POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 1, 47–57
http://www.pm.microbiology.pl

MECHANIZMY OPORNOŚCI NA FLUOROCHINOLONY KODOWANE PLAZMIDOWO – PMQR

Katarzyna Piekarska*

Zakład Bakteriologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny

Wpłynęło w maju, zaakceptowano w grudniu 2017 r.

Streszczenie: Fluorochinolony (FQ) to grupa syntetycznych chemioterapeutyków o właściwościach bakteriobójczych i szerokim spektrum aktywności, powszechnie stosowanych w terapii wielu zakażeń u ludzi i zwierząt. W ostatnich latach, wśród pałeczek *Enterobacteriaceae* obserwowany jest wyraźny wzrost oporności na te związki. Miejscem docelowego działania FQ są dwa enzymy bakteryjne: gyraza (topoizomeraza II) i topoizomeraza IV, które odgrywają zasadniczą rolę podczas replikacji, transkrypcji, rekombinacji i naprawy bakteryjnego DNA. Istnieją dwie kategorie mechanizmów warunkujących oporność na FQ, tj. chromosomowe i nabyte. Mutacje w chromosomowych genach kodujących gyrazę i topoizomerazę IV są najczęstszymi mechanizmami odpowiedzialnymi za wysoki poziom oporność na FQ. Mutacje występują również w genach regulatorowych kontrolujących ekspresję natywnych pomp zlokalizowanych w błonie bakteryjnej. W ostatnich dwóch dekadach odkryto trzy mechanizmy oporności na chinolony kodowane plazmidowo (PMQR), w tym: białka Qnr, wariant acylotransferazy aminoglikozydowej – AAC (6,) – Ib-cr i pompy błonowe – QepA i OqxAB. Chociaż same mechanizmy PMQR powodują jedynie niski poziom oporności na FQ, swoją aktywnością sprzyjają skutecznej selekcji mutacji w genach gyrazy i topoizomerazy IV i nabywaniu przez szczep bakteryjny wysokiej oporności na FQ. Ponadto, mechanizmy PMQR często występują w plazmidach MDR wraz z innymi determinantami oporności (ESBL, pAmpC, KPC), co sprzyja rozpowszechnianiu fenotypu wielolekooporności. W pracy, podjęto próbę dokonania przeglądu molekularnych mechanizmów leżących u podstaw oporności na fluorochinolony występującej u pałeczek *Enterobacteriaceae*.

1. Wstęp. 2. Mechanizm działania fluorochinolonów. 3. Oporność na fluorochinolony kodowana chromosomowo. 3.1. Mutacje prowadzące do zmiany aktywności enzymów docelowych. 3.2. Redukcja stężenia leku w cytoplazmie – pompy błonowe. 4. Oporność na fluorochinolony kodowana plazmidowo. 4.1. Białka Qnr. 4.2. Enzym AAC(6')-Ib-cr. 4.3. Pompy kodowane plazmidowo: QepA i OqxAB. 4.4. Wpływ PMQR na poziom oporności. 5. Podsumowanie

Plasmid-mediated quinolone resistance – PMQR

Abstract: Fluoroquinolones (FQ) are broad-spectrum antimicrobial agents widely used to treat a range of infections in clinical medicine. However, the surveillance studies demonstrate that fluoroquinolone resistance rates increased in *Enterobacteriaceae* in the past years. FQ inhibit bacterial DNA synthesis by interfering with the action of two bacterial enzymes – DNA gyrase and topoisomerase IV. There are two categories of quinolone resistance mechanisms: chromosomally encoded and acquired. Mutations in chromosomal genes encoding gyrase and topoisomerase IV are the most common mechanisms responsible for high-level fluoroquinolone resistance. Mutations can occur also in regulatory genes which control the expression of native efflux pumps located in bacterial membrane. Furthermore, three mechanisms of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) have been discovered so far, including Qnr proteins, the aminoglycoside acetylotransferase variant – AAC(6')-Ib-cr, and plasmid-mediated efflux pumps – QepA and OqxAB. Although the PMQR mechanisms alone cause only low-level resistance to fluoroquinolone, they can complement other mechanisms of chromosomal resistance and facilitate the selection of higher-level resistance. Moreover, plasmids with PMQR mechanisms often encode additional resistance traits (ESBLs, pAmpC, KPC) contributing to multidrug resistance (MDR). This review is focused on a range of molecular mechanisms which underlie quinolone resistance.

1. Introduction. 2. Mechanisms of fluoroquinolone action. 3. Chromosomally-encoded fluoroquinolone resistance. 3.1. Mutations changing the functions of target enzymes. 3.2. Reduction of drug concentration in the cytoplasm – efflux pump. 4. Plasmid-mediated quinolone resistance. 4.1. Qnr proteins. 4.2. AAC(6')-Ib-cr enzyme. 4.3. Plasmid-mediated efflux pump: QepA i OqxAB. 4.4. The impact of PMQR on fluoroquinolone susceptibility level. 5. Summary

Słowa kluczowe: *Enterobacteriaceae*, oporność na fluorochinolony, PMQR
Key words: *Enterobacteriaceae*, fluoroquinolone resistance, PMQR

1. Wstęp

Na przestrzeni prawie sześciu dekad chinoliny stały się z małoistotnej klasy leków stosowanych głównie do leczenia infekcji w obrębie układu moczowego, jednymi z najczęściej przepisywanych związków przeciwbakteryjnych wykorzystywanych w leczeniu różnego rodzaju infekcji [22].

Chinoliny, jak i ich fluorowane pochodne, to grupa syntetycznych chemioterapeutyków o bakteriobójczych właściwościach i szerokim spektrum aktywności [30, 31]. Pierwszym chinolonem wprowadzonym do lecznictwa w latach 60-tych, był kwas nalidyksowy – związek stosowany wyłącznie w terapii zakażeń układu moczowego [22]. W następnych latach, modyfikowano chemicznie cząstkę chinolonów wprowadzając

* Autor korespondencyjny: Dr Katarzyna Piekarska, Zakład Bakteriologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel. 22 5421263; e-mail: kpiekarska@pzh.gov.pl

różne podstawniki, skutkiem czego było zsyntetyzowanie związków o szerszym spektrum aktywności i doskonalszych parametrach farmakokinetycznych. Kluczowa modyfikacja dotyczyła m.in. wprowadzenia do cząsteczki chinolonów w pozycji 6 ich podstawowego szkieletu atomu fluoru, co doprowadziło do opracowania grupy związków, znanych dziś jako fluorochinolony (FQ) [3]. Szerokie spektrum aktywności FQ, dość dobre przenikanie do większości tkanek i osiąganie w nich wysokich stężeń terapeutycznych, relatywnie niska toksyczność oraz możliwość podania zarówno doustnie, jak i parenteralnie sprawiło, że są one powszechnie stosowane w terapii wielu zakażeń u ludzi i zwierząt. Konsekwencją powszechnego stosowania tej grupy leków jest coraz częstsze występowanie u ludzi, także poza placówkami opieki medycznej, jak i w środowisku, wielu gatunków bakterii opornych na FQ [15].

Przez lata uważano, że oporność na chinoliny związana jest z występowaniem chromosomowo kodowanych mechanizmów, głównie mutacji. Jednak, pod koniec ubiegłego wieku pojawiły się pierwsze doniesienia opisujące nowe, kodowane plazmidowo mechanizmy oporności na chinoliny tzw. PMQR (Plasmid-Mediated Quinolone Resistance) [50]. Co więcej, w ostatnich latach nastąpił wyraźny wzrost badań w zakresie występowania tych mechanizmów wśród różnych gatunków pałeczek *Enterobacteriaceae*.

Aktualnie na świecie podejmowane są działania mające na celu ograniczenie stosowania FQ zarówno w medycynie, jak i weterynarii. Należy jednak podkreślić, że w wielu krajach, wciąż brakuje nadzoru nad stopniem zużycia FQ i związków o podobnej strukturze, jak i odsetkiem szczepów opornych na tę grupę chemioterapeutyków. W Europie, tego typu informacje zbierane są przez ECDC (Europeaen Centre for Disease Prevention and Control).

