

BIOFILM, POMPY MDR I INNE MECHANIZMY OPORNOŚCI *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* NA ZWIĄZKI PRZECIWBAKTERYJNE

Olga Zajac^{1*}, Agnieszka E. Laudy¹, Stefan Tyski^{1,2}

¹Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Oczki 3, 02-007 Warszawa

²Zakład Antybiotyków i Mikrobiologii, Narodowy Instytut Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa

Wpłynęło w kwietniu 2014 r.

1. Wstęp. 2. Leczenie zakażeń *S. maltophilia*. 3. Oporność na związki przeciwbakteryjne. 3.1. Oporność na antybiotyki i chemioterapeutyki. 3.2. Oporność na środki dezynfekcyjne. 3.3. Oporność na jony metali. 4. Systemy pomp. 4.1. Rodzina RND. 4.2. Rodzina MFS. 4.3. Rodzina ABC. 4.4. Pompa FuaABC. 5. Biofilm bakteryjny i system *quorum sensing*. 6. Podsumowanie

Biofilm, MDR efflux pumps and other mechanisms of *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to antibacterial substances

Abstract: *Stenotrophomonas maltophilia* is a non-fermentative Gram-negative rod, which can cause many infections, including pneumonia and bacteremia, especially in immunocompromised or long-term hospitalized patients. The infections are difficult in therapy, because clinical isolates are usually highly resistant to many classes of antimicrobial agents, moreover, they are able to colonize medical devices and epithelial cells and form biofilm. The several resistance mechanisms of *S. maltophilia* to antibacterial agents have been described, among them: β -lactamases production, production of other enzymes modifying antibiotics structure and activity of multidrug efflux pumps (MDR). Up to date, eight MDR efflux pumps have been identified in *S. maltophilia* strains. These pumps belong to three different families of MDR pumps and RND family plays the most important role in multidrug resistance.

1. Introduction. 2. Treatment of *S. maltophilia* infections. 3. Resistance to antibacterial substances. 3.1. Resistance to antibiotics and chemotherapeutics. 3.2. Resistance to disinfectants. 3.3. Resistance to metals. 4. Efflux systems. 4.1. RND family. 4.2. MFS family. 4.3. ABC family. 4.4. The FuaABC efflux pump. 5. Biofilm and *quorum sensing* system. 6. Summary

Słowa kluczowe: biofilm, pompy MDR, oporność na antybiotyki, QS, *Stenotrophomonas maltophilia*

Key words: biofilm, MDR pumps, antibiotic resistance, QS, *Stenotrophomonas maltophilia*

1. Wstęp

Pałeczki *Stenotrophomonas maltophilia* zostały po raz pierwszy wyizolowane w 1943 roku jako *Bacterium bookeri*. W roku 1961 nazwę zmieniono na *Pseudomonas maltophilia*, a następnie w 1983 r. gatunek ten sklasyfikowano jako *Xanthomonas maltophilia* [45, 89]. Po dokładnych analizach sekwencji genu kodującego 16S rRNA i debatach nad nomenklaturą w 1993 roku zdecydowano się utworzyć nowy rodzaj – *Stenotrophomonas* oraz gatunek *Stenotrophomonas maltophilia* [70].

Według Bergey's Manual of Systematic Bacteriology rodzaj *Stenotrophomonas* obejmuje aktualnie 3 gatunki: *S. maltophilia*, *S. africana* i *S. nitrireducens* [30]. W ostatnich latach w światowym piśmiennictwie pojawiły się informacje o wyizolowaniu kolejnych gatunków, wśród których możemy wyróżnić: *S. acidaminiphila* [7], *S. daejeonensis* [54], *S. dokdonensis* [101], *S. ginsengisoli* [48], *S. rhizophila* [98], *S. pavanii* [77], *S. koreensis* [100], *S. chelatiphaga* [47], *S. terre* i *S. humi* [38]. Tylko jeden gatunek – *S. maltophilia* jest chorobotwórczy dla człowieka [79].

Rodzaj *Stenotrophomonas* charakteryzowano w szeregu publikacji przeglądowych [14, 35, 62, 65]. Niniej-

sza praca natomiast koncentruje się na zebraniu i analizie najbardziej aktualnych informacji dotyczących rozmaitych mechanizmów oporności *S. maltophilia* na związki przeciwbakteryjne, co może ułatwić walkę z tym drobnoustrojem, którego rola w patogenezie zakażeń bakteryjnych ostatnio uległa zwiększeniu.

Stenotrophomonas maltophilia to niefermentująca pałeczka Gram-ujemne należąca do grupy bezwzględnych tlenowców. Występuje w środowisku naturalnym – w glebie, ryzosferze, u zwierząt, w naturalnych zbiornikach wodnych [14]. Były także izolowane z produktów spożywczych np. mrożonych ryb, mleka, wody butelkowanej [35]. W środowisku szpitalnym mogą stanowić zanieczyszczenie sprzętu medycznego, natrysków szpitalnych, środków dezynfekcyjnych zawierających chlorheksydynę i cetrimid oraz mogą być obecne na dłoniach personelu medycznego [35, 62, 97]. Izolowano je także z płynów do soczewek kontaktowych [14].

S. maltophilia jest patogenem oportunistycznym; najbardziej podatne na zakażenia są osoby z obniżoną odpornością, chorzy na mukowiscydozę, długotrwale hospitalizowani oraz przebywający na oddziałach intensywnej opieki medycznej [14, 62, 73, 82]. Pałeczki *S. maltophilia* wywołują zakażenia układu oddechowego

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Oczki 3, 02-007 Warszawa; tel.: 22 628-08-22; tel./fax: 22 621-13-51; e-mail: olga.m.zajac@gmail.com

(zapalenia płuc) [67], jak również zakażenia oka (głównie zapalenia twardówki, rogówki, wnętrza gałki ocznej) [17, 59], zapalenia wsierdza [11] i tkanki łącznej [81], infekcje dróg moczowych [92], zapalenia opon mózgowych [42], a także posocznice [71].

Dużą trudnością w diagnostyce i terapii zakażeń jest różnorodność fenotypowa i genotypowa klinicznych szczepów *S. maltophilia*. W celu analizy czy podobieństwo genetyczne szczepów w obrębie danej grupy wpływa na ich podobieństwo fenotypowe utworzono grupy filogenetyczne. Za punkt odniesienia obrano porównanie sekwencji nukleotydowych genów kodujących β -laktamazy L1 i L2 oraz 16S rRNA i w ten sposób utworzono 3 grupy *S. maltophilia*. Grupa filogenetyczna A, którą charakteryzuje szczep K279a, grupa B – reprezentowana przez szczep N531 oraz grupa C, której przykładem jest szczep J675a [9, 31]. W późniejszym czasie, po dokładniejszej analizie sekwencji nukleotydowych powstała 4 grupa – D [34]. Najbardziej powszechna jest grupa A zawierająca izolaty o największej homologii. Największa heterogenność występuje w grupie B [33].

Zakażenia *S. maltophilia* stanowią bardzo poważny problem terapeutyczny. Głównie z uwagi na szeroko występującą oporność tych szczepów na różne rodzaje antybiotyków i chemioterapeutyków, należą one do grupy wielolekoopornych drobnoustrojów MDRO (*multi-drug resistant organisms*) [14, 35, 65].

2. Leczenie zakażeń *S. maltophilia*

Lekiem z wyboru stosowanym w zakażeniach *S. maltophilia* jest trimetoprim-sulfametoksazol. Mimo, iż liczba szczepów opornych na ten związek z każdym rokiem rośnie, obecnie nie przekracza jednak 25% izolatów [13, 20]. W poprzednich latach 1997–1999 w Kanadzie, Ameryce Środkowej i Południowej zaobserwowano oporność u 2% szczepów, w krajach z rejonu Azji u 8%, a w Europie u 10% [29]. Trimetoprim-sulfametoksazol ma działanie bakteriostatyczne wobec bakterii, w tym *S. maltophilia* i w związku z tym zaleca się stosowanie wysokich dawek tego leku w terapii ciężkich zakażeń [62]. W przypadku nietolerancji lub nadwrażliwości pacjenta na trimetoprim-sulfametoksazol lekiem drugiego rzutu jest zestawienie tykarcylina/kwas klawulanowy. Wiadomo, iż β -laktamy wykazują niewielką aktywność wobec szczepów *S. maltophilia* ze względu na szeroko rozwiniętą naturalną oporność tego gatunku w stosunku do tej grupy leków [18, 62]. Dopiero dodatek inhibitora β -laktamaz, jakim jest kwas klawulanowy może przywracać wrażliwość na antybiotyki β -laktamowe [62]. W latach 90-tych wykazano, że ponad 80% szczepów było wrażliwych na połączenie tykarcylina/kwas klawulanowy [52], w później pro-

wadzonych badaniach zaobserwowano już oporność u 55% szczepów [80]. Ponadto w badaniach *in vitro* wykazano dużą skuteczność zestawienia aztreonamu z kwasem klawulanowym, jednak różna farmakokinetyka tych związków ogranicza możliwość zastosowania powyższego zestawienia w terapii [62]. Cefalosporyny wykazują małą aktywność wobec *S. maltophilia* zarówno w monoterapii, jak i w zestawieniu z inhibitorami β -laktamaz [65].

Nowsze chemioterapeutyki z grupy fluorochinolonów, takie jak: moksifloksacyna, gatifloksacyna oraz lewofloksacyna wykazują większą skuteczność przeciw szczepom *S. maltophilia* niż starsze związki z tej rodziny [96]. Niestety, zaobserwowano wśród szczepów klinicznych *S. maltophilia* bardzo szybkie rozprzestrzenianie się oporności na chinolony, co znacznie ogranicza ich zastosowanie w monoterapii [62].

Pochodne tetracykliny t.j. doksycyklina, minocyklina i tygecyklina wykazują dobrą skuteczność przeciwbakteryjną w odniesieniu do *S. maltophilia* [20, 62]. Ponadto tygecyklina jest aktywna także wobec szczepów opornych na trimetoprim-sulfametoksazol i może być brana pod uwagę jako alternatywa w leczeniu, mimo iż doświadczenie kliniczne związane z terapią pochodnymi tetracykliny jest niewielkie [62].

