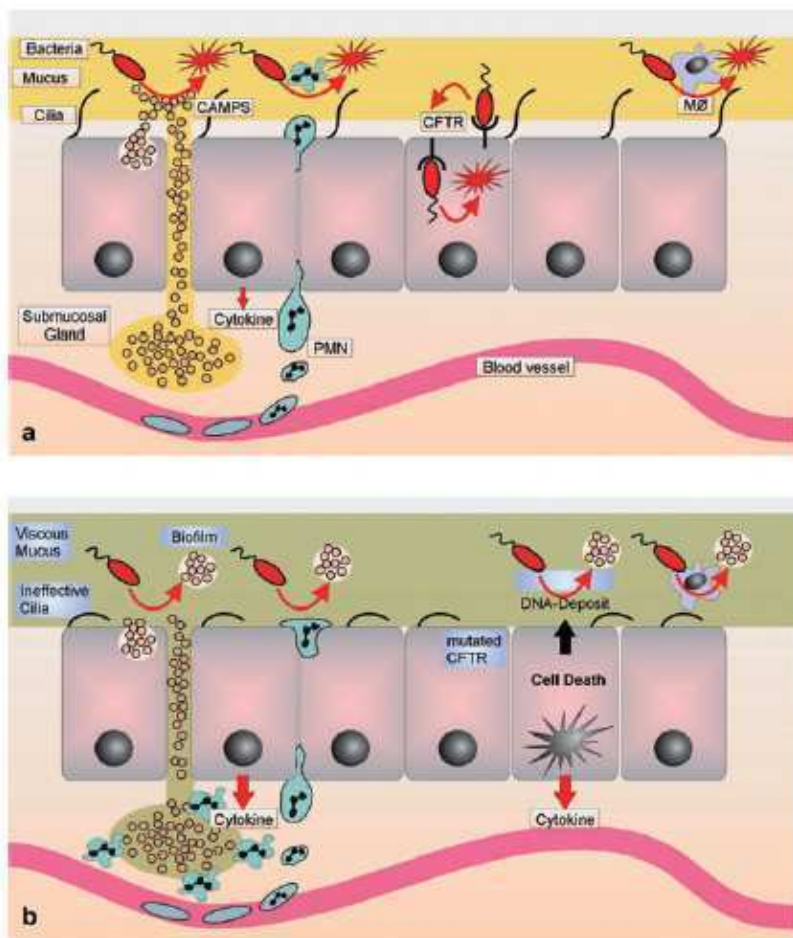
## 2. Respirační infekce u pacientů s cystickou fibrózou

U zdravého člověka jsou horní dýchací cesty kolonizovány běžnou bakteriální komenzální flórou, zejména zástupci ze skupiny viridujících streptokoků a neiserií, nicméně trvale či přechodně se zde mohou vyskytovat také potencionální bakteriální patogeni jako např. *S. aureus* (Muhlebach *et al.* 1999, Cabello *et al.* 1997). Dolní dýchací cesty zůstávají sterilní díky nespecifické imunitní obraně hostitele. U pacientů s CF jsou tyto imunitní mechanismy defektní, což umožňuje kolonizaci bakteriemi s následným rizikem infekce.

### 2.1. Defekty imunitního systému u pacientů s cystickou fibrózou

Mutace genu *CFTR* dysregulují ve svém důsledku různé komponenty nespecifické imunitní obrany dýchacích cest pacientů s CF (viz obr. 1), a to především kvůli abnormální viskozitě produkovaného sekretu. Nejvýrazněji je narušena funkce tzv. mukociliární clearance – u zdravého jedince je neustálým aktivním pohybem řasinek neboli cilií odstraňován ven z dolních dýchacích cest sekretovaný hlen spolu s mikroorganismy, cizorodými částicemi a buněčným detritem, zatímco u pacientů s CF je pohyblivost řasinek ztížena vazkým hlenem (Regnis *et al.* 1994). Podslizniční exokrinní žlázy běžně produkující kationtové antimikrobiální peptidy (tzv. CAMPs, např. beta-defenziny) mohou být v místě vyústění na povrch sliznice mechanicky omezeny v sekreci hustým hlenem pacientů s CF; produkované peptidy jsou u nich navíc inaktivovány vysokou koncentrací solí (Smith *et al.* 1996, Goldman *et al.* 1997). Snížena je rovněž pohyblivost neutrofilů a makrofágů (Matsui *et al.* 2005), jejichž úkolem je fagocytovat cizorodé částice. Prostředí se pro bakterie díky viskozitě sekretu může změnit v mikroaerofilní až anaerobní, což vede ke snížené produkci reaktivních sloučenin kyslíku (ROS) neutrofilů. Výsledky studií naznačují, že bakterie jsou v takovém prostředí schopné vytvořit fenotyp odolný i proti neoxidativnímu ničení buněk (fagocytóze) – např. biofilm *Pseudomonas aeruginosa* nebo polysacharidové pouzdro *S. aureus* (Cramton *et al.* 2001). CFTR kanál sám o sobě navíc může fungovat jako receptor bakterií, které jsou po navázání endocytovány epiteliálními buňkami a usmrceny (Pier *et al.* 1997). Běžně se CFTR podílí také na acidifikaci lyzozomů a pozdních fagozomů. U pacientů s CF je kvůli narušené funkci CFTR v těchto váčcích alkaličtější pH, což vede k nerovnováze v aktivitě některých enzymů uplatňujících se např. v metabolismu membránového lipidu sfingomyelinu. Ten je běžně degradován kyselou sfingomyelinázou na ceramid a dále kyselou ceramidázou na sfingosin. V alkalických váčcích buněk pacientů s CF dochází ke zvýšené aktivitě kyselé sfingomyelinázy, v důsledku čehož se meziproduct ceramid akumuluje v lyzozomech epiteliálních buněk a fagolyzozomech makrofágů. Ceramid vyvolává zvýšenou produkci cytokinů (mediátorů zánětu) a buněčnou smrt. Hromadící se DNA mrtvých buněk pak ještě více zahušťuje sekret dýchacího epitelu a navíc usnadňuje adhezi bakterií. (Teichgräber *et al.* 2008).





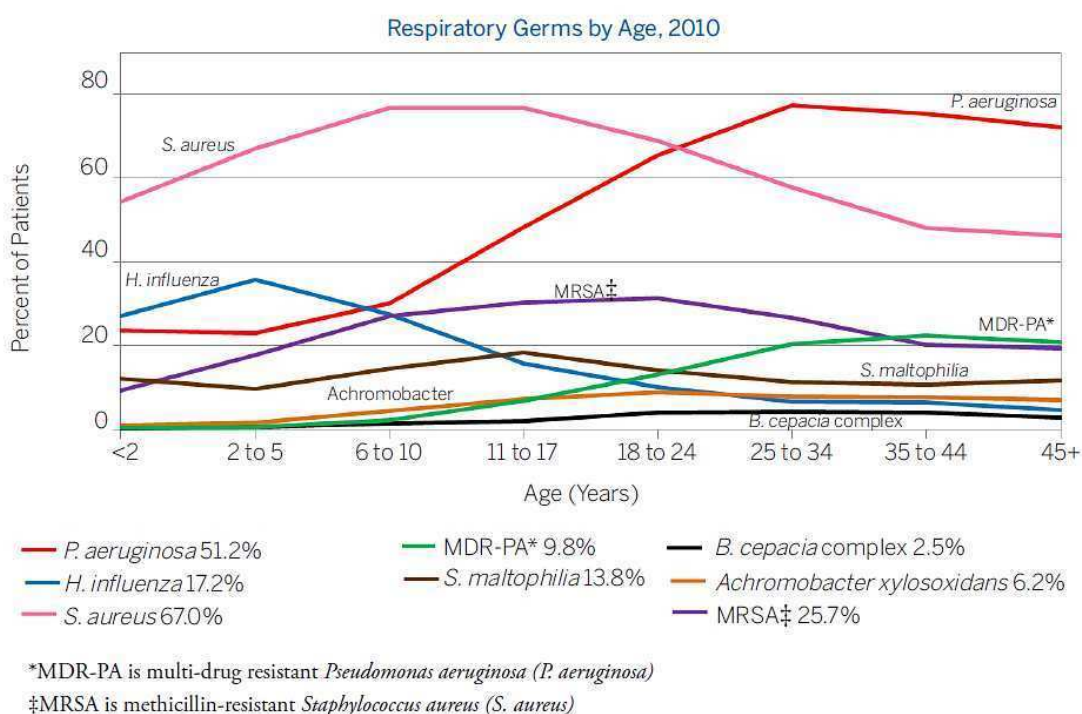
**Obr. 1:** Nahoře (a) je znázorněn správně fungující plicní epitel zdravého jedince. Bakterie jsou zachyceny v hlenové vrstvě a pohybem řasinek odplaveny ven z plic. Navíc je fagocytují neutrofilů (diferencující z polymorfonukleárních leukocytů, PMN, dopravených krevním řečištěm) a makrofágy (MΦ). Dále se v imunitní obraně angažují kationtové antimikrobní peptidy (CAMPs) sekretované podslizničními žlázami i samotný CFTR jakožto receptor některých bakterií, jež jsou následně endocytovány. Dole (b) je naopak znázorněna situace v plicích pacienta s CF. Vysoká viskozita hlenu vyvolává snížení pohyblivosti řasinek, zhoršenou sekreci CAMPs a ztíženou migraci neutrofilů i makrofágů. Vzniká tak příhodné prostředí pro množení bakterií. Zvýšená produkce cytokinů navíc vede k zánětu. Převzato z Döring and Gulbins 2009.

## 2.2. Bakteriální původci respiračních infekcí u pacientů s cystickou fibrózou

Mechanismy imunitní obrany hostitele jsou u pacientů s CF značně narušeny. Častými patogeny jsou pak v dolních dýchacích cestách pacientů s CF bakterie, které původně asymptomaticky kolonizují horní dýchací cesty nebo jsou běžně přítomné ve vnějším prostředí. Tyto bakterie se mohou přirozeně dostat rovněž do dolních dýchacích cest zdravého člověka, nicméně ke kolonizaci ani infekci nedojde díky komplexní imunitní ochraně plic. Infekce dýchacích cest pacientů s CF začíná už v dětství, kdy jsou během prvních let života časnými původci infekcí *Staphylococcus aureus* (nebo MRSA) a *Haemophilus influenzae* (viz obr. 2). Později převažují infekce způsobené *Pseudomonas aeruginosa* a komplexem *Burkholderia cepacia* (Razvi *et al.* 2009, Rosenfeld *et al.* 2001). Vedle těchto nejčastěji izolovaných bakteriálních patogenů mohou plíce pacientů s CF kolonizovat a infikovat také netypičtí zástupci, jako jsou *Pandora* spp., *Ralstonia* spp., *Inquilinus limosus*, *Achromobacter xylosoxidans* či *Stenotrophomonas maltophilia* (Emerson *et al.* 2010, Coenye *et al.* 2002).

Přesná role jednotlivých bakteriálních patogenů u pacientů s CF není dosud uspokojivě objasněna. Přestože je léčba časných bakteriálních infekcí způsobených *H. influenzae* a *S. aureus* v klinické praxi běžná, neexistují jednoznačná data potvrzující zlepšení plicních funkcí a zdravotního stavu pacientů s CF. Antibiotická léčba navíc často selhává v eradikaci původců

těchto infekcí. Kontinuální podávání antibiotik trvající léta až desetiletí navíc vede ke vzniku specifických fenoménů v mikrobiomu plic pacientů s CF. Příkladem je disociace bakteriální kultury na několik fenotypů známá hlavně u *P. aeruginosa* (mukózní či nemukózní fenotyp; Martin *et al.* 1993, Feliziani *et al.* 2010) nebo *S. aureus* (SCV neboli trpasličí *S. aureus*; Tuchscher *et al.* 2010). Mukózní kmeny *P. aeruginosa* (M fenotyp) vznikají z důvodu mutace v genu *mucA* a jejich výskyt úzce souvisí s tvorbou biofilmu v dýchacích cestách, který už prakticky nelze ovlivnit antibiotiky. Závažným patogenem chronických infekcí jsou také bakterie z komplexu *B. cepacia*, které mohou vyvolat tzv. cepacia syndrom, kdy tento původce proniká do krevního řečiště pacienta a způsobuje sepsi, která často vede k úmrtí (Hindo *et al.* 2008).



**Obr. 2:** Graf znázorňující zastoupení jednotlivých bakteriálních patogenů izolovaných od pacientů s CF v závislosti na věku pacientů. Zpočátku převažuje *S. aureus*, nicméně s věkem jeho zastoupení v plicích klesá a je nahrazován *P. aeruginosa*. Převzato z Annual Report of Cystic Fibrosis Foundation 2010.

### 2.3. Role *Staphylococcus aureus* v cystické fibróze

*S. aureus* se běžně vyskytuje v nose – jeho nosiči tvoří okolo 30 % zdravé populace (Gorwitz *et al.* 2008). Možná i proto je jedním z prvních bakteriálních původců kolonizujících dolní dýchací cesty pacientů s CF (Armstrong *et al.* 1995). Častěji je izolován od dětí a dospívajících s CF v počátečních stádiích infekce a s postupujícím věkem je nahrazován *P. aeruginosa*, nicméně obvykle se v menší míře vyskytuje také u mnoha dospělých pacientů. Přínosy protistafylokokové léčby jsou diskutabilní. Dochází díky ní sice ke snížení přítomnosti stafylokoků v dolních dýchacích cestách, ale také k nárůstu jejich rezistence; některé studie navíc naznačují, že výsledkem této léčby

je časnější kolonizace (a následně infekce) *P. aeruginosa*, která společně s infekcí zástupci komplexu *B. cepacia* vede k chronickému zánětu zhoršujícímu plicní funkce a celkovou prognózu pacientů (Tramper-Stranders *et al.* 2007, Hansen *et al.* 2009).