W związku z obserwowaną w krajach europejskich zróżnicowaną sytuacją, na wybranych przykładach, porównano stopień konsumpcji FQ oraz odsetek szczepów opornych (Ryc. 1) [20, 21]. Jak powszechnie wiadomo, w Skandynawii (Norwegia, Szwecja) występuje dość niski wskaźnik spożycia antybiotyków, w tym FQ. Występuje tam również relatywnie niski odsetek szczepów (zarówno *Escherichia coli*, jak i *Klebsiella pneumoniae*) opornych na tę grupę leków. Zupełnie odwrotna sytuacja występuje w krajach basenu Morza Śródziemnego (Włochy, Grecja), w których zarówno spożycie FQ, jak i odsetek szczepów opornych jest wysoki. Z danych zebranych przez ECDC [20, 21] wynika, że także w Polsce, szczególnie w odniesieniu do *K. pneumoniae*, występuje wysoki odsetek szczepów opornych. Co więcej, obserwowana w naszym kraju sytuacja może być skutkiem względnie częstego stosowania FQ w praktyce klinicznej (Ryc. 1).

Dlatego też, ze względu na skalę i istotę problemu, w niniejszym opracowaniu, podjęto próbę dokonania przeglądu molekularnych mechanizmów leżących u podstaw oporności na fluorochinolony występującej u pałeczek *Enterobacteriaceae*.

2. Mechanizm działania fluorochinolonów

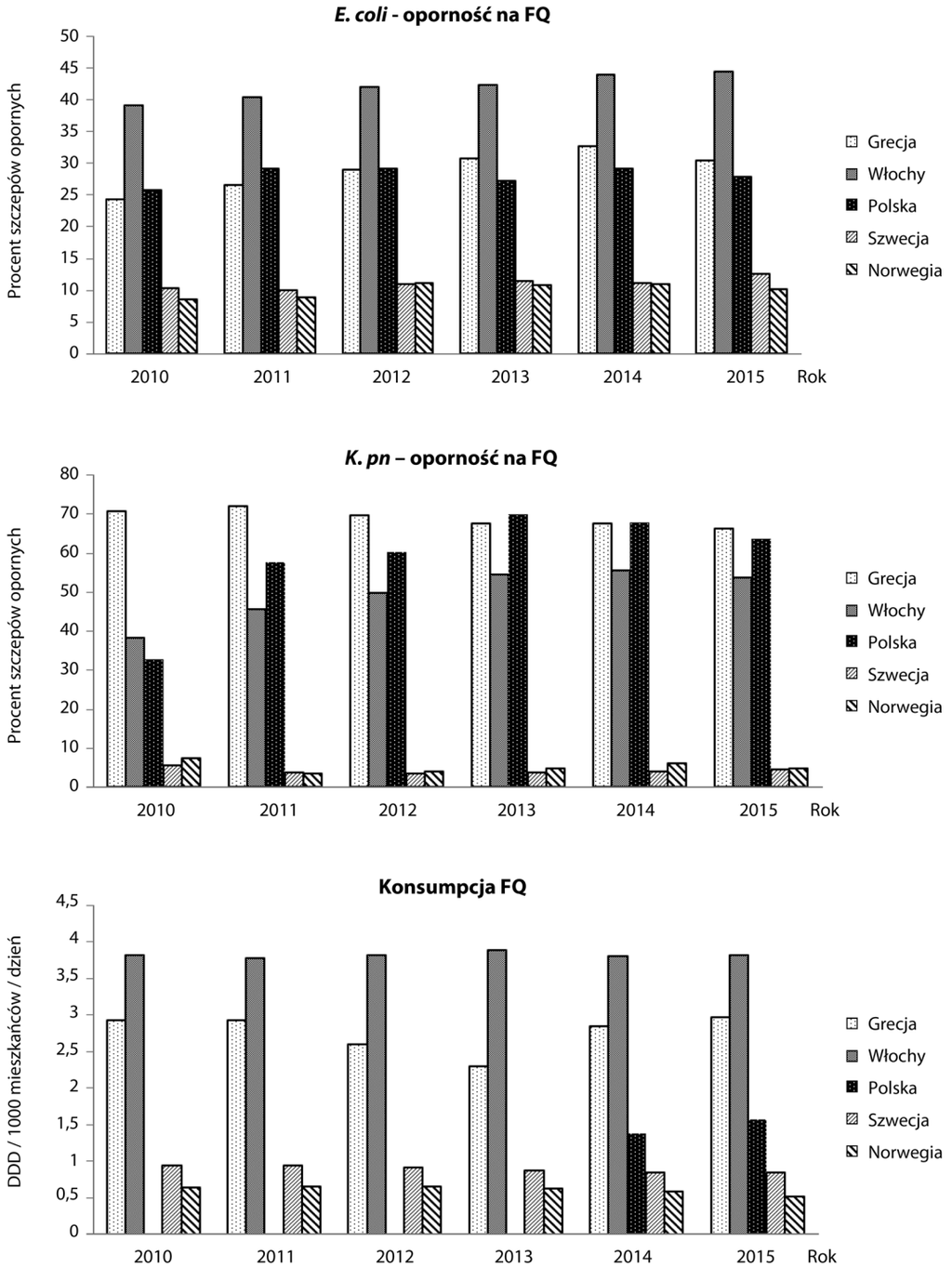
Miejscem docelowego działania fluorochinolonów są dwa enzymy bakteryjne: gyraza (topoizomeraza II) i topoizomeraza IV [30]. Gyraza jest tetramerem ($GyrA_2B_2$), składającym się z dwóch podjednostek GyrA (97 kDa) i dwóch GyrB (90 kDa), kodowanych odpowiednio przez chromosomowe geny: *gyrA* i *gyrB* [30, 35, 67]. Topizomeraza IV ($ParC_2E_2$) zaś jest analogiem gyrazy, złożonym z dwóch podjednostek ParC (75 kDa) i dwóch ParE (70 kDa), kodowanych odpowiednio przez chromosomowe geny: *parC* i *parE* [30, 35, 67]. Enzymy te odgrywają zasadniczą rolę podczas replikacji, transkrypcji, rekombinacji i naprawy bakteryjnego DNA [30, 35, 67]. Podstawową funkcją gyrazy jest wprowadzanie ujemnego superhelikalnego skrętu do nici DNA, co odgrywa istotną rolę podczas procesu replikacji i transkrypcji [4, 14]. Zablokowanie aktywności gyrazy doprowadza do nagromadzenia dodatnich skrętów i zahamowania procesu replikacji DNA. Rola topoizomerazy IV polega na umożliwieniu rozdzielenia siostrzanych nici DNA po zakończeniu procesu replikacji [4, 14, 17].

W celu zmiany stopnia superzwinięcia cząsteczki DNA, gyraza i topoizomeraza IV powodują przejściowe pęknięcie dwuniciowego DNA, w konsekwencji czego dochodzi do kowalencyjnego związania enzymu z DNA i utworzenia kompleksu enzym-DNA [18]. Oba te enzymy są hamowane przez fluorochinolony, które stabilizacją połączenie enzym-DNA (powstaje potrójny kompleks FQ-enzym-DNA). Powstały kompleks staje się nieodwracalny, czego skutkiem jest zahamowanie syntezy DNA, prowadzące do zablokowania podziału komórki i jej śmierci [17, 18]. Zarówno gyraza, jak i topoizomeraza IV modulują topologię DNA poprzez regulację stopnia skręcenia cząsteczki DNA w komórce bakteryjnej, czego efektem jest zaburzenie replikacji DNA (w obecności niskich stężeń FQ) lub śmierć komórki (w obecności wysokich stężeń FQ) [17, 19].