Duże znaczenie w terapii zyskały ostatnio polimyksyny, t.j. polimyksyna B oraz kolistyna. Badania prowadzone przez Nicodemo i wsp. na kolekcji 66 izolatów *S. maltophilia* wykazały wrażliwość 75,7% szczepów na kolistynę i 77,3% szczepów na polimyksynę B [64]. Niestety ograniczeniem do stosowania polimyksyn jest niewielka liczba badań klinicznych oraz znaczna toksyczność leków zawierających te związki [65].

Chloramfenikol może być stosowany w terapii ciężkich zakażeń *S. maltophilia* jedynie w postaci maści na skórę. Wymagane jest jednak wcześniejsze potwierdzenie braku oporności danego szczepu *in vitro* [62].

Strategią terapeutyczną jest również stosowanie terapii kombinowanej, która zakłada użycie wybranych antybiotyków działających synergicznie. Wprowadzenie jej było spowodowane m.in. dużym poziomem oporności szczepów oraz szybkim nabywaniem oporności. Badania *in vitro* wykazały zwiększoną aktywność przeciwbakteryjną leków działających synergicznie niż stosowanych w monoterapii, nawet w przypadku gdy izolat jest oporny na jeden lub oba badane związki. Terapia kombinowana jest wskazana szczególnie w przypadkach neutropenii, zapalenia wsierdza, u pacjentów z immunosupresją i bakteriecią. Wśród leków wykazujących największe działanie synergiczne wobec *S. maltophilia* możemy wyróżnić następujące zestawienia: trimetoprim-sulfametoksazol i tykarcylina z kwasem klawulanowym, trimetoprim-sulfametoksazol i karbenicylina, tykarcylina z kwasem klawulanowym i cyprofloksacyna, ceftazydym i amikacyna, gatifloksacyna

i cefepim oraz tykarcylina z kwasem klawulanowym i amikacyna [14, 19, 62, 65].

3. Oporność na związki przeciwbakteryjne

Stenotrophomonas maltophilia charakteryzuje się dużym poziomem oporności na szerokie spektrum związków przeciwbakteryjnych znacznie różniących się pod względem strukturalnym m.in. antybiotyki β -laktamowe, aminoglikozydy, chinolony, tetracyklinę, chloramfenikol, środki dezynfekcyjne (w tym czwartorzędowe sole amoniowe oraz związki fenolowe) czy jony metali. Badania prowadzone w latach 1994–2006 w wielu ośrodkach na świecie wykazały, że odsetek szczepów opornych na karbapenemy wynosił 88–100%, na cefalosporyny – 34–100%, aminoglikozydy – 58–100%, tetracyklinę – 70–86%, a na chloramfenikol – 35–39% [62]. W ciągu ostatnich lat obserwowany jest także wzrost liczby szczepów opornych na lek pierwszego wyboru trimetoprim-sulfametoksazol [13]. Do głównych mechanizmów oporności *S. maltophilia* należą: wytwarzanie różnych β -laktamaz, a także innych enzymów modyfikujących cząsteczki antybiotyków oraz obecność pomp MDR (*multi-drug resistance*), usuwających antybiotyki na zewnątrz komórki bakterii. Co jest szczególnie istotne, niektóre z systemów pomp MDR mają zdolność nie tylko aktywnego usuwania z komórek antybiotyków należących do różnych grup chemicznych, ale także środków dezynfekcyjnych. Dodatkowo *S. maltophilia*, jak wszystkie pałeczki Gram-ujemne, posiada błonę zewnętrzną, która stanowi barierę fizyczną i m.in. chroni komórkę przed wnikaniem antybiotyków do jej wnętrza. Ponadto zdolność wzrostu szczepów *S. maltophilia* w postaci biofilmu determinuje ich zwiększoną tolerancję na związki przeciwbakteryjne.

3.1. Oporność na antybiotyki i chemioterapeutyki

W ostatnich latach zaobserwowano coraz większą liczbę szczepów *S. maltophilia* opornych na trimetoprim-sulfametoksazol, lek pierwszego rzutu stosowany w leczeniu zakażeń tymi drobnoustrojami. W badaniach prowadzonych w latach 2001–2012 w Wielkiej Brytanii stwierdzono oporność na trimetoprim-sulfametoksazol aż u 24% szczepów *S. maltophilia* izolowanych od pacjentów z mukowiscydozą [13]. Oporność na trimetoprim-sulfametoksazol jest związana z występowaniem genów *sul*. Obecność genu *sul1*, stanowiącego część integronów klasy I, wykazano u szczepów izolowanych m.in. na Tajwanie, w Hiszpanii, we Włoszech oraz Północnej i Południowej Ameryce [62]. Gen *sul2* związany jest z sekwencjami insercyjnymi ISCR2 i może występować zarówno w plazmidzie, jak i w chromoso-

malnym DNA. Gen *sul2*, podobnie jak *sul1*, wykryto u szczepów pochodzących z różnych części świata [62, 90]. Oporność *S. maltophilia* tylko na trimetoprim jest warunkowana obecnością genu *dfrA* kodującego reduktazę kwasu foliowego [40].

Bardzo istotną dużą grupą antybiotyków stosowaną w leczeniu zakażeń pałeczkami Gram-ujemnymi są β -laktamy, zaburzające syntezę peptydoglikanu, głównego składnika ściany komórkowej bakterii. Za jego ostateczną syntezę i prawidłową strukturę odpowiadają białka PBP (*penicillin-binding protein*), które są charakterystyczne dla danego drobnoustroju. Antybiotyk β -laktamowy wiążąc się z PBP powoduje zmiany w strukturze peptydoglikanu, co często prowadzi do wycieku cytoplazmy i śmierci komórki bakteryjnej. Ponadto antybiotyki β -laktamowe mogą zaburzać równowagę produktów obrotu metabolicznego peptydoglikanu w cytoplazmie, co prowadzi to do indukcji genów kodujących β -laktamazy.

S. maltophilia posiada dwie chromosomalnie kodowane β -laktamazy: L1 i L2. Enzym L1 to metalo- β -laktamaza, która zawiera w swoim centrum aktywnym jony cynku. Ma ona strukturę tetrameru, w którym każdy monomer jest zdolny do przyłączenia dwóch jonów Zn^{2+} . β -laktamaza L1 jest kodowana przez chromosomalny gen *bla_{L1}*, ma zdolność hydrolizy wszystkich klas β -laktamów (penicylin, cefalosporyn, karbapenemów), z wyjątkiem monobaktamów. Nie jest wrażliwa na działanie inhibitorów β -laktamaz serynowych [22, 50]. Wykazano, że nawet tazobaktam stanowi substrat metalo- β -laktamazy obecnej u szczepu *S. maltophilia* ULA-511 [27].

Enzym L2 należy do grupy β -laktamaz serynowych i jest zbudowany z dwóch podjednostek tworzących dimer. Koduje go chromosomalny gen *bla_{L2}*. β -laktamaza L2 ma zdolność rozkładania penicylin i cefalosporyn, jak również hydrolizy aztreonamu, a jej aktywność jest hamowana przez kwas klawulanowy [50, 61, 93].

Sekwencja nukleotydowa genów kodujących enzymy L1 i L2 u poszczególnych szczepów *S. maltophilia* charakteryzuje się dużą zmiennością. Przeprowadzono badania, które wykazały różnice w sekwencji nukleotydowej od 8% do 20% dla genów *bla_{L1}* oraz 4–25% dla genów *bla_{L2}*, co przekłada się na różnice sekwencji aminokwasowych, odpowiednio, 8–19% i 5–32% [9]. Ekspresja genów kodujących β -laktamazy L1 i L2 jest zwykle indukowana ekspozycją komórek na antybiotyki β -laktamowe [8]. U szczepów należących do grupy filogenetycznej A produkcja zarówno enzymu L1, jak i L2 jest indukowana, w grupie B indukowane jest wytwarzanie enzymu L1, natomiast L2 wydzielany jest konstytutywnie na niskim poziomie. W grupie filogenetycznej C oba enzymy są produkowane konstytutywnie w niewielkich ilościach. Izolaty należące do tej grupy charakteryzują się większą wrażliwością na wszystkie

związki β -laktamowe z wyjątkiem imipenemu niż izolaty pochodzące z grup A i B [33].

U *S. maltophilia* indukcja genów bla_{L1} i bla_{L2} jest zależna od zespołu genów *ampR-ampN-ampG-ampD_I*. Białka AmpG i AmpN tworzą system permeazy. Odpowiadają za transport z peryplazmy do cytoplazmy produktów degradacji ściany komórkowej, które stanowią ligand dla cząsteczki AmpR będącej regulatorem transkrypcji. Białko AmpD_I odpowiada za degradację cząsteczek ligandów [58]. Cząsteczki AmpR są niezbędne do konstytutywnej ekspresji genu bla_{L1} , lecz nie bla_{L2} oraz do indukowanej ekspresji obu genów [57].

W 2012 roku w Chinach wyizolowano szczep *S. maltophilia* DCPS-01, który oprócz genów bla_{L1} i bla_{L2} posiadał także gen kodujący metalo- β -laktamazę New Delhi (NDM-1). Szczep ten charakteryzował się opornością na wszystkie antybiotyki β -laktamowe, był wrażliwy jedynie na kolistynę i fluorochinolony [60]. Wśród szczepów klinicznych *S. maltophilia* wykryto dodatkowo takie β -laktamazy jak: TEM-2 kodowana przez gen zlokalizowany w transpozonie Tn1 [10] oraz enzym CTX-M-1 należący do grupy ES β L (*extended spectrum β -lactamase*) [2].

