

# **Enterokoki odporne na linezolid - sytuacja epidemiologiczna oraz mechanizmy oporności**

Iwona Gawryszewska

Zakład Mikrobiologii Molekularnej  
Narodowy Instytut Leków

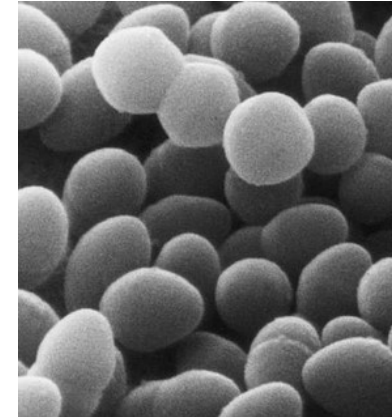
[i.gawryszewska@nil.gov.pl](mailto:i.gawryszewska@nil.gov.pl)

# Plan wykładu

1. Enterokoki - ogólna charakterystyka
2. Linezolid - ogólna charakterystyka
3. Mechanizm działania linezolidu
4. Mechanizmy oporności enterokoków na linezolid
5. Częstość występowania enterokoków opornych na linezolid
6. Dyskusja

# Enterokoki

- Gram-dodatnie paciorkowce
- Naturalny składnik mikroflory jelitowej ludzi i zwierząt
- Bakterie kwasu mlekowego
- Udział w fermentacji produktów spożywczych
- Szczepy probiotyczne
- Występują w różnych środowiskach (rośliny, gleba, woda, ścieki, żywność)
- **patogeny oportunistyczne - jedna z najczęstszych przyczyn zakażeń w szpitalach** (zapalenie wsierdza, bakteriemia, sepsa, zapalenie otrzewnej, zakażenia ran pooperacyjnych, zakażenie układu moczowego)



***E. faecalis* i *E. faecium* - największe znaczenie kliniczne**

# Enterokoki jako patogeny szpitalne

## ZDOLNE DO PRZETRWANIA W EKSTREMALNYCH WARUNKACH

(temp. 10° i 45°, pH 9,6, 6.5% NaCl, 30 min w 60°C)

### OPORNOŚĆ

#### Naturalna

- aztreonam, temocyлина, polimyksyna B/ kolistyna, kwas nalidyksowy **G+**
- cefalosporyny
- kwas fusydowy
- sulfonamidy
- makrolidy
- aminoglikozydy (niskie stężenia)
- klindamycyna - *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*
- chinupristyna/dalfopristyna - *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*
- niskie stężenia wankomycyny - *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*

#### Nabyta

- aminoglikozydy (wysokie stężenia)
- erytromycyna
- tetracykliny
- chloramfenikol
- chinolony
- penicyliny
- **glikopeptydy (VRE)**
- chinupristyna/dalfopristyna - *E. faecium*
- tigecyklina
- linezolid

# Enterokoki VRE

- **1986 r.** - wykrycie po raz pierwszy enterokoków opornych na wankomycynę (VRE) - **Francja, Wielka Brytania**
- 1988 r. - pierwsze VRE w **USA**
- grudzień 1996 r. - pierwsze VRE w **Polsce** (oddział hematologiczny szpitala klinicznego w Gdańsku)

# Patogeny ESKAPE

*Enterococcus* (*E. faecium* VRE)

*Staphylococcus aureus*

*Klebsiella pneumoniae*

*Acinetobacter baumannii*

*Pseudomonas aeruginosa*

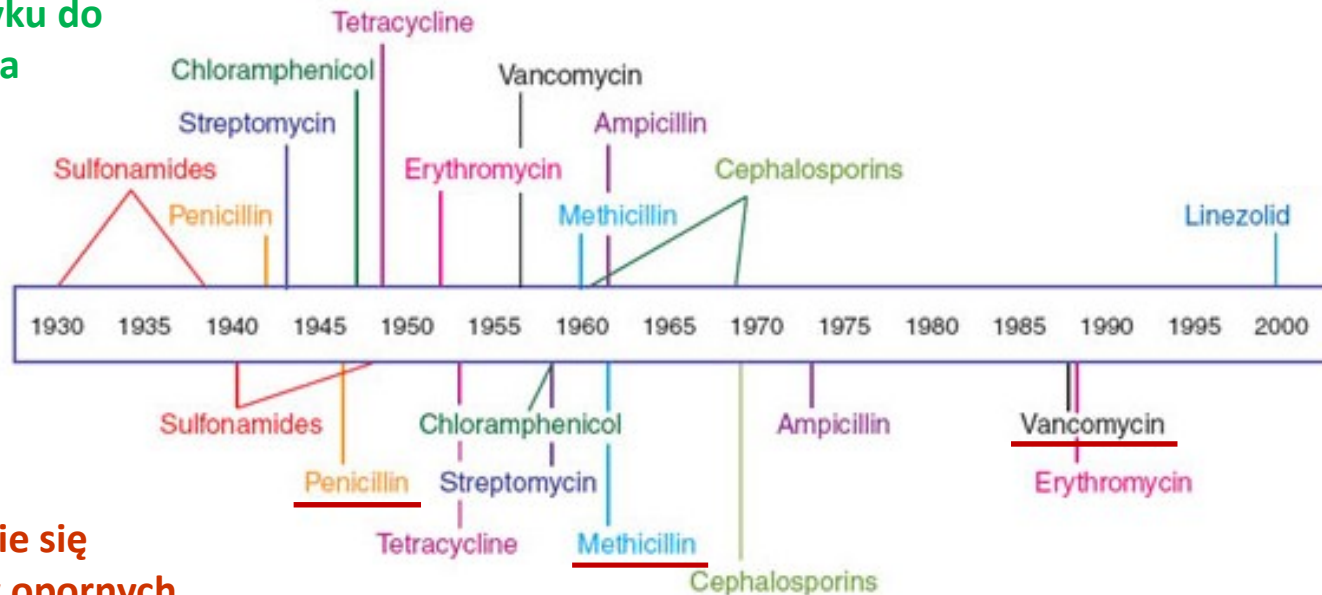
*Enterobacter*

Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE!