3. Oporność na fluorochinolony kodowana chromosomowo

3.1. Mutacje prowadzące do zmiany aktywności enzymów docelowych

W odpowiedzi na wprowadzenie do lecznictwa chinolonów wśród różnych gatunków bakterii zaczęto obserwować wzrastającą liczbę szczepów opornych na



Ryc. 1. Porównanie odsetka opornych na FQ szczepów *E. coli* i *K. pneumoniae* izolowanych w Polsce w latach 2010–2015 z odsetkiem szczepów opornych izolowanych w wybranych krajach europejskich o odpowiednio niskim i wysokim zużyciu FQ wg ECDC [20, 21].

tę grupę związków. Podstawowy mechanizm warunkujący wysoki poziom oporności polega na zmianie budowy (modyfikacji sekwencji aminokwasowej) poszczególnych podjednostek gyrazy i/lub topoizomerazy IV, czego skutkiem jest zmniejszenie lub utrata powinowactwa do leku [30, 35]. Modyfikacja ta jest zwykle wynikiem spontanicznych mutacji, w jednym bądź w kilku genach chromosomowych (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*), prowadzących do zmiany sekwencji kodowanych aminokwasów. Mutacje te występują najczęściej w określonych, krótkich odcinkach (rejonach) genów – nazwanych rejonami warunkującymi oporność na fluorochinolony – QRDR (Quinolone-Resistance Determinig Region). Według danych piśmiennictwa, w przypadku *E. coli*, mutacje związane ze wzrostem oporności na fluorochinolony najczęściej obserwowane

są: w GyrA pomiędzy 67 a 106 aminokwasem i/lub 63 a 102 aminokwasem w ParC. Prowadzą one najczęściej do zmiany kodowanego aminokwasu, a w konsekwencji do zmiany właściwości białka [30, 34]. Aminokwasem najczęściej ulegającym substytucji w GyrA u *E. coli* (jak również u innych gatunków) jest Ser83 i Asp87 [30, 90]. Uważa się, iż substytucje: Ser83Trp i Ser83Leu redukują zdolność wiązania norfloksacyny do kompleksu gyraza – DNA [86]. Przyjmuje się również, że substytucja seryny w pozycji 83 GyrA *E. coli* ma niewielki wpływ na katalityczne właściwości gyrazy [5]. Inaczej jest w przypadku substytucji znajdującego się w sąsiedztwie kwasu asparaginowego Asp87 (lub innych aminokwasów o charakterze kwaśnym znajdujących się w tej pozycji w przypadku innych gatunków), która obniża 5–10-krotnie katalityczne właściwości gyrazy [5, 34].

Wykazano także, że z opornością na FQ związane są mutacje występujące w podjednostce GyrB (Asp426Asn i Lys447Glu u *E. coli*) i ParE (Leu445His u *E. coli*) [8, 91]. Jednak, co istotne, są one zdecydowanie mniej rozpowszechnione w porównaniu z mutacjami spotykanymi w GyrA i ParC [30]. Zauważyć należy także, że rejon występowania mutacji (QRDR) w genie w przypadku GyrB i ParE jest bardziej odległy w porównaniu z QRDR GyrA czy ParC.

Poziom oporności drobnoustroju na działanie fluorochinolonów, zależy od właściwości chemicznych aminokwasu, który na skutek mutacji zastąpił naturalnie występujący. Niektóre mutacje mogą prowadzić do niewielkiej utraty powinowactwa enzymu do cząsteczki fluorochinolonu, a przez to do niewielkiego wzrostu wartości MIC FQ, inne zaś mogą znacznie zmniejszać to powinowactwo co pociąga za sobą znaczny wzrost wartości MIC [30, 35]. Poziom oporności może także zależeć od liczby mutacji w genach [30, 35]. Mutacje dotyczące jednego aminokwasu w podjednostce gyrazy lub topoizomerazy IV mogą skutkować umiarkowanym wzrostem MIC, zaś kolejne zmiany zachodzące w tym samym enzymie mogą powodować dalszy wzrost minimalnego stężenia hamującego [30, 34]. Oporność wysokiego rzędu jest zatem następstwem pojawienia się mutacji, doprowadzającej do zmiany struktury enzymu będącego drugorzędowym miejscem docelowego działania FQ [30, 34].

Dla wielu FQ stosowanych klinicznie, w tym ciprofloksacyny, podstawowym miejscem docelowego działania (czyli enzymem bardziej wrażliwym) w przypadku bakterii Gram-ujemnych jest gyraza, podczas gdy u bakterii Gram-dodatnich – topoizomeraza IV [18, 30, 58]. W przypadku większości FQ pojedyncze mutacje w *gyrA* powodują 8–16-krotny wzrost oporności [34, 67]. Natomiast wysoki poziom oporności (MIC ciprofloksacyny ≥ 16 mg/l) związany jest najczęściej z mutacjami w obu enzymach, tj. gyrazie i topoizomerazie IV [79]. Kumulacja mutacji znaczących tzn. dwie mutacje w *gyrA* i jedna w *parC* warunkuje 60-krotny wzrost oporności [58, 67].

3.2. Redukcja stężenia leku w cytoplazmie – pompy błonowe

Drugi mechanizm oporności na fluorochinolony, ma na celu obniżenie stężenia chemioterapeutyku w cytoplazmie i polega na czynnym usuwaniu cząsteczek FQ z komórki poprzez kompleksy białkowe tzw. pompy błonowe (efflux pump) [32, 33]. FQ, by dotrzeć do obecnych w cytoplazmie enzymów, gyrazy i topoizomerazy IV, muszą pokonać barierę złożoną ze ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej u Gram-dodatnich oraz dodatkowo zewnętrzną błonę u drobnoustrojów Gram-ujemnych. Ściana komórkowa stanowi tylko niewielką przeszkodę dla małych molekuł takich, jak chinolony, których ciężar cząsteczkowy wynosi około 300–400 Da [30, 33]. Leki te, jako związki amfoteryczne, dostają się do wnętrza komórki bakterii Gram-ujemnych na drodze pasywnej dyfuzji przez kanały porynowe (OmpF i OmpC) i mogą ulegać akumulacji [34, 35]. Mechanizm czynnego wypompowywania chemioterapeutyku z komórki bakteryjnej ma tu zasadnicze znaczenie, zaś ochronna funkcja pomp błonowych polegająca na usunięciu toksyn z wnętrza komórki, pozwala bakteriom przeżyć w niesprzyjającym środowisku nawet w obecności antybiotyków stosowanych podczas leczenia [33].

W zależności od budowy, swoistości substratowej, źródła wykorzystywanej energii i mechanizmu działania, pompy błonowe podzielić można na dwie główne grupy: tzw. transportery kasetonowe ABC wykorzystujące energię pochodzącą z ATP oraz pompy protonowe PMF (Proton Motive Force), do których zalicza się cztery rodziny, takie jak: MFS (Major Facilitator Superfamily), SMR (Small Multidrug Resistance), RND (Resistance – Nodulation Division) oraz MATE (Multidrug and Toxic compound Extruction) [65, 66]. Warto dodać, że największe znaczenie w oporności na antybiotyki i najszersze spektrum substratowe odgrywają białka transportowe należące do rodziny RND, w tym najlepiej poznany i zbadany system – AcrAB-TolC występujący u *E. coli* i *Salmonella enterica* [6, 85]. AcrB jest białkiem transportowym błony wewnętrznej (funkcjonuje jako pompa), zaś jak się przypuszcza AcrA i znajdujące się w błonie zewnętrznej białko TolC – odgrywają rolę pomocniczą [85].

Aktywność pomp wiąże się z indukowanym zwiększeniem ekspresji genów kodujących białka wchodzące w skład pomp. U pałeczek *Enterobacteriaceae* geny te zlokalizowane są głównie w chromosomie bakteryjnym i obecne są u większości przedstawicieli danego gatunku. Ekspresja genów związanych z pompami

często podlega regulacji. Mutacje w genach regulatorowych przyczyniają się do nadekspresji genów kodujących białka systemu efflux, co prowadzi do ponadprzeciętnego wzrostu zdolności usuwania FQ z komórki bakteryjnej ograniczając tym samym dostęp leku do miejsca docelowego, co powoduje wzrost wartości MIC. Mutacje w genie *acrR* (represor *acrAB*) zwiększają aktywność pompy [35], a mutacje inaktywujące *marR* (represor *marA*) umożliwiają białku MarA aktywację genów *acrAB*, *tolC* i genu *ompF* odpowiedzialnego za wytwarzanie wspomnianego wyżej białka porynowego *OmpF* [1, 2, 35]. Tak więc, fenotyp niskiej oporności na FQ warunkowany jest zarówno redukcją napływu (*influx*) leku przez kanały porynowe (ograniczona przepuszczalność błony komórkowej), jak i wzrostem jego wypływu przez system efflux.