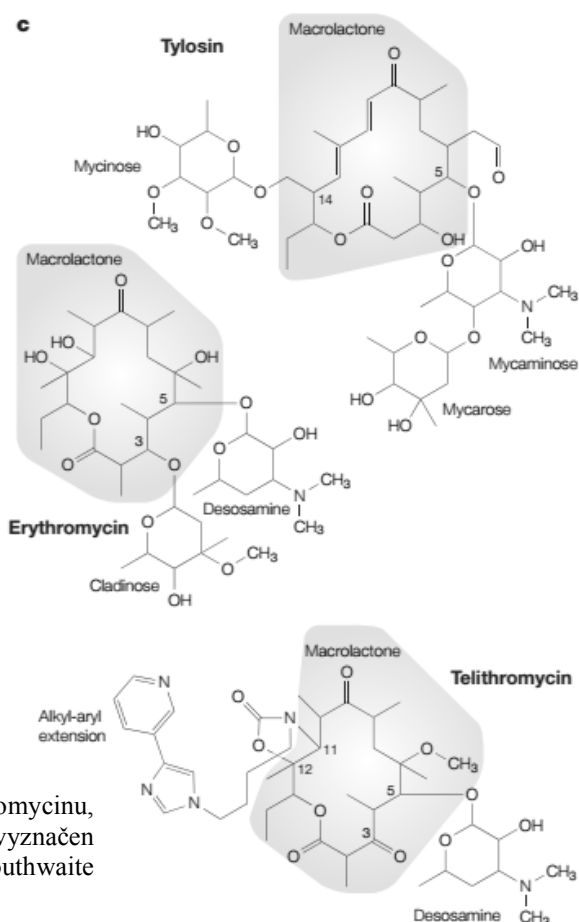
### 3. MLS<sub>B</sub> antibiotika a jejich působení

S rostoucím rozšířením rezistence k beta-laktamům roste rovněž význam MLS<sub>B</sub> antibiotik. Mají podobné spektrum účinku jako peniciliny a navíc mnoho výhod, mezi nimiž dominuje relativně nízká cena a příhodnější farmakokinetické vlastnosti. Jsou alternativou beta-laktamových antibiotik, pokud je pacient alergický k penicilinu nebo v případě, že léčba těmito antibiotiky první volby selže – především při léčbě infekce způsobené kmenem rezistentním k penicilinu. Kvůli častému používání se však i k MLS<sub>B</sub> antibiotikům postupně rozšiřuje rezistence v mnoha různých podobách.

#### 3.1. Struktura a spektrum účinku MLS<sub>B</sub> antibiotik

Makrolidy, linkosamidy i streptograminy jsou přírodní produkty různých druhů streptomycet a polosyntetické deriváty těchto produktů.

Ve struktuře makrolidů dominuje mnohočetný makrolaktonový kruh s ketoskupinami, hydroxylovými vazbami a glykosidicky navázanými neutrálními sacharidy a/nebo aminosacharidy (viz obr. 3). Makrolidy jsou klasifikovány podle počtu atomů tvořících laktonový kruh; z komerčně dostupných jsou to čtrnácti-atomové (přírodní erytromycin produkovaný *Streptomyces erythraeus*, od něj odvozené klaritromycin či roxitromycin), patnácti-atomové (azalidy s endogenním dusíkem vloženým do laktonového kruhu mezi C9 a C10, jako např. azitromycin) a šestnácti-atomové molekuly (např. spiramycin nebo veterinárně používaný tylosin). Substitucí některých skupin na makrolaktonovém kruhu přírodních makrolidů je dosaženo vyšší efektivity léčby díky rozšíření spektra účinku



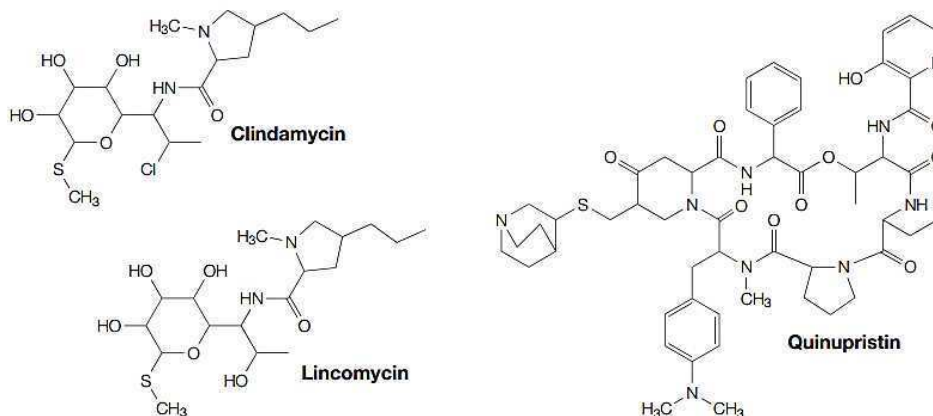
**Obr. 3:** Struktura makrolidových antibiotik erytromycinu, tylosinu a ketolidu telitromycinu. Šedě vždy vyznačen makrolaktonový kruh. Převzato z Poehlsgaard and Douthwaite 2005.

(Ferrara et al. 1996) či výhodnějším farmakologickým vlastnostem vzniklých polosyntetických derivátů – jde např. o lepší distribuci do tkání (azitromycin; Girard *et al.* 1987) či vyšší stabilitu a tím i menší dávku léčiva nutnou pro dosažení antibakteriálního účinku (ketolidy; Hamilton-Miller and Shah 1998).

Poměrně nedávno do praxe zavedené ketolidy (telitromycin) jsou deriváty erytromycinu – na makrolaktonovém kruhu v pozici C3 je sacharidový zbytek kladinóza nahrazen ketoskupinou a jsou přidány také různé dlouhé postranní řetězce v pozicích C11 a C12 (viz obr. 3 dole). Tyto přidané struktury umožňují efektivnější vazbu do cílového místa v bakteriální buňce, a proto lze ketolidy často úspěšně použít i tam, kde jiné starší makrolidy už neúčinkují kvůli vzniklé rezistenci (Hamilton-Miller and Shah 1998).

Pro strukturu linkosamidů je charakteristický galaktosidový kruh, na který je peptidovou vazbou připojen modifikovaný prolinový zbytek (viz obr. 4). Přírodním linkosamidem je linkomycin, produkovaný především *Streptomyces lincolnensis*. Nahrazením kyslíku za chlor v poloze 7 vzniká z linkomycinu polosyntetický klindamycin (7-chloro-7-deoxy-linkomycin), který má daleko širší použití díky vyšší účinnosti (Phillips *et al.* 1970).

Streptograminy typu B jsou obecně cyklické hexa- nebo hepta- depsi-peptidy (tj. peptidy s alespoň jednou esterovou vazbou namísto vazby peptidové; viz obr. 4). Přírodním streptograminem je pristinamycin, jehož producentem je *Streptomyces pristinaespiralis*. V praxi se častěji setkáváme, stejně jako u většiny antibiotik, s jeho polosyntetickými deriváty – jde o dalfopristin (streptogramin typu A) a quinupristin (streptogramin typu B). Při léčbě se v tomto případě obvykle používá kombinace streptograminu B a A, tzv. quinupristin-dalfopristin, pro jejich synergický účinek (Bouanchaud 1992) – díky odlišnosti jejich cílových vazebných míst vzájemně zesilují svůj účinek. Zatímco sama o sobě působí každá složka quinupristin-dalfopristinu bakteriostaticky, jejich kombinace může být pro některé patogeny baktericidní (Fuchs *et al.* 2000).



**Obr. 4:** Struktura linkosamidů (vlevo) a streptograminu typu B (vpravo). Převzato z Poehlgard and Douthwaite 2005.

Spektrum aktivity  $MLS_B$  antibiotik zahrnuje většinu grampozitivních bakterií (často i anaerobních) s důrazem na patogeny infikující dýchací cesty, kůži a měkké tkáně – zejména stafylokoky a streptokoky (Hardy *et al.* 1988, Reeves *et al.* 1991, Jones *et al.* 1998), nicméně účinné jsou i proti některým gramnegativům. Některé makrolidy či linkosamidy (azithromycin, spiramycin, klindamycin) mohou být překvapivě použity také pro léčbu protozoálních infekcí způsobených toxoplazmou nebo plazmodiem, protože dokážou částečně inhibovat jejich proteosyntézu zablokováním apikoplastového (plastidového) ribozomu (Lee *et al.* 2011). Rovněž se v posledních letech ukazuje, že některé makrolidy vykazují mimo jiné funkci imunomodulátorů, např. azitromycin pro zmírňování zánětů (Suzuki *et al.* 1997). Léčba quinupristin-dalfopristinem je účinná i na infekce způsobené rezistentními grampozitivními bakteriemi jako jsou enterokoky rezistentní k vankomycinu (VRE; Linden *et al.* 2001), MRSA nebo stafylokoky rezistentní k makrolidům a linkosamidům (Fuchs *et al.* 2000, Baudoux *et al.* 2010).

### **3.2. Mechanismus účinku $MLS_B$ antibiotik**

Je patrné, že  $MLS_B$  antibiotika jsou strukturně velmi nesourodá. I přesto je však spojuje stejné cílové místo působení v bakteriální buňce a stejný mechanismus účinku – na bakteriálním ribozomu různými způsoby blokují proteosyntézu citlivých mikroorganismů. Obecně lze  $MLS_B$  antibiotika označit jako blokátory translace.

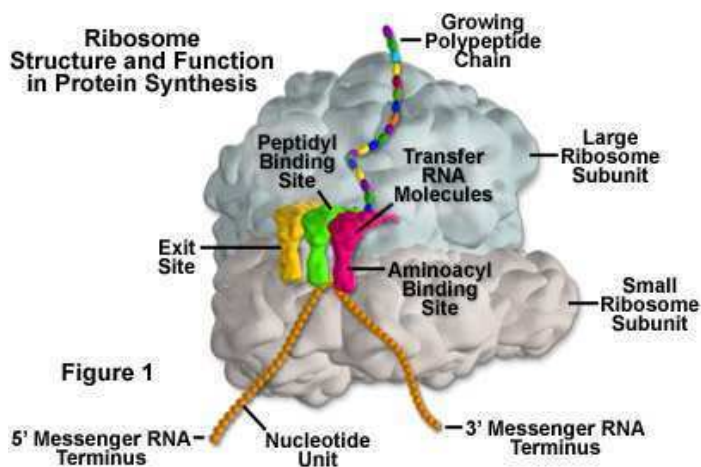
#### **3.2.1. Ribozom jako cílová struktura**

Prokaryotní ribozom (70S) je ve své struktuře poměrně odlišný od ribozomu eukaryotního (80S), což má velký význam při léčbě bakteriálních infekcí, neboť je tím umožněno selektivní fungování antibiotik proti bakteriím bez ovlivnění proteosyntézy v eukaryotické buňce makroorganismu.

Přibližně dvě třetiny hmotnosti bakteriálního ribozomu tvoří rRNA, zbytek potom přes 50 ribozomálních proteinů. Tyto komponenty mají schopnost samspořádání do výsledné podoby, na níž lze rozlišit velkou (50S) a malou (30S) podjednotku. Malá podjednotka má afinitu k mRNA, velká k aminoacyl-tRNA (transferová RNA nabitá jednou z dvaceti esenciálních aminokyselin). Hlavní strukturní a funkční částí velké podjednotky je 23S rRNA. V její struktuře se nacházejí tři důležitá vazebná místa pro aminoacyl-tRNA - A (aminoacyl-tRNA binding site), P (peptidyl binding site), E (exit site); viz obr. 5.

Jednotlivé aminoacyl-tRNA se pohybují ve směru A-P-E, při čemž odevzdávají svou aminokyselinu a ta je připojena ke vznikajícímu polypeptidovému řetězci (Rheinberger *et al.* 1981). Klíčovou roli v tomto elongačním procesu sehrává peptidyltransferázová oblast PTC (peptidyl transferase center), v níž je díky vlastní enzymatické aktivitě ribozomu katalyzována tvorba peptidové vazby mezi sousedními aminokyselinami. Na PTC navazuje ribozomální tunel, kterým

vznikající polypeptid vychází z dutiny uvnitř ribozomu do vnějšího prostředí cytoplazmy. Důležitost těchto klíčových center dokládá fakt, že se jedná o evolučně vysoce konzervované oblasti.



**Obr. 5:** Struktura ribozomu a znázornění jeho funkce v proteosyntéze: světle šedě malá podjednotka 30S, světle modře velká podjednotka 50S; za sebou růžově, zeleně a žlutě znázorněna vazbná místa pro tRNA – A, P, E. Ribozom skenuje mRNA (oranžový řetězec) od 5' k 3' konci za současné syntézy polypeptidového řetězce (různobarevný řetězec, kde každá barva představuje jednu aminokyselinu), který vychází ribozomálním tunelem. Převzato z <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/ribosomes/ribosomes.html>.

### 3.2.2. Specifická místa působení a charakter blokace

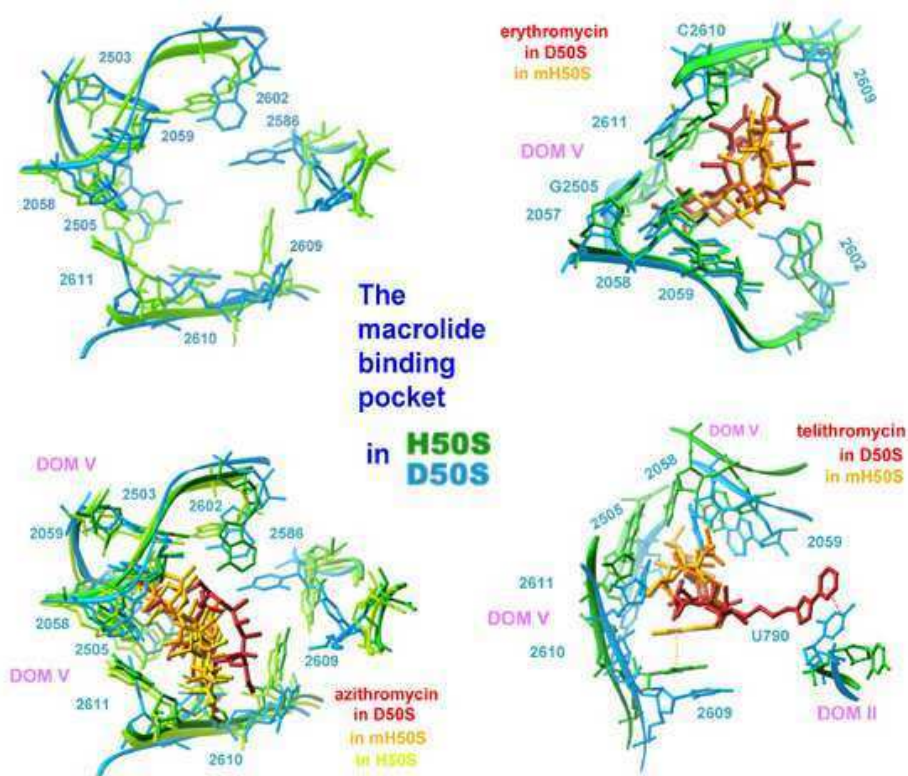
Hlavním cílovým místem inhibičního účinku MLS<sub>B</sub> antibiotik je především 23S rRNA s mnoha klíčovými místy pro správný průběh translace (viz výše). Jejich blokadí je pozastavena proteosyntéza, což vede k zastavení růstu bakterie a k její neschopnosti reagovat na změny prostředí.

