

Alicja Krutkiewicz\*, Danuta Klimuszko

Katedra Nauk Przedklinicznych, Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Wpłynęło w maju 2008 r.

1. Wstęp. 2. Oporność *Campylobacter* spp. na fluorochinolony. 3. Oporność *Campylobacter* spp. na makrolidy. 4. Oporność *Campylobacter* spp. na tetracykliny. 5. Oporność *Campylobacter* spp. na aminoglikozydy/aminocyklitole. 6. Oporność *Campylobacter* spp. na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe. 7. Oporność *Campylobacter* spp. na sulfonamidy. 8. Podsumowanie

#### Mechanisms of resistance of *Campylobacter* spp. to antimicrobial agents

**Abstract:** *Campylobacter* is recognized as the major cause of acute bacterial gastroenteritis in the world. Two species of the genus *Campylobacter*, *C. jejuni* and *C. coli*, are most frequently isolated from cases of human infection. Patients usually recover without any antimicrobial therapy, but treatment with erythromycin or fluoroquinolones may be needed in some cases of prolonged illness. Increasing antimicrobial resistance of *Campylobacter* strains in both medicine and agriculture has been recognized. Some reports have suggested that the use of fluoroquinolones for veterinary medicine results in the establishment of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* strains. Moreover it has been found that *C. jejuni* is able to acquire resistance determinants from outside of the genus (from Gram-positive organisms) by horizontal transfer and genes can be incorporated into plasmids or the chromosome. High-level resistance to erythromycin is mediated by mutation in the domain V of the 23S rRNA gene. Fluoroquinolone resistance appears to be mainly due to mutations in the *gyrA* gene encoding part of the GyrA subunit of DNA gyrase. In this article, the mechanisms of antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp. are presented.

1. Introduction. 2. Resistance of *Campylobacter* spp. to fluoroquinolones. 3. Resistance of *Campylobacter* spp. to macrolides. 4. Resistance of *Campylobacter* spp. to tetracyclines. 5. Resistance of *Campylobacter* spp. to aminoglycosides. 6. Resistance of *Campylobacter* spp. to  $\beta$ -lactam antibiotics. 7. Resistance of *Campylobacter* spp. to sulphonamides. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** antybiotyki, *Campylobacter*, oporność

**Key words:** antibiotics, *Campylobacter*, resistance

## 1. Wprowadzenie

Pałeczki z rodzaju *Campylobacter* należące do klasy  $\epsilon$ -Proteobacteria są mikroaerofilnymi, Gram-ujemnymi bakteriami zdolnymi do ruchu dzięki obecności rzęski. Występują one w przewodzie pokarmowym wielu gatunków zwierząt, zwłaszcza ptaków, jako składnik bioty komensalicznej. Dwa gatunki: *Campylobacter jejuni* i *C. coli* przeniesione na ludzi, stają się jednym z najczęściej izolowanych etiologicznych czynników bakteryjnych zakażeń pokarmowych u ludzi. Dane dotyczące częstości występowania wskazują że 95–99% zakażeń dotyczy *C. jejuni*. Kampylobakterioza przebiega najczęściej pod postacią zapalenia żołądkowo-jelitowego lub zapalenia jelit. Opisywane są przypadki, kiedy u zainfekowanych osób dochodzi do infekcji systemowych, przeniesienia zakażenia na inne organy lub posocznicy. Sporadycznie pałeczki *Campylobacter* mogą wywołać powikłania, takie jak reaktywny artretyzm, oraz choroby neurologiczne: zespół Guillain-Barre (GBS), czy zespół Miller-Fisher

(MFS). W przypadkach objawiających się ostrą, krwawą biegunką z towarzyszącą wysoką temperaturą, utrzymującą się ponad tydzień, zwłaszcza u osób z obniżoną odpornością wskazane jest leczenie etiotropowe. Lekiem z wyboru w leczeniu kampylobakteriozy jest erytromycyna, lub azytromycyna. Decyduje o tym łatwość jej użycia, niski poziom toksyczności oraz wysoka skuteczność. U osób dorosłych, w przypadku stwierdzonych stanów zapalnych jelit bez identyfikacji czynnika etiologicznego powodującego chorobę stosowane są również fluorochinolony będące antybiotykami o szerokim spektrum działania [8].

W ostatnim czasie obserwuje się znaczący wzrost liczby przypadków zakażeń pałeczkami z rodzaju *Campylobacter*. Wprowadzenie do powszechnego użycia antybiotyków, zarówno w medycynie jak i weterynarii warunkuje zjawisko narastania oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki szczepów *Campylobacter* izolowanych zarówno od ludzi i zwierząt, jak i żywności. Opisano szczepy odporne na ciprofloksacynę i inne fluorochinolony, makrolidy i linkozamidy,

\* Autor korespondencyjny: Katedra Nauk Przedklinicznych, Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: alicjakrutek@wp.pl

chloramfenikol, aminoglikozydy, tetracyklinę, ampicylinę i inne  $\beta$ -laktamy [24, 26]. Wzrastający poziom bakteryjnej oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki jest uwarunkowany nabywaniem nowych genów na drodze horyzontalnego transferu oraz mutacji.

