

OPORNOŚĆ GRONKOWCÓW ZŁOCISTYCH NA ŚRODKI PRZECIWBAKTERYJNE

Joanna Stefańska

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny Akademii Medycznej w Warszawie
ul. Oczki 3, 02-007 Warszawa

tel.: +22 6280822; +22 6211351

Otrzymany 28.03.2003; zaakceptowany 30.07.2003; zamieszczony 4.08.2003

STRESZCZENIE

Narastanie oporności bakterii, w tym *S. aureus*, na antybiotyki i inne środki przeciwbakteryjne, jest poważnym problemem w medycynie. Poznanie mechanizmów tej oporności i warunkujących ją zjawisk genetycznych pozwala na poszukiwanie nowych środków (leków, dezynfektantów itp.), działających przeciw gronkowcom, w tym przeciw wielolekoopornym szczepom, odpowiedzialnym za zakażenia szpitalne.

SŁOWA KLUCZOWE: antybiotyki, oporność bakterii, plazmidy, *S. aureus*

ABSTRACT

STAPHYLOCOCCAL RESISTANCE TO ANTIBACTERIAL AGENTS

Increase of the resistance of *S. aureus* and other bacteria to antibiotics and remaining antimicrobial agents is an essential problem in medicine. The knowledge of the resistance mechanism and their genetic basis enables the search for new agents (drugs, disinfectants), acting against staphylococci, including multidrug resistance strains, responsible for nosocomial infections.

KEYWORDS: antibiotics, bacterial resistance, plasmids, *S. aureus*

Chorobotwórczość gronkowców złocistych i ich znaczenie w zakażeniach szpitalnych

Gronkowce powszechnie występują w środowisku człowieka. Szacuje się, że od 10 do 50% populacji ludzkiej jest stale lub okresowo nosicielami tych drobnoustrojów bez występowania objawów chorobowych. Nosicielstwo dotyczy najczęściej błony śluzowej przedstonoska i sprzyja dalszej kolonizacji skóry czy gardła. Wiele gatunków gronkowców wchodzi w skład normalnej mikroflory człowieka. Gronkowce należą do bakterii warunkowo chorobotwórczych, dlatego też w przypadku zakażeń przez nie wywołanych należy brać pod uwagę zarówno ich patogenność, jak i czynniki predysponujące organizm gospodarza do zachorowania (np. obniżona odporność, przerwanie ciągłości tkanek, równoczesne występowanie innych schorzeń).

Największe znaczenie ma gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*), który jest odpowiedzialny za ropne zakażenia skóry i tkanek podskórnych w postaci czyraków pojedynczych lub mnogich oraz zakażeń ran pooperacyjnych. Gronkowce te mogą wywoływać także zakażenia układowe i narządowe np. zapalenia płuc, opon mózgowo-rdzeniowych, ropnie mózgu, zapalenie szpiku kostnego i kości, zakażenia układu moczowego, zapalenie mięśnia sercowego oraz zakażenia lub zatrucia związane z wytwarzaniem przez te bakterie określonych toksyn. U osób z obniżoną odpornością, u pacjentów leczonych z powodu innych chorób, a także po zabiegach chirurgicznych zakażenie gronkowcowe może przejść w postać uogólnionej posocznicy [6].

Gronkowiec złocisty wytwarza wiele czynników powierzchniowych, które odgrywają istotną rolę w jego chorobotwórczości. Do czynników odpowiedzialnych za patogenność gronkowca złocistego zalicza się najczęściej: czynniki chroniące komórkę przed działaniem układu odpornościowego człowieka takie jak np. otoczka, białka wiążące immunoglobuliny klasy IgG, czy superantygenowa aktywność niektórych egzotoksyn, czynniki powierzchniowe, pełniące rolę adhezyn, egzotoksyny, egzoproteiny, składniki systemów wiążących żelazo - siderofory (aureocholina, staphyloferryina A i B) [26].

Staphylococcus aureus jest od wielu lat jednym z podstawowych patogenów odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne i pozaszpitalne u ludzi. Powszechne nosicielstwo sprzyja szybkiemu rozprzestrzenianiu się drobnoustroju w środowisku szpitalnym. Na zakażenia gronkowcowe szczególnie narażeni są pacjenci po zabiegach chirurgicznych, dializowani oraz noworodki. Najczęstszymi i najbardziej typowymi zakażeniami wywołanymi przez *S. aureus* u chorych hospitalizowanych są zakażenia ran chirurgicznych, zapalenie płuc, zapalenie opon mózgowych u chorych po operacjach kardiochirurgicznych (zastawki komorowe) oraz zakażenia u noworodków na oddziałach intensywnej terapii. Wprowadzenie każdego nowego antybiotyku do leczenia zakażeń gronkowcowych jak dotąd zawsze po dłuższym lub krótszym czasie prowadziło do selekcji szczepów opornych. Już w niedługim czasie po wprowadzeniu do leczenia penicylin zaobserwowano występowanie szczepów opornych wytwarzających penicylinazę - enzym hydrolizujący penicyliny. Rozprzestrzenianie się tej oporności wśród

szczepów jest bardzo szybkie ze względu na kodowanie jej przez geny plazmidowe. Dziś wiadomo, że ponad 90% szczepów *S. aureus* izolowanych od chorych hospitalizowanych jest niewrażliwych na działanie penicylin naturalnych, aminopenicylin oraz ureidopenicylin. Wobec tych szczepów mogą być skuteczne cefalosporyny, penicyliny odporne na działanie β -laktamaz np. penicyliny izoksazolytowe, oraz połączenia penicylin z inhibitorami β -laktamaz [5].