- **Wielolekooporne patogeny szpitalne**
- **Ograniczone lub brak opcji terapeutycznych**

# Historia odkryć środków przeciwdrobnoustrojowych

Wprowadzenie  
antybiotyku do  
lecznictwa

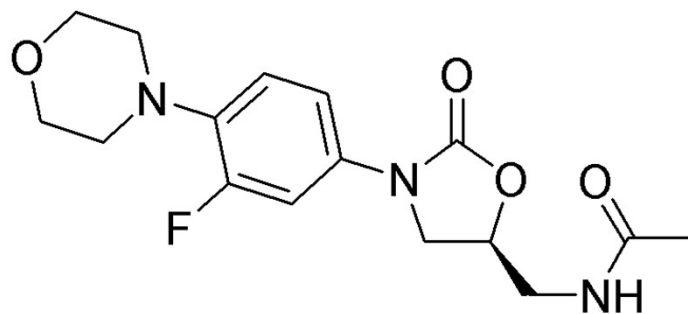


Pojawienie się  
szczepów opornych

- Linezolid - pierwszy od 30 lat przedstawiciel zupełnie nowej grupy środków przeciwbakteryjnych
- Cel terapeutyczny - leczenie zakażeń wywoływanych przez wielolekooporne (MDR-multidrug resistant) Gram-dodatnie patogeny

# Linezolid

- Syntetyczny środek przeciwbakteryjny - **chemioterapeutyk**
- Pierwszy **oxazolidynon** wprowadzony do leczenia:
  - **kwiecień 2000** - zaakceptowany przez FDA (US Food and Drug Administration) - USA - **Zyvox**
  - **luty 2002** - rejestracja linezolidu w Polsce - **Zyvoxid**





# Spektrum aktywności

- Tlenowe bakterie Gram-dodatnie, w tym szczepy MDR:

## Enterokoki

VRE

## Gronkowce

*Staphylococcus aureus* MRSA, VISA, VRSA

Gronkowce koagulazoujemne (CoNS) - MR-CoNS - *S. epidemidis*, *S. saprophyticus*,  
*S. haemolyticus*

## Streptokoki

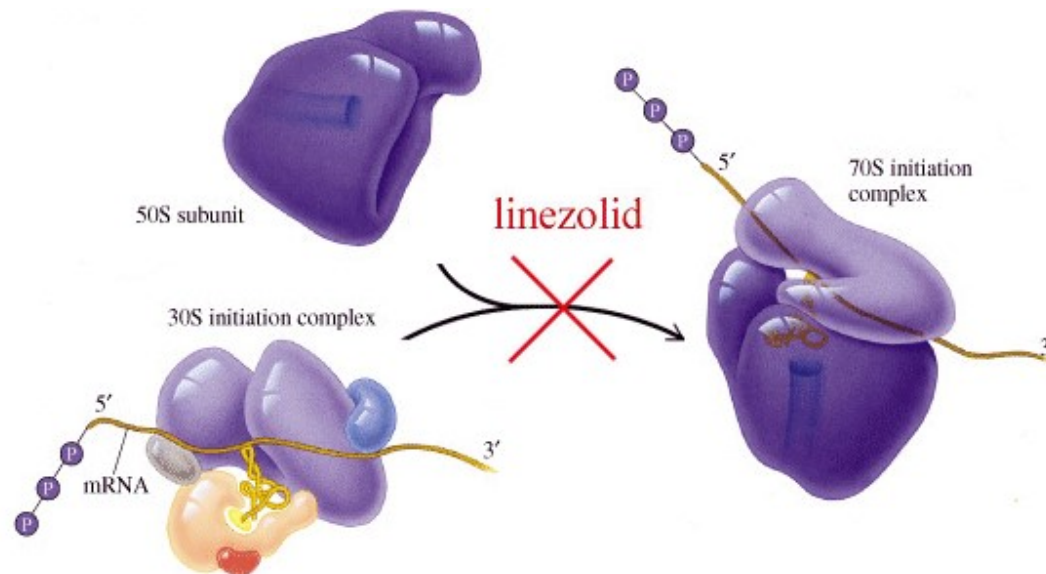
*Streptococcus pneumoniae* odporne na penicylinę (PRP), *S. pyogenes*, *S. agalactiae*  
streptokoki z grupy Viridans

## *Corynebacterium spp.*

- **Prątki** - *Mycobacterium spp.*, w tym wielooporne *Mycobacterium tuberculosis*

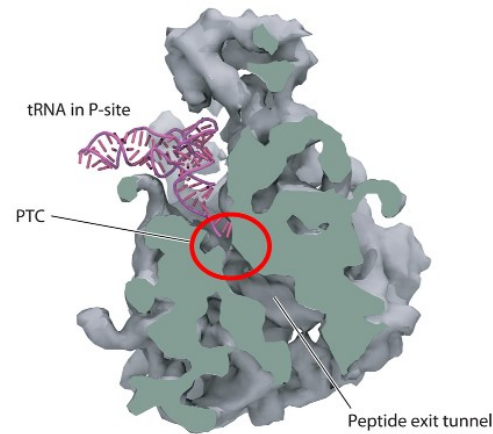
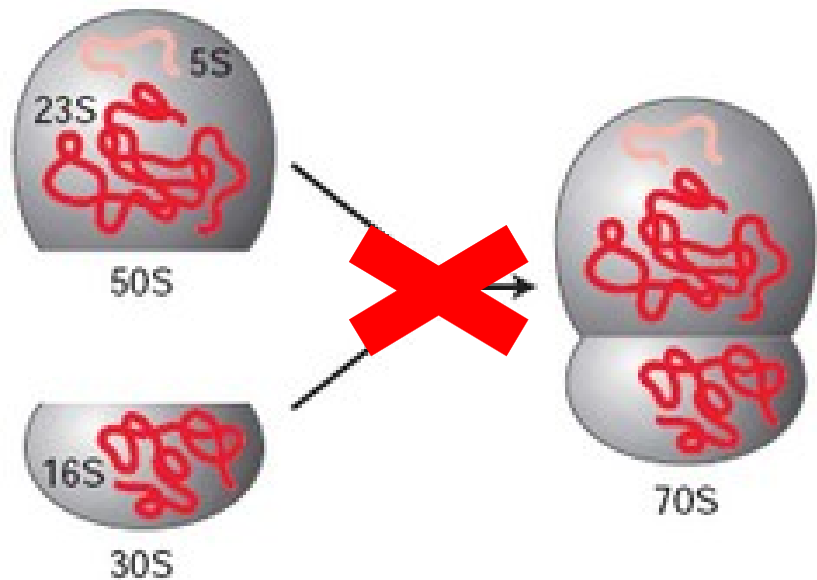
# Mechanizm działania

- Cel komórkowy: **rybosom**
- Linezolid wiąże się z podjednostką **50S** - uniemożliwia tworzenie się kompleksu 70S
- **Zahamowanie syntezy białka** na etapie inicjacji