## 2. Oporność *Campylobacter* spp. na fluorochinolony

Działanie fluorochinolonów ściśle zależy od stężenia leku w tkankach i surowicy. Są one często stosowane w zakażeniach przewodu pokarmowego, również w zakażeniach pałeczkami *Campylobacter*, zwłaszcza szczepami wieloopornymi.

Oporność bakterii na fluorochinolony jest wynikiem punktowych mutacji chromosomowych, a nie nabywania genów od innych gatunków [23]. Dlatego występowanie oporności jest uzależnione od częstości stosowania fluorochinolonów. Oporność ma charakter krzyżowy w obrębie tej grupy antybiotyków, z tego też powodu postuluje się wycofywanie z użycia chinolonów I generacji (kwasu nalidyksowego), by zmniejszyć ryzyko narastania oporności na nowsze generacje. Fluorochinolony powinny być stosowane dopiero w sytuacjach niewrażliwości lub nadwrażliwości na leki I rzutu. W ostatnich latach zaobserwowano gwałtowny wzrost częstości pojawiania się szczepów opornych na fluorochinolony wśród wielu gatunków bakterii, w tym szczepów *Campylobacter jejuni* [17].

Mechanizm oporności na fluorochinolony polega na blokowaniu topoizomerazy II (gyrazy DNA), oraz topoizomerazy IV-enzymów biorących udział w replikacji, transkrypcji i naprawie DNA bakterii. Enzymy te pod wpływem antybiotyku ulegają unieczynnieniu, co prowadzi do zahamowania replikacji a także transkrypcji DNA, a w następstwie do śmierci komórki bakteryjnej [1].

Najpowszechniejszy typ oporności obejmuje mutacje w genach kodujących gyrazę (*gyrA* i *gyrB*) i topoizomerazę IV (*por C* i *por E*). Najczęstszą przyczyną oporności *Campylobacter jejuni* na fluorochinolony jest mutacja punktowa w kodonie 86 (ACA>ATA) w obrębie regionu QRDR (quinolone resistance determining region), będącego obszarem genu strukturalnego podjednostki A gyrazy i kodującego od 67 do 108 aminokwasów. Efektem wystąpienia tej mutacji jest zamiana treoniny na izoleucynę co powoduje powstanie zmienionego białka, pozbawionego zdolności wiązania się z cząsteczką antybiotyku [28]. Zamiana ta jest homologiczna do substytucji seryny 83 przez leucynę, powodującej 40-krotny wzrost MIC ciprofloksacyny dla *E. coli*. Wyniki wielu badań wskazują, że szczepy *C. jejuni* odporne na ciprofloksacynę posiadają mutację w kodonie 86 genu *gyrA*. Wartość MIC

ciprofloksacyny dla opornych szczepów *C. jejuni* wynosiła >32 mg/L [18].

Opisano również inną mutację punktową w genie *gyrA* *C. jejuni* powodującą zamianę aminokwasu w kodonie 86 (treonina → alanina), która powoduje wysoki poziom oporności na kwas nalidyksowy, oraz niższy poziom oporności na ciprofloksacynę niż w przypadku substytucji (treonina → izoleucyna). Podwyższenie poziomu oporności szczepów *C. jejuni* na fluorochinolony bywa także efektem, choć znacznie rzadziej, zmian aminokwasu w kodonie 70 (alanina → treonina), 86 (treonina → lizyna), 90 (asparaginian → asparagina), 104 (prolina → seryna). Zostały również opisane podwójne mutacje punktowe w genie *gyrA* powodujące zastąpienie treoniny 86 izoleucyną i asparaginianu 85 tyrozyną, lub asparaginianu 90 asparaginą, bądź proliny 104 seryną [12]. Zmian w podjednostce GyrB będących wynikiem mutacji powodujących oporność na fluorochinolony u pałeczek *Campylobacter* nie odnotowano [28]. Nie zidentyfikowano również genu homologicznego do genu strukturalnego *parC* topoizomerazy IV w chromosomie *C. jejuni*, odgrywającego rolę w rozdziale kopii chromosomu podczas podziałów komórkowych np. u *E. coli*. Powstanie mutacji w tym genie zwiększa stopień oporności na fluorochinolony u bakterii należących do wielu różnych rodzajów [30].