Obecnie największym problemem związanym ze szpitalnymi (i nie tylko) zakażeniami gronkowcowymi jest oporność tych drobnoustrojów na metycylinę, która w praktyce oznacza oporność na wszystkie stosowane antybiotyki β -laktamowe. Szczepy takie określa się mianem MRS (methicillin resistant *Staphylococcus*; MRSA - *S. aureus* i MRCNS - gronkowce koagulazoujemne). Ulegają one selekcji w środowisku szpitalnym przede wszystkim na skutek niewłaściwego i bardzo szerokiego stosowania β -laktamów, zwłaszcza cefalosporyn. Oporność ta jest spowodowana produkcją dodatkowego białka wiążącego penicyliny PBP2a o zmniejszonym powinowactwie do antybiotyków β -laktamowych. Szczepy te ponadto mają najczęściej zdolność wytwarzania β -laktamaz, a więc posiadają podwójny mechanizm oporności. Szczepy MRSA stanowią poważny problem, ponieważ niezależnie od oporności na β -laktamy wykazują oporność na wiele innych antybiotyków oraz środków przeciwbakteryjnych, a niejednokrotnie mogą być przyczyną epidemii. Pojawiły się również doniesienia o izolacji gronkowców o zmniejszonej wrażliwości na antybiotyki glikopeptydowe a także szczepów opornych na wankomycynę, antybiotyki stanowiące dotychczas "ostatnią deskę ratunku" w infekcjach gronkowcowych [1,2,23,54].

Mechanizmy genetyczne warunkujące oporność gronkowców na środki przeciwdrobnoustrojowe

Drobnoustroje mają zdolność obrony przed szkodliwymi substancjami jak np. antybiotyki, środki dezynfekcyjne czy sole metali. Oporność ta może być warunkowana w różny sposób. W niektórych przypadkach może powstać w wyniku spontanicznej mutacji w szczepie, bez kontaktu z chemioterapeutykami. Bakteryjne antybiotykooporne mutanty spontaniczne mogą powstawać w środowisku naturalnym jak i w warunkach laboratoryjnych z częstotliwością 10^{-6} do 10^{-8} na komórkę. Oporność gronkowców na takie antybiotyki jak np. fluorochinolony, mupirocyna, trimetoprim, streptomycyna, rifampicyna czy kwas fusydowy może być spowodowana np. mutacjami odpowiednich genów chromosomalnych lub nabyciem przez bakterie odpowiednich plazmidów [20].

Przy stosowaniu środków przeciwdrobnoustrojowych obserwuje się zjawisko oporności krzyżowej. Dotyczy ono głównie substancji należących do jednej grupy chemicznej, ale czasem spotykane jest także w przypadku różnych związków (np. chlorheksydyna, amidy i IV-rzędowe związki amoniowe). Istotną rolę odgrywa również sprzężenie genów w obrębie jednego elementu - plazmidu czy transpozonu. Przykładem może być obecność u *S. aureus* genów oporności na IV-rzędowe związki amoniowe (*qac*) na tzw. plazmidach gentamycynowych i penicylinazowych. Jest to zjawisko bardzo niekorzystne, gdyż coraz szersze stosowanie chemioterapeutyków prowadzi do równoczesnego

zwiększenia oporności na środki dezynfekcyjne wśród drobnoustrojów.

Bezpośrednią przyczyną oporności bakterii na różnego rodzaju związki jest obecność i ekspresja odpowiednich genów w komórce. Oporność konstytutywna jest związana z ciągłą ekspresją odpowiednich genów, natomiast indukcyjna może być inicjowana obecnością antybiotyków. Geny oporności na różne związki przeciwbakteryjne mogą być zlokalizowane na chromosomie, a także na elementach pozachromosomalnych takich jak plazmidy czy transpozony [7].

Plazmidy są to cząsteczki DNA zdolne do samodzielnej replikacji w komórkach bakteryjnych i dziedziczone niezależnie od chromosomu. Oprócz genów odpowiedzialnych za niezależną replikację i genów regulatorowych, plazmidy mogą zawierać szereg genów odpowiedzialnych za różne cechy fenotypowe bakterii np. oporność na związki przeciwbakteryjne, zdolność do koniugacji czy produkcji toksyn.

Większość naturalnie występujących szczepów *S. aureus* posiada jeden lub kilka plazmidów. Plazmidy gronkowcowe zostały podzielone na trzy podstawowe klasy oraz prowizoryczną klasę czwartą, zawierającą plazmidy nie dające się sklasyfikować w żadnej z trzech pierwszych [33,37].

Klasa I zawiera małe plazmidy (1,3 - 4,6 kbp; 1 kpb oznacza tysiąc par zasad), występujące w 10 - 50 kopiach na komórkę, zawierają najczęściej jedną rzadko dwie determinanty oporności. Należą tu plazmidy warunkujące oporność na chloramfenikol, tetracykliny, aminoglikozydy, kationy kadmu, IV-rzędowe związki amoniowe oraz MLS_B (makrolidy, linkozamidy, streptograminy B).

Plazmidy klasy II są większe (15 - 46 kbp) i występują w mniejszej liczbie kopii na komórkę (4 - 6). Należą tu między innymi liczne plazmidy penicylinazowe, które oprócz genów odpowiedzialnych za produkcję β -laktamaz, zawierają także różne kombinacje genów oporności na jony metali ciężkich (kadm, arseniany, arseniny, antymon, bizmut, rtęć), a także plazmidy warunkujące oporność na aminoglikozydy i trimetoprim.

