

**Tomasz Wołkowicz¹, Marcin Kadłubowski^{2*}
Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka¹, Waleria Hryniewicz^{2,3}**

¹ Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

² Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków
ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa, tel. 0-22 851 46 70, email: kadlubek@cls.edu.pl

³ Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa

Wpłynęło w kwietniu 2008 r.

1. Charakterystyka *Haemophilus influenzae*. 2. Antybiotyko-terapia zakażeń wywołanych przez *H. influenzae*. 3. Mechanizmy warunkujące oporność na antybiotyki β -laktamowe. 3.1. Wytwarzanie β -laktamaz. 3.2. Zmiany w białkach PBP i fenotyp BLNAR. 3.3. Inne mechanizmy warunkujące oporność na antybiotyki β -laktamowe. 4. Wielolekooporność. 5. Podsumowanie

Mechanisms of resistance of *Haemophilus influenzae* to β -lactam antibiotics

Abstract: *Haemophilus influenzae* is an important respiratory tract pathogen, which can cause numerous invasive and non-invasive infections. The major group of chemotherapeutics used in the treatment of infections caused by this species are β -lactam antibiotics, especially aminopenicillins and cephalosporines. The most common mechanism of resistance to these agents is the production of β -lactamase – an enzyme, which inactivates these antibiotics. In clinical strains of *H. influenzae*, TEM and ROB β -lactamases have been identified. Other mechanisms of resistance to β -lactams are mutations in the *ftsI* gene, which encodes penicillin-binding proteins – PBP3A and PBP3B. These mutations cause alterations in PBP3A and PBP3B and decrease their affinity to β -lactam antibiotics. Strains showing resistance to β -lactams through this mechanism are called Beta-Lactamase Negative (or Non-producing), Ampicillin Resistant (BLNAR). This phenotype is difficult to detect by standard microbiological methods. In Poland, the number of clinical respiratory *H. influenzae* isolates with BLNAR phenotype is rising. BLNAR phenotype can promote other mechanisms of antimicrobial resistance, such as efflux pumps or production of extended spectrum β -lactamases (ESBL), which do not play an important role, when existing in *H. influenzae* on their own.

1. Characteristics of *Haemophilus influenzae*. 2. Antibiotic therapy of infections caused by *H. influenzae*. 3. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. 3.1. β -lactamase production. 3.2. Alterations in PBP and BLNAR phenotype. 3.3. Other mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. 4. Multidrug resistance. 5. Summary

Słowa kluczowe: Antybiotyki, β -laktamy, BLNAR, *Haemophilus influenzae*, lekooporność

Key words: Antibiotics, β -lactams, BLNAR, *Haemophilus influenzae*, antimicrobial resistance

1. Charakterystyka *Haemophilus influenzae*

Rodzaj *Haemophilus* (z gr. „lubiący krew”) obejmuje piętnaście gatunków (oraz dwa dodatkowe nazywane hemofilusopodobnymi) [26], z których część stanowi ludzką fizjologiczną florę bakteryjną zasiedlającą głównie błony śluzowe górnych dróg oddechowych. Najistotniejszym klinicznie gatunkiem tego rodzaju jest *H. influenzae* (pałeczka hemofilna).

Po raz pierwszy bakterię tę wyizolował R i c h a r d P f e i f f e r z płwociny chorych na grypę w 1892 roku i nazwał ją *Bacillus influenzae* [43]. Mylną nazwę gatunkową mikroorganizm ten zawdzięcza temu, iż był on uznawany za czynnik etiologiczny tej groźnej choroby. W 1918 roku zmieniono nazwę na *H. influenzae*. W Polsce jeszcze w 1927 roku używano nazwy prątki Pfeiffera albo *Bacillus influenzae Pfeiffer* [47].

Komórki tego gatunku są małymi, Gram-ujemnymi, nieruchliwymi, pleomorficznymi ziarniako-pałeczkami lub

pałeczkami. Bakterie te mają duże wymagania wzrostowe. Do wzrostu wymagają heminy lub hematyny (czynnik X) oraz NAD⁺ lub NADP⁺ (czynnik V).

W obrębie gatunku *H. influenzae* wyróżnia się szczepy wytwarzające otoczkę oraz szczepy bezotoczkowe (nietypowalne, NTHi, ang. Non-Typeable *Haemophilus influenzae*). Ze względu na budowę otoczki wyróżnia się 6 typów serologicznych oznaczonych kolejnymi literami alfabetu od a do f. Istnieje również inny podział przyjmujący jako kryterium właściwości biochemiczne drobnoustroju (wytwarzanie indolu, wytwarzanie ureazy czy dekarboksylazy ornitynowej) i rozróżniający 8 biowarów (biotypów) oznaczanych cyframi rzymskimi od I–VIII [18, 27, 44, 54].

Bakterie z gatunku *H. influenzae* mogą wywoływać zakażenia zlokalizowane, nieinwazyjne lub inwazyjne. Zakażenia nieinwazyjne występują zazwyczaj w obrębie układu oddechowego i zazwyczaj są wywołane przez szczepy bezotoczkowe. Do najważniejszych

* Autor korespondencyjny: Marcin Kadłubowski, Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej Narodowy Instytut Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa, email: kadlubek@cls.edu.pl

postaci zakażeń o etiologii NTHi zalicza się zapalenie płuc, zapalenie ucha środkowego, zaostrzenia przewlekłego zapalenia oskrzeli oraz zapalenie zatok. Pałeczki hemofilne mogą też odpowiadać za zakażenia okołoporodowe.

Najczęstsze zakażenia inwazyjne są wywołane przez serotyp b pałeczek hemofilnych i są to zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (ZOMR), zapalenie nóg, posocznica, zapalenie stawów i kości, zapalenie tkanki podskórnej, zapalenie osierdza, zapalenie szpiku kostnego czy zapalenie płuc przebiegające z bakterie-mią. Zakażenia wywołane przez *H. influenzae* serotypu b (Hib) stanowią zdecydowaną większość (około 95%) chorób inwazyjnych powodowanych przez szczepy tego gatunku u dzieci pomiędzy 2 miesiącem a 5 rokiem życia w krajach, w których nie wprowadzono powszechnych szczepień przeciwko temu drobnoustrojowi.

2. Antybiotykoterapia zakażeń wywołanych przez *H. influenzae*

W leczeniu zakażeń wywołanych przez *H. influenzae* kluczową rolę odgrywają antybiotyki β -laktamowe. Z grupy penicylin, w leczeniu chorób o etiologii *H. influenzae* ważne miejsce zajmują aminopenicyliny takie, jak ampicylina czy amoksyacylina. Aktywne wobec bakterii są też ureidopenicyliny np. piperacylina. Wszystkie te antybiotyki są podatne na rozkład enzymatyczny i nie są skuteczne w leczeniu zakażeń wywołanych przez szczepy wytwarzające β -laktamazy.

Inną, istotną klinicznie grupą są cefalosporyny, przede wszystkim należące do III (np. ceftriakson czy cefotaksym) i IV generacji (np. cefepim). Antybiotyki z tych grup cechuje poszerzony zakres działania oraz oporność na działanie wielu β -laktamaz (nie obejmuje to oporności na β -laktamazy o poszerzonym spektrum substratowym – ESBL (ang. Extended Spectrum Beta-Lactamases). W zakażeniach górnych dróg oddechowych powszechnie stosowane są też cefalosporyny II generacji takie, jak cefuroksym, cefaklor czy cefprozil.

Spośród pozostałych grup antybiotyków β -laktamowych, rzadziej stosowane w leczeniu zakażeń wywołanych przez *H. influenzae* są karbapenemy (np. imipenem czy meropenem) oraz monobaktamy (aztreonam).

Istotne miejsce w leczeniu zakażeń bakteryjnych zajmują preparaty penicylin z inhibitorami β -laktamaz takimi, jak kwas klawulanowy. Blokują one enzymy rozkładające antybiotyki (β -laktamazy) unieczyniając bakteryjny mechanizm oporności. W leczeniu *H. influenzae* stosowane są preparaty takie, jak amoksyacylina z kwasem klawulanowym, ampicylina z sulbaktamem lub piperacylina z tazobaktamem.

Mechanizm działania antybiotyków β -laktamowych polega na oddziaływaniu z białkami wiążącymi penicy-

linę PBP (ang. Penicillin Binding Proteins), które odgrywają kluczową rolę w III etapie syntezy mureiny. Katalizują one reakcję polimeryzacji łańcucha cukrowego ściany komórkowej oraz wytwarzanie wiązań poprzecznych między aminokwasami sąsiednich łańcuchów glikopeptydu w ścianie komórkowej bakterii. Zależnie od rodzaju białka, różne jest ich powinowactwo do antybiotyków β -laktamowych.

Antybiotyki β -laktamowe, na zasadzie podobieństwa substratowego, blokują jedno lub więcej białek PBP. Prowadzi to do zahamowania syntezy ściany komórkowej i śmierci komórki bakteryjnej. Zablockowanie tylko jednego z białek PBP może prowadzić do występowania zmian w kształcie komórki; występowania komórek okrągłych, lub też komórek rosnących w postaci długich filamentów.

W komórkach *H. influenzae* funkcjonuje 8 różnych białek PBP [20]. Początkowo były one oznaczone numerami PBP1-8 [31, 38]. Później przyjęto numerację PBP1A, 1B, 2, 3A, 3B, 4, 5 i 6 [46].