Opisano również inne mechanizmy oporności na fluorochinolony jak np. obecność pomp MDR (oporność wieloraka, ang. multi-drug resistance), które skutecznie usuwają chinolony z komórki bakteryjnej. U pałeczek *Campylobacter* najlepiej poznanym mechanizmem jest ATP-zależny system białek CmeABC (Campylobacter-multidrug-efflux), składający się z białka peryplazmatycznego (CmeA), białka transportowego zlokalizowanego w błonie wewnętrznej (CmeB), oraz transmembranowego białka błony zewnętrznej (CmeC). Białka te wykazują dużą homologię do białek superrodziny (inaczej pomp) RND (ang. resistance-nodulation-division) występujących wyłącznie u bakterii Gramujemnych. Są one odpowiedzialne za wieloraką oporność *C. jejuni* na: fluorochinolony, erytromycynę, tetracyklinę, chloramfenikol i ampicylinę. Wiele z nich oprócz antybiotyków usuwa z komórki również inne szkodliwe czynniki jak np. jony metali czy bromek etydyny. Współwystępowanie ATP-zależnego systemu białek CmeABC wraz mutacjami punktowymi w genie *gyrA* u *C. jejuni* przyczynia się do osiągnięcia wysokiego poziomu oporności na fluorochinolony [21].

## 3. Oporność *Campylobacter* spp. na makrolidy

Mechanizm działania antybiotyków makrolidowych polega na hamowaniu biosyntezy białek na poziomie podjednostki 50S rybosomu, co powoduje blokowanie

wydłużania łańcucha peptydowego. Miejsce wiązania makrolidów do rybosomu bakteryjnego znajduje się w obrębie cząsteczki 23S rRNA. U bakterii z rodzaju *Campylobacter* kodowana chromosomalnie oporność na erytromycynę i inne makrolidy związana jest z modyfikacją genu 23S rRNA, oraz białek L4 i L22 w podjednostce 50S rybosomu [1].

Opisano wysoki poziom oporności na makrolidy ( $MIC \geq 128$  mg/L) w przypadku klinicznych szczepów *Campylobacter jejuni* i *C. coli*. Jest on wynikiem mutacji w pozycji 2074 i 2075 w genie kodującym podjednostkę V 23S rRNA. Najczęstszą mutacją występującą u 78–100% szczepów jest tranzycja A→G w pozycji 2075, zaś mutacja polegająca na zamianie A→C lub A→G w pozycji 2074 oraz podwójna tranzycja A→C i A→G zostały opisane u pojedynczych szczepów *Campylobacter* opornych na erytromycynę [40]. U bakterii, u których występuje więcej niż jedna kopia genu 23S rRNA, poziom oporności na makrolidy zależy od liczby zmutowanych alleli. Szczepy *Campylobacter* zawierają trzy kopie i uważa się, że liczba zmutowanych alleli wpływa na poziom oporności na makrolidy. Niezbędne są co najmniej mutacje w dwóch kopiach do ujawnienia się oporności. Najwięcej klinicznych izolatów *Campylobacter* opornych na makrolidy zawiera trzy kopie zmutowanych alleli [16].

Oprócz opisanej powyżej modyfikacji genu 23S rRNA, zmianie mogą też ulegać rybosomalne białka L4 i L22 w podjednostce 50S rybosomu. Opisano szczepy *C. jejuni* i *C. coli* u których występowały zmiany pojedynczego aminokwasu w białku L4 i od dwóch do kilku substytucji aminokwasów w białku L22. U dwóch izolatów opornych na erytromycynę *C. jejuni* i *C. coli* zidentyfikowano substytucję aminokwasu A→V (alanina→walina) w pozycji 103 w białku L22 [10].

System białek CmeABC warunkuje oporność na wiele antybiotyków m.in. na fluorochinolony, antybiotyki β-laktamowe, oraz makrolidy. Zaobserwowano zależność pomiędzy występowaniem modyfikacji w systemie białek CmeABC a poziomem oporności na makrolidy (M). Wzrost aktywności „pompy” spowodowany nadekspresją genów *cmeABC* nadaje niski poziom oporności szczepów pałeczek *Campylobacter* na erytromycynę ( $MIC$  8–16 mg/L). Współwystępując z modyfikacją genu 23S rRNA, poziom ten wzrasta [22].

Została określona rola mutacji w genach kodujących białka systemu CmeABC w niepowodzeniu leczenia ludzi erytromycyną. Dlatego ustalono nowe wytyczne, według których za szczepy wrażliwe uważa się takie, których  $MIC \leq 8$  mg/L, a za odporne,  $MIC \geq 32$  mg/L, sugerując, że infekcje powodowane przez szczepy *Campylobacter* niosące te mutacje mogą być nadal skutecznie leczone erytromycyną [7].

Erytromycyna lub azytromycyna uznawane są za lek z wyboru w leczeniu kampylobakteriozy u ludzi.

Jak w przypadku innych antybiotyków, zbyt częste, nieuzasadnione lub niewłaściwe stosowanie makrolidów może doprowadzić do zwiększenia częstości występowania szczepów opornych. Szczególnie niebezpieczne jest zjawisko krzyżowej oporności z β-laktamami.

#### 4. Oporność *Campylobacter* spp. na tetracykliny

Tetracykliny jako antybiotyki o szerokim spektrum działania, obejmującym zarówno bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne, jak również patogeny atypowe (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Chlamydia*), należą do jednej z grup antybiotyków najszerzej stosowanych, a oporność bakterii na tetracykliny stanowi poważny problem z medycznego punktu widzenia. Częstość izolacji szczepów opornych na różne tetracykliny wzrasta wraz z rozszerzeniem stosowania tych antybiotyków nie tylko w medycynie w celach leczniczych, ale także w rolnictwie w profilaktyce zakażeń powodowanych przez różne patogeny. Zjawisku temu sprzyja lokalizacja genów determinujących oporność na tetracyklinę na ruchomych elementach genetycznych [6].