Do klasy III należą duże plazmidy (30 - 60 kbp) koniugacyjne zawierające często determinanty oporności na aminoglikozydy, mupirocynę i środki dezynfekcyjne.

Transpozony oraz sekwencje insercyjne należą do genetycznych elementów translokacyjnych, mogą przenosić się w obrębie tego samego replikonu (chromosomu lub plazmidu) albo pomiędzy replikonami [7]. Na transpozonach zlokalizowane są geny warunkujące zdolność do transpozycji oraz szereg genów strukturalnych kodujących np. produkcję enzymów, toksyn, oporność na leki czy zdolność do koniugacji.

Najważniejsze mechanizmy oporności bakterii na różnego rodzaju środki o aktywności przeciwdrobnoustrojowej to:

- enzymatyczna inaktywacja leku,
- zmiana powinowactwa do leku lub dublowanie funkcji miejsca docelowego
- utrudnione wnikanie leku do komórki lub jego czynne usuwanie.

Oporność gronkowców na antybiotyki

Inaktywacja enzymatyczna

W inaktywacji antybiotyków biorą udział najczęściej enzymy z grupy hydrolaz lub transferaz.

Najbardziej rozpowszechnionymi hydrolazami są β -laktamazy wytwarzane przez bakterie, zarówno Gram-ujemne jak i Gram-dodatnie. Zalicza się do nich penicylinazy, ESBL (β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym), cefalosporynazy oraz karbapenemazy. Inaktywują one antybiotyki β -laktamowe poprzez hydrolizę pierścienia β -laktamowego. Do tej pory opisano ponad 200 β -laktamaz bakteryjnych. Stanowią one bardzo zróżnicowaną grupę enzymów, różniących się między sobą strukturą, spektrum substratowym i wrażliwością na inhibitory [19].

β -laktamazy gronkowcowe są enzymami uwalnianymi na zewnątrz komórki o wąskim spektrum substratowym. Spotykane są jednak szczepy, u których występuje nadprodukcja tych enzymów lub wytwarzają β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym, co w efekcie prowadzi do zwiększonej oporności na penicyliny (tzw. szczepy BOR-SA - borderline resistant *S. aureus*) [5,24]. Produkcja β -laktamaz u gronkowców złośliwych kodowana jest najczęściej przez geny zlokalizowane na plazmidach i w transpozonach, rzadziej w chromosomie, dlatego też jest cechą łatwo przekazywaną pomiędzy szczepami. Większość plazmidów kodujących β -laktamazę należy do II klasy plazmidów występujących u *S. aureus*. Podzielono je na podrodziny: alfa, beta, gamma i delta, wyodrębniono tzw. plazmidy "sieroco" (orphan) oraz naturalne rekombinanty alfa/beta i alfa/gamma [24]. Oprócz genów odpowiedzialnych za produkcję β -laktamaz na plazmidach penicylinazowych mogą być zlokalizowane geny oporności na różne środki przeciwbakteryjne np. sole metali ciężkich, IV-rzędowe związki amoniowe, antyseptyki, bromek etydyne czy różne antybiotyki [24]. Przykłady plazmidów penicylinazowych należących do klasy II podano w Tabeli 1.

Inaktywacja chloramfenikolu u szczepów gronkowców opornych na ten lek odbywa się na drodze unieczynniania go przez acetylazę chloramfenikolową. Kodowana jest wyłącznie przez grupę małych wielokopijowych plazmidów.

Najczęstszym mechanizmem oporności gronkowców na aminoglikozydy jest modyfikacja antybiotyków przez enzymy komórkowe: acetylotransferazy, fosfotransferazy i nukleotydylotransferazy. Determinanty tej oporności zlokalizowane są zwykle na większych plazmidach o małej liczbie kopii. Na plazmidach penicylinazowych mogą znajdować się determinanty oporności na niektóre aminoglikozydy (Tabela 1).

Wyróżnia się 3 grupy transferaz o różnej swoistości substratowej, które oznaczone są odpowiednimi skrótami zależnie od tego jakie antybiotyki i w jakich pozycjach są przez nie inaktywowane. Dwudomenowe białko AAC(6')/APH(2'') wykazujące aktywność acetylotransferazy AAC(6') i fosfotransferazy APH(2'') kodowane przez gen *aacA-aphD* (zwykle w strukturze transpozonu) odpowiada za unieczynnianie gentamycyny, kanamycyny i tobramycyny oraz wszystkich innych stosowanych aminoglikozydów z wyjątkiem streptomycyny. Produktem genu *aadD* jest nukleotydylotransferaza AAD(4')(4''), która warunkuje oporność na neomycynę, kanamycynę, tobramycynę i amikacynę. Fosfotransferazy APH(3')IIIa oraz APH(3')III, kodowane przez geny *aphA* i *aphA-3* inaktywują neomycynę i kanamycynę.

Na pochodne streptydyny (streptomycynę) działają enzymy: nukleotydylotransferaza AAD(3'') i nukleotydylotransferaza AAD(6'), kodowane odpowiednio przez geny *aadA* i *aadE* oraz fosfotransferaza APH (3''), produkt genu *aphC* [48].

Tabela 1. Przykłady plazmidów penicylinazowych klasy II występujących u *S. aureus* wg [20,24].

