

Marcin Zmudziński, Eugenia Gospodarek

Katedra i Zakład Mikrobiologii, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel. (052) 585 34 81, 585 44 80, e-mail: kiemikrob@cm.umk.pl

Wpłynęło w czerwcu 2005 r.

1. Wprowadzenie. 2. Antybiotyki aktywne wobec pałeczek *Acinetobacter* spp. 3. Antybiotykoterapia złożona w leczeniu zakażeń wywołanych przez pałeczki *Acinetobacter* spp. 4. β -laktamazy pałeczek *Acinetobacter* spp. 4.1. Klasa A β -laktamaz. 4.2. Klasa B β -laktamaz. 4.3. Klasa C β -laktamaz. 4.4. Klasa D β -laktamaz. 5. Zmiana białek wiążących penicyliny. 6. Zmiana przepuszczalności osłon komórkowych. 7. Wpływ („efflux”) antybiotyków z wnętrza komórki. 8. Podsumowanie

Mechanisms of resistance to β -lactams in *Acinetobacter* spp.

Abstract: *Acinetobacter* spp. has emerged as a serious nosocomial pathogen in many countries mainly due to its resistance to β -lactams, which are the most frequently used antibiotics. These bacteria appears to have a propensity for developing antibiotic resistance extremely fast. Many mechanisms of resistance to β -lactams have been identified in this species.

Acinetobacter spp. is responsible for the production of all classes of β -lactamases. The most important β -lactamases are cephalosporinases, which are C class β -lactamases, A class β -lactamases, OXA enzymes, which are D class β -lactamases and B class β -lactamases also known as metallo- β -lactamases. ESBL, related to the narrow spectrum TEM and SHV type β -lactamases, have not yet been detected in *Acinetobacter* spp. The only type of ESBL identified in this agent were non-TEM and non-SHV type ESBL: PER, VEB and CTX-M. *Acinetobacter* spp. all produce OXA-type β -lactamases that hydrolyze carbapenems OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, OXA-51 and OXA-58, which have already been identified and described.

Other mechanisms include alteration of PBPs and the reduction of penetration rate across the outer membrane. Combination of these two mechanisms with the production of OXA-type β -lactamases or with class C cephalosporinases can lead to resistance to carbapenems. The reduced expression of PBPs or loss of some outer membrane proteins are related to the increased MIC of carbapenems. Efflux pump system does not appear to influence the resistance to β -lactams. The most active agents against *Acinetobacter* spp. in this group are imipenem, meropenem, ampicillin or cefaperazon with sulbactam and colistin. Combination therapy can be effective in patients with severe infections caused by multidrug resistant strains of *Acinetobacter* spp.

1. Introduction. 2. The most active agents against *Acinetobacter* spp. 3. Combination therapy in treating infections caused by *Acinetobacter* spp. 4. β -lactamases in *Acinetobacter* spp. 4.1. Class A β -lactamases. 4.2. Class B β -lactamases. 4.3. Class C β -lactamases. 4.4. Class D β -lactamases. 5. Alterations of penicillin-binding proteins. 6. Efflux pump system. 7. Loss of outer membrane proteins. 8. Summary

Słowa kluczowe: *Acinetobacter*, β -laktamowe antybiotyki, β -laktamazy, PBP

Key words: *Acinetobacter*, β -lactam antibiotics, β -lactamases, PBP

1. Wprowadzenie

W ostatnim trzdziestoleciu zaobserwowano znaczny wzrost udziału pałeczek *Acinetobacter* spp. w zakażeniach szpitalnych. Związane jest to ze spadkiem odporności populacji ludzkiej oraz wzrostem oporności tych bakterii na antybiotyki [6, 18, 30, 63], co wynika z szerokiego stosowania antybiotyków zwykle w sposób niekontrolowany w prewencji i leczeniu zakażeń, jak również z rozwoju medycyny, wykorzystującej coraz częściej inwazyjne metody diagnostyczne i lecznicze. Wzrost znaczenia pałeczek *Acinetobacter* spp. w zakażeniach szpitalnych ma związek z szybką zdolnością tych bakterii do wytwarzania oporności pod wpływem presji antybiotykowej. Zdolność tą uzyskały na drodze ewolucji w środowisku naturalnym w wyniku współzawodnictwa z innymi gatunkami bakterii, wytwarzającymi różne substancje

przeciwdrobnoustojowe. Pałeczki *Acinetobacter* spp. mają także możliwość przeżycia w różnorodnych środowiskach, często ubogich w związki odżywcze wykazując stosunkowo małą wrażliwość na niekorzystne warunki fizyko-chemiczne [29].

Bakterie najczęściej nabywają oporność na antybiotyki w wyniku mutacji w genach chromosomalnych lub plazmidowych oraz przekazywania genów warunkujących oporność. Przekazywanie to może przebiegać zarówno poziomo jak i pionowo. Po pojawieniu się mutacji dochodzi do selekcji szczepów posiadających nowe czynniki oporności. Ostatni mechanizm ma największy wpływ na rozprzestrzenienie się bakterii wykazujących lekooporność. U pałeczek *Acinetobacter* spp. opisano wszystkie znane sposoby przekazywania genów oporności na antybiotyki, jednak najważniejszym sposobem ich przekazywania między szczepami tego rodzaju prawdopodobnie jest koniugacja [6].

Uważa się, że potencjał antybiotykooporności istniał od dawna. Jest on obecny wśród szczepów dziko żyjących, ulega ekspresji i licznym modyfikacjom w warunkach selektywnej presji wywołanej przez stosowane środki przeciwbakteryjne [6]. Taka presja spotęgowana jest niewątpliwie w środowisku szpitalnym. Sprzyja to promocji gatunków wykazujących łatwość nabywania nowych mechanizmów oporności, czyli szybko przystosowujących się do zmieniających się warunków. Do takich bakterii należą niewątpliwie pałeczki *Acinetobacter* spp.

Antybiotykami najpowszechniej stosowanymi w praktyce klinicznej, do leczenia zakażeń wywołanych przez pałeczki *Acinetobacter* spp. i jednocześnie wywołującymi najmniej objawów ubocznych, są β -laktamy. Oporność na te antybiotyki wśród szczepów *Acinetobacter* spp. związana jest z czterema mechanizmami:

- wytwarzaniem β -laktamaz,
- zmianami w białkach wiążących penicyliny (penicillin binding proteins, PBP),
- zmianą przepuszczalności osłon komórkowych poprzez wytwarzanie zmniejszonej liczby białek porynowych (outer membrane proteins, OMP), oraz
- wypływem („efflux”) antybiotyków z wnętrza komórki.

Najważniejszym mechanizmem oporności na antybiotyki β -laktamowe u pałeczek *Acinetobacter* spp. jest wytwarzanie β -laktamaz [6]. Geny warunkujące wytwarzanie tych enzymów mogą być kodowane na plazmidach (enzymy IMP, VIM) lub chromosomach (enzymy OXA). Zmiany w PBP i zmiana przepuszczalności osłon komórkowych kodowana jest przez geny zlokalizowane na chromosomie [63].