Tetracykliny są antybiotykami bakteriostatycznymi, których mechanizm działania polega na hamowaniu biosyntezy białek i procesów fosforylacji w komórkach bakteryjnych. Mechanizmy oporności na tetracykliny mogą być związane z aktywnym usuwaniem antybiotyku z komórki bakterii, obecnością białek chroniących rybosom przed przyłączeniem tetracykliny (RPPs, ang. ribosomal-protection-proteins) [6] oraz z enzymatyczną inaktywacją cząsteczek antybiotyku, którą opisano u *Bacteroides* [34]. Rzadziej oporność jest wynikiem mutacji w genie kodującym 16S rRNA, którą znaleziono u *Propionibacterium acnes* i *H. pylorii* [32, 38]. Głównym mechanizmem oporności na tetracykliny nadającym bakteriom oporność na duże dawki antybiotyku jest czynne wypompowywanie antybiotyku z komórki bakteryjnej. Białko o charakterze pompy należy do grupy MFS (ang. major-facilitator-superfamily) i do swojej aktywności wykorzystuje siłę protonomotoryczną [23].

Mechanizm oporności szczepów *Campylobacter jejuni* i *C. coli* na tę grupę antybiotyków wyraża się poprzez wytwarzanie białka Tet(O), należącego do białek chroniących rybosom. Białko Tet(O) nadaje oporność poprzez usunięcie tetracykliny z jej pierwotnego miejsca wiązania na rybosomie i wymaga do tego obecności GTP. W efekcie uwalnia rybosom od hamującego wpływu antybiotyku na syntezę białek. tRNA z grupą aminoacylową (aa-tRNA) zostaje związany z miejscem A na rybosomie i synteza białek może być kontynuowana [9].

Gen *tet(O)* u *C. jejuni* zlokalizowany jest najczęściej na plazmidzie i wykazuje około 75% homologii

do genu *tet (M)* *Streptococcus pneumoniae*, który to znajduje się na transpozonie Tn916 i wykryto go u wielu bakterii m.in. *Ureaplasma*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *Staphylococcus*, *Clostridium*. Zawartość par G+C w genie *tet (O)* wynosi 40% i jest podobna do *tet(M)*, lecz wyższa niż w całym genomie *C. jejuni*.

Badania dowodzą, że od 13–52% szczepów *C. jejuni* izolowanych od ludzi zawiera różnej wielkości plazmidy, w większości niosące geny oporności na antybiotyki. Plazmidy zawierające gen *tet(O)* mają wielkość od 30–60 kb, nadają wysoki poziom oporności na tetracyklinę (512 mg/L) [15] i stanowią jak podają Ross i wsp. [31] 30, czy nawet 90% izolowanych plazmidów. Zsekwencjonowano dwa duże plazmidy nadające oporność na tetracykliny: pTET (45,2 kb) ze szczepu *C. jejuni* 81–176 (Z1) i pCC31 (44,7 kb) ze szczepu *C. coli* CC31. Wykazują one wysoki poziom homologii sekwencji (94,3%) i organizacji genetycznej mimo, że były izolowane na przestrzeni 20 lat i na różnych kontynentach [5]. Zawierają gen *tet(O)*, geny biorące udział w replikacji i koniugacji, homolog genu metylazy, oraz 30 ORF o nieznannej funkcji. Spośród szczepów opornych na tetracyklinę 53% nosło gen *tet(O)* na plazmidzie koniugacyjnym, co może sprzyjać rozprzestrzenianiu się oporności na tę grupę antybiotyków na drodze horyzontalnego transferu tego genu [42].

Na plazmidzie niosącym gen *tet(O)* została zidentyfikowana sekwencja insercyjna IS607\* podobna do IS607 znalezionej na chromosomie *Helicobacter pylori*. Dlatego też możliwe jest, że inne ruchome elementy genetyczne a nie samoprzekazywalny plazmid mogą być związane ze zdolnością nabywania i rozpowszechniania genu *tet (O)*.

Lokalizacja genu *tet(O)* na chromosomie została opisana u 33% szczepów *C. jejuni* opornych na tetracyklinę wyizolowanych w Kanadzie, oraz 76% w Australii, wśród których zaś u 26% nie wykryto plazmidów [31].

## 5. Oporność *Campylobacter* spp. na aminoglikozydy/aminocyklitole

Oporność na antybiotyki aminoglikozydowe, oraz na niektóre inne chemioterapeutyki hamujące syntezę białka bakteryjnego jest związana z kilkoma mechanizmami. Niektóre bakterie mają osłony komórkowe o obniżonej przepuszczalności dla aminoglikozydów, mogą wypompowywać antybiotyki z tej grupy z wnętrza komórki oraz syntetyzować enzymy modyfikujące aminoglikozydy. Najczęstszą przyczyną oporności na streptomycynę oraz na inne antybiotyki aminoglikozydowe jest inaktywacja enzymatyczna antybiotyku. Występuje zarówno u bakterii Gram-dodatnich

jak i Gram-ujemnych i może być sprzężona zarówno z genami plazmidowymi jak i chromosomowymi. Inaktywacja cząsteczek antybiotyków odbywa się przy udziale enzymów zaklasyfikowanych do trzech rodzin enzymów modyfikujących: *N*-acetylotransferazy aminoglikozydowej (AAC), *O*-adenylotransferazy aminoglikozydowej (ANT) i *O*-fosfotransferazy aminoglikozydowej (APH) [1].

U szczepów *Campylobacter* opisano i zsekwencjonowano geny kodujące fosfotransferazy [2]. Gen *aphA-3*, początkowo opisywany tylko u Gram-dodatnich ziarniaków [39], został zidentyfikowany na 48-kb plazmidzie wyizolowanym ze szczepu *C. coli* [36] i na dużych plazmidach wyizolowanych ze szczepów *C. jejuni* [15]. U *C. jejuni* gen ten zlokalizowany jest na plazmidzie w stronę końca 3' od sekwencji insercyjnej IS607\*, lub jako część zgrupowania genów oporności *aadE-sat4-aphA-3*, który koduje enzymy: 6' adenylotransferazę (*aadE*), streptomycynową acetylotransferazę (*sat4*) i 3'-fosfotransferazę aminoglikozydową typu III (*aphA-3*). Zgrupowanie genów oporności *aadE-sat4-aphA-3* jest częścią transpozonów typu Tn5405, które występują u gronkowców [11]. Organizacja genetyczna zgrupowania genów *aadE-sat4-aphA-3* sugeruje, że został on nabyty przez *C. jejuni* od bakterii Gram-dodatnich [15].

Geny determinujące syntezę enzymów modyfikujących aminoglikozydy najczęściej występują na plazmidach i mogą być związane z transpozonami wielorakiej oporności. Z klinicznego szczepu *C. jejuni*, który charakteryzowała oporność wieloraka wyizolowano plazmid pCG8245. Zawierał on 10 genów kodujących enzymy inaktywujące aminoglikozydy zarówno u bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych. Zgrupowanie genów oporności *aadE-sat4-aphA-3* występowało na tym plazmidzie obok dwóch transpozonów hybrydowych *H. pylori*: ISHp608 i IS606 [19, 25].

Genem odpowiedzialnym za oporność na kanamycynę u *C. jejuni* jest gen *aphA-7* kodujący fosfotransferazę. Został on zlokalizowany na plazmidzie pS1178 o wielkości 14 kbp [37]. Otwarta ramka odczytu genu strukturalnego ma 753 par zasad i koduje białko o masie cząst. 29 kDa. Sekwencja DNA tego genu wykazuje 55% podobieństwo do genu *aphA-3* występującego u *Streptococcus faecalis*. Zawartość par G+C wynosi 32,8% i jest podobna do odsetka w całym genomie *C. jejuni*, co sugeruje, że gen ten może być endemiczny dla całego rodzaju *Campylobacter* [37].

Wyniki badań dowodzą, że geny warunkujące oporność *C. jejuni* na kanamycynę mogą występować na jednym plazmidzie razem z genem nadającym oporność na tetracyklinę. Opisano koniugacyjny transfer determinant oporności na oba te antybiotyki pomiędzy szczepami *C. jejuni* [15].

## 6. Oporność *Campylobacter* spp. na antybiotyki β-laktamowe

Głównymi mechanizmami warunkującymi oporność komórek bakteryjnych na antybiotyki β-laktamowe są: produkcja β-laktamaz, które unieczynniają antybiotyków poprzez hydrolizę pierścienia β-laktamowego, zmniejszenie przepuszczalności osłon bakteryjnych, przede wszystkim błony zewnętrznej dla antybiotyku, oraz zmiany w celu działania antybiotyku β-laktamowego – tzn. w syntezie białka wiążącego penicylinę (PBP, penicillin-binding-protein) o zmniejszonym powinowactwie do antybiotyku [23].

Mechanizmy oporności mogą się na siebie nakładać, natomiast w przypadku takich antybiotyków β-laktamowych jak ampicylina i cefalosporyny o szerokim spektrum działania są zmienne i nie do końca jasno zdefiniowane [35].

Większość szczepów *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* jest opornych na antybiotyki β-laktamowe z wyjątkiem karbapenemów, imipenu i meropenemu [1].

Oporność szczepów *C. jejuni* i *C. coli* na penicyliny i cefalosporyny o wąskim spektrum działania jest warunkowana przez mechanizm dotyczący zmian celu działania antybiotyku β-laktamowego. Zmiany w PBP szczepów opornych polegają przede wszystkim na utracie powinowactwa do penicyliny. Zmniejszone powinowactwo nie wywołuje zaburzeń naturalnych funkcji PBP tj. uczestnictwa w biosyntezie mureiny.