Nazwa plazmidu	Podrodziny	Markery oporności występujące na plazmidzie
pI524	Alfa	Pc Asa Asi Sb Hg Om Cd Bi Pb
pSJ24	Alfa	Pc Asa Hg, Cd Em Km
pSK23	Alfa/Beta	Hg Cd Ac Eb Qa Gm Tm Km
pWG50	Alfa/Gamma	Pc Hg Om Cd Gm Tm Km Eb Qa
pSK57	Alfa/Gamma	Pc Hg Cd Ac Eb Qa Pi Dd
pII3804	Beta	Pc Hg Om Cd Pb
pII147	Beta	Pc Asa Asi Hg Om Cd Pb
pI258	Gamma	Pc Asa Asi Sb Hg Om Cd Bi Pb MLS _B
pII6907	Delta	Asa Asi Sb Cd Bi Pb
pII1113	Orphan	Pc Cd Pb

Oznaczenia markerów oporności: Ac - akryflawina; Asa - arseniany; Asi - arseniny; Bi - sole bizmutu; Cd - sole kadmu; Dd - dwuchlorowodorek diaminodifenyloaminy; Eb - bromek etydyne; Em - erytromycyna; Gm - gentamycyna; Hg - nieorganiczne sole rtęci; Km - kanamycyna; MLS_B - makrolidy, linkozamidy, streptograminy B; Om - sole rtęci organicznej; Pb - sole ołowiu; Pc - penicylina; Pi - izotioian propamidyny; Qa - IV-rzędowe związki amoniowe; Sb - sole antymonu; Tm - tobramycyna.

Do innych enzymów spotykanych u gronkowców, inaktywujących związki przeciwdrobnoustrojowe należą: nukleotydylotransferaza linkomycynowa, acetylotransferazy streptogramin A i hydrolaza streptogramin B.

Zmiana powinowactwa do leku lub dublowanie funkcji miejsca docelowego

Mutacja w obrębie genu kodującego białko stanowiące cel dla antybiotyku może wywołać zmniejszenie jego powinowactwa do wiązania się z antybiotykiem. Przykładem jest mutacja genów kodujących gyrazę lub inne topozomerazy bakteryjne, będąca przyczyną oporności bakterii na chinolony, a także mutacje genów odpowiedzialnych za PBP (białka wiążące penicyliny) powodujące obniżenie powinowactwa antybiotyków β -laktamowych do tych białek i w konsekwencji oporność na te antybiotyki.

Mutacje w obrębie genów kodujących odpowiednie enzymy mogą także decydować o oporności bakterii na trimetoprim, sulfonamidy, mupirocynę lub rifampicynę,

O jednym z mechanizmów oporności gronkowców na antybiotyki aminoglikozydowe może decydować mutacja w genie kodującym białko rybosomalne, prowadząca do zmian w strukturze rybosomu i w efekcie do braku wiązania antybiotyku. Mechanizm ten wykryto u izolatów klinicznych *S. aureus* o wysokim poziomie oporności na streptomycynę [20].

Oporność gronkowców na kwas fusydowy powstaje na skutek mutacji w komórce drobnoustroju, która powoduje zmniejszenie powinowactwa miejsca docelowego (czynnika elongacji) do leku. Znacznie rzadziej występują dające

tego typu oporność determinanty zlokalizowane na plazmidach penicylinazowych lub plazmidach kodujących oporność na aminoglikozydy.

Niski poziom oporności gronkowców na mupirocynę jest wynikiem mutacji genu kodującego syntetazę izoleucylo-tRNA. Oporność na wysokie stężenia mupirocyny jest wynikiem nabycia przez szczepy plazmidu niosącego gen *mupA*, kodujący syntetazę izoleucylo-tRNA o bardzo niskim powinowactwie do mupirocyny. Jest on znajdowany w różnych, często niespokrewnionych plazmidach. Wykryto także szczepy, u których kopia tego genu jest zlokalizowana w chromosomie [21,40].

Najpowszechniejszym mechanizmem oporności gronkowca złocistego na fluorochinolony jest zmiana miejsca docelowego dla tych związków. Jest ona spowodowana mutacjami w genie *gyrA*, który koduje podjednostkę A gyrazy (topoizomerazy II) i *grlA* (topoizomeraza IV), stanowiące cel ataku tej grupy leków. Oporność ta jest konstytutywna [52,55].

Oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B (tzw. MLS_B) spowodowana jest enzymatyczną modyfikacją miejsca docelowego przez metylazy (Erm). Indukcyjna oporność na MLS_B u gronkowców złocistych może być kodowana przez małe, wielokopiowe plazmidy (niosące gen *ermC*) lub chromosomalnie (gen *ermA* zlokalizowany na transpozonie Tn554). Konstytutywna oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B jest kodowana plazmidowo (gen *ermC* w małych plazmidach oraz gen *ermB* zlokalizowany w transpozonie Tn551 na plazmidzie p1258), lub chromosomalnie (Tn551) [20,25].

O oporności bakterii na antybiotyki glikopeptydowe (wankomycyna, teikoplanina) decyduje zdolność do syntezy zmienionego prekursora peptydoglikanu ściany komórkowej i utrudniony dostęp antybiotyku do miejsca docelowego [10]. W przypadku enterokoków mechanizm tej oporności jest dość dobrze scharakteryzowany. W 1992 roku plazmid zawierający m.in. gen oporności na wankomycynę został przeniesiony ze szczepu *Enterococcus faecalis* do *Staphylococcus aureus* [31]. Od 1996 roku zaczęły pojawiać się doniesienia o izolacji na świecie szczepów gronkowca złocistego o obniżonej wrażliwości na wankomycynę, a w 2002 roku wykryto w USA szczepy odporne na ten antybiotyk [2, 10, 23, 54]. Mechanizm oporności gronkowców na glikopeptydy nie jest do końca wyjaśniony i nadal stanowi przedmiot licznych badań.