2. Antybiotyki aktywne wobec pałeczek *Acinetobacter* spp.

Najczęściej izolowanym i wykazującym największą oporność na antybiotyki spośród gatunków pałeczek *Acinetobacter* spp. jest *Acinetobacter baumannii*. Pozostałe gatunki, do których zalicza się, *A. haemolyticus*, *A. calcoaceticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. radioresistens* i inne opisane dotychczas grupy DNA, wykazują większą wrażliwość na stosowane w leczeniu antybiotyki [34, 67]. Jest ona zróżnicowana zależnie od pochodzenia szczepów, tj. kraju, z którego dany szczep został wyizolowany, ośrodka leczniczego, a nawet oddziału tego samego szpitala. Te różnice są odbiciem sytuacji epidemiologicznej i polityki antybiotykowej prowadzonej w danym ośrodku [6, 29]. Houan g i wsp. [34] wykazali znaczące różnice w wrażliwości na antybiotyki wśród szczepów pałeczek należących do kompleksu *A. calcoaceticus* – *A. baumannii*, izolo-

wanych z tych samych oddziałów szpitalnych, a nawet od pacjentów, czy personelu jednego oddziału.

Według badań przeprowadzonych przez V i s a l l i i wsp. [67], dotyczących oporności *Acinetobacter* spp. na antybiotyki β -laktamowe, najwyższą aktywność wobec tych pałeczek wykazuje imipenem (99,2% wrażliwych szczepów). Badali oni także skuteczność połączeń penicylin z inhibitorami β -laktamaz. Najskuteczniejszym połączeniem okazała się ampicylina z sulbactamem (86,9%). Nieco mniejszą skuteczność stwierdzono dla połączenia tikarcyliny z kwasem klawulanowym i piperacyliny z tazobaktamem, odpowiednio u 85,7% i 84,8% szczepów badanych. Zdecydowanie najmniejszą aktywność, wynoszącą 54,4%, stwierdzono dla amoksycyliny z kwasem klawulanowym. Wysoką skuteczność wobec pałeczek *Acinetobacter* spp. wykazują połączenia sulbaktamu nie tylko z ampicyliną, ale także z cefaperazonem [38, 69]. Sulbaktam hamuje katalityczne działanie enzymów β -laktamowych wiążąc się nieodwracalnie z ich miejscem aktywnym [38]. W porównaniu do tazobaktamu i kwasu klawulanowego, wykazuje on największą aktywność w stosunku do *Acinetobacter* spp. [38, 52]. Sulbaktam oprócz wpływu inhibicyjnego w stosunku do β -laktamaz, posiada również aktywność przeciw tym pałeczkom po związaniu się z białkiem PBP2.

Badania nad opornością pałeczek *Acinetobacter* spp. przeprowadzono również w Polsce [29, 30]. Wyniki wskazują, że najbardziej aktywnymi antybiotykami wobec szczepów izolowanych z polskich szpitali są imipenem, nitroksolina, netilmicyna i ampicylina z sulbactamem.

Antybiotykem ostatniej szansy w leczeniu ciężkich zakażeń wywołanych szczepami rodzaju *Acinetobacter* wykazującymi oporność na β -laktamy, w tym na karbapenemy, jest kolistyna. Ma ona jednak toksyczne działanie na organizm człowieka i nie daje możliwości stosowania terapii sekwencyjnej, ponieważ musi być podawana paraenteralnie [37, 46, 58].

3. Antybiotykoterapia złożona w leczeniu zakażeń wywołanych przez pałeczki *Acinetobacter* spp.

Ostatnie doniesienia sugerują dużą skuteczność antybiotykoterapii złożonej [6, 25, 43]. Znaczący udział mają w niej antybiotyki β -laktamowe. Takie leczenie zmniejsza ryzyko wytwarzania oporności, tak jak ma to miejsce w monoterapii, zmniejsza toksyczność stosowanych antybiotyków oraz podnosi skuteczność leczenia antybakteryjnego. Ma to istotne znaczenie wobec faktu szybkiego wytwarzania przez szczepy pałeczek *Acinetobacter* spp. nowych mechanizmów oporności na antybiotyki.

β -laktamy, z uwagi na ich mechanizm działania, stosuje się w skojarzeniu z wieloma antybiotykami nie β -laktamowymi. Opisano skuteczność połączeń antybiotyków β -laktamowych z między innymi aminoglikozydami, fluorochinolonami [6, 25, 45]. Stwierdzono zwiększoną aktywność lewofloksacyliny i ciprofloksacyliny w połączeniu z cefalosporynami III i IV generacji takimi, jak ceftazidim i cefepim, a także wymienionych fluorochinolonów z piperacyliną z tazobaktamem oraz imipenemem [25]. Opisano również synergizm między połączeniami β -laktamów (imipenemu, ampicyliny z sulbaktamem i tikarcyliny z kwasem klawulanowym) z aminoglikozydami (tobramycyną i amikacyną) [43]. W stosowaniu antybiotykoterapii złożonej wobec zakażeń wywołanych przez pałeczki *Acinetobacter* spp. rekomendowanymi przez większość badaczy antybiotykami są penicyliny i cefaloporyny o szerokim zakresie działania, a także karbapenemy w skojarzeniu głównie z aminoglikozydami i fluorochinolonami. Terapia złożona wydaje się być postępowaniem z wyboru w leczeniu ciężkich zakażeń wywołanych przez wielolekooporne szczepy *Acinetobacter* spp.

4. β -laktamazy pałeczek *Acinetobacter* spp.

U pałeczek *Acinetobacter* spp. opisano β -laktamazy o zróżnicowanym zakresie działania, występowaniu i oporności na inhibitory β -laktamaz. Wszystkie powodują hydrolizę wiązania amidowego w pierścieniu β -laktamowym [31]. Podobne enzymy są identyfikowane wśród innych Gram-ujemnych pałeczek, np. *Pseudomonas* spp. Nasuwa to przypuszczenie, co do ich wspólnego pochodzenia. β -laktamazy pałeczek *Acinetobacter* spp. należą generalnie do enzymów wytwarzanych konstytutywnie. Rzadziej są to enzymy indukowane. Wiąże się to z możliwością natychmiastowej reakcji na obecność antybiotyku w środowisku i jego szybką inaktywacją.

Obecnie najczęściej używane są dwie klasyfikacje β -laktamaz: wg Bush i Amblera [4, 14, 16]. Klasyfikacja Bush to podział funkcjonalny uwzględniający hydrolityczne właściwości różnych enzymów w stosunku do β -laktamów. Natomiast klasyfikacja Amblera jest podziałem strukturalnym, opierającym się na sekwencjach aminokwasowych enzymów hydrolizujących β -laktamy. Oba systemy klasyfikacji w dużej mierze pokrywają się. Podział β -laktamaz wytwarzanych przez pałeczki *Acinetobacter* spp. w niniejszej pracy został oparty na klasyfikacji Amblera.

4.1. Klasa A β -laktamaz

Do klasy A β -laktamaz wg Amblera zalicza się enzymy zwane β -laktamazami o szerokim zakresie działania (broad spectrum β -lactamases), np. SHV,

TEM. Występują one powszechnie wśród pałeczek rodziny *Enterobacteriaceae* i to z nich najczęściej powstają β -laktamazy o rozszerzonym zakresie działania (extended spectrum β -lactamases, ESBL) [11, 28, 61]. U pałeczek *Acinetobacter* spp. dotychczas nie opisano tego typu enzymów. Wykryto jednak ESBL inne niż TEM i SHV, zaliczane do PER, VEB, a w ostatnim czasie CTX-M [11, 48, 61]. Są to jedyne β -laktamazy typu ESBL opisane dotychczas u rodzaju *Acinetobacter*.

PER-1 to β -laktamaza typu ESBL kodowana plazmidowo. Gen odpowiedzialny za syntezę tego enzymu zidentyfikowano również na chromosomie [64, 70]. PER-1 hydrolizuje penicyliny i cefalosporyny, w tym także IV generacji. Pierwotnie enzym ten opisano u *Pseudomonas aeruginosa* we Francji, a następnie także wśród szczepów *A. baumannii* w Turcji i we Włoszech [11, 64]. Do niedawna uważano, że występuje on jedynie u pałeczek *Acinetobacter* spp. izolowanych w Europie. W 2003 roku opisano jednak w Korei szczepy posiadające gen *bla*_{PER-1}, a odsetek ich występowania oceniono na 54,6% [70]. Dla porównania w Turcji odsetek ten był również bardzo wysoki i wynosił 46% [64]. Sugeruje to powszechne występowanie wśród pałeczek rodzaju *Acinetobacter* tego enzymu także w innych częściach świata.

Szczepy posiadające gen *bla*_{PER-1} należą do różnych klonów pałeczek *Acinetobacter* spp., jednak nie wyklucza to jednocześnie klonalnego rozprzestrzeniania się bakterii posiadających ten mechanizm oporności. Gen ten wykazuje zdolność do wbudowywania się w różne struktury genomu. Jego ekspresja fenotypowa wymaga odpowiedniej sekwencji promotorowej, która nie występuje u pałeczek *Escherichia coli*. Konjugacja tego genu do pałeczek *E. coli* nie spowoduje więc wytworzenia oporności na cefalosporyny IV generacji, które nie są generalnie objęte zakresem działania ESBL typu TEM i SHV.

Wytwarzanie β -laktamazy PER-1, oprócz oporności na cefalosporyny powoduje także brak skuteczności połączeń β -laktamów z sulbaktamem [64]. Dotyczy to nie tylko kombinacji sulbaktamu z ampicyliną, ale także jego połączenia z cefoperazonem, wprowadzonego ostatnio na rynek polski.

W 2003 roku Poirer i wsp. [56] opisali we Francji β -laktamazę VEB-1, kolejny enzym typu ESBL u pałeczek *Acinetobacter* spp. Jest on kodowany na integronie wbudowywanym w strukturę chromosomu bakteryjnego. Wcześniej wykazywano go u pałeczek *Enterobacteriaceae* i *Pseudomonas* spp. w południowo-wschodniej Azji [27]. *Acinetobacter* spp. jest pierwszą Gram-ujemną pałeczką izolowaną w Europie wytwarzającą ten enzym poza południowo-wschodnią Azją [56]. Sekwencja genowa integronu zawierającego gen *bla*_{VEB-1} u pałeczek *Acinetobacter* spp. jest identyczna, jak analogicznych integronów, występujących

u innych gatunków. Świadczy to o horyzontalnym przekazywaniu tego mechanizmu oporności.

W 2004 roku [48] u trzech pacjentów oddziału neurochirurgicznego opisano szczepy pałeczek *Acinetobacter* spp. wykazujące oporność na cefotaksym, ceftriakson, cefepidoksym, aztreonam, ale były one wrażliwe na ceftazidim i imipenem. Bakterie te wytwarzały β -laktamazę o rozszerzonym spektrum wrażliwą na kwas klawulanowy sklasyfikowaną jako CTX-M-2. Gen *bla*_{CTX-M-2} kodujący ten enzym zlokalizowany jest na plazmidzie, który występuje także u innych bakterii, np. u *Proteus mirabilis*. Jego ekspresja fenotypowa ma charakter indukcyjny.

Wytwarzanie enzymów ESBL u pałeczek *Acinetobacter* spp. wiąże się ze wzrostem MIC cefalosporyn (w tym również IV generacji). Wiąże się to z trudnościami w wykrywaniu β -laktamaz typu ESBL za pomocą powszechnie stosowanego w diagnostyce mikrobiologicznej testu dwóch krążków. Użycie ceftazidimu, cefotaksymu i aztreonamu w odległości 10 mm od środka krążka z inhibitorem β -laktamaz pozwala na wykrycie tylko części szczepów posiadających gen *bla*_{PER-1}. Dopiero użycie cefepimu i zmniejszenie odległości między krążkami do 5 mm zwiększa znacznie czułość testu. Dowodzą tego badania przeprowadzone przez Yon g i wsp. [70]. W pierwszym etapie doświadczeń, za pomocą testu dwóch krążków wykryto 17 z 53 szczepów z genem *bla*_{PER-1}. W drugim etapie, po wprowadzeniu opisanej modyfikacji, liczba wykrytych szczepów wzrosła do 52 z 53. Wadą opisanej metody są jednak, według autorów, niewielkie rozmiary stref zahamowania wzrostu, co utrudnia interpretację wyników. Może być to przyczyną zaniżenia wykrywalności enzymów typu ESBL u pałeczek *Acinetobacter* spp. Poirel i wsp. [56] uważają, że wiarygodność testu dwóch krążków w wykrywaniu ESBL u tych pałeczek można zwiększyć przez dodanie do podłoża kloksacyliny, która jest inhibitorem cefalosporynaz, wytwarzanych często jednocześnie z ESBL. Metoda ta, zdaniem autorów, powinna być stosowana powszechnie w diagnostyce mikrobiologicznej.

Enzymami należącymi do klasy A β -laktamaz, opisanymi u pałeczek *Acinetobacter* spp., które nie należą do ESBL, są CARB-5, TEM-1, TEM-2 oraz β -laktamazy podobne do SHV [6, 23, 53, 65]. Są to najczęściej, obok cefalosporynaz, występujące β -laktamazy u tych bakterii. CARB-5 (pI 6,3) kodowana jest na plazmidzie, hydrolizuje ampicylinę, karbenicylinę i cefalosporyny I generacji. Nie hydrolizuje natomiast meticyliny. Jest ona wrażliwa na kwas klawulanowy, sulbaktam, pCMB (p-chloromerkuribenat) oraz kloksacylinę [53]. Wysoka aktywność wobec karbenicyliny pozwala zakwalifikować ten enzym jako karbenicylinazę. TEM-1 (pI 5,4) oraz pozostałe wymienione enzymy także kodowane są plazmidowo i wykazują

wrażliwość na działanie kwasu klawulanowego [6]. Ich głównym substratem jest penicylina.

Biorąc pod uwagę różnorodność β -laktamaz klasy A należy przypuszczać, że geny kodujące te enzymy będą ulegały dalszym mutacjom, prowadzącym do powstania kolejnych szczepów opornych. Taką właściwość wykazują szczególnie enzymy typu TEM i SHV, co uwarunkowane jest trzema głównymi ich właściwościami: znacznym rozpowszechnieniem wśród pałeczek Gram-ujemnych, powstawaniem ich w bardzo dużych ilościach oraz możliwością mutacji w kierunku enzymów o coraz szerszym zakresie substratowym [28]. Enzymy tego typu opisano już wśród niefermentujących pałeczek *P. aeruginosa* [47, 49]. Pojawienie się wśród pałeczek *Acinetobacter* spp. ESBL typu TEM i SHV jest wysoce prawdopodobne i wydaje się być tylko kwestią czasu.

Dotychczas u pałeczek rodzaju *Acinetobacter* nie opisano β -laktamaz hydrolizujących karbapenemy, które należałyby do klasy A według A m b l e r a.

