

Aktualne zagrożenia dotyczące oporności na antybiotyki u bakterii

Wprowadzenie

Stosowanie właściwej chemioterapii zakażeń bakteryjnych jest nie tylko niesłabnącym, ale wciąż narastającym problemem od czasu wprowadzenia pierwszych sulfonamidów. Przy czym o ile we wczesnej erze antybiotyków, a więc w latach 60-tych optymistycznie uważano, że wynalezienie kilku jeszcze antybiotyków doprowadzi jeżeli nie do całkowitego wyeliminowania, to do znacznego ograniczenia zakażeń bakteryjnych, to późniejsze lata prowadziły do znacznego osłabienia tego optymizmu. Już w krótkim czasie uświadomiono sobie, że wprowadzenie praktycznie każdego nowego antybiotyku początkowo skutecznego przeciwko określonym gatunkom bakterii, prowadzi do narastania liczby szczepów opornych. W tym czasie bardzo intensywnie zajęto się analizowaniem przyczyn tego zjawiska, a zwłaszcza badaniem genetycznych uwarunkowań powstawania i rozprzestrzeniania się oporności na antybiotyki u drobnoustrojów.

Antybiotyki β -laktamowe

Obecnie do najliczniej reprezentowanych na rynku oraz do najczęściej stosowanych należą antybiotyki β -laktamowe, do których zaliczamy penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy, monobaktamy i inhibitory beta-laktamaz (kwas klawulanowy i sulbaktam). Wszystkie antybiotyki z tej grupy charakteryzują się wspólnym elementem budowy (obecność pierścienia β -laktamowego) oraz wspólnym mechanizmem działania w stosunku do komórki bakteryjnej. Różnią się natomiast między sobą znacznie spektrum działania przeciwbakteryjnego, jak również właściwościami farmakokinetycznymi. Takie antybiotyki β -laktamowe jak penicylina G czy oporne na β -laktamazy penicyliny izoksazolytowe (kloksacylina, dikloksacylina charakteryzują się wąskim spektrum działania i działają tylko na bakterie Gram-dodatnie, oraz na niektóre ziarniaki Gram-ujemne. Wiele półsyntetycznych pochodnych z tej grupy wykazuje natomiast szerokie (cefalosporyny I i II generacji, omino- lub karboksypenicyliny) lub bardzo szerokie (cefalosporyny III i IV generacji, karbapenemy) spektrum działania. Bakterie dysponują jednak mechanizmami oporności na wszystkie antybiotyki z tej grupy. Oporność na antybiotyki β -laktamowe

może wynikać z obecności jednego lub więcej spośród następujących mechanizmów: zdolność do hydrolizy antybiotyku, utrata powinowactwa miejsca uchwytu w komórce bakteryjnej lub brak przepuszczalności dla antybiotyku, a więc niemożność dotarcia do właściwego miejsca działania. Produkcja enzymów hydrolizujących cząsteczki antybiotyków jest charakterystyczna zarówno dla bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych, przy czym enzymy te, szczególnie u bakterii Gram-ujemnych wykazują znaczny stopień zróżnicowania zwłaszcza pod względem spektrum działania ale również budowy i mechanizmu działania. Modyfikacja miejsca działania antybiotyku prowadzi najczęściej do oporności na wszystkie bez wyjątku antybiotyki β -laktamowe i występuje u bakterii Gram-dodatnich. Brak przepuszczalności dla antybiotyków β -laktamowych o wąskim spektrum może być cechą gatunkową wielu bakterii Gram-ujemnych i wiąże się z obecnością i specyficzną budową tzw. błony zewnętrznej (outer membrane). Bakterie Gram-ujemne, zwłaszcza pałeczki niefermentujące mogą nabyć wtórnie oporność na antybiotyki β -laktamowe o szerokim spektrum przez utratę białka ułatwiającego przechodzenie antybiotyku przez błonę zewnętrzną, mianowicie jednego z tzw. białek porynowych.

1. Gronkowce

U gronkowców kliniczne znaczenie mają dwa mechanizmy oporności na antybiotyki β -laktamowe. Pierwszy z nich polega na wytwarzaniu indukcyjnej β -laktamazy o wąskim spektrum substratowym hydrolizującej cząsteczki antybiotyków do formy nieaktywnej. Spektrum β -laktamaz gronkowcowych obejmuje penicyliny klasyczne oraz ampicylinę, amoksacylinę i karbenicylinę. β -laktamaza gronkowcowa nie hydrolizuje penicylin izoksazolytowych, cefalosporyn i karbapenemów. Drugi mechanizm prowadzi do oporności na wszystkie antybiotyki β -laktamowe i obejmuje cefalosporyny, karbapenemy i preparaty z inhibitorami β -laktamaz. Ta oporność występuje u bakterii, które posiadają dodatkowo białko PBP o niskim powinowactwie do wszystkich antybiotyków β -laktamowych. Takie szczepy nazywamy MRS (methicillin resistant staphylococci), MRSA w przypadku *S. aureus* lub MRSCN w przypadku gatunków gronkowców koagulazo-ujemnych. Istnieją również oznaczenia MRSCV (methicillin

* Autor jest Dyrektorem Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie.