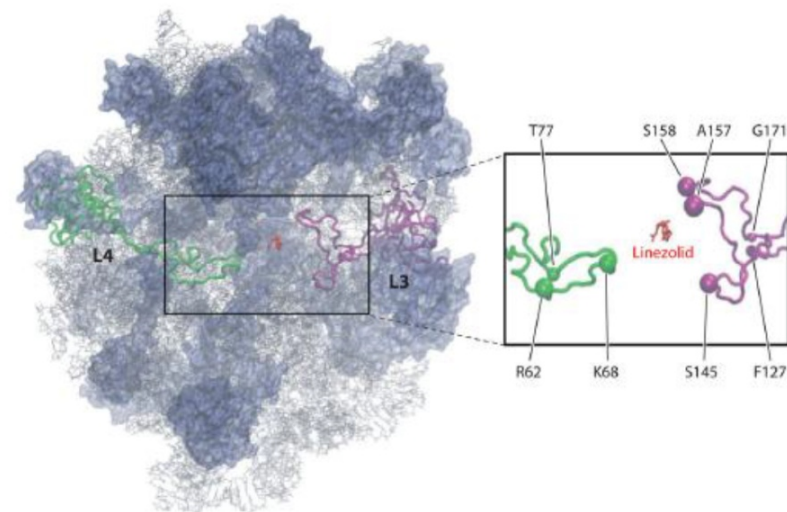


# Miejsce wiązania

- Podjednostka 50S - cząsteczka **23S rRNA**



- Linezolid wiąże się z 23S rRNA, w miejscu sąsiadującym z białkami rybosomalnymi **L3** i **L4**



# Nadzieje związane z linezolidem

- **Syntetyczny** - niskie prawdopodobieństwo naturalnie występującego mechanizmu oporności, brak naturalnego rezerwuaru genów oporności
- **Unikalny mechanizm działania** - brak oporności krzyżowej z innymi klasami antybiotyków (później wykazano jej występowanie)
- **Kilka kopii genu kodującego 23S rRNA** u gatunków istotnych klinicznie - np. *E. faecalis* - 4 kopie, *E. faecium* i *S. aureus* - 5-6 kopii - selekcja opornych szczepów wydawała się trudna ponieważ uważano, że oporność wymaga mutacji w kilku kopiach genu
- **Trudna selekcja mutantów linezolidoopornych *in vitro*** - obserwowano niską częstość występowania spontanicznie opornych szczepów, a także niską częstość występowania szczepów opornych na linezolid pod presją selekcyjną

Pierwszy kliniczny szczep oporny na linezolid został wyizolowany w lipcu 2001 -  
*S. aureus*

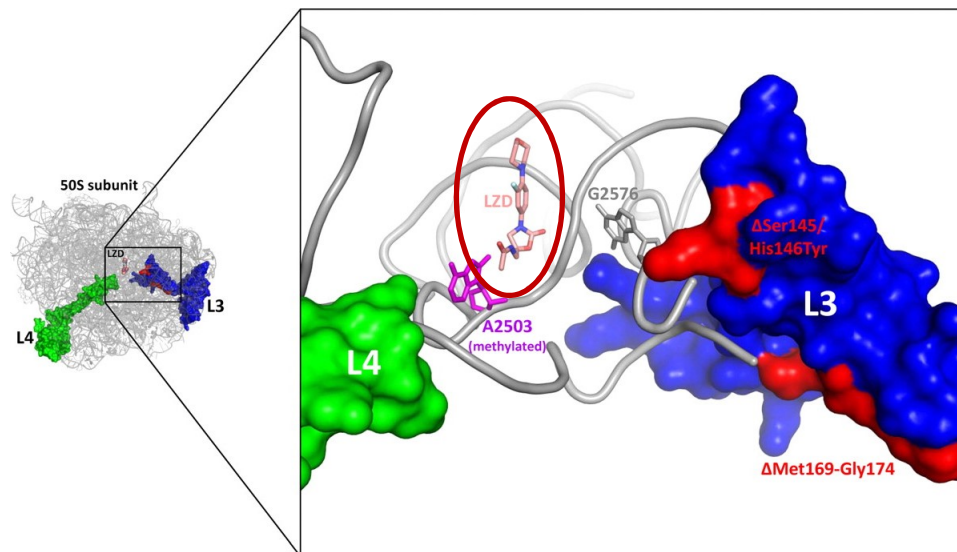
# Mechanizmy oporności

## Modyfikacja miejsca docelowego:

- mutacje w 23S rRNA
- mutacje w białkach rybosomalnych L3 i L4
- metylacja 23S rRNA przez metylotransferazę Cfr

## Ochrona miejsca docelowego:

- białka chroniące rybosom



# Mutacje w 23S rRNA

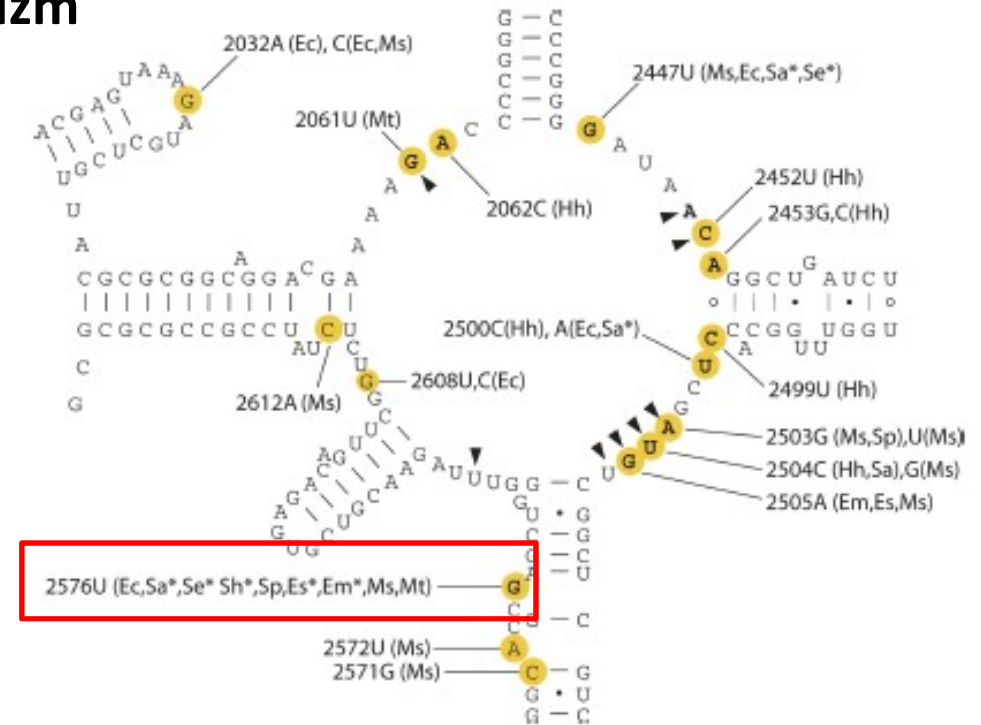
- Najczęściej występujący mechanizm oporności na linezolid