Pomimo tego, że obecność systemu efflux jako jedynego mechanizm warunkującego oporność na FQ, powoduje niewielki (4–8-krotny) wzrost wartość MIC ciprofloksacyny, uważa się, iż jest to istotny mechanizm przyczyniający się do rozwoju wysokiego poziomu oporności na tę grupę leków [67]. Warto również zauważyć, że posiadające szeroki profil substratowy pompy związane z opornością na FQ to tzw. pompy MDR (Multiple Drug Resistance), występujące często wraz z innymi mechanizmami oporności, w tym plazmidowo kodowanymi mechanizmami warunkującymi oporność na FQ [34].

4. Oporność na fluorochinolony kodowana plazmidowo

Prawie dwie dekady temu u pałeczek Gram-ujemnych, głównie u *Enterobacteriaceae*, opisano grupę genów związanych z opornością na FQ, zlokalizowanych zazwyczaj na mobilnych elementach genetycznych – plazmidach. Stąd nazwa trzeciej grupy – mechanizmy oporności na FQ kodowane plazmidowo (PMQR). Do tej grupy mechanizmów należą: białka Qnr (prowadzące do zmiany miejsca docelowego działania antybiotyku); dwufunkcyjny wariant enzymu acetylotransferazy aminoglikozydowej – AAC(6')-Ib-cr (strukturalnie modyfikujący zarówno aminoglikozydy, jak i hydrofilowe FQ) oraz białka pomp błonowych związane z aktywnym transportem – QepA i OqxAB [80]. Pod względem funkcjonalnym wymienione mechanizmy warunkują obniżoną wrażliwość na FQ (MIC > 0,25 mg/l) lecz ich fenomen polega na tym, iż swoją aktywnością sprzyjają skutecznej selekcji mutacji w QRDR genów gyrazy i topoizomerazy IV i nabywaniu przez szczep bakteryjny wysokiej oporności na FQ, oraz na tym, że mechanizmy te mogą się szybko rozprzestrzeniać na ruchomych elementach genetycznych [34, 53].

Pierwszy kodowany plazmidowo mechanizm związany z opornością na FQ został wykryty przypadkowo, w retrospektywnych badaniach plazmidu (pMG252), który uzyskano z wyizolowanego z moczu szczepu *K. pneumoniae* [50]. W plazmidzie tym znaleziono determinanty warunkujące oporność na antybiotyki β-laktamowe (aztreonam, ceftazydym, cefotaksym, cefoksytynę, cefotetan), aminoglikozydowe (kanamycynę, gentamycynę, streptomycynę, tobramycynę), chloramfenikol, trimetoprim i chlorek rtęci. Co istotne, zaobserwowano, że po przeniesieniu plazmidu do szczepu *K. pneumoniae* z ograniczoną przepuszczalnością białek błony zewnętrznej wartość MIC ciprofloksacyny wzrosła z 4 do 32 μg/ml [50]. Tak znacznego wzrostu wartości MIC nie obserwowano w przypadku przeniesienia plazmidu do wrażliwego na chinolony szczepu *E. coli* J53 i *K. pneumoniae*. Obecność plazmidu wprawdzie powodowała ponad 30-krotny wzrost wartości MIC ciprofloksacyny (z 0,008 do 0,25 μg/ml u *E. coli* i z 0,004 do 0,125 μg/ml u *K. pneumoniae*) jednak szczepy te pozostawały nadal wrażliwe na ten związek, aczkolwiek wystąpiło już zjawisko obniżenia wrażliwości na FQ [50]. Za ten specyficzny fenotyp odpowiedzialny był fragment DNA składający się z 657 pz, a białko kodowane przez gen leżący w tym obszarze nazwano Qnr (Quinolone resistance) [50]. Wkrótce opisano więcej białek Qnr, zaś wspomniane wyżej pierwsze białko tego typu określono jako QnrA1.

4.1. Białka Qnr

Podstawową rolą białek Qnr jest ochrona gyrazy przed zablokowaniem przez kompleks przeciętego DNA i chinolonu, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia wrażliwości na FQ (MIC 0,25–1,0 μg/ml) [53, 70, 80]. Szczegółowy, molekularny mechanizm działania Qnr nie został jeszcze ostatecznie doprecyzowany. Obecnie przyjmuje się, że Qnr działa konkurencyjnie do DNA obniżając ilość trwałych i letalnych kompleksów: gyraza-DNA-chinolon w komórce bakteryjnej [34]. Mechanizm ochronny działa *in vitro* najskuteczniej przy niskich (0,5 nM) stężeniach Qnr, zaś jego wysokie stężania (25–30 μM) działają hamująco na gyrazę. Przyjmuje się również, że Qnr ma zdolność destabilizowania istniejących kompleksów: gyraza-DNA-chinolon [34]. Jak już wspomniano, choć obecność białek Qnr skutkuje „jedynie" obniżoną wrażliwością, to mechanizm ten jest istotny ze względu na to, że sprzyja selekcji szczepów wykazujących wysoki poziom oporności na FQ [34, 50, 53].

Na podstawie homologii DNA, aktualnie znanych jest 6 rodzin białek Qnr: wspomniane wyżej QnrA [50], QnrS [29], QnrB [36], QnrC [83], QnrD [11] i QnrVC [25, 64]. Poszczególne rodziny między sobą charakteryzują się zróżnicowaniem sekwencji

nukleotydowych przekraczającym 35%, co w efekcie przekłada się na znaczące zmiany aminokwasów. Co więcej, w obrębie każdej rodziny występuje duży polimorfizm genetyczny, co umożliwia identyfikację stale wzrastającej liczby alleli poszczególnych genów. Jak dotąd, według ogólnodostępnej bazy danych zamieszczonej na stronie Lahey Clinic (http://www.lahey.org/qnrstudies) opisano: 7 alleli genu *qnrA* (QnrA1--QnrA7), 9 – *qnrS* (QnrS1-QnrS 9), 82 – *qnrB* (QnrB1--QnrB82), 7 – *qnrVC* (QnrVC1-QnrVC7), 2 – *qnrD* (QnrD1-QnrD2) i 1 allel genu *qnrC* (QnrC) [37].

Geny Qnr obecne są w plazmidach o różnej wielkości i grupie niezgodności Inc (Incompatibility) [34, 40, 80], co sprzyja rozpowszechnieniu oporności na FQ w różnych gatunkach *Enterobacteriaceae*. Ponadto, ta różnorodność plazmidów wskazuje również na to, że ich nabywanie następowało w sposób niezależny, wielokrotnie [34]. Geny *qnr* najczęściej występują na transpozycyjnym elemencie, głównie IS*CR1* i IS*26* [34, 40, 80]. Zazwyczaj geny *qnr* występują w plazmidach MDR wraz z innymi determinantami oporności, w tym genami kodującymi β-laktamazy: ESBL, AmpC czy karbapenemazy [40, 80].

Qnr występują powszechnie na całym świecie wśród różnych gatunków *Enterobacteriaceae*, najczęściej *K. pneumoniae*, *Enterobacter* sp., *E. coli* i *S. enterica* izolowanych zarówno od pacjentów szpitalnych, jak i ambulatoryjnych [16, 23, 24, 41, 42, 44, 45, 51, 55, 59, 60, 72, 76]. Na podstawie przeglądu piśmiennictwa dostępnego w przeglądarce PubMed, najczęściej występującą determinantą wśród szczepów *Enterobacteriaceae* izolowanych od ludzi jest gen *qnrB*. Potwierdziły to również nieliczne badania przeprowadzone w Polsce, w których gen *qnrB* stwierdzono, odpowiednio, w przypadku 26,5% pałeczek *Enterobacteriaceae* opornych na ciprofloksacynę i 8,8% *E. coli* izolowanych od noworodków przebywających na intensywnej terapii [13, 59]. Inna determinanta Qnr, gen *qnrS* (zwłaszcza *qnrS1*) był często wykrywany u kilku gatunków pałeczek jelitowych, w tym często u *Salmonella* sp. Wieloośrodkowe badania wykazały, że powyżej 10% pałeczek *Salmonella* pochodzących od zwierząt i ludzi, oraz z próbek żywności i środowiska posiadało gen *qnrS1* [82]. Obecność tego genu stwierdzono także wśród szczepów *E. coli* izolowanych od: świń na Węgrzech [81], koni w Czechach [16], a także od ubitego bydła i drobiu w Polsce [84]. Sugerować to może, że ludzie mogą nabywać ten mechanizm oporności pośrednio – drogą łańcucha pokarmowego (potencjalna możliwość transmisji od zwierząt do człowieka). Natomiast częstość występowania markerów *qnrC* i *qnrD* wydaje się być niska. Badania Mazzariol i wsp. [52] wykazały, że wśród 756 *Enterobacteriaceae* tylko cztery izolaty *Proteus mirabilis* i jeden *Morganella morganii* (w sumie 0,66%) posiadało gen *qnrD.* W innych badaniach [82] obecność genu *qnrD* stwierdzono w przypadku 22/1215 (1,8%) izolatów *Salmonella*. Natomiast w przytoczonych wyżej badaniach [52, 82] w żadnym izolacie nie stwierdzono występowania determinanty *qnrC*. Podsumowując, spośród wszystkich determinant Qnr, gen *qnrB* jest spotykany częściej niż *qnrA* czy *qnrS*, które zaś są bardziej rozpowszechnione niż *qnrD* [42, 59, 76].