** Autorzy pracują w Katedrze Mikrobiologii: AM w Warszawie.

resistant *S. aureus* small colony variants) oraz MRSE (methicillin resistant *S. epidermidis*).

W syntezę β -laktamazy u gronkowców zaangażowane są cztery geny: gen strukturalny *blaZ*, oraz geny regulatorowe *blaI*, *blaR1* i *blaR2*. Geny *blaZ*, *blaI* i *blaR1* zwykle są sprzężone i występują pozachromosomalnie natomiast *blaR2* jest zawsze chromosomalny (5). Mechanizm regulacji syntezy β -laktamazy u *S. aureus* nie jest dotąd w pełni poznany. Operon *blaZ* często występuje na plazmidach klasy II lub na transpozonach. Transpozony te występują najczęściej w obrębie plazmidów konigacyjnych klasy III. U gronkowców opisano kilka transpozonów warunkujących syntezę β -laktamazy jak np. Tn552, Tn4002, Tn3852, Tn4201 (13). Wszystkie te transpozony są podobne do siebie i prawdopodobnie mają wspólne pochodzenie. Ponieważ na plazmidach klasy II i III często występują geny warunkujące oporność na środki dezynfekcyjne i antyseptyczne (*qac* i *smr*) a na plazmidach klasy III geny warunkujące oporność na aminoglikozydy (np. *aacA-aphD*, *aadA*, *aadD*, *aadE*) oraz na trimetoprim (*dfra*) warianty produkujące β -laktamazę są selekcjonowane nie tylko przez obecność antybiotyków β -laktamowych w środowisku (13).

Produkcja β -laktamaz przez gronkowce nie powoduje oporności szczepu na antybiotyki odporne na ich działanie takie jak oksacylina, kloksacylina, cefalosporyny czy imipenem. Jednak opisano szczepy *S. aureus* wykazujące podwyższoną oporność na oksacylinę (i inne β -laktamy) na skutek hiperprodukcji β -laktamazy lub też produkcji β -laktamazy o zmienionym spektrum. Szczepy takie nazwano BORSA (borderline oxacillin resistant *S. aureus*). Jednakże w przeciwieństwie do pałeczek Gram-ujemnych u gronkowców nie stwierdzono mutantów produkujących β -laktamazę o rozszerzonym spektrum. Brak takiej selekcji jest spowodowany pozakomórkowym charakterem β -laktamaz gronkowcowych które zabezpieczają całą populację bakterii a nie tylko pojedynczą komórkę (7).

Drugi typ oporności na antybiotyki β -laktamowe u gronkowców nie jest warunkowany produkcją β -laktamazy i dotyczy wszystkich antybiotyków β -laktamowych. Ten typ oporności wiąże się z modyfikacją miejsca działania antybiotyku. Antybiotyki β -laktamowe wiążą się w komórce bakteryjnej ze specyficznymi białkami zlokalizowanymi w błonie cytoplazmatycznej (po stronie zewnętrznej), nazwanymi PBPs (penicillin binding proteins). Białka te są enzymami o charakterze transpeptydaz oraz transglikozydas i biorą udział w końcowym etapie syntezy ściany komórkowej bakterii (peptydoglikanu), w tzw. reakcji sieciowania. Antybiotyki β -laktamowe są analogami D-alanylo-alaniny bocznych łańcuchów peptydowych biorącej udział w tej reakcji. Poszczególne antybiotyki β -laktamowe wykazują różny stopień powinowactwa do różnych PBP. Liczba PBPs jest różna i w zależności od gatunku bakterii wynosi od 4-7 i są one nazywane PBP1, 2 ... itd. Obecność w komórce białka, które nie wiązałyby antybiotyków, a jednocześnie przejęłyby na siebie funkcje pozostałych wa-

runkowałyby oporność. Ten typ oporności może powstać u *S. aureus* albo na drodze mutacji w genach *pbp* i *abc* (szczepy MODSA uzyskiwane w warunkach laboratoryjnych) albo, co ma znacznie większe znaczenie kliniczne poprzez nabycie nowych genów. Nabyte DNA to region o długości ok. 30 kb, pochodzący od innego (nieznanego) rodzaju bakterii, kodujący oporność na wszystkie β -laktamy (regulon *mec*) (3, 6, 13). Regulon *mec* zawiera kilka genów. Najważniejszym jest gen *mecA* kodujący dodatkowe białko PBP2A (76 kDa) o niskim powinowactwie do antybiotyków β -laktamowych. Białko to posiada dwie domeny: transpeptydazową i prawdopodobnie transglikozydazową, co umożliwia mu przejęcie funkcji innych PBPs, związanych z antybiotykiem (3). Region *mec* zakończony jest z jednej strony przez sekwencję insercyjną IS431*mec* (3) i nie wykazuje cech transpozonu. Białko PBP2A ma charakter indukcyjny i regulacja produkcji tego białka jest bardzo podobna do regulacji β -laktamazy.