- Najczęściej występująca mutacja w szczepach klinicznych:

**G → T** w genie kodującym 23S rRNA  
w pozycji 2576 (numeracja *E. coli*)



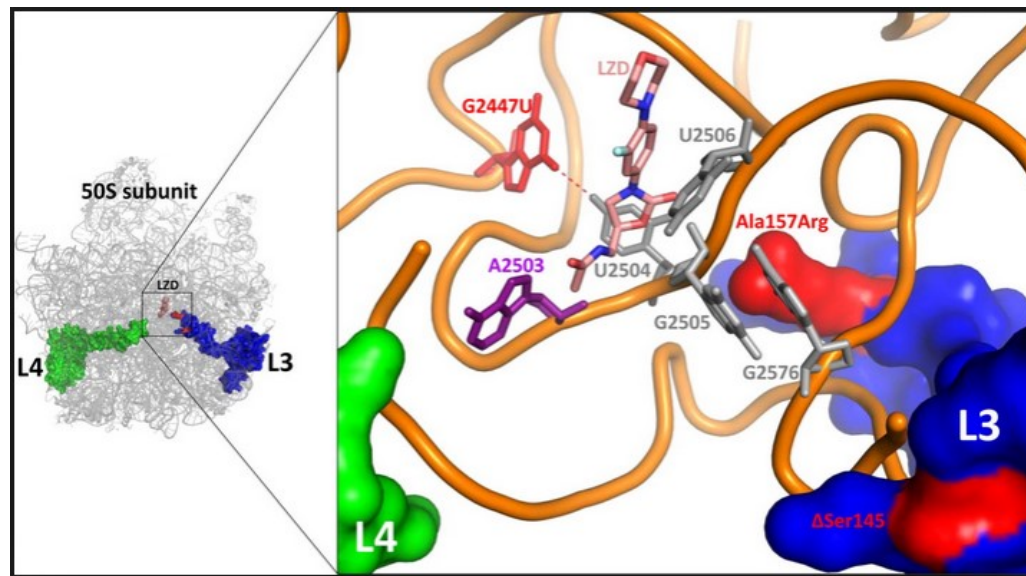
**G → U** w V domenie 23S rRNA



Struktura drugorzędowa pętli V domeny 23S rRNA z zaznaczonymi nukleotydami, których mutacje nadają oporność

# Mutacje w białkach rybosomalnych

- Mutacje w genach kodujących białka rybosomalne **L3** (*rplC*) i **L4** (*rplD*)
- Pojedyncze **substytucje** aminokwasowe lub **delecje**
- Mutacje w L3 i L4 są stosunkowo **rzadko wykrywane u linezolidoopornych enterokoków** (często u gronkowców koagulazo-ujemnych)
- Mutacje w L3 nadają także **oporność na pleuromutuliny** (tiamulina, walnemulina, retapamulina) - **oporność krzyżowa**



# Metylacja 23S rRNA

- **Metylotransferaza Cfr** kodowana jest przez gen *cfr* (chloramphenicol-florfenicol resistance gene)
- Nadaje oporność na strukturalnie różne substancje przeciwbakteryjne: fenikole, linkozamidy, oxazolidynony, pleuromutuliny, streptograminy oraz 16-pierścieniowe makrolidy - **oporność krzyżowa**

## Fenotyp wielolekooporności

### PhLOPS<sub>A</sub>:

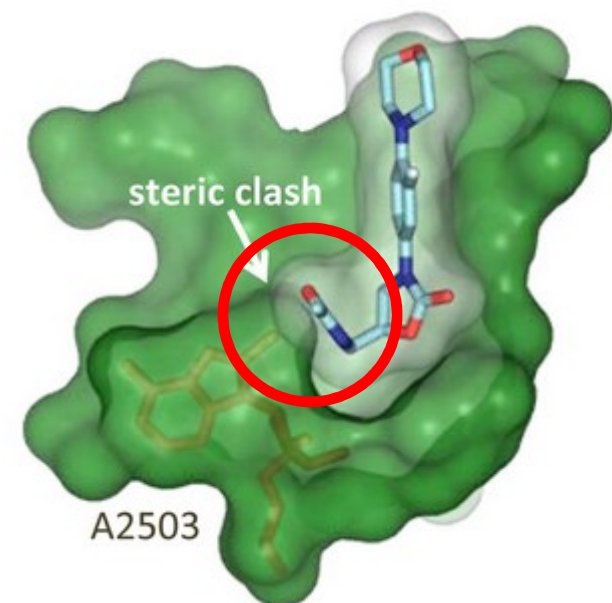
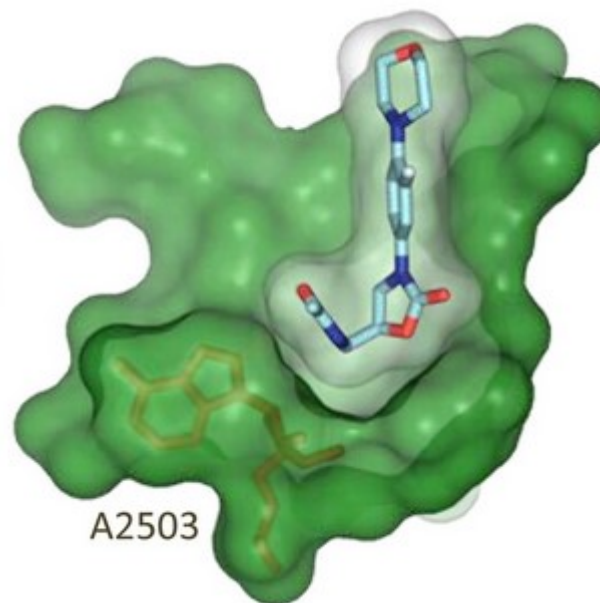
Phenicols,