Makrolaktonový kruh makrolidů se váže k 23S rRNA na základě hydrofobních interakcí a vodíkových můstků v místě PTC a tunelu, kterým vychází vznikající polypeptid ven z dutiny v ribozomu (viz obr. 6). Důležitou roli v této interakci sehrávají OH skupiny monosacharidu v poloze C5 na makrolaktonovém kruhu makrolidů a adeniny v pozici A2058 a A2059 (součástí domény V 23S rRNA; číslování dle *E. coli*) – mutace nebo jiné pozměnění těchto bází má proto za následek selhání účinku makrolidů (Champney and Tober 2000). Některá makrolidová antibiotika mají ve své struktuře takové sacharidy nebo postranní řetězce, které jim umožňují buď interagovat i s jinými bázemi lokalizovanými hlouběji v ribozomálním tunelu nebo přímo inhibovat PTC (konkrétní příklady níže).

Ketolidy se na rozdíl od klasických makrolidů vážou navíc ještě k adeninu v doméně II 23S rRNA, což zajišťuje jejich vyšší účinnost (Hansen *et al.* 1999). Nepřímo se na interakci s MLS<sub>B</sub> antibiotiky podílí i ribozomální proteiny L4 a L22 nacházející se na vnitřní stěně ribozomálního tunelu. Konformační změny ve struktuře těchto proteinů hrají pravděpodobně roli při otevírání a zavírání ribozomálního tunelu (Gabashvili *et al.* 2001).

Linkosamidy a streptogramin B se váží do přibližně stejné ribozomální oblasti jako makrolidy, klíčová je pro ně rovněž interakce s adeniny A2058/A2059 (viz obr. 7).

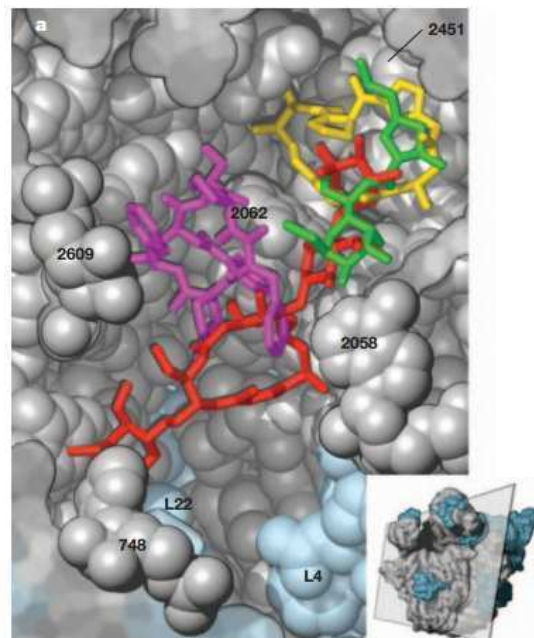
**Obr. 6:** Kry-  
stallická struktura části  
velké ribozomální pod-  
jednotky a vybraných  
makrolidových anti-  
biotik (erytromycinu,  
azitromycinu a telitro-  
mycinu), znázorněných  
v ribozomálním tunelu.  
Modře a červeně jsou  
vyznačeny tyto struktury  
u D50S (eubakterie  
*Deinococcus radio-  
durans*), zeleně a žlutě  
u H50S (archebakterie  
*Haloarcula maris-  
mortui*). Převzato  
z [www.weizmann.ac.il](http://www.weizmann.ac.il).



Některé makrolidy (typu erytromycinu) a streptogramin B zablokováním začátku tunelu indukují disociaci nedokončeného polypeptidu z ribozomu (tzv. „drop-off“) ve formě peptidyl-tRNA. Délka odpadlého polypeptidového řetězce je různá, záleží na poloze, kam se konkrétní antibiotikum k ribozomu váže – čím víc volného prostoru je ponecháno mezi PTC a blokujícím antibiotikem, tím delší polypeptid se stihne vytvořit, než disociuje (Tenson *et al.* 2003).

Makrolidy s mykarozou v pozici C5 na makrolaktonovém kruhu (šestnáctičetné spiramycin, tylosin a karbomycin) a linkosamidy blokují kromě tunelu i PTC a tím znemožňují elongaci syntetizovaného polypeptidového řetězce (Poulsen *et al.* 2000, Hansen *et al.* 2002). Jejich vazebné místo se totiž překrývá s A místem pro příchozí aminoacyl-tRNA.

Blokace ribozomu MLS<sub>B</sub> antibiotiky je však reverzibilní, může být vyrušena (např. nedostatečným dávkováním antibiotika). Jde o látky bakteriostatické, nicméně jejich účinky mohou být i baktericidní (podle použité dávky antibiotika či míry citlivosti bakterie).



**Obr. 7:** Struktura ribozomálního tunelu s navázanými antibiotiky. Ve struktuře ribozomu jsou modře znázorněny proteiny, šedě rRNA. Antibiotika: červeně makrolid tylosin, žlutě streptogramin A dalfopristin, fialově streptogramin B quinupristin, zeleně linkosamid klindamycin. Převzato z Pohlsgaard and Douthwaite 2005.

#### 4. Rezistence k MLS<sub>B</sub> antibiotikům u *Staphylococcus aureus*

Jen pár let po uvedení prvního makrolidového antibiotika erytromycinu do klinické praxe (v 50. letech 20. století) se objevila rezistence u stafylokoků. Příčinou byly geny *erm*, které se postupně objevovaly i u jiných druhů rezistentních bakterií. Zřejmě i proto zůstává tento prvotní mechanismus MLS<sub>B</sub> rezistence dodnes tím nejrozšířenějším, nikoli však jediným – bylo popsáno mnoho různých způsobů, jak mohou stafylokoky odolávat inhibičnímu účinku MLS<sub>B</sub> antibiotik (viz obr. 8).

##### 4.1. Vznik a rozšíření MLS<sub>B</sub> rezistence

Mechanismy MLS<sub>B</sub> rezistence mají pravděpodobně původ v přírodních producentech makrolidů, linkosamidů a streptograminů B (Arthur *et al.* 1987), kteří se museli obrnit proti svým vlastním zbraním – tito producenti antibiotik ve své výbavě často kombinují několik různých způsobů obrany proti produkovanému antibiotiku, aby měli zajištěnou dokonalou ochranu (Canu and Leclercq 2009). Rezistence tedy nevznikla jako následek častého používání MLS<sub>B</sub> antibiotik, nicméně k jejímu rozšíření tato antibiotika značně přispěla, neboť selektují rezistentní kmeny na úkor citlivých. Bez selekčních tlaků způsobených MLS<sub>B</sub> antibiotiky by kmeny k nim rezistentní neměly žádnou výhodu a tudíž by nebyly přednostně šířeny.

Mimořádně důležitým v procesu šíření genů rezistence je horizontální přenos genetické informace umožňující přenášet geny mezi dvěma bakteriemi, z nichž ani jedna není potomkem té druhé. Přenosu rezistence napomáhá také fakt, že mnoho genů udělujících rezistenci je lokalizováno na pohyblivých genetických elementech (transpozonech či plazmidech), a tak se mohou snadno šířit horizontálně v bakteriální populaci jednoho druhu, avšak i mezidruhově. Přenos probíhá dokonce i mezi bakteriemi některých zcela nepříbuzných rodů. Geny rezistence se tak mohou rychle a nekontrolovatelně rozšířit po celém světě.

K vyšší míře rezistence může přispět také fakt, že některá makrolidová a streptograminová antibiotika strukturně podobná klinicky významným antibiotikům se dříve hojně používala jako růstové faktory v živočišné výrobě – jde např. o makrolid tylosin (strukturně podobný erytromycinu) nebo streptogramin virginiamycin. Jejich masové používání mohlo přispět k rozšíření MLS<sub>B</sub> rezistence mezi zvířata a z těchto rezervoárů pak také na člověka. (Thal and Zervos 1999, Luh *et al.* 2000). Od roku 1999 proto v České republice platí zákaz používání tylosinu či virginiamycinu ke stimulaci růstu (podle V. 451/2000 Sb.), aby se předešlo případnému vzniku zkřížené rezistence k antibiotikům významným v klinické praxi.

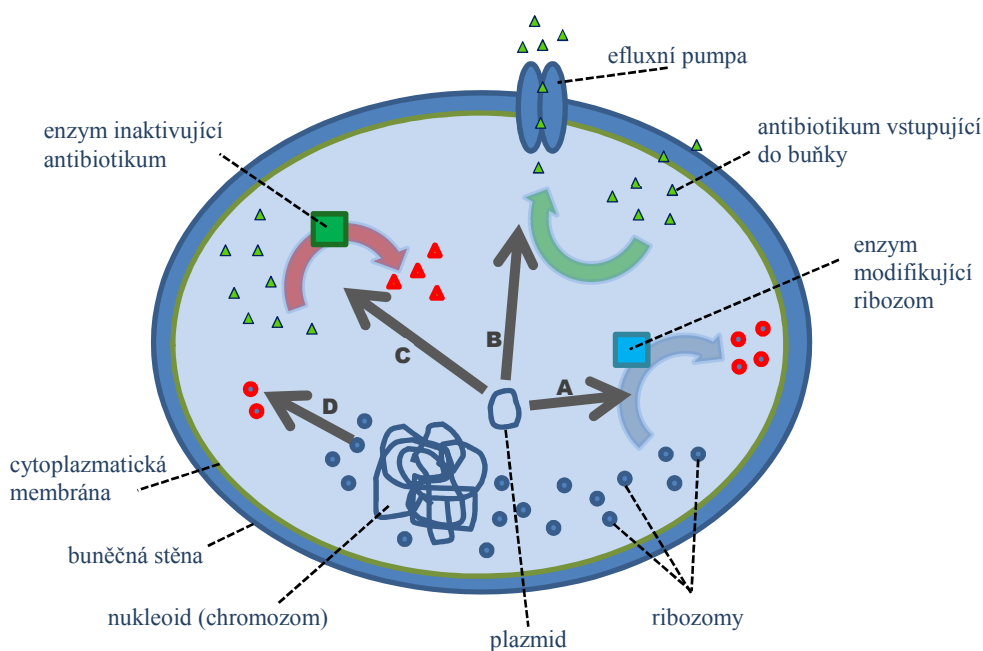
##### 4.2. Mechanismy MLS<sub>B</sub> rezistence

Některé mechanismy udělují specifickou rezistenci jen k jednomu druhu antibiotika nebo k antibiotikům strukturně podobným, jiné naopak skýtají rezistenci širšího charakteru – např. ke



všem  $MLS_B$  antibiotikům (tzv.  $MLS_B$  fenotyp). Zkřížená rezistence mezi makrolidy, linkosamidy a streptograminy je poměrně běžná, protože (jak již bylo řečeno) jejich vazebná místa se vzájemně překrývají.

Získá-li bakterie nové geny rezistence, dojde tím k obohacení její proteinové výbavy. Většinou se jedná o nové enzymy, které buď modifikují cílové místo působení  $MLS_B$  antibiotik, jež je k těmto antimikrobním látkám následně necitlivé, anebo modifikují přímo dané antibiotikum a tím jej činí nefunkčním (viz obr. 8). Další možností je aktivní transport antibiotika z bakteriální buňky díky membránovému transportéru kódovanému nově získanými geny. Kromě genů rezistence se na vzniku rezistence mohou podílet i spontánní či indukované mutace.



**Obr. 8:** Schematické znázornění způsobů  $MLS_B$  rezistence u *S. aureus*. A – enzymatická modifikace struktury ribozomu (červeně znázorněn ribozom, na který se nemůže vázat antibiotikum); B – eflux antibiotika speciálním transportérem; C – enzymatická inaktivace antibiotika (červeně znázorněno nefunkční antibiotikum); D – modifikace struktury ribozomu díky spontánní či indukované mutaci. Upraveno podle Marešová and Urbášková 2006.

#### 4.2.1. Metylace ribozomu – geny *erm*

Jak již bylo řečeno, geny *erm* byly prvním objeveným mechanismem rezistence k  $MLS_B$  antibiotikům a jsou dnes nejčastější příčinou  $MLS_B$  rezistence u bakterií.

Produktem genů *erm* (erythromycin ribosome methylase) jsou metylázy, které monometylují či dimetylují dusík v poloze 6 na adeninu v pozici A2058 nebo A2059 v 23S rRNA (Lai and Weisblum 1971). Následkem této modifikace se makrolidy, linkosamidy ani streptogramin B nemohou navázat do svého cílového místa na ribozomu a jsou tedy neúčinné ( $MLS_B$  fenotyp). Pro stafylokoky jsou typické geny *ermA* a *ermC* kódující stejnojmenné metylázy (Lina *et al.* 1999),

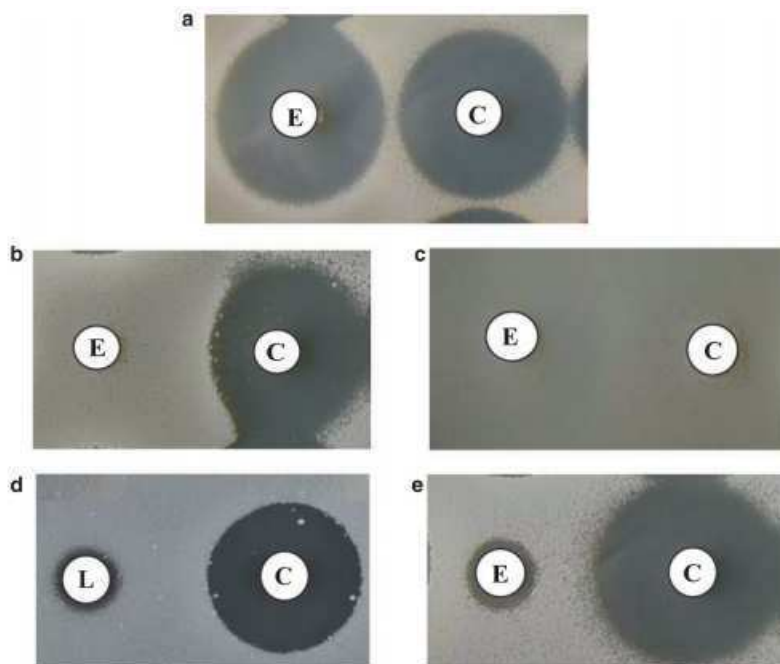
zřídka se u nich vyskytuje také gen *ermB*. Někdy může jedna bakterie vlastnit více těchto genů, například kombinaci *ermA* a *ermC* (Schmitz *et al.* 2000).

Expresí genů *erm* je inducibilní (divoký fenotyp) nebo konstitutivní (Murphy 1985).