Mechanizm oporności na antybiotyki β-laktamowe polegający na wytwarzaniu przez bakterie różnorodnych β-laktamaz (w tym β-laktamaz klasy D-oxacylinazy) został opisany u szczepów *C. jejuni* i *C. coli*. Badania na 100 szczepach *C. jejuni* wykazały, że β-laktamazy występowały u 88% szczepów [35].

β-laktamazy klasy D należą do superrodziny serynowych transferaz penicyloilowych, inaktywujących penicyliny i cefalosporyny. Mogą one hydrolizować również karbapenemy, nie są one jednak metyloenzymami. Wykazują różną aktywność wobec cefalosporyn III generacji. Hamowane są przez kwas klawulanowy, tazobaktam i sulbaktam, wykazują dużą aktywność wobec kloksacyliny i oksacyliny. Oksacylinazy mogą być kodowane chromosomalnie, jakkolwiek niektóre geny mogą znajdować się na ruchomych elementach genetycznych (plazmidy, integrony), umożliwiających ich rozprzestrzenianie. U szczepów *Campylobacter* oporność na ampicylinę związana z produkcją β-laktamaz jest kodowana chromosomalnie. Sklonowano gen *bla*<sub>OXA61</sub> kodujący białko strukturalne β-laktamazy należącej do klasy molekularnej D. Stwierdzono, że szczep *C. jejuni* wrażliwy na antybiotyki β-laktamowe, do którego wprowadzono sklonowany gen, zmienia fenotyp na oporny na ampicylinę, piperacylinę i karbenicylinę [3].

U bakterii Gram-ujemnych oporność na antybiotyki β-laktamowe powodowana zmniejszoną przepuszczalnością błony zewnętrznej zwykle nie jest wysoka, lecz mechanizm ten jest skuteczniejszy w połączeniu z aktywnością β-laktamaz znajdujących się w przestrzeni peryplazmatycznej. Zmiany w osłonach ograniczające penetrację antybiotyków β-laktamowych wiążą się przede wszystkim z białkami (porynami) w błonie zewnętrznej.

Na zjawisko oporności na antybiotyki β-laktamowe nakłada się coraz powszechniej spotykana u bakterii oporność wieloraka. Zaobserwowano, również u szczepów *Campylobacter*, zjawisko indukcji oporności na antybiotyki tej grupy nie tylko jako konsekwencji ich stosowania, lecz także przez inne antybiotyki.

## 7. Oporność *Campylobacter* spp. na sulfonamidy

Oporność *Campylobacter jejuni* na sulfonamidy związana jest z wytwarzaniem zmodyfikowanego (substytucja czterech reszt aminokwasowych) enzymu, syntetazy dihydropterynianowej (DHPS), czego rezultatem jest redukcja powinowactwa do chemioterapeutyku [2]. Gen warunkujący oporność umiejscowiony jest na plazmidzie, natomiast drugi gen, znajdujący się na chromosomie szczepów zarówno wrażliwych jak i opornych, koduje syntezę normalnego enzymu DHPS wrażliwego na sulfonamidy.

Inny mechanizmem oporności na sulfonamidy polega na nadprodukcji kwasu *p*-aminobenzoowego (PABA), który bezpośrednio współzawodniczy o dostęp do centrum aktywnego DHPS [23].

Szczepy wielolekooporne charakteryzuje wysoka oporność na trimetoprim (analog kwasu dihydrofoliowego). Wśród pałeczek *Campylobacter* oporność na trimetoprim jest szeroko rozpowszechniona, do czego przyczynia się na pewno fakt, że należy on do selekcyjnych związków dodawanych do podłoża bakteryjnych przy izolacji szczepów *Campylobacter* z różnych źródeł.

Wykazano, że oporność na ten chemioterapeutyk wśród klinicznych szczepów *C. jejuni* związana jest z obecnością na chromosomie genów *dfr1* i *dfr9*, kodujących reduktazy dihydrofolianowe, niewrażliwe na działanie leku. Około 10% badanych szczepów, które nie miały tych genów wykazywały niższy poziom oporności na trimetoprim niż pozostałe izolaty [13]. Obszar DNA otaczający geny *dfr1* i *dfr9* wykazuje cechy charakterystyczne dla transpozonów i integronów [14], które odgrywają istotną rolę w rozpowszechnianiu się genów lekooporności wśród bakterii Gram-ujemnych [20]. Obecność genów *dfr* na transpozonach i integronach sprzyja rozpowszechnianiu oporności na tę grupę chemioterapeutyków na drodze horyzontalnego transferu [14].

Opisano rolę integronów klasy pierwszej i tzw. kaset genowych warunkujących oporność na antybiotyki na drodze umiejscowionej rekombinacji. Stwierdzono obecność ponad 75 kaset genowych niosących geny oporności na antybiotyki. W wyniku włączenia kilku kaset oporności do jednego plazmidu, powstaje plazmid, który może warunkować fenotyp wielorakiej oporności [27].