Lincosamides,

Oxazolidinones,

Pleuromutilins,

Streptogramin A





# Metylotransferaza Cfr

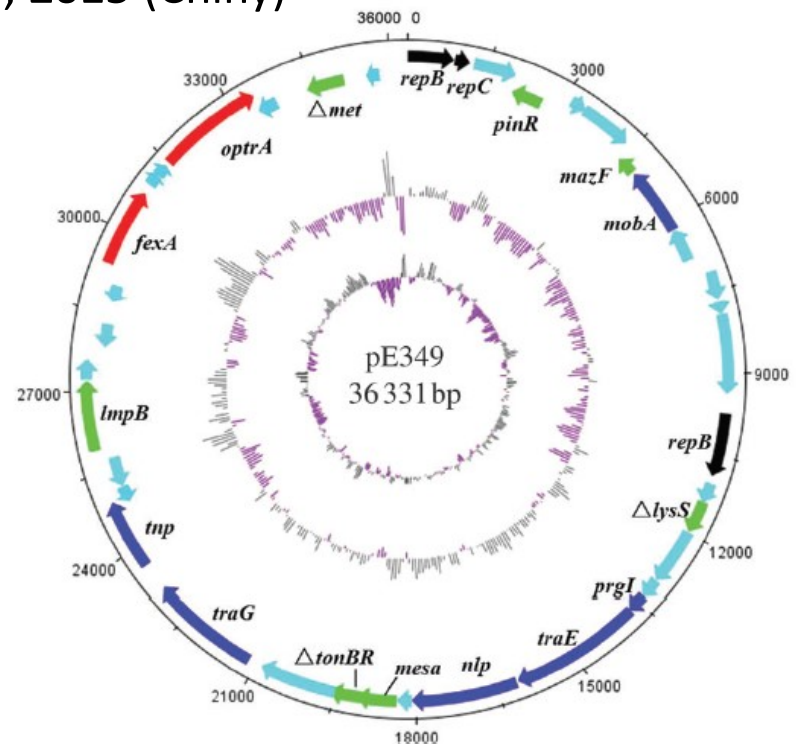
- Lokalizacja genu *cfr* - **plazmid** lub chromosom
- Wysoki potencjał do transferu, sprzyja rozprzestrzenianiu się oporności
- Kliniczne izolaty *Enterococcus* spp. posiadające metylotransferazę Cfr wykrywane są sporadycznie
- *cfr* wykrywany był u bakterii **Gram-dodatnich**: głównie *Staphylococcus* spp. (*S. sciuri*, *S. cohnii*, *S. aureus*, *S. epidemidis*, *S. capitis*), *Bacillus* spp., *Jeotgalicoccus pinnipedialis*, *Macrocooccus caseolyticus*, *Streptococcus suis*, ***E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*** oraz **Gram-ujemnych**: *E. coli*, *Proteus vulgaris*
- Duża część izolatów z *cfr* to **izolaty weterynaryjne**

# Białka chroniące rybosom

- Wiążą się z rybosomem
- Uniemożliwiają wiązanie się linezolidu z rybosomem (linezolid odłącza się od podjednostki 50S)
- Białka typu ABC (ATP-binding cassette):
  - **OptrA** - oporność na oksazolidynony (**linezolid**, tedizolid) i fenikole (chloramfenikol, florfenikol)
  - **PoxA** - oporność na oksazolidynony (**linezolid**, tedizolid), fenikole (chloramfenikol, florfenikol) i tetracykliny

# OptrA

- ***optrA*** (oxazolidinone phenicol transferable resistance)
- Pierwsze doniesienie o *optrA* - szczep *E. faecalis*, **2015** (Chiny)
- Lokalizacja genu - **plazmid** lub chromosom



- Wykryto także u *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. thailandicus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus captis*, *Streptococcus suis*
- **Szczepy kliniczne i odzwierzęce**
- Austria, Irlandia, Włochy, Malezja, Kolumbia, USA, Dania, Tunezja, Korea Południowa, Hiszpania, Belgia, Niemcy, Francja, Szwecja oraz **Polska**

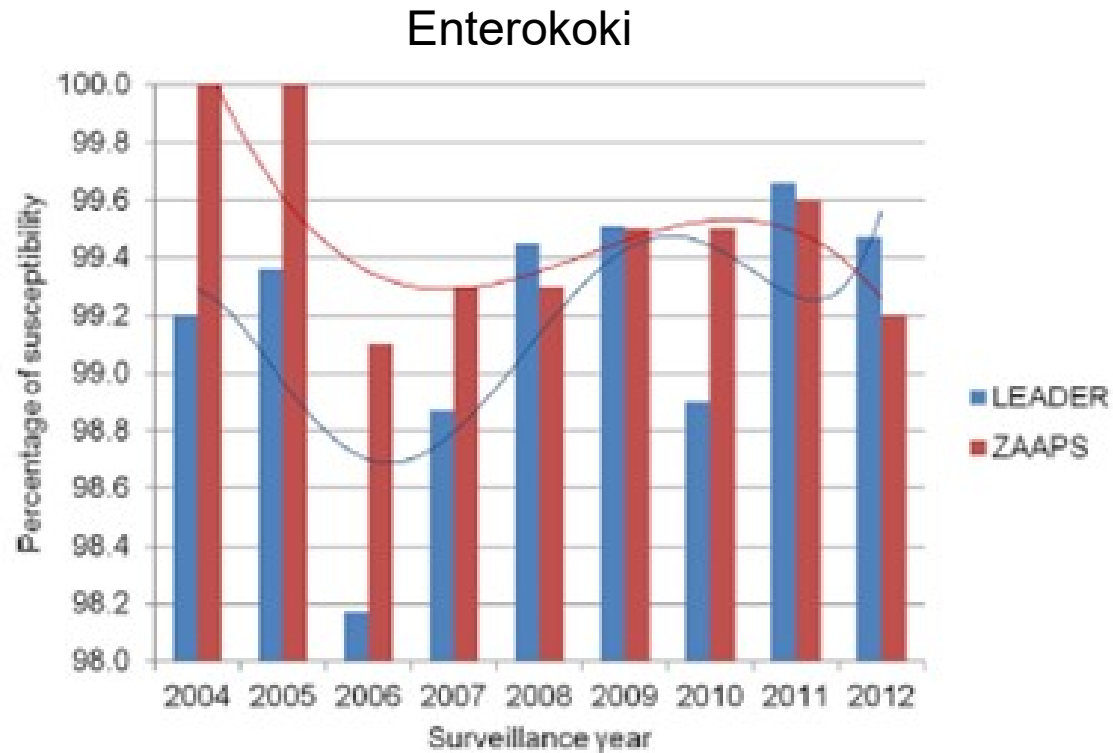
# PoxA

- ***poxA*** (phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance)
- Pierwsze doniesienie o *poxA* - szczep *S. aureus*, **2018** (Włochy)
- Lokalizacja genu - **plazmid**
  