Należy zauważyć, że homologiczne sekwencje do białek Qnr znajdowane są również w chromosomie wielu Gram-ujemnych i Gram-dodatnich bakterii izolowanych zarówno z próbek środowiskowych, jak i próbek materiału klinicznego [7, 39, 74]. Uważa się, że bytujące w środowisku wodnym bakterie należące do rodzaju *Aeromonas*, *Photobacterium*, *Shewanella* i *Vibrio* stanowią zasadniczy rezerwuar genów q*nr* [61, 62, 63,]. I tak dla przykładu, białko QnrA1 jest w 98% homologiczne z chromosomowo determinowanym białkiem Qnr *Shewanella algae* [62], QnrS1 jest w 83% identyczne z Qnr *Vibrio splendidus* [9], zaś QnrC jest w 72% homologiczne do chromosomowo kodowanego białka Qnr *Vibrio orientalia* czy *Vibrio cholerae* [83]. Homologiczne sekwencje do QnrB są kodowane w chromosomie przedstawicieli kompleksu *Citrobacter freundii*, w tym *Citrobacter braakii*, *Citrobacter werkmanii* i *Citrobacter youngae* izolowanych zarówno z próbek klinicznych, jak i środowiskowych [38, 93]. Natomiast mały, niekoniugacyjny plazmid, w którym przenoszony jest gen *qnrD* może być obecny w różnych gatunkach *Enterobacteriaceae,* przy czym najczęściej występuje u przedstawicieli *Proteeae*, tj. *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* czy *Providencia rettgeri* [94], co też może tłumaczyć jego pochodzenie [26].

Jak się zatem wydaje, szerokie rozpowszechnienie genów *qnr* sugeruje, że występowały one w przyrodzie długo przed odkryciem chinolonów. Potwierdza to fakt wykrycia wariantów genu *qnrB* i „pseudogenów" *qnrB*--like w chromosomie szczepów *Citrobacter*, wyizolowanych jeszcze przed wprowadzeniem do użytku antybiotyków, tj. w latach 30. XX wieku [73]. Generalnie, uważa się, że częstość występowania genów *qnr* wśród szczepów klinicznych sukcesywnie wzrasta, jednak nie przekracza 10%. Dotyczy to zwłaszcza sytuacji, gdy dobór materiału do badań nie podlegał żadnemu czynnikowi selekcyjnemu [34, 45, 78]. Natomiast, zdecydowanie wyższe odsetki częstości występowania genów *qnr* obserwowano w przypadku, gdy czynnikiem selekcyjnym był fenotyp oporności np. oporność na cefalosporyny czy fluorochinolony [23, 42, 59, 76, 95].

4.2. Enzym AAC(6')-Ib-cr

AAC(6')-Ib-cr, to dwufunkcyjny wariant powszechnie występującego u pałeczek *Enterobacteriaceae* enzymu – acetylotransferazy aminoglikozydowej (AAC). Jego pierwotne działanie polega na modyfikacji czą-

steczki aminoglikozydu prowadzącej do utraty powinowactwa do podjednostki 16S rRNA, co stanowi przyczynę oporności na najczęściej stosowane w lecznictwie antybiotyki z tej grupy tj. amikacynę, tobramycynę i kanamycynę. Ponadto, AAC(6')-Ib-cr posiada zdolność do strukturalnej modyfikacji hydrofilowych fluorochinolonów tj. ciprofloksacyny i norfloksacyny [68], co obniża ich aktywność przeciwbakteryjną. Zdolność ta jest wynikiem dwóch mutacji znaczących, (Trp102Arg i Asp179Tyr), nadających temu dwufunkcyjnemu enzymowi zdolność N-acetylacji grupy aminowej znajdującej się w pierścieniu piperazynowego podstawnika hydrofilowych FQ [68, 80]. Odpowiedzialny za wytwarzanie AAC(6')-Ib-cr gen *aac(6')-Ib-cr* obecny jest w kasecie genowej jako część integronu zwykle w plazmidowym DNA, w którym przenoszone mogą być także i inne geny oporności, w tym PMQR (*qnrA1* [41], *qnrB4* [41, 48], *qnrB6* [41], *qnrB8* [41], *qnrS1* [41, 48], *qepA* [48]). Spośród determinant warunkujących inne mechanizmy oporności wraz z genem *aac(6')-Ib-cr* szczególnie często występuje gen kodujący β-laktamazę CTX-M-15 [43, 49, 72], jak również CTX-M-1 [77], CTX-M-2 [24], CTX-M-14 [41], CTX-M-24 [41], DHA-1 [48], SHV-12 [24, 48] czy karbapenemazę KPC-2 [12].

Jak wskazują dane piśmiennictwa, gen *aac(6')-Ib-cr* występuje powszechnie wśród pałeczek *Enterobacteriaceae* [44, 54, 59, 60], i jak wskazują niektóre wyniki badań jest bardziej rozpowszechniony niż geny *qnrB* [54, 59, 60, 71, 89]. W zależności od źródła szczepów klinicznych i kryteriów selekcji, częstość występowania *aac(6')-Ib-cr* kształtuje się w zakresie od 0,4 do 85% [59, 68].

Warto podkreślić również, że u pałeczek *Enterobacteriaceae* obecność genu *aac(6')-Ib-cr* poza plazmidowym DNA stwierdzono także w ich chromosomie [71]. Nabycie tego genu powoduje 4-krotny wzrost wartości MIC ciprofloksacyny [68]. Co więcej, choć jego obecność skutkuje niskim poziomem oporności na niektóre FQ, to może ułatwiać przetrwanie mutantów w stężeniu przekraczającym 10-krotnie ich MPC (Mutant Prevention Concentration) [10], czego konsekwencją będzie nabycie wysokiego poziomu oporności.

4.3. Pompy kodowane plazmidowo: QepA i OqxAB

Białko QepA (aktualnie znanych jest przynajmniej trzy warianty) jest plazmidowo-kodowaną pompą błonową należącą do rodziny MFS (Major Facilitator Superfamily). Pompa ta poprzez mechanizm aktywnego usuwania z komórki hydrofilowych fluorochinolonów przyczynia się do obniżenia wrażliwości na ciprofloksacynę i norfloksacynę powodując zwiększenie MIC w zakresie od 2 do nawet 64-razy [87, 88]. Mechanizm ten, po raz pierwszy został wykryty w plazmidzie pHPA obecnym w wyizolowanym z moczu szczepie *E. coli* [87]. Wraz z genem *qepA* w plazmidzie (zwykle MDR) przenoszone są także i inne determinanty oporności, włączając w to β-laktamazy o szerokim spektrum substratowym czy aminoglikozydy. Gen *qepA* często współwystępuje wraz z genem kodującym 16S rRNA metylazę – *rmtB* [57, 88]. Jednak częstość występowania genu *qepA* wśród pałeczek *Enterobacteriaceae* ogółem jest niska. Badania przeprowadzone przez Yamane i wsp. [88] wskazują, że tylko 2 (0,3%) spośród 751 przebadanych klinicznych szczepów *E. coli* posiadały tę determinantę.