## 8. Podsumowanie

Pałeczki *C. jejuni* i *C. coli* są z reguły wrażliwe na antybiotyki, jednakże w ostatnich latach udokumentowana została wzrastająca oporność na powszechnie stosowane terapeutyki, co jest prawdopodobnie istotnym problemem w leczeniu zakażeń *Campylobacter*. Poziom oporności na antybiotyki stosowane w terapii zapalenia żołądkowo-jelitowych wzrasta, zarówno w krajach uprzemysłowionych jak i w krajach rozwijających się. Szczególnie niepokojący jest wzrost odsetka szczepów *Campylobacter* spp. opornych na antybiotyki z grupy makrolidów. Badania prowadzone w Polsce pokazują, że wśród szczepów *C. jejuni* izolowanych od ludzi (najczęściej od dzieci do 2 roku życia) największy odsetek szczepów opornych obserwowano w odniesieniu do ciprofloksacyny do 58%, tetracykliny do 29%, ampicyliny do 21% [33].

Wśród szczepów *Campylobacter* spp. występują szczepy wielolekooporne. W badaniu wrażliwości *C. jejuni* na erytromycynę, ciprofloksacynę, ampicylinę, tetracyklinę oraz gentamycynę 35% szczepów wykazywało oporność na jeden antybiotyk, 23% na dwa antybiotyki bądź chemioterapeutyki oraz 6% na trzy [41]. Ciprofloksacyna nie jest stosowana u dzieci poniżej 16 roku życia, dlatego też wysoki odsetek szczepów opornych prawdopodobnie ma swoje przyczyny w zbyt częstym użyciu fluorochinolonów w medycynie weterynaryjnej, zwłaszcza na fermach drobiu. Stosowanie tej grupy antybiotyków u drobiu, który jest głównym rezerwuarem pałeczek *Campylobacter* spp. może prowadzić do selekcji szczepów opornych, a następnie do ich transmisji na ludzi poprzez skażoną żywność. W wielu krajach oporność *Campylobacter* spp. na fluorochinolony jest niższa, dzięki ograniczeniom stosowania tych antybiotyków jako leku z wyboru w leczeniu kamylobakteriozy, jak to ma miejsce np. w Australii, lecz są też takie kraje jak np. Hiszpania, gdzie odsetek szczepów *C. jejuni* opornych przekroczył 80%.

Zagrożenie jakim jest narastająca lekooporność szczepów pałeczek z rodzaju *Campylobacter* wymaga właściwej diagnostyki, oraz uzasadnionego stosowania antybiotyków w leczeniu ludzi, wykluczając infekcje przebiegające z tendencją do samowyleczenia.

## Piśmiennictwo

1. Aarestrup F.M., Engberg J.: Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. *Vet. Res.* **32**, 311–321 (2001)
2. Alfredson D., A., Korolik V.: Antibiotic resistance and mechanisms in *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **277**, 123–132 (2007)
3. Alfredson D., Korolik V.: Isolation and expression of a novel molecular class D  $\beta$ -lactamase, OXA-61, from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2515–2518 (2005)
4. Bacon D.J., Alm R.A., Burr D.H., Hu L., Kopecko D.J., Ewing C.P., Trust T.J., Guerry P.: Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81–176. *Infect. Immun.* **68**, 4384–4390 (2002)
5. Batchelor R.A., Pearson B.M., Friis L.M., Guerry P., Wells J.M.: Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different *Campylobacter* species. *Microbiology*, **150**, 3507–3517 (2004)
6. Chopra I., Roberts M.: Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 232–260 (2001)
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated of Fastidious Bacteria: Approved Guideline M45A. CLSI, PA, USA 2006
8. Coker A.O., Isokpehi R.D., Thomas B.N., Amisu K.O., Obi C.L.: Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 237–243 (2002)
9. Connell S.R., Tracz D.M., Nierhaus K.H., Taylor D.E.: Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3675–3681 (2003)
10. Corcoran D., Quinn T., Cotter L., Fanning S.: An investigation of the molecular mechanism contributing to high-level erythromycin resistance in *Campylobacter*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **27**, 40–45 (2006)
11. Derbise A., Aubert S., El Solh N.: Mapping the regions carrying the three contiguous antibiotic resistance genes *aadE*, *sat4*, and *aphA-3* in the genomes of staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1024–1032 (1997)
12. Ge B., McDermott P., White D., Meng J.: Role of efflux pumps and topoisomerase mutations in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3347–3354 (2005)
13. Gibreel A., Skold O.: High-level resistance to trimethoprim in clinical isolates of *Campylobacter jejuni* by acquisition of foreign genes (*dfr1* and *dfr9*) expressing drug-insensitive dihydrofolate reductases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 3059–3064 (1998)
14. Gibreel A., Skold O.: An integron cassette carrying *dfr1* with 90-bp repeat sequences located on the chromosome of trimethoprim-resistant isolates of *Campylobacter jejuni*. *Microb. Drug Resist.* **6**, 91–98 (2000)
15. Gibreel A., Skold O., Taylor D.E.: Characterization of plasmid-mediated *aphA-3* kanamycin resistance in *Campylobacter jejuni*. *Microb. Drug Resist.* **10**, 98–105 (2004)
16. Gibreel A., Taylor D.E.: Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**, 243–255 (2006)
17. Gupta A., Nelson J.M., Barrett T.I.: Antimicrobial resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997–2001. *Emerg. Infect. Disease*, **10**, 1102–1109 (2004)