W oporności *S. maltophilia* na chinolony główną rolę odgrywają pompy efflux (szczególnie system SmeDEF) oraz niska przepuszczalność błony zewnętrznej komórek bakterii. W 2008 roku w Japonii w obrębie chromosomu bakteryjnego szczepu *S. maltophilia* CCUG 5866 wykryto gen *Smqnr* odpowiadający za niski poziom oporności na powyższe związki [87]. Gen ten był także obecny u 24 niespokrewnionych ze sobą izolatów klinicznych *S. maltophilia*. Koduje on białko uniemożliwiające przyłączenie chinolonów do miejsc ich oddziaływania – gyrazy DNA i topoizomery IV. Jak dotąd, nie wykryto obecności genów *Smqnr* w plazmidach szczepów *S. maltophilia*. Za oporność na chinolony mogą odpowiadać również mutacje w genach kodujących gyrazę i topoizomazę IV, lecz prawdopodobnie ten mechanizm oporności nie ma większego znaczenia dla szczepów *S. maltophilia* [62, 103].

Oporność *S. maltophilia* na aminoglikozydy może być wynikiem działania kilku mechanizmów, wśród których można wyróżnić: występowanie enzymów modyfikujących cząsteczki aminoglikozydów, oporność temperaturo-zależną oraz mechanizm efflux.

Modyfikacja enzymatyczna aminoglikozydów zachodzi przy udziale enzymów kodowanych przez geny chromosomalne. Gen *aac(6')-Iz* kodujący enzym acetylotransferazę odpowiada za spadek wrażliwości szczepów głównie na tobramycynę. Geny *aph(3')-IIa* i *aph(3')-IIc* kodują fosfotransferazy. Enzym APH(3')-IIa przyczynia się do oporności na wszystkie aminoglikozydy z wyjątkiem gentamycyny, natomiast enzym APH(3')-IIc odpowiada za oporność szczepów na kanamycynę i neomycynę [65, 66].

Oporność na aminoglikozydy związana jest także z modyfikacją struktury błony zewnętrznej komórek. Stanowi ona miejsce wiązania m.in. dla antybiotyków kationowych, jakimi są aminoglikozydy. W zależności od temperatury szczepy *S. maltophilia* są zdolne do zmiany rozmiarów cząsteczek O-polisacharydów poprzez zmianę długości jego bocznych łańcuchów oraz zawartości fosforanów w lipopolisacharydzie (LPS) błony zewnętrznej. Obserwowano większą zawartość ujemnie naładowanych grup fosforanowych w LPS, stanowiących miejsce przyłączania aminoglikozydów, w temp. 37°C w porównaniu do temp. 30°C. W związku z tym, szczepy *S. maltophilia* charakteryzują się zwiększoną opornością na powyższe antybiotyki w temp. 30°C niż w 37°C [62, 65, 76].

3.2. Oporność na środki dezynfekcyjne

Szczepy *S. maltophilia* są trudno eliminowane przy użyciu powszechnie stosowanych środków dezynfekcyjnych. Podchloryn sodu o stężeniu 0,1%, używany m.in. do dezynfekcji ssaków medycznych, redukuje liczbę komórek bakterii jedynie o 1–2 log₁₀. Procedura dezynfekcji obejmuje wstępne mycie z użyciem bierzącej wody, a następnie zanurzenie ssaków na okres 2 h w 0,1% roztworze podchlorynu sodu [102].

S. maltophilia wykazują tolerancję wobec triklosanu – przedstawiciela związków fenolowych. Triklosan posiada zdolność indukcji genów kodujących pompę SmeDEF, która usuwa jego cząsteczki na zewnątrz komórek bakteryjnych [37, 85]. W związku z tym, po powtarzającej się ekspozycji drobnoustrojów na triklosan obserwowany jest spadek wrażliwości izolatów [53].

Inny powszechnie stosowany środek dezynfekcyjny, jakim jest chlorheksydyna wykazuje zdolność redukcji liczby komórek szczepu klinicznego *S. maltophilia* G478 o 5 log₁₀ jedynie w stężeniu powyżej 500 mg/l. Wartość MIC tego związku wobec *S. maltophilia* G478 wynosi 175 mg/l, podczas gdy wartości MIC chlorheksydyny dla szczepów klinicznych z innych rodzajów pałeczek Gram-ujemnych mieszczą się w przedziale 10–250 mg/l [39].

Wang i wsp. [94] wykryli u 10,5% przebadanych szczepów *S. maltophilia* gen *qacEΔ1* kodujący oporność na szeroką grupę środków dezynfekcyjnych jaką stanowią czwartorzędowe sole amoniowe (m.in. chlorek benzalkoniowy, cetrimid). Gen *qacEΔ1* jest związany z integronami klasy 1.

3.3. Oporność na jony metali

Szczep *S. maltophilia* Sm777 jest zdolny do wzrostu w obecności wysokich stężeń toksycznych jonów metali, w szczególności Cd²⁺, jak również Cu²⁺, Pb²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺ i Ag⁺. Gęstość hodowli bakteryjnych wyrosłych na

Tabela I

Pompy MDR zidentyfikowane u pałeczek *S. maltophilia*

Rodzina	Pompa	Substraty	Regulator	Piśmiennictwo
RND	SmeDEF	erytromycyna, chloramfenikol, tetracykliny, fluorochinolony, triklosan	SmeT	36, 37, 51, 65, 83, 84
	SmeABC	aminoglikozydy, β -laktamy, fluorochinolony	SmeR SmeS	14, 15, 55
	SmeU1VWU2X	chloramfenikol, chinolony, tetracykliny	SmeRv	16, 21
	SmeIJK	aminoglikozydy, tetracykliny, cyprofloksacyna	Nieznany	21, 32
	SmeYZ	aminoglikozydy	Nieznany	21, 32
ABC	SmrA	cyprofloksacyna, norfloksacyna, tetracyklina	Nieznany	3
MFS	EmrCABsm	kwas nalidyksowy, erytromycyna, karbonylocyjanek 3-chlorofenylohydrazonu, tetrachlorosalicylanilid	EmrRsm	44
?	FuaABC	kwas fusydowy	FuaR	41

podłożach zawierających sole powyższych metali jest wysoka, może osiągać wartość 10^9 cfu/ml [68].

Tolerancja *S. maltophilia* na związki kadmu jest związana m.in. z obecnością genów *cadA* i *cadC* odpowiedzialnych za jego usuwanie z komórek [6]. Gen *cadA* koduje białko systemu efflux, natomiast produkt białkowy genu *cadC* pełni funkcję regulatora transkrypcji. Struktura tych genów oraz zawartość par G-C wskazują na to, że wywodzą się one od bakterii Gram-dodatnich. Ich homologi wykryto m.in. u szczepów *Staphylococcus aureus*, od których prawdopodobnie zostały nabyte przez szczepy *S. maltophilia*. Transfer genów pomiędzy komórkami bakterii jest możliwy, gdy bytują one w tym samym środowisku, a zarówno *S. aureus* jak i *S. maltophilia* są często izolowane z dróg oddechowych pacjentów z mukowiscydozą [6].

Innym mechanizmem pozwalającym komórkom bakterii na detoksykację związków kadmu jest ich przekształcanie do siarczków kadmu. Szczepy *S. maltophilia* w warunkach tlenowych, na podłożu stałym zawierającym 0,5 mM $CdCl_2$, wyrastają w postaci żółtych kolonii, co wskazuje na wytrącanie związków kadmu w postaci CdS. Dokładny mechanizm tego zjawiska jednak nie jest do końca wyjaśniony [68]. Dodatkowo, u drobnoustrojów rosnących w obecności $CdCl_2$ zaobserwowano wzrost puli cysteiny wewnątrzkomórkowej. Wolna cysteina jest źródłem stresu oksydacyjnego dla komórki, ale posiada ona także zdolność chelatowania jonów kadmu, co chroni komórkę przed toksycznym wpływem tego metalu. Powstanie chelatów powoduje zmniejszenie ilości zarówno wolnej cysteiny, jak i wolnego kadmu w komórce [68].

Szczep *S. maltophilia* Sm777 charakteryzuje się możliwością wzrostu w obecności toksycznych selenianów i tellurynów. Mechanizm oporności związany jest ze zdolnością drobnoustrojów do redukcji powyższych oksyanionów do wolnego telluru (Te^0) i selenu (Se^0). Akumulacja Te^0 i Se^0 następuje wewnątrz komórki bakteryjnej [68].

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa jonów srebra związana jest z ich przyłączaniem do białek obecnych w ścianach komórkowych bakterii. Następuje zachwianie potencjału elektrycznego, co skutkuje zahamowaniem procesów metabolicznych i śmiercią komórek. Ponadto srebro ma zdolność przyłączania się do DNA [88]. Hu a n g i wsp. [43] badali aktywność *in vitro* jonów srebra i miedzi, a także połączenia srebro-miedź w eradykacji szczepów *S. maltophilia* rosnących w formie planktonowej. Uzyskano redukcję ponad 99,999% bakterii w ciągu 6 h stosując jony miedzi w zakresie stężeń od 200 do 800 $\mu g/l$ lub używając jony srebra w stężeniach 40 i 80 $\mu g/l$. Połączenie jonów srebra i miedzi w stężeniach 200/20 $\mu g/l$ i 400/40 $\mu g/l$ charakteryzowało się antagonistycznym działaniem wobec szczepów *S. maltophilia* [43].

4. Systemy pomp

Jednym z głównych mechanizmów lekooporności bakterii *S. maltophilia* jest obecność pomp MDR aktywnie usuwających antybiotyki i inne związki przeciwbakteryjne na zewnątrz komórek bakterii. Do tej pory u *S. maltophilia* wykryto pompy MDR (*multi-drug resistance*) należące do 3 rodzin: RND, ABC i MFS. Aktywność większości opisanych pomp jest indukowana obecnością antybiotyków. W tabeli I zestawiono pompy odpowiedzialne za zjawisko efflux zidentyfikowane u pałeczek *S. maltophilia*.

4.1. Rodzina RND

(*resistance-nodulation-division family*)

Najważniejszą z punktu widzenia lekooporności jest rodzina pomp RND. Pompy te charakteryzują się szerokim spektrum substratowym, usuwają z komórek bakterii antybiotyki należące do różnych klas, jak również środki dezynfekcyjne i antyseptyczne. Są to pompy

protonowe – ich działanie jest oparte na antyporcie proton-substrat [46]. Pompy RND zbudowane są z trzech części: białek RND tworzących kanał w błonie cytoplazmatycznej, białek OMF odpowiedzialnych za transport substancji poprzez błonę zewnętrzną i białek MFP łączących białka obecne w błonie cytoplazmatycznej i w błonie zewnętrznej [21, 51]. Białka MFP zwykle są specyficzne dla konkretnych białek RND i obie grupy białek są kodowane w obrębie tego samego operonu. Białka błony zewnętrznej (OMF) mogą być kodowane przez geny zlokalizowane w obrębie tego samego operonu co para RND/MFP, ale mogą również podlegać niezależnej regulacji [21].