Antybiotyki β -laktamowe u bakterii Gram-ujemnych pokonują barierę błony zewnętrznej poprzez kanały porynowe [28]. W komórkach *H. influenzae* rolę w ich transporcie odgrywa poryna – białko OMP-P2 [35], bardzo dobrze przepuszczająca małe cząsteczki β -laktamów. Efektem tego są bardzo niskie wartości MIC (najmniejsze stężenie hamujące, Minimal Inhibitory Concentration) antybiotyków β -laktamowych u wrażliwych szczepów tego gatunku.

W ZOMR o etiologii *H. influenzae* lekami pierwszego wyboru są cefalosporyny III generacji takie, jak cefotaksym i ceftriakson. Leki te dobrze penetrują do płynu mózgowo-rdzeniowego, są skuteczne w leczeniu, a dotychczas u pałeczek hemofilnych nie identyfikowano na nie oporności. Przez wiele lat z powodzeniem była stosowana ampicylina, jednak aktualnie liczba szczepów *H. influenzae* opornych na ten lek w niektórych krajach jest już bardzo wysoka. Chloramfenikol, ze względu na jego poważne działania uboczne, jest obecnie rzadko stosowany w krajach rozwiniętych, ale wrażliwość Hib jest na lek powszechna. Zastosowanie chloramfenikolu może być uzasadnione wyłącznie brakiem innej opcji terapeutycznej (ze względu na oporność szczepu lub poważne uczulenie pacjenta na antybiotyki β -laktamowe grożące wystąpieniem wstrząsu anafilaktycznego po ich podaniu). W krajach rozwijających się, ze względu na niską cenę, chloramfenikol jest nadal często stosowanym chemioterapeutycznym.

W innych zakażeniach o etiologii *H. influenzae*, głównie w zakażeniach układu oddechowego często stosuje się amoksyacylinę, amoksyacylinę z klawulanianem, cefalosporyny II generacji, tetracykliny, nowsze makrolidy takie, jak klarytromycynę czy azytromycynę oraz fluorochinolony.

3. Mechanizmy warunkujące oporność na antybiotyki β -laktamowe

3.1. Wytwarzanie β -laktamaz

β -laktamazy TEM: *H. influenzae* wytwarza dwa rodzaje enzymów należących do rodziny TEM β -laktamaz: TEM-1 oraz TEM-2 [35, 50], różniące się nieznacznie punktem izoelektrycznym. Geny kodujące te enzymy różnią się pojedynczą substytucją cytozyny na adeninę w pozycji 4094 [50] (numeracja według sekwencji Sutcliffe transpozonu Tn3 [56]), w wyniku czego znika miejsce cięcia rozpoznawane przez enzym restrykcyjny *MboI* (\downarrow GATC). Na poziomie sekwencji aminokwasowej dochodzi do zamiany glicyny w pozycji 37 (kodon CAG) na lizynę (AAG). Obydwa te enzymy mają podobny zakres działania, jednak TEM-1 wykazuje nieznacznie niższą aktywność względem niektórych antybiotyków β -laktamowych [21], co może być spowodowane różnicami w sile promotorów obu genów. Ekspresja genu kodującego enzym TEM-2 jest regulowana przez promotory Pa/Pb o wysokim powinowactwie do RNAP (polimerazy RNA) [7, 8, 64]. Oba enzymy należą, według klasyfikacji Bush, do klasy 2b i zaliczane są to tzw. β -laktamaz o szerokim spektrum substratowym (ang. broad spectrum beta-lactamases) [4].

Enzymy te są często identyfikowane u bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* i bakterii blisko spokrewnionych [7]. Gen *bla*_{TEM-1} występuje na transpozonach z rodzin transpozonów Tn2 i Tn3, natomiast *bla*_{TEM-2} zlokalizowany jest w obrębie transpozonów z rodziny Tn1 [7]. Badania sekwencji nukleotydowych tych transpozonów wskazują na przeniesienie genu *bla*_{TEM-1} z rodziny *Enterobacteriaceae* do *H. influenzae* na transpozonie Tn2 [8, 30].

U *H. influenzae* częściej występującym enzymem jest TEM-1 [41, 50]. Ekspresja genu *bla*_{TEM-1} u *H. influenzae* jest regulowana, inaczej niż u większości *Enterobacteriaceae*, przez układ silnych promotorów Pa/Pb (występujących zazwyczaj z *bla*_{TEM-2}), a nie przez regulujący ten gen promotor P3 [7, 64]. Błona zewnętrzna *H. influenzae* stanowi słabszą barierę dla antybiotyków β -laktamowych niż błona bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, tak więc gen β -laktamazy ulegający ekspresji na niskim poziomie może nie warunkować wystarczającego poziomu oporności, co może mieć wpływ na selekcję szczepów niosących gen o wyższym poziomie ekspresji. W genomach niektórych szczepów zaobserwowano także delecję 136 par zasad w rejonie promotorowym tych genów [41, 64]. Efektem tej mutacji jest wyższa ich oporność na cefaklor czy lorakarbef [41].

Dotychczas nie zaobserwowano u *H. influenzae* β -laktamaz typu ESBL, tj. rozkładających cefalospo-

ryny III generacji. Część enzymów typu ESBL, takich jak TEM-3, TEM-4, TEM-5, wywodzi się od wspomnianych enzymów TEM-1 czy TEM-2. β -laktamazy typu ESBL są obserwowane głównie u *Enterobacteriaceae*. W ostatnim czasie opisano jednak kliniczne szczepy *H. parainfluenzae* wytwarzające taki enzym [65]. Prawdopodobnie enzymy kodowane przez geny znajdujące się zazwyczaj na transpozonach, zostaną przeniesione do bakterii *H. influenzae*, albo enzymy TEM-1 czy TEM-2, już występujące u bakterii, „zmutują” do ESBL [63]. Eksperymentalne przeniesienie genów kodujących enzymy typu ESBL (z *E. coli*: TEM-3, TEM-4 i TEM-5) do komórek *H. influenzae* skutkowało wzrostem poziomu oporności bakterii na cefalosporyny o poszerzonym zakresie działania, jak cefotaksym, ale oporność nie była tak wysokiego stopnia, by mogła mieć istotne znaczenie kliniczne [62, 63]. Możliwe, że niski poziom oporności, jaki nadawały enzymy typu ESBL bakteriom *H. influenzae* ogranicza ich rozprzestrzenianie. Enzymy te, jeśli występowały wraz z opornością receptorową polegającą na zmianach w białkach PBP3, nadawały komórkom wysoki poziom oporności na cefotaksym [3]. Jak dotąd takie szczepy *H. influenzae* zostały stworzone wyłącznie w warunkach laboratoryjnych. Jednakże dodatni wynik eksperymentów wskazuje na możliwość wyewoluowania podobnych szczepów ze szczepów wykazujących oporność receptorową i wytwarzających β -laktamazę TEM-1 czy TEM-2, na drodze generowania mutacji w genach kodujących β -laktamazę i poszerzających ich zakres substratowy [3]. Inną możliwością jest przeniesienie genów kodujących enzymy typu ESBL do szczepów wykazujących receptorowy mechanizm oporności na β -laktamy. Powszechne stosowanie cefalosporyny III generacji może doprowadzić do selekcji tak opornych szczepów.

β -laktamaza ROB: β -laktamaza ROB-1 została po raz pierwszy opisana u bakterii *H. influenzae*. Analiza sekwencji aminokwasowej enzymu wykazała, że jest on spokrewniony z β -laktamazami bakterii Gram-dodatnich [23]. Enzym został odnaleziony także w komórkach innego gatunku z rodzaju *Haemophilus* – *H. pleuropneumoniae*, który jest patogenem świń [37]. Możliwe więc, że gatunek *H. influenzae* jest źródłem β -laktamazy ROB-1.

W klasyfikacji Bush β -laktamaza ROB-1 należy do grupy 2b (tej samej, co wcześniej opisane enzymy TEM). W porównaniu z β -laktamazą TEM, ROB-1 cechuje wyższa aktywność wobec cefakloru, cefprozilu czy lorakarbefu [25].

Nie opisano dotychczas szczepów wytwarzających warianty β -laktamazy ROB wykazujących aktywność wobec cefalosporyny III generacji. Eksperymenty z wykorzystaniem hiperzmiennego szczepu *E. coli* wykazały jednak, iż spontaniczne mutacje w genie *bla*_{ROB-1} mogą

doprowadzić do powstania takich wariantów β -laktamazy ROB [16]. Na skutek presji antybiotykowej, szczepy wytwarzające zmutowane enzymy mogą stać się w przyszłości potencjalnym problemem klinicznym.

W przypadku *H. influenzae* wytwarzających zarówno β -laktamazy typu TEM i ROB, obserwuje się zjawisko tzw. efektu inokulum [2, 57]. Efekt ten jest określany, jako co najmniej czterokrotny wzrost wartości MIC przy zwiększeniu inokulum o jeden rząd wielkości. Nie występuje on w przypadku szczepów niewykazujących tego typu oporności mimo, iż podczas oznaczeń lekowrażliwości metodą rozcieńczeniową zmętnienie roztworu o większym inokulum, wywołane tworzeniem się agregatów martwych komórek bakteryjnych może sprawiać znaczne problemy w odczycie wyników. Efekt inokulum znieść można poprzez zastosowanie inhibitora β -laktamaz, ale w większej niż normalnie ilości (w proporcji 1:1 z antybiotykiem) [2].