#### 4.2.1.1. Inducibilita exprese genů *erm*

Jsou-li geny *erm* exprimovány konstitutivně (cMLS<sub>B</sub>), rezistence se u nositelů projevuje za jakýchkoli podmínek, tj. nepotřebuje k projevu žádný induktor. Zaručuje křížovou rezistenci k makrolidům, linkosamidům i streptograminu B. Při inducibilní expresi (iMLS<sub>B</sub>) dochází k translaci do funkčních proteinů (metyláz) pouze v přítomnosti induktoru; útlum exprese v jeho nepřítomnosti je způsoben translační atenuací. Mezi silné induktory patří makrolidy se čtrnácti- až patnáctičetným kruhem a k indukci rezistence stačí malé, subterapeutické dávky těchto antibiotik. V poslední době se však jako induktory, i když o něco slabší, ukazují také další látky ze skupiny MLS<sub>B</sub> antibiotik, např. telitromycin, klindamycin anebo quinupristin pro gen *ermC* (Bailey *et al.* 2008), a to včetně vyvolání křížové rezistence mezi těmito látkami; gen *ermA* je takto indukován telitromycinem (Schmitz *et al.* 2002). Rezistence vzniklá inducibilně nedosahuje takové šíře jako rezistence konstitutivní - vztahuje se nejčastěji pouze k induktoru. Po odstranění induktoru dochází k obnovení citlivosti bakteriálního kmene, nicméně někdy může dojít vlivem mutací či např. vmezeřením inzerční sekvence do regulační oblasti genu (Schmitz *et al.* 2002) k přetvoření inducibilní exprese na konstitutivní (Werckenthin and Schwarz 2000, Murphy 1985).

Poměrně častým jevem je, že rezistence indukovaná erytromycinem činí bakterii odolnou také ke klindamycinu a k makrolidům se šestnáctičetným kruhem. Běžné testování citlivosti diskovou difúzní metodou je v takovém případě nedostačující, protože kmen jeví se jako citlivý ke klindamycinu může vykazovat právě inducibilní rezistenci, která se ale *in vitro* projeví jen za současné přítomnosti erytromycinu. Proto byl zaveden D-test (double disc-diffusion test), kdy je klindamycinový disk na agaru umístěn blízko k disku erytromycinovému tak, aby se případné zóny inhibice částečně překrývaly. Pokud je výsledkem D-testu kruhovitá inhibiční zóna kolem klindamycinového disku, může být kmen označen za citlivý ke klindamycinu (viz obr. 9a). Dojde-li ale okolo disku s klindamycinem k vytvoření zóny ve tvaru písmene D (na okraji bližším k erytromycinovému disku je zóna inhibice useknutá; viz obr. 9b), je to jednoznačný průkaz inducibilní formy klindamycinové rezistence. Pakliže by byla infekce takovým kmenem léčena klindamycinem, nejenže by toto antibiotikum mohlo selhat, ale pod jeho vlivem by také hrozila selekce konstitutivních mutant (viz obr. 9c) a tím přechod na konstitutivní formu rezistence (Siberry *et al.* 2003, Levin *et al.* 2004). Takto zvolená léčba by tedy byla neúčinná a dokonce potenciálně nebezpečná. D-test tak značně zvyšuje pravděpodobnost správného výběru antibiotika pro účinnou léčbu – v Indii bylo zjištěno, že přibližně třetina kmenů *S. aureus* rezistentních k erytromycinu by byla bez D-testu mylně označena jako citlivá ke klindamycinu (Fiebelkorn *et al.* 2003, Prabhu *et al.* 2011).

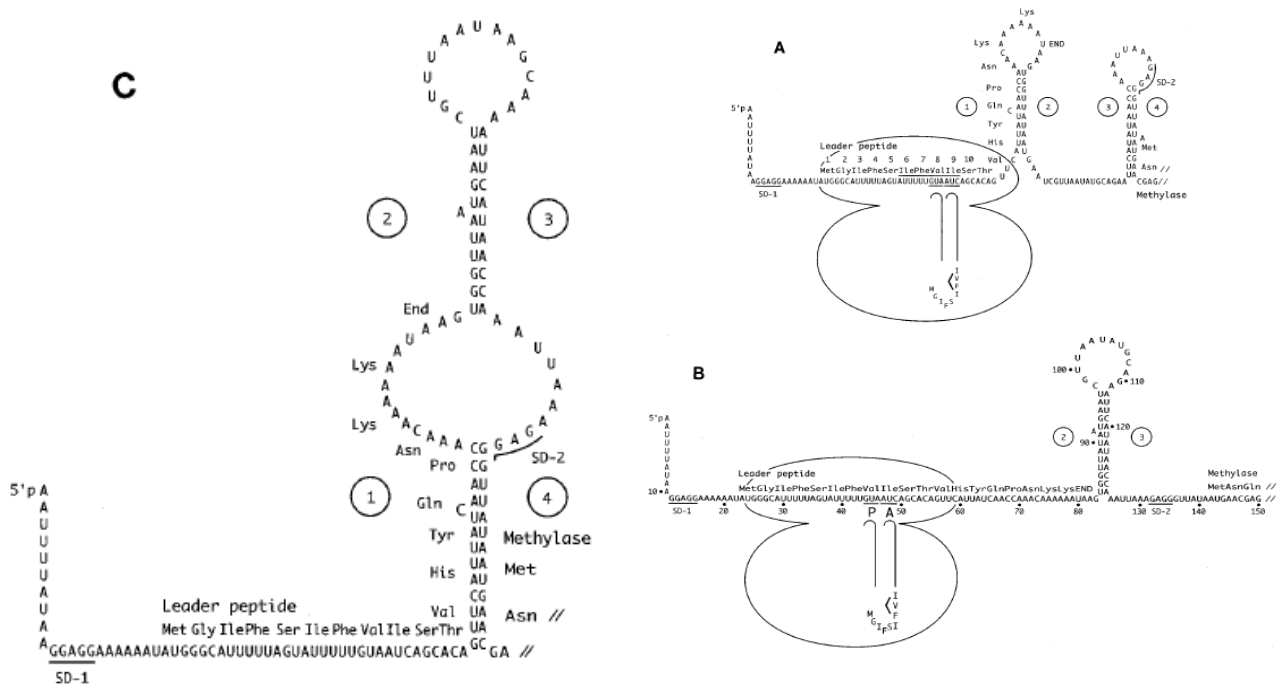


**Obr. 9:** Testování citlivosti *S. aureus* k erytromycinu (E), klindamycinu (C) nebo linkomycinu (L): (a) kmen je citlivý k erytromycinu i klindamycinu, (b) kmen vykazuje indukibilní klindamycinovou rezistenci díky genu *erm*, D-zóna kolem C disku, (c) kmen vykazuje konstitutivní rezistenci díky genu *erm*, (d) kmen kódující gen *lnuA* inaktivující klindamycin i linkomycin (viz níže), (e) kmen rezistentní díky genu *msrA* pro eflux, D-zóna nevzniká (viz níže). Převzato z Canu and Leclercq 2009.

#### 4.2.1.2. Gen *ermC*

Gen *ermC* leží obvykle na malých plazmidech vyskytujících se v buňce v mnoha kopiích. Je to indukibilně exprimovaný gen kódující metylázu erytromycinu, ErmC. Inducibilita je regulována mechanismem translační atenuace. Vedoucí sekvence se nachází na 5'konci tohoto genu, má 141 bazí kódujících polypeptid o délce asi 19 aminokyselin; v této regulační oblasti se dále nacházejí čtyři segmenty s invertovanými repeticemi (Horinouchi and Weisblum 1980; viz obr. 10). Bez přítomnosti induktoru jsou iniciační kodony na mRNA genu *ermC* i vazebné místo pro ribozom uzavřeny v sekundární struktuře vedoucí sekvence zaujímající základní konformaci, kdy první segment interaguje s druhým a třetí segment interaguje se čtvrtým za vzniku vlásenek. V přítomnosti induktoru (například erytromycinu) dojde k navázání tohoto antibiotika na ribozom, což vyvolá pozastavení ribozomální translace (tzv. „stalling“ ribozomu; Vazquez-Laslop *et al.* 2008) v místě vedoucí sekvence pro gen *ermC*. Pozastavený ribozom indukuje přeskupení translatované mRNA do alternativní sekundární struktury, čímž je zpřístupněno vazebné místo pro ribozom a rovněž iniciační kodon genu *ermC*, který byl předtím stabilizován párováním bazí ve vlásence. Ribozom tedy může přisednout a syntetizovat metylázu ErmC, která následně metyluje klíčové oblasti ribozomu a činí jej necitlivým k MLS<sub>B</sub> antibiotikům.

Některé mutace v regulačních oblastech genu *ermC* mohou vést ke změně jeho exprese na konstitutivní, pakliže je struktura tohoto genu díky mutaci přednostně uskupena do translatovatelné podoby (Daurel *et al.* 2007).

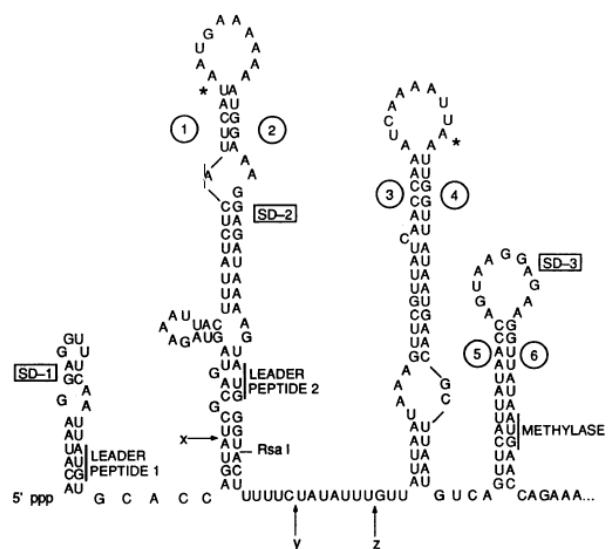


**Obr. 10:** Vedoucí sekvence genu *ermC*. A: Časná fáze indukce – první segment interaguje s druhým segmentem, třetí se čtvrtým; ribozom je pozastaven při translaci vedoucí sekvence. B: Plně indukovaná exprese – interakce už jen mezi druhým a třetím segmentem; je odhaleno vazebné místo ribozomu a iniciační kodony genu pro metylázu. C: Neindukovaná, stabilní struktura genu, kdy interaguje první se čtvrtým a druhý s třetím segmentem. Převzato z Weisblum 1995.

K metylaci nedochází na maturované ribozomální podjednotce 50S, ale na jejím prekurzoru. Erytromycin jako induktor totiž nejenže pozastavuje proteosyntézu, ale také se váže právě na tento ribozomální prekurzor a zabraňuje tak jeho uspořádání do funkční konformace, následkem čehož dochází k jeho degradaci ribonukleázami. Pakliže však bakterie vlastní indukovatelný gen *erm*, je prekurzor 50S s navázaným erytromycinem substrátem pro metylázu a následná metylace vede ke vzniku rezistence (Champney *et al.* 2003).

#### 4.2.1.3. Gen *ermA*

Gen *ermA* je obvykle u *S. aureus* lokalizován na transpozonu Tn554, ale jedna či více kopií je kódována také chromozomálně (Murphy 1985). Je homologní s genem *ermC*, takže princip indukované exprese je velmi podobný. Hlavní rozdíl je ve vedoucí sekvenci genu *ermA* – má mnohem komplikovanější sekundární strukturu (viz obr. 11).



**Obr. 11:** Sekundární struktura regulační oblasti genu *ermA* stabilizovaná díky šesti inverzovaným repetičím. Znázorněn je pouze neindukovaný stav. Převzato z Sandler and Weisblum 1989.

Její délka je 211 bází a kóduje dva peptidy (o délce 15 a 19 aminokyselin). Druhý peptid kódovaný vedoucí sekvencí genu *ermA* má 13 z 19 aminokyselin shodných s vedoucí sekvencí genu *ermC*. Součástí vedoucí sekvence genu *ermA* je navíc šest inverovaných repetic, takže jsou báze opět různě zpárované do nepřístupných vlásenek (viz obr. 11). Než je zpřístupněn iniciační signál pro translaci tohoto genu, musí dojít k pozastavení ribozomu dvakrát. Složitost sekundární struktury je zřejmě příčinou, proč dochází u genu *ermA* méně často k přechodu na konstitutivní expresi; gen *ermC* je exprimovaný konstitutivně přibližně desetkrát častěji než *ermA* (Daurel *et al.* 2007).

#### 4.2.2. Eflux MLS<sub>B</sub> antibiotik

Dalším mechanismem MLS<sub>B</sub> rezistence je transport antibiotika zpět do extracelulárního prostoru (tzv. eflux) dřív, než se stihne dostat k ribozomu. U bakterií existuje pět druhů transportních pump, které buď udělují nositelské buňce multirezistenci a jsou nejčastěji kódované chromozomálně, nebo jsou naopak substrátově specifické a umístěné typicky na plazmidu či transpozonu.

U stafylokoků se objevují všechny druhy efluxních pump, nicméně s MLS<sub>B</sub> antibiotiky souvisí pouze ty z rodiny ABC (ATP-binding cassette) transportérů (Ross *et al.* 1990). Jde o plazmidově kódované transportéry se specifickým účinkem jen na některá MLS<sub>B</sub> antibiotika, která jsou aktivně vypumpována ven na úkor energie buňky spážením s hydrolýzou ATP. ABC transportéry mají typicky tvar kanálu a jsou složeny ze dvou domén několikrát procházejících cytoplazmatickou membránou a dvou ATP-vazebných domén lokalizovaných intracelulárně pod membránou (Ross *et al.* 1995, podle Higgins 1992).

Příkladem jsou MsrA pumpy, jejichž projevem je tzv. MS<sub>B</sub> fenotyp (rezistence k makrolidům se čtrnácti- a patnáctičetným kruhem a ke streptograminu B). Gen *msrA* je obvykle lokalizovaný na plazmidu. Sekvenací bylo zjištěno, že má 2 ATP-vazebné domény, které propojuje dlouhá Q-spojka, nicméně v jeho struktuře chybí charakteristické domény procházející membránou (Ross *et al.* 1990). Proto je možné, že se podílí na efluxu antibiotik pouze nepřímo, ve spolupráci s některým z chromozomálně kódovaných bakteriálních transportérů – tato teorie však zatím nebyla potvrzena (Ross *et al.* 1995, Ross *et al.* 1996). Dříve se pokládaly MsrA pumpy za typické pro stafylokoky s častějším výskytem u koaguláza-negativních stafylokoků (14,6%; Lina *et al.* 1999) než u *S. aureus* (2,1 %; Lina *et al.* 1999), později byly však tyto transportéry nalezeny také u gram pozitivních streptokoků, enterobakterií či korynebakterií a dokonce i u gramnegativních pseudomonád (Ojo *et al.* 2005).

Tento typ rezistence má prvotně rovněž inducibilní charakter, eflux je aktivován až po vystavení danému antibiotiku. Molekulární mechanismus indukce zatím nebyl objasněn, ale je možné, že jde opět o translační atenuaci, kdy některé sekvence v regulačních oblastech se podobají genům *erm* (Ross *et al.* 1990). Induktorem efluxní rezistence mohou být makrolidy se čtrnácti- a patnáctičetným kruhem, nicméně substrátem pro efluxní pumpu MsrA je kromě těchto typů

makrolidů i streptogramin B, který ale není induktorem. Kmen tedy díky genu *msrA* může být rezistentní ke streptograminu B po indukci některým makrolidem, např. erytromycinem. Linkosamidy nejsou ani induktorem ani substrátem pro MsrA pumpu (Ross *et al.* 1989). Podobně jako u inducibilní rezistence zapříčiněné geny *erm*, i zde může při nesprávném použití antibiotik (ale také např. delecí kontrolního regionu vedoucí sekvence genu *msrA*; Ross 1996) dojít k selekci konstitutivních mutant, jejichž projevem je stálý MS<sub>B</sub> fenotyp, přičemž ke klindamycinu zůstávají nosiči této rezistence citliví. Tento fenotyp lze snadno odlišit od fenotypu inducibilní MLS<sub>B</sub> rezistence způsobené geny *erm* – opět pomocí D-testu. Pokud je příčinou inducibilní rezistence eflux antibiotika, D-zóna se nikdy nevytvoří (viz obr. 9e). Infekci takto rezistentním kmenem lze úspěšně léčit klindamycinem, neboť svou citlivost *in vitro* si udržuje i během terapie *in vivo*.

#### 4.2.3. Enzymatická modifikace MLS<sub>B</sub> antibiotik

Enzymatická modifikace determinuje rezistenci pouze vůči strukturně velmi podobným antibiotikům. Modifikací struktury makrolidů, linkosamidů a streptograminu B je narušena jejich aktivita. Na procesu inaktivace se mohou podílet esterázy, transferázy a hydrolázy.

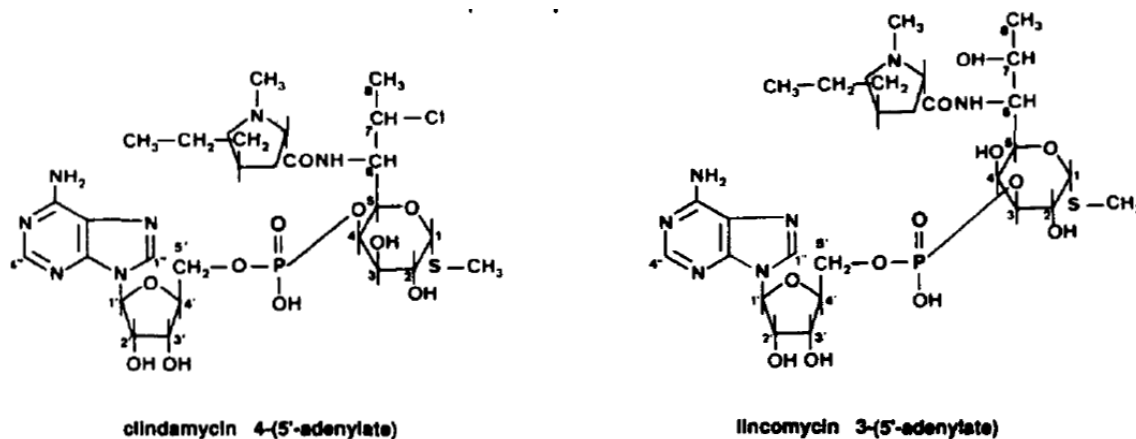
Pokud jde o makrolidy, mohou být inaktivovány esterázami, fosfotransferázami, acetyltransferázami, hydrolázami či nukleotidyltransferázami. U grampozitivních bakterií je však tento typ rezistence k makrolidům vedle jiných mechanismů minoritní. Příkladem může být gen *mphC* (macrolide 2' phosphotransferase) popsán u několika kmenů *S. aureus*, kódující transferázu MphC. Tento enzym fosforyluje 2'hydroxylovou skupinu aminosacharidu na makrolaktonovém kruhu makrolidů. Pro expresi genu *mphC* jsou zapotřebí některé regulační oblasti výše zmiňovaného genu *msrA*, přičemž oba tyto geny leží za sebou na plazmidu pMS97. Příčina tohoto jevu zatím nebyla objasněna, ale pravděpodobně je mRNA transferázy MphC nestabilní, nebo není vlastní promotor tohoto genu rozpoznán polymerázou (Matsuoka *et al.* 1998, Matsuoka *et al.* 2003).

Dalším enzymem inaktivujícím makrolidy je u stafylokoků gen *ereB* (erythromycin esterase). Esteráza EreB štěpí makrolaktonový kruh makrolidů. Výskyt tohoto genu je však velmi nízký, jak naznačují výsledky studie zkoumající mechanismy rezistence kmenů z 24 evropských nemocnic, kde pouze u 0,6 % (5 z 851) izolátů MRSA byl detekován tento gen (Schmitz *et al.* 2000).

V případě linkosamidů patří k nejčastějším modifikacím fosforylace a adenylylace. Příkladem může být gen *lnuA'* (lincosamide nucleotidyltransferase) u *S. aureus*, dříve zvaný *linA'*. LnuA' O-nukleotidyltransferáza adenylyluje linkosamidy (viz obr. 12) a ty jsou potom neschopny navázat se na svá cílová místa. Gen *lnuA'* se liší pouhými čtrnácti aminokyselinami od genu *lnuA* (dříve *linA*) vyskytujícímu se u *Staphylococcus haemolyticus* (Brisson-Noël *et al.* 1988) a jiných koaguláza-negativních stafylokoků, u nichž může být tento způsob linkosamidové rezistence poměrně častým jevem (Novotná *et al.* 2005). Geny *lnu* jsou obvykle lokalizovány na malých plazmidech (Lüthje *et al.* 2007) a vyskytují se i u jiných bakteriálních rodů, např. u streptokoků nebo escherichií.

Způsobují u svého nositele tzv. L fenotyp, který se projevuje rezistencí ke všem linkosamidům (viz obr. 9d); linkomycin je však inaktivován účinněji než klindamycin.

Streptogramin B může být u stafylokoků a jiných grampozitivních bakterií inaktivován produkty genů *vgb* (virginiamycin B lyase). Dříve se předpokládalo, že Vgb enzymy jsou hydrolázy, ale pečlivá analýza ukázala, že jde o lyázy linearizující cyklickou strukturu streptograminu B rozštěpením esterové vazby (Korczynska *et al.* 2007).



**Obr. 12:** Struktura linkosamidů inaktivovaných LnuA' O-nukleotidyltransferázou kódovanou genem *lnuA'*. Tento enzym přenáší adenylát na C3 linkomycinu (vpravo) a C4 klindamycinu (vlevo). Převzato z Brisson-Noël *et al.* 1988.

#### 4.2.4. Mutace způsobující MLS<sub>B</sub> rezistenci

Vedle mechanismů založených na genech rezistence může k podobným fenotypovým projevům bakterií docházet i díky přirozeným spontánním mutacím, pokud je mutován některý specifický gen (kódující například cílovou strukturu antibiotika).

Na rezistenci u bakterií mají nejvýznamnější vliv mutace bodové. Dochází při nich k záměně nukleotidů či změně jejich pořadí v DNA. Může jít o změnu posunovou (posun čtecího rámce díky inzerci nebo delecí jednoho či více nukleotidů) nebo substituční (nahrazení správného nukleotidu chybným). V podstatě jde o chybu replikace, která nebyla rozpoznána ani opravena žádným z rozmanitých reparačních mechanismů mutované bakteriální buňky.

Mutační frekvence je za normálních okolností velmi nízká, navíc jen málokterá mutace je pozitivní, tj. dávající mutovanému jedinci nějakou výhodu. Proto je MLS<sub>B</sub> rezistence vzniklá mutací obvykle vzácná. Pravděpodobnost spontánní mutace u bakterií je 10<sup>-6</sup> až 10<sup>-7</sup> na 1 kilobázi během jednoho dělení, nicméně existují výchylky od této hodnoty oběma směry – v přírodě lze najít jak bakterie, které mají přesnější reparační mechanismy (např. bakterie rostoucí v prostředí s vysokou intenzitou UV) tak i takové, které naopak mutují daleko častěji (tzv. hypermutátoři, kterým zvýšená četnost mutací umožňuje i za cenu ztrát přežít v nepříznivém prostředí – viz níže).

V případě stafylokoků hrají v rezistenci roli především bodové mutace ve výše popsaných klíčových oblastech velké ribozomální podjednotky (např. v genu *rrl* pro 23S rRNA). Výhodné jsou

tedy pro bakterii mutace v adeninu A2058 nebo A2059 z domény V 23S rRNA (jejich modifikace zaručuje nejvyšší míru rezistence) a v nukleotidech v jejich blízkém okolí. Navíc mohou být mutovány nukleotidy domény II 23S rRNA nebo geny kódující ribozomální proteiny L4 (*rplD*) nebo L22 (*rplV*) (Prunier *et al.* 2002).

To, že se mutace projeví u běžných klinických izolátů stafylokoků zřídka, má jasný důvod – gen *rrl* pro 23S rRNA je součástí operonu *rrn*, který se na chromozomu stafylokoků vyskytuje v pěti až šesti kopiích (počet kopií je druhově specifický; Wada *et al.* 1993). Je-li tedy mutován jen jeden z operonů, jeho fenotypové projevy jsou zamaskovány díky projevům ostatních nemutovaných kopií téhož operonu. K tomu, aby se mutace mohla plně nebo alespoň částečně projevit a aby tedy byla detekovatelná, musí dojít k mutaci ve více operonech. Čím víc kopií genu pro 23S rRNA je mutováno, tím větší je pak rezistence – a ta je velmi variabilní (podle počtu mutovaných kopií a typu mutace). Dříve se dokonce mělo za to, že mutace zodpovědná za MLS<sub>B</sub> rezistenci se vyskytuje pouze u bakterií, které nesou pouze jednu nebo dvě kopie *rrn* operonu – pravděpodobně proto, že u nich je snadné ji detekovat.

Kromě mutací v genech pro ribozomální struktury je nutno zmínit také mutace způsobující přerušování některé metabolické dráhy a následnou auxotrofii, které mohou vyústit v trpasličí fenotyp s pozmeněnou rezistencí daného kmene k antibiotikům; většího významu dosahují tyto mutace při zvýšené mutační frekvenci u tzv. „hypermutátorových“ kmenů. Tyto dva jevy budou blíže popsány v následující kapitole, neboť jde o mechanismy vyskytující se ve zvýšené míře právě u pacientů s CF.

Mutace mají mimo jiné také schopnost přetvořit inducibilní charakter rezistence na konstitutivní (inducibilně exprimovaný gen zmutuje na konstitutivní a selekce způsobí jeho převážení v populaci).

### 4.3. Výskyt MLS<sub>B</sub> rezistence v ČR a ve světě

Stanovit celosvětový výskyt MLS<sub>B</sub> rezistence je problematické, neboť je velice variabilní i v rámci jedné země. V České republice chybí větší studie zkoumající výskyt MLS<sub>B</sub> rezistence u meticilin-citlivých kmenů *S. aureus* (MSSA). V roce 2002 byla zjišťována rezistence u 713 kmenů *S. aureus* izolovaných z různých klinických materiálů (především z hnisu a ze sputa). Mezi 653 kmeny MSSA bylo rezistentních k erytromycinu 18,2 % z nich, zatímco mezi 60 kmeny MRSA se vyskytovala erytromycinová rezistence téměř u 94 %. Celková rezistence k erytromycinu u všech kmenů (MRSA i MSSA) činila 26,8 % (Urbášková *et al.* 2002).

Obsáhlejší česká studie MLS<sub>B</sub> rezistence se týkala MRSA (Melter *et al.* 2003). Předmětem studia bylo sto kmenů MRSA izolovaných z více než dvaceti různých nemocnic v České republice. V roce 2003 byla detekována rezistentnce k erytromycinu u 98 % analyzovaných kmenů (příčinou byl vždy jeden či více genů *erm*), ke klindamycinu bylo rezistentních 86 % kmenů. Celkový výskyt MRSA se v České republice v letech 1999 až 2001 pohyboval od 3 do 10 %.



V roce 2001 bylo analyzováno 3051 izolátů *S. aureus* z 25 evropských nemocnic (Fluit *et al.* 2001). U čtvrtiny izolátů byla prokázána rezistence k oxacilinu (MRSA). Konstitutivní MLS<sub>B</sub> fenotyp se vyskytoval u 88 % erytromycin-rezistentních kmenů MRSA a u 37 % erytromycin-rezistentních kmenů MSSA. Vysoká rezistence MSSA k penicilinu (84,6 %) a ampicilinu (83,9 %) naznačuje důležitost MLS<sub>B</sub> antibiotik při tolik rozšířené beta-laktamové rezistenci. Z beta-laktamů si však zatím zachovávají účinnost některé novější preparáty, jako např amoxicilin-klavulanát (5,2% rezistence mezi MSSA). Co se týká MLS<sub>B</sub> rezistence analyzovaných kmenů *S. aureus*, rezistentních k erytromycinu bylo 95,2 % MRSA a 32,5 % MSSA, rezistentních ke klindamycinu 76,7 % MRSA a 6,3 % MSSA a rezistentních ke quinupristinu-dalfopristinu pouze 0,5 % MRSA a 4,7 % MSSA. K podobným výsledkům došly i jiné studie (např. Lina *et al.* 1999).

Bliže byl rovněž zkoumán výskyt erytromycinové rezistence včetně genů zodpovědných za tuto rezistenci (Schmitz *et al.* 1999). Z 1554 izolátů *S. aureus* (22 % MRSA) získaných z 20 evropských nemocnic bylo celkem 39 % kmenů erytromycin-rezistentních. Mezi MRSA bylo 96,6 % kmenů erytromycin-rezistentních, a to téměř ve všech případech konstitutivně, zatímco mezi MSSA pouze 33,1 % vykazovalo erytromycinovou rezistenci, konstitutivních jen v necelé polovině případů. Citlivost MSSA k erytromycinu je tedy přibližně dvacetkrát častější než u MRSA. U 851 erytromycin-rezistentních kmenů *S. aureus* (358 MSSA, 493 MRSA) byly dále analyzovány geny rezistence (Schmitz *et al.* 2000). V celém souboru byl nejčastěji příčinou rezistence gen *ermA* (celkem 67%; 88 % MRSA a 38 % MSSA) převážně exprimovaný konstitutivně, druhý nejčastější byl gen *ermC* (celkem 23%; 5% MRSA, 47 % MSSA). U 3% všech kmenů byla detekována kombinace obou těchto genů. Naopak gen *ermB* byl prokázán jen u 0,6 % kmenů, stejně jako *ereB* (nelezený pouze u MRSA). Gen pro efluxní pumpu *msrA* nebo *msrB* neslo 6% všech kmenů (a to pouze MSSA s výskytem 13 %). Obecně lze říci, že čím větší podíl všech analyzovaných kmenů tvořily za danou evropskou zemi MRSA, tím vyšší rezistence byla pro tuto zemi detekována (Schmitz *et al.* 2000).

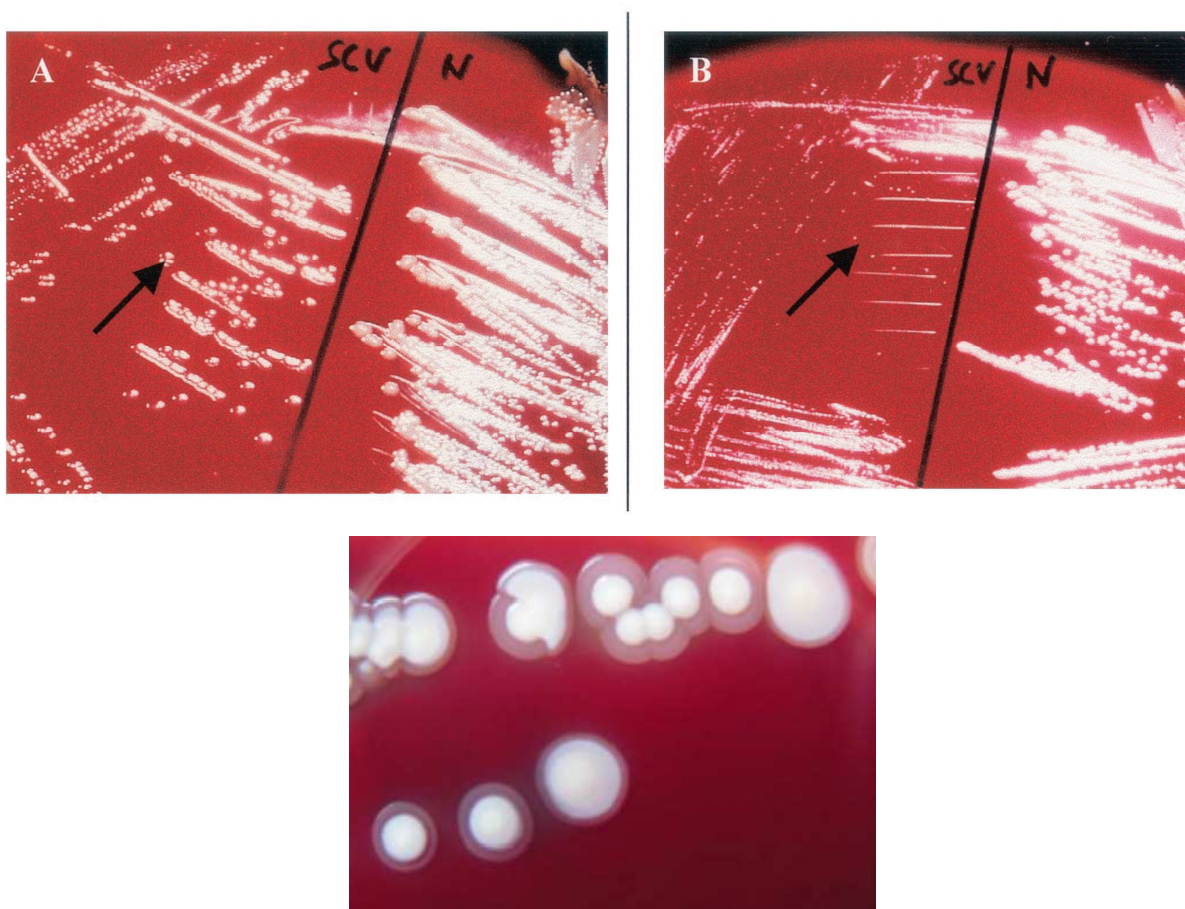
## **5. Specifické mechanismy MLS<sub>B</sub> rezistence *Staphylococcus aureus* u pacientů s cystickou fibrózou**

Jak bylo popsáno výše, patofyziologické změny spojené s cystickou fibrózou vytvářejí unikátní prostředí v plicích pacienta. Selhání některých složek imunitního systému má za následek vyšší vnímavost hostitelských buněk k bakteriálním infekcím. Celoživotní antibiotická léčba pacientů s CF přispívá k selekci kmenů, které mají větší šance v takovém prostředí přežít. Ovlivňovat se mohou i bakteriální druhy či nepříbuzné kmeny navzájem, neboť mezi nimi přirozeně dochází ke kompetici o zdroje. *S. aureus* je v prostředí plic pacientů s CF rezistentnější (např. viz obr. 14) než u zdravých jedinců, i pokud se antibiotikům brání jen běžnými, výše popsanými způsoby rezistence. Navíc ovšem využívá speciálních mechanismů, známých sice i od jiných

bakterií či nespojovaných pouze s cystickou fibrózou, nicméně vyskytujících se u pacientů s CF ve zvýšené míře.

### 5.1. Trpasličí kolonie (SCV)

Mutace podmiňující rezistenci se nemusí dotknout jen cílových míst  $MLS_B$  antibiotik na velké ribozomální podjednotce. Dojde-li k mutaci v genech pro syntézu menadionu, heminu, thiaminu nebo tymidinu, je výsledkem specifický fenotyp bakteriálních kmenů známý jako SCV (small colony variants) nebo také trpasličí kolonie; viz obr. 13. Takovéto kmeny mají většinou defektní elektron-transportní řetězec, což se fenotypově projevuje pomalejším růstem na rozdíl od jejich mateřských kmenů, tudíž jsou při kultivaci o mnoho menší (přibližně desetkrát).

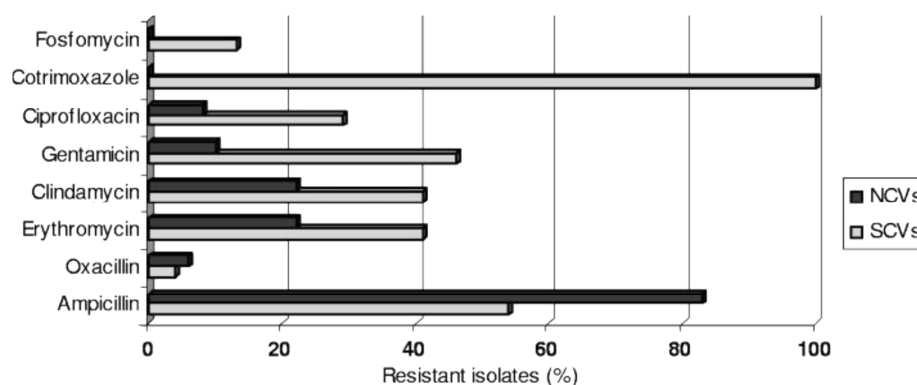


**Obr. 13:** Nahoře morfologické varianty trpasličích (SCV) a normálních (N) kmenů *S. aureus* na Columbia agaru – šipkou označeny kolonie SCV tvaru „fried-eggs“ (A) a droboučké kolonie zvané „pinpoint“ (B). Dole detail „fried-eggs“ kolonií. Převzato z Kahl *et al.* 2003 a Melter and Radojevič 2010.

Izolace SCV kmenů z klinického materiálu a rovněž jejich kultivace je náročná, protože nemutované mateřské či kompetující bakteriální kmeny je na agaru snadno přerostou a navíc je SCV fenotyp často nestabilní (v příznivých podmínkách mohou konvertovat zpět k nemutovanému fenotypu). Kromě typicky drobné velikosti kolonií dochází u SCV také k útlumu respirace

a některých patogenních vlastností, jako je hemolýza nebo pigmentace. Ačkoli jsou méně virulentní než jejich mateřské kmeny (někteří autoři dokonce navrhují umělou indukci SCV fenotypu jako způsob zmírnění stafylokokové infekce), jejich patogenita je naopak posílena zvýšenou schopností intracelulární perzistence v hostitelských neprofesionálních fagocytech, např. endoteliálních či epiteliálních buňkách. Zřejmě proto je podstatně snížena jejich citlivost k antibiotikům (viz obr. 14) a mohou vyvolat latentní rekurentní formy infekce (Kahl *et al.* 1998, Proctor *et al.* 1995).

V důsledku výše uvedených mutací se u SCV *S. aureus* vyskytuje auxotrofie buď k menadionu, heminu, thiaminu nebo tymidinu. Nedokáže si tedy tyto látky syntetizovat a je odkázán na jejich extracelulární zdroje. Suplementace média těmito látkami, ale v některých případech překvapivě také nenasycenými mastnými kyselinami nebo CO<sub>2</sub>, vede k reverzi na klasický fenotyp. SCV kolonie s nedostatečným příjmem menadionu, heminu, thiaminu či tymidinu jsou defektní buď v procesech oxidační fosforylace a elektron-transportního řetězce, nebo v procesu biosyntézy tymidinu. Menadion je nezbytný pro tvorbu menachinonu, akceptoru elektronů z NADH a FADH<sub>2</sub> v elektron transportním řetězci, hemin hraje důležitou roli v biosyntéze cytochromů přijímajících elektrony z menachinonu a thiamin je vyžadován pro biosyntézu menadionu. Přerušení elektron-transportního řetězce redukuje elektrochemický gradient na membráně, což vede mimo jiné také ke sníženému transportu antibiotik do bakteriální buňky. Potlačení aerobního metabolismu *S. aureus* vyvolává upřednostnění fermentačních procesů, čímž je snížen výtěžek ATP a zpomalen růst.



**Obr. 14:** Procentuální zastoupení kmenů *S. aureus* rezistentních k různým antibiotikům mezi 110 normálními izoláty (černě) a 24 SCV *S. aureus* (světle šedě). Kmeny izolovány od pacientů s CF. Je patrné, že rezistence k erytromycinu či klindamycinu je u SCV kmenů podstatně zvýšena. Převzato z Besier *et al.* 2007.

Bylo prokázáno, že *S. aureus* je citlivý k některým exotoxinům, které produkuje *P. aeruginosa* jako součást mezidruhového boje s komezální mikroflórou. Příkladem takového toxinu je pyocyanin, respirační inhibitor zacílený proti elektron-transportnímu řetězci stafylokoků. Subpopulace *S. aureus* dokáže přežít v prostředí s tímto toxinem právě díky selekci SCV fenotypu, kdy je cílové místo inhibičního účinku pyocyaninu defektní a nemůže být postiženo (Bisvas *et al.* 2009).

Co se týče výskytu, v roční německé studii byl normální *S. aureus* detekován v dýchacích cestách 120 z 252 pacientů s CF (48 %), zatímco SCV *S. aureus* jen u 20 pacientů (8 %). Pacienti s SCV byli signifikantně starší, v pokročilejším stádiu plicního onemocnění a častěji kolonizováni současně také *P. aeruginosa* (Besier *et al.* 2007). V jiné studii byly normální kmeny *S. aureus* zjištěny u 32 z 98 pacientů s CF (33 %), zatímco SCV *S. aureus* u 8 z nich (8 %). Rozdíly mezi pacienty byly stejné jako v prvním příkladu, navíc však ještě byli pacienti s SCV častěji léčeni kombinovaným sulfonamidovým antibiotikem kotrimoxazolem a systémovými aminoglykosidy (Schneider *et al.* 2008). Pravděpodobnost vzniku SCV *S. aureus* je také významně zvýšena u pacientů s cizím tělesem (cévka, katetr, umělé náhrady).

Fenotyp SCV byl prokázán u mnoha jiných bakteriálních zástupců izolovaných od pacientů s CF, jako jsou např. *H. influenzae* nebo *P. aeruginosa* (Häussler *et al.* 1999, Häussler *et al.* 2003) či také od pacientů s jinými onemocněními (Besier *et al.* 2008).

## 5.2. Hypermutableabilita

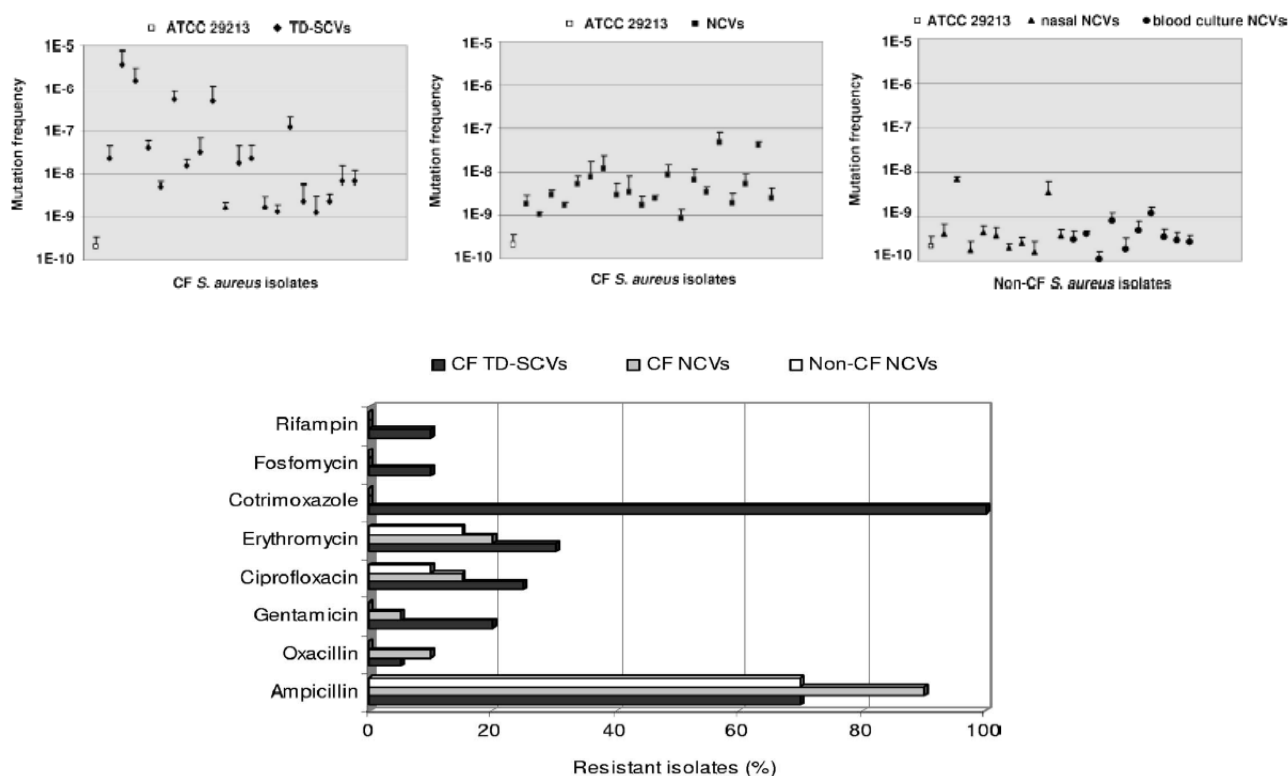
Mutace může zasáhnout geny kódující některé komponenty mechanismů podílejících se na opravě chyb v replikaci. Tím se snižuje přesnost replikace (spontánní chyby v tomto procesu jsou méně často opraveny) a dochází k výraznému zvýšení mutační frekvence. Bakterie se stává „hypermutátorem“, což je pro ni značně nákladné, nicméně ve stresovém prostředí (např. mnohočetná antibiotická terapie u pacientů s CF) může být díky tomu zvýhodněna, neboť pravděpodobnost vzniku jakékoli výhodné mutace udělující rezistenci je vyšší (Alcalá-Franco *et al.* 2012). Mutace se v takovém případě může stát hlavním mechanismem rychlé adaptace k prostředí při perzistentní infekci.