Pierwszą pompą należącą do rodziny RND wykrytą u *S. maltophilia* był system SmeDEF. Został on scharakteryzowany po raz pierwszy przez Alonzo i Martinez w 2000 roku; badali oni sekwencję chromosomalnego DNA *S. maltophilia* pod kątem mechanizmów odpowiedzialnych za wielolekooporność szczepu [5]. Przesłanką do poszukiwania pomp MDR u *S. maltophilia* było wykrycie zjawiska efflux u spokrewnionej bakterii Gram-ujemnej *Pseudomonas aeruginosa*. W obrębie badanego odcinka chromosomalnego DNA *S. maltophilia* zidentyfikowano 3 geny: *smeD*, *smeE* i *smeF*. Sekwencje aminokwasowe produktów tych genów wykazały podobieństwo do kilku komponentów pomp efflux obecnych u różnych bakterii Gram-ujemnych. Białko SmeD wykazało homologię do białek z grupy MFP, w tym największe podobieństwo (48%) do AcrA i AcrE występujących u *E. coli*. Wykazało natomiast stosunkowo małe podobieństwo (41%) do białka SmeA z grupy RND, pochodzącego ze szczepu *S. maltophilia*. Białko SmeE wykazało homologię do białek RND, w tym do AcrB i AcrF z *E. coli* (odpowiednio w 61% i 58%). Produkt białkowy trzeciej ramki odczytu – SmeF wykazał podobieństwo do białek błony zewnętrznej (OMF), największe do białka SmeC szczepu *S. maltophilia* [5].

Pompa SmeDEF usuwa z komórek takie antybiotyki jak: erytromycyna, chloramfenikol, tetracykliny, fluorochinolony, a także triklosan [46, 65, 85]. Ekspresja genów *smeDEF* jest regulowana przez białko SmeT pełniące rolę represora. Gen kodujący SmeT znajduje się powyżej operonu kodującego pompę. Białko SmeT należące do rodziny regulatorów TetR ma strukturę homodimeru, gdzie każda podjednostka składa się z 9 helis tworzących 2 domeny. Białko SmeT wiąże się do obszaru operatora o długości 28 pz zlokalizowanego pomiędzy genami *smeT* i *smeD*, który nakłada się na sekwencje promotorów *smeT* i *smeDEF*. W wyniku tego represor SmeT hamuje transkrypcję nie tylko genów pompy SmeDEF, ale także genów własnych. SmeT wiąże się z operatorem w dwóch miejscach tworząc dwa kompleksy (dwa homodimery SmeT przypadają na jeden operator). Kluczowe znaczenie dla

wiązania represora ma sekwencja TGTATGT obecna w nici kodującej pompę. Drugi homodimer rozpoznaje podobną sekwencję komplementarnej nici. Wykazano, że mutacje w genach kodujących białko SmeT oraz mutacje w sekwencji TGTATGT mogą przyczyniać się do nadekspresji genów operonu *smeDEF* [36, 83, 84]. Co więcej, składnik past do zębów, domowych środków czyszczących, czy modnych jeszcze niedawno mydeł antyseptycznych – triklosan indukuje nadekspresję systemu SmeDEF poprzez przyłączanie się do cząsteczki represora SmeT, co stymuluje lekooporność szczepów [37, 85].

Kolejną wykrytą pompą RND obecną u *S. maltophilia* był system SmeABC [55]. Geny *smeA*, *smeB* i *smeC* kodują odpowiednio białka MFP, RND i OMF. Sekwencje aminokwasowe komponentów systemu SmeABC charakteryzują się dużym podobieństwem m.in. do sekwencji składników systemu MexAB-OprM obecnego u *P. aeruginosa* oraz SmeDEF u *S. maltophilia* [55]. Wykazano, że na lekooporność ma wpływ jedynie białko SmeC, które posiada zdolność do współpracy także z innymi systemami efflux. Delecja genu *smeC* powoduje utratę oporności związaną z obecnością systemu SmeABC [14, 55]. Nadekspresja genów *smeABC* wiąże się z występowaniem u szczepów oporności na aminoglikozydy, β -laktamy oraz fluorochinolony [15]. Po wprowadzeniu genu *smeC* do zmutowanego szczepu *P. aeruginosa* niewytwarzającego własnego białka OprM, gen ten ulegał ekspresji. Białko SmeC przejęło funkcję białka OprM i było zdolne do współpracy jako część systemu MexAB-SmeC [55]. Gen *smeC* posiada swój własny słaby promotor, co powoduje, że może on ulegać ekspresji samodzielnie lub z całym operonem *smeABC*. Transkrypcja operonu *smeABC* jest regulowana przez dwuskładnikowy system regulacyjny, kodowany przez geny *smeR* i *smeS*. Geny te prawdopodobnie tworzą osobny operon i ulegają wspólnej transkrypcji niezależnie od genów kodujących pompę. SmeS jest białkiem sensorowym, natomiast SmeR pełni rolę regulatora odpowiedzi. W przypadku braku genu *smeR* ekspresja *smeC* zachodzi jedynie przy udziale własnego promotora [55].

System efflux SmeU1VWU2X obecny u *S. maltophilia* należy do grupy pomp RND [16]. Operon kodujący ten system składa się aż z pięciu genów: *smeV* (koduje białka MFP), *smeW* (białka RND), *smeX* (białka OMF), *smeU1* i *smeU2*. Geny *smeU1* i *smeU2* kodują krótko łańcuchową dehydrogenazę/reduktazę (SDR) i zlokalizowane są odpowiednio: *smeU1* powyżej genu *smeV*, a *smeU2* między genami *smeW* i *smeX*. Sekwencja aminokwasowa białek SmeU1 i SmeU2 jest zgodna tylko w 21%. Porównanie SmeU1VWU2X z innymi pompami RND wykazało duże podobieństwo do systemów obecnych u *Xanthomonas campestris* (DauE-MexE-MexF-Xcc1441-OprN) i *P. aeruginosa* (MexEF-OprN).

Zgodność sekwencji aminokwasowej poszczególnych białek, w pierwszym przypadku wynosiła 51–81%, a w drugim wahała się w granicach 48–58%. Substratami systemu *SmeU1VWU2X* są tetracykliny, chloramfenikol i chinolony [16].

Ekspresja operonu *smeU1VWU2X* jest regulowana przez białko *SmeRv* należące do rodziny LysR. Gen *smeRv* zlokalizowany jest w sąsiedztwie operonu *smeU1VWU2X*, powyżej genu *smeU1*. *SmeRv* prawdopodobnie pełni rolę pozytywnego regulatora, czego potwierdzeniem jest 78-krotny wzrost ekspresji kodującego go genu w szczepie wykazującym nadekspresję operonu *smeU1VWU2X* w porównaniu do szczepu dzikiego. Istnieje również hipoteza, która mówi, że białko *SmeRv* może funkcjonować jako pozytywny bądź negatywny regulator w zależności od obecności liganda [16, 21].

Natomiast geny kodujące pozostałe dwie pompy – *SmeIJK* i *SmeYZ*, obecne u *S. maltophilia*, ulegają ekspresji na stałym poziomie przyczyniając się do lekooporności tych szczepów. Pompa *SmeIJK* odpowiada za oporność na aminoglikozydy, tetracykliny i cyprofloksacynę, natomiast pompa *SmeYZ* usuwa z komórek bakterii aminoglikozydy [32, 75]. Wykazano, że geny *smeZ*, *smeJ* i *smeK* mogą ulegać skoordynowanej nadekspresji, co skutkuje zwiększeniem oporności szczepów na antybiotyki. Nadprodukcja białka *SmeZ* powoduje wzrost najmniejszego stężenia hamującego (MIC) aminoglikozydów. Zwiększona produkcja białek *SmeJ* i *SmeK* przejawia się wzrostem MIC tetracyklin i cyprofloksacyny oraz warunkuje oporność na lewofloksacynę [32]. Wykazano, że mutacje w genach *smeJ* i/lub *smeK* szczepów wykazujących nadekspresję powodują obniżenie wartości MIC tetracyklin i cyprofloksacyny oraz przywracają wrażliwość szczepów na lewofloksacynę. Mutacje w genie *smeZ* przyczyniają się do spadku wartości MIC aminoglikozydów, ale nie przywracają wrażliwości bakterii na ten antybiotyk.

Geny *smeJ* i *smeK* zlokalizowane są w obrębie jednego operonu, nie wykryto do tej pory żadnych genów regulatorowych położonych w jego sąsiedztwie. W pobliżu genu *smeZ* zlokalizowane są natomiast geny kodujące system dwuskładnikowy, lecz nieznaną jest jak dotąd jego rola w regulacji ekspresji genów kodujących pompy *SmeIJK* i *SmeYZ* [21, 32].

4.2. Rodzina MFS (*major facilitator superfamily*)

Wśród szczepów *S. maltophilia* wykryto do tej pory tylko jedną pompę z rodziny MSF – *EmrCABsm* [44]. Jest ona homologiem pompy *EmrAB* oraz *EmrKY* obecnych u *E. coli*, *VceAB* u *Vibrio cholerae* oraz *FarAB* obecnej u *Neisseria gonorrhoeae* [44]. Energia do pracy tej grupy pomp pochodzi z gradientu elektrochemicznego – cząsteczka antybiotyku transportowana jest na zewnątrz komórki, a do wnętrza wprowadzany jest pro-

ton. Pompy MSF zbudowane są zwykle z pojedynczego transportera białkowego znajdującego się w błonie cytoplazmatycznej, który usuwa substancje do przestrzeni peryplazmatycznej [51]. Niektóre pompy, w tym *EmrCABsm* obecna u *S. maltophilia*, prawdopodobnie zbudowane są z trzech części [44].

Transkrypcja genów kodujących pompę jest regulowana przez białko *EmrRsm*, należące do regulatorów typu MarR [44]. Pełni ono rolę represora – wiąże się do sekwencji w obrębie promotora i uniemożliwia zajście transkrypcji. Zjawisko derepresji transkrypcji zachodzi w obecności induktora, który wiąże się do cząsteczki represora i osłabia tym samym powinowactwo represora do promotora umożliwiając transkrypcję genów. W przypadku nieobecności induktora regulator wydzielany jest na stałym poziomie. Substratami dla pompy *EmrCABsm* są związki hydrofobowe, do których należą m.in.: kwas nalidyksowy, erytromycyna, karbonylocyjanek 3-chlorofenylohydrazonu i tetrachlorosalicylanilid [44]. Ekspresja operonu *emrCABsm* nie jest indukowana obecnością tych związków. Przypuszcza się, że pompa *EmrCABsm* pełni fizjologiczną rolę w usuwaniu z komórki naturalnych substancji szkodliwych pochodzących ze środowiska lub będących produktami jej własnego metabolizmu, a nie jest ściśle ukierunkowana na transportowanie na zewnątrz komórki antybiotyków i wyżej wymienionych związków [44].

4.3. Rodzina ABC (*ATP-binding cassette family*)

U *S. maltophilia* wykryto jedną pompę z rodziny ABC – *SmrA* [3]. Pompy należące do tej grupy energię do pracy czerpią z rozpadu cząsteczek ATP, są transporterami białkowymi tworzącymi kanały w błonie cytoplazmatycznej. Kanał pompy *SmrA* ma strukturę homodimeru, a każdy monomer zbudowany jest z części hydrofobowej i hydrofilowej. Domenę hydrofobową tworzy 6 transbłonowych helis, których zadaniem jest wiązanie substratu oraz jego transport przez błonę komórkową. Domena hydrofilowa NBD (*nucleotide binding domain*) obecna jest po wewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej i bierze ona udział w hydrolizie ATP. W obrębie genów kodujących pompy ABC występują liczne sekwencje konserwowane m.in. motywy Walker A i Walker B obecne w domenie wiążącej nukleotydy [51, 95]. Pompa *SmrA* wykazuje duże podobieństwo do transporterów ABC obecnych u *Lactococcus lactis* (*LmrA*) i *Vibrio cholerae* (*VcaM*) oraz do ludzkiej glikoproteiny P, kodowanej przez gen *MDR1*. Porównanie sekwencji aminokwasowej *SmrA* z danymi zawartymi w bazie NCBI (National Center for Biotechnology Information) wskazało na duże podobieństwo tej sekwencji do białek obecnych u wielu gatunków bakterii Gram-ujemnych, w tym *P. aeruginosa* i *Acinetobacter* spp. [3].

Przeprowadzono badania, w których porównywano wartości MIC dużej grupy antybiotyków dla szczepu *E. coli* posiadającego wprowadzony gen *smrA* oraz dla szczepu *E. coli* nieposiadającego tego genu. Szczepy z obecną pompą SmrA wykazały 8-krotny wzrost wartości MIC cyprofloksacyny, norfloksacyny i tetracykliny. Badano również wewnątrzkomórkowe stężenie norfloksacyny w przypadku obu powyższych szczepów. Wykazano, że ma ono dużo niższą wartość u bakterii *E. coli* z genem *smrA*, co świadczy o aktywności pompy [3].

4.4. Pompa FuaABC

Tajwańscy naukowcy zidentyfikowali u *S. maltophilia* jeszcze jedną pompę odpowiedzialną za zjawisko efflux – FuaABC, usuwającą z komórek bakterii kwas fusydomowy [41]. Związek ten jest mykotoksyną wytwarzaną przez grzyby z rodzaju *Fusarium* bytujące wraz ze *S. maltophilia* w tej samej niszy ekologicznej w obrębie ryzosfery. Najprawdopodobniej system efflux FuaABC powstał jako mechanizm obrony przed szkodliwym wpływem kwasu fusydomowego na komórki drobnoustrojów. Analizy filogenetyczne wykazały, że system FuaABC powinien zostać sklasyfikowany jako podrodzina pomp ABC lub zupełnie nowa rodzina. Energia do pracy pompy jest pozyskiwana z gradientu protonowego. Geny kodujące system FuaABC tworzą operon *fuaABC*, którego transkrypcja jest regulowana przez gen *fuaR* zlokalizowany powyżej genów wchodzących w skład operonu. Białko FuaR należy do rodziny AraC, może pełnić zarówno rolę aktywatora, jak i represora – w obecności kwasu fusydomowego pracuje jako aktywator, przy jego braku jako represor. W przypadku nieobecności białka FuaR np. w wyniku uszkodzenia genu *fuaR*, obecność kwasu fusydomowego nie powoduje aktywacji transkrypcji. System FuaABC jest odpowiedzialny za usuwanie wyłącznie kwasu fusydomowego, żaden z przebadanych do tej pory związków przeciwdrobnoustrojowych nie stanowił substratu tego systemu pomp [41].

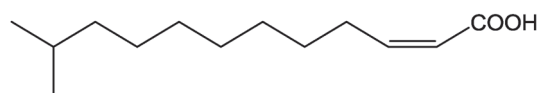
5. Biofilm bakteryjny i system *quorum sensing*

Zdolność adhezji szczepów *S. maltophilia* do wilgotnych powierzchni tworzyw sztucznych – cewników, nebulizatorów, endoskopów, jak i powierzchni biotycznych oraz do tworzenia biofilmu nie jest klasycznym mechanizmem oporności, jednak znacząco przyczynia się do spadku wrażliwości bakterii na związki przeciwdrobnoustrojowe [23].

Powstawanie biofilmu jest silnie związane ze zjawiskiem *quorum sensing* (QS), które polega na wzajemnej komunikacji populacji komórek bakteryjnych przebiegającej za pośrednictwem specjalnych cząsteczek

sygnałowych tzw. autoinduktorów (AI) wytwarzanych przez bakterie, a następnie wydzielanych na zewnątrz ich komórek. Im większa liczebność populacji bakterii, tym większe jest stężenie autoinduktorów w środowisku. Po osiągnięciu odpowiedniego stężenia AI łączą się z właściwymi receptorami obecnymi wewnątrz komórek bakterii lub w błonie cytoplazmatycznej i prowadzą do równoczesnej aktywacji lub represji genów we wszystkich komórkach danej populacji. QS odgrywa ważną rolę w takich procesach jak: wirulencja, koniugacja, bioluminescencja czy tworzenie biofilmu [1, 49, 63, 91].

Zjawisko *quorum sensing* występuje zarówno u bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. W obu tych grupach przebiega jednak inaczej ze względu na różną budowę ściany komórkowej. U bakterii Gram-ujemnych rolę autoinduktorów pełnią zwykle N-acylowane laktony homoseryny (AHL). Substratami do ich syntezy są S-adenozylometionina (SAM) i białko Acyl-ACP [1, 63, 78]. Gatunek *S. maltophilia* charakteryzuje się obecnością autoinduktorów, które nie należą do pochodnych laktonów homoseryny. Bakterie te posiadają system komunikacji międzykomórkowej oparty na syntezie cząsteczek DSF (*diffusible signal factor*). Cząsteczki DSF stanowią grupę kwasów tłuszczowych, w których skład wchodzi kwas cis-11-metylo-2-dodekenowy (Rys. 1) oraz jego 7 pochodnych. Dwie z nich stanowią nasycone kwasy tłuszczowe, a pozostałe to kwasy nienasycone z podwójnym wiązaniem w pozycji 2 [1, 78]. System DSF jest regulowany przez zespół genów *rpf* (*regulation of pathogenicity factors*). Najistotniejszym elementem systemu jest gen *rpfF* kodujący syntazę DSF. Jego transkrypcja jest pozytywnie regulowana przez białko CRP (aktywator transkrypcji), które posiada dwa miejsca wiązania powyżej promotora *rpfF* [1]. Białka RpfC i RpfG tworzą dwuskładnikowy system regulacyjny odpowiedzialny za odbiór sygnału, gdzie RpfC pełni rolę białka sensorowego, natomiast RpfG jest regulatorem odpowiedzi. Geny *rpfC* i *rpfG* zlokalizowane są w obrębie operonu *rpfBFCG* i podlegają wspólnej regulacji [28].



Rys. 1. Wzór cząsteczki DSF [12]

System DSF jest odpowiedzialny za regulację wirulencji drobnoustrojów poprzez wpływ na syntezę pozakomórkowych enzymów i polisacharydów oraz tworzenie biofilmu [4]. Prowadzono badania, w których porównywano wirulencję „dzikiego” szczepu *S. maltophilia* 279a oraz tego samego szczepu z mutacją w genie *rpfF*. Mutant w porównaniu do dzikiego szczepu charakteryzował się obniżoną mobilnością, spadkiem produkcji proteazy, zmianami w LPS, zwiększoną

wrażliwością na antybiotyki i metale ciężkie, niezdolnością do tworzenia mikrokolonii oraz obniżoną zdolnością. Egzogenny dodatek cząsteczek DSF lub wklonowanie genu *rpfF* spowodowało przywrócenie zdolności do tworzenia mikrokolonii, mobilność i produkcję proteazy [1, 4, 28].

W związku z dużą opornością na antybiotyki szczepów *S. maltophilia* poszukiwane są związki będące inhibitorami QS. Zahamowanie tego zjawiska prowadziłyby do osłabienia chorobotwórczości bakterii. Badania wykazały, że emodyna, będąca składnikiem leków tradycyjnej medycyny chińskiej, jest w stanie zahamować QS, a co z tym związane, powstawanie biofilmu u *S. maltophilia* [1, 26].