Istnieją dwa główne fenotypy oporności na metycylinę u gronkowców: homogenny i heterogenny. Wiele szczepów klinicznych charakteryzuje się heterogennym fenotypem oporności, a więc nie wszystkie komórki danego szczepu ujawniają w warunkach standardowych jednakową oporność. Może to być przyczyną błędów w oznaczaniu wrażliwości na metycylinę. W laboratoriach klinicznych oporność gronkowców na metycylinę (równoznaczne z opornością na wszystkie antybiotyki β -laktamowe) oznacza się stosując specjalne warunki hodowli (obecność w podłożu NaCl w stężeniu 3-7% lub temperatura inkubacji 30°C). Podział klinicznych szczepów *S. aureus* na 4 klasy oporności wprowadził Tomasz (22). Klasa 1 to szczepy gdzie dla $\geq 90\%$ populacji MIC metycyliny wynosi od 1,5 do 3,0 mg/L, a komórki o wysokiej oporności (HRS) występują z częstością 10^{-8} - 10^{-6} . Dla $\geq 90\%$ szczepów klasy 2 MIC metycyliny wynosiło 6,0-12,0 mg/L, HRS występują z częstością 10^{-5} - 10^{-4} . W klasie 4 wszystkie komórki wykazują MIC dla metycyliny > 400 mg/L (22).

Do chwili obecnej charakter oporności o heterogennym fenotypie nie został wyjaśniony w sposób satysfakcjonujący. Stwierdzono, że w ekspresji wysokiej oporności na metycylinę jest zaangażowanych wiele genów chromosomalnych oprócz genów *mec*. Najlepiej poznano geny *fem*, które badane przez Berger-Báchi i wsp. (3). Jak dotąd znanych jest 6 genów *fem*, nazwanych od *femA* do *femF*. Białka kodowane przez te geny są enzymami biorącymi udział w różnych etapach syntezy ściany komórkowej (3, 26). Prawdopodobnie każda zmiana dotycząca biosyntezy peptydoglikanu może wpływać na stopień oporności na metycylinę, mimo że większość tych enzymów nie bierze bezpośrednio udziału w wyrażeniu się oporności.

Częstość izolacji szczepów MRSA w ostatnich latach różni się w różnych krajach. We Francji wynosiła 35,1%, 34,4% we Włoszech, 30,3% w Hiszpanii, 25,1% w Belgii, 21,6% w Austrii, 12,2% w Polsce, 5,5% w Niemczech, 1,8% w Szwajcarii, 1,5% w Holandii, 0,3% w Szwecji i 0,1% w Danii (23). Szczepy MRSA występują znacznie

częściej w materiałach od chorych hospitalizowanych w porównaniu z materiałami od chorych niehospitalizowanych. Np. wśród szczepów *S. aureus* izolowanych w Państwowym Szpitalu Klinicznym Nr 1 w Warszawie, MRSA stanowiły ponad 40% (15).

Szczepy MRSA stanowią poważny problem nie tylko ze względu na oporność na wszystkie antybiotyki β -laktamowe, ale obecność determinanty *mec* prawdopodobnie zwiększa częstość integracji i stabilizacji innych determinant oporności występujących w plazmidach lub elementach transpozycyjnych. IS431*mec* może stanowić miejsce docelowe rekombinacji homologicznej dla innych elementów zakończonych podobnymi sekwencjami. Ponadto obecność tych sekwencji dostarcza miejsc włączania (attachment) w procesie miejscowo-specyficznego rekombinacji (site-specific) dla innych elementów transpozycyjnych (np. Tn554). Prowadzi to do pojawiania się szczepów *S. aureus* opornych prawie na wszystkie dostępne antybiotyki. Obecność determinanty *mec* może również wpływać na ekspresję białek bakteryjnych biorących udział w procesie patogenyzy oraz białek których wykrywanie jest przydatne w identyfikacji (białko A, koagulaza, clumping factor) (10, 13). Pochodzenie determinanty *mec* u gronkowców nie jest znane i prawdopodobnie proces nabywania oporności jest złożony. Przypuszcza się, że element *mec* powstał na skutek rekombinacji pomiędzy promotorem i sekwencją N-końcową genu β -laktamazy i genu strukturalnego o nieznanym pochodzeniu, prawdopodobnie nie gronkowcowym. Na początku wszystkie szczepy MRSA pochodziły prawdopodobnie od jednego klonu, ale później pojawiły się szczepy różniące filogenetycznie. Analiza determinanty *mec* u MRSA i MRS-CN potwierdza hipotezę, że determinanta ta może się rozprzestrzeniać horyzontalnie, a gronkowce koagulazo-ujemne mogą stanowić jej rezerwuar (10, 13).

Oporność związana z nabyciem zmienionego białka PBP niewątpliwie odgrywa najistotniejszą rolę u gronkowców, ale podobny mechanizm może występować również u innych bakterii Gram-dodatnich jak np. *Bacillus* spp. czy *Streptococcus pneumoniae*.