Obvykle jsou u *S. aureus* zasaženy vysoce konzervované geny *mutS* a *mutL* kódující komponenty systému „mismatch repair“ (MMS), který se u gram pozitivních bakterií významně podílí na opravě chybného párování bází a tím rovněž na udržování stability genomu (Prunier and Leclercq 2004). Nejlepší podmínky pro vznik mutací ve vysoké frekvenci vytváří subterapeutické dávky antibiotika podávané po dlouhou dobu (např. profylaktická léčba infekcí při CF), proto je lepší použít k léčbě kombinaci dvou či více antibiotik, kdy se rezistence ke všem z nich vytvoří jen velmi nesnadno (Prunier *et al.* 2003).

Ve francouzské studii kmenů *S. aureus* izolovaných v letech 1997–1999 byla hypermutabilita označena jako příčina vyšší míry rezistence *S. aureus* k erytromycinu u pacientů s CF v porovnání se zdravými osobami (Prunier *et al.* 2003). Mutační frekvence kmenů byla zjišťována na základě indukce mutací přítomností rifampinu. Hypermutátoři byli nalezeni u 13 z 89 kmenů *S. aureus* od pacientů s CF (14,6 %) zatímco jen u jednoho ze 74 kmenů *S. aureus* od zdravých osob (1,4 %). Za hypermutabilitu byly často zodpovědné různé mutace genu *mutS*. Jako hypermutátoři byly označeny kmeny s mutační frekvencí vyšší než  $10^{-7}$ . U izolátů od pacientů s CF se tato hodnota pohybovala okolo  $3,4 \times 10^{-6}$ , zatímco průměrná frekvence mutace *S. aureus* izolovaných od zdravých osob byla

$3,5 \times 10^{-8}$ . Generované mutace byly většinou nalezeny v klíčových oblastech působení  $MLS_B$  antibiotik ve 23S rRNA, ale mj. také v genech účastnících se adheze či stresové odpovědi bakteriální buňky, což naznačuje možnosti komplexnější adaptace zkoumaných kmenů díky hypermutabilitě.

Hypermutabilita by mohla být rovněž příčinou častějšího vzniku SCV *S. aureus* u pacientů s CF (Besier *et al.* 2008). V německé studii byly porovnávány kmeny *S. aureus* ze tří skupin - s normálním fenotypem od osob bez CF, s normálním fenotypem od pacientů s CF a s tymidin-dependentním SCV fenotypem od pacientů s CF (viz obr. 15). U kmenů izolovaných od pacientů s CF, ať už normálního či SCV fenotypu, byla zjištěna vyšší frekvence mutací. Mutační frekvence u pěti kmenů SCV odpovídala hypermutabilitě (dle výše uvedené definice), jejíž příčinou byly většinou rozličné delece, inserce nebo substituce v genech *mutS* a *mutL*. Rezistence k vybraným antibiotikům včetně erytromycinu byla u SCV častější; polovina kmenů SCV testovaných na rezistenci k makrolidům byla navíc k těmto antibiotikům odolná spíše díky mutacím ve 23S rRNA než díky genům rezistence. Zvýšená mutační frekvence podle autorů mohla hrát roli jak při vzniku rezistence, tak také při vzniku auxotrofie k tymidinu díky různým mutacím v genu *thyA*.



**Obr. 15: Nahore:** Frekvence mutací u tří skupin kmenů *S. aureus*. Zleva: tymidin-dependentní SCV kmeny od pacientů s CF, normální (NCV) kmeny od pacientů s CF a NCV kmeny od pacientů bez CF. Každý černě vyznačený bod symbolizuje průměrnou mutační frekvenci jednoho kmene z dané skupiny, bílý bod je vždy referenční kmen ATCC 29213 *S. aureus*. Signifikantně vyšší mutační frekvence byla prokázána u mnoha kmenů spojených s CF. **Dole:** Procentuální zastoupení kmenů *S. aureus* rezistentních k různým antibiotikům mezi 20 normálními izoláty pacientů bez CF (bíle), 20 normálními izoláty pacientů s CF (šedě) a 20 izoláty tymidin-dependentních SCV *S. aureus* rovněž od pacientů s CF (černě). Je patrné, že rezistence k erytromycinu je u SCV kmenů podstatně zvýšena. Převzato z Besier *et al.* 2008.

Role hypermutability u bakterií však zatím není zcela objasněna. Její význam při vzniku rezistence u *S. aureus* některé studie dokonce popírají (O'Neill and Chopra 2003). Jiné studie jsou naopak v souladu s výše uvedenými poznatky – velký podíl „hypermutátorových“ kmenů byl zjištěn např. mezi izoláty *P. aeruginosa* od pacientů s CF; následkem hypermutability byla zvýšena rezistence těchto kmenů, přičemž přežívaly v infikovaných pacientech po dlouhou dobu (Oliver *et al.* 2000, Maciá *et al.* 2005).

## 6. Závěr

Uvedení erytromycinu na trh vyvolalo v 50. letech minulého století velké nadšení, protože beta-laktamová rezistence se čím dál více šířila mezi bakteriemi dříve citlivými k penicilinům. Makrolidová antibiotika začala být masově používána a není proto divu, že se dnes poměrně často můžeme setkat s bakteriálními kmeny, které nejsou citlivé už ani k těmto léčivům. První izoláty *S. aureus* rezistentní k erytromycinu byly přitom objeveny jen pár let po jeho zavedení na trh. Je nutné si uvědomit, že determinanty rezistence nejsou nové, nicméně selekční tlaky způsobené zvýšeným výskytem MLS<sub>B</sub> antibiotik a jejich reziduí v prostředí napomáhají šíření rezistentních kmenů a jejich postupnému převážení nad citlivými kmeny. MLS<sub>B</sub> rezistence zatím nedosahuje závažnosti rezistence beta-laktamové, ale i tak bychom měli být v užívání MLS<sub>B</sub> antibiotik uvážlivější – pokud by rezistence vzrostla, bylo by nutné hledat nové léky a hrozila by selekce ještě rezistentnějších kmenů.

Na antibiotika bylo dlouhá léta po jejich objevu (ve 30. letech 19. století) veřejností pohlíženo jako na jakési všeléky jakýchkoli onemocnění. Jejich volná dostupnost v některých zemích umožnila jejich zneužívání, což vyvrcholilo rozšířením bakteriální multirezistence. Tak zvaná zlatá éra antibiotik je však už nyní minulostí, dokonce se lze setkat s označením dneška jako „postantibiotické“ éry. Lidé si začínají uvědomovat dopady nesprávného užívání antibiotik. Dobrou zprávou je, že omezeným užíváním daných antibiotik může dojít k opětovnému snížení podílu rezistentních kmenů v populaci, neboť tyto kmeny potom nebudou selekcí tolik prosazovány. Vyšší podíl kmenů citlivých k beta-laktamům nebo MLS<sub>B</sub> antibiotikům by jistě umožnil také snadnější léčbu infekcí vyvolaných *S. aureus*.

Kvůli narušení imunitního systému respiračního traktu je u pacientů s CF nutná častá a při chronických infekcích až kontinuální antibiotická léčba. V jejich plicích se tak uplatňují mnohem větší selekční tlaky než v plicích zdravých jedinců, což v kombinaci se selháním některých funkcí jejich imunitního systému vede k vytvoření jedinečné mikrobiální niky, již kolonizuje mimo jiné také *S. aureus*. Toto prostředí dává vzniknout „hypermutátorovým“ kmenům a kmenům defektním v elektron-transportním řetězci či syntéze tymidinu (SCV). Hypermutátoři mohou generací náhodných mutací snadněji dosáhnout rezistence. Mutace zdánlivě znevýhodňující svého nositele se mohou v takovémto stresovém prostředí stát výhodnou – například umožňují *S. aureus* osídlit epitel dýchacích cest nejen na povrchu, ale ve zvýšené míře také intracelulárně za cenu ztráty některých virulentních vlastností (v případě SCV). Perzistence tohoto patogena pak trvá léta až desetiletí, a tak může zdánlivě vyléčená infekce znovu propuknout a nečekaně ochromit pacienta. Také díky intracelulárnímu přežívání jsou SCV *S. aureus* odolnější k rozličným antibiotikům; jejich odolnost se navíc ještě zvyšuje vlivem defektů spojených s CF. Jsou to přitom především antibiotika, která umožňují pacientům s CF dožít se vyššího věku (průměrně již téměř 40 let). Účinnost antistafylokokových antibiotik nicméně zatím nebyla spolehlivě prokázána. Je možné, že eradikaci

stafylokoků z plic dochází paradoxně ke zhoršení stavu pacienta kvůli následně usnadněné infekci *P. aeruginosa*, která může být fatální. Výzkum by se tedy měl soustředit na objasnění vlivu této antistafylokokové preventivní léčby na stav pacientů s CF, ale také na bližší poznání mechanismů rezistence (např. dosud nedořešený mechanismus fungování MsrA pumpy) či prověření vlivu hypermutability na průběh infekce. Stafylokokům se věnuje méně pozornosti než *P. aeruginosa* nebo *B. cepacia*, které jsou při cystické fibróze větší hrozbou pro pacienta; *S. aureus* však nepochybně sehrává rovněž důležitou roli ve vývoji tohoto onemocnění. Porozumění specifickým mechanismům rezistence *S. aureus* je tak klíčové pro plánování dalších možností léčby pacientů s CF, pro navrhování nových antibiotik a pro případná preventivní opatření zabráňující jejich šíření.



## 7. Seznam použité literatury

**Alcalá-Franco B**, Montanari S, Cigana C, Bertoni G, Oliver A, Bragonzi A (2012) Antibiotic pressure compensates the biological cost associated with *Pseudomonas aeruginosa* hypermutable phenotypes *in vitro* and in a murine model of chronic airways infection. *J Antimicrob Chemother*, 67(4):962-969.

**Armstrong DS**, Grimwood K, Carzino R, Carlin JB, Olinsky A, Phelan PD (1995) Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis. *BMJ*, 310:1571-2.

**Arthur M**, Brisson-Noël A, Courvalin P (1987) Origin and evolution of genes specifying resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics: data and hypotheses. *J Antimicrob Chemother*, 20(6):783-802.

**Bailey M**, Chettiath T, Mankin AS (2008) Induction of *ermC* expression by noninducing antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(3):866–874.

**Baudoux P**, Lemaire S, Denis O, Tulkens PM, van Bambeke F, Glupczynski Y (2010) Activity of quinupristin/dalfopristin against extracellular and intracellular *Staphylococcus aureus* with various resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother*, 65(6):1228-1236.

**Besier S**, Smaczny C, von Mallinckrodt C, Krahl A, Ackermann H, Brade V, Wichelhaus TA (2007) Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Microbiol*, 45(1):168–172.

**Besier S**, Zander J, Kahl BC, Kraiczky P, Brade V, Wichelhaus TA (2008) The thymidine-dependent small-colony-variant phenotype is associated with hypermutability and antibiotic resistance in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 6:2183–2189.

**Besier S**, Zander J, Siegel E, Saum SH, Hunfeld KP, Ehrhart A, Brade V, Wichelhaus TA (2008) Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variants: human pathogens that are relevant not only in cases of cystic fibrosis lung disease. *J Clin Microbiol*, 46(11):3829-3832.

**Biswas L**, Biswas R, Schlag M, Bertram R, Götz F (2009) Small-colony variant selection as a survival strategy for *Staphylococcus aureus* in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, 75(21):6910-6912.

**Bouanchaud DH** (1992) *In-vitro* and *in-vivo* synergic activity and fractional inhibitory concentration (FIC) of the components of a semisynthetic streptogramin, RP 59500. *J Antimicrob Chemother*, 30(suppl A):95-99.

**Brisson-Noël A**, Delrieu P, Samain D, Courvalin P (1988) Inactivation of lincosaminide antibiotics in *Staphylococcus*: Identification of lincosaminide O-nucleotidyltransferases and comparison of the corresponding resistance genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 263:15880-15887.

**Cabello H**, Torres A, Celis R, El-Ebiary M, de la Bellacasa JP, Xaubet A, González J, Agustí C, Soler N (1997) Bacterial colonization of distal airways in healthy subjects and chronic lung disease: a bronchoscopic study. *Eur Respir J*, 10:1137–1144.

**Canu A, Leclercq R** (2009) Macrolides and lincosamides, *Antimicrobial Drug Resistance* Chapter 18.

**Champney WS, Tober CL** (2000) Specific inhibition of 50S ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells by 16-membered macrolide, lincosamide, and streptogramin B antibiotics. *Current Microbiology* 41:126–135.

**Champney WS**, Chittum HS, Tober CL (2003) A 50S ribosomal subunit precursor particle is a substrate for the ErmC methyltransferase in *Staphylococcus aureus* cells. *Current Microbiology*, 46:453–460.

**Coenye T**, Goris J, Spilker T, Vandamme P, LiPuma JJ (2002) Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. *J Clin Microbiol*, 40(6):2062–2069.

**Cramton SE**, Ulrich M, Götzl F, Döring G (2001) Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun*, 69(6):4079–4085.

Cystic fibrosis foundation patient registry: Annual data report 2010

**Daurel C**, Huet C, Dhalluin A, Bes M, Etienne J, Leclercq R (2008) Differences in potential for selection of clindamycin-resistant mutants between inducible *ermA* and *ermC* *Staphylococcus aureus* genes. *J Clin Microbiol*, 46(2):546–550.

**Döring G**, Gulbins E (2009) Cystic fibrosis and innate immunity: how chloride channel mutations provoke lung disease. *Cellular Microbiology*, 11(2):208–216.

**Emerson J**, McNamara S, Buccat AM, Worrell K, Burns JL (2010) Changes in cystic fibrosis sputum microbiology in the United States between 1995 and 2008. *Pediatric Pulmonology*, 45:363–370.

**Feliziani S**, Luján AM, Moyano AJ, Sola C, Bocco JL, Montanaro P, Canigia LF, Argaraña CE, Smania AM (2010) Mucoïdy, quorum sensing, mismatch repair and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis chronic airways infections. *PLoS ONE*, 5(9)e12669:1-12.

**Ferrara A**, Dos Santos C, Cimbro M, Gialdroni Grassi G (1996) Comparative antimicrobial activity and post-antibiotic effect of azithromycin, clarithromycin and roxithromycin against some respiratory pathogens. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 7:181-186.