Zjawisko wzajemnej komunikacji bakterii jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania biofilmu bakteryjnego. Biofilm jest to wielokomórkowe skupisko drobnoustrojów, jednego bądź wielu gatunków, przylegające do powierzchni abiotycznych lub powierzchni komórek organizmów żywych [49]. Zdolność do tworzenia przez komórki bakterii biofilmu stanowi ważny czynnik ich wirulencji. Biofilm chroni komórki bakteryjne przed działaniem mechanizmów obronnych gospodarza, jak również zwiększa ich oporność na antybiotyki i inne środki przeciwbakteryjne [73]. Szczepy *S. maltophilia* posiadają zdolność adhezji zarówno do powierzchni biotycznych np. komórek nabłonka dróg oddechowych, jak i abiotycznych – szkła i różnego rodzaju materiałów stosowanych do produkcji wyrobów medycznych (endoskopów, cewników, protez naczyniowych, soczewek kontaktowych) [23, 73]. Biofilm bakteryjny powstaje w kilku etapach, na które mają wpływ zarówno właściwości zasiedlanego materiału lub kolonizowanej powierzchni komórek, jak i cechy komórek zasiedlających [14, 49]. Do najważniejszych cech bakterii *S. maltophilia* wpływających na tworzenie biofilmu należą: zdolność ruchu, obecność flagelli i fimbrii, hydrofobowość, wydzielanie EPS (*extracellular polymeric substances*) [74]. P o m p i l i o i wsp. [73] prowadzili badania, w których analizowano tworzenie przez szczepy *S. maltophilia* biofilmu na linii komórek pochodzących z nabłonka oskrzeli pacjenta z mukowiscydozą (CF – *cystic fibrosis*). Badane szczepy zostały wyizolowane od chorych cierpiących na mukowiscydozę. Mierzono zdolność szczepów do adhezji do komórek nabłonka oraz tworzenia biofilmu po 2 h i 24 h od inokulacji. Wszystkie szczepy uformowały biofilm, jednak nie wykazano korelacji między zdolnością do adhezji, a ilością wytworzonego biofilmu [73]. Badano również udział flagelli w adhezji *S. maltophilia* do komórek nabłonka. W tym celu skonstruowano mutanty szczepów *S. maltophilia* posiadające zablokowany gen kodujący enzym ATP-azę niezbędną do prawidłowej pracy flagelli. Brak enzymu znacznie obniżył zdolność komórek bakteryjnych do adhezji, ale

nie została ona całkowicie zablokowana, co świadczy o udziale w tym procesie, oprócz flagelli, także innych czynników. Zdolność ruchu typu „swimming” i „twitching” szczepów *S. maltophilia* nie wpływa ani na adhezję, ani na proces tworzenia biofilmu na powierzchni komórek nabłonka oskrzeli [73].

Analizowano również powstawanie biofilmu *S. maltophilia* na powierzchniach abiotycznych hydrofobowych t.j. polistyren, polipropylen oraz hydrofilowych – borokrzemian [23]. Wykazano brak zależności pomiędzy adhezją wybranych szczepów do polistyrenu i komórek nabłonka oskrzeli [73]. Najsilniejszy biofilm został utworzony na powierzchni polistyrenowej, na pozostałych dwóch tworzywach występowały różnice w biofilmie w zależności od badanego szczepu. Wykazano związek pomiędzy występowaniem ruchu „twitching” u szczepów a tworzeniem biofilmu na trzech powyższych powierzchniach, natomiast zdolność do ruchu typu „swimming” nie była związana z tworzeniem biofilmu na polipropylenie, polistyrenie i borokrzemianie. Żaden z badanych szczepów nie wykazywał ruchu typu „swarming” [23]. Sprzeczne w stosunku do powyższych wyniki uzyskali P o m p i l i o i wsp. [74], którzy wykazali brak zależności między ruchami typu „twitching”, a zdolnością do adhezji i wytwarzania na polistyrenie biofilmu przez szczepy *S. maltophilia*.

W związku z zasiedlaniem przez *S. maltophilia* wyrobów medycznych często stosowanych u pacjentów hospitalizowanych zbadano zdolność adhezji tych drobnoustrojów do powierzchni trzech cewników wykonanych odpowiednio z: PVC, silikonu i gumy. We wszystkich przypadkach otrzymano wysoki współczynnik adhezji [23].

Dobór antybiotyków do terapii zakażeń *S. maltophilia* jest oparty na testach oceny lekowrażliwości przeprowadzanych na bakteriach rosnących w formie planktonowej. U chorych bakterie te przeważnie tworzą biofilm, znacznie mniej wrażliwy na działanie antybiotyków i innych związków przeciwbakteryjnych [99]. Przebadano wrażliwość na szeroką grupę antybiotyków 125 izolatów rosnących w postaci planktonowej, jak i biofilmu. Następujące związki przeciwbakteryjne: β -laktamy, fluorochinolony, kolistyna, tobramycyna, doksycyklina i trimetoprim-sulfametoksazol wykazały o ok. 20–80% słabsze działanie na szczepy rosnące w postaci biofilmu niż w formie planktonowej. Najbardziej skutecznymi antybiotykami wobec szczepów *S. maltophilia* rosnących w obydwu badanych formach były lewofloksacyna i kolistyna [99]. Związki powszechnie stosowane jako lek z wyboru w leczeniu zakażeń *S. maltophilia* – trimetoprim-sulfametoksazol są skuteczne tylko u mniej niż 10% szczepów tworzących biofilm [24, 56, 99].

Niektóre antybiotyki w stężeniach niższych niż wartości MIC są zdolne do zmniejszenia zdolności do

adhezji i tworzenia biofilmu przez dany szczep, mimo, iż nie powodują śmierci drobnoustrojów. Największą skuteczność wykazała moksyflokscyna, antybiotyk z grupy fluorochinolonów stosowany w zakażeniach układu oddechowego wywołanych bakteriami *S. maltophilia* opornymi na trimetoprim-sulfametoksazol [14, 72]. Moksyflokscyna jest zdolna do hamowania adhezji komórek poprzez m.in. wpływ na syntezę i ekspresję adhezyn, a także poprzez zmniejszenie hydrofobowości przestrzeni międzykomórkowej [72].

Istnieje również szereg czynników środowiskowych, które mogą mieć wpływ na tworzenie biofilmu przez szczepy *S. maltophilia*. Należą do nich: stężenie fosforanów, pH, temperatura, warunki tlenowe lub beztlenowe, obecność jonów miedzi i srebra. Obecność fosforanu sodu powoduje wzrost biofilmu bakteryjnego, dlatego zaleca się monitorowanie stężenia jonów sodu i fosforanowych w systemach hydraulicznych w szpitalach. Odczyny środowiska o pH 7,5 i 8,5 stwarzają lepsze warunki do rozwoju biofilmu niż pH 5,5. Większy wzrost biofilmu obserwowany był także w temperaturze 32°C niż w 37°C i 18°C, a także w warunkach tlenowych i w obecności 6% CO₂, niż w warunkach beztlenowych [14, 25].

Badano także wpływ jonów miedzi i srebra w eradykacji szczepów *S. maltophilia* rosnących w formie biofilmu [43]. Jony srebra w postaci azotanu srebra o stężeniu 100 µg/l wykazują brak aktywności wobec szczepów tworzących biofilm bakteryjny. Brak aktywności jest spowodowany adsorpcją jonów metalu przez strukturę biofilmu. Inhibicja biofilmu bakteryjnego została osiągnięta przy stężeniu azotanu srebra 10 000 µg/l [14, 88].

Badano również wpływ połączenia srebro-miedź na biofilm bakteryjny obecny w systemie dystrybucji wody. Wszystkie badane stężenia (200/20 µg/l – 800/80 µg/l) wykazały redukcję liczb komórek *S. maltophilia* tworzących biofilm po 48 h ekspozycji [86].

Palanisamy i wsp. [69] analizowali wpływ popularnych ostatnio cząstek nanosrebra na biofilm szczepów *Pseudomonas aeruginosa*. Współczynnik zahamowania wzrostu szczepów opornych wyniósł 56%, co pozwala przypuszczać, że nanocząstki srebra będą także aktywne wobec szczepów *S. maltophilia*.

6. Podsumowanie

Każdego roku odnotowujemy coraz wyższą liczbę zakażeń szczepami *S. maltophilia*, szczególnie niebezpiecznych dla pacjentów z osłabioną odpornością oraz długotrwale hospitalizowanych. Bakterie te wywołują infekcje zarówno u dzieci, jak i dorosłych, powodują śmierć u 21–69% osób z bakteriami [65]. Ich zdolność do tworzenia biofilmu na powierzchni komórek nabłonkowych oraz wyrobów medycznych, a także

rosnąca oporność na wiele związków przeciwbakteryjnych o szerokim spektrum działania sprawiają, że terapia zakażeń *S. maltophilia* jest trudnym wyzwaniem i powinna ewoluować. Niezbędne jest prowadzenie badań pozwalających na dokładne poznanie zjawiska efflux, odpowiedzialnego w dużej mierze za osłabioną wrażliwość na antybiotyki, oraz dalsze poszukiwania nowych środków umożliwiających zahamowanie aktywności pomp MDR oraz zjawiska *quorum sensing*.

