MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2010, 62: 97 - 107

Katarzyna Zacharczuk[1], Katarzyna Piekarska[1], Jolanta Szych[1], Małgorzata Sulik[2], Ewa Roszko[2], Joanna Łata[2], Marek Jagielski[1], Rafał Gierczyński[1]

OPORNOŚĆ PAŁECZEK *ENTEROBACTERIACEAE* WYOSOBNIONYCH W SZPITALU POŁOŻNICZO-GINEKOLOGICZNYM NA WYBRANE ANTYBIOTYKI AMINOGLIKOZYDOWE ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM ZDOLNOŚCI DO WYTWARZANIA 16S rRNA METYLAZ ArmA, RmtB i RmtC*

[1] Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny
Kierownik: prof. dr hab. *M. Jagielski*
[2] Szpital Kliniczny im. Ks. Anny Mazowieckiej w Warszawie
Kierownik Laboratorium Bakteriologicznego: mgr *M. Sulik*

Określono udział szczepów opornych na wybrane aminoglikozydy (gentamicyna, amikacyna, netylmycyna, tobramycyna i neomycyna) u 2359 izolatów pałeczek *Enterobacteriaceae* wyosobnionych z materiału klinicznego od pacjentek szpitala ginekologiczno-położniczego i od noworodków. Oporność na jeden lub więcej z wymienionych antybiotyków stwierdzono u 45 izolatów (1,90%), z czego 33 (73,33%) należało do gatunku *Escherichia coli*. W metodzie dyfuzyjno—krążkowej 14 izolatów (31,11%) wykazywało wzrost do krawędzi krążka z gentamicyną (10 µg), w tym 7 izolatów charakteryzowało się wartością MIC w zakresie od 256 do 1024 µg/ml, jednakże u tych izolatów nie stwierdzono obecności 16S rRNA metylaz ArmA, RmtB lub RrmtC. Uzyskane wyniki wskazują na nieznaczny udział szczepów opornych na aminoglikozydy wśród pałeczek *Enterobacteriaceae* występujących u kobiet w okresie okołoporodowym i mogą świadczyć o znikomym rozprzestrzenieniu pałeczek wytwarzających 16S rRNA metylazy w populacji.

Antybiotyki aminoglikozydowe (amonocyklitolowe) stanowią ważną grupę leków przeciwbakteryjnych stosowanych samodzielnie bądź w terapii skojarzonej w zagrażających życiu zakażeniach spowodowanych przez tlenowe bakterie Gram-ujemne (19) i niektóre bakterie Gram-dodatnie (24). Mechanizm działania aminoglikozydów polega na zaburzaniu prawidłowości przebiegu procesu biosyntezy białek w komórkach bakteryjnych poprzez trwałe

* Badania współfinansowane ze środków na naukę w latach 2008-2009 w ramach projektu badawczego NN 404 165034

wiązanie się z podjednostką 30S rybosomu (19, 24). Obecnie większość aminoglikozydów ważnych z klinicznego punktu widzenia należy do grupy 4,6-dwupodstawionych 2-deoksystreptamin, w której wyróżnić można podgrupę kanamycyny (amikacyna; kanamycyna A, B, C i tobramycyna) i gentamicyny (gentamicyna B i C; sisomicyna; isepamicyna) oraz do grupy 4,5-dwupodstawionych 2-deoksystreptamin (neomycyna B, paromomycyna I) (20).

Najczęściej spotykany u bakterii mechanizm oporności na działanie aminoglikozydów polega na wytwarzaniu enzymów: N-acetylotransferaz (ACC); O-adenylotransferaz (AAD) i O-fosforotransferaz (APH) zdolnych do kowalencyjnej modyfikacji cząsteczki aminoglikozydu powodującej utratę powinowactwa do podjednostki 30S rybosomu (19, 20, 24). Mechanizm ten warunkuje oporność o wąskim spektrum substratowym. Jednakże opisane zostały szczepy bakteryjne zdolne do wytwarzania od 2 do 5 różnych enzymów z powyższych grup, co nadawało im oporność na kilka antybiotyków aminoglikozydowych z różnych grup strukturalnych (6, 15, 22). Inny mechanizm oporności na antybiotyki aminoglikozydowe polega na ograniczaniu przenikania antybiotyku do komórki bakteryjnej i ewentualnej jego kumulacji, prowadzącej do ograniczenia liczby cząsteczek antybiotyku zdolnej do wiązania się z rybosomami (20). Mimo, że mechanizm ten zapewnia oporność na szerokie spektrum amminoglikozydów, to skutecznie chroni on bakterie jedynie przed działaniem niskich stężeń antybiotyku, prowadząc do ujawniania się „in vitro" średniej-wrażliwości (20, 22).