4.2. Klasa B β -laktamaz

Klasa B to metalo- β -laktamazy, w skrócie nazywane MBL, do których zalicza się IMP i VIM. W odróżnieniu od β -laktamaz serynowych, do których należą wszystkie pozostałe klasy β -laktamaz, zawierają one w miejscu aktywnym dwuwartościowy jon cynku i dlatego są hamowane przez EDTA. Są one jednocześnie odporne na działanie inhibitorów β -laktamaz [15, 35]. Hydrolizują penicyliny, cefalosporyny i karbapenemy. Mimo tak szerokiego zakresu działania nie rozkładają aztreonamu.

Pierwszy enzym typu IMP wykryto i opisano na początku lat 90. XX wieku w Japonii u pałeczek *P. aeruginosa* i *Serratia marcescens* [51, 68]. Został on nazwany IMP-1. Wkrótce potem opisano ten enzym u wielu gatunków bakterii w innych krajach, w tym także w 1999 roku we Włoszech u *Acinetobacter* spp. [20]. Należy podkreślić, że w tym czasie na Dalekim Wschodzie, podczas gdy opisywano IMP-1 u wielu gatunków bakterii, nie wykazywano go jeszcze w Europie. *Acinetobacter* spp. okazał się bakterią, u której po raz pierwszy na tym kontynencie zidentyfikowano enzymy typu IMP [20]. IMP-2, kolejną karbapenemazę występującą u pałeczek *Acinetobacter* spp., opisano także we Włoszech w 2000 roku [60]. *A. baumannii* jest pierwszą na świecie bakterią, u której zidentyfikowano ten enzym. Kolejną metalo- β -laktamazą typu IMP wykrytą u rodzaju *Acinetobacter* był enzym IMP-4 opisany w Hong Kongu w Chinach [17]. W Portugalii natomiast w 2002 roku zidentyfikowano po raz pierwszy na świecie enzym IMP-5. Bakterią, u której go wykryto był, podobnie jak w przypadku IMP-2, *A. baumannii* [22]. Świadczy to o ogromnych możliwościach pałeczek

czek rodzaju *Acinetobacter* do wytwarzania nowych mechanizmów oporności obejmujących swoim zakresem nawet karbapenemy, powszechnie uważane za najskuteczniejsze antybiotyki β -laktamowe.

Do metalo- β -laktamaz klasy B występujących u pałeczek *Acinetobacter* spp. należą także enzymy typu VIM. VIM-1 opisany został w tej grupie drobnoustrojów we Włoszech, a VIM-2 w Korei [71].

Łatwość rozprzestrzeniania MBL wiąże się z horyzontalnym przekazywaniem genów *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* wśród bakterii różnych gatunków [8, 35, 59]. Geny te pierwotnie znajdowały się w chromosomach. Obecnie wiadomo, że wchodzi w skład integronów, które mogą wbudowywać się w plazmidy i chromosomy. Mają one też zdolność włączania i wyłączania sekwencji DNA w obrębie, tzw. kasety zawierającej duże fragmenty z genami oporności na różne klasy antybiotyków, co warunkuje wielolekooporność.

Rozprzestrzenienie MBL wśród pałeczek *Acinetobacter* spp. wykazuje zróżnicowanie geograficzne [1, 35, 60, 62, 71]. Szczepy wytwarzające te enzymy izolowano głównie na Dalekim Wschodzie, ale także i w Europie. Opisywanie ich w tak odległych od siebie rejonach pozwala przypuszczać, że występują one na całym świecie. Odsetek szczepów pałeczek *Acinetobacter* spp. opornych na karbapenemy jest niższy niż wśród szczepów *Pseudomonas* spp., ale ciągle wzrasta. Należy jednak zwrócić uwagę, że odsetek szczepów posiadających MBL wśród szczepów niewrażliwych na karbapenemy może być wyższy dla *Acinetobacter* spp., niż dla *Pseudomonas* spp. [36]. Niewątpliwie wzrost występowania MBL wiąże się ze wzrostem stosowania karbapenemów w leczeniu zakażeń. Szczepy odporne na imipenem występują na całym świecie. Jednak izolaty wytwarzające MBL występują rzadziej, niż te, które wytwarzają inne mechanizmy oporności na karbapenemy, na przykład opisane niżej enzymy typu OXA [14–16, 35]. Biorąc jednakże pod uwagę ogromny potencjał genów kodujących MBL zdolnych do rozprzestrzeniania się wśród pałeczek niefermentujących, jak również innych drobnoustrojów, karbapenemy mogą stać się wkrótce nieskutecznymi lekami w terapii zakażeń wywołanych przez pałeczki *Acinetobacter* spp.

4.3. Klasa C β -laktamaz

Do klasy C należą kodowane chromosomalnie cefalosporynazy, zaliczane do grupy 1 według klasyfikacji Bush [14, 16]. Wykazują one bardzo dużą różnorodność, co utrudnia ich ocenę i identyfikację. Wiele badań sugeruje jednak, iż są to najważniejsze β -laktamazy wytwarzane przez pałeczki *Acinetobacter* spp. Występują one u 75 do 98% szczepów tego rodzaju. Są hamowane przez kloksacylinę. Izolacja tych enzymów jest trudna ze względu na dużą masę

cząsteczkową i słabą rozpuszczalność. Z tych powodów wiedza na ich temat jest jeszcze niepełna i wymaga on uzupełnienia dalszymi badaniami.

Pierwszą chromosomalną cefalosporynazę (pI 8,6) u pałeczek *Acinetobacter* spp. opisali w 1976 roku Matthew i Harris [wg 6]. W następnych latach opisano kolejne enzymy tej grupy. Cefalosporynazę hamowaną przez kloksacylinę, aztreonam, karbenicylinę i sulbaktam opisał w 1977 roku Morohoshi (pI 7,25–7,5 CEP-N) i Bluschmidt (pI 9,9) [wg 6]. Jest ona oporna na działanie kwasu klawulanowego.

Hood i Ameyes [33] w 1991 roku podzielili znane wówczas cefalosporynazy kodowane chromosomalnie, na 4 grupy: ACE-1, ACE-2, ACE-3 i ACE-4 (*Acinetobacter* chromosomal enzymes). Enzymy te zróżnicowano dzięki chromatografii FPLC (Fast-Protein Liquid Chromatography). Najmniejszą cząsteczkę ma ACE-3 (M_r 35000) i ACE-2 (M_r 60500). Z kolei ACE-1 i ACE-4 to duże enzymy o masie cząst. powyżej 500000, a nawet 1000000, co sugeruje, że są one złożone z wielu łańcuchów polipeptydowych lub łączą się z innymi komponentami komórkowymi, w tym prawdopodobnie składnikami ściany komórkowej. Mogą więc one stanowić formę pośrednią między PBP, a β -laktamazami [44]. ACE wykazują aktywność wobec cefalosporyn i penicylin. Najwyższą efektywność ich działania stwierdza się w stosunku do cefalosporyn I generacji, takich jak cefalorydyna i cefradyna. Żaden z enzymów tej grupy nie hydrolizuje aztreonamu i cefalosporyn III generacji. Trzy z nich (ACE-1, ACE-2, ACE-3) wiążą jednak aztreonam, co z jednej strony warunkuje częściową oporność na ten antybiotyk, z drugiej natomiast inaktywuje te enzymy. Najsilniejszą cefalosporynazą opisanej grupy jest ACE-1. Obecnie cefalosporynazy dzieli się na dwie grupy: pierwszą o pI >8,5 oraz drugą o pI 8–8,5 [40].

W 1996 roku [54] scharakteryzowano nowe cefalosporynazy pod względem właściwości biochemicznych, a w 2000 roku [9] opisano sekwencję nukleotydową pierwszego genu kodującego cefalosporynazę AmpC, wytwarzaną przez pałeczki *Acinetobacter* spp. Gen *ampC* cefalosporynazy występującej u pałeczek *Acinetobacter* spp. wykazuje największe podobieństwo w stosunku do genu *ampC* u *Aeromonas sobria*. Sięga ono jednak tylko 42,3% budowy nukleotydowej. Porównując sekwencje nukleotydowe genów *ampC* pałeczek *Acinetobacter* spp. i innych gatunków bakterii wykazano kolejne różnice, co świadczy o jeszcze mniejszym pokrewieństwie między nimi. Obecnie pojawiają się prace opisujące sekwencje nukleotydowe kolejnych cefalosporynaz występujących u pałeczek *Acinetobacter* spp. [5].

Pałeczki *A. baumannii* wytwarzające enzym AmpC wykazują różną oporność na β -laktamy. Poziom wytwarzania tego enzymu i tym samym oporności na

ceftazidim, zależy od obecności sekwencji promotoryjnej [21]. System regulacji ekspresji tych β -laktamaz jest tu bardziej złożony niż u pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*. Stwierdzono, że szczepy *A. baumannii* posiadające średnią i wysoką oporność na ceftazidim dysponują sekwencją insercyjną zawierającą silny promotor, umieszczoną przed genem *ampC* [21]. Sekwencja ta jest ruchoma i zbudowana z 1200 par zasad. Jest to pierwszy znany ruchomy element genomu, który może regulować różne geny oporności u pałeczek *Acinetobacter* spp. Wykazuje on możliwość regulacji wytwarzania oksacylinaz, należących do klasy D β -laktamaz oraz genu *aac(3)IIa*, odpowiedzialnego za powstanie enzymu modyfikującego aminoglikozydy. Cefalosporynazy pałeczek *Acinetobacter* spp. wydają się nie podlegać indukcji w sposób taki jak ma to miejsce u pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* [5]. Użycie cefoksyminy jako induktora w doświadczeniu przeprowadzonym przez Beceiro i wsp. [5] nie spowodowało zwiększenia wytwarzania AmpC β -laktamaz. Podobne wyniki uzyskiwali inni badacze [wg 6].

Jak już wspomniano cefalosporynazy pałeczek *Acinetobacter* spp. mogą inaktywować penicyliny oraz cefalosporyny. Są one jednak hamowane przez sulbaktam, co jest cechą obserwowaną tylko u pałeczek *Acinetobacter* spp. i *Citrobacter freundii*. Wyraża się to dużą aktywnością penicylin w połączeniu z tym inhibitorem β -laktamaz w warunkach *in vitro*. Stężenie sulbaktamu musi być jednak wysokie, co sprawia, że w warunkach *in vivo* skuteczność takiego połączenia jest wyraźnie mniejsza.

Wysoki poziom ekspresji genów cefalosporynaz wykryto u szczepów opornych na karbapenemy, u których mechanizm oporności na tę grupę antybiotyków jest dodatkowo związany ze zmniejszeniem przepuszczalności osłon komórkowych [57]. Oba te mechanizmy zdają się być odpowiedzialne za wzrost MIC dla karbapenemów, co zmniejsza ich skuteczność terapeutyczną. Dowodem na to przypuszczenie jest fakt, że nie stwierdzono innych istotnych różnic w mechanizmie oporności na β -laktamy u badanych szczepów *A. baumannii*, zarówno wrażliwych, jak i opornych na karbapenemy. Potwierdza to udział cefalosporynaz w oporności na tę grupę antybiotyków. Podobną zależność stwierdzono w przypadku oporności na piperacylinę, cefotaksym, cefpirom i aztreonam.

4.4. Klasa D β -laktamaz

Klasa D to β -laktamazy typu OXA (pI 6,65) – oksacylinazy inaktywujące penicyliny i cefalosporyny. Większość z nich hydrolizuje również karbapenemy, nie są one jednak metaloenzymami. Kodowane są chromosomalnie. Trudności w ich wykrywaniu wynikają z różnej aktywności wobec cefalosporyn III ge-

neracji. Mogą dla przykładu hydrolizować cefepim, nie hydrolizując ceftazidimu. Hamowane są przez kwas klawulanowy (oprócz OXA-23), tazobaktam i sulbaktam, wykazują z wyjątkiem enzymów OXA-24, OXA-27 i OXA-40, dużą aktywność wobec kloksacyliny i oksacyliny [3]. Według klasyfikacji Bush zaliczane są one wszystkie do klasy 2d [14, 16].

Pierwszym sklasyfikowanym i opisanym enzymem tej klasy u pałeczek *Acinetobacter* spp. był OXA-21 [66]. Zakres jego działania nie został ostatecznie wyjaśniony, ponieważ badany szczep wytwarzał dodatkowo dwie inne β -laktamazy, niemniej jednak nie obejmuje on karbapenemów [11, 66]. OXA-23, następny enzym występujący u rodzaju *Acinetobacter*, początkowo zakwalifikowano jako karbapenemazę klasy A wg Ambler'a i nazwano ARI-1 (*Acinetobacter* enzymy resistant to imipenem) [12]. Później, na podstawie badań nad strukturą genetyczną, zaliczono ją do oksacylinaz [2, 24]. Kolejną opisaną oksacylinazą była OXA-24 izolowana ze szczepu pochodzącego z Hiszpanii [10] oraz OXA-25, OXA-26, OXA-27 [3]. W 2003 roku opisano OXA-40 [32], a ostatnio w 2005 r. w Argentynie [13] i we Francji [55] wyizolowano dwie nowe karbapenemazy u pałeczek *Acinetobacter* spp. nazwane odpowiednio OXA-51 i OXA-58.

Pałeczki *Acinetobacter* spp. wytwarzają wszystkie opisane dotychczas β -laktamazy OXA hydrolizujące imipenem, tj. OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40 oraz OXA-51 i OXA-58 [35, 55]. Badania genetyczne zaowocowały ich podziałem na trzy grupy. Do jednej z nich zaliczono OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40, do drugiej OXA-23 i OXA-27, a do trzeciej OXA-51 i OXA-58 [13, 32, 55]. Porównując sekwencje nukleotydową poszczególnych grup enzymów OXA wykazano 60% podobieństwa w budowie cząsteczkowej. Z kolei podobieństwo enzymów należących do tej samej grupy jest bardzo wysokie i osiąga nawet 99%. Dla przykładu, OXA-40 różni się od pozostałych enzymów ze swojej grupy, jednym lub dwoma aminokwasami. Jednak jego właściwości biochemiczne znacznie różnią się od pozostałych, gdyż jest on słabo hamowany przez inhibitory β -laktamaz: kwas klawulanowy, tazobaktam, sulbaktam oraz wykazuje względnie wąski zakres działania, obejmujący jednak ceftazidim i imipenem.

Ostatnio opisane karbapenemazy OXA-51 i OXA-58 z uwagi na małe podobieństwo (około 60%) do pozostałych OXA karbapenemaz pałeczek *Acinetobacter* spp. zostały zaliczone do nowoutworzonej trzeciej grupy [13, 55]. Głównym substratem tych enzymów jest imipenem. Hydrolizują one także penicyliny, w tym oksacylinę. OXA-58 nie wykazuje aktywności wobec cefalosporyn. Są to enzymy kodowane przez geny znajdujący się na plazmidzie, w przeciwieństwie do większości enzymów tej klasy występujących u pa-

łeczek *Acinetobacter* spp., które kodowane są chromosomalnie.