Piśmiennictwo

1. AboZahra R.: Quorum sensing and interspecies interactions in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Brit. Microbiol. Res. J.* **3**, 414–422 (2013)
2. Al Naiemi N., Duim B., Bart A.: A CTX-M extender-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Med. Microbiol.* **55**, 1607–1608 (2006)
3. Al-Hamad A., Upton M., Burnie J.: Molecular cloning and characterization of SmrA, a novel ABC multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**, 731–734 (2009)
4. Alavi P., Müller H., Cardinale M., Zachow Ch., Sánchez M.B., Martínez J.L., Berg G.: The DSF quorum sensing system controls the positive influence of *Stenotrophomonas maltophilia* on plants. *PLoS One*, **8**, 1–9 (2013)
5. Alonso A., Martínez J.L.: Cloning and characterization of SmeDEF, a novel multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 3079–3086 (2000)
6. Alonso A., Sanchez P., Martínez J.L.: *Stenotrophomonas maltophilia* D457R contains a cluster of genes from Gram-positive bacteria involved in antibiotic and heavy metal resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1778–1782 (2000)
7. Assis E.A., Ouattara A.S., Thierry S., Cayol J.L., Labat M., Macarie H.: *Stenotrophomonas acidaminiphila* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 559–568 (2002)
8. Avison M.B., Higgins C.S., Ford P.J., von Heldreich C.J., Walsh T.R., Bennett P.M.: Differential regulation of L1 and L2 beta-lactamase expression in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 387–89 (2002)
9. Avison M.B., Higgins C.S., von Heldreich C.J., Bennett P.M., Walsh T.R.: Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2 β-lactamase genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 413–419 (2001)
10. Avison M.B., von Heldreich C.J., Higgins C.S., Bennett P.M., Walsh T.R.: A TEM-2-beta-lactamase encoded on an active Tn1-like transposon in the genome of a clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**, 879–884 (2000)
11. Aydin K., Köksal I., Kaygusuz S., Kaklikkaya I., Caylan R., Özdemir R.: Endocarditis caused by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Scand. J. Infect. Dis.* **32**, 427–430 (2000)
12. Barber C.E., Tang J.L., Feng J.X., Pan M.Q., Wilson T.J., Slater H., Dow J.M., Williams P., Daniels M.J.: A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol. Microbiol.* **24**, 555–566 (1997)
13. Brooke J.S.: New strategies against *Stenotrophomonas maltophilia*: a serious worldwide intrinsically drug-resistant opportunistic pathogen. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **12**, 1–4 (2014)

14. Brooke J.S.: *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**, 1–40 (2012)
15. Chang L.L., Chen H.F., Chang Ch.Y., Lee T.M., Wu W.J.: Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 518–521 (2004)
16. Chen Ch.H., Huang Ch.Ch., Chung T.Ch., Hu R.m., Huang Y.W., Yang T.Ch.: Contribution of resistance-nodulation-division efflux pump operon *smeU1-V-W-U2-X* to multidrug resistance of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 5826–5833 (2011)
17. Chen K.J., Wang N.K., Sum M.H., Chen T.L., Lai C.C., Wu W.C., Tan H.Y.: Endophthalmitis caused by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Ophthalmic Surg. Lasers Imaging*, **41**, e555–e561 (2010)
18. Cho H.H., Sung J.Y., Kwon K.Ch., Koo S.H.: Expression of Sme efflux pumps and multilocus sequence typing in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Ann. Lab. Med.* **32**, 38–43 (2012)
19. Chung H.S., Hong S.G., Kim Y.R., Shin K.S., Whang D.H., Ahn J.Y., Park Y.J., Uh Y., Chang Ch.L., Shin J.H., Lee H.S., Lee K., Chong Y.: Antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from Korea, and the activity of antimicrobial combinations against the isolates. *J. Korean Med. Sci.* **28**, 62–66 (2013)
20. Chung H.S., Hong S.G., Lee Y., Kim M., Yong D., Jeong S.H., Lee K., Chong Y.: Antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from a Korean Tertiary Care Hospital. *Yonsei Med. J.* **53**, 439–441 (2012)
21. Crossman L.C., Gould V.C., Dow J.M., Vernikos G.S., Okazaki A., Sebahia M., Saunders D., Arrowsmith C., Carver T., Peters N., Adlem D., Kerhornou A., Lord A., Murphy L., Seeger K., Squares R., Rutter S., Quail M.A., Rajandream M.A., Harris D., Churcher C., Bentley S.D., Parkhill J., Thomson N.R., Avison M.B.: The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biology*, **9**, 1–13 (2008)
22. Crowder M.W., Walsh T.R., Banovic L., Pettit M., Spencer J.: Overexpression, purification and characterization of the cloned metallo- β -lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 921–926 (1998)
23. De Rossi B., Calenda M., Vay C., Franco M.: Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from device-associated nosocomial infections. *Rev. Argentina Microbiol.* **39**, 204–212 (2007)
24. Di Bonaventura G., Spedicato I., D'Antonio D., Robuffo I., Piccolomini R.: Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 151–160 (2004)
25. Di Bonaventura G., Stepanović S., Picciani P., Pompilio A., Piccolomini R.: Effect of environmental factors on biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Folia Microbiol.* **52**, 86–90 (2007)
26. Ding X., Yin B., Qian L., Zeng Z., Yang Z., Li H., Lu Y., Zhou S.: Screening for novel quorum-sensing inhibitors to interfere with the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *J. Med. Microbiol.* **60**, 1827–1834 (2011)
27. Felici A., Amicosante G.: Kinetic analysis of extension of substrate specificity with *Xanthomonas maltophilia*, *Aeromonas hydrophila* and *Bacillus cereus* metallo- β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 192–199 (1995)
28. Fouhy Y., Scanlon K., Schouest K., Spillane Ch., Crossman L., Avison M.B., Ryan R.P., Dow J.M.: Diffusible signal factor-dependent cell-cell signaling and virulence in the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Bacteriol.* **189**, 4964–4968 (2007)
29. Gales A.C., Jones R.N., Forward K.R., Liñares J., Sader H.S., Verhoef J.: Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997–1999). *Clin. Infect. Dis.* **32**, 104–113 (2001)
30. Garrity G. (Ed.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2: The Proteobacteria. Springer, Nowy Jork 2005
31. Gould V.C., Avison M.B.: SmeDEF-mediated antimicrobial drug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates having defined phylogenetic relationships. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 1070–1076 (2006)
32. Gould V.C., Okazaki A., Avison M.B.: Coordinate hyperproduction of SmeZ and SmeJK efflux pumps extends drug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 655–657 (2013)
33. Gould V.C., Okazaki A., Avison M.B.: β -lactam resistance and β -lactamase expression in clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates having defined phylogenetic relationships. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 199–203 (2006)
34. Gould V.C., Okazaki A., Howe R.A., Avison M.B.: Analysis of sequence variation amongst *smeDEF* multi-drug efflux pump genes and flanking DNA from defined 16S rRNA sub-groups of clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**, 348–353 (2004)
35. Hankiewicz-Ziołkowska K., Gospodarek E.: *Stenotrophomonas maltophilia* – charakterystyka i patogeneza zakażeń. *Post. Mikrobiol.* **50**, 43–50 (2011)
36. Hernandez A., Mate M.J., Sanchez-Díaz P.C., Romero A., Rojo F., Martinez J.L.: Structural and functional analysis of SmeT, the repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF. *J. Biol. Chem.* **284**, 14428–14438 (2009)
37. Hernández A., Ruiz F.M., Romero A., Martinez J.L.: The binding of triclosan to SmeT, the repressor of the multidrug efflux pump SmeDEF, induces antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS Pathogens*, **7**, 1–12 (2011)
38. Heylen K., Vanparys B., Peirsegeale F., Lebbe L., Devos P.: *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humi* sp. nov., two nitrate-reducing bacteria isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 2056–2061 (2007)
39. Higgins C.S., Murtough S.M., Williamson E., Hiom S.J., Payne D.J., Russell A.D., Walsh T.R.: Resistance to antibiotics and biocides among non-fermenting Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**, 308–315 (2001)
40. Hu L.F., Chang X., Ye Y., Wang Z.X., Shao Y.B., Shi W., Li X., Li J.B.: *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of *sul* and *dfrA* genes in a plasmid-mediated class 1 integron. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **37**, 230–234 (2011)
41. Hu R.M., Liao S.T., Huang Ch.Ch., Huang Y.W., Yang T.Ch.: An inducible fusaric acid tripartite efflux pump contributes to the fusaric acid resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS One*, **7**, 1–8 (2012)
42. Huang C.R., Chen S.F., Tsai N.W., Chang C.C., Lu C.H., Chuang Y.C., Chien C.C., Chang W.N.: Clinical characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia* meningitis in adults: a high incidence in patients with a postneurosurgical state, long hospital staying and antibiotic use. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **115**, 1709–1715 (2013)
43. Huang H.I., Shih H.Y., Lee C.M., Yang T.C., Lay J.J., Lin Y.E.: *In vitro* efficacy of cooper and silver ions in eradicating *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter baumannii*: implications for on-site disinfection for hospital infection control. *Water Research*, **42**, 73–80 (2008)
44. Huang Y.W., Hu R.M., Chu F.Y., Lin H.R., Yang T.Ch.: Characterization of a major facilitator superfamily (MFS) tripartite