- Wykryto także u *E. faecalis*, *E. faecium*, *Pediococcus acidilactici*
- **Głównie szczepy odzwierzęce**
- Portugalia, Francja

# Epidemiologia

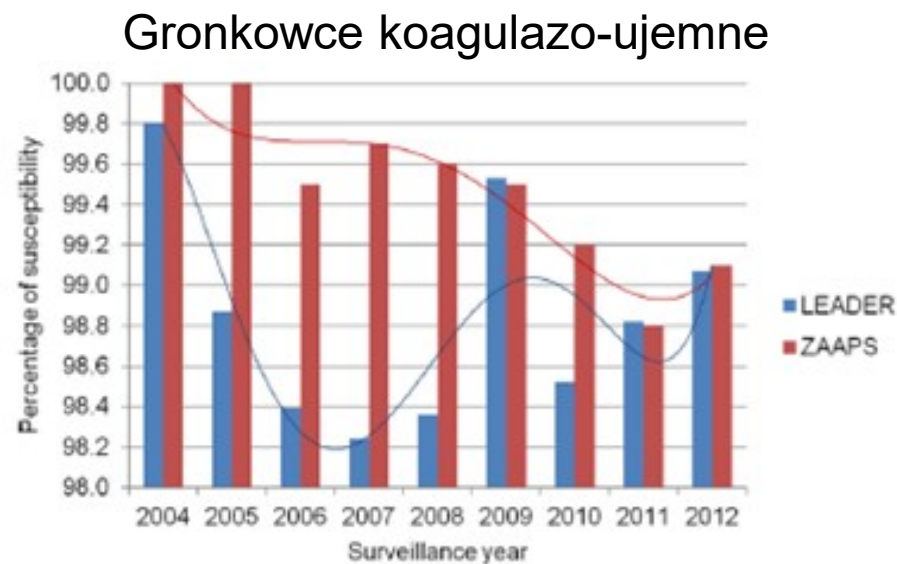
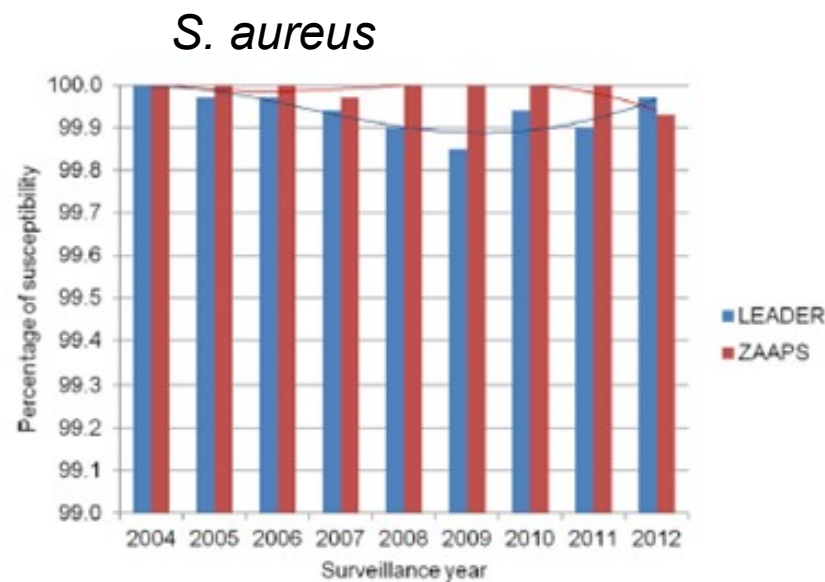
- **Międzynarodowe programy monitorujące oporność na linezolid:**
  - **ZAAPS** - Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum Programme - program ogólnoświatowy, zbiórka szczepów od 2002
  - **LEADER** - Linezolid Experience and Accurate Determination of Resistance Programme - program amerykański, ośrodki wydzielone z ZAAPS w 2004
- Monitorowanie oporności szczepów klinicznych:
  - **enterokoków**
  - *S. aureus*
  - gronkowców koagulazoujemnych (CoNS)
  - *S. pneumoniae*
  - streptokoków, w tym z grupy Viridans, paciorkowców  $\beta$ -hemolizujących

# LEADER/ZAAPS lata 2004-2012



**Niski stabilny poziom oporności na linezolid**

# LEADER/ZAAPS lata 2004-2012



## Niski stabilny poziom oporności na linezolid

- Odsetek szczepów opornych wśród wszystkich badanych drobnoustrojów:
  - ZAAPS - 0.2% (2016)
  - LEADER -  $\leq 0.8\%$  (2015)

# Epidemiologia

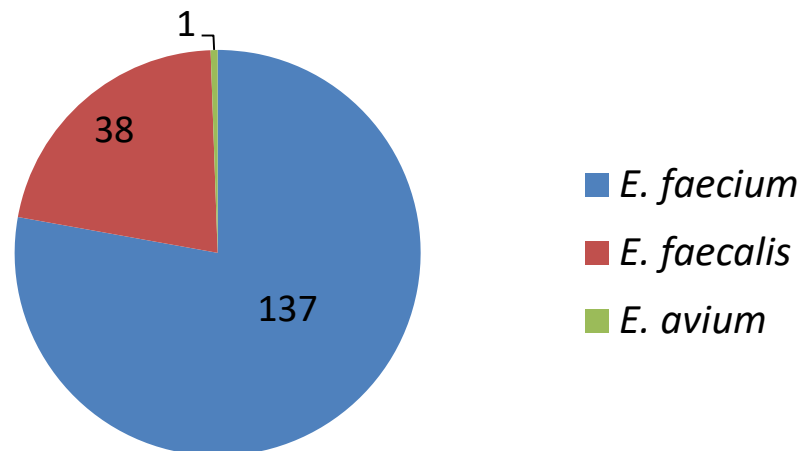
- **Lokalne wielośrodkowe badania wykazują wzrost odsetka szczepów opornych:**
  - Niemcy - enterokoki - 1% → 9% - lata 2008 - 2014