18. Engberg J., Aarestrup F.M., Taylor D.E., Gerner-Smidt P., Nachamkin I.: Quinolone and macrolides resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg. Infect. Disease*, **7**, 24–34 (2001)
19. Kersulyte, D., B. Velapatino, G. Dailide, A.K. Mukhopadhyay, Y. Ito, L. Cahuayme, A.J. Parkinson, R.H. Gilman, D.E. Berg.: Transposable element ISHp608 of *Helicobacter pylori*: non-random geographic distribution, functional organization, and insertion specificity. *J. Bacteriol.* **184**, 992–1002 (2002)
20. Lee M.D., Sanchez S., Zimmer M., Umelaalim I., Berang M.E., McDermott P.F.: Class 1 integron-associated tobramycin-gentamicin resistance in *Campylobacter jejuni* isolated from the broiler chicken house environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3660–3664 (2002)
21. Lin J., Michel L.O., Zhang Q.: CmeABC functions as a multi-drug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**, 2124–2131 (2002)
22. Lin J., Yan M., Sahin O.: Effect of macrolide usage on emergence of erythromycin-resistant *Campylobacter* isolates in chickens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1678–1686 (2007).
23. Markiewicz Z., Kwiatkowski Z.A.: Bakterie, antybiotyki, lekooporność. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001
24. Moore J.E., Barton M.D., Blair I.S.: The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes Infect.* **8**, 1955–1966 (2006)
25. Nirdnoy W., Mason C.J., Guerry P.: Mosaic structure of a multiple-drug-resistant, conjugative plasmid from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2454–2459 (2005)
26. Padungton P., Kaneene J.B.: *Campylobacter* spp. in human, chickens, pigs and their antimicrobial resistance. *J. Vet. Med. Sci.* **65**, 161–170 (2003)
27. Payot S., Bolla J.M., Corcoran D., Fanning S., Megraud F., Zhang Q.: Mechanism of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* sp. *Microbes Infect.* **8**, 1967–1971 (2006)
28. Payot S., Dridi S., Laroche M.: Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolated from fattening pigs in France. *Vet. Microbiol.* **101**, 91–99 (2004)
29. Piddock L.J., Ricci V., Pumbwe L., Everett M.J., Griggs D.J.: Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* species from man and animals: detection of mutation in topoisomerase genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 19–26 (2003)
30. Pratt A., Korolik V.: Tetracycline resistance of Australian *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**, 452–460 (2005)
31. Ross J.L., Eady E.A., Cove J.H., Cunliffe W.J.: 16S rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1702–1705 (1998)
32. Rozynek E., Dzierżanowska-Fangrat K., Korsak D., Konieczny P., Wardak S., Szych J., Jarosz M., Dzierżanowska D.: Comparison of antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from humans and chicken carcasses in Poland. *J. Food Protect.* **71**, 602–607 (2008)
33. Speer B.S., Salyers A.A.: Novel aerobic tetracycline resistance gene that chemically modifies tetracycline. *J. Bacteriol.* **171**, 148–153 (1989)
34. Tajada P., Gomez-Garcez J.L., Alos J.I., Balas D., Cogollos R.: Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to 12  $\beta$ -lactam agents and combinations with  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 1924–1925 (1996)
35. Taylor D.E.: Genetics of *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 35–64 (1992)
36. Tenover F.C., Gilbert T., O'Hara P.: Nucleotide sequence of a novel kanamycin resistance gene, *aphA-7*, from *Campylobacter jejuni* and comparison to other kanamycin phosphotransferase genes. *Plasmid*, **22**, 52–58 (1989)
37. Trieber C.A., Taylor D.E.: Mutations in the 16S ribosomal RNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline. *J. Bacteriol.* **184**, 2131–2140 (2002)
38. Trieu-Cuot P., Gerbaud G., Lambert T., Courvalin P.: In vivo transfer of genetic information between gram-positive and gram-negative bacteria. *EMBO J.* **4**, 3583–3587 (1985)
39. Vacher S., Menard A., Bernard E., Megraud F.: Detection of mutations associated with macrolide resistance in thermophilic *Campylobacter* spp. by real-time PCR. *Microb. Drug Resist.* **11**, 40–47 (2005)
40. Wardak S., Szych J., Duda U.: Wrażliwość na antybiotyki i chemioterapeutyki szczepów pałeczek *Campylobacter* sp. izolowanych od ludzi w latach 2005–2006 w regionie Bielsko-Bialskim. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **59**, 43–49 (2007)
41. Wardak S., Szych J., Zasada A.A.: Antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* clinical isolates from Poland. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1123–1125 (2007)