- efflux pump EmrCABsm from *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 2498–2505 (2013)
45. Hugh R., Leifson E.: A description of the type strain of *Pseudomonas maltophilia*. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon.* **13**, 133–138 (1963)
 46. Jarmuła A., Obląg E., Wawrzycka D., Gutowicz J.: Oporność wielolekowa związana z aktywnym usuwaniem leków z komórek drobnoustrojów. *Post. Hig. Med. Dośw.* **65**, 216–227 (2011)
 47. Kaparullina E., Doronina N., Chistyakova T., Trotsenko Y.: *Stenotrophomonas chelatiphaga* sp. nov., a new aerobic EDTA-degrading bacterium. *Syst. Appl. Microbiol.* **32**, 157–162 (2009)
 48. Kim H.B., Srinivasan S., Sathiyaraj G., Quan L.H., Kim S.H., Bui T.P.N., Liang Z., Kim Y.J., Yang D.C.: *Stenotrophomonas ginsengisoli* sp. nov., isolated from a ginseng field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 1522–1526 (2010)
 49. Kołwzan B.: Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstania i funkcjonowania. *Ochrona Środowiska*, **33**, 2–14 (2011)
 50. Laudy A.E., Starościak B.J.: β -laktamazy pałeczek z rodziny *Pseudomonadaceae*. *Post. Mikrobiol.* **39**, 99–132 (2000)
 51. Laudy A.E.: Systemy MDR – istotny mechanizm oporności pałeczek Gram-ujemnych na antybiotyki i chemioterapeutyki. *Post. Mikrobiol.* **47**, 415–422 (2008)
 52. Lecso-Bornet M., Bergogne-Berezin E.: Susceptibility of 100 strains of *Stenotrophomonas maltophilia* to three β -lactam and five β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**, 717–720 (1997)
 53. Ledder R.G., Gilbert P., Willis C., McBain A.J.: Effects of chronic triclosan exposure upon the antimicrobial susceptibility of 40 *ex-situ* environmental and human isolates. *J. Appl. Microbiol.* **100**, 1132–1140 (2006)
 54. Lee M., Woo S.G., Chae M., Shin M.C., Jung H.M., Ten L.N.: *Stenotrophomonas daejeonensis* sp. nov., isolated from sewage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**, 598–604 (2011)
 55. Li X-Z., Zhang L., Poole K.: SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 333–343 (2002)
 56. Liaw S.J., Lee Y.L., Hsueh P.R.: Multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucomutase (SpgM), and melanin and biofilm formation. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **35**, 126–130 (2010)
 57. Lin C.W., Huang Y.W., Hu R.M., Chiang K.H., Yang T.C.: The role of AmpR in regulation of L1 and L2 β -lactamases in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Research in Microbiology*, **160**, 152–158 (2009)
 58. Lin C.W., Lin H.C., Huang Y.W., Chung T.C., Yang T.C.: Inactivation of *mrcA* gene derepresses the basal-level expression of L1 and L2 β -lactamases in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 2033–2037 (2011)
 59. Lin H.C., Ma D.H., Chen Y.F., Yeh L.K., Hsiao C.H.: Late-onset intrascleral dissemination of *Stenotrophomonas maltophilia* scleritis after pterygium excision. *Cornea* **30**, 712–715 (2012)
 60. Liu W., Zou D., Wang X., Li X., Zhu L., Yin Z., Yang Z., Wei X., Han L., Wang Y., Shao C., Wang S., He X., Liu D., Liu F., Wang J., Huang L., Yuan J.: Proteomic analysis of clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia* with *bla_{NDM-1}*, *bla_{L1}* and *bla_{L2}* β -lactamase genes under imipenem treatment. *J. Proteome Research*, **11**, 4024–4033 (2012)
 61. Livermore D.M.: β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**, 557–584 (1995)
 62. Looney W.J., Narita M., Mühlemann K.: *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect. Dis.* **9**, 312–323 (2009)
 63. Matejczyk M., Suchowierska M.: Charakterystyka zjawiska quorum sensing i jego znaczenie w aspekcie formowania i funkcjonowania biofilmu w inżynierii środowiska, budownictwie, medycynie oraz gospodarstwie domowym. *Budownictwo i Inżynieria Środowiska*, **2**, 71–75 (2011)
 64. Nicodemo A.C., Araujo M.R.E., Riuz A.S., Gales A.C.: *In vitro* susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates: comparison of disc diffusion, E test and agar dilution methods. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 604–608 (2004)
 65. Nicodemo A.C., Garcia Paez J.I.: Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **26**, 229–237 (2007)
 66. Okazaki A., Avison M.B.: Aph(3')-IIc, an aminoglycoside resistance determinant from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 359–360 (2007)
 67. Paez J.I., Tengan F.M., Barone A.A., Levin A.S., Costa S.F.: Factors associated with mortality in patients with bloodstream infection and pneumonia due to *Stenotrophomonas maltophilia*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**, 901–906 (2008)
 68. Pages D., Rose J., Conrod S., Cuine S., Carrier P., Heulin T., Achouak W.: Heavy metal tolerance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS One*, **3**, 1–6 (2008)
 69. Palanisamy N.K., Ferina N., Amirulhusni A.N., Mohd-Zain Z., Hussaini J., Ping L.J., Durairaj R.: Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Nanobiotechnology*, **12**, 1–7 (2014)
 70. Palleroni N.J., Bradbury J.F.: *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings i wsp. 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 606–609 (1993)
 71. Papadakis K.A., Vartivarian S.E., Vassilaki M.E., Anaissie E.J.: *Stenotrophomonas maltophilia* an unusual case of biliary sepsis. *Clin. Infect. Dis.* **21**, 1032–1034 (1995)
 72. Pompilio A., Catavittello C., Picciani C., Confalone P., Piccolomini R., Savini V., Fiscarelli E., D'Antonio D., Di Bonaventura G.: Subinhibitory concentrations of moxifloxacin decrease adhesion and biofilm formation of *Stenotrophomonas maltophilia* from cystic fibrosis. *J. Med. Microbiol.* **59**, 76–81 (2010)
 73. Pompilio A., Crocetta V., Confalone P., Nicoletti M., Petrucca A., Guarnieri S., Fiscarelli E., Savini V., Piccolomini R., Di Bonaventura G.: Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients. *BMC Microbiology*, **10**, 1–15 (2010)
 74. Pompilio A., Piccolomini R., Picciani C., D'Antonio D., Savini V., Di Bonaventura G.: Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility. *FEMS Microbiol. Lett.* **287**, 41–47 (2008)
 75. Poole K.: Efflux-mediated antimicrobial resistance (w) Antibiotic discovery and development. Red. T.J. Dougherty, M.J. Pucci, Springer Science+Business Media, London 2012, 349–395
 76. Rahmati-Bahram A., Magee J.T., Jackson S.K.: Effect of temperature on aminoglycoside binding sites in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**, 19–24 (1997)
 77. Ramos P.L., Van Trappen S., Thompson F.L., Rocha R.C.S., Barbosa H.R., De Vos P., Moreira-Filho C.A.: Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**, 926–931 (2011)
 78. Ryan R.P., Dow J.M.: Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology*, **154**, 1845–1858 (2008)
 79. Ryan R.P., Monchy S., Cardinale M., Taghavi S., Crossman L., Avison M.B., Berg G., van der Lelie D., Dow J.M.: The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature*, **7**, 514–525 (2009)
 80. Sader H.S., Jones R.N.: Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric gram-negative bacilli. *Int. J. Antimicrob. Agents* **25**, 95–109 (2005)

81. Sakhnini E., Weissmann A., Oren I.: Fulminant *Stenotrophomonas maltophilia* soft tissue infection in immunocompromised patients: an outbreak transmitted via tap water. *Am. J. Med. Sci.* **323**, 269–272 (2002)
82. Samonis G., Karageorgopoulos D.E., Maraki S., Levis P., Dimopoulou D., Spernovasilis N.A., Kofteridis D.P., Falagas M.E.: *Stenotrophomonas maltophilia* infections in a general hospital: patient characteristics, antimicrobial susceptibility, and treatment outcome. *PLoS One*, **7** (5), 1–7 (2012)
83. Sánchez P., Alonso A., Martínez J.L.: Cloning and characterization of SmeT, a repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3386–3393 (2002)
84. Sanchez P., Alonso A., Martinez J.L.: Regulatory regions of *smeDEF* in *Stenotrophomonas maltophilia* strains expressing different amounts of the multidrug efflux pump SmeDEF. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2274–2276 (2004)
85. Sanchez P., Moreno E., Martinez J.L.: The biocide triclosan selects *Stenotrophomonas maltophilia* mutants that overproduce the SmeDEF multidrug efflux pump. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 781–782 (2005)
86. Shih H.Y., Lin Y.E.: Efficacy of copper-silver ionization in controlling biofilm- and plankton – associated waterborne pathogens. *Sppl. Environ. Microbiol.* **76**, 2032–2035 (2010)
87. Shimizu K., Kikuchi K., Sasaki T., Takahashi N., Ohtsuka M., Ono Y., Hiramatsu K.: *Smqnr*, a new chromosome-carried quinolone resistance gene in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3823–3825 (2008)
88. Silvestry-Rodriguez N., Bright K.R., Slack D.C., Uhlmann D.R., Gerba C.P.: Silver as a residual disinfectant to prevent biofilm formation in water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 1639–1641 (2008)
89. Swings J., De Vos P., Van den Mooter M., De Ley J.: Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**, 409–413 (1983)
90. Toleman M.A., Bennett P.M., Bennett D.M.C., Jones R.N., Walsh T.R.: Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of *sul* genes. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 559–565 (2007)
91. Trafny E.A.: Microorganisms in metalworking fluids: current issues in research and management. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, **26**, 4–15 (2013)
92. Vartivarian S.E., Papadakis K.A., Anaissie E.J.: *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* urinary tract infection. A disease that is usually severe and complicated. *Arch. Intern. Med.* **156**, 433–435 (1996)
93. Walsh T.R., MacGowan A.P., Bennett P.M.: Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine β -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1460–1464 (1997)
94. Wang C., Zhan Q., Mi Z., Huang Z., Chen G.: Distribution of the antiseptic-resistance gene *qacEAI* in 283 clinical isolates of Gram-negative bacteria in China. *J. Hosp. Infect.* **69**, 394–396 (2008)
95. Wasążnik A., Grinholc M., Bielawski K.P.: Czynne usuwanie leku z komórki jako jeden z mechanizmów oporności bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe i metody jego zwalczania. *Post. Hig. Med. Dośw.* **63**, 123–133 (2009)
96. Weiss K., Restieri C., De Carolis E., Laverdiere M., Guay H.: Comparative activity of new quinolones against 326 clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**, 363–365 (2000)
97. Wishart M.N., Riley T.V.: Infection with *Pseudomonas maltophilia*: hospital outbreak due to contaminated disinfectant. *Med. J. Aust.* **2**, 710–712 (1976)
98. Wolf A., Fritze A., Hagemann M., Berg G.: *Stenotrophomonas rizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1937–1944 (2002)
99. Wu K., Yau Y.C.W., Matukas L., Waters V.: Biofilm compared to conventional antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 1546–1548 (2013)
100. Yang H.C., Im W.T., Kang M.S., Shin D.Y., Lee S.T.: *Stenotrophomonas koreensis* sp. nov., isolated from compost in South Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 81–84 (2006)
101. Yoon J.H., Kang S.J., Oh H.W., Oh T.K.: *Stenotrophomonas dokdonensis* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 1363–1367 (2006)
102. Yorioka K., Oie S., Kamiya A.: Microbial contamination of suction tubes attached to suction instruments and preventive methods. *Jpn. J. Infect. Dis.* **63**, 124–127 (2010)
103. Zhang R., Sun Q., Hu Y.J., Yu H., Li Y., Shen Q., Li G.X., Cao J.M., Yang W., Wang Q., Zhou H.W., Hu Y.Y., Chen G.X.: Detection of the *Smqnr* quinolone protection gene and its prevalence in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* in China. *J. Med. Microbiol.* **61**, 535–539 (2012)