OqxAB jest pompą efflux typu MDR należącą do rodziny RND białek transportowych powszechnie występującą u *K. pneumoniae*. Gen kodujący tę pompę po raz pierwszy został zidentyfikowany w plazmidzie (pOLA52), jako determinanta odpowiedzialna za oporność na używany wśród trzody chlewnej stymulator wzrostu – olaquindox [27]. Obecność genu *oqxAB* przyczynia się do oporności na m.in. chloramfenikol, trimetoprim i chinoliny, w tym kwas nalidyksowy, norfloksacynę oraz ciprofloksacynę (powoduje 16-krotny wzrost wartości MIC ciprofloksacyny) [28]. Występowanie *oqxAB* opisano wśród klinicznych izolatów zarówno w plazmidzie u *E. coli,* jak i w chromosomie, a także w plazmidzie u *K. pneumoniae* i *Salmonella* Enteritidis [46, 47, 69]. W obu sytuacjach gen flankowany był przez element transpozycyjny IS*26*. Wysoka częstość występowania pompy OqxAB (kodowanej zarówno plazmidowo, jak i chromosomowo) obserwowana jest wśród powyżej 70% szczepów *K. pneumoniae* wytwarzających β-laktamazy [56]. Przypuszcza się nawet, że drobnoustrój ten może stanowić potencjalny rezerwuar genu *oqxAB*. Jak dotąd, występowanie pompy OqxAB opisano wśród klinicznych izolatów *K. pneumoniae* wyosobnionych w Chinach, Korei Płd., Hiszpanii i USA [55, 56, 69, 92].

4.4. Wpływ PMQR na poziom oporności

Nabycie mechanizmów oporności na FQ kodowanych plazmidowo, w przypadku nieobecności mechanizmów kodowanych chromosomowo (mutacji), skutkuje wzrostem wartości MIC (< 1 mg/l) ale wartość ta pozostaje nadal w kategorii wrażliwości, zgodnie z kryteriami przyjętymi przez EUCAST [www.eucast.org/clinical breakpoints/].

Ogólnie, przyjmuje się, że obecność genów *qnr* (zwłaszcza *qnrA*, *qnrB* i *qnrS*) prowadzi do > 30-krotnej zmiany wartości MIC ciprofloksacyny i levofloksacyny, porównywalnej do zmiany wywołanej pojedynczą mutacją w podjednostce GyrA [50]. Natomiast wpływ QnrC i QnrD, na poziom oporności jest mniej zauważalny [70].

Warto zauważyć, że oddziaływanie AAC(6')-Ib-cr na wzrost wartości MIC fluorochinolonów jest

zdecydowanie niższe niż obserwowany w przypadku białek Qnr [67, 68]. Ponadto, ekspresja pompy OqxAB kodowanej plazmidowo u *E. coli* może zwiększać wartość MIC fluorochinolonów od 16- do 128-krotnie zaś MIC kwasu nalidyksowego 8-krotnie [70]. Ekspresja genu kodującego białko transportowe QepA powoduje wzrost wartości MIC kwasu nalidyksowego i ciprofloksacyny, odpowiednio 2- i 32-krotnie [70].

Pomimo tego, że wszystkie determinanty PMQR przyczyniają się, jak wspomniano, tylko do redukcji wrażliwości na fluorochinolony to w przypadku współwystępowania dwóch lub więcej mechanizmów oporności na FQ kodowanych plazmidowo obserwuje się wyższy poziom oporności [70]. I tak, w przypadku klinicznych izolatów *E. coli*, u których MIC ciprofloksacyny wynosił 4 mg/ml, nie posiadających mutacji w QRDR genów gyrazy i topoizomerazy IV stwierdzono obecność genów PMQR, tj. *qnrS1* i *oqxAB* oraz nadekspresję chromosomowo kodowanej pompy AcrAB-TolC [75].

Należy zauważyć, że wyizolowane z materiału klinicznego pałeczki *Enterobacteriaceae* zawierające mechanizmy PMQR zazwyczaj wykazują wysoki poziom oporności na fluorochinolony, co jest wynikiem współwystępowania tych determinant wraz z chromosomowo kodowanymi mechanizmami oporności, głównie mutacjami [59, 75]. Z tego względu, jak również z uwagi na to, że obecność PMQR przyczynia się do umiarkowanego wzrostu wartości MIC fluorochinolonów oraz braku specyficznych fenotypowych markerów wskazujących na obecność PMQR, w badaniach przesiewowych utrudnione jest wykrycie izolatów posiadających te mechanizmy i ich scharakteryzowanie bez zastosowania metod molekularnych.

5. Podsumowanie

Oporność na fluorochinolony jest zjawiskiem złożonym, będącym często wypadkową współwystępowania kilku mechanizmów. Wprawdzie nabycie mechanizmów oporności na FQ kodowanych plazmidowo przyczynia się zazwyczaj jedynie do obniżenia wrażliwości na tę grupę leków, ale ich obecność sprzyja selekcji mutantów o wysokim poziomie oporności, związanych z nabyciem mutacji w QRDR w trakcie terapii FQ. Ponadto, obecność mechanizmów PMQR jest dość istotna, gdyż kodujące je geny znajdują się na ruchomych elementach genetycznych dzięki czemu łatwo mogą być przekazywane horyzontalnie pomiędzy różnymi gatunkami pałeczek *Enterobacteriaceae.* Co więcej, występowanie PMQR często związane jest z opornością na inne grupy antybiotyków. Geny PMQR można znaleźć w transpozonach i/lub integronach znajdujących się w plazmidach MDR, co sprzyja rozpowszechnianiu fenotypu wielolekooporności. Niestety, do dziś nie jest znana rzeczywista częstość występowania mechanizmów PMQR wśród *Enterobacteriaceae*. Związane jest to z faktem, że jak dotąd brak jest odpowiednich testów fenotypowych zaś wiarygodne wykrywanie tych mechanizmów oparte jest o kosztowne techniki biologii molekularnej.

Podziękowania

Publikacja sfinansowana z działalności statutowej NIZP-PZH, zadanie nr 4/EM/2017.

Piśmiennictwo

1. Alekshun M.N., Levy S.B.: Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 2067–2075 (1997)
2. Alekshun M.N., Levy S.B.: The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiol.* **7**, 410–413 (1999)
3. Ball P.: Quinolone generations: natural history or natural selection? *J. Antimicrob. Chemother*. **46** Suppl T1, 17–24 (2000)
4. Baranello L., Levens D., Gupta A., Kouzine F.: The importance of being supercoiled: how DNA mechanics regulate dynamic processes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1819**, 632–638 (2012)
5. Barnard F.M., Maxwell A.: Interaction between DNA gyrase and quinolones: effect of alanine mutations at GyrA subunit residues Ser (83) and Asp(87). *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1994–2000 (2001)
6. Baucheron S., Imberechts H., Chaslus-Dancla E., Clockaert A.: The AcrB multidrug transporter plays a major role in high-level fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage type DT204. *Microb. Drug Resist.* **8**, 281–289 (2002)
7. Boulund F., Johnning A., Pereira M.B., Larsson D.G., Kristiansson E.: A novel method to discover fluoroquinolone antibiotic resistance (*qnr*) genes in fragmented nucleotide sequences. *BMC Genomics*, **13**, 695 (2012)
8. Breines, D.M., Ouabdesselam S., Ng E.Y., Tankovic J., Shah S., Soussy C.J., Hooper D.C.: Quinolone resistance locus *nfxD* of *Escherichia coli* is a mutant allele of *parE* gene encoding a subunit of topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41,** 175–179 (1997)
9. Cattoir V., Poirel L., Mazel D., Soussy C.J., Nordmann P.: *Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated QnrS-like quinolone resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother*. **51**, 2650–2651 (2007)
10. Cattoir V., Nordmann P.: Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Curr. Med. Chem.* **16**, 1028–1046 (2009)
11. Cavaco L.M., Hasman H., Xia S., Aarestrup F.M.: *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 603–608 (2009)
12. Chmelnitsky I., Hermesh O., Navon-Venezia S., Strahilevitz J., Carmeli Y.: First detection of *aac(6')-Ib-cr* in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Tel Aviv, Izrael. *J. Antimicrob Chemother*. **64**, 718–722 (2009)
13. Chmielarczyk A., Pobiega M., de Champs C., Wojkowska-Mach J., Rozanska A., Heczko P.B., Guillard T., Bulanda M.: The high

prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance among very low birth-weight infants in Poland. *Microb. Drug Resist.* **21**, 391–397 (2015)
14. Corbett K.D., Schoeffler A.J., Thomsen N.D., Berger J.M.: The structural basic for substrate specifity in DNA topoisomerase IV. *J. Mo.l Biol.* **351**, 545–561 (2005)
15. Dalhoff A.: Resistance surveillance studies: A multifaceted problem – the fluoroquinolone example. *Infection*, **40**, 239–262 (2012)
16. Dolejska M., Cizek A. i wsp.: Plasmids carrying $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. *J. Antimicrob. Chemother*. **66**, 757–764 (2011)
17. Drlica K.: Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr. Opin. Microbiol*. **2**, 504–508 (1999)
18. Drlica K., Malik M., Kerns R.J., Zhao X.: Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob. Agents Chemother*. **52**, 385–392 (2008)
19. Drlica K., Hiasa H., Kerns R., Malik M., Mustaev A., Zhao X.: Quinolones: action and resistance updated. *Curr. Top. Med. Chem*. **9**, 981–998 (2009)
20. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database (22.05.2017)
21. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Atlas of Infectious Diseases, http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial-resistance-and-consumption/Pages/antimicrobial-resistance-and-anitmicrobial-consumption.asp (22.05.2017)
22. Emmerson A.M., Jones A.M.: The quinolones: decades of development and use. *J. Antimicrob. Chemother*. **51**, 13–20 (2003)
23. Ferjani S., Saidani M., Amine F.S., Boutiba-Ben Boubaker I.: Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a Tunisian hospital. *Mikrob. Drug Resist*. **21**, 158–166 (2015)
24. Fihman V., Lartigue M.F., Jacquier H., Meunier F., Schnepf N., Raskine L., Riahi J., Sanson-le Pors M.J., Berçot B.: Appearance of *aac(6')-Ib-cr* gene among extender-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a French hospital. *J. Infect.* **56**, 454–459 (2008)
25. Fonseca E.L., Vincente A.C.: Epidemiology of *qnrVC* allels and emergence out of the *Vibrionaceae* family. *J. Med. Microbiol.* **62**, 1628–1630 (2013)
26. Guillard T., Grillon A., de Champs C., Cartier C., Madoux J., Lozniewski A., Berçot B., Riahi J., Vernet-Garnier V., Cambau E.: Mobile insertion cassets as a source of *qnrD* mobilization onto small non-transmissible plasmids in *Proteeae. Plos One*, **9**, e87801 (2014)
27. Hansen L.H., Johannesen E., Burmølle M., Sørensen A.H., Sørensen S.J.: Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquindox in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **48**, 3332–3337 (2004)
28. Hansen L.H., Jensen L.B., Sørensen H.I., Sørensen S.J.: Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J. Antimicrob. Chemother*. **60**, 145–147 (2007)
29. Hata M., Suzuki M., Matsumoto M., Takahashi M., Sato K., Ibe S., Sakae K.: Cloning of novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 801–803 (2005)
30. Hooper D.C.: Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resistance Updates*, **2**, 38–55 (1999)
31. Hooper D.C.: New uses for new and old quinolones and challenge of resistance. *Clin. Infect. Dis.* **30**, 234–254 (2000)
32. Hooper D.C.: Emerging mechanisms of fluoroquinolones resistance. *Emerging Infect. Dis.* **7**, 337–341 (2001)
33. Hooper D.C.: Efflux pumps and nosocomial antibiotic resistance: a primer for hospital epidemiologists. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 1811–1817 (2005)
34. Hooper D.C., Jakoby G.A.: Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1354**, 12–31 (2015)
35. Jakoby GA.: Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis*. **41**, 120-126 (2005)
36. Jacoby G.A., Walsh K.E., Mills D.M., Walker V.J., Oh H., Robicsek A., Hooper D.C.: *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1178–1182 (2006)
37. Jacoby G., Cattoir V., Hooper D., Martínez-Martínez L., Nordmann P., Pascual A., Poirel L., Wang M.: *qnr* gene nomenclature. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2297–2299 (2008)
38. Jacoby G.A., Griffin C.M., Hooper D.C.: *Citrobacter* spp. As a source of *qnrB* alleles. *Antimicrob. Agents Chemother*. **55**, 4979–4984 (2011)
39. Jacoby G.A., Hooper D.C.: Phylogenetic analysis of chromosomally determined Qnr and related proteins. *Antimicrob. Agents Chemother*. **57**, 1930–1934 (2013)
40. Jacoby G.A., Strahilevitz J., Hooper D.C.: Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol. Spectr.* **2**, PLAS-0006-2013 (2014)
41. Jiang Y., Zhou Z., Qian Y., Wei Z., Yu Y., Hu S., Li L.: Plasmid--mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')--Ib-cr* in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *J. Antimicrob. Chemother*. **61**, 1003–1006 (2008)
42. Jlili Nel-H., Réjiba S., Smaoui H., Guillard T., Chau F., Kechrid A., Cambau E.: Trend of plazmid-mediated quinolone resistance genes at the Children's Hospital in Tunisia. *J. Med. Microbiol.* **63**, 195–202 (2014)
43. Karisik E., Ellington M.J., Pike R., Warren R.E., Livermore D.M., Woodford N.: Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 β-lactamases from *Escherichia coli* strains in the United Kingdom. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**, 665–668 (2006)
44. Kim E.S., Jeong J.Y., Jun J.B., Choi S.H., Lee S.O., Kim M.N., Woo J.H., Kim Y.S.: Prevalence of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme among *Enterobacteriaceae* blood isolates in Korea. *Antimicrob. Agents Chemother*. **53**, 2643–2645 (2009)
45. Kim H.B., Park C.H., Kim C.J., Kim E.C., Jacoby G.A., Hooper D.C.: Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrob. Agents Chemother*. **53**, 639–645 (2009)
46. Kim H.B., Wang M., Park C.H., Kim E.C., Jacoby G.A., Hooper D.C.: *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **53**, 3582–3584 (2009)
47. Li L., Liu Y. i wsp.: Spread of *oqxAB* in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium predominantly by IncHI2 plasmids. *J. Antimicrob. Chemother*. **68**, 2263–2268 (2013)
48. Ma J., Wang M. i wsp.: High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrob. Agents Chemother*. **53**, 519–524 (2009)
49. Machado E., Coque T.M., Cantón R., Baquero F., Sousa J.C., Peixe L.: Dissemination in Portugal of CTX-M-15, OXA-1, and TEM-1-producing *Enterobacteriaceae* strains containing the *aac(6')-Ib-cr* gene, which encodes an aminoglycoside- and

fluroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother*. **50**, 3220–3221 (2006)
50. Martínez-Martínez L., Pascual A., Jacoby G.A.: Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet,* **351**, 797–799 (1998)
51. Martínez-Martínez L., Pascual A., Garcia I., Tran J., Jacoby G.A.: Interaction of plasmid and host quinolone resistance. *J. Antimicrob. Chemother*. **51**, 1037–1039 (2003)
52. Mazzariol A., Kocsis B., Koncan R., Kocsis E., Lanzafame P., Cornaglia G.: Description and plasmid characterization of *qnrD* determinants in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii*. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, E46–48 (2012)
53. Nordmann P., Poirel L.: Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother*. **56**, 463–469 (2005)
54. Park C.H., Robicsek A., Jacoby G.A., Sahm D., Hooper D.C.: Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother*. **50**, 3953–3955 (2006)
55. Park K.S., Kim M.H., Park T.S., Nam Y.S., Lee H.J., Suh J.T.: Prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance genes, aac(6')-Ib-cr, qepA, and oqxAB in clinical isolates of extended--spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Ann. Clin. Lab. Sci*. **42**, 191–197 (2012)
56. Perez F., Bonomo R.A.: OqxAB, a quinolone and olaquindox efflux pump, is widely distributed among multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates of human origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 4602–4603 (2013)
57. Périchon B., Courvalin P., Galimand M.: Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **51**, 2464–2469 (2007)
58. Piddock L. J.: Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update1994–1998. *Drugs*, **58**, 11–18 (1999)
59. Piekarska K., Wołkowicz T., Zacharczuk K., Rzeczkowska M., Chróst A., Bareja E., Olak M., Gierczyński R.: Co-existence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and mutations in *gyrA* and *parC* among fluoroquinolone-resistant clinical *Enterobacteriaceae* isolated in tertiary hospital in Warsaw, Poland. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **45**, 238–243 (2015)
60. Pitout J.D., Wei Y., Church D.L., Gregson D.B.: Surveillance for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* within the Calgary Health Region, Canada: the emergence of *aac(6')-Ib-cr*. *J. Antimicrob. Chemother*. **61**, 999–1002 (2008)
61. Poirel L., Liard A., Rodriguez-Martinez J.M., Nordmann P.: *Vibronaceae* as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants. *J. Antimicrob. Agents.* **56**, 1118–1121 (2005)
62. Poirel L., Rodriguez-Martinez J.M., Mammeri H., Liard A., Nordmann P.: Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob. Agents Chemother*. **49**, 3523–3525 (2005)
63. Poirel L., Cattoir V., Nordmann P.: Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between humans, animal, and environmental ecologies. *Front. Microbiol.* **3**, 24 (2012)
64. Pons M.J., Gomes C., Ruiz J.: *qnrVC*, a new transferable Qnr-like family. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* **31**, 191–192 (2013)
65. Poole K.: Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother*. **56**, 20–51 (2005)
66. Putman M., van Veen H.W., Konings W.N.: Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 672–693 (2000)
67. Redgarve L.S., Sutton S.B., Webber M.A., Piddock L.J.V.: Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiol.* **22**, 438–445 (2014)
68. Robicsek A., Strahilevitz J., Jacoby G.A., Macielag M., Abbanat D., Park Ch.H., Bush K., Hooper D.C.: Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of common aminoglicoside acetylotransferase. *Nat. Med*. **12**, 83–88 (2006)
69. Rodríguez-Martínez J.M., Díaz de Alba P., Briales A., Machuca J., Lossa M.,Fernández-Cuenca F., Rodríguez Baño J., Martínez--Martínez L., Pascual Á.: Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum-β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother*. **68**, 68–73 (2013)
71. Rodríguez-Martínez J.M., Machuca J., Cano M.E., Calvo J., Martínez-Martínez L., Pascual A.: Plasmid-mediated quinolone resistance: two decades on. *Drug Resist. Updat*. **29**, 13–29 (2016)
72. Ruiz E., Saenz Y., Zarazaga M., Rocha-Gracia R., Martinez-Martinez L., Arlet G., Torres C.: *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichi coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *J. Antimicrob. Chemother*. **67**, 886–897 (2012)
73. Sabtcheva S., Kaku M., Saga t., Ishii Y., Kantardjiev T.: High prevalence of the *aac(6')-Ib-cr* gene and its dissemination among *Enterobacteriaceae* isolates by CTX-M-15 plasmid in Bulgaria. *Antimicrob. Agents Chemother*. **53**, 335–336 (2009)
74. Saga T., Sabtcheva S., Mitsutake K., Ishii Y., Tateda K., Yamaguchi K., Kaku M.: Characterization of *qnrB*-like genes in *Citrobacter* species of the American Type Culture Collection. *Antimicrob. Agents Chemother*. **57**, 2863–2866 (2013)
75. Sánchez M.B., Rodríguez- Martínez J.M., Martínez-Martínez L., Martínez J. L.: Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of novel family of Qnr determinants. *BMC Microbiol*. **8**, 148–161 (2008)
76. Sato T., Yokota S.-I., Uchida I., Okubo T., Usui M., Kusumoto M., Akiba M., Fujii N., Tamura Y.: Fluoroquinolone resistance mechanisms in an *Escherichi coli* isolate, HUE1, without quinolone resistance – determining region mutations. *Front. Microbiol*. **4**, 125 (2013)
77. Silva-Sánchez J., Cruz-Trujillo E., Barrios H., Reyna-Flores F., Sánchez-Pérez A., Bacterial Resistance Consortium, Garza--Ramos U.: Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* pediatric clinical isolates in Mexico. *PLoS One*, **17**, 8:e77968 (2013)
78. Soge O.O., Adeniyi B.A., Roberts M.C.: New antibiotic resistance genes associated with CTX-M plasmids from uropathogenic Nigerian *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother*. **58**, 1048–1053 (2006)
79. Strahilevitz J., Engelstein D., Adler A., Temper V., Moses A.E., Block C., Robicsek A.: Changes in *qnr* prevalence and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. collected from 1990 to 2005. *Antimicrob. Agents Chemother*. **51**, 3001–3003 (2007)
80. Strahilevitz J., Hooper D.C.: Dual targeting of topoisomerase IV and gyrase to reduce mutant selection: direct testing of the paradigm by using WCK-1734, a New fluoroquinolone, and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49,** 1949–1956 (2005)
81. Strahilevitz J., Jacoby G.A., Hooper D.C., Robicsek A.: Plasmid--mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev*. **22**, 664–689 (2009)
82. Szmolka A., Fortini D., Villa L., Carattoli A., Anjum M.F., Nagy B.: First report on IncN plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrS1* in porcine *Escherichia coli* in Europe. *Mikrob. Drug Resist*. **17**, 567–573 (2011)

83. Veldman K., Aarestrup F.M., i wsp.: International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *J. Antimicrob. Chemother*. **66**, 1278–1286 (2011)
84. Wang M., Guo Q., Xu X., Wang X., Ye X., Wu S., Hooper D.C., Wang M.: New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1892–1897 (2009)
85. Wasyl D.: Prevalence and characterization of quinolone resistance mechanisms in commensal *Escherichia coli* isolated from slaughter animals in Poland, 2009–2012. *Mikrob. Drug Resist.* **20**: 544–549 (2014)
86. Webber M.A., Piddock L.J.: Absence of mutations in *marRAB* or *soxRS* in *acrB*-overexpressing fluoroquinolone-resistant clinical and veterinary isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1550–1552 (2001)
87. Willmott C.J., Maxwell A.: A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrob. Agents Chemother*. **37,** 126–127 (1993)
88. Yamane K., Wachino J., Suzuki S., Kimura K., Shibata N., Kato H., Shibayama K., Konda T., Arakawa Y.: New plasmid--mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichi coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother*. **51**, 3354–3360 (2007)
89. Yamane K., Wachino J., Suzuki S., Arakawa Y.: Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob. Agents Chemother*. **52**, 1564–1566 (2008)
90. Yang J., Lu Y., Li J., Ma Y., Hu C., Jin S., Ye L., Cui S.: Characterization of clinical *Escherichia coli* isolates from China containing transferable quinolone resistance determinants. *J. Antimicrob. Chemother*. **65**, 453–459 (2010)
91. Yoshida H., Bogaki M., Nakamura M., Nakamura S.: Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1271–1272 (1990)
92. Yoshida H., Bogaki M., Nakamura M., Yamanaka L.M., Nakamura S.: Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35,** 1647–1650 (1991)
93. Yuan J., Xu X., Guo Q., Zhao X., Ye X., Guo Y., Wang M.: Prevalence of the *oqxAB* gene complex in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 1655–1659 (2012)
94. Zhang R., Ichijo T., Huang Y.L., Cai J.C., Zhou H.W., Yamaguchi N., Nasu M., Chen G.X.: High prevalence of *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* genes in both water-borne environmental bacteria and clinical isolates of *Citobacter freundii* in China. *Microbes Environ*. **27**, 158–163 (2011)
95. Zhang S., Liu Y.H. i wsp.: Prevalence and plasmid characterization of the *qnrD* determinant in *Enterobacteriaceae* isolated from animal, retail meat products, and humans. *Microb. Drug Resist*. **19**, 331–335 (2013)
96. Zhao X., Xu X., Zhu D., Ye X., Wang M.: Decreased quinolone susceptibility in high percentage of *Enterobacter cloaceae* clinical isolates caused only by Qnr determinants. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **67**, 110–113 (2010)