Oksacylinazy mają zdecydowanie słabszą aktywność wobec karbapenemów niż metaloenzymy należące do klasy B. Wytwarzanie tych enzymów nie warunkuje całkowitej oporności na karbapenemy. Konieczne jest współistnienie zmniejszonej przepuszczalności błony zewnętrznej, związanej z brakiem białek porynowych. Dopiero połączenie tych dwóch mechanizmów powoduje pojawienie się oporności klinicznej na imipenem.

Karbapenemazy typu OXA mogą rozprzestrzeniać się także wśród innych gatunków bakterii. Enzym OXA-23 opisano u *P. mirabilis* [7]. Pałeczki *Acinetobacter* spp. są więc rezerwuarem, z którego geny *bla_{OXA}* kodujące karbapenemazy mogą rozprzestrzeniać się w przyszłości na inne bakterie. Liczba enzymów typu OXA u rodzaju *Acinetobacter* będzie się niewątpliwie powiększać coraz bardziej.

5. Zmiany w białkach wiążących penicyliny

Zmiana PBP jest często związana z opornością na β -laktamy. PBP u pałeczek *Acinetobacter* spp. wykazują podobieństwo do analogicznych białek szczepów *Bacteroides* spp. O b a r a i N a k l e [50] opisali u pałeczek *Acinetobacter* spp. 6 białek PBP: 1a (94 kDa), 1b (92 kDa), 1c (86 kDa), 2 (74 kDa), 3 (59 kDa), 4 (42 kDa). Kombinacje tych białek warunkują różny stopień wiązania się antybiotyków β -laktamowych z komórką bakteryjną. F e r n á n d e z - C u e n c a i w s p . [26] obserwowali 12 różnych wzorów PBP u badanych przez siebie szczepów. Stwierdzili oni, że brak PBP2 (73,2 kDa) wraz z wytwarzaniem oksacylinaz lub MBL warunkuje oporność na imipenem.

6. Zmiana przepuszczalności osłon komórkowych poprzez redukcję białek porynowych

Istotnym mechanizmem oporności na antybiotyki β -laktamowe pałeczek *Acinetobacter* spp. jest zmniejszenie przepuszczalności ściany bakteryjnej. Bakterie te wykazują 3% przepuszczalności ściany komórkowej *E. coli* i taką samą lub nawet mniejszą przepuszczalność niż *P. aeruginosa* [57]. Przepuszczalność ściany komórkowej rodzaju *Acinetobacter* dla penicylin i cefalosporyn stanowi 1% przepuszczalności jaka występuje u szczepów *E. coli*. Dla karbapenemów jest to poniżej 2%. Pozwala to tym bakteriom na osiągnięcie wysokiego poziomu oporności na antybiotyki β -laktamowe już przy niższym poziomie wytwarzania enzymów hydrolizujących te antybiotyki. Mechanizm zmniejszenia przepuszczalności osłon komórkowych

jest powszechny wśród dzikich szczepów występujących w środowisku naturalnym [6] i jest związany z wytwarzaniem białek porynowych OMP (outer membrane proteins). Jest to obok wytwarzania β -laktamaz najważniejszy sposób uzyskania oporności na antybiotyki β -laktamowe wśród pałeczek *Acinetobacter* spp. Wynika on z redukcji liczby poryn lub z tworzenia kanałów o mniejszych średnicach, nieprzepuszczających związków o dużej masie cząsteczkowej lub o znacznej hydrofobowości.

Za przepuszczalność antybiotyków przez błonę zewnętrzną u pałeczek *Acinetobacter* spp. odpowiedzialne są między innymi białka porynowe o masie cząsteczkowej 22 kDa, 22,5 kDa, 33–36 kDa, 46,5 kDa [8, 19, 26, 50]. Utrata tych białek warunkuje oporność na β -laktamy. Zmniejszone wytwarzanie poryn o masie cząsteczkowej 46,5 kDa jest związane ze spadkiem przepuszczalności dla małych hydrofilnych cząsteczek o 40% do 80% [50]. Pałeczki *Acinetobacter* spp. posiadają wiele białek porynowych, które mogą tworzyć różne wzory PBP.

Ostatnio pojawiło się szereg badań, których autorzy opisują niewątpliwą rolę OMP i PBP w budzącej coraz więcej obaw oporności szczepów *Acinetobacter* spp. na karbapenemy [1, 60]. Oporność tą wykazują zarówno szczepy wytwarzające karbapenemazy, jak i nie posiadające takiej cechy. Potwierdza to udział ściany komórkowej w wytworzeniu tej oporności, albo współistnienie kilku mechanizmów jednocześnie. Przypuszcza się, że jest to uwarunkowane utratą OMP lub ich uszkodzeniem na skutek mutacji. Stwierdzono, że szczepy odporne na karbapenemy w porównaniu ze szczepami wrażliwymi wykazują zmniejszoną ekspresję białek osłon zewnątrzkomórkowych 47 kDa, 44 kDa, 37 kDa [wg 6]. B o u i w s p . [8] odkryli, że zmniejszona ekspresja białek 22 kDa, 33 kDa powoduje podwyższenie MIC karbapenemów wśród szczepów wytwarzających OXA-24. W innych badaniach zauważono, że już sama redukcja ekspresji białek 33–36 kDa, bez udziału innych mechanizmów oporności może powodować oporność na karbapenemy [19]. Podobnie utrata białka 29 kDa związana jest z pojawieniem się oporności na imipenem u szczepów nie wytwarzających karbapenemaz [39]. Podobny efekt wywołuje brak białka porynowego 22,5 kDa [26].

Udział OMP i PBP w kształtowaniu oporności na imipenem jest bezsporny, ale wymaga jeszcze kolejnych, wnikliwych badań. Należy jednak zauważyć rosnący udział tych mechanizmów oporności w stosunku do wytwarzania β -laktamaz. Znamienny jest fakt, iż mogą one bez udziału enzymów hydrolizujących β -laktamy warunkować oporność na najbardziej skuteczną dziś grupę antybiotyków wobec pałeczek *Acinetobacter* spp. jaką są karbapenemy. Oporność pałeczek *Acinetobacter* spp. na antybiotyki β -laktamowe jest

jednak w rzeczywistości najczęściej wynikiem działania kilku mechanizmów jednocześnie. Potęguje to efekt obronny danego szczepu przed antybiotykami. Zmniejszenie powinowactwa β -laktamów do PBP, z jednoczesnym spadkiem przepuszczalności osłon komórkowych, daje zdecydowanie większe szanse na to, że β -laktamazy wytwarzane nawet w mniejszej ilości zhydrolizują lek przeciwbakteryjny. Naturalnie zmniejszona

przepuszczalność ściany komórkowej u bakterii jest znaczącym czynnikiem selekcyjnym. Powoduje też łatwiejsze uzyskiwanie wysokiego poziomu oporności na antybiotyki w stosunku do innych pałeczek Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae*. Wydaje się, że to właśnie w ścianie komórkowej tkwi największa tajemnica oporności pałeczek *Acinetobacter* spp. na antybiotyki.

Tabela I

Mechanizmy oporności na antybiotyki β -laktamowe u pałeczek *Acinetobacter* spp.