2. Pneumokoki

Pierwsze pneumokoki o obniżonej wrażliwości na penicylinę wyizolowano w latach 60., ale izolacje takie były niezmiernie rzadkie. Niestety w ostatnich latach nastąpił ogromny wzrost liczby szczepów *S. pneumoniae* opornych na antybiotyki. Częstość występowania pneumokoków opornych na penicylinę (PRP) jest różna w różnych krajach. Waha się od 3% w Niemczech do 58% na Węgrzech. W Polsce częstość izolacji PRP szacuje się na około 10% (10). Oporność pneumokoków na penicylinę może być przyczyną problemów terapeutycznych, ponieważ PRP są często oporne również na co-trimoksazol, makrolidy, chloramfenikol i tetracykliny. Oporność *S. pneumoniae* na penicylinę rozwinęła się na drodze zmian w głównych PBP, prowadzących do zmniejszenia powinowactwa antybiotyków β -laktamowych. Po-

ziom oporności pneumokoków na penicylinę jest zróżnicowany i przyjmuje się szczepy mające MIC 0,1-1 mg/L za średnio wrażliwe, natomiast szczepy mające MIC ≥ 2 jako oporne. Szczepy oporne na niskie stężenia penicyliny pozostają wrażliwe na cefalosporyny, natomiast oporność na wysokie stężenia penicyliny u *S. pneumoniae* jest również związana z opornością na cefalosporyny. Oporność na penicylinę u pneumokoków może teoretycznie powstać na skutek zmian w każdym z pięciu PBP o wysokiej masie cząsteczkowej: 1a, 1b, 2x, 2b. Białka te są transpeptydazami i transglikozydami niezbędnymi w końcowym etapie syntezy ściany komórkowej, katalizującymi odpowiednio reakcje sieciowania mostków peptydowych oraz wydłużania się łańcuchów peptydoglikanu. W badaniach laboratoryjnych nad przekazywaniem oporności stwierdzono, że szczepy biorców nabywają oporność po przekazaniu genów *pbp1a*, *pbp2b*, *pbp2x* (28). Szczególnie istotne w oporności na różne β -laktamy wydają się być determinanty *pbp2b* i *pbp2x*. Geny warunkujące te zmienione PBP mają strukturę mozaikową, co wskazuje na to iż powstały one na drodze przekazywania fragmentów genów od innych gatunków paciorkowców w procesie transformacji. Mechanizm oporności pneumokoków na penicylinę i inne antybiotyki β -laktamowe jest aktualnie przedmiotem wielu badań, ale nie został wyjaśniony (8, 28). Nie stwierdzono wytwarzania przez paciorkowce enzymów rozkładających antybiotyki β -laktamowe.

3. Pałeczki Gram-ujemne

Aktywność antybiotyków β -laktamowych w stosunku do różnych gatunków bakterii Gram-ujemnych jest różna i zależy od możliwości penetracji antybiotyku do miejsca działania (obecność oraz liczby odpowiednich kanałów białkowych w błonie zewnętrznej) oraz ich powinowactwa do PBP istotnych w syntezie ściany komórkowej u danego gatunku. Ponadto wiele gatunków bakterii Gram-ujemnych wytwarza naturalne β -laktamazy warunkowane chromosomalnie. Mają one najczęściej charakter indukcyjny lub też są wytwarzane stale w niewielkiej ilości. Stwierdzono, że β -laktamazy takie są produkowane między innymi przez *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *C. diversus*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Proteus* spp., *Serratia marcescens*, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* spp., *Burkholderia cepacia*, *Flavobacterium meningosepticum*. Enzymy te bardzo różnią się spektrum antybiotyków na które działają oraz aktywnością. Ich rola w oporności też może być różna, ale na ogół stała dla danego gatunku. Indukcyjny charakter wielu z tych enzymów powoduje, że antybiotyki β -laktamowe, które nie są dobrymi induktorami są aktywne. Istnieje jednak niebezpieczeństwo powstania w trakcie leczenia mutantów tzw. depresjonowanych, które wytwarzają enzym w sposób konstytutywny. Ponadto wrażliwość lub

oporność (MIC) w bardzo dużym stopniu zależy od inculum bakterii.

W nabytej oporności na antybiotyki β -laktamowe u bakterii Gram-ujemnych największą rolę również odgrywają β -laktamazy. Najczęściej są to enzymy kodowane plazmidalnie, ponieważ lokalizacja taka sprzyja międzyszczepowemu, a nawet międzygatunkowemu przekazywaniu genów oporności. Plazmidy warunkujące produkcję β -laktamaz są szczególnie często rozpowszechnione wśród *Enterobacteriaceae*, ale występują również u *P. aeruginosa* i innych pałeczek niefermentujących. Najczęściej występujące β -laktamazy plazmidalne mają spektrum obejmujące amino-, karboksy-, i ureido-penicyliny, a także cefalosporyny I generacji. Wobec nowszych cefalosporyn, karbapenemów i monobaktamów wykazują bardzo słabą aktywność. Enzymy te różnią się między sobą wrażliwością na inhibitory β -laktamaz takie jak klawulanian, tazobaktam czy sulbaktam. Wszystkie β -laktamazy bakteryjne, zarówno chromosomalne jak i plazmidalne kilkakrotnie zostały sklasyfikowane, głównie na podstawie aktywności wobec różnych grup antybiotyków β -laktamowych, wrażliwości na inhibitory oraz lokalizację genów, które je kodują. Najbardziej znane są klasyfikacje wg Jack i Richmond z 1970 r., Richmond i Sykes 1973 r. oraz Bush z 1989 i Busch 1995 (11). Istnieje również klasyfikacja oparta o sekwencję aminokwasów w łańcuchu białkowym enzymu wg Ambler 1980 (11). Jedynie ta ostatnia klasyfikacja umożliwia stwierdzenie rzeczywistego pokrewieństwa pomiędzy poszczególnymi enzymami.

Obecnie największe niebezpieczeństwo stanowią coraz częściej izolowane mutanty opisanych wcześniej β -laktamaz, są to tzw. ESBLs (extended-spectrum β -lactamases), czyli β -laktamazy o rozszerzonym spektrum aktywności. Wyizolowano wiele takich enzymów z różnych gatunków pałeczek Gram-ujemnych, najczęściej ze szczepów *K. pneumoniae*. Enzymy te mogą mieć różne pochodzenie, ponieważ mogą wywodzić się z różnych klas β -laktamaz. Najczęściej są to mutanty plazmidalnych enzymów TEM-1, TEM-2 i SHV-1 i zostały nazwane od TEM-3 do TEM-27 oraz SHV-2 do SHV-7. Enzymy te różnią się od swoich macierzystych form tym, że działają na wszystkie cefalosporyny, również te o poszerzonym spektrum oraz na monobaktamy (aztreonam). ESBL nie są aktywne wobec karbapenemów oraz cefamycyn. Nie rozkładają również temocyliny. Pewien problem może stanowić również to, że niektóre szczepy wytwarzające ESBL mogą dawać wynik antybiogramu „wrażliwy” dla takich cefalosporyn III-ciej generacji jak cefotaksym, ceftriaksone, cefpirom czy ceftazyksym. Wiadomo jednak, że mimo iż MIC tych antybiotyków dla tych szczepów badane *in vitro* mieści się w granicach przyjętych dla szczepów wrażliwych lub słabo wrażliwych, to ESBL mają zdolność rozkładu tych leków i żadne cefalosporyny nie powinny być stosowane w leczeniu zakażeń tymi szczepami. Stosowanie penicylin w połączeniu z inhibitorami β -laktamaz stanowi przedmiot dyskusji, a naj-

częściej przyczyną niepowodzeń może być duża ilość produkowanego enzymu. Podobnie istnieją doniesienia o niepowodzeniach w leczeniu po zastosowaniu cefoksytyny (17).

Szczególnie groźne, ale nie bardzo rozpowszechnione są β -laktamazy aktywne wobec karbapenemów (karbapenemazy). Większość karbapenemaz w odróżnieniu od innych β -laktamaz jest zależna od jonów cynku (metaloenzymy). Enzymy te są chromosomalnie kodowane u wszystkich pałeczek *Xantomonas maltophilia*, *Aeromonas hydrophila* oraz *Flavomonas odoratum*. Ponadto pewien procent beztlenowych pałeczek *Bacteroides fragilis* zawiera chromosomalne geny warunkujące produkcję tych enzymów, ale ekspresji ulegają tylko u około 1%. Niepokojące, ale na szczęście bardzo rzadkie są doniesienia o plazmidalnej lokalizacji genów warunkujących karbapenemazy. Zostały one opisane u pojedynczych szczepów *S. marcescens*, (16, 27) *Enterobacter cloacae* (11) i *P. aeruginosa* (24).

Innym mechanizmem wpływającym na oporność pałeczek Gram-ujemnych na antybiotyki β -laktamowe jest brak przepuszczalności zewnętrznej błony komórkowej. Mechanizm ten został stwierdzony pierwotnie u *Pseudomonas aeruginosa*, a później również u niektórych przedstawicieli *Enterobacteriaceae* jak *S. marcescens* oraz *C. freundii* związany jest ze zmianami w składzie białek tworzących kanały w błonie umożliwiających przenikanie antybiotyku do ściany komórkowej (białek porynowych). Efektywność tego mechanizmu wiąże się z możliwością wykorzystywania przez antybiotyk jednego lub większej liczby takich kanałów. W przypadku antybiotyków β -laktamowych są to najczęściej białka OprF oraz OprC u *Enterobacteriaceae* oraz OprD2 u *P. aeruginosa*. Brak odpowiedniego białka porynowego występuje przeważnie w połączeniu z produkcją β -laktamazy, co w konsekwencji prowadzi do oporności na karbapenemy.

Oporność na glikopeptydy

Glikopeptydy, z których znaczenie w klinice odgrywają dwa: wankomycyna i teikoplanina stanowią ważną klasę antybiotyków, stosowanych do leczenia poważnych zakażeń spowodowanych przez bakterie Gram-dodatnie, wykazujące oporność na inne antybiotyki (zwłaszcza β -laktamy) warunkowaną gatunkowo lub nabytą. Wankomycyna nie ulega absorpcji z przewodu pokarmowego, co czyni ją dobrym lekiem z wyboru w leczeniu enterocolitis spowodowanego przez *C. difficile*. Wankomycyna i teikoplanina hamują syntezę bakteryjnej ściany komórkowej u bakterii Gram-dodatnich, interferując z końcową D-alanylo-D-alaniną (D-Ala-D-Ala) bocznych łańcuchów pentapeptydowych prekursorów peptydoglikanu. Antybiotyki te prawdopodobnie hamują reakcję transpeptydacji i transglikozydacji, niezbędne w syntezie ściany komórkowej (25).

Wankomycyna okazała się nietypowym i unikalnym antybiotykiem pod względem narastania oporności ponieważ przez wiele lat oporność opisywano bardzo rzadko i nie miała ona dużego znaczenia klinicznego. Do-

piero w ostatnich latach pojawiły się oporne szczepy enterokoków, a ostatnio nawet gronkowców o znacznie podwyższonej oporności na glikopeptydy (9, 10).

Początkowo, mimo że lek jest zarejestrowany od ponad 35 lat, stosowanie wankomycyny było ograniczone. Później, ogromne rozprzestrzenienie się szczepów MRSA, a także znaczny wzrost liczby infekcji opornych spowodowanych przez bakterie Gram-dodatnie charakteryzujące się znaczną opornością na antybiotyki, często gatunkową, a ostatnio również pojawieniem się pneumokoków opornych na penicylinę doprowadziło do znacznego wzrostu zużycia glikopeptydów (9, 10).

Obecnie glikopeptydy stanowią ważną klasę leków stosowanych w zwalczaniu zakażeń powodowanych przez MRSA, koagulazo-ujemne gronkowce, oporne enterokoki, corynebacteria oraz niekiedy penicylino-oporne pneumokoki.

1. Enterokoki

Pierwsze doniesienia na temat plazmidowej oporności na wysokie stężenia zarówno wankomycyny jak i teikoplaniny u enterokoków pojawiły się w 1988 roku. Wykazano ponadto, że bakterie mlekowe z rodzajów *Pediococcus*, *Leuconostoc* i niektóre szczepy *Lactobacillus* wykazują gatunkową oporność na glikopeptydy. Podobnie *Erysipelothrix rhusiopathiae* jest odporny na wankomycynę, natomiast MIC teikoplaniny dla szczepów tego gatunku często pozwala na zaliczenie ich do wrażliwych.

U enterokoków opisano 4 fenotypy oporności na glikopeptydy: VanA, VanB, VanC i VanD. Podział na klasy fenotypowe jest oparty o poziom oporności na wankomycynę (zakres MIC), przy jednoczesnej oporności lub wrażliwości na teikoplaninę oraz na tym, czy oporność ma charakter indukcyjny czy konstytutywny (18, 25).

Fenotyp VanA jest najczęściej opisywany wśród *E. faecium* i *E. faecalis*, ale również był spotykany u *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. mundtii*, *E. raffinosus* i *E. avium*. Fenotyp VanA charakteryzuje się tym, że jest to oporność nabyta, indukcyjna, dotyczy wysokich stężeń wankomycyny (MIC \geq 256 μ g/ml) oraz opornością na teikoplaninę (MIC \geq 16 μ g/ml). Fenotyp VanB jest opisywany u gatunków *E. faecalis* i *E. faecium* a także w jednym przypadku u *S. bovis*. Jest to również nabyta, indukcyjna oporność na wankomycynę (MIC \geq 64 μ g/ml) ale zwykle nie na teikoplaninę. Fenotyp VanC występuje jako cecha gatunkowa u *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* i *E. flavescens*. Jest to konstytutywna oporność na niskie stężenia wankomycyny (MIC 4-16 μ g/ml) oraz wrażliwość na teikoplaninę. Fenotyp VanD został ostatnio opisany u jednego szczepu *E. faecium* i jest to nabyta, konstytutywna oporność na wankomycynę (MIC = 64 μ g/ml) oraz na niskie stężenie teikoplaniny (MIC = 4 μ g/ml) (18).

Geny warunkujące oporność typu VanA, VanB, VanC i VanD zidentyfikowano i nazwano odpowiednio *vanA*, *vanB*, *vanC*₁ u *E. gallinarum*, *vanC*₂ u *E. casseliflavus*, *vanC*₃ u *E. flavescens* i *vanD*. Geny *vanC*₂ i *vanC*₃

wykazują znaczny stopień homologii sekwencyjnej oraz wykazują reakcje krzyżowe w hybrydyzacji oraz PCR-RLFP.

Najwięcej uwagi poświęcono oporności typu VanA, ze względu na częstość występowania jak również znaczenie kliniczne ze względu na wysoki poziom oporności. Geny odpowiedzialne za ten typ oporności zlokalizowano pierwotnie na plazmidzie niekonjugacyjnym pIP816 w szczepie *E. faecalis* BM4147. Dalsze badania wkrótce wykazały, że geny te stanowią część transpozonu, nazwanego Tn1546. Za oporność odpowiedzialnych jest kilka genów zlokalizowanych obok siebie, tworzących tzw. operon. Dzięki obecności genów oporności, powstają prekursorzy peptydoglikanu: UDP-N-acetylmuramylpentadepsipeptydy, które są zakończone D-alanylo-D-mleczanem. Zamiast D-alanylo-D-alania. Wankomycyna i teikoplamina wykazują znacznie mniejsze powinowactwo do tych prekursorów (1, 2).