Około 15% szczepów *H. influenzae* izolowanych na świecie wytwarza β -laktamazy [13]. Taki fenotyp oporności określa się skrótem BLPAR (Beta-Lactamase Positive/Producing, Ampicillin Resistant). Oporność ta jest związana z wytwarzaniem trzech różnych β -laktamaz. Najczęściej spotykanym enzymem jest β -laktamaza TEM, która jest wytwarzana w około 93% szczepów (spośród wszystkich wykazujących enzymatyczny typ oporności). Zdecydowanie rzadziej produkowana jest β -laktamaza ROB-1 (około 5%). Sporadycznie izolowane są szczepy wytwarzające β -laktamazę VAT [51]. Zazwyczaj nie spotyka się bakterii wytwarzającej więcej niż jeden typ enzymu, jednak został opisany szczep wytwarzający zarówno β -laktamazę TEM-1, jak i ROB-1 [50].

Obserwowane są istotne różnice geograficzne w występowaniu szczepów *H. influenzae* wytwarzających β -laktamazy; na Tajwanie prawie 68% szczepów wykazuje ten rodzaj oporności [13], w Ameryce Południowej częstość występowania takich szczepów jest niska, a w Peru czy Wenezueli nie identyfikowano szczepów wytwarzających β -laktamazy. Występują również duże różnice w rodzajach wytwarzanej β -laktamazy w danej populacji. β -laktamaza ROB-1, jak opisano wyżej, jest rzadko wytwarzanym enzymem. Jednak i tu obserwuje się znaczne zróżnicowanie geograficzne; w Meksyku 30% szczepów wytwarzających β -laktamazy wytwarza enzym ROB-1 [13], a w Kanadzie około 10% [50].

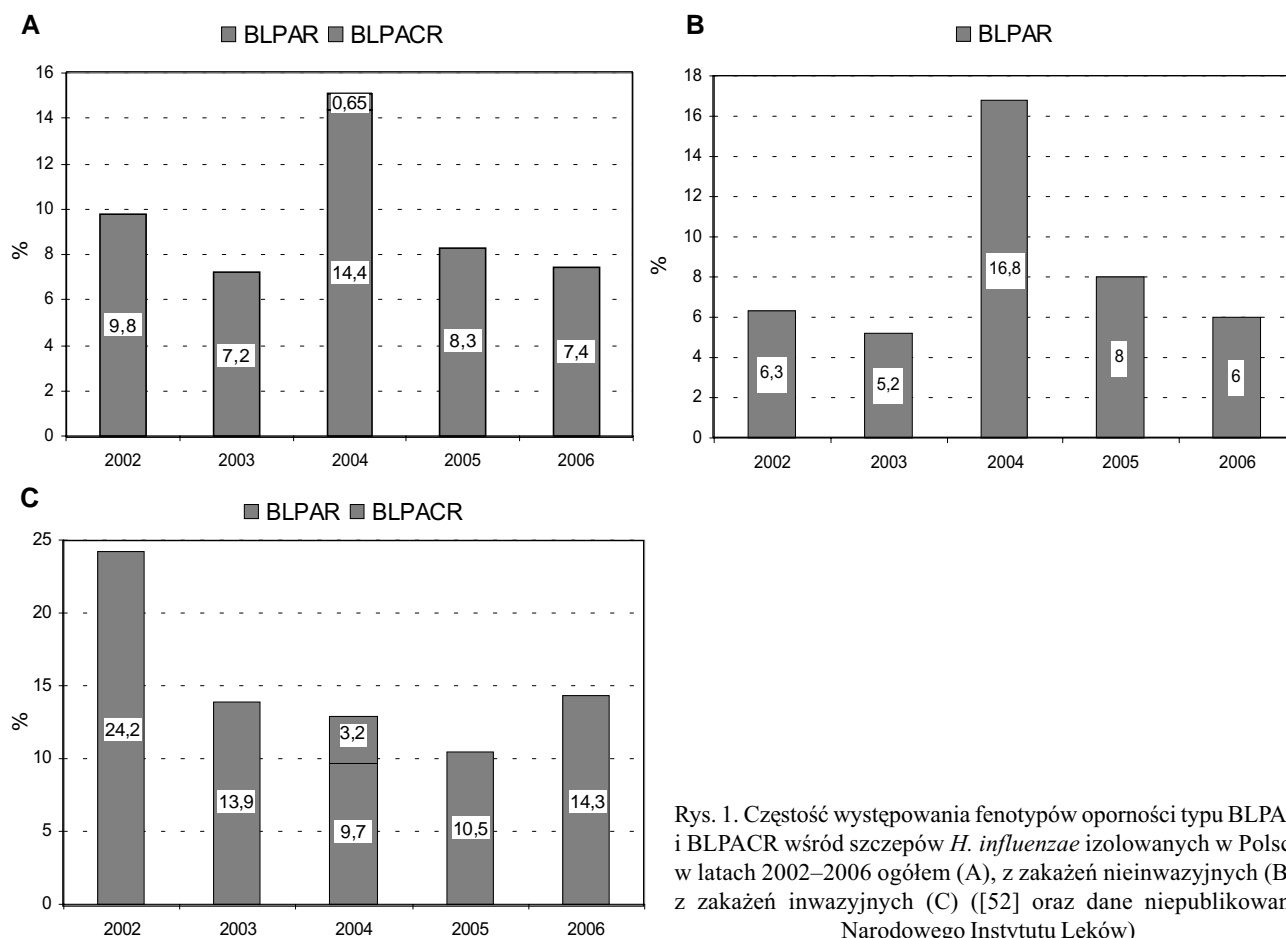
W Polsce częstość izolacji bakterii *H. influenzae* wytwarzających β -laktamazy, na przestrzeni lat 2002–2006, wahała się od 7,2 w roku 2003 do 15% w roku 2004 (Rys. 1). Spośród bakterii izolowanych z zakażeń dróg oddechowych częstość tego fenotypu oporności wahała się od 5,2% w 2003 roku do 16,8% w 2004 roku, jednakże zazwyczaj utrzymywała się na poziomie poniżej 10% [52]. Wszystkie te szczepy wytwarzały β -laktamazę TEM-1.

Laboratoryjne wykrywanie β -laktamaz: Wykrywanie β -laktamaz jest proste poprzez wykorzystanie testu z nitrocefina. Związek ten, posiadający pierścień β -laktamowy, po jego rozerwaniu przez β -laktamazę zmienia kolor z bezbarwnego na czerwony. Aktualnie stosowane są szybkie testy w postaci krążków lub paszków bibułowych nasączonych roztworem nitrocefiny, które w kilka sekund wykrywają obecność β -laktamazy w komórkach *H. influenzae*. Najprostszą metodą identyfikacji wytwarzanego enzymu jest reakcja PCR z użyciem starterów komplementarnych do nukleotydowych sekwencji genów kodujących TEM-1 i ROB-1. Rozróżnienie między genami kodującymi enzymy TEM-1 i TEM-2 można osiągnąć trawiając produkty reakcji PCR enzymem restrykcyjnym *MboI*. Innym sposobem rozróżnienia dwóch rodzajów enzymów z rodziny TEM jest określenie ich punktu izoelektrycznego.

3.2. Zmiany w białkach PBP i fenotyp BLNAR

Wzmianki o szczepach opornych na ampicylinę, ale niewytwarzających β -laktamaz pojawiły się w piśmiennictwie już w 1974 roku [60]. Pierwszy oporny na ampicylinę szczep, wyizolowany w 1977 roku w USA od chorej z ZOMR, opisany został w 1980 roku [33]. Cztery lata później *Parr* i *Bryan* [46] oraz równolegle *Mendelman* i wsp. [38] zbadali mechanizm warunkujący tego rodzaju oporność. Z danych eksperymentalnych przedstawionych przez obie grupy badaczy wynikało, że oporność nie jest związana ze zmianą przepuszczalności błony zewnętrznej ani zmianami w białkach porynowych, ale ma charakter receptorowy i wynika ze zmian w powinowactwie antybiotyku do białek PBP, a zwłaszcza do PBP3A i PBP3B. Wnioski te potwierdziły późniejsze badania nad sklonowanym genem kodującym zmienione białka PBP3 [9]. Wykazano, iż mutacje w genie kodującym białka PBP3 prowadzą do zmniejszenia powinowactwa antybiotyku do tego białka. Z czasem szczepy wykazujące ten typ oporności zaczęto nazywać BLNAR (Beta-Lactamase Negative/Nonproducing Ampicillin Resistant). Badania nad pochodzeniem bakterii o fenotypie BLNAR wykazały, że nie pochodzą one z jednego klonu, w którym białka PBP3 uległy mutacji, lecz wykazują duże zróżnicowanie i raczej wywodzą się z różnych szczepów [11, 39].

To zróżnicowanie podkreślili *Clairoux* i wsp. [9], którzy podczas badania kanadyjskich szczepów o fenotypie BLNAR, wyróżnili trzy grupy, przyjmując jako kryterium podziału poziom oporności na ampicylinę. Wartości MIC ampicyliny w poszczególnych grupach wynosiły odpowiednio: grupa I: 0,5–1,0 $\mu\text{g/ml}$; grupa II: 2,0–4,0 $\mu\text{g/ml}$; grupa III: 8,0 $\mu\text{g/ml}$. Wszystkie szczepy wykazywały oporność związaną wyłącznie ze zmianami w sekwencjach aminokwasowych białek PBP3A i 3B.



Rys. 1. Częstość występowania fenotypów oporności typu BLPAR i BLPACR wśród szczepów *H. influenzae* izolowanych w Polsce w latach 2002–2006 ogółem (A), z zakażeń nieinwazyjnych (B), z zakażeń inwazyjnych (C) ([52] oraz dane niepublikowane Narodowego Instytutu Leków)

W 2001 roku Ubukata i wsp. [66] zbadali genetyczne podłoże zmian w białkach PBP3 i PBP4, których efektem jest powstawanie szczepów o fenotypie BLNAR. Opisali oni kilka substytucji w sekwencji nukleotydowej genu *ftsI*. Gen ten koduje białka PBP3A oraz PBP3B, które, jak się podejrzewa, są syntetyzowane z wykorzystaniem tej samej informacji genetycznej, ale ulegają innym modyfikacjom posttranslacyjnym [32, 66]. Skutkiem mutacji w genie *ftsI* są pojedyncze zmiany w sekwencjach aminokwasowych występujące w pobliżu ważnych motywów białek. Analiza mutacji zaowocowała, podobnie jak we wcześniej opisanym podziale zaproponowanym przez Claïroux, wyróżnieniem przez Ubukatę trzech grup bakterii o fenotypie BLNAR.

Grupa I obejmuje szczepy posiadające w PBP3 argininę w pozycji 517 zamienioną na histydynę. W PBP3 szczepów zaliczanych do grupy II lizyna znajduje się w pozycji 526 – w miejscu normalnie występującej tam asparaginy. Obie mutacje, zarówno w grupie I, jak i II, występują w pobliżu konserwowanego motywu KTG (Lys512-Thr513-Gly514). Klasyfikację grupy II rozszerzyli później Dabernat i wsp. [11], wyszczególniając cztery podgrupy: a, b, c, d. Wszystkie one posiadają charakterystyczną dla grupy II substytucję lizyny-526 w miejsce asparaginy (taka pojedyncza

mutacja zaliczona została do podgrupy IIa), lecz oprócz tego posiadają one kilka różnych dodatkowych zmian w sekwencjach aminokwasowych takich, jak zamiana alaniny w pozycji 502 na walinę, charakterystyczną dla podgrupy IIb, lub na treoninę występującą w podgrupie IIc. Podgrupę II d charakteryzuje natomiast zamiana w PBP3 izoleucyny-449 na walinę. Bakterie z tych grup zaliczane są do fenotypu low-BLNAR, cdla których MIC ampicyliny zawiera się w zakresie od 1,0 do 4,0 $\mu\text{g/ml}$. Podobnie podwyższone są u nich wartości MIC innych pochodnych penicylin takich, jak amoksyicylina oraz dla cefalosporyn niższych generacji (I i II). Podwyższone są też wartości MIC cefalosporyn III generacji, jednak pozostają nadal niskie i mieszczą się w zakresie pełnej wrażliwości [11, 64].

Do grupy III zaliczane są szczepy BLNAR. MIC ampicyliny tych szczepów jest wyższy lub równy 4 $\mu\text{g/ml}$. Białko PBP3 tych szczepów charakteryzuje zamiana asparaginy-526 na lizynę (tak samo jak ma to miejsce w grupie II), a dodatkowo posiadają trzy substytucje w okolicach innego ważnego motywu SSN (Ser379-Ser380-Asn381). Zmutowanie genu skutkuje zamianą metioniny-377 na izoleucynę, seryny-385 na treoninę oraz leucyny-389 na fenyloalaninę w białku PBP3. Oprócz tych zmian, białko PBP3 wszystkich trzech grup bakterii o fenotypie BLNAR, charakteryzuje

dotatkowo zamiana asparaginanu-350 na asparaginę oraz seryny-357 na asparaginę. Aminokwasy te znajdują się w sąsiedztwie motywu STVK (Ser327 – Thr328 – Val329 – Lys330).

Kolejne badania dowolnie rozszerzały klasyfikację szczepów typu BLNAR, a różni autorzy, znajdując kolejne mutacje lub inne kombinacje mutacji już znanych, często tworzyli własne klasyfikacje inaczej grupujące odporne szczepy *H. influenzae* [19, 45].

Szczepy BLNAR z grupy III wykazują wyraźnie podwyższone wartości MIC cefalosporyn III generacji takich, jak cefotaksym (wartość MIC około 1,0–2,0 µg/ml) oraz ceftriakson (MIC około 0,25 µg/ml) [34, 66]. Także cefalosporyny IV generacji, takie jak cefpirom, mogą wykazywać wobec takich szczepów niższą aktywność *in vitro* [29]. Wydaje się, że za obniżoną wrażliwość bakterii grupy III na antybiotyki β-laktamowe odpowiada w głównej mierze mutacja skutkująca substytucją fenyloalaniny-389 w miejsce leucyny w PBP3 [34]. Inni badacze wskazują na istotną rolę w nadawaniu oporności na np. cefuroksym zmiany seryny w pozycji 357 na asparaginę [54]. Występowanie wielu dodatkowych mutacji punktowych w badanych genach może pogłębiać oporność na cefalosporyny, także te III i IV generacji [29].

Wszystkie omawiane motywy aminokwasowe (KTG, SSN czy STVK) występują w centrum aktywnym białek PBP3 a dokładniej w jego domenie transpeptydazy [66]. Dlatego też zmiany w ich pobliżu mogą istotnie wpływać na przestrzenną strukturę centrum aktywnego. Zmiana konformacji białka może nie być dla komórki letalna, jeśli białko nadal ma zdolność katalizowania reakcji enzymatycznej, ale może utrudniać wiązanie się „zmutowanych” białek z antybiotykami β-laktamowymi. Obserwowane zmiany w PBP3 nie pozostają jednak całkiem obojętne dla komórki, gdyż bakterie wytwarzające zmutowane białka PBP3 mają charakterystyczny wydłużony kształt, a mogą nawet tworzyć długie filamenty [9]. Analizując strukturę białka PBP3, poprzez jego porównanie z białkiem PBP2X *Streptococcus pneumoniae* [55] wykazano, że powyższe zmiany w sekwencjach aminokwasowych wpływają na zmianę struktury miejsca wiążącego antybiotyki β-laktamowe powodując, iż staje się ono dla nich niedostępne.

Rzeczywisty wpływ wykrytych mutacji w genach kodujących białko PBP3 na stopień oporności *H. influenzae* przebadał zespół O s a k i i wsp. [45] używając metody mutagenyzy specyficznej co do miejsca. Badacze ci wprowadzali do szczepów z dzikim genem *ftsI* takie mutacje punktowe, jakie obserwowane były najczęściej w genach kodujących zmienione białka. W efekcie, potwierdzona została rola większości powstających mutacji. Substytucja Asn526→Lys czy Asn526→Lys + Ser385→Thr podnosiła MIC ampicyliny 2–4 razy. Sama mutacja warunkująca zmianę Asn526→Lys pod-

nosiła MIC cefalosporyn 2–8 razy. Dodatkowe zmiany Ser385→Thr czy Leu389→Phe jeszcze zwiększały poziom oporności. Mutacja powodująca substytucję Asn526→Lys również znacząco (8 razy) zwiększała oporność bakterii na imipenem, lecz nie na meropenem. Co istotne, wykazano iż zamiana metioniny w pozycji 377 na izoleucynę nie wpływa w żadnym stopniu na oporność bakterii na antybiotyki β-laktamowe.

Ze względu na znaczne zróżnicowanie klonalne szczepów o fenotypie BLNAR [17], wielość znajdujących miejsc mutacji oraz różne ich wzajemne występowanie w genie *ftsI*, trudno jest określić kierunki ewolucyjne tych zmian. Takie badania śledzące zmiany w występowaniu mutacji w białkach PBP3 w szczepach *H. influenzae* izolowanych w Japonii na przestrzeni 9 lat przeprowadzili S a n b o n g i i wsp. [48]. Wskazują oni na wyraźny wzrost częstości występowania mutacji warunkującej powstawanie Asn526→Lys. Wzrasta także częstość występowania tej mutacji w połączeniu z mutacjami powodującymi zmiany Met377→Ile, Ser385→Thr oraz Leu389→Phe. Jednocześnie spada częstość występowania substytucji Arg517→His. Te tendencje mogą mieć jednak charakter lokalny i być związane ze specyfiką leczenia, a zwłaszcza z doborem poszczególnych antybiotyków i wielkości ich dawek stosowanych w danym kraju.

Pojawienie się szczepów opornych na antybiotyki β-laktamowe na drodze innej niż enzymatyczna mogło spowodować wyewoluowanie szczepów posiadających oba te mechanizmy. Szczepy takie po raz pierwszy zostały wyizolowane w USA na przełomie 1994 i 1995 roku [12]. Opisano od razu aż siedemnaście izolatów klinicznych charakteryzujących się prawdopodobnie obecnością mutacji w białkach PBP, jak i wytwarzanie β-laktamazy odpornej na inhibicję kwasem klawulanowym lub inne możliwe mechanizmy oporności. Późniejsze badania wykazały, że szczepy o tym fenotypie wykazują te same rodzaje mutacji w genie *ftsI*, co szczepy BLNAR [34]. Nie wykryto natomiast występowania β-laktamazy odpornej na inhibicję kwasem klawulanowym. W piśmiennictwie zwykło się je określać skrótem BLPACR (Beta-Lactamase Positive/Producing, Amoxicillin-Clavulanate Resistant) [12].

Ze względu na wspomnianą wyżej różnorodność zarówno szczepów o fenotypie BLNAR, jak i BLPACR, trudno określić wzajemne korelacje tych fenotypów. Badania podobieństwa materiału genetycznego bakterii (prowadzone metodami takimi, jak RAPD czy RFLP-PFGE), wykonywane lokalnie wykazują, iż niektóre szczepy o fenotypie BLPACR mogą być dość blisko spokrewnione z równoległymi występującymi na danym obszarze szczepami o fenotypie BLNAR [19]. Wskazuje to na powstawanie szczepów o fenotypie BLPACR poprzez nabywanie przez szczepy ze zmienionymi białkami PBP plazmidowo kodowanych β-laktamaz.

Powstawanie szczepów *H. influenzae* o fenotypie BLNAR nie musi zachodzić wyłącznie na drodze generowania mutacji spontanicznych i rozprzestrzeniać się wyłącznie klonalnie. Bakterie te mają bowiem zdolność do tzw. międzykomórkowego transferu genów chromosomalnych z wykorzystaniem mechanizmu odmiennego od transformacji czy koniugacji [1]. Mogą one pobierać ze środowiska DNA zawierający specyficzną dla rodzaju *Haemophilus* sekwencję USS (Uptake Signal Sequence). Taki fragment DNA jest następnie wbudowywany w genom bakterii na drodze rekombinacji homologicznej. W genie *ftsI* sekwencja USS występuje w dwóch miejscach. Możliwa jest więc rekombinacja fragmentu genu *ftsI*. Jak dowodzą T a k a h a t a i wsp. [58], możliwe jest przekazywanie zmienionej wersji genu *ftsI* podczas współwystępowania w jednej niszy ekologicznej szczepów BLNAR i BLNAS (Beta-Lactamase Negative/Non-producing, Ampicillin Susceptible). Autorzy ci wykazali również możliwość horyzontalnego transferu genu *ftsI* między różnymi gatunkami bakterii z rodzaju *Haemophilus*. Fakt ten powoduje, iż inne gatunki tego rodzaju (takie jak *H. haemolyticus*) mogą stanowić rezerwuar zmutowanej wersji genu *ftsI* leżącej u podstaw fenotypu BLNAR.

Występowanie bakterii wykazujących oporność receptorową może nieść za sobą poważne problemy w leczeniu zakażeń wywoływanych przez *H. influenzae*. Co prawda, w wielu przypadkach poziom oporności szczepów pozostaje stosunkowo niski, jednak powstające zmiany otwierają drogę do zwiększania się oporności w przyszłości (za H. D a b e r n a t e m, [11]). Jak dotąd oporność na często stosowane w leczeniu cefalosporyny III generacji nie stanowi problemu i leki tej grupy pozostają aktywne także wobec szczepów o fenotypie BLNAR. Zauważalna jest jednak selekcja mutacji w białkach PBP, prowadząca do zwiększania się wartości MIC tych antybiotyków [29, 48]. W związku z tym niektórzy badacze postulują stosowanie antybiotyków β -laktamowych z innych grup, które blokują inne białka PBP i działają także na szczepy BLNAR. Takimi antybiotykami są karbapenemy a zwłaszcza meropenem, jako lek o większej aktywności od imipenemu i zachowujący wysoką aktywność także wobec szczepów o fenotypie BLNAR [22, 40].

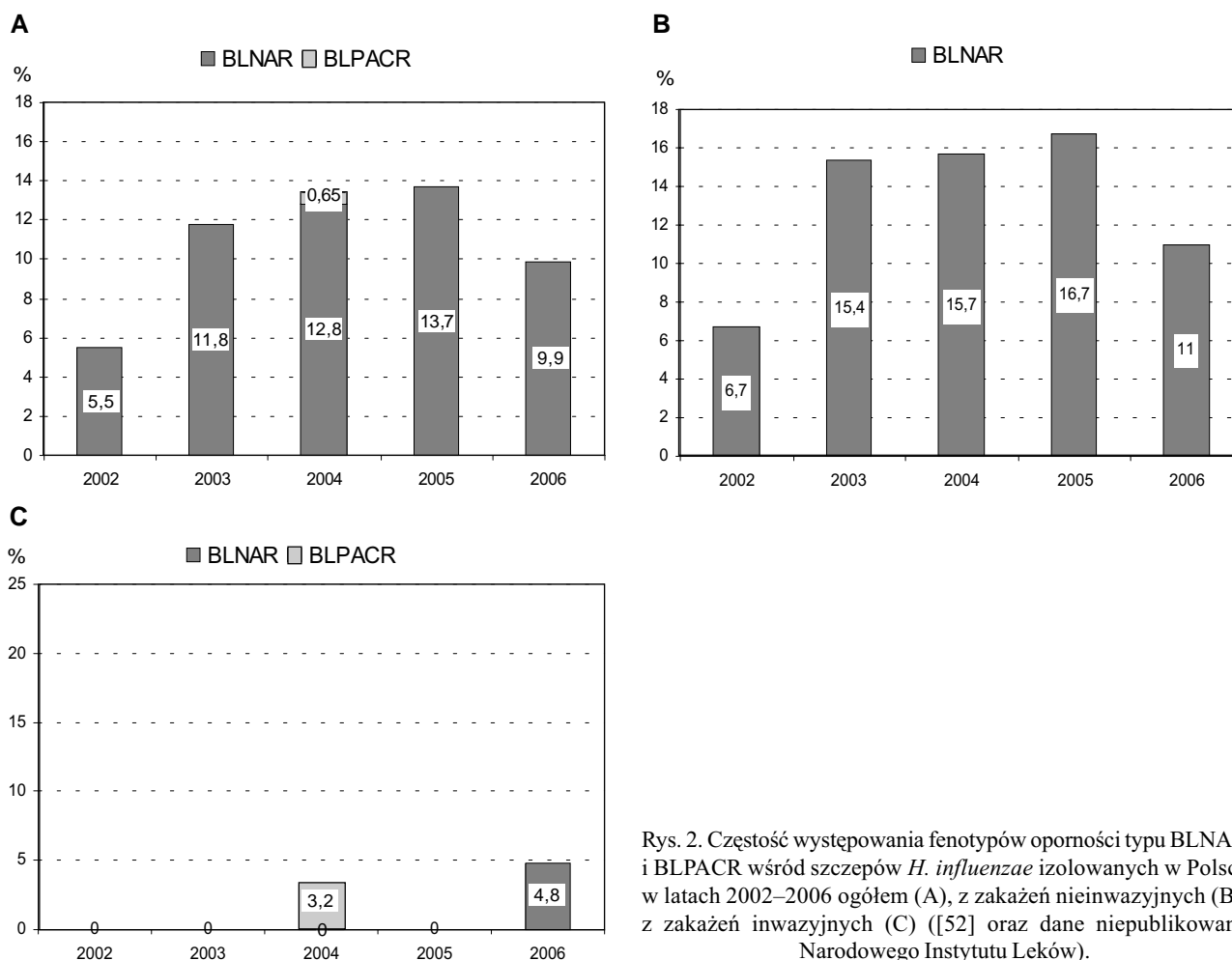
Karbapenemy działają przede wszystkim na białka PBP4 i PBP5. Opisano szczepy *H. influenzae* wykazujące obniżoną wrażliwość na karbapenemy na drodze zmniejszenia powinowactwa antybiotyku do białka PBP4 [36]. Zsekwencjonowanie przez U b u k a t e i wsp. [66] genu *dacB* kodującego białko PBP4, wykazało u niektórych szczepów delecję 7 nukleotydów w pozycji 943–949, co powodowało zmianę ramki odczytu i wcześniejszą terminację translacji. Łańcuch kończył się w odległości zaledwie 20 aminokwasów za motywem SDN, a motyw KTG w ogóle w nim

nie występował. Mutacja nie powodowała jednak spadku wrażliwości na karbapenemy, ani inne badane antybiotyki [66].

Innym antybiotykiem wykazującym *in vitro* aktywność wobec szczepów *H. influenzae* typu BLNAR jest piperacylina [42]. W oznaczeniach laboratoryjnych działa ona na szczepy BLNAR często skuteczniej niż cefalosporyny III generacji i, w przeciwieństwie do nich, dodatkowo indukuje procesy autolizy bakterii. Wysoka aktywność wobec szczepów o fenotypie BLNAR może wynikać z faktu, że lek ten blokuje nie tylko białka PBP3, ale również białko PBP2 [42]. Piperacylina nie wykazuje jednak tak wysokiej aktywności wobec szczepów o fenotypie BLPACR, gdyż jest wrażliwa na działanie β -laktamaz [29]. W tym wypadku aktywność piperacyliny zostaje zachowana poprzez skojarzenie jej z inhibitorem β -laktamaz – tazobaktamem [48]. Wskazanie do stosowania piperacyliny wobec szczepów o fenotypie BLNAR jest jednak niejednoznaczne, gdyż według wytycznych CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) szczepy te należy traktować jako odporne na ten antybiotyk mimo możliwości aktywności *in vitro* [10].

Częstość występowania szczepów *H. influenzae* o fenotypie BLNAR wykazuje duże zróżnicowanie pod względem geograficznym: w USA szczepy o tym fenotypie stanowią poniżej 1% wszystkich izolowanych pałeczek hemofilnych a w latach 2000–2001 wykryto tam tylko 9 przypadków (0,6%) zakażeń wywołanych przez szczepy BLNAR. Zidentyfikowano je w dwóch ośrodkach a szczepy bakteryjne okazały się dodatkowo przedstawicielami tego samego klonu, co dowodziło istnienie klonalnego rozprzestrzeniania się oporności typu badawczego. Zupełnie odmienna sytuacja ma miejsce w Japonii, gdzie w 1998 roku aż 28% izolowanych *H. influenzae* stanowiły bakterie o fenotypie BLNAR [66]. W przypadku zakażeń inwazyjnych o etiologii *H. influenzae* (takich jak ZOMR), częstość występowania szczepów BLNAR wzrosła w Japonii z 34% w 1999 do 67,3% w 2002 roku (wliczając w to także fenotypy low-BLNAR oraz BLPACR) [19]. H a s e g a w a i wsp. [19] zwracają uwagę, iż taka różnica w częstości występowania szczepów BLNAR między Japonią a USA może wynikać z faktu stosowania innych dawek antybiotyków w obu krajach. W Japonii dawki ampicyliny czy amoksyliny z kwasem klawulanowym są około dwa do trzech razy niższe niż w USA, co może prowadzić do łatwiejszego „powstawania” szczepów opornych.

W Europie również istnieją duże różnice w częstości występowania fenotypu BLNAR u klinicznych izolatów *H. influenzae*. Jak donoszą Fluit i wsp. [14], wśród szczepów izolowanych z zakażeń układu oddechowego, średnia częstość występowania szczepów fenotypu BLNAR wynosiła 8,8% w latach 1997–1998 i wzrosła do 9,6% w latach 2002–2003. W tych latach



Rys. 2. Częstość występowania fenotypów oporności typu BLNAR i BLPACR wśród szczepów *H. influenzae* izolowanych w Polsce w latach 2002–2006 ogółem (A), z zakażeń nieinwazyjnych (B), z zakażeń inwazyjnych (C) ([52] oraz dane niepublikowane Narodowego Instytutu Leków).

najniższą częstość występowania szczepów BLNAR odnotowano w Niemczech – 2% izolowanych szczepów, oraz we Włoszech – 3,3%. Inną sytuację zaobserwowano w Hiszpanii, Portugalii, Irlandii oraz Wielkiej Brytanii, gdzie procent szczepów o fenotypie BLNAR wynosił odpowiednio: 11,1%, 11,8%, 15,2% oraz 18,2% [14].

Według badań Fluita i wsp. [14], najwyższą częstość występowania bakterii o fenotypie BLNAR w Europie zaobserwowano w Polsce. Wynosiła ona 20% w latach 2002–2003. Dane te jednak obarczone są dużym błędem statystycznym, gdyż zostały przeprowadzone na niewielkiej liczbie szczepów (35 izolatów z Polski). Dokładniejsze informacje dotyczące częstości występowania fenotypu BLNAR w Polsce uzyskano w ramach prowadzonego przez Narodowy Instytut Leków „Wieloośrodkowego badania wrażliwości na leki bakterii wywołujących zakażenia dróg oddechowych w środowisku pozaszpitalnym w Polsce” (kontynuacja projektu Alexander). Wyniki badań wykazały, że wartości podane przez Fluita i wsp. [14] były wyższe od stanu faktycznego, gdyż szczepy BLNAR w 2002 roku stanowiły 6,7%, natomiast w 2003 roku – 15,4% wszystkich szczepów pałeczek

hemofilnych izolowanych z zakażeń układu oddechowego (Rys. 2). Spośród wszystkich izolatów klinicznych *H. influenzae* w Polsce odsetek był nieznacznie niższy i wynosił w tych latach odpowiednio 5,5% i 11,8%. Wśród szczepów serotypu b ten mechanizm oporności nadal pozostaje bardzo rzadki. Jak dotąd, wyizolowane zostały w Polsce tylko dwa takie szczepy – po jednym w latach 2004 i 2006. Niepokojący jest jednak fakt, iż częstość występowania bakterii o fenotypie BLNAR w Polsce wśród populacji *H. influenzae* w ciągu ostatnich lat sukcesywnie zwiększa się (nieвелиki spadek zaobserwowano w 2006 roku). Wszystkie takie szczepy wykazują wartości MIC ampicyliny na poziomie 1,0–2,0 µg/ml, co kwalifikuje je do grupy bardziej wrażliwych, o fenotypie low-BLNAR. Istnieje jednak obawa, że podobnie jak wcześniej w Japonii, stopień wrażliwości tych bakterii na antybiotyki β-laktamowe może ulec dalszemu obniżeniu w wyniku powstawania dodatkowych mutacji w genie kodującym białka PBP3.

Wykrywanie fenotypu BLNAR. Duża liczba możliwych mutacji nadających różny stopień oporności na wiele antybiotyków sprawia, iż szybkie wykrywanie tego mechanizmu oporności jest problematyczne. Na-

leży jednak zwrócić uwagę, iż stopień wykrywalności szczepów BLNAR stale się poprawia [53]. Najprostszą metodą wykrycia tego fenotypu jest porównanie wartości MIC ampicyliny i amoksyliny z klawulanianem. Otrzymywane wyniki nie zawsze jednak dają jednoznaczną odpowiedź. Interpretacja wyników jest trudna zwłaszcza dla szczepów wykazujących niski stopień oporności (low-BLNAR). Łatwiejszych do interpretacji wyników dostarcza stosowanie amoksyliny zamiast ampicyliny. W przypadku metody dyfuzyjno-krażkowej bardziej wiarygodne dane eksperymentalne uzyskiwane są przy zastosowaniu krążków z 2,0 μ g ampicyliny, niż przy standardowo używanych krążkach zawierających 10,0 μ g antybiotyku [67]. Opracowywane są nowe metody szybkiego wykrywania tego mechanizmu oporności, tak ważnego w diagnostyce zakażeń.

Skuteczną i szybką metodą wydaje się zastosowanie reakcji PCR ze starterami homologicznymi do dzikiej wersji genu *ftsI*, natomiast niewykrywającymi jego zmutowanej wersji. Problemem jest jednak dobranie starterów spełniających te warunki ze względu na dużą liczbę możliwych mutacji w różnych fragmentach genu. Sprawia to, iż nie da się zaprojektować jednej pary starterów wykrywających wszystkie genotypy BLNAR w jednej reakcji. Strategią pozwalającą na częściowe rozwiązanie problemu jest stosowanie zestawu starterów diagnostycznych wykrywających najczęściej na danym rejonie występujące genotypy BLNAR. W Polsce takie badania dotychczas nie były prowadzone.

Praktycznie jedyną pewną i jednoznaczną metodą wykrywania genotypu BLNAR jest sekwencjonowanie genu *ftsI*. Ta metoda nie jest jednak szeroko dostępna i rutynowo na dzień dzisiejszy niemożliwa.

3.3. Inne mechanizmy warunkujące oporność na antybiotyki β -laktamowe

Wytwarzanie β -laktamaz oraz zmiany w białkach PBP są głównymi mechanizmami warunkującymi oporność *H. influenzae* na antybiotyki β -laktamowe. Możliwe są jednak inne mechanizmy, a wiele z nich jest spotykanych u innych gatunków bakterii, co sugeruje, iż mogą one występować także w szczepach *H. influenzae*. Można wyróżnić zmniejszenie przepuszczalności błony zewnętrznej (jak ma to miejsce u *P. aeruginosa*), czy wytwarzanie nowego białka PBP, spełniającego rolę białka zablokowanego przez lek, ale posiadającego zmniejszone powinowactwo do antybiotyku (tak jak w komórkach meticylinoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* – MRSA, Methicillin Resistant *S. aureus*).

Innym mechanizmem oporności wykorzystywanym przez bakterie jest aktywne wypompowywanie leku z komórki warunkowane aktywnością tzw. pomp opor-

ności wielolekowej określane skrótem MDR (Multidrug resistance pumps). W komórkach *H. influenzae* opisano taki kompleks białkowy – pompę, należącą do rodziny RND (ang. Resistance-Nondulation-Cell Division). Do tej rodziny zaliczane są systemy, jak AcrAB/TolC występujące w komórkach *E. coli* czy MexAB u *P. aeruginosa*. Wszystkie wymienione wyżej pompy składają się z trzech białek. W przypadku systemu AcrAB/TolC (zarówno u *E. coli*, jak i u *H. influenzae*), białko AcrB tworzy kanał przechodzący przez błonę komórkową oraz przestrzeń peryplazmatyczną. Łączy się ono z białkiem tworzącym por w błonie zewnętrznej – TolC [61]. Całość systemu zabezpiecza i stabilizuje białko AcrA należące do rodziny peryplazmatycznych białek fuzji błon (ang. Membrane Fusion Proteins, MFP). System AcrAB/TolC ma zdolność do usuwania z komórki substancji toksycznych dla bakterii jak akryflawina, sole żółci, erytromycyna, chloramfenikol, fluorochinolony, mitomycyna a także β -laktamy. W komórkach *H. influenzae* pompa ta nie usuwa ani chloramfenikolu, ani fluorochinolonów [49, 61].

Ze względu na niską wydajność pompy AcrAB/TolC oraz wysoką przepuszczalność błony zewnętrznej *H. influenzae* dla antybiotyków β -laktamowych, spowodowana obecność opisanej wcześniej dużej poriny P2, mechanizm ten długo nie był brany pod uwagę jako istotnie wpływający na oporność na tę grupę antybiotyków [49]. Jednakże w 2004 roku, K a c z m a r e k i wsp. [24], badając oporności szczepów BLNAR ze znacznie podwyższonymi wartościami MIC ampicyliny zauważyli, iż mechanizm usuwania leku może, obok zmian w białkach PBP3, istotnie wpływać na stopień oporności badanych bakterii. Sekwencjonowanie genów wchodzących w skład kompleksu genów *acrAB* wykazało występowanie dwu insercji w genie represora AcrR – wstawienie tyminy po 40 nukleotydzie albo adeniny po 150 nukleotydzie. Obie mutacje powodowały przesunięcie ramki odczytu oraz wcześniejszą terminację translacji. Wynikająca ze zmian w sekwencji nukleotydowej genu derepresja operonu *acrAB* i nadekspresja genów wchodzących w jego skład dawała w efekcie istotny wzrost liczby pomp systemu AcrAB, a więc i znaczący wzrost ich wydajności.

4. Wielolekooporność

Duże zagrożenie w leczeniu zakażeń bakteryjnych stanowią szczepy odporne na wiele grup antybiotyków. Coraz częściej pojawiają się doniesienia o przypadkach braku opcji terapeutycznej w groźnych zakażeniach bakteryjnych, często zagrażających życiu pacjenta. Znane są też przypadki, gdy skuteczne w leczeniu pozostają wyłącznie leki wykazujące dużą toksyczność dla organizmu człowieka.