Odmienną strategią zapewniającą bakteriom oporność na działanie szerokiego spektrum aminoglikozydów jest modyfikacja struktury podjednostek tworzących rybosomy, a w szczególności rRNA (8) tak, iż podjednostki te tracą powinowactwo do aminoglikozydów (15). Zdolność potranskrypcyjnej modyfikacji cząsteczek 16S rRNA posiadają, opisane w ostatnich latach, enzymy z grupy metylaz (metylotransferaz) (10, 25). Wytwarzanie przez szczepy bakteryjne 16S rRNA metylaz uznawane jest obecnie za istotny i narastający problem terapeutyczny (9, 11). W odróżnieniu od wspomnianych wyżej mechanizmów, 16S rRNA metylazy nadają bakteriom Gram-ujemnym oporność na wysokie stężenia (MIC ≥512 μg/ml) szerokiego spektrum antybiotyków z grupy 4,6-dwupodstawionych 2-deoksystreptamin, a niekiedy także 4,5-dwupodstawionych 2-deoksystreptamin (25). Z tego względu nabycie przez szczep bakteryjny pojedynczego genu warunkującego wytwarzanie 16S rRNA metylazy może nadać mu wysoką oporność na szereg najczęściej stosowanych antybiotyków aminoglikozydowych.

W Europie pierwszy enzym z grupy16S rRNA metylaz (ArmA), kodowany przez gen *armA,* wykryto w roku 2003 w szczepie *Klebsiella pneumoniae* we Francji (10). Co ciekawe, sekwencja identyczna z genem *armA* została zdeponowana w bazie danych Genbank już w 2002 roku wraz z kompletną sekwencją dużego plazmidu pCTX-M3 (AF550415), niosącego gen $bla_{CTX\text{-}M\text{-}3}$ odpowiedzialny za wytwarzanie ESBL typu CTX-M-3. Plazmid ten wyizolowano ze szczepu *Citrobacter freundii* wyosobnionego w Polsce (14). Nieco później w innych krajach wykryto geny *rmtA* (27), *rmtB* (5) i *rmtC* (26), a ostatnio *rmtD* (4) i *npmA* (25) związane odpowiednio z wytwarzaniem 16S rRNA metylaz z rodziny RmtA-D i NpmA.

Poza Francją i Polską metylazę ArmA wykryto u szczepów wyosobnionych w Belgii (2), Bułgarii (23), Hiszpanii (15), w Ameryce Północnej (9), na Tajwanie (28) w Chinach (29) i Japonii (30). Obecnie w Europie dominuje ArmA, a zdecydowanie rzadziej spotykane są metylazy RmtB i RmtC (2, 23). U większości szczepów wytwarzających metylazę ArmA, gen *armA* zlokalizowany był przeważnie w tym samym plazmidzie, co gen $bla_{CTX\text{-}M\text{-}3}$ odpowiedzialny za wytwarzanie ESBL typu CTX-M-3 (2). Występowanie genu *armA* w obrębie

transpozonu (11) zlokalizowanego w plazmidzie koniugacyjnym zdolnym do efektywnego transferu horyzontalnego (14) jest uważane za przyczynę szybkiego rozprzestrzeniania się tego mechanizmu oporności wśród szczepów szpitalnych (10, 11).