U gronkowców największe znaczenie z punktu widzenia klinicznego ma oporność na metycylinę. Wynika ona najczęściej z obecności genu *mecA* warunkującego syntezę nowego PBP, tzw PBP2' lub 2a. Białko to przejmując funkcje inaktywowanych przez antybiotyki β-laktamowe białek PBP2 i PBP3 niezbędnych do prawidłowej syntezy mureiny ściany komórkowej [4,42]. Ze względu na liczbę komórek, w których geny oporności ulegają ekspresji w warunkach standardowych szczepy *S. aureus* można podzielić na homogenne i heterogenne. Używamy w praktyce wskaźnikiem jest oporność na metycylinę lub oksacylinę - penicyliny odporne na penicylinazy gronkowcowe.

Aktywne usuwanie związku z komórki

Ważnym i szeroko rozpowszechnionym wśród drobnoustrojów mechanizmem oporności na różnego rodzaju związki (w tym chemioterapeutyki) jest czynne usuwanie

ich z wnętrza komórki (pompa błonowa - "efflux mechanism"). Jest to spowodowane obecnością transporterów błonowych (białek) zależnych od energii pochodzącej z ATP lub z pompy protonowej (PMF - proton motive force) [15,27,29]. Wśród białek błonowych można wyróżnić kilka rodzin, które różnią się liczbą segmentów transmembranowych.

Do białek zależnych od ATP należy rodzina transporterów wiążących ATP tzw. transportery kasetonowe ABC, o charakterze P-glikoprotein [34,44]. Uczestniczą one w aktywnym usuwaniu licznych związków przeciwnowotworowych z komórek zmienionych, niektóre warunkują oporność na antybiotyki, np. u gronkowców oporność na makrolidy i streptograminy B [30].

Do białek czerpiących energię z pompy protonowej należą 3 rodziny: MFS (major facilitator superfamily), RND (resistance-nodulation-division) oraz SMR (small multidrug resistance family) [35,38,39].

Do rodziny MFS należą białka posiadające 12 segmentów transmembranowych (podrodzina 12-TMS) oraz 14 segmentów (podrodzina 14-TMS). Do 12-segmentowych transporterów należą np. białka Tet (A, B, C, D, E, G, H) odpowiedzialne z oporność wielu rodzajów drobnoustrojów na tetracykliny oraz białek Blt i Bmr odpowiadających za oporność *Bacillus subtilis* na chloramfenikol a także środki antyseptyczne [28].

Ważną rolę w oporności gronkowców na fluorochinolony odgrywa ich aktywne usuwanie z komórki. Odpowiedzialne za to jest białko NorA, zlokalizowane w błonie cytoplazmatycznej i będące produktem genu *norA* [12,13]. Należy ono również do rodziny MFS białek transportowych. Wykazano, że wzrost ilości białka NorA u gronkowców w rezultacie zwiększonej transkrypcji genu powoduje nie tylko oporność na fluorochinolony, ale obniża wrażliwość na tak różne strukturalnie związki jak cetrymid, bromek etydydny czy akryflawina [11,13].

Białka podrodziny 14-TMS to np. TetK, TetL (oporność *S. aureus* i gronkowców koagulazoujemnych na tetracykliny), LfrA (oporność *Mycobacterium smegmatis* na fluorochinolony, bromek etydydny i akryflawinę), QacA i QacB (oporność gronkowców na IV-rzędowe związki amoniowe) [18,36].

W przypadku tetracyklin jeden z mechanizmów oporności *S. aureus* związany jest ze zmniejszeniem ich wewnątrzkomórkowego stężenia na skutek specyficznego mechanizmu usuwania [20]. Odpowiedzialne za nią jest białko TetK należące do rodziny MFS transporterów błonowych. Oporność indukcyjna na tetracykliny (z wyjątkiem półsyntetycznej minocykliny) kodowana jest przez małe plazmidy, natomiast oporność konstytutywna (na wszystkie tetracykliny) przez determinanty chromosomalne *tetM* i nie jest związana z pompą błonową tylko z aktywną ochroną rybosomu [8,20].

Do rodziny SMR transporterów błonowych należą białka o 4 lub 10 segmentach transmembranowych (4-TMS i 10-TMS) [14,39]. Do 4-TMS należą białka Smr (QacC, QacD, EBR, QacH - występujące u gronkowców, QacE - u *K. pneumoniae*, QacE-Δ1 - u pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*), które są odpowiedzialne są za czynne usuwanie z komórki środków dezynfekcyjnych. Rodzina RND zawiera trójskładnikowe systemy białek z 12 segmentami transmembranowymi, występujące u bakterii Gram-ujemnych, o

bardzo szerokim zakresie substratowym. Odpowiedzialne są m.in. za aktywny wypływ antybiotyków i innych chemioterapeutyków, inhibitorów metabolizmu, a także barwników, detergentów i rozpuszczalników [29,30]. W procesie aktywnego usuwania uczestniczy układ 3 białek: transportujące lek przez błonę cytoplazmatyczną, transportujące go w przestrzeni periplazmatycznej oraz tworzące kanał w błonie zewnętrznej, odpowiadające za usunięcie leku. Do transporterów takich należą np. białka ArcB/ArcA/TolC, MexB/MexA/OprM występujące u pałeczek Gram-ujemnych, odpowiedzialne za usuwanie z komórki niektórych antybiotyków czy antyseptyków.