Oporność wieloraka jest definiowana jako oporność danego szczepu na co najmniej trzy grupy antybiotyków. Rozprzestrzenianie oporności na wiele leków ułatwia fakt, iż presja jednym antybiotykiem może się przyczyniać do zwiększania się ilości bakterii opornych na inne grupy antybiotyków co jest powodowane zwykle występowaniem kodujących oporność genów w obrębie tych samych mobilnych elementów genetycznych – plazmidów czy transpozonów.

W przypadku *H. influenzae* pierwsze opisane izolaty bakterii opornych zarówno na ampicylinę jak i chloramfenikol pochodzą z 1980 roku i dotyczą szczepów w większości izolowanych z zakażeń inwazyjnych. Szczepy wykazujące wieloraką oporność szybko rozpowszechniły się w Hiszpanii, gdzie w badaniu z lat 1981–83, 40,9% szczepów izolowanych z zakażeń inwazyjnych wykazywało oporność na ampicylinę, chloramfenikol, tetracyklinę i ko-trimoksazol [5]. Jednocześnie oporność na te cztery grupy chemioterapeutyków jest wśród fenotypów oporności wielorakiej nadal najczęściej obserwowanym fenotypem u *H. influenzae*. Na Kubie, gdzie szczepy wielolekooporne stanowią 43,8% bakterii izolowanych z krwi oraz płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR), powyższy fenotyp charakteryzował 67% szczepów wielolekoopornych [59]. Najczęściej fenotyp oporności wielorakiej jest obserwowany u *H. influenzae* typu b, izolowanych z krwi lub PMR [6, 59].

Geny warunkujące oporność u szczepów z wieloraką opornością na antybiotyki, są zazwyczaj zlokalizowane na wspólnym plazmidzie, co ułatwia ich jednoczesne rozprzestrzenianie. Jednak u badanych szczepów *H. influenzae*, oporność na trimetoprim kodowana była przez gen chromosomalny [59]. Fakt ten świadczy o klonalnym szerzeniu się oporności wielorakiej [15].

W Polsce szczepy *H. influenzae* wykazujące wieloraką oporność na antybiotyki izolowane są bardzo rzadko (niepublikowane dane Narodowego Instytutu Leków).

5. Podsumowanie

Bakteryjne zakażenia układu oddechowego, wywołane przez *H. influenzae*, *S. pneumoniae* i inne gatunki bakteryjne są przyczyną znacznej liczby zgonów na świecie. Szczepionki dostępne przeciwko niektórym z patogenów bakteryjnych, takie jak szczepionka przeciwko Hib, czy szczepionki przeciw pneumokokowe, wpływają na spadek liczby groźnych zakażeń. W przypadku pałeczek hemofilnych poważnym problemem pozostają zakażenia wywołane przez szczepy bezotoczkowe, przeciwko którym nie opracowano dotychczas skutecznej szczepionki.

W walce z poważnymi zakażeniami wywołanymi przez *H. influenzae* istotne jest stosowanie skutecznej

terapii antybiotykowej. Epidemiologia lekooporności pałeczek hemofilnych jest jednak bardzo dynamiczna. Odkąd w latach 70. ubiegłego wieku pierwszy raz wyizolowano od chorych szczepy oporne na stosowane w leczeniu antybiotyki, problem ten narasta. Izolowane są szczepy wykazujące coraz skuteczniejsze i trudne do wykrycia mechanizmy oporności na różne, także nowsze antybiotyki.

Poznanie i zrozumienie mechanizmów oporności występujących u bakterii i stosowanie leczenia skutecznie omijającego ich działanie jest niezwykle ważne. Wiedza taka pozwala stosować antybiotyki w racjonalny sposób, ograniczający narastanie i powstawanie nowych mechanizmów oporności. Istotnym problemem jest też badanie procesów patogenezy oraz fizjologii bakterii zasiedlających ludzki organizm. Przykładem jest tu odkrycie wytwarzania biofilmów przez bakterie, także *H. influenzae*, których obecność nadaje, w nieznanym dotąd sposób, wysoki poziom oporności na antybiotyki bakteriom wrażliwym. Można więc tę strukturę uznać za kolejny ważny mechanizm oporności. Od kilku lat prowadzi się badania preparatów blokujących wytwarzanie biofilmów, które mogłyby w przyszłości być stosowane w leczeniu zakażeń.

Ciągłe monitorowanie lekowrażliwości drobnoustrojów chorobotwórczych dostarcza wiedzy o molekularnych mechanizmach warunkujących oporność, przez co może pomóc w opracowaniu szybkich metod do ich wykrywania. Ma to istotne znaczenie w szybkim i dokładnym oznaczeniu wrażliwości bakterii na antybiotyki, co umożliwi wdrożenie skutecznej terapii celowanej. Ze względu na częste problemy z szybkim określeniem wrażliwości drobnoustroju, czy też nie wykonywanie takich badań, niezmiernie ważne jest stosowanie skutecznej terapii empirycznej. Dotyczy to zwłaszcza sytuacji, w których stan pacjenta wymaga natychmiastowego włączenia skutecznego leczenia. Ze względu na powszechnie narastającą oporność na antybiotyki, bardzo istotne jest stałe śledzenie epidemiologii lekooporności drobnoustrojów oraz badanie mechanizmów leżących u jej podstaw.

Piśmiennictwo

1. Albritton W.L., Setlow J.K., Slaney L.: Transfer of *Haemophilus influenzae* chromosomal genes by cell-to-cell contact. *J. Bacteriol.* **152**, 1066–1070 (1982)
2. Balko T., Karlowsky J.A., Palatnick L.P., Zhanel G.G., Hoban D.J.: Characterization of the inoculum effect with *Haemophilus influenzae* and β -lactams. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **33**, 47–58 (1999)
3. Bozdogan B., Tristram S., Appelbaum P.C.: Combination of altered PBPs and expression of cloned extended-spectrum β -lactamases confers cefotaxime resistance in *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 747–749 (2006)

4. Bush K.: Classification of β -lactamases: Groups 1, 2a, 2b, and 2b'. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 264–270 (1989)
5. Campos J., Garcia-Tornel S., Sanfeliu I.: Susceptibility studies of multiply resistant *Haemophilus influenzae* isolated from pediatric patients and contacts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **25**, 706–709 (1984)
6. Campos J., Hernando M., Roman F., Perez-Vazquez M., Aracil B., Oteo J., Lazaro E., de Abajo F., the Group of Invasive *Haemophilus* Infections of the Autonomous Community of Madrid, Spain: Analysis of invasive *Haemophilus influenzae* infections after extensive vaccination against *H. influenzae* type b. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 524–529 (2004)
7. Chen S-T., Clowes R.C.: Variations between the nucleotide sequences of Tn1, Tn2, and Tn3 and expression of β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 913–916 (1987)
8. Chen S-T., Clowes R.C.: Nucleotide sequence comparisons of plasmids pHD131, pJB1, pFA3, ald pFA7 and β -lactamase expression in *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **169**, 3124–3130 (1987)
9. Clairoux N., Picard M., Brochu A., Rousseau N., Gourde P., Beauchamp D., Parr T.R., JR., Bergeron M.G., Malouin F.: Molecular basis of the non- β -lactamase-mediated resistance to β -lactam antibiotics in strains of *Haemophilus influenzae* isolated in Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 1504–1513 (1992)
10. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational Supplement. Document M100-S17. Wayne, PA: CLSI (2007)
11. Dabernat H., Delmas C., Seguy M., Pelissier R., Faucon G., Bennamani S., Pasquier Ch.: Diversity of β -lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2208–2218 (2002)
12. Doern G.V., Brueggemann A.B., Pierce G., Holley H.P., JR., Rauch A.: Antibiotic resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and detection of β -lactamase-positive strains resistant to amoxicillin-clavulanate: results of a national multi-center surveillance study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 292–297 (1997)
13. Farrell D.J., Morrissey I., Bakker S., Buckridge S., Felmingham D.: Global distribution of TEM-1 and ROB-1 β -lactamases in *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 773–776 (2005)
14. Fluit A.C., Florijn A., Verhoef J., Milatovic D.: Susceptibility of European β -lactamase-positive and -negative *Haemophilus influenzae* isolates from the periods 1997/1998 and 2002/2003. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 133–138 (2005)
15. Fuste M.C., Pineda M.A., Palomar J., Vinas M., Loren J.G.: Clonality of multidrug-resistant nontypeable strains of *Haemophilus influenzae*. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 760–765 (1996)
16. Galan J-C., Morosini M-J., Baquero M-R., Reig M., Baquero F.: *Haemophilus influenzae* bla_{ROB-1} mutations in hypermutagenic ampC *Escherichia coli* conferring resistance to cefotaxime and β -lactamase inhibitors and increased susceptibility to cefaclor. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2551–2557 (2003)
17. Gazagne L., Delmas C., Bingen E., Dabernat H.: Molecular epidemiology of ampicillin-resistant non- β -lactamase-producing *Haemophilus influenzae*. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 3629–3635 (1998)
18. Gratten M.: *Haemophilus influenzae* biotype VII. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 1015–1016 (1983)
19. Hasegawa K., Chiba N., Kobayashi R., Murayama S.Y., Iwata S., Sunakawa K., Ubukata K.: Rapidly increasing prevalence of β -lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b in patients with meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1509–1514 (2004)
20. Hryniewicz W., Meszaros J. Red.: Antybiotyki w profilaktyce i leczeniu zakażeń, Wyd. Lekarskie PZWL, 2002
21. Jacoby G.A., Sutton L.: β -lactamases and β -lactam resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**, 703–705 (1985)
22. Jorgensen J.H., Maher L.A., Howell A.W.: Activity of a new carbapenem antibiotic, meropenem, against *Haemophilus influenzae* strains with β -lactamase- and non-enzyme-mediated resistance to ampicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 600–602 (1991)
23. Juteau J-M., Levesque R.C.: Sequence analysis and evolutionary perspectives of ROB-1 β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1354–1359 (1990)
24. Kaczmarek F. S., Gootz T. D., Dib-Hajj F., Shang W., Hallowell S., Cronan M.: Genetic and molecular characterization of β -lactamase-negative ampicillin-resistance *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1630–1639 (2004)
25. Karlowsky J.A., Verma G., Zhanel G.G., Hoban D.J.: Presence of ROB-1 β -lactamase correlates with ceftazidime resistance among recent isolates of *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**, 871–875 (2000)
26. Kilian M.: *Haemophilus*, Bergley's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. II, part B, Springer, 2005, s. 883–904
27. Kilian M.: A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. *J. Gen. Microbiol.* **93**(1), 9–62 (1976)
28. Kobayashi Y., Takahashi I., Nakae T.: Diffusion of β -lactam antibiotics through liposome membranes containing purified porins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**, 775–780 (1982)
29. Kubota T., Higa F., Kusano N., Nakasone I., Haranaga S., Tateyama M., Yamane N., Fujita J.: Genetic analyses of β -lactamase negative ampicillin-resistant strains of *Haemophilus influenzae* isolated in Okinawa, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **59**, 36–41 (2006)
30. Laufs R., Riess F-C., Jahn G., Fock R., Kaulfers P-M.: Origin of *Haemophilus influenzae* R factors. *J. Bacteriol.* **147**, 563–568 (1981)
31. Makover S.D., Wright R., Telep E.: Penicillin-binding proteins in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**, 584–588 (1981)
32. Malouin F., Schryvers A.B., Bryan L.E.: Cloning and expression of genes responsible for altered penicillin-binding proteins 3a and 3b in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 286–291 (1987)
33. Markowitz S.M.: Notes: isolation of an ampicillin-resistant, Non- β -lactamase-producing strain of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**, 80–83 (1980)
34. Matic V., Bozdogan B., Jacobs M.R., Ubukata K., Appelbaum P.C.: Contribution of β -lactamase and PBP amino acid substitutions to amoxicillin/clavulanate resistance in β -lactamase-positive, amoxicillin/clavulanate-resistant *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 1018–1021 (2003)
35. Matthew M., Hedges R.W.: Analytical isoelectric focusing of R factor-determined β -lactamases: correlation with plasmid compatibility. *J. Bacteriol.* **125**, 713–718 (1976)
36. Matuso Y.: abstract: *In vitro* susceptibility to 23 antimicrobial agents of *Haemophilus influenzae* from pediatric patients in Japan. *Kurume Med. J.* **47**(3), 205–210 (2000)

37. Medeiros A.A., Levesque R., Jacoby G.A.: An animal source for the ROB-1 β -lactamase of *Haemophilus influenzae* Type b. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**, 212–215 (1986)
38. Mendelman P.M., Chaffin D.O., Stull T.L., Rubens C.E., Mack K.D., Smith A.L.: Characterization of non- β -lactamase-mediated ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **26**, 235–244 (1984)
39. Mendelman P.M., Chaffin D.O., Musser J.M., de Groot R., Serfass D.A., Selander R.K.: Genetic and phenotypic diversity among ampicillin-resistance, non- β -lactamase-producing, non-typeable *Haemophilus influenzae* isolates. *Infect Immun.* **55**, 2585–2589 (1987)
40. Miyazaki S., Fujikawa T., Kanazawa K., Yamaguchi K.: *In vitro* and *in vivo* activities of meropenem and comparable antimicrobial agents against *Haemophilus influenzae*, including β -lactamase-negative ampicillin-resistant strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**, 723–726 (2001)
41. Molina J.M., Cordoba J., Monsolieu A., Diosdado N., Gobernado M.: *Haemophilus influenzae* and betalactam resistance: Description of bla_{TEM} gene deletion. *Rev. Esp. Quimioterap.* **16**, 195–203 (2003)
42. Morikawa Y., Kitazato M., Mitsuyama J., Mizunaga S., Minami S., Watanabe Y.: *In vitro* activities of piperacillin against β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1229–1234 (2004)
43. Mrozińska M., Poszwińska B.: *Haemophilus influenzae* typu β -epidemiologia, klinika, profilaktyka. *Przewodnik Lekarza*, **10**, 63–70 (2002)
44. Oberhofer T.R., Back A.E.: Biotypes of *Haemophilus influenzae* encountered in clinical laboratories. *J. Clin. Microbiol.* **10**, 168–174 (1979)
45. Osaki Y., Sanbongi Y., Ishikawa M., Kataoka H., Suzuki T., Maeda K., Ida T.: Genetic approach to study the relationship between penicillin-binding protein 3 mutations and *Haemophilus influenzae* β -lactam resistance by using site-directed mutagenesis and gene recombinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2834–2839 (2005)
46. Parr T.R., Bryan L.E.: Mechanism of resistance of an ampicillin-resistance, β -lactamase-negative clinical isolate of *Haemophilus influenzae* type b to β -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **25**, 747–753 (1984)
47. Przesmycki F.: *Zarys bakteriologii praktycznej*. Fr. Herod, Warszawa 1927
48. Sanbongi Y., Suzuki T., Osaki Y., Senju N., Ida T., Ubukata K.: Molecular evolution of β -lactam-resistant *Haemophilus influenzae*: 9-year surveillance of penicillin-binding protein 3 mutations in isolates from Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2487–2492 (2006)
49. Sanchez L., Pan W., Vinas M., Nikaido H.: The acrAB homolog of *Haemophilus influenzae* codes for a functional multidrug efflux pump. *J. Bacteriol.* **179**, 6855–6857 (1997)
50. Scriver S.R., Walmsley S.L., Kau C.L., Hoban D.J., Brunton J., McGeer A., Moore T.C., Witwicki E., Canadian *Haemophilus* Study Group, Low D.E.: Determination of antimicrobial susceptibilities of Canadian isolates of *Haemophilus influenzae* and characterization of their β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1678–1680 (1994)
51. Shanahan P.M., Thomson C.J., Amyes S.G.: Abstract: Antibiotic susceptibilities of *Haemophilus influenzae* in central Scotland. *Clin. Microbiol. Infect.* **1(3)**, 168–174 (1996)
52. Skoczyńska A., Kadłubowski M., Waško I., Fiett J., Hryniewicz W.: Resistance patterns of selected respiratory tract pathogens in Poland. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 377–383 (2007)
53. Snell J.J.S., Brown D.F.J.: External quality assessment of antimicrobial susceptibility testing in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**, 801–810 (2001)
54. Sottnek F.O., Albritton W.L.: *Haemophilus influenzae* biotype VIII. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 815–816 (1984)
55. Straker K., Wootton M., Simm A.M., Bennett P.M., MacGowan A.P., Walsh T.R.: Cefuroxime resistance in non β -lactamase *Haemophilus influenzae* is linked to mutations in *ftsI*. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 523–530 (2003)
56. Sutcliffe J.G.: Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3737–3741 (1978)
57. Syriopoulou V.Ph., Scheifele D.W., Sack C.M., Smith A.L.: Effect of inoculum size on the susceptibility of *Haemophilus influenzae* b to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**, 510–513 (1979)
58. Takahata S., Takashi I., Senju N., Sanbongi Y., Miyata A., Maebashi K., Hoshiko S.: Horizontal gene transfer of *ftsI*, encoding penicillin-binding protein 3, in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1589–1595 (2007)
59. Tamargo I., Fuentes K., Llop A., Oteo J., Campos J.: High levels of multiple antibiotic resistance among 938 *Haemophilus influenzae* type b meningitis isolates from Cuba (1990–2002). *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 695–698 (2003)
60. Thornsberry C., Kirven L.A.: Ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* as Determined by a Rapid Test for Beta-Lactamase Production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **6**, 653–654 (1974)
61. Trepod C.M., Mott J.E.: Identification of the *Haemophilus influenzae* *tolC* gene by susceptibility profiles of insertionally inactivated efflux pump mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1416–1418 (2004)
62. Tristram S.G.: Effect of extended-spectrum β -lactamases on the susceptibility of *Haemophilus influenzae* to cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 39–43 (2003)
63. Tristram S.G., Bozdogan B., Appelbaum P.C.: Disc diffusion-based screening tests for extended-spectrum β -lactamases in *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**, 570–573 (2005)
64. Tristram S.G., Hawes R., Soupronov J.: Variation in selected regions of bla_{TEM} genes and promoters in *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 481–484 (2005)
65. Tristram S.G., Pitout M.J., Forward K., Campbell S., Nichols S., Davidson R.J.: Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing isolates of *Haemophilus parainfluenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 509–514 (2008)
66. Ubukata K., Shibasaki Y., Yamamoto K., Chiba N., Hasegawa K., Takeuchi Y., Sunakawa K., Inoue M., Konno M.: Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with β -lactam resistance in β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1693–1699 (2001)
67. Zerva L., Biedenbach D. J., Jones R. N.: Reevaluation of interpretive criteria for *Haemophilus influenzae* by using meropenem (10-microgram), imipenem (10-microgram), and ampicillin (2- and 10-microgram) disks. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1970–1974 (1996)