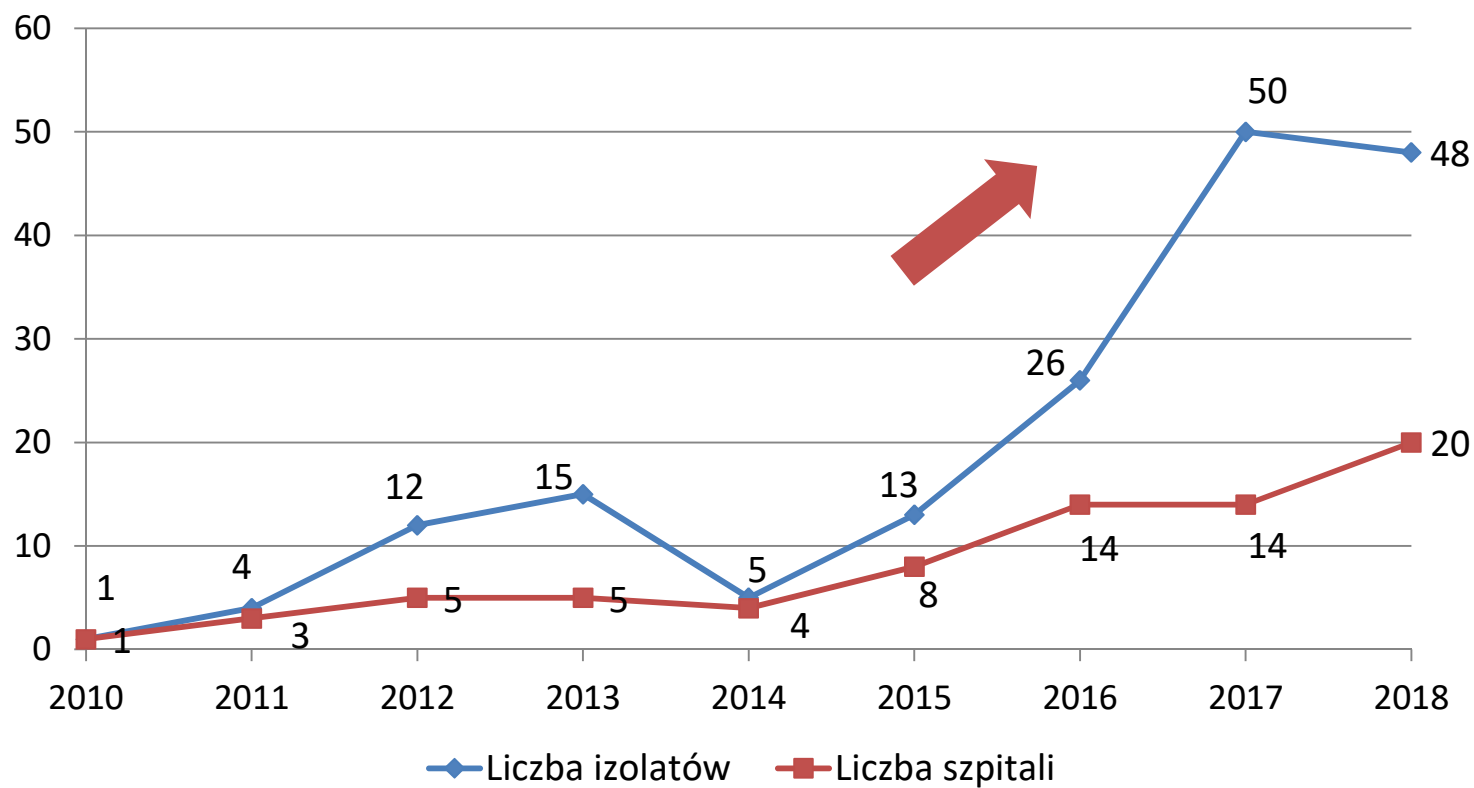
# LRE w Polsce

## Enterokoki odporne na linezolid (LRE-linezolid resistant enterococci)

- **2004**, Gdańsk - izolacja pierwszego szczepu *Enterococcus* spp. opornego na linezolid - *E. faecium* VRE - pacjent leczony linezolidem, szczep oporny wyizolowano po 23 dniach podawania linezolidu
- **Kolekcja Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD) (2008-2018)** - 176 klinicznych izolatów *Enterococcus* spp. opornych na linezolid



# LRE w Polsce



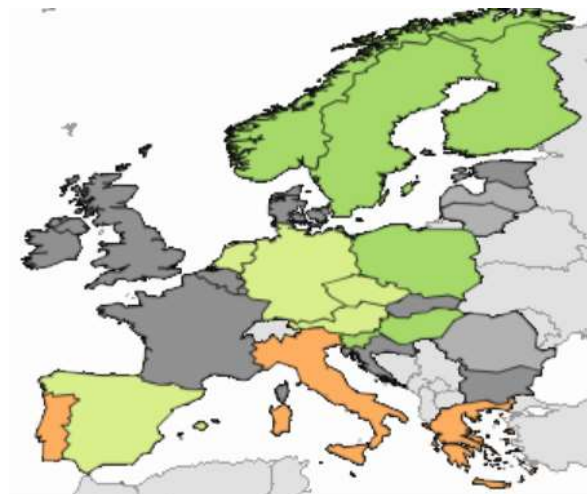
**Wzrost liczby potwierdzonych przypadków LRE**

# Oporność enterokoków na wankomycynę

*E. faecium*

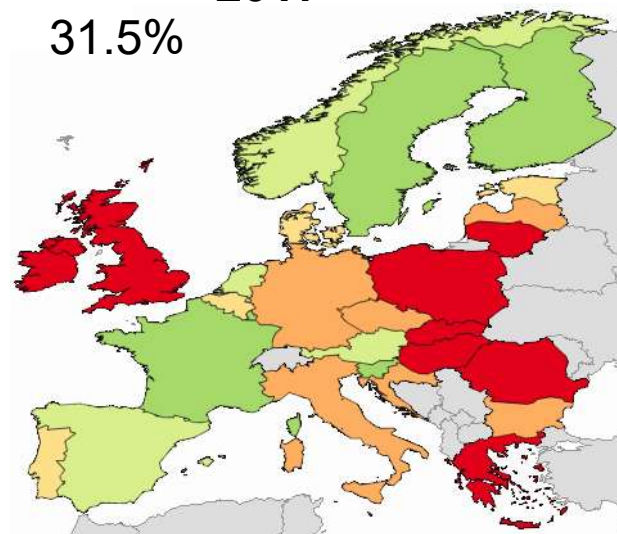
2001

0%

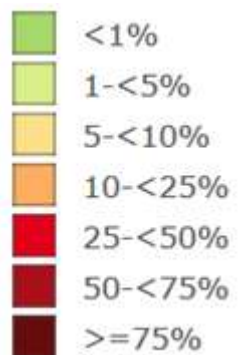


2017

31.5%

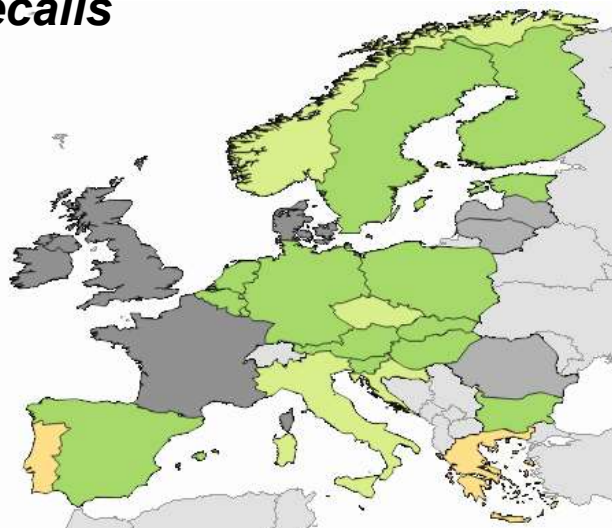


R (%)

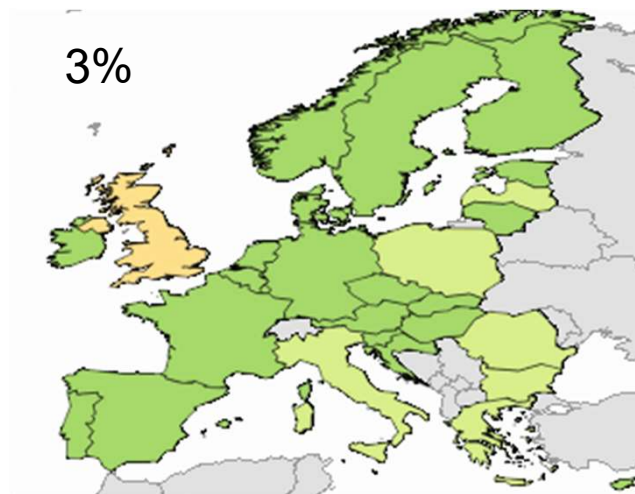


*E. faecalis*

0%



3%



EARS-Net

# LRE w Polsce

Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2017) 36:1279–1286  
DOI 10.1007/s10096-017-2934-7



ORIGINAL ARTICLE

## **Linezolid-resistant enterococci in Polish hospitals: species, clonality and determinants of linezolid resistance**

I. Gawryszewska<sup>1</sup> · D. Żabicka<sup>2</sup> · W. Hryniewicz<sup>2</sup> · E. Sadowy<sup>1</sup>

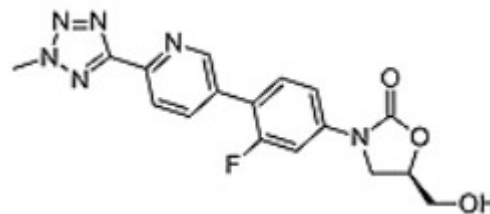
29th  
**ECCMID** Amsterdam, Netherlands  
13–16 April 2019

**P2325 Linezolid-resistant hospital enterococci in Poland**

Iwona Gawryszewska<sup>1</sup>, Dorota Zabicka\*<sup>1</sup>, Waleria Hryniewicz<sup>1</sup>, Ewa Sadowy<sup>1</sup>

# Tedizolid - oksazolidynon II generacji

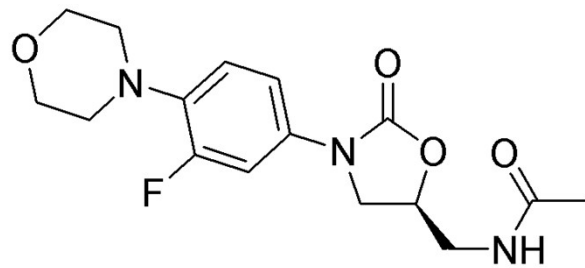
- **Tedizolid** - Sivextro (Cubist Pharmaceuticals)
- Zaakceptowany przez FDA w czerwcu 2014
- Stosowany w leczeniu skomplikowanych zakażeń skóry i tkanki podskórnej (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. anginosus*, *S. intermedius*, *S. constellatus*, *E. faecalis*)
- Aktywny wobec szczepów opornych na linezolid *cfr+* (nieskuteczny wobec szczepów niosących mutacje 23S rRNA G2576T, białek L3 i L4)



# Podziękowania

- mikrobiolodzy kliniczni i specjaliści kontroli zakażeń z całego kraju
- dr hab. Ewa Sadowy
- prof. Waleria Hryniewicz, dr Dorota Żabicka oraz Zespół Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD)

Dziękuję za uwagę



# Pytanie 1

Do jakiej klasy środków przeciwbakteryjnych należy linezolid?

1. tetracykliny
2. oksazolidynony
3.  $\beta$ -laktamy
4. makrolidy



# Pytanie 1

Do jakiej klasy środków przeciwbakteryjnych należy linezolid?

1. tetracykliny
2. oksazolidynony
3.  $\beta$ -laktamy
4. makrolidy

# Pytanie 2

Na czym polega mechanizm działania linezolidu?

1. hamowanie syntezy ściany komórkowej
2. hamowanie syntezy DNA
3. hamowanie produkcji białek
4. uszkodzenie błony komórkowej

# Pytanie 2

Na czym polega mechanizm działania linezolidu?

1. hamowanie syntezy ściany komórkowej
2. hamowanie syntezy DNA
3. hamowanie produkcji białek
4. uszkodzanie błony komórkowej

# Pytanie 3

Oporność enterokoków na linezolid najczęściej związana jest z:

1. mutacjami 23S rRNA
2. metylacją rybosomu
3. aktywnością białek chroniących rybosom
4. usuwaniem linezolidu z komórki

# Pytanie 3

Oporność enterokoków na linezolid najczęściej związana jest z:

1. mutacjami 23S rRNA
2. metylacją rybosomu
3. aktywnością białek chroniących rybosom
4. usuwaniem linezolidu z komórki