Oporność gronkowców na środki dezynfekcyjne i antyseptyczne

Z licznych prac wynika, że zwiększenie oporności/tolerancji na niektóre związki, w tym środki dezynfekcyjne i antyseptyki (IV-rzędowe związki amoniowe, bromek etyldyny, diamidyny, triclosan, pochodne akrydynowe), jest powiązane z obecnością w komórce plazmidów niosących geny oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe [47,53]. Podobnie jak w przypadku niektórych antybiotyków także oporność gronkowców na kationowe środki dezynfekcyjne i antyseptyczne wymienione powyżej może być spowodowana czynnym usuwaniem ich z komórki (pompa błonowa - "efflux").

Podwyższony poziom oporności na organiczne kationy w tym IV-rzędowe sole amoniowe jest rozpowszechniony szczególnie wśród szczepów metycylinoopornych gronkowców złocistych [18,22,45,50,55]. Jest to związane z występowaniem dwóch rodzin genów: MFS (*qacA* i *B*) oraz SMR (*qacC* i *D*), zlokalizowanych na plazmidach [17,18,22,32,53]. Geny *qacA* i *qacB* kodują zależny od pompy protonowej transport białek i są odpowiedzialne za wysoki poziom oporności na IV-rzędowe związki amoniowe, bromek etyldyny, akryflawinę. Produkty tych genów, białka QacA i QacB należą do rodziny MFS. Gen *qacA* występuje na plazmidach, ale może także być zlokalizowany na chromosomie, zwłaszcza u izolatów klinicznych [9,22]. Gen *qacB* występuje na plazmidach oporności na sole metali ciężkich [22,55]. Gen *ebr* (oporność na bromek etyldyny), geny *qacC* i *qacD* odpowiadają za syntezę białek Smr (Ebr, QacC, QacD) należących do rodziny SMR transporterów błonowych. Geny *ebr*, *smr*, *qacC* i *qacD* kodują identyczne fenotypy i odpowiadają za niski poziom oporności na środki dezynfekcyjne i antyseptyki. Z badań doświadczalnych wynika, że duplikacja genu *ebr* w komórce powoduje zwiększony poziom oporności na bromek etyldyny i różne antyseptyki [47].

Wielokrotnie potwierdzono, że szczepy gronkowców MRSA są kilkakrotnie bardziej odporne na chlorheksydynę i IV-rzędowe zasady amoniowe w porównaniu ze szczepami metycylinowrażliwymi (MSSA). Niektórzy autorzy wykazywali korelację między zwiększonym poziomem oporności (MIC) szczepów *S. aureus* na oksacylinę, a opornością na niektóre antyseptyki jak np. chlorheksydyna, chlorek benzalkoniowy czy akryflawina [41,45,49,55].

Oporność gronkowców na sole metali ciężkich

Na plazmidach penicylinazowych bardzo często zlokalizowane są determinanty oporności na chemioterapeutyki, a także na sole metali ciężkich (Tabela 1). Oporność na sole kadmu jest najbardziej charakterystyczna dla takich

plazmidów zarówno u szczepów klinicznych gronkowców jak i izolowanych z materiałów pozaszpitalnych.

Oporność *S. aureus* na sole kadmu jest kodowana przez plazmidowe determinanty *cadA*, *cadB* i *cadC*. Produkt genu *cadA* nadaje także komórkom oporność na jony cynku. Oporność kodowana przez *cadA* jest związana z mechanizmem aktywnego usuwania substancji, który chroni komórki przed nadmierną kumulacją toksycznych związków [8,20].

Oporność na arseniany jest również kodowana plazmidowo i podobnie jak w przypadku kadmu polega na czynnym usuwaniu z komórki, jednak energia czerpana jest z ATP, a nie zależy od pompy protonowej [20]. Determinanty oporności na związki arsenu i antymonu zlokalizowane są często na plazmidach penicylinazowych.

Oporność na sole rtęci występuje u gronkowców powszechnie i jest kodowana przez plazmidowe geny *merA* (Hg^{2+}) i *merB* (połączenia organiczne).

W inaktywowaniu związków organicznych rtęci gronkowców bierze udział liza organortęciowa, która rozszczepia połączenia rtęci z węglem do jonów Hg^{2+} , które następnie są zamieniane w mniej toksyczną i bardziej lotną rtęć metaliczną [43]. W tym ostatnim procesie uczestniczy reduktaza rtęciowa, która warunkuje oporność na nieorganiczne sole rtęci. Biosynteza obydwu tych enzymów indukowana jest przez jony Hg^{2+} , octan fenylortęciowy i różne inne związki rtęci organicznej, które nie koniecznie stanowią dla nich substraty. Regionowi warunkującemu oporność na rtęć przypisuje się dużą rolę w zmienności plazmidów penicylinazowych ponieważ w tym rejonie występują liczne sekwencje insercyjne [20].

Podsumowanie

Bardzo szybko narastająca w ostatnich latach oporność drobnoustrojów, w tym gronkowców na chemioterapeutyki oraz powszechnie stosowane środki dezynfekcyjne stanowi poważny problem współczesnej medycyny. Ciągłe poszukuje się nowych możliwości leczenia zakażeń wywołanych przez coraz bardziej odporne bakterie.

Ostatnio duże nadzieje budzi zastosowanie nowych antybiotyków z grupy oksazolidonów, streptogramin oraz cyklicznych polipeptydów. Przedstawicielem oksazolidonów jest Linezolid, hamujący syntezę białek bakteryjnych, posiadający wysoką aktywność wobec wielolekoopornych szczepów bakterii Gram-dodatnich w tym gronkowców [3,46,51]. Synercid jest półsyntetycznym antybiotykiem złożonym z pochodnych naturalnych streptogramin A i B - chinupristyny i dalfopristyny. Wykazuje działanie wobec metycylinoopornych szczepów *S. aureus* (MRSA) [46,56]. Cykliczny polipeptyd - daptomycyna posiada szerokie spektrum działania przeciw bakteriom Gram-dodatnim, w tym również jest aktywna wobec opornych na wankomycynę enterokoków oraz szczepów MRSA o zmniejszonej wrażliwości na glikopeptydy [46].