Badania nad częstością występowania i zróżnicowaniem 16S rRNA metylaz u szczepów izolowanych z materiału klinicznego od ludzi prowadzone są na świecie od kilku lat (2, 28). Natomiast brak jest krajowych publikacji dotyczących tego zakresu tematycznego. W większości dostępnych prac oceniano częstość występowania i udział 16S rRNA metylaz u szczepów wyosobnianych od osób chorych, hospitalizowanych w wieloprofilowych szpitalach i poddawanych antybiotykoterapii. Znikoma jest natomiast wiedza na temat występowania tego mechanizmu oporności wśród pałeczek *Enterobacteriaceae* w populacji osób zdrowych. W prezentowanej pracy podjęto próbę znalezienia odpowiedzi na powyższe pytanie poprzez poszukiwanie 16S rRNA metylaz u pałeczek *Enterobacteriaceae* wyosobnionych od pacjentek przebywających na oddziałach położniczych i ginekologicznych, a także u szczepów z materiału klinicznego od noworodków. Większość pacjentek z tej grupy przebywała w szpitalu w okresie do kilku dni po porodzie i nie były one poddawane antybiotykoterapii, co pozwala uznać, że osoby te nie należały do grupy zagrożonej występowaniem bakterii wytwarzających 16S rRNA metylazy.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne. W badaniach posłużono się 2359 izolatami pałeczek *Enterobacteriaceae*, które wyosobniono w okresie od 15 marca do 31 grudnia 2009 roku z materiału klinicznego od pacjentek i noworodków w Szpitalu Klinicznym im Ks. Anny Mazowieckiej w Warszawie. Szczegółowe informacje o typie materiału, z którego izolowano pałeczki *Enterobacteriaceae* i liczbie badanych próbek przedstawiono w tabeli I. Liczba izolatów była zbliżona do liczby badanych pacjentów. Gatunek badanych izolatów pałeczek *Enterobacteriaceae* określano przy użyciu komercyjnych systemów diagnostycznych (API ID GN lub ID E) w Laboratorium Bakteriologicznym Szpitala Klinicznego im Ks. Anny Mazowieckiej.

Profile lekowrażliwości. Test fenotypowy na zdolność wytwarzania ESBL oraz lekowrażliwość badanych szczepów na wybrane antybiotyki aminoglikozydowe określono metodą dyfuzyjno-krążkową w Laboratorium Bakteriologicznym Szpitala Klinicznego im Ks. Anny Mazowieckiej (Tabela III). Interpretację wyników przeprowadzono zgodnie z wytycznymi CLSI (3). Czternaście izolatów wykazujących zdolność wzrostu do krawędzi krążka z gentamicyną (10 μg) poddano reidentyfikacji w Zakładzie Bakteriologii NIZP-PZH przy użyciu klasycznych testów biochemicznych oraz metodą kolejnych rozcieńczeń w podłożu stałym określono najmniejsze stężenie hamujące ich wzrost (MIC) dla gentamicyny, amikacyny, streptomycyny (SIGMA) i kanamycyny oraz neomycyny (Fluka). Jako kontrolę stosowano szczep kontrolny *E. coli* ATCC 25922. Określenie MIC oraz interpretację wyników przeprowadzano zgodnie z zaleceniami CLSI (3).

Badanie metodą PCR. Do wykrywania wybranych genetycznych determinantów lekooporności zastosowano technikę łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Posłużono się opracowanymi we własnym zakresie starterami-PCR komplementarnymi do wysoce konserwatywnych fragmentów genów związanych z wytwarzaniem 16S rRNA metylaz *armA, rmtB* i *rmtC* (Tabela II) oraz β-laktamaz: bla_{TEM}, bla_{SHV} i bla_{CTX-M} z rodzin TEM, SHV

Tabela I. Charakterystyka głównych grup materiału badań i liczba wyosobnionych szczepów, z wyszczególnieniem gatunków liczebnie dominujących

Materiał	Typ[a]	Drobnoustrój						Łącznie
		E. coli	*K. pneumoniae*	*K. oxytoca*	*E. cloacae*	*P. mirabilis*	Inne	
Wymaz z odbytu	K	144	177	211	163	3	31	729
Wymaz z kanału szyjki macicy	K	445	70	12	13	11	21	572
Wymaz z gardła	K	266	73	84	86	1	12	522
Wymaz z przedsionka pochwy	K	65	9	4	1	4	6	89
Wymaz z nosa	K	2	0	0	0	0	0	2
Mocz	Z	144	6	1	5	5	4	165
Wymaz z rany	Z	67	9	9	12	10	12	119
Wody płodowe	Z	57	6	0	2	1	4	70
Wydzielina dróg oddechowych	Z	16	8	16	12	0	3	55
Wymaz z oka	Z	13	1	1	2	0	1	18
Inne	Z	14	0	2	0	0	2	18
Łącznie:	K	922	329	311	263	19	70	1914
	Z	311	30	29	33	16	26	445
	K+Z	1233	359	340	296	35	96	2359

[a] – interpretacja charakteru występowania drobnoustroju (K)– kolonizacja; (Z) - zakażenie

Tabela II. Oligonukleotydy (startery-PCR) użyte do identyfikacji genów związanych z wytwarzaniem wybranych 16S rRNA metylaz.

Gen	Starter nici wiodącej (Forward)	Starter nici komplementarnej (Reverse)	Locus ID (GenBank)	Powielany odcinek DNA	Długość (pz)
armA	TTCTGCCTATCCTAATTGGG	CCTTTGTAGACATCACTCTC	DQ177329	168-512	345
rmtB	AAACAGACCGTAGAGGCTGC	CCTCAATCTCAAACTCGGCG	AB103506	1524-2112	589
rmtC	CAAGCAGCTAGAGAAGGAGG	AAGATCACTCTCGCCTGACG	AB194779	7028-7499	472

(pz) – pary zasad

ID – numer referencyjnej sekwencji DNA w bazie danych GenBank (1) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

i CTX-M (12). Izolację matrycowego DNA i PCR przeprowadzono stosując postępowanie opisane uprzednio (12, 21).

PFGE. Analizę polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych chromosomalnego DNA przeprowadzono przy użyciu endonukleazy XbaI (Eurx, Polska) i aparatu CHEF DR II (BioRad, USA) według metodyki przedstawionej uprzednio (21). Podobieństwo profili XbaI-PFGE określono przy użyciu programu GelCompar II (Applied Maths, Belgia) stosując kryteria opisane uprzednio (21).

Tabela III. Liczba izolatów poddana ocenie wrażliwości na wybrane aminoglikozydy oraz udział izolatów wrażliwych, średnio wrażliwych i opornych.

Antybiotyk	Liczba i odsetek izolatów[a]									
	Zbadanych		S		I		R		I + R	
	(n)	%[b]	(n)	%[c]	(n)	%	(n)	%[c]	(n)	%[c]
Gentamicyna	2345	99,40	2309	98,46	0	0	36	1,53	36	1,53
Netylmycyna	1971	83,55	1949	98,88	13	0,66	9	0,46	22	1,12
Amikacyna	1428	60,53	1404	98,32	18	1,26	6	0,42	24	1,68
Neomycyna	773	32,77	736	95,21	4	0,52	33	4,27	37	4,79

[a] – (S) wrażliwy; (I) średnio wrażliwy; (R) oporny,
[b] – odsetek w odniesieniu do całkowitej liczby wyosobnionych izolatów (n=2359),
[c] – odsetek w odniesieniu do liczby izolatów zbadanych,
(n) – liczba izolatów.

WYNIKI

Liczbę zbadanych izolatów i udział izolatów wrażliwych, średnio wrażliwych i opornych wśród 2359 izolatów pałeczek *Enterobacteriaceae* wyosobnionych w okresie od 15 marca do 31 grudnia 2009 roku z materiału klinicznego od pacjentek i noworodków w Szpitalu Klinicznym im Ks. Anny Mazowieckiej w Warszawie podano w tabeli III. Stwierdzono, że wśród wyhodowanych od badanych osób izolatów pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* ponad 95% było wrażliwych na używane w badaniach antybiotyki aminoglikozydowe. Zaledwie 91 izolatów spośród 2359 badanych było średnio wrażliwych lub opornych na przynajmniej jeden z czterech użytych aminoglikozydów. Grupa ta obejmowała 23 izolaty niewrażliwe na 2 spośród użytych antybiotyków i 2 izolaty, które były niewrażliwe na 3 antybiotyki. W tabeli IV przedstawiono szczegółowe dane dotyczące przynależności gatunkowej i liczby izolatów, u których metodą dyfuzyjno-krążkową stwierdzono średnią wrażliwość bądź oporność na przynajmniej jeden spośród użytych aminoglikozydów. W tej grupie izolatów przeważały pałeczki *Escherichia coli* przy jedynie znikomym udziale pałeczek z rodzaju *Klebsiella*.

Tabela IV. Przynależność gatunkowa i liczba izolatów wykazujących brak wrażliwości na wybrane aminoglikozydy w metodzie dyfuzyjno-krążkowej.

Gatunek	Gentamicyna		Amikacyna		Netylmycyna		Neomycyna	
	I	R	I	R	I	R	I	R
E. coli	0	15	15	1	4	0	4	24
E. coli (ESBL+)	0	9	2	3	7	3	0	2
K. pneumoniae	0	1	0	0	0	0	0	1
K. pneumoniae (ESBL+)	0	1	0	1	0	1	0	0
K. oxytoca	0	0	1	0	0	0	0	0
P. mirabilis	0	4	0	0	1	0	0	4
P. mirabilis (ESBL+)	0	3	0	1	1	2	0	0
M. morganii	0	3	0	0	0	3	0	2

I – liczba izolatów średnio wrażliwych,
R – liczba izolatów opornych,
(ESBL+) – izolaty wykazujące dodatni wynik fenotypowego testu na wytwarzanie ESBL.

Tabela V. Charakterystyka 14 izolatów wykazujących wzrost do krawędzi krążka z gentamicyną (10 µg)

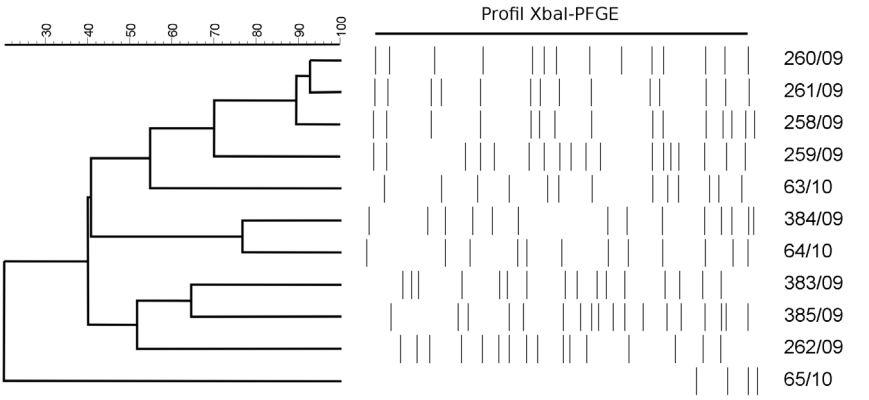
Gatunek	Numer[a]	Materiał[b]	Typ[c]	ESBL[d]	MIC (µg/ml)[e]					PCR[f]		
					GN	AN	K	N	STR	TEM	SHV	CTX-M
E. coli	259/09	PM	Z	-	<128	512	<128	4	64	+	-	-
E. coli	384/09	PM	Z	-	>1024	<128	>1024	>32	>128	+	-	-
E. coli	383/09	PM	Z	+	512	<128	<128	4	4	+	-	-
E. coli	63/10	PM	Z	-	<128	<128	<128	4	128	+	-	-
E. coli	64/10	PM	Z	-	<128	<128	<128	2	128	+	-	-
E. coli	261/09	WKSM	K	-	512	<128	<128	4	>128	+	-	-
E. coli	262/09	WOD	K	+	<128	<128	<128	4	4	+	-	+
E. coli	260/09	WKSM	K	-	1024	<128	<128	4	>128	+	-	-
E. coli	385/09	WKSM	K	-	<128	<128	1024	>32	>128	+	-	-
E. coli	65/10	WKSM	K	+	<128	<128	<128	2	128	+	-	+
E. coli	258/09	WKSM	K	-	256	<128	<128	2	128	+	-	-
P. mirabilis	263/09	WR	Z	+	256	<128	<128	16	16	+	-	-
P. mirabilis	62/10	WR	Z	-	<128	<128	512	>32	16	+	-	-
K. pneumoniae	386/09	WPP	K	+	<128	<128	<128	2	4	+	+	-

[a] – numer kolekcji LEB/ZP Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH,
[b] – WR (wymaz z rany); PM (posiew moczu); WOD (wymaz z odbytu); WKSM (wymaz z ujścia kanału szyjki macicy); WPP (wymaz z przedsionka pochwy),
[c] – klasyfikacja roli drobnoustroju (Z) zakażenie; (K) – kolonizacja,
[d] – wynik testu fenotypowego na zdolność wytwarzania ESBL, (+) dodatni; (-) ujemny,
[e] – (GN) gentamicyna; (AN) amikacyna; (K) kanamycyna; (N) neomycyna,
[f] – poszukiwanie genów bla_{TEM}, bla_{SHV} i bla_{CTX-M}

W tabeli IV przedstawiono charakterystykę 14 izolatów, które ze względu na zdolność wzrostu do krawędzi krążka z gentamicyną (10 µg) zakwalifikowano do dalszych badań na obecność 16S rRNA metylaz. Jedenaście izolatów należało do gatunku *E. coli.* U sześciu izolatów stwierdzono oporność na wysokie stężenie (≥512 µg/ml) jednego z trzech użytych aminoglikozydów z grupy 4,6-dwupodstawionych 2-deoksystreptamin, a izolat *E. coli* 384/09 charakteryzował się wartością MIC dla gentamicyny i kanamycyny przewyższającą 1024 µg/ml. Izolat ten wykazywał również oporność na wysokie stężenia neomycyny i streptomycyny. U żadnego z 14 izolatów nie stwierdzono oporności na działanie wysokich stężeń (≥512 µg/ml) każdego z użytych w badaniach aminoglikozydów z grupy 4,6-dwupodstawionych 2-deoksystreptamin.

Badanie testem PCR wykazało, że wszystkie 14 izolatów o podwyższonej oporności na gentamicynę posiadało gen bla_{TEM} związany z wytwarzaniem β-laktamazy z rodziny TEM. U dwóch izolatów z fenotypem (ESBL+) wykryto gen bla_{CTX-M} odpowiedzialny za wytwarzanie ESBL z rodziny CTX-M. Trzeci izolat wytwarzający ESBL posiadał gen bla_{SHV}. Nie stwierdzono natomiast obecności genów *armA, rmtB* i *rmtC* związanych z wytwarzaniem 16S rRNA metylaz.

Analiza profili XbaI-PFGE (Rycina 1) wykazała, że 11 izolatów *E. coli* i 2 izolaty *P. mirabilis* wykazujące podwyższoną oporność na gentamicynę należało do różnych genotypów o niewielkim stopniu podobieństwa (od 40% do 92%) i reprezentowało różne szczepy *sensu stricto*. Izolaty: *E. coli* (65/10) i *P. mirabilis* (62/10) nie typowały się enzymem XbaI.



Ryc. 1. Ideogram profili XbaI-PFGE jedenastu szczepów *E. coli* wykazujących wzrost do krawędzi krążka z gentamicyną (10 μg) oraz dendrogram przedstawiający ich genetyczne podobieństwo.

DYSKUSJA

W Europie częstość występowania pałeczek *Enterobacteriaceae* wytwarzających 16S rRNA metylazy wynosiła u pacjentów szpitalnych od 0,12% do 1,5% odpowiednio w Belgii i Bułgarii (2, 23). Znacznie wyższy odsetek tych drobnoustrojów może występować na Tajwanie (18, 28) i w Chinach, gdzie wykryto szczepy zdolne do równoczesnego wytwarzania dwóch różnych metylaz: ArmA i RmtB (29). Co więcej, w odróżnieniu od Europy (15), oba te enzymy występują w Chinach także u pałeczek *Enterobacteriaceae* wyosobnianych od drobiu (7).

W Polsce częstość występowania szczepów wytwarzających 16S rRNA metylazy wśród pałeczek *Enterobacteriaceae* wyosobnianych od ludzi i zwierząt nie była dotychczas przedmiotem oceny. Dostępne są jednak prace, w których opisano wyosobnione od ludