

OPORNOŚĆ BAKTERII Z RODZINY *ENTEROBACTERIACEAE* NA ANTYBIOTYKI β -LAKTAMOWE WYNIKAJĄCA Z WYTWARZANIA β -LAKTAMAZ

Ewa Nikonorow¹, Anna Baraniak^{1*}, Marek Gniadkowski¹

¹ Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Narodowy Instytut Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa

Wpłynęło w grudniu 2012 r.

Spis treści: 1. Wprowadzenie. 2. Mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki β -laktamowe. 3. Klasyfikacja β -laktamaz. 4. β -Laktamazy gatunkowo-specyficzne. 5. β -Laktamazy nabyte. 6. Ekspresja β -laktamaz. 7. Najważniejsze grupy β -laktamaz nabytych. 7.1. β -Laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym, ESBL. 7.2. Cefalosporynazy AmpC. 7.3. Karbapenemazy. 7.3.1. Karbapenemazy klasy A. 7.3.2. Karbapenemazy klasy B. 7.3.3. Karbapenemazy klasy D. 8. Podsumowanie

β -Lactamase-mediated resistance in *Enterobacteriaceae*

Abstract: Production of β -Lactamase is the major mechanism of resistance to β -lactams in Gram-negative bacteria. In recent years, resistance due to production of β -lactamases has been increasing at an alarming rate. It refers mostly to extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) that are the main problem in microorganisms of the family *Enterobacteriaceae*, conferring resistance to all penicillins, cephalosporins (except for cephamycins) and monobactams. Acquired cephalosporinases of the AmpC type also have become a significant factor of enterobacterial resistance to newer generation of β -lactams. The effect of AmpCs is largely strengthened by this mutational overexpression in such pathogens as *Enterobacter* spp. or *Citrobacter freundii*. β -Lactamase-mediated resistance to carbapenems in the members of the family *Enterobacteriaceae* has become a matter of highest concern over the last decade. It has been associated with various carbapenem-hydrolyzing enzymes, including the so-called KPC, MBL or OXA-48 types. Antimicrobial resistance in bacteria has been a key issue in public health, requiring constant monitoring at the hospital, country and global level.

Contents: 1. Introduction. 2. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. 3. Classification of β -lactamases. 4. Natural β -lactamases. 5. Acquired β -lactamases. 6. Expression of β -lactamases. 7. Main groups of the acquired β -lactamases. 7.1. Extended-spectrum β -lactamases, ESBLs. 7.2. AmpC-type cephalosporinases. 7.3. Carbapenemases. 7.3.1. Class A carbapenemases. 7.3.2. Class B carbapenemases. 7.3.3. Class D carbapenemases. 8. Conclusions

Słowa kluczowe: AmpC, β -laktamaza, *Enterobacteriaceae*, ESBL, karbapenemaza

Key words: AmpC, β -lactamase, carbapenemase, *Enterobacteriaceae*, ESBL

1. Wprowadzenie

Szybki wzrost oporności bakterii na antybiotyki stosowane w leczeniu stanowi jeden z najpoważniejszych problemów współczesnej medycyny. Oporność bakterii może być naturalna (charakterystyczna dla danego gatunku) lub nabyta (charakterystyczna dla danego szczepu drobnoustroju) i jest warunkowana różnorodnymi mechanizmami. Oporność naturalna może wynikać z braku w komórkach danego gatunku miejsca docelowego dla leku, obecności struktur ograniczających możliwość jego dotarcia do celu lub funkcjonowania konkretnych mechanizmów oporności, których efektery (np. pompy, enzymy) kodowane są przez gatunkowo-specyficzne geny chromosomalne. Nie stanowi ona poważnego problemu klinicznego, gdyż zazwyczaj dotyczy jedynie niewielkich stężeń leków. Problem wzrasta, gdy dzięki zjawiskom genetycznym dochodzi np. do podwyższenia poziomu ekspresji naturalnych genów oporności i powstania szczepów opornych na leczenie, przy czym wówczas mamy już do czynienia z opornością nabytą. Ten rodzaj oporności stanowi znacznie większe wyzwanie. Zmiany w chromosomalnym DNA komórki,

oprócz podwyższenia ekspresji naturalnych genów oporności, mogą prowadzić też do modyfikacji miejsca docelowego antybiotyku lub zamknięcia dróg jego penetracji. Ponadto, efektywny horyzontalny transfer genów powoduje pojawianie się w komórkach nowych genów oporności (kodujących różnorodne efektery), przenoszonych na ruchomych elementach genetycznych (elementy transpozycyjne, plazmidy, bakteriofagi). Szczepy dysponujące opornością nabytą mają przewagę selekcyjną w warunkach silnej presji antybiotykowej. Równoczesna ekspozycja na różne rodzaje antybiotyków prowadzi do selekcji tzw. szczepów wieloopornych, czyli dysponujących opornością na kilka grup terapeutycznych. Jednoczesna obecność różnych genów oporności na tych samych elementach ruchomych ułatwia pojawianie się takich szczepów [39, 43, 76, 78].

Istnieje pięć podstawowych strategii oporności bakterii na antybiotyki, takich jak:

1. inaktywacja enzymatyczna antybiotyków (hydrolyza, modyfikacje chemiczne, np. acetylacja);
2. zmiany strukturalne miejsca działania leku (zmiany sekwencji aminokwasowej białka, modyfikacje, np. metylacja);

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Narodowy Instytut Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa; tel.: 22 851 43 88; fax: 22 841 33 67; e-mail: abaraniak@cls.edu.pl

3. zastąpienie oryginalnego miejsca docelowego nową cząsteczką, pozbawioną powinowactwa do leku;
4. zmniejszenie przepuszczalności osłon komórkowych dla antybiotyku (błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych);
5. aktywne wypompowywanie leku z komórki [43, 76, 78].

2. Mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki β -laktamowe

Antybiotyki β -laktamowe są największą i najbardziej zróżnicowaną grupą antybiotyków, używaną do leczenia niemal wszystkich rodzajów zakażeń o rozległej etiologii. W użyciu jest obecnie pięć typów β -laktamów, tj. penicyliny, cefalosporyny, monobaktamy, karbapenemy oraz inhibitory β -laktamaz, przy czym te ostatnie nie są antybiotykami i stosowane są w lekach łączonych z penicylinami lub cefalosporynami. Mechanizm działania β -laktamów polega na inhibicji kluczowych enzymów biosyntezy ściany komórkowej bakterii (peptydoglikanu), tzw. białek PBP (*Penicillin-Binding Proteins*). Komórki bakterii o osłabionej strukturze ściany ulegają lizie, przez co β -laktamy zaliczane są do antybiotyków o działaniu bakteriobójczym [39, 43]. Oporność bakterii na β -laktamy jest warunkowana różnorodnymi mechanizmami, które klasyfikuje się w obrębie czterech zasadniczych strategii:

1. wytwarzanie białek PBP o niskim powinowactwie do β -laktamów;
2. zmniejszanie przepuszczalności osłon komórkowych bakterii;
3. wypompowywanie leków z komórki bakteryjnej;
4. wytwarzanie β -laktamaz – enzymów hydrolizujących cząsteczki β -laktamów.

Pierwsza grupa mechanizmów, obecna zarówno u bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych, związana jest z białkami PBP. Mechanizmy oporności zależne od tych białek są dwójakiego rodzaju. Pierwszy polega na modyfikacji naturalnych PBP tak, aby nie miały one powinowactwa do β -laktamów, ale jednocześnie pełniły funkcje katalityczne w procesie wytwarzania peptydoglikanu. Modyfikacje te następują wskutek gromadzenia mutacji w genach *pbp* lub nabywania ich zmutowanych fragmentów od innych organizmów i zastępowania nimi homologicznych odcinków genów własnych. Drugi rodzaj związany jest z pozyskiwaniem obcego, kompletnego genu kodującego białko PBP, które nie oddziałuje z cząsteczkami β -laktamów [43].

Dwie kolejne strategie, typowe dla bakterii Gram-ujemnych, polegają na ograniczeniu możliwości penetracji komórki bakteryjnej przez antybiotyk β -laktamowy. Pierwsza z nich związana jest z likwidacją lub zmniejszeniem liczby tzw. kanałów porynowych

w błonie zewnętrznej tych bakterii, przez co cząsteczki β -laktamów wnikają w niższych stężeniach do przestrzeni periplazmatycznej komórki. Druga strategia polega na aktywnym wypompowywaniu leku z komórki bakteryjnej, która może ulegać intensyfikacji wskutek podwyższania ekspresji tzw. systemów pompowo-porynowych, odpowiedzialnych za ten proces [43, 51].

Ostatnim z omawianych typów mechanizmów, o największym znaczeniu dla oporności na antybiotyki β -laktamowe u pałeczek Gram-ujemnych, jest wytwarzanie β -laktamaz [44]. Enzymy te prawdopodobnie pochodzą od prekursorowych białek PBP; przypuszcza się, że niektóre z nich mogą nadal pełnić bliżej nieokreśloną rolę w procesie biosyntezy peptydoglikanu [49, 51]. Jednak podstawową funkcją β -laktamaz jest ochrona bakterii przed działaniem β -laktamów, zarówno tych, które są naturalnie produkowane i uwalniane do środowiska przez grzyby i inne bakterie (β -laktamazy naturalne), jak i tych, które stosowane są przez człowieka w medycynie i innych obszarach aktywności (β -laktamazy naturalne i nabyte) [39].

3. Klasyfikacja β -laktamaz

Zdecydowana większość β -laktamaz posiada serynę w centrum aktywnym (β -laktamazy serynowe), a katalizowana przez nie hydroliza β -laktamów przebiega dwuetapowo: najpierw w reakcji acylacji wytwarzany jest ester serynowy, a następnie w wyniku jego hydrolizy (deacylacji) uwolniony zostaje produkt bez pierścienia β -laktamowego [39, 49, 51]. Drugi, mniej powszechny mechanizm otwierania pierścienia β -laktamowego wykorzystywany jest przez tzw. metalo- β -laktamazy i opiera się na interakcji antybiotyku z kationem cynku w centrum aktywnym enzymu. Wytwarzanie β -laktamaz jest jednym z intensywniej i najdłużej badanych mechanizmów oporności bakterii na leki [9, 39].

Zasadniczy zrąb różnorodności β -laktamaz, obejmujący wszystkie znane dzisiaj ich klasy i rodziny powstał dawno przed wprowadzeniem do lecznictwa antybiotyków. Niezwykle krótki z ewolucyjnego punktu widzenia okres po wprowadzeniu antybiotyków do terapii i innych dziedzin aktywności człowieka zaowocował dalszym, bardzo przyspieszonym różnicowaniem się tych enzymów. Obecnie w użyciu są dwa systemy klasyfikacji β -laktamaz, tzw. system funkcjonalny oraz system strukturalny [2, 9, 11, 39]. Pierwszy, autorstwa Bush i Jacoby'ego, opiera się na porównaniu szybkości reakcji hydrolizy różnych β -laktamów (penicylin, cefalosporyn, monobaktamów i karbapenemów) oraz podatności β -laktamaz na inhibicję przez niektóre β -laktamy (typowe inhibitory β -laktamaz – kwas klawulanowy, sulbaktam i tazobaktam, a także aztreonam i kloksacylinę) oraz EDTA i NaCl. Wyodrębnia

on cztery zasadnicze grupy funkcjonalne, oznaczone cyframi od 1 do 4:

- Grupa 1 obejmuje β -laktamazy preferujące cefalosporyny, ale aktywne też względem penicylin i monobaktamów, słabo podatne na inhibicję kwasem klawulanowym, ale hamowane przez kloksacylinę. Tradycyjnie określa się je terminem „cefalosporynazy AmpC”.
- Grupa 2 jest najliczniejsza, bardzo zróżnicowana strukturalnie i funkcjonalnie, przez to podzielona na 12 podgrup. Są tu zarówno penicylinazy, jak i cefalosporynazy, o wąskim, szerokim, rozszerzonym lub ekstremalnie szerokim spektrum substratowym, obejmującym praktycznie wszystkie β -laktamy. Wspólną cechą tych enzymów jest podatność na hamowanie przez inhibitory β -laktamowe (kwas klawulanowy, tazobaktam, sulbaktam), która może też ulegać redukcji w drodze mutacji.
- Grupa 3 obejmuje metalo- β -laktamazy (MBL), hydrolizujące penicyliny, cefalosporyny oraz karbapenemy. MBL są hamowane przez EDTA, natomiast nie są hamowane przez inhibitory β -laktamowe.
- Grupa 4 to zaledwie kilka enzymów stosunkowo dawno zidentyfikowanych i słabo zbadanych; w najnowszej wersji systemu klasyfikacji funkcjonalnej grupa ta została pominięta [39].

Drugi system zaproponował Ambley [1]. Jest on oparty na analizie sekwencji aminokwasowych enzy-

mów i grupuje β -laktamazy ze względu na ich pokrewieństwo ewolucyjne. Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych β -laktamaz pozwoliła wyróżnić cztery klasy enzymów, oznaczone od A do D. Klasy A, C i D to β -laktamazy serynowe, natomiast w klasie B znalazły się MBL. Oba podziały β -laktamaz dobrze ze sobą korelują. Wszystkie enzymy tworzące funkcjonalną grupę 1 stanowią strukturalną klasę C. Grupa 2 zawiera β -laktamazy klas A i D, natomiast grupa 3 odpowiada klasie B. Enzymy należące do funkcjonalnej grupy 4 nie zostały scharakteryzowane pod względem struktury.

4. β -Laktamazy gatunkowo-specyficzne

Jak wspomniano wcześniej, β -laktamazy pojawiły się na wczesnych etapach ewolucji bakterii. Wspólnymi przodkami dzisiejszych β -laktamaz oraz białek PBP były pierwotne PBP. W 1998 r. Massova i Mobasher zaproponowali hipotezę, w myśl której wszystkie klasy β -laktamaz (A-D) wyewoluowały niezależnie od siebie z innych prekursorów PBP, wraz z odpowiednimi klasami współczesnych białek PBP [49]. Zdecydowana większość pałeczek Gram-ujemnych posiada własne, typowe dla danego gatunku β -laktamazy, których geny zlokalizowane są w chromosomalnym DNA. Wiele gatunków bakterii Gram-ujemnych, m.in. *Acinetobacter* spp.,

Tabela I

Wybrane elementy klasyfikacji funkcjonalnej i strukturalnej β -laktamaz (na podstawie Jacoby i Bush [32])

Grupa funkcjonalna	Klasa strukturalna	Wybrane substraty	Wrażliwość na inhibitory		Wybrane enzymy	
			klawulanian tazobaktam	EDTA		
1	1	C	cefalosporyny (I, II, III)*	NIE	NIE	Cefalosporynazy AmpC <i>E. coli</i> i <i>P. aeruginosa</i> , CMY-2, FOX-1, MIR-1, P99
			cefalosporyny (I, II, III, IV)	NIE	NIE	GCI, CMY-37
2	2a	A	penicyliny z wyjątkiem izoksazolilowych	TAK	NIE	PCI
			penicyliny i cefalosporyny (I)	TAK	NIE	SHV-1, TEM-1, TEM-2, TLE-1 (TEM-90)
			penicyliny, cefalosporyny (I, II, III, IV), monobaktamy	TAK	NIE	CTX-M-15, CTX-M-44 (TOHO-1), PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10, TEM-26, VEB-1
			penicyliny i cefalosporyny (I)	NIE	NIE	TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26
			penicyliny, cefalosporyny (I, II, III, IV) i monobaktamy	NIE	NIE	TEM-50, TEM-68, TEM-89
			karboksypenicyliny	TAK	NIE	PSE-1, CARB-3
	2d	D	penicyliny izoksazolilowe	Słaba	NIE	OXA-1, OXA-10
			penicyliny, cefalosporyny (I, II, III, IV)	Słaba	NIE	OXA-11, OXA-15
			penicyliny, karbapenemy	Słaba	NIE	OXA-23, OXA-48
	2e	A	cefalosporyny (I, II, III, IV)	TAK	NIE	CepA
karbapenemy			TAK	NIE	IMI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-1	
3	3a	B	penicyliny, cefalosporyny (I, II, III, IV), karbapenemy	NIE	TAK	IMP-1, LI, NDM-1, VIM-1
			karbapenemy	NIE	TAK	CphA, Sfh-1

* liczbami rzymskimi oznaczono generacje cefalosporyn

Pseudomonas spp. oraz pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*, takie jak *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* i *Providencia rettgeri*, posiada gatunkowo-specyficzne cefalosporynazy AmpC. Pomimo pewnych różnic gatunkowych, enzymy te charakteryzują się bardzo szerokim zakresem preferencji substratowych, obejmującym przede wszystkim większość cefalosporyn (z wyjątkiem leków IV generacji), ale też penicyliny i monobaktamy [10, 39, 43, 51]. Ekspresja tych β -laktamaz najczęściej ma charakter indukowalny, ale u *E. coli* i *Acinetobacter* spp. zachodzi ona konstytutywnie na bardzo niskim poziomie i nie nadaje dzikim szczepom oporności na antybiotyki β -laktamowe [39, 43]. Różne zjawiska genetyczne (mutacje w genach regulatorowych, mutacje i insercje elementów ruchomych w obrębie promotorów) prowadzą do ekspresji konstytutywnej enzymów AmpC na zdecydowanie podwyższonym poziomie.

Niektóre pałeczki Gram-ujemne: *Klebsiella* spp., *Citrobacter koseri*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Kluyvera* spp., *Chryseobacterium meningosepticum*, *Stenotrophomonas maltophilia* i inne wytwarzają charakterystyczne enzymy należące do klasy A. Profile substratowe tych β -laktamaz są bardzo zróżnicowane. Niektóre z nich głównie hydrolizują różnego rodzaju penicyliny i są to tzw. β -laktamazy o szerokim spektrum substratowym (np. enzymy typu SHV-1, LEN lub OKP *Klebsiella pneumoniae*), a inne posiadają bardzo rozległy zakres działania tzw. β -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym, ESBL (np. β -laktamazy K-OXY *Klebsiella oxytoca* lub KLU *Kluyvera* spp.), lub do nich zbliżony [39, 43]. U szeregu wymienionych gatunków naturalny poziom wytwarzania tych enzymów jest bardzo niski i nie nadają one drobnoustrojom oporności na β -laktamy. Podobnie jednak jak w przypadku naturalnych cefalosporynaz AmpC, możliwe są modyfikacje genetyczne, prowadzące do istotnego podwyższenia ich ekspresji. U niektórych gatunków naturalne β -laktamazy klasy A wytwarzane są w sposób indukowalny [39].

Inną grupę enzymów kodowanych chromosomalnie stanowią MBL. Występują one np. u *S. maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *C. meningosepticum*, *Legionella gormanii*, *Caulobacter crescentus*, *Janthinobacterium lividum*, czy *Flavobacterium johnsoniae*, i wykazują aktywność wobec penicylin, cefalosporyn i karbapenemów, przez co ich spektrum substratowe należy także określić jako bardzo szerokie [10, 43].

5. β -Laktamazy nabyte

Od momentu wprowadzenia β -laktamów do terapii zakażeń, obserwuje się gwałtowne przyspieszenie ewolucji oporności na te antybiotyki w populacjach drobnoustrojów chorobotwórczych.

W przypadku bakterii Gram-ujemnych jest to przełom lat 1950 i 1960, kiedy to wprowadzono pierwsze β -laktamy skierowane przeciwko pałeczkom jelitowym (aminopenicyliny i cefalosporyny I generacji). Masowe stosowanie β -laktamów, a także opracowywanie co pewien czas nowych ich rodzajów i generacji (cefamycyny, oksymino-cefalosporyny II, III i IV generacji, monobaktamy, inhibitory β -laktamaz, karbapenemy) były powodami wręcz lawinowego narastania oporności u pałeczek Gram-ujemnych od przełomu lat 1970. i 1980. Kolejne „kamienie milowe” tego procesu odzwierciedlają sekwencję wprowadzania coraz to nowych β -laktamów [39, 51]. Uzyskanie samej oporności na te leki jest głównym kierunkiem tej ewolucji (pojawianie się kolejnych wariantów β -laktamaz), ale ważne są także jej efektywność (podnoszenie ekspresji lub parametrów kinetycznych β -laktamaz, sprzyjające tło genetyczne), ekonomika (poszerzanie spektrów substratowych) oraz rozprzestrzenianie w populacjach bakterii. Istnieje szereg mechanizmów wpływających na ewolucję β -laktamaz, a przez to i wytwarzających je szczepów, z których najważniejszymi są: mobilizacja naturalnych genów β -laktamaz, mutacje strukturalne w genach β -laktamaz, mutacyjne i rekombinacyjne zmiany regulatorowe prowadzące do wzrostu ich ekspresji, koniugacyjny transfer genów β -laktamaz, wreszcie mutacyjne zmiany tła genetycznego podnoszące poziom oporności (defekty poryn, zwiększanie aktywności pomp) [24, 25, 48, 51].

6. Ekspresja β -laktamaz

Zakres i stopień oporności bakterii na antybiotyki β -laktamowe, wywołanej wytwarzaniem β -laktamazy, wynikają z właściwości samego enzymu oraz ze sposobu i poziomu jego ekspresji. Bardzo duże znaczenie ma też tło genetyczne, czyli obecność innych mechanizmów oporności na β -laktamy w danym szczepie. Wytwarzanie β -laktamazy przez komórkę bakteryjną może odbywać się stale na tym samym poziomie (ekspresja konstytutywna) lub w sposób regulowany (ekspresja indukowana), zależny od obecności w środowisku bakterii odpowiednich dla danego gatunku i rodzaju enzymu induktorów β -laktamowych. Poziom ekspresji, zarówno konstytutywnej, jak i w stanie indukcji, może być bardzo różny i wynika on przede wszystkim z wydajności transkrypcji genu kodującego daną β -laktamazę. Transkrypcja genu zależy głównie od siły promotora, a niekiedy też obecności pewnych elementów regulacyjnych, np. attenuatorów transkrypcji. Ponadto, w niektórych szczepach bakterii dochodzi do zwiększenia liczby kopii genu β -laktamazy. Dlatego też ta sama β -laktamaza, nawet w szczepach tego samego gatunku, może być wytwarzana na różnym poziomie [32, 39, 43].

Jak wspomniano wyżej, przykładami enzymów ulegających ekspresji konstytutywnej na bardzo niskim poziomie są naturalne β -laktamazy AmpC *E. coli* i *Acinetobacter* spp. Dzikie szczepy tych drobnoustrojów są wrażliwe na wszystkie β -laktamy aktywne wobec pałeczek Gram-ujemnych. Z kolei *K. pneumoniae* wytwarza gatunkowo-specyficzne β -laktamazy o szerokim spektrum substratowym klasy A (typu SHV-1, LEN lub OKP) na poziomie wystarczającym do nadania szczepom dzikim oporności na amino- i karboksypenicyliny. Charakter indukowany ma natomiast ekspresja cefalosporynaz AmpC charakterystycznych dla *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *S. marcescens*, *M. morgani*, *P. stuartii* i *P. rettgeri*, a także *P. aeruginosa*. Dzikie szczepy tych gatunków są odporne na te β -laktamy, które są induktorami i jednocześnie substratami AmpC, głównie aminopenicyliny oraz cefalosporyny I i II generacji. Dodatkowo, wskutek mutacji w genach regulatorowych, ww. gatunki mogą wytwarzać β -laktamazy AmpC stale na wysokim poziomie, bez względu na obecność lub brak induktora. Stan trwałego odblokowania produkcji AmpC określa się mianem „derepresji”. Zmutowane szczepy z derepresją AmpC stają się odporne na wszystkie β -laktamy, które są choćby „słabymi” substratami tych cefalosporynaz, czyli wszystkie penicyliny, cefalosporyny (z wyjątkiem leków IV generacji) oraz monobaktam i jest to oporność niehamowana lub w niewielkim stopniu hamowana przez inhibitory β -laktamaz – kwas klawulanowy, sulbaktam i tazobaktam. Częstość derepresji i poziom wytwarzania enzymu w tym stanie zależy od gatunku bakterii. Derepresja β -laktamaz AmpC, związana z bardzo wysokim poziomem produkcji tych enzymów, najczęściej spotykana jest u *Enterobacter cloacae* i *C. freundii* [32, 39, 43].

Zdecydowana większość β -laktamaz nabytych, w tym β -laktamaz o szerokim spektrum substratowym, ESBL, AmpC i MBL, których geny obecne są na plazmidach, ulega ekspresji konstytutywnej [39, 43]. Jak już wcześniej wspomniano, poziom tej ekspresji zależy głównie od siły promotora genu kodującego β -laktamazę oraz liczby kopii genu w komórce bakteryjnej.

7. Najważniejsze grupy β -laktamaz nabytych

7.1. β -Laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym, ESBL

ESBL to enzymy zdolne do hydrolizy wszystkich penicylin, cefalosporyn (oprócz cefamycyn) i monobaktamów. Hydrolizują oksyimino- β -laktamy z szybkością nie mniejszą niż 10% szybkości hydrolizy benzylopenicyliny. Aktywność większości tych β -laktamaz hamowana jest przez kwas klawulanowy, sulbaktam i tazobaktam [10, 39]. W systemie funkcjonalnym

β -laktamaz, ESBL zostały zaklasyfikowane do dwóch podgrup grupy 2: podgrupy 2be („ β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym hamowane przez kwas klawulanowy”) oraz podgrupy 2de („ β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym hydrolizujące kloksacylinę”). Według podziału strukturalnego β -laktamaz należą one do klas A (podgrupa 2be) i D (podgrupa 2de). Są to enzymy o masie cząsteczkowej około 30 kDa, w ich miejscu aktywnym znajduje się reszta serynowa [10].

Enzymy ESBL występują głównie jako nabyte, kodowane plazmidowo β -laktamazy. Geny kodujące ESBL zlokalizowane są często na plazmidach koniugacyjnych (np. IncFII, IncI), w tym także o szerokim zakresie gospodarza (np. IncA/C, IncL/M), przez co ulegają szybkiemu rozprzestrzenianiu, również pomiędzy szczepami należącymi do różnych gatunków [15, 29, 47, 59]. Ponadto, występują one w obrębie specyficznych elementów genetycznych (transpozonów, modułów transpozycyjnych, kaset integronowych), co zapewnia im przenoszenie pomiędzy różnymi cząsteczkami DNA, a często też wysoki poziom ekspresji [32, 39, 67]. Jak zaznaczono wyżej, także niektóre gatunkowo-specyficzne β -laktamazy klasy A posiadają cechy ESBL. Wytwarzane są one m.in. przez *K. oxytoca* (β -laktamazy K2 lub K-OXY) [22, 26], *Kluyvera* spp. (KLU) [18, 30, 65, 74], *Serratia fonticola* (SFO) [50], *C. meningosepticum* (CME) [6, 75] lub *Rahnella aquatilis* (RAHN) [5].

Nabyte ESBL, zidentyfikowane po raz pierwszy w 1983 r. [35, 36], są obecnie źródłem poważnych problemów klinicznych i epidemiologicznych na całym świecie. Wytwarzane są przede wszystkim przez szpitalne szczepy pałeczek różnych gatunków z rodziny *Enterobacteriaceae*, choć w ostatnim okresie obserwuje się je także coraz częściej w szczepach wywołujących zakażenia pozaszpitalne, głównie u *E. coli*, ale także u *Salmonella* i *Shigella* [12, 61]. Identyfikowane są również u niektórych pałeczek niefermentujących, zwłaszcza *P. aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii* [39].

Duża i stale rosnąca częstość występowania ESBL wśród izolatów klinicznych *K. pneumoniae*, która w skali pojedynczego oddziału lub szpitala, a nawet regionu lub kraju może osiągać 40–60% i więcej [21, 61], konsekwentnie zawęża możliwości terapeutyczne antybiotyków β -laktamowych. Ponadto, brak skutecznego leczenia wynika z faktu, że wiele izolatów ESBL+ przejawiało w badaniach *in vitro* wrażliwość na szereg antybiotyków należących do spektrum substratowego ESBL (zwłaszcza oksyimino- β -laktamów) ze względu na specyficzne cechy enzymu lub niższy poziom jego ekspresji [39, 77]. Zastosowanie takich leków w terapii kończyło się jednak często niepowodzeniem. Pierwsze takie przypadki odnotowywano już w latach 1980. [7], przeprowadzona zaś pod koniec lat 1990. metaanaliza wykazała, że ryzyko niepowodzenia wynosi ok. 50%

w przypadku zastosowania cefalosporyny III generacji (np. ceftazydymu, cefotaksymu, ceftriaksonu) w leczeniu zakażenia szczepem ESBL+, na którą ten szczep wykazywał wrażliwość *in vitro* [62]. Ryzyko to zależało od wartości MIC (minimalnego stężenia hamującego) danej cefalosporyny i wzrastało jeszcze bardziej w przypadku szczepów, dla których wartość MIC znajdowała się bezpośrednio poniżej wartości granicznej dla szczepów wrażliwych i średniowrażliwych [61, 62]. Zjawisko to związane jest z tzw. efektem inokulum, czyli wzrostu wartości MIC leku wraz ze wzrostem gęstości zawiesiny bakterii (badania lekowrażliwości *in vitro* prowadzi się przy stosunkowo niskiej gęstości zawiesiny bakterii). Ponadto, może dojść do selekcji mutantów o podwyższonej aktywności enzymatycznej ESBL lub zwiększonym poziomie ekspresji β -laktamazy. W związku z tym, potrzeby kliniczne i epidemiologiczne, spowodowały konieczność precyzyjnej identyfikacji fenotypu ESBL+ we wszystkich izolatach *Enterobacteriaceae* w ramach rutynowej diagnostyki laboratoryjnej. Zalecano więc, aby wszystkie izolaty kliniczne, u których stwierdzano obecność ESBL, bez względu na szczegółowy obraz antybiogramu, interpretować jako odporne na wszystkie substraty ESBL (z wyjątkiem izolatów pochodzących z zakażeń dróg moczowych). W ostatnich latach główne ośrodki zajmujące się standaryzacją metod diagnostyki mikrobiologicznej (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST, oraz Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI) dokonały istotnych zmian w zakresie diagnostyki ESBL. Poprzez zaostrzenie kryteriów oceny wrażliwości pałeczek *Enterobacteriaceae* na oksymino-cefalosporyny, niemal wszystkie szczepy ESBL+ są odporne na tę grupę leków i w związku z tym nie ma już potrzeby ich reklasyfikacji w razie wykrycia tego mechanizmu oporności. Obecnie wykrywanie ESBL prowadzi się wyłącznie do celów epidemiologicznych oraz kontroli zakażeń, i służą temu różne metody (np. test dwóch krążków, DDST – *double-disc synergy test*; E-test), wszystkie jednak sprowadzające się do stwierdzenia znaczącego obniżenia wrażliwości badanego szczepu na przynajmniej jeden z markerowych oksymino- β -laktamów (ceftazydym, cefotaksym, ceftriakson, cefpodoksym, cefepim, aztreonam) i wykazania wpływu inhibitora β -laktamaz (kwasu klawulanowego) na ten efekt [20]. Diagnostykę ESBL utrudnia różnorodność fenotypów oporności szczepów ESBL+ na β -laktamy, której jedynie wycinkiem jest wspomniana wyżej bardzo niska oporność *in vitro* części szczepów na wybrane substraty ESBL. Fenotypy oporności szczepów wytwarzających ESBL zależą od wielu czynników, m.in. szczegółowych preferencji substratowych konkretnych wariantów ESBL, stopnia ich podatności na działanie inhibitorów, poziomu aktywności enzymatycznej i ekspresji oraz obecności innych mechanizmów oporności (inne β -laktamazy, obniżenie

przepuszczalności błony zewnętrznej, wypompowywanie leku). Niektóre z tych mechanizmów, np. wysoka ekspresja cefalosporynazy AmpC, MBL, lub poważne obniżenie przepuszczalności błony zewnętrznej, ze względu na niepodatność na działanie inhibitorów β -laktamaz, mogą maskować obecność ESBL [20]. Innym poważnym problemem w zwalczaniu szczepów o fenotypie ESBL+ jest też fakt, że są one często odporne również na antybiotyki z innych grup terapeutycznych, przez co jeszcze łatwiej mogą ulegać pozytywnej selekcji i utrzymywać się we florze szpitalnej oraz wywoływać epidemie. Geny kodujące ESBL zlokalizowane są na plazmidach, na których z reguły znajdują się też geny warunkujące oporność np. na aminoglikozydy, ko-trimoksazol, tetracykliny lub chloramfenikol [32].

7.2. Cefalosporynazy AmpC

Aktywność cefalosporynaz AmpC, w tym ich bardzo rozległe spektrum substratowe, omówiono w części poświęconej β -laktamazom gatunkowo-specyficznym. Od roku 1988r. obserwuje się również nabyte warianty tych enzymów i są one wytwarzane głównie przez *K. pneumoniae*, *E. coli* i *P. mirabilis* [31, 39, 63]. Za przeniesienie naturalnych genów *ampC* odpowiedzialne są elementy *ISEcp1*, *ISCR1* oraz *IS26*. Ich źródłem były chromosomy *C. freundii*, *Enterobacter* spp., *M. morgani* i innych bakterii, które dały początek kilku rodzinom nabytych AmpC, takim jak np. MIR, CMY-2, DHA, ACC, MOX, czy FOX [17, 31, 63]. Najbardziej rozpowszechnione są β -laktamazy z rodziny CMY-2, pochodzące od AmpC *C. freundii* [4, 9, 33]. W odróżnieniu od swoich indukowanych prekursorów, większość cefalosporynaz nabytych wytwarzana jest w sposób konstytutywny, ponieważ mobilizacji najczęściej ulegał jedynie gen *ampC*, bez towarzyszącego mu na chromosomie genu regulatorowego *ampR*. Nabyte AmpC nadają szczepom oporność na penicyliny, cefalosporyny (z wyjątkiem IV generacji), monobaktamy i połączenia β -laktamów z inhibitorami [31, 63]. Jak w przypadku innych β -laktamaz, poziom oporności szczepów zależy od poziomu ekspresji enzymu [63, 17]. W sensie klinicznym szczepy wytwarzające nabyte AmpC są równie groźne, jak szczepy ESBL+, jednak w sensie epidemiologicznym stanowią one mniejsze zagrożenie ze względu na znacznie mniejszą częstość występowania [31, 63].

7.3. Karbapenemazy

W ciągu ostatnich dziesięciu lat największy niepokój budzą β -laktamazy zdolne do hydrolizy karbapenemów. Karbapenemy to jedna z najnowszych generacji β -laktamów, wprowadzona do leczenia w połowie lat 1980, o najszerszym zakresie działania spośród wszystkich antybiotyków, dobrych parametrach farma-

kologicznych i – co szczególnie ważne – niehydrolizowana przez ESBL i AmpC. Szybkie rozprzestrzenianie się szczepów wytwarzających ESBL spowodowało, że karbapenemy stały się lekami „ostatniej szansy” w leczeniu ciężkich zakażeń wywołanych przez pałeczki Gram-ujemne, zwłaszcza na oddziałach intensywnej terapii [43]. Nieuzasadnione ich stosowanie przyniosło negatywne skutki w postaci selekcji szczepów opornych, najpierw dzięki mechanizmom ograniczającym transport leków, a od 1988 r. także wytwarzaniu β -laktamaz hydrolizujących karbapenemy. Oba rodzaje oporności początkowo pojawiły się u niefermentujących pałeczek *P. aeruginosa* [39, 51, 41], ale w latach 1990. zaczęto obserwować także szczepy *Enterobacteriaceae* z nabytymi karbapenemazami klasy B, tzw. MBL [44, 58, 42]. W latach 2000. lawinowy wzrost izolacji szczepów wytwarzających karbapenemazy w niektórych regionach świata, coraz częstsze przypadki przenoszenia wraz z pacjentami do innych krajów, wreszcie pojawianie się coraz to nowych typów tych enzymów spowodowało, że jest to obecnie najważniejszy temat w dziedzinie lekooporności drobnoustrojów. Narastanie wielooporności drobnoustrojów wytwarzających karbapenemazy prowokuje do stawiania pytań o przyszłość terapii zakażeń [14, 40]. Karbapenemazy to enzymy o szerokich, a nawet możliwie najszerszych spektrach substratowych, przez co ta często używana nazwa w pewnym sensie jest myląca; oddaje ona jednak to, co w ich aktywności jest najważniejsze [8, 19, 40, 53, 55–57, 68, 72, 80]. Zdumiewająca jest różnorodność strukturalno-ewolucyjna karbapenemaz, obejmująca wszystkie cztery klasy strukturalne β -laktamaz, przede wszystkim jednak klasy A, B i D.

7.3.1. Karbapenemazy klasy A

Najważniejsze karbapenemazy klasy A (podgrupa 2f) to enzymy z rodziny KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*), izolowane od 1996 r. w USA. Pochodzenie ewolucyjne tych β -laktamaz nie jest znane, natomiast, zgodnie z nazwą, najczęściej obserwuje się je w szczepach *K. pneumoniae*, choć do chwili obecnej zidentyfikowano je również w wielu innych gatunkach *Enterobacteriaceae*, a nawet *Pseudomonas* spp. i innych pałeczkach niefermentujących. Enzymy z tej rodziny, których dzisiaj znamy już 12, posiadają najszersze spektrum substratowe ze wszystkich β -laktamaz: hydrolizują one wszystkie stosowane klinicznie β -laktamy, choć nie zawsze z taką samą wydajnością (najaktywniejsze są względem penicylin i cefalosporyn I generacji) [11, 55, 57, 72]. Duże znaczenie dla wysokiej oporności szczepów ma obecność dodatkowych mechanizmów (defekty poryn, wytwarzanie dodatkowo ESBL), co jest zjawiskiem równie częstym, jak oporność na inne grupy leków (wielooporność) [16, 34]. Geny bla_{KPC} lokują się

w obrębie transpozonu Tn4401 z grupy Tn3 [54], a wraz z nim na plazmidach różnych typów (np. IncFII_K). Wiele z tych plazmidów ma zdolność do koniugacji, jednak jej wydajność jest stosunkowo niewielka [3, 16, 38]. Drobnoustroje KPC⁺ swój „sukces” epidemiologiczny zawdzięczają przede wszystkim rozprzestrzenianiu klonalnemu i związane jest to z tzw. hiperepidemicznym (o wysokim potencjale epidemicznym) klonem *K. pneumoniae* ST258, który najpierw pojawił się w USA, potem został przeniesiony do Izraela, Grecji, a wreszcie dotarł do wielu miejsc na całym niemal świecie [55, 57]. W wymienionych krajach, a także w Polsce, klon ten jest zdecydowanie dominujący [3]. Wszystkie wymienione czynniki powodują, że szczepy KPC⁺ uważa się dziś powszechnie za jedno z największych wyzwań dla zdrowia publicznego w dziedzinie zakażeń bakteryjnych, medycyny (terapia), epidemiologii (zapobieganie, eradykacja) oraz mikrobiologii (wykrywanie, interpretacja wyniku) [8, 40, 55, 57]. Niewątpliwie są one od 2008 r. największym problemem w tym zakresie w Polsce, kiedy to po raz pierwszy zidentyfikowano szczep KPC⁺ [3].

7.3.2. Karbapenemazy klasy B

Wspominane już wcześniej enzymy klasy B (grupy 3), czyli metalo- β -laktamazy (*metallo- β -lactamases*; MBL) są specyficzną grupą β -laktamaz, które nie posiadają reszty serynowej w centrum aktywnym, wymagają natomiast jonów cynku jako kofaktorów reakcji hydrolizy pierścienia β -laktamowego. Z tego powodu są hamowane przez EDTA i inne chelatory jonów dwuwartościowych, pozostają natomiast niewrażliwe na inhibitory β -laktamowe. Są to najbardziej wyspecjalizowane i najaktywniejsze karbapenemazy, ponadto, jest to jedyna klasa β -laktamaz, której wszyscy przedstawiciele wykazują zdolność do hydrolizy karbapenemów. Spektrum substratowe tych enzymów obejmuje również wszystkie penicyliny i cefalosporyny, a MBL nie rozkładają tylko monobaktamów [11, 42, 68, 72, 80]. U bakterii środowiskowych odkryto wiele gatunkowo-specyficznych MBL, jednak żadna z nich nie mogła być prekursorem obserwowanych nabytych enzymów tej grupy. Pierwsze nabyte MBL pojawiły się u Gram-ujemnych pałeczek niefermentujących *P. aeruginosa* (1988 r. w Japonii) i do dzisiaj są one najczęściej wytwarzane przez ten gatunek bakterii. Od połowy lat 1990. na Dalekim Wschodzie (np. Japonii, Korei, Tajwanie, Chinach), a od 2001 r. w Europie obserwuje się też szczepy *Enterobacteriaceae* MBL⁺. Najważniejszymi rodzinami nabytych MBL są enzymy IMP i VIM, występujące zarówno u pałeczek niefermentujących, jak i jelitowych. Geny bla_{IMP} i bla_{VIM} istnieją zawsze w postaci kaset włączonych w obręb integronów, głównie klasy 1. Integrony te mogą być z kolei zlokalizowane w transpozonach (np. Tn21) i wraz z nimi przenosić się między cząsteczkami DNA [68, 72, 80].

W Europie problem *Enterobacteriaceae* MBL+ szybko przybrał zatrważające rozmiary w Grecji, gdzie w ciągu pięciu lat szczepy *K. pneumoniae* wytwarzające enzym VIM-1 stanowiły ok. 50% populacji tego gatunku w środowiskach oddziałów intensywnej terapii [79]. U podłoża tego procesu było rozprzestrzenianie się kilku klonów *K. pneumoniae*, ale też intensywny transfer plazmidów (typu IncN) [23, 52]. Sytuacja ta uwiarydlała, jak wielkie zagrożenie niesie narastanie lekooporności bakterii chorobotwórczych, w przypadku gdy nie zostaną podjęte energiczne działania zapobiegawcze na poziomach lokalnym i państwowym. Drobnoustroje wytwarzające MBL z rodziny VIM pojawiły się później w Hiszpanii i innych krajach Europy, niekiedy w wyniku przeniesienia pacjenta ze szpitala w Grecji [27].

W 2010 r. wielki rozgłos zyskała sprawa identyfikacji nowego rodzaju MBL – enzymu NDM-1, wykrytego w wieloopornym szczepie *K. pneumoniae* w Szwecji u pacjenta, który wcześniej hospitalizowany był w Indiach. W ślad za pierwszym doniesieniem pojawiły się kolejne prace ukazujące niezwykle rozprzestrzenienie szczepów NDM-1+ różnych gatunków *Enterobacteriaceae* w Indiach, Pakistanie i Bangladeszu (także w środowisku pozaszpitalnym) oraz wskazujących wymienione kraje jako źródło tych szczepów przeniesionych do Wielkiej Brytanii i szeregu różnych państw europejskich, USA, Australii, krajów Zatoki Perskiej i Afryki [37, 56, 82]. Szczepy NDM+ są z reguły wysoce odporne i – tak jak KPC+ – wielooporne [56]. Geny bla_{NDM} tworzące operon wraz z genem oporności na bleomycynę (ble_{MBL}), położone są obok elementu IS*Aba125*, który prawdopodobnie odpowiedzialny był za ich mobilizację z chromosomu nieznanego gatunku. Charakter sekwencji IS*Aba1* oraz kilka innych przesłanek sugerują, że niefermentująca pałeczka *A. baumannii* mogła być pierwszym gatunkiem, który nabył geny bla_{NDM} i stąd dopiero nastąpiło przeniesienie do rodziny *Enterobacteriaceae* (szczepy *A. baumannii* NDM+ są stosunkowo często izolowane w niektórych krajach). Obecność bla_{NDM} w plazmidach o wysokim potencjale koniugacyjnym (IncN, IncL/M, IncA/C, IncFII) sprawia, że transfer horyzontalny jest głównym sposobem rozprzestrzeniania się karbapenemazy NDM wśród bakterii, przy czym wielkie znaczenie ma tu również wysoka aktywność transpozycyjna elementów zawierających bla_{NDM} („epidemia transpozonu”) [64]. W ramach wspomnianego wcześniej rozgłosu medialnego, w którym *K. pneumoniae* NDM-1+ nazwano „superbakterią”, po raz pierwszy powszechniej uświadomiono sobie wymiar ekonomiczny i nawet społeczno-polityczny narastania oporności bakterii na antybiotyki w dzisiejszym świecie. Wspomniane doniesienia uderzyły bowiem w intensywnie rozwijającą się, nową gałąź gospodarki niektórych krajów, czyli rynek tanich usług medycznych [60, 81] [R o b e r t s M.: New ‘superbug’ found in UK hospitals. BBC News Health, 11 sierpnia 2010]. Warto nadmienić, że w 2011 r. pierwszy szczep *E. coli* NDM+ wyizolowano w Polsce u pacjenta przeniesionego ze szpitala w jednym z krajów środkowo-afrykańskich [M. Gniadkowski, J. Fiett, A. Baraniak, R. Izdebski, D. Żabicka, K. Filczak, W. Hryniewicz; dane niepublikowane].

7.3.3. Karbapenemazy klasy D

β -Laktamazy hydrolizujące karbapenemy klasy D (podgrupa 2df), czyli tzw. enzymy CHDL (*carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases*) spotykane są od początku lat 1980. u przedstawicieli rodzaju niefermentujących pałeczek *Acinetobacter* i u tych drobnoustrojów stanowią główne źródło oporności na karbapenemy [66]. W 2001 r. pojawił się w Turcji ich nowy rodzaj, OXA-48, związany wyłącznie z *Enterobacteriaceae*, zwłaszcza *K. pneumoniae*, ale też *E. coli*, *E. cloacae* i innymi gatunkami [57]. CHDL mają stosunkowo słabą aktywność wobec karbapenemów, a poza nimi hydrolizują jeszcze tylko penicyliny i cefalosporyny I generacji [11, 66]. Niemniej, wysoka ekspresja i częsta obecność licznych innych mechanizmów oporności (w tym wytwarzanie ESBL) powoduje, że szczepy OXA-48+ są, podobnie do KPC+ i MBL+, wysoce odporne na wszystkie β -laktamy i wiele innych grup leków [13]. Gen bla_{OXA-48} leży w transpozonie Tn1999, utworzonym przez dwie sekwencje IS1999, ale blisko z nim spokrewniony gen $bla_{OXA-181}$ jest położony w bezpośrednim pobliżu IS*Ecp1* [13, 70]. Koniugacyjny transfer specyficznej grupy plazmidów uważany jest za główny mechanizm rozprzestrzeniania się OXA-48 w populacjach *Enterobacteriaceae* [13]. Szczepy z β -laktamazami typu OXA-48 są kolejnym przykładem szybkiego przenikania do Europy niebezpiecznych drobnoustrojów z regionów endemicznych, którymi są w tym przypadku głównie kraje wschodniej i południowej części basenu Morza Śródziemnego. Szczepy OXA-48+ z Turcji i północnej Afryki (Egipt, Maroko) napływają do Europy i wywołują epidemie szpitalne we Francji, Holandii, Niemczech, Hiszpanii i innych krajach. Ostatnio również stwierdzono pojawienie się szczepów *Enterobacteriaceae* wytwarzających bardzo podobne enzymy: OXA-181 w Indiach i OXA-204 w Tunezji [27, 56, 69].

8. Podsumowanie

Problematyka oporności bakterii chorobotwórczych na antybiotyki stała się jednym z najbardziej palących wyzwań dla medycyny zakażeń i zdrowia publicznego w ostatnich dekadach. Szacuje się, że krajach Unii Europejskiej lekooporność drobnoustrojów jest przyczyną śmierci ok. 25 000 osób rocznie, ponadto, zwiększa ona też znacznie koszty opieki zdrowotnej i koszty społeczne

[73]. Wytwarzanie β -laktamaz hydrolizujących antybiotyki β -laktamowe nowych generacji niewątpliwie należy obecnie do najgroźniejszych mechanizmów oporności bakterii na leki. Głównym problemem jest pojawianie się i rozprzestrzenianie szczepów pałeczek Gram-ujemnych, zarówno jelitowych z rodziny *Enterobacteriaceae* jak i niefermentujących, wytwarzających enzymy nabyte, takie jak ESBL, AmpC i karbapenemazy. Szczepy te wykazują oporność także na leki nie β -laktamowe. Europejskie Centrum Kontroli Chorób, ECDC (*European Centre for Disease Control*), wyróżnia wśród nich szczepy wielooporne, czyli niewrażliwe na co najmniej trzy grupy leków (*multi-drug resistant*, MDR), szczepy o rozszerzonej wielooporności (*extensively drug-resistant*, XDR) oraz szczepy całkowicie odporne (*pandrug-resistant*, PDR) [46]. Zaliczane one są do tzw. „patogenów alarmowych”, których pojawienie się powinno prowadzić do wdrażania zaostrzonych procedur kontroli zakażeń. Niezwykle ważna jest ich niezwłoczna i wiarygodna identyfikacja w laboratoriach mikrobiologicznych. Znaczące ograniczenie lub – niekiedy – całkowity brak opcji terapeutycznych wobec tak istotnych czynników zakażeń stanowi z oczywistych względów wielkie zagrożenie dla zdrowia publicznego.

Podziękowania

Powstanie tej publikacji było możliwe dzięki częściowemu wsparciu z funduszu programu zdrowotnego Ministerstwa Zdrowia „Narodowy Program Ochrony Antybiotyków” (NPOA).

Piśmiennictwo

- Ambler R. P., Coulson A. F., Frere J. M., Ghuysen J. M., Joris B., Forsman M., Levesque R. C., Tiraby G., Waley S. G.: A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochem. J.* **276**, 269–270 (1991)
- Ambler R. P.: The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*, **289**, 321–331 (1980)
- Baraniak A., Grabowska A., Izdebski R., Fiett J., Herda M., Bojarska K., Zabicka D., Kania-Pudlo M., Mlynarczyk G., Zak-Pulawska Z., Hryniewicz W., Gniadkowski M., the KPC-PL Study Group: Molecular characteristics of KPC-producing *Enterobacteriaceae* at the early stage of their dissemination in Poland, 2008–2009. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 5493–5499 (2011)
- Barlow M., Hall B.G.: Origin and evolution of the AmpC β -lactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1190–1198 (2002)
- Bellais S., Poirel L., Fortineau N., Decousser, J.W., Nordmann P.: Biochemical-genetic characterization of the chromosomally encoded extended-spectrum class A β -lactamase from *Rahmella aquatilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2965–2968 (2001)
- Bellais S., Poirel L., Naas T., Girlich D., Nordmann P.: Genetic-biochemical analysis and distribution of the Ambler class A β -lactamase CME-2, responsible for extended-spectrum cephalosporin resistance in *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1–9 (2000)
- Brun-Buisson C., Legrand P., Philippon A., Montravers F., Ansquer M., Duval J.: Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet*, **2**, 302–306 (1987)
- Bush K.: Alarming β -lactamase-mediated resistance in multi-drug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 558–564 (2010)
- Bush K., Fisher J.F.: Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 455–478 (2011)
- Bush K., Jacoby G.A., Medeiros A.A.: A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1211–1233 (1995)
- Bush K., Jacoby G.A.: Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 969–976 (2010)
- Canton R., Novais A., Valverde A., Machado E., Peixe L., Baquero F., Coque T.M.: Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **14** (Suppl. 1), 144–153 (2008)
- Carrère A., Poirel L., Yilmaz M., Akan O.A., Feriha C., Cuzon G., Matar G., Honderlick P., Nordmann P.: Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 1369–1373 (2010)
- Cohen M. L.: Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science*, **257**, 1050–1055 (1992)
- Coque T. M., Novais A., Carattoli A., Poirel L., Pitout J., Peixe L., Baquero F., Canton R., Nordmann P.: Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 195–200 (2008)
- Cuzon G., Naas T., Truong H., Villegas M.V., Wisell K., Carmeli Y., Gales A.C., Navon-Venezia S., Quinn J.P., Nordmann P.: Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces β -lactamase bla_{KPC-2} gene. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 1349–1356 (2010)
- D'Andrea M. M., Literacka E., Zioga A., Giani T., Baraniak A., Fiett J., Sadowy E., Tassios P. T., Rossolini G. M., Gniadkowski M., Miriagou V.: Evolution of a multi-drug-resistant *Proteus mirabilis* clone with chromosomal AmpC-type cephalosporinases spreading in Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 2735–2742 (2011)
- Decousser J.W., Poirel L., Nordmann P.: Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A β -lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3595–3598 (2001)
- Deshpande P., Shetty A., Kapadia F., Hedge A., Soman R., Rodrigues C.: New Delhi metallo 1: have carbapenems met their doom? *Clin. Infect. Dis.* **51**, 1222 (2010)
- Drieux L., Brossier F., Sougakoff W., Jarlier V.: Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clin. Microbiol. Infect.* **14** (Suppl. 1), 90–103 (2008)
- Empel, J., Baraniak A., Literacka E., Mrówka A., Fiett J., Sadowy E., Hryniewicz W., Gniadkowski M.: Molecular survey of β -lactamases conferring resistance to newer β -lactams in *Enterobacteriaceae* isolates from Polish hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2449–2454 (2008)
- Fournier B., Roy P.H.: Variability of chromosomally encoded β -lactamases from *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1641–1648 (1997)
- Giakkoupi P., Xanthaki A., Kanelopoulou M., Vlahaki A., Miriagou V., Kontou S., Papafragas E., Malamou-Lada H., Tzouveleki L.S., Legakis N.J., Vatopoulos A.C.: VIM-1 Metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 3893–3896 (2003)
- Gniadkowski M.: Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**, 597–608 (2001)

25. Gniadkowski M.: Evolution of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) by mutation. *Clin. Microbiol. Infect.* **14** (Suppl. 1), 11–32 (2008)
26. Granier S.A., Leflon-Guibout V., Goldstein F.W., Nicolas-Chanoine M.H.: New *Klebsiella oxytoca* β -lactamase genes bla(OXY-3) and bla(OXY-4) and a third genetic group of *K. oxytoca* based on bla(OXY-3). *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2922–2928 (2003)
27. Grundmann H., Carmeli Y. i wsp.: Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro. Surveill.* **15**, 19711 (2010)
28. Hernández J.R., Martínez-Martínez L., Cantón R., Coque T.M., Pascual A., the Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH): Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2122–2125 (2005)
29. Hopkins K.L., Liebana E., Villa L., Batchelor M., Threlfall E.J., Carattoli A.: Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY β -lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3203–3206 (2006)
30. Humeniuk C., Arlet G., Gautier V., Grimont P., Labia R., Philippon A.: β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3045–3049 (2002)
31. Jacoby G.A.: AmpC β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 161–182 (2009)
32. Jacoby G.A., Bush K.: β -Lactam Resistance in the 21st Century (w) Frontiers in Antimicrobials Resistance. red. D.G White, M.N. Alekshun, P.F. Mcdermott, S.B. Levy, ASM Press, USA, 2005, 53–65
33. Jacoby G.A., Griffin C.M., Hooper D.C.: *Citrobacter* spp. as a source of qnrB alleles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4979–4984 (2011)
34. Kitchel B., Rasheed J.K., Endimiani A., Hujer A.M., Anderson K.F., Bonomo R.A., Patel J.B.: Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4201–4207 (2010)
35. Kliebe C., Nies B.A., Meyer J.F., Tolxdorff-Neutzling R.M., Wiedemann B.: Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**, 302–307 (1985)
36. Knothe H., Shah P., Krcmery V., Antal M., Mitsuhashi S.: Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, **11**, 315–317 (1983)
37. Kumarasamy K.K., Woodford N.I. i wsp.: Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infect. Dis.* **10**, 597–602 (2010)
38. Leavitt A., Chmelnitsky I., Carmeli Y., Navon-Venezia S.: Complete nucleotide sequence of KPC-3-encoding plasmid pKpQIL in the epidemic *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4493–4496 (2010)
39. Livermore D.M.: Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**, 557–584 (1995)
40. Livermore D.M.: Has the era of untreatable infections arrived? *J. Antimicrob. Chemother.* **64** (Suppl. 1), 29–36 (2009)
41. Livermore D.M.: Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**, 247–250 (2001)
42. Livermore D.M.: The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **3**, 218–224 (2002)
43. Livermore D.M., Williams J.D.: β -Lactams: Mode of Action and Mechanism of Bacterial Resistance (w) Antibiotics in Laboratory Medicine, wyd. 4, red. V. Lorian, Williams & Wilkins, USA, 2000, s. 502
44. Livermore D.M., Woodford N.: The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* **14**, 413–420 (2006)
45. Luzzaro F., Mezzatesta M., Mugnaioli C., Perilli M., Stefani S., Amicosante G., Rossolini G.M., Toniolo A.: Trends in production of extended-spectrum β -lactamases among enterobacteria of medical interest: report of the second Italian nationwide survey. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1659–1664 (2006)
46. Magiorakos A.P., Monnet D.L. i wsp.: Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international export proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, 268–281 (2012)
47. Marcade G., Deschamps C., Boyd A., Gautier V., Picard B., Branger C., Denamur E., Arlet G.: Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**, 67–71 (2009)
48. Martínez-Martínez L.: Extended-spectrum β -lactamases and the permeability barrier. *Clin. Microbiol. Infect.* **14** (Suppl. 1), 82–89 (2008)
49. Massova I., Mobashery S.: Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1–17 (1998)
50. Matsumoto Y., Inoue M.: Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 307–313 (1999)
51. Medeiros A.A.: Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* **24** (Suppl. 1), 19–45 (1997)
52. Miriagou V., Papagiannitsis C.C., Kotsakis S.D., Loli A., Tzelepi E., Legakis N.J., Tzouveleki L.S.: Sequence of pNL194, a 79.3-kilobase IncN plasmid carrying the bla_{VIM-1} metallo- β -lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4497–4500 (2010)
53. Moellering R.C. Jr.: NDM-1 – a cause for worldwide concern. *N. Engl. J. Med.* **363**, 25 (2010)
54. Naas T., Cuzon G., Villegas M.V., Lartigue M.F., Quinn J.P., Nordmann P.: Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla_{KPC} gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1257–1263 (2008)
55. Nordmann P., Cuzon G., Naas T.: The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect. Dis.* **9**, 228–236 (2009)
56. Nordmann P., Poirel L., Toleman M.A., Walsh T.R.: Does broad-spectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 689–692 (2011)
57. Nordmann P., Naas T., Poirel L.: Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 1791–1798 (2011)
58. Nordmann P.: Trends in β -lactam resistance among *Enterobacteriaceae*. *Clin. Infect. Dis.* **27** (Suppl. 1), 100–106 (1998)
59. Novais A., Canton R., Moreira R., Peixe L., Baquero F., Coque T.M.: Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 796–799 (2007)
60. Palmer R.: A disease – or gene – by any other name would cause a stink. *Nature Medicine*, **16**, 1059 (2010)
61. Paterson D.L., Bonomo R.A.: Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 657–686 (2005)
62. Paterson D.L., Ko W.C., Von Gottberg A., Casellas J.M., Mulazimoglu L., Klugman K.P., Bonomo R.A., Rice L.B.,

- McCormack J.G., Yu V.L.: Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2206–2212 (2001)
63. Philippon A., Arlet G., Jacoby G.A.: Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1–11 (2002)
64. Poirel L., Dortet L., Bernabeu S., Nordmann P.: Genetic features of *bla*_{NDM-1}-positive *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 5403–5407 (2011)
65. Poirel L., Kampfer P., Nordmann P.: Chromosome-encoded Ambler class A β -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 4038–4040 (2002)
66. Poirel L., Naas T., Nordmann P.: Diversity, epidemiology and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 24–38. (2010)
67. Poirel L., Naas T., Nordmann P.: Genetic support of extended-spectrum β -lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.* **14** (Suppl. 1), 75–81 (2008)
68. Poirel L., Pitout J.D., Nordmann P.: Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol.* **2**, 501–512 (2007)
69. Poirel L., Potron A., Nordmann P.: OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 1597–1606 (2012)
70. Potron A., Nordmann P., Lafeuille E., Al Maskari Z., Al Rashdi F., Poirel L.: Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4896–4899 (2011)
71. Pulcini C., Bush K., Craig W.A., Frimodt-Møller N., Grayson M.L., Mouton J.W., Turnidge J., Harbarth S., Gyssens I.C., ESCMID Study Group for Antibiotic Policies: Forgotten antibiotics: an inventory in Europe, the United States, Canada, and Australia. *Clin. Infect. Dis.* **54**, 268–274 (2012)
72. Qenan A.M, Bush K.: Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 440–458 (2007)
73. Rezolucja Parlamentu Europejskiego z dn. 27 października 2011 r. w sprawie zagrożenia zdrowia publicznego w wyniku oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (nr B7 0538/2011)
74. Rodriguez M.M., Power P., Radice M., Vay C., Famiglietti A., Galleni M., Ayala J.A., Gutkind G.: Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4895–4897 (2004)
75. Rossolini G.M., Franceschini N., Lauretti L., Caravelli B., Riccio M.L., Galleni M., Frere J.M., Amicosante G.: Cloning of a *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* chromosomal gene (*blaA(CME)*) encoding an extended-spectrum class A β -lactamase related to the *Bacteroides cephalosporinases* and the VEB-1 and PER β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2193–2199 (1999)
76. Rozenberg-Arska M., Visser M.R.: *Enterobacteriaceae* (w) Infectious diseases, Wyd. 2, red. J. Cohen, W.G. Powderly i wsp., Mosby, USA, 2004, s. 2189
77. Sanders C.C., Thomson K.S., Bradford P.A.: Problems with detection of β -lactam resistance among nonfastidious gram-negative bacilli. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **7**, 411–424 (1993)
78. Schmitz F.J., Fluit A.C.: Mechanizms of antibacterial resistance (w) Infectious diseases, Wyd. 2, red. J. Cohen, W.G. Powderly i wsp., Mosby, USA, 2004, s. 1733
79. Vatopoulos A.: High rates of metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece – a review of the current evidence. *Euro. Surveill.* **13**, 8023 (2008)
80. Walsh T.R., Toleman M.A., Poirel L., Nordmann P.: Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 306–325 (2005)
81. Walsh T.R., Toleman M.A.: The emergence of pan-resistant Gram-negative pathogens merits a rapid global political response. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 1–3 (2012)
82. Walsh T.R., Weeks J., Livermore D.M., Toleman M.A.: Dissemination of NDM-1-positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect. Dis.* **11**, 355–362 (2011)