**Fiebelkorn KR**, Crawford SA, McElmeel ML, Jorgensen JH (2003) Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative Staphylococci. *J Clin Microbiol*, 41(10):4740.

- Fluit AC**, Wienders CLC, Verhoef J, Schmitz F-J (2001) Epidemiology and susceptibility of 3051 *Staphylococcus aureus* isolates from 25 university hospitals participating in the European SENTRY study. *J Clin Microbiol*, 39(10):3727–3732.
- Fuchs PC**, Barry AL, Brown SD (2000) Bactericidal activity of quinupristin-dalfopristin against *Staphylococcus aureus*: clindamycin susceptibility as a surrogate indicator. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(10):2880–2882.
- Gabashvili IS**, Gregory ST, Valle M, Grassucci R, Worbs M, Wahl MC, Dahlberg AE, Frank J (2001) The polypeptide tunnel system in the ribosome and its gating in erythromycin resistance mutants of L4 and L22. *Molecular Cell*, 8:181–188.
- Gilligan PH**, Gage PA, Welch DF, Muszynski MJ, Wait KR (1987) Prevalence of thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 25(7):1258.
- Girard AE**, Girard D, English AR, Gootz TD, Cimochowski CR, Faiella JA, Haskell SL, Retsema JA (1987) Pharmacokinetic and in vivo studies with azithromycin (CP-62,993), a new macrolide with an extended half-life and excellent tissue distribution. *Antimicrob Agents Chemother*, 31:1948-1954.
- Goldman MJ**, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM (1997) Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*, 88:553–560.
- Gorwitz RJ**, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE, Jensen BJ, Killgore G, Tenover FC, Kuehnert MJ (2008) Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. *J Inf Dis*, 197:1226–34.
- Hamilton-Miller JMT and Shah S** (1998) Comparative in-vitro activity of ketolide HMR 3647 and four macrolides against Gram-positive cocci of known erythromycin susceptibility status. *J Antimicrob Chemother*, 41:649–653.
- Hansen CR**, Pressler T, Hoiby N, Johansen HK (2009) Long-term, low-dose azithromycin treatment reduces the incidence but increases macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* in Danish CF patients. *Journal of Cystic Fibrosis* 8:58–62.
- Hansen JL**, Ippolito JA, Ban N, Nissen P, Moore PB, Steitz TA (2002) The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Molecular Cell*, 10:117–128.
- Hansen LH**, Mauvais P, Douthwaite S (1999) The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA. *Mol Microbiol*, 31:623–631.
- Hardy DJ**, Hensey DM, Beyer JM, Vojtko C, McDonald EJ, Fernandes PB (1988) Comparative in vitro activities of new 14-, 15- and 16-membered macrolides. *Antimicrob Agents Chemother*, 32(11):1710-1719.

- Häussler S**, Lehmann C, Breselge C, Rohde M, Classen M, Tümmler B, Vandamme P, Steinmetz I (2003) Fatal outcome of lung transplantation in cystic fibrosis patients due to small-colony variants of the *Burkholderia cepacia* complex. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 22:249–253.
- Häussler S**, Tümmler S, Weissbrodt H, Rodhe M, Steinmetz I (1999) Small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Clin Infect Dis*, 29:621–625.
- Higgins CF** (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, 8:67-113
- Jones RN**, Ballow CH, Biedenbach DJ, Deinhart JA, Schentag JJ (1998) Antimicrobial activity of quinupristin-dalfopristin (RP 59500, Synercid) tested against over 28,000 recent clinical isolates from 200 medical centers in the United States and Canada. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 31(3):437–451.
- Kahl BC**, Belling G, Reichelt R, Herrmann M, Proctor RA, Peters G (2003) Thymidine-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* exhibit gross morphological and ultrastructural changes consistent with impaired cell separation. *J Clin Microbiol*, 41(1):410–413.
- Kahl BC**, Duebbers A, Lubritz G, Haeberle J, Koch HG, Ritzerfeld B, Reilly M, Harms E, Proctor RA, Herrmann M, Peters G (2003) Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. *J Clin Microbiol*, 41(9):4424-4427.
- Korczyńska M**, Mukhtar TA, Wright GD, Berghuis AM (2007) Structural basis for streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus* by virginiamycin B lyase. *PNAS*, 104(25):10388–10393.
- Lai CJ, Weisblum B** (1971) Altered methylation of ribosomal RNA in an erythromycin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Proc Nat Acad Sci USA*, 68(4):856-860.
- Lee Y**, Choi JY, Fu H, Harvey C, Ravindran S, Roush WR, Boothroyd JC, Khosla C (2011) Chemistry and biology of macrolide antiparasitic agents. *J Med Chem*, 54:2792-2804.
- Levin TP**, Suh B, Axelrod P, Truant AL, Fekete T (2005) Potential clindamycin resistance in clindamycin-susceptible, erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus*: report of a clinical failure. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(3):1222–1224.
- Lina G**, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J (1999) Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among *Staphylococci*. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(5):1062–1066.
- Linden PK**, Moellering RC Jr, Wood CA, Rehm SJ, Flaherty J, Bompert F, Talbot GH (2001) Treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infections with quinupristin/dalfopristin. *Clin Infect Dis*, 33:1816–1823.
- Luh KT**, Hsueh PR, Teng LJ, Pan HJ, Chen YC, Lu J, Wu JJ and Ho SW (2000) Quinupristin-dalfopristin resistance among gram-positive bacteria in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother*, 44:3374–3380.

- Lüthje P**, von Köckritz-Blickwede M, Schwarz S (2007) Identification and characterization of nine novel types of small staphylococcal plasmids carrying the lincosamide nucleotidyltransferase gene *lnuA*. *J Antimicrob Chemother*, 59:600–606.
- Maciá MD**, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Pérez JL, Oliver A (2005) Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(8):3382–3386.
- Marešová V, Urbášková P** (2006) Spiramycinum. *Remedia*, 2006/1.
- Martin DW**, Schurr MJ, Mudd MH, Govan JRW, Holloway BW, Deretic V (1993) Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:8377-8381.
- Matsui H**, Verghese MW, Kesimer M, Schwab UE, Randell SH, Sheehan JK, Grubb BR, Boucher RC (2005) Reduced three-dimensional motility in dehydrated airway mucus prevents neutrophil capture and killing bacteria on airway epithelial surfaces. *The Journal of Immunology*, 175:1090-1099.
- Matsuoka M**, Inoue M, Endo Y, Nakajima Y (2003) Characteristic expression of three genes, *msrA*, *mphC* and *ermY*, that confer resistance to macrolide antibiotics on *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 220:287-293.
- Matsuoka Y**, Endou K, Kobayashi H, Inoue M, Nakajima Y (1998) A plasmid that encodes three genes for resistance to macrolide antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 167:221-227.
- Melter O**, de Sousa A, Urbášková P, Jakubů V, Žemličková H, de Lencastre H (2003) Update on the major clonal types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech Republic. *J Clin Microbiol*, 41(11):4998–5005.
- Melter O**, Radojevič B (2010) Small Colony Variants of *Staphylococcus aureus* – review. *Folia Microbiol*, 55(6):548–558.
- Muhlebach MS**, Stewart PW, Leigh W, Noah TL (1999) Quantification of inflammatory responses to bacteria in young cystic fibrosis and control patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 160:186-191.
- Murphy E** (1985) Nucleotide sequence of *ermA*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B determinant in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 162(2):633-640.
- Novotná G**, Adámková V, Janata J, Melter O, Spížek J (2005) Prevalence of resistance mechanisms against macrolides and lincosamides in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the Czech Republic and occurrence of an undefined mechanism of resistance to lincosamides. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(8):3586-3589.

**O'Neill AJ, Chopra I** (2002) Insertional inactivation of *mutS* in *Staphylococcus aureus* reveals potential for elevated mutation frequencies, although the prevalence of mutators in clinical isolates is low. *J Antimicrob Chemother*, 50(2):161-169.

**Ojo KK, Striplin MJ, Ulep CC, Close NS, Zittle J, Luis H, Bernardo M, Leitao J, Roberts MC** (2006) *Staphylococcus* efflux *msrA* gene characterized in *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, and *Pseudomonas* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(3):1089-1091.

**Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J** (2000) High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288:1251-1253.

**Phillips I, Fernandes R, Warren C** (1970) In-vitro comparison of erythromycin, lincomycin, and clindamycin. *British Medical Journal*, 2:89-90.

**Pier GB, Grout M, Zaidi TS** (1997) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:12088–12093.

**Poehlsgaard J, Douthwaite S** (2005) The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat Rev Microbiol*, 3:870-881.

**Poulsen SM, Kofoed C, Vester B** (2000) Inhibition of the ribosomal peptidyl transferase reaction by the mycarose moiety of the antibiotics carbomycin, spiramycin and tylosin *J Mol Biol*, 304:471-481.

**Prabhu K, Rao S, Rao V** (2011) Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. *J Lab Physicians*, 3(1):25–27.

**Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M, Maslow JN, Arbeit RD** (1995) Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*, 20(1):95-102.

**Prunier AL, Malbruny B, Laurans M, Brouard J, Duhamel JF, Leclercq R** (2003) High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *The Journal of Infectious Diseases*, 187:1709–16.

**Prunier AL, Malbruny B, Tande D, Picard B, Leclercq R** (2002) Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* with ribosomal mutations conferring resistance to macrolides. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(9):3054–3056.

**Razvi S, Quittell L, Sewall A, Quinton H, Marshall B, Saiman L** (2009) Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995 to 2005. *Chest*, 136:1554-1560.

**Reeves DS, Holt HA, Phillips I, King A, Miles RS, Paton R, Wise R, Andrew M** (1991) Activity of clindamycin against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* from four UK centres. *J Antimicrob Chemother*, 27(4):469-474.

**Regnis JA**, Robinson M, Bailey DL, Cook P, Hooper P, Chan HK, Gonda I, Bautovich G, Bye PT (1994) Mucociliary clearance in patients with cystic fibrosis and in normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med*, 150(1):66-71.

**Rheinberger HJ**, Sternbach H, Nierhaus KH (1981) Three tRNA binding sites on *Escherichia coli* ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78(9):5310-5314.

**Riordan JR**, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245(4922):1066-1073.

**Rosenfeld M**, Gibson RL, McNamara S, Emerson J, Burns JL, Castile R, Hiatt P, McCoy K, Wilson CB, Inglis A, Smith A, Martin TR, Ramsey BW (2001) Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 32:356-366.

**Ross JL**, Farrell AM, Eady EA, Cove JH, Cunliffe VJ (1989) Characterisation and molecular cloning of the novel macrolide-streptogramin B resistance determinant from *Staphylococcus epidermitis*. *J Antimicrob Chemother*, 24:851-862.

**Ross JI**, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ, Baumberg S, Wootton JC (1990) Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Molecular Microbiology*, 4(7):1207-1214.

**Ross JI**, Eady EA, Cove JH, Baumberg S (1995) Identification of a chromosomally encoded ABC-transport system with which the staphylococcal erythromycin exporter MsrA may interact. *Gene*, 153:93-98

**Ross JI**, Eady EA, Cove JH, Baumberg S (1996) Minimal functional system required for expression of erythromycin resistance by *msrA* in *Staphylococcus aureus* RN4220. *Gene*, 183(1-2):143-148.

**Sandler P**, Weisblum B (1989) Erythromycin-induced ribosome stall in the *ermA* leader: a barricade to 5'-to-3' nucleolytic cleavage of the *ermA* transcript. *J Bacteriol*, 171(12):6680-6688.

**Schmitz FJ**, Sadurskia R, Kray A, Boos M, Geisel R, Köhrer K, Verhoef J, Fluit C (2000) Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *J Antimicrob Chemother*, 45(6): 891-894.

**Schmitz FJ**, Petridou J, Jagusch H, Astfalk N, Scheuring S, Schwarz S (2002) Molecular characterization of ketolide-resistant *erm(A)*-carrying *Staphylococcus aureus* isolates selected in vitro by telithromycin, ABT-773, quinupristin and clindamycin. *J Antimicrob Chemother*, 49(4):611-617.

**Schmitz FJ**, Verhoef J, Fluit AC and The Sentry Participants Group (1999) Prevalence of resistance to MLS antibiotics in 20 European university hospitals participating in the European SENTRY surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*, 43(6):783-792.

**Schneider M**, Mühlemann K, Droz S, Couzinet S, Casaulta C, Zimmerli S (2008) Clinical characteristics associated with isolation of small-colony variants of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 46(5):1832-34.

**Siberry GK**, Tekle T, Carroll K, Dick J (2003) Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance *in vitro*. *Clin Inf Dis*, 37:1257–60.

**Smith JJ**, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ (1996) Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell*, 85:229–236.

**Suzuki H**, Shimomura A, Ikeda K, Furukawa M, Oshima T, Takasaka T (1997) Inhibitory effect of macrolides on interleukin-8 secretion from cultured human nasal epithelial cells. *Laryngoscope*, 107:1661-1666.

**Teichgräber V**, Ulrich M, Endlich N, Riethmüller J, Wilker B, de Oliveira–Munding CC, van Heeckeren AM, Barr ML, von Kürthy G, Schmid KW, Weller M, Tümmler B, Lang F, Grassme H, Döring G, Gulbins E (2008) Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nature Medicine*, 14:382-391.

**Tenson T**, Lovmar M, Ehrenberg M (2003) The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol*, 330:1005–1014.

**Thal LA, Zervos MJ** (1999) Occurrence and epidemiology of resistance to virginiamycin and streptogramins. *J Antimicrob Chemother*, 43:171–176.

**Tramper-Stranders GA**, Wolfs TFW, Fler A, Kimpen JLL, van der Ent CK (2007) Maintenance azithromycin treatment in pediatric patients with cystic fibrosis: long-term outcomes related to macrolide resistance and pulmonary function. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 26(1):8-12.

**Tuchscher L**, Heitmann V, Hussain M, Viemann D, Roth J, von Eiff C, Peters G, Becker K, Löffler B (2010) *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *Journal of Infectious Diseases*, 202(7):1031–1040.

**Urbášková P** and Pracovní skupina pro monitorování antibiotické rezistence (2002) Stav citlivosti klinických izolátů stafylokoků, enterokoků a pneumokoků z 16 lokalit České republiky k antibiotikům včetně linezolidu. *Remedia* 12-5-02:334-338.

**Vazquez-Laslop N**, Thum C, Mankin AS (2008) Molecular mechanism of drug-dependent ribosome stalling. *Molecular Cell* 30:190–202.

**Wada A**, Ohta H, Kulthanan K, Hiramatsu K (1993) Molecular cloning and mapping of 16S-23S rRNA gene complexes of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 175(22):7483-7487.

**Werckenthin C**, Schwarz S (2000) Molecular analysis of the translational attenuator of a constitutively expressed *ermA* gene from *Staphylococcus intermedius*. *J Antimicrob Chemother*, 46:785-788.