Rodzaj mechanizmu oporności	Nazwa	Klasa mechanizmów laktamazy	Zakres działania	Kodowanie	Rok odkrycia
β -laktamaza	TEM-1	A	Penicyliny	Plazmidowo	1980
β -laktamaza	TEM-2	A	Penicyliny	Plazmidowo	1982
β -laktamaza	CARB-5	A	Karbenicylina	Plazmidowo	1988
β -laktamaza	SHV-like	A	Penicyliny	Plazmidowo	1993
β -laktamaza	PER-1	A	Cefalosporyny, penicyliny	Plazmidowo/Chromosomalnie	1997
β -laktamaza	VEB-1	A	Cefalosporyny, peniceliny	Plazmidowo/Chromosomalnie	2003
β -laktamaza	CTX-M-2	A	Cefalosporyny, peniceliny	Plazmidowo	2004
β -laktamaza	IMP-1	B	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Plazmidowo	1999
β -laktamaza	IMP-2	B	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Plazmidowo	2000
β -laktamaza	IMP-4	B	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Plazmidowo	2001
β -laktamaza	IMP-5	B	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Plazmidowo	2002
β -laktamaza	VIM-1	B	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Plazmidowo	1999
β -laktamaza	VIM-2	B	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Plazmidowo	2002
β -laktamaza	ACE-1	C	Cefalosporyny I i II generacji	Chromosomalnie	1987
β -laktamaza	ACE-2	C	Cefalosporyny I i II generacji	Chromosomalnie	1987
β -laktamaza	ACE-3	C	Cefalosporyny I i II generacji	Chromosomalnie	1987
β -laktamaza	ACE-4	C	Cefalosporyny I i II generacji	Chromosomalnie	1987
β -laktamaza	AMP-C	C	Penicyliny, cefalosporyny	Chromosomalnie	od 1996
β -laktamaza	OXA-21	D	Penicyliny, cefalosporyny	Chromosomalnie/Plazmidowo	1997
β -laktamaza	OXA-23 (ARI-1)	D	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Chromosomalnie/Plazmidowo	1985/99
β -laktamaza	OXA-24	D	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Chromosomalnie	1993
β -laktamaza	OXA-25	D	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Chromosomalnie	2000
β -laktamaza	OXA-26	D	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Chromosomalnie	2000
β -laktamaza	OXA-27	D	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Chromosomalnie	2000
β -laktamaza	OXA-40	D	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Chromosomalnie	2002
β -laktamaza	OXA-51	D	Penicyliny, cefalosporyny, karbapemy	Plazmidowo	2005
β -laktamaza	OXA-58	D	Penicyliny, karbapemy	Plazmidowo	2005
Zmiana PBP:	1a (94 kDa), 1b (92 kDa), 1c (86 kDa), 2 (74 kDa), 3 (59 kDa), 4 (42 kDa)	–	β -laktamy z karbapenemami	Chromosomalnie	1991
Przepuszczalność osłon komórkowych	Spadek liczby białek m.in. 22 kDa, 22.5 kDa, 33–36 kDa, 46 kDa	–	β -laktamy z karbapenemami	Chromosomalnie	1996
Przepuszczalność osłon komórkowych	Brak 29 kDa	–	Karbapenemy	Chromosomalnie	2002

7. Wpływ („efflux”) antybiotyków z wnętrza komórki

Kolejnym mechanizmem oporności na β -laktamy jest wypływ („efflux”) antybiotyku z komórki bakteryjnej. Jest to najslabiej poznany mechanizm oporności na antybiotyki u pałeczek *Acinetobacter* spp. Dotyczy on wielu antybiotyków, a zwłaszcza cefotaksymu, chloramfenikolu, trimetoprimu, tetracyklin, fluorochinolonów i aminoglikozydów [41, 42, 57]. Pompa odpowiedzialna za ten rodzaj oporności należy do superrodziny RND (resistance-nodulation-division) i jest kodowana przez gen *adeABC*, którego ekspresja jest regulowana przez dwuskładnikowy system regulacji, zbudowany z genów *adeR* i *adeS*. Mechanizm ten ma jednak, jak się okazuje, niewielkie znaczenie w oporności na β -laktamy.

8. Podsumowanie

Podsumowując przytoczone mechanizmy oporności na β -laktamy (tab. I) występujące u pałeczek *Acinetobacter* spp. można stwierdzić, że bakterie te mają potencjalną zdolność wytwarzania oporności na wszystkie znane dziś antybiotyki β -laktamowe. Jeden szczep może wytwarzać kilka β -laktamaz z jednoczesną redukcją lub zmianą OMP, czy PBP, co powoduje oporność na wiele antybiotyków tej grupy. Udowodniono, że każdy z tych mechanizmów niezależnie może powodować oporność w stosunku do nawet najbardziej skutecznych β -laktamów. Niewątpliwie jednak największe znaczenie ma współdziałanie wielu z nich jednocześnie.

Ze względu na złożoność problemu oporności na antybiotyki β -laktamowe, należy stosować je z dużą rozważą, aby nie dopuścić do selekcji szczepów opornych.

Piśmiennictwo

- Afzal-Shah M., Livermore D.: Worldwide emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**, 576–577 (1998)
- Afzal-Shah M., Villar H., Livermore D.: Biochemical characteristics of a carbapenemase from an *Acinetobacter baumannii* isolate collected in Buenos Aires, Argentina. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**, 127–131 (1999)
- Afzal-Shah M., Woodford N., Livermore D.: Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 583–588 (2001)
- Ambler R.P.: The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **286**, 321–331 (1980)
- Beceiro A., Dominguez L., Ribera A.: Molecular characterization of the gene encoding a new AmpC β -lactamase in clinical strain of *Acinetobacter* genomic species 3. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1374–1378 (2004)
- Bergogne-Bérézin E., Joly-Guillou, Towner K. J.: *Acinetobacter* microbiology, epidemiology, infections, management. CRC Press INC. New York 1996
- Bonnet R., Marchandin H., Chanal C.: Chromosome-encoded class D β -lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2004–2006 (2002)
- Bou G., Cerveró G., Domínguez M.: Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of β -lactamases. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3299–3305 (2000)
- Bou G., Martínez-Beltrán J.: Cloning nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 428–432 (2000)
- Bou G., Oliver A., Martínez-Beltrán J.: OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1556–1561 (2000)
- Bradford P.: Extended-spectrum β -lactamases in the 21st Century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microb. Rev.* **14**, 933–951 (2001)
- Brown S., Bantar C.: Limitation of *Acinetobacter baumannii* treatment by plasmid-mediated carbapenemase ARI-2. *Lancet*, **351**, 186–187 (1998)
- Brown S.: Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin. Microb. Infect.* **11**, 15–23 (2005)
- Bush K., Jacoby G., Medeiros A.: A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1211–1233 (1995)
- Bush K.: Metallo- β -lactamases: a class apart. *Clin. Infect. Dis.* **27**, 48–53 (1998)
- Bush K.: New β -lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 1085–1089 (2001)
- Chu Y., Afzal-Shah M., Houang E.: IMP-4, a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 710–714 (2001)
- Cisneros J., Rodriguez-Bano J.: Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin. Microb. Infect.* **8**, 687–693 (2002)
- Clark, R. B.: Imipenem resistance among *Acinetobacter baumannii*: association with reduced expression of a 33–36-kDa outer membrane protein. *J. Antimicrob. Chemother.* **38**, 242–251 (1996)
- Cornaglia G., Riccio M., Mazzariol A.: Appearance of IMP-1 metallo- β -lactamase in Europe. *Lancet*, **13**, 899 (1999)
- Corvec S., Caroff N., Espaze E.: AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 629–635 (2003)
- Da Silva G.J., Correia M., Vital C., Ribeiro G, Sousa J.C., Leitão R., Peixe L., Duarte A.: Molecular characterization of *bla*_{IMP-5}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**, 33–39 (2002)
- Devaud M., Kayser F.H., Bachi B.: Transposon-mediated multiple antibiotic resistance in *Acinetobacter* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**, 323–329 (1982)
- Donald H., Scaife W., Amyes S.: Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance

- in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 196–199 (2000)
25. Drago L., Vecchi E., Nicola L.: Activity of levofloxacin and ciprofloxacin in combination with cefepime, ceftazidime, imipenem, piperacillin-tazobactam and amikacin against different *Pseudomonas aeruginosa* phenotypes and *Acinetobacter* spp. *Chemother.* **50**, 202–210 (2004)
 26. Fernández-Cuenca F., Martínez L., Conejo, Juana C.: Relationship between β -lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 565–574 (2003)
 27. Girlich D., Poirel L., Leelaporn A.: Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum β -lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 175–182 (2001)
 28. Gniadkowski M.: Beta-laktamazy o szerokim i rozszerzonym spektrum substratowym oraz β -laktamazy odporne na inhibitory. *Antybiotykoterapia*, **5**, 540–544 (1999)
 29. Gospodarek E., Ziółkowski G.: Antybiotykooporne szczepy *Acinetobacter baumannii* występujące w Polsce. *Przeg. Epid.* **54**, 88–96 (2000)
 30. Gospodarek E.: Ocena wybranych właściwości biologicznych pałeczek *Acinetobacter* spp. Akademia Medyczna im. L. Rydygiera w Bydgoszczy. Praca habilitacyjna 1999
 31. Helfand M., Bonomo R.: β -lactamases: a survey of protein diversity. *Curr. Drug Targets.* **3**, 9–23 (2003)
 32. Héritier C., Poirel L., Aubert D.: Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 268–273 (2003)
 33. Hood J., Amyes S.C.E.: The chromosomal β -lactamases of the genus *Acinetobacter*: enzymes which challenge our imagination (w) *The biology of Acinetobacter*. Towner K.J., Bergogne-Bérézin E., Fewson C.A., Plenum Publishing Corp., New York 1991, s 117–132
 34. Houang E., Yiu Wai Chu, K.Y. Chu.: Significance of genomic DNA group delineation in comparative studies of antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1472–1475 (2003)
 35. Laudy A.: Karbapenemazy – enzymy mogące hydrolizować szerokie spektrum β -laktamów. *Zakażenia*, z. **4**, 32–38 (2003)
 36. Lee K., Gyo Lee W., Uh Y.: VIM- and IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 868–871 (2003)
 37. Levin A., Baron R., Santos M.: Intravenous colistin as therapy for nosocomial infectious caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Infect. Dis.* **28**, 1008–1011 (1999)
 38. Levin A.: Multiresistant *Acinetobacter* infections: a role for sulbactam combinations in overcoming an emerging worldwide problem. *Clin. Microb. Infect.* **8**, 144–153 (2002)
 39. Limansky A., Musi M., Viale A.: Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4776–4778 (2002)
 40. López-Hernández S., Alarcón T., López-Brea M.: Biochemical characterization of chromosomal cephalosporinases from isolates belonging to the *Acinetobacter baumannii* complex. *Clin. Microb. Infect.* **7**, 218–226 (2001)
 41. Magnet S., Courvalin P., Lambert T.: Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3375–3380 (2001)
 42. Marchand I., Damier-Piolle L., Courvalin P.: Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3298–3304 (2004)
 43. Marques M.B., Brookings E.S., Moser S.A.: Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 881–885 (1997)
 44. Massova I., Mobashery S.: Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1–17 (1998)
 45. Montero A., Ariza J., Corbella X.: Efficacy of colistin versus β -lactams, aminoglycosides, and rifampin as monotherapy in a mouse model of pneumonia caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1946–1952 (2002)
 46. Montero J., Leyba C., Jiménez F.: Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP. *Clin. Infect. Dis.* **36**, 1111–1118 (2003)
 47. Mugnier P., Dubrous P., Casin I.: A TEM-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 2488–2493 (1996)
 48. Nagano N., Nagano Y., Cordevant C., Shibata N., Arakawa Y.: Nosocomial transmission of CTX-M-2 β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3978–3984 (2004)
 49. Nass T., Philippon L., Porel E.: An SHV-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1281–1284 (1999)
 50. Obara M., Nake T.: Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **28**, 791–800 (1991)
 51. Osano E., Arakawa Y., Wacharotayankun R., Ohta M., Horii T., Ito H., Yoshimura F., Kato N.: Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 71–78 (1994)
 52. Pandey A., Kapil A., Sood S.: In Vitro activities of ampicillin-sulbactam and amoxicillin clavulanic acid against *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 3415–3416 (1998)
 53. Paul, G., M.L. Joly-Gouilou, E. Bergogne-Brezin.: Novel carbenicillin-hydrolyzing β -lactamase (CARB-5) from *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **59**, 45–50 (1989)
 54. Perilli M., Felici A., Oratore A.: Characterization of the chromosomal cephalosporinases produced by *Acinetobacter lwoffii* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 715–719 (1996)
 55. Poirel L., Marqué S., Héritier C.: OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 202–208 (2005)
 56. Poirel L., Menuteau O., Agoli N.: Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 3542–3547 (2003)
 57. Quale J., Bratu S., Landman D.: Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. *Clin. Infect. Dis.* **37**, 214–220 (2003)

58. Reis A., Luz D., Tognim M.: Polymyxin-resistant *Acinetobacter* spp. isolates: what is next. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 1025–1026 (2003)
59. Riccio M., Franceschini N., Boschi L.: Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*_{IMP} allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1229–1235 (2000)
60. Rohini M., Gee Yen S., Farrag N.: Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a London hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 141–142 (2003)
61. Shah A., Hasan F., Ahmed S.: Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs): characterization, epidemiology and detection. *Crit. Rev. Microbiol.* **30**, 25–32 (2004)
62. Tysall L., Stockdale M., Chadwick P.: IMP-1 carbapenemase detected in an *Acinetobacter* clinical isolate from the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 215–224 (2002)
63. Urban C., Segal-Maurer S., Rahal J.: Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Infect. Dis.* **36**, 1268–1274 (2003)
64. Vahaboglu H., Öztürk R., Aygün G.: Widespread detection of PER-1- type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 2265–2269 (1997)
65. Vila J., Marcos A., Marco F.: In vitro antimicrobial production of β -lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 138–141 (1993)
66. Vila J., Navia J., Casals R. and C.: Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA – derived β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 2757–2759 (1997)
67. Visalli M., Jacobs M., Moore T.: Activities of β -lactams against *Acinetobacter* genospecies as determined by agar dilution and E-test MIC methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 767–770 (1997)
68. Watanabe M., Iyobe S., Inoue M., Mitsuashi S.: Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 147–151 (1991)
69. Wood Ch., Hanes S., Croce M.: Comparison of ampicillin-sulbactam and imipenem-cilastatin for the treatment of *Acinetobacter* ventilator-associated pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **34**, 1425–1430 (2002)
70. Yong D., Hee Shin J., Kim S.: High prevalence of PER-1 extended-spectrum β -lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1749–1751 (2003)
71. Yum J., Yi K., Yong D.: Molecular characterization of metallo-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the *bla*_{VIM-2} gene cassettes. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 837–840 (2002)