UPD-MurNAC-pentapeptyd zakończony D-Ala-D-mleczanem stwierdzono również u enterokoków wykazujących fenotyp oporności VanB. Stwierdzono, że peptyd VanB, który odpowiada analogicznemu peptydowi VanA jest również D-ligazą. Geny kodujące VanB i inne białka odpowiedzialne za regulację ekspresji oporności na wankomycynę zlokalizowane są w obrębie transpozonu Tn1545 który znajdowano zarówno w chromosomie jak i w obrębie plazmidów koniugacyjnych (20). Oporność typu VanC (niska oporność na wankomycynę i wrażliwość na teikoplaninę) stanowi gatunkową cechę większości szczepów *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* i *E. flavescens*. Przypuszcza się, że ten fenotyp jest kodowany chromosomalnie i ulega ekspresji konstytutywnie. Ten typ oporności jest również warunkowany przez ligazę, charakteryzującą się zmienioną specyficznością substratową. Prekursorzy peptydoglikanu u *E. gallinarum* są zakończone dwupeptydem D-alanina-D-seryna, a nie D-Ala-D-Ala ani D-Ala-D-mleczan. Takie podstawienie prawdopodobnie redukuje wiązanie wankomycyny, ale nie w tym samym stopniu co w przypadku co podstawienie D-Ala-D-mleczanu, jak to ma miejsce w przypadku fenotypów VanA i VanB. Biochemiczna natura oporności typu VanC u *E. casseliflavus* i *E. flavescens* nie jest znana.

W ostatnich latach zaobserwowano znaczny wzrost liczby wyhodowań szczepów enterokoków wankomycyno-opornych. W USA liczba wankomycyno-opornych enterokoków izolowanych w szpitalach wzrosła z 0,3% w 1989 roku do 7,9% w roku 1993 (19). W Europie ocenia się ich liczbę na 2,3% w stosunku do innych szpitalnych szczepów enterokoków. W Polsce jak dotąd szczepy te są izolowane niezmiernie rzadko.

Badania biochemiczne dotyczące naturalnej, wysokiej oporności na wankomycynę występującej u gatunków *Leuconostoc mesenteroides* oraz *Pediococcus pentosaceus* wykazały, że bakterie te mają prekursorzy peptydoglikanu zakończone zawsze D-Ala-D-mleczanem, podobnie jak przedstawiciele fenotypów VanA i VanB u enterokoków. Przypuszcza się, że te

organizmy posiadają tylko ligazę, która syntezuje dep-
sipeptydy zakończone D-Ala-D-mleczanem, i w ogóle
nie syntezują D-Ala-D-Ala.

Jest wiele spekulacji na temat źródła genów opor-
ności na glikopeptydy. Selekcję opornych enteroko-
ków przypisuje się poza zastosowaniem glikopepty-
dów u ludzi, stosowaniu antybiotyków z tej grupy (np.
avoparcyny) w hodowli zwierząt w Europie. Jako samo
źródło genów oporności mogły służyć szczepy produ-
centów (geny oporności mogą stanowić zanieczysz-
czenie obecne w antybiotyku). Porównywano geny li-
gazy (*ddl*) uzyskane ze szczepów produkujących an-
tybiotyki glikopeptydowe *Amycolatopsis orientalis*
i *Streptomyces toyocaenensis* z ligazami VanA i VanB.
Wykazano 60% podobieństwa w przewidywanej se-
kwencji aminokwasów, natomiast podobieństwo do in-
nych D-Ala-D-X ligaz było znacznie mniejsze i wynosi-
ło poniżej 35%. Wskazywałoby to na ścisłe pokrewień-
stwo ewolucyjne mechanizmów oporności u szczepów
klinicznych i produkujących antybiotyki.

2. Gronkowce

Wysoka oporność na glikopeptydy (MIC \geq 32mg/L)
występuje w środowisku naturalnym niezbyt często
i ograniczona jest właściwie do dwóch gatunków gron-
kowców koagulazoujemnych. *Staphylococcus haemo-
lyticus* i *Staphylococcus epidermidis*. Znacznie częściej
izolowane są gronkowce dla których MIC glikopepty-
dów jest nieco powyżej wartości granicznych, przyję-
tych dla szczepów wrażliwych (MIC > 4 mg/l dla wan-
komycyny i MIC > 8mg/l dla teikoplaniny) (4). W ostat-
nim czasie pojawiły się doniesienia o wyizolowaniu
szczepów *Staphylococcus aureus* o podwyższonej
oporności.

W przeciwieństwie do paciorkowców, gronkowce
są ogólnie rzecz biorąc bardziej wrażliwe na wanko-
mycynę niż na teikoplaninę. Szczepy *S. haemolyticus*
oporne na teikoplaninę izolowano zanim antybiotyk
ten został wprowadzony do handlu.

Ze względu na znaczny wzrost użycia wankomycy-
ny, izolacja naturalnie występującego szczepu *S. au-
reus*, a zwłaszcza MRSA opornego na wankomycynę
stała się faktem, a rozprzestrzenienie się takich szcze-
pów oraz powstanie szczepów MRSA o wysokiej opor-
ności na glikopeptydy jest coraz bardziej prawdopo-
dobna (10).

Istnieją co najmniej dwa sposoby nabycia przez
gronkowce genów oporności na glikopeptydy. Pierw-
szym z nich jest nabycie genów oporności od innych
rodzajów, np. enterokoków. Wykazano już w warun-
kach laboratoryjnych tego typu przekazywanie opor-
ności typu VanA ze szczepu *E. faecalis* do *S. aureus*
na drodze koniugacji. Innym mechanizmem nabycia
oporności na glikopeptydy, który może zachodzić
u gronkowców są zmiany mutacyjne. Wykazano np.,
że kilkakrotne pasażę, zarówno szczepów *S. aureus*
jak gatunków koagulazo-ujemnych, które wstępnie mia-
ły nieco podwyższone MIC prowadzi do uzyskania
szczepów o wysokiej oporności.

Jednakże ani genetyczny ani biochemiczny mecha-
nizm oporności na glikopeptydy u gronkowców nie
został wyjaśniony. Dotyczy to zarówno szczepów wy-
stępujących w naturze jak i mutantów laboratoryjnych,
przy czym nie jest powiedziane, że mechanizm opor-
ności musi być w tych wszystkich przypadkach po-
dobny (9, 10).

Oporność gronkowców na glikopeptydy jest kon-
stytutywna i charakteryzuje się obecnością dodatko-
wego białka o masie cząsteczkowej, w zależności od
źródła (być może od gatunku) od 35 do 39 kDa lub też
zwiększoną ekspresją tego białka (12, 21).

Niepowodzenia terapii wankomycyną mogą niekie-
dy być spowodowane tolerancją bakterii na ten anty-
biotyk. Tolerancja występuje wtedy, jeżeli bakterie są
wrażliwe na bakteriostatyczne działanie antybiotyku,
natomiast oporna na działanie bakteriobójcze. Mecha-
nizm molekularny tego zjawiska nie jest znany, ale bra-
ne są pod uwagę różne czynniki, a między innymi stan
lizogenii pewnymi bakteriofagami (14).

PIŚMIENNICTWO

1. Arthur M., Departieu F., Gerbaud G., Galimand M., Lec-
lercq R., Courvalin P.: The VanS sensor negatively control VanR-
mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance
genes of Tn1546 and related elements in the absence of in-
duction. *J. Bacteriol.*, 1997, 197, 97.– 2. Arthur M., Departieu
F., Molinas C., Reynolds P., Courvalin P.: The vanZ gene of
Tn1546 from *Enterococcus faecalis* BM4147 confers resistan-
se to teicoplanin. *Gene*, 1995, 154, 87.– 3. Berger-Bachi B.:
Resistance not mediated by β -lactamase (Methicillin resistan-
ce). [w]: *The Staphylococci in human disease*. (red: Crossley
K.B., Archer G.L.), Churchill Livington, New York 1997, 158.–
4. Billot-Klein D., Gutman L., Bryant D., Bell D., van Heijenoort
J., Grewal J., Shlaes D.M.: Peptidoglycan synthesis and struc-
ture in *Staphylococcus haemolyticus* expressing increasing
levels of resistance to glycopeptide antibiotics. *J. Bacteriol.*,
1996, 178, 4696.– 5. Bruns O., Bruns W., Pulverer G.: Regula-
tion of β -lactamase synthesis as a novel site of action for sup-
pression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*.
Zbl. Bakt., 1997, 285, 413.– 6. Domanski T.L., Bayles K.W.:
Analysis of *Staphylococcus aureus* genes encoding penicilin-
binding protein 4 and ABC-type transporter. *Gene*, 1995, 167,
111.– 7. Dyke K., Gregory P.: Resistance to β -lactam antibio-
tics. Resistance mediated by β -lactamase. [w]: *The Staphylo-
cocci in human disease* (red: Crossley K.B., Archer G.L.),
Churchill Livington, New York 1997, 139.– 8. Grebe T., Haken-
beck R.: Penicillin binding proteins 2b and 2x of *Streptococ-
cus pneumoniae* are primary resistance determinants for dif-
ferent classes of β -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Che-
mother.*, 1996, 40, 829.– 9. Jeljaszewicz J.: Epidemiology, bio-
chemistry and therapeutic possibilities for vancomycin-resi-
stant *Staphylococcus aureus*. *Antibiot. Chemother.*, 1998, 2,
5.– 10. Jeljaszewicz J., Młynarczyk G., Młynarczyk A.: Present
and future problems of resistance in Gram-positive cocci. *In-
fection*, 1998, 26 (1), 1.–
11. Livermore D.M.: β -lactamases in laboratory and clinical
resistance. *Microbiol. Rev.*, 1995, 8, 257.– 12. Milewski W.M.,
Boyle-Vavra S., Moreira B., Ebert C., Daum R.S.: Overproduc-
tion of 37-kilodalton cytoplasmatic protein homologous to
NAD⁺-linked D-lactate dehydrogenase associated with van-
comycine resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.
Agents Chemother.*, 1996, 40, 166.– 13. Młynarczyk A., Mły-
narczyk G., Jeljaszewicz J.: The genome of *Staphylococcus*