Trzeba się jednak liczyć z faktem, że problem oporności drobnoustrojów prędzej czy później będzie również dotyczyć nowych, w tym wymienionych tu leków. Poważnym problemem będzie także, już stwierdzone, narastanie oporności *S. aureus* na powszechnie stosowane środki dezynfekcyjne i antyseptyczne.

WYKAZ SKRÓTÓW

kpb	- tysiąc par zasad
ESBL	- β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym
BORSA	- szczepy <i>S. aureus</i> o zwiększonej oporności na penicyliny (<i>borderline resistant</i>)
MODSA	- szczepy <i>S. aureus</i> o umiarkowanej oporności na penicyliny (<i>moderate resistant</i>)
MRSA	- metycylinooporne szczepy <i>S. aureus</i>
ATP	- adenozynotrifosforan
PMF	- <i>proton motive force</i>
MFS	- <i>major facilitator superfamily</i>
RND	- <i>resistance-nodulation-division</i>
SMR	- <i>small multidrug resistance family</i>

BIBLIOGRAFIA

- CDC. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin - United States, 2002. MMWR, 2002, 51 (26), 565-567
- CDC. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin - United States, 1997. MMWR, 1997, 46 (33), 765
- Chien J. W., Kucia M. L., Salata R. A. 2000. Use of linezolid, an oxazolidinone, in the treatment of multidrug-resistant gram-positive bacterial infections. Clin. Infect. Diseases. 30: 146-151
- De Lencastre H., de Jonge B. L., Matthews P. R., Tomasz A. 1994. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 33: 7-24
- Dzierżanowska D. Antybiotykoterapia w zakażeniach szpitalnych. W: Zakażenia szpitalne. Red. Dzierżanowska D., Jeljaszewicz J. Alfa-Medica Press 1999. 517-534
- Dzierżanowska D., Murawska B. 1998. Rola metycylinoopornych gronkowców (MRSA) w zakażeniach szpitalnych. Terapia 9: 16-19
- Firth N., Skurray R. A. 1998. Mobile elements in the evolution and spread of multiple-drug resistance in staphylococci. Drug Resistance Updates. 1: 49-58
- Foster T. J. 1983. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. Microbiol. Rev. 47:361-409
- Gillespie M. T., May W., Skurray R. A. 1986. Plasmid-encoded resistance to acriflavine and quaternary ammonium compounds in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett. 34: 47-51
- Hiramatsu K., Hanaki H., Ino T., Tabata T., Oguri T., Tenover F. C. 1997. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains with reduced vancomycin susceptibility. J. Antimicrob. Chemother. 40, 135-146
- Hsieh P-Ch., Siegel S. A., Rogers B., Davis D., Lewis K. 1998. Bacteria lacking a multidrug pump: a sensitive tool for drug discovery. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 6602-6606
- Kaatz G. W., Seo S. M., O'Brien L., Wahiduzzaman M., Foster T. J. 2000. Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 1404-1406
- Kaatz G. W., Seo S. M., Ruble Ch.A. 1993. Efflux-mediated fluorochinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 1086-1094
- Kazama H., Hamashima H., Sasatsu M., Arai T. 1998. Distribution of the antiseptic-resistance gene *qacE ϕ 1* in Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 165: 295-299
- Levy S. B. 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 36: 695-703
- Linares J. 2001. The VISA/GISA problem: therapeutic implications. Clin. Microbiol. Infect. 7 Suppl. 4: 8-15
- Littlejohn T. G., Rouch D. A., Cram D. S., Di Bernardino D., Skurray A. Molecular and sequence analysis of *qacA* specifying antiseptic/disinfectant resistance in staphylococci. W: Molecular Biology of the Staphylococci, eds. R.P. Novick. VCH Publishers Inc. 1990, New York, 175-180
- Littlejohn T. G., Paulsen I. T., Gillespie M. T., Tennet J. M., Midgley M., Jones I. G., Purewal A. S., Skurray R. A. 1992. Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett. 95: 259-266
- Livermore D. M. 1995. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev. 8: 557-584
- Lyon B. R., Skurray R. A. 1987. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. Microbiol. Rev. 51: 88-134
- Łęski T., Hryniewicz W. 1999. Mupirocyna - natura chemiczna oraz jej zastosowanie w leczeniu zakażeń bakteryjnych. Nowa Klinika. 6: 533-536
- McDonnell G., Russell A. D. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. Clin. Microbiol. Rev. 12: 147-179
- McManus J. 1999. Vancomycin resistant staphylococcus reported in Hong Kong. BMJ, 318, 626
- Młynarczyk A., Młynarczyk G., Jeljaszewicz J. 1999. Charakterystyka plazmidów penicylinazowych u szczepów *Staphylococcus aureus*. Med. Dośw. Mikrobiol. 51: 1-8
- Młynarczyk A. Mechanizmy oporności na makrolidy, streptograminy i linkozamidy. Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Oddział Warszawski, 11 grudzień 2001.
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Kobayashi G. S., Pfaller M. A. 1998. Medical Microbiology 3rd Edition, 160-168, 175-188
- Neyfakh A. A. 1997. Natural functions of bacterial multidrug transporters. Trends Microbiol. 5: 309-313
- Neyfakh A. A. 1992. The multidrug efflux transporter of *Bacillus subtilis* is a structural and functional homolog of the *Staphylococcus* NorA protein. Antimicrob. Agents Chemother. 36: 484-485
- Nikaido H. 1996. Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 178: 5853-5859
- Nikaido H. 1998. Multiple antibiotic resistance and efflux. Curr. Opin. Microbiol. 1: 516-523
- Noble W. C., Viarani Z., Cree R. 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett. 93, 195-198
- Noguchi N., Hase M., Kitta M., Sasatsu M., Deguchi K., Kono M. 1999. Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett. 172: 247-253
- Novick R.P. 1990. The *Staphylococcus* as a molecular genetic system. W: Molecular biology of the staphylococci Red. P. Novick, R. A. Skurray. VCH Publishers, Inc. New York, 1-37
- Otto M., Gotz F. 2001. ABC transporters of staphylococci. Res. Microbiol. 152 (3-4): 351-6
- Pao S. S., Paulsen I. T., Saier M. H. Jr. 1998. Major facilitator superfamily. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 1-34
- Paulsen I. T., Brown M. H., Littlejohn T. G., Mitchell B. A., Skurray R. A. 1996. Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*; Membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 3630-3635
- Paulsen I. T., Firth N., Skurray R. A. 1997. Resistance to antimicrobial agents other than β -lactams. W: The Staphylococci in human disease. Red. K. B. Crossley, G. L. Archer. Churchill Livingstone, New York. 175-212
- Paulsen I. T., Brown M. H., Skurray R. A. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiol. Rev. 60: 575-608
- Paulsen I. T., Skurray R. A., Tam R., Saier M. H. Jr, Turner R. J., Weiner J. H., Goldberg E. B., Grinius L. L. 1996. The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. Mol. Microbiol. 19: 1167-1175
- Ramsey M. A., Bradley S. F., Kauffman C. A., Morton T. M. 1996. Identification of chromosomal location of *mupA* gene, encoding lowlevel mupirocin resistance in staphylococcal isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 40 (12): 2820-2823
- Reverdy M. -E., Bes M., Brun Y., Fleurette J. 1992. Activity of four antiseptics (acriflavine, benzalconium chloride, chlorhexidine digluconate, hexamidine di-isethionate) and of ethidium bromide on 392 strains representing 26 *Staphylococcus* species. Med. Microbiol. Lett. 1: 56-63.
- Reynolds P. E., Fuller C. 1986. Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*; presence of identical additional penicillin-

- binding protein in all strains examined. FEMS Microbiol. Lett. 33: 251-254
43. Robinson J. B., Tuovinen O. H. 1984. Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical and genetic analyses. Microbiol. Rev. 48: 95-124
44. Ross J. I., Esdy E. A., Cove J. H., Baumberg S. 1995. Identification of a chromosomally encoded ABC-transport system with which the staphylococcal erythromycin exporter MsrA may interact. Gene. 153: 93-98
45. Russell A. D., Maillard J. -Y., Furr J.R. 1998. Possible link between bacterial resistance and use of antibiotics and biocides. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2151
46. Rybak J. M., Hershberger E., Moldovan T., Grucz R. G. 2000. In vitro activities of daptomycin, vancomycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin against staphylococci and enterococci, including vancomycin-intermediate and -resistant strains. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 1062-1066
47. Sasatsu M., Shibata Y., Noguchi N., Kono M. 1992. High-level resistance to ethidium bromide and antiseptics in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett. 93: 109-114
48. Shaw K. J., Rather P. N., Hare R. S., Miller G. H. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationship of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiol. Rev. 57: 138-163
49. Stefańska J. 2000. Występowanie i rozprzestrzenianie się u *Staphylococcus aureus* determinant oporności na antybiotyki oraz inne związki o aktywności przeciwbakteryjnej. Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej AM w Warszawie. Rozprawa doktorska
50. Stefańska J., Młynarczyk G., Młynarczyk A., Starościak B., Łuczak M. 2002. Oporność szczepów *Staphylococcus aureus* na czwartorzędowe sole amoniowe i chlorheksydyne. Med. Dośw. Mikrobiol. 54, 191-197
51. Suresh J. A., Bitter K., Moreland T., Raudales F., Diaz-Luna H. 1999. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection in a renal recipient treated successfully with a novel new antimicrobial agent (linezolid): new treatment opinions for infections due to resistant organisms. Clin. Infect. Dis. 29: 1341-1342
52. Tanaka M., Sato K., Kimura Y., Hayakawa I. 1991. Inhibition by quinolones of DNA gyrase from *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1489-1491
53. Tennen J. M., Lyon B. R., Midgley M., Jones J. G., Purewal A. S., Skurray R. A. 1989 Physical and chemical characterisation of the *qacA* gene encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol. 135: 1-10
54. Tracolsomboon S., Danchaivijitr S., Rongrungruang Y., Dhiraputra C., Sasaemgrat W., Ito T., Hiramatsu K. 2001. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Thailand. JMC, 39, 591-595
55. Yamamoto T., Tamura Y., Yokota T. 1988. Antiseptic and antibiotic resistance plasmid in *Staphylococcus aureus* that possesses ability to confer chlorhexidine and acrinol resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 32: 932-93
56. Zarrouk V., Bozdogan B., Leclercq R., Garry L., Carbon C., Fantin B. 2000. Influence of resistance to streptogramin A type antibiotics on the activity of quinupristin-dalfopristin in vitro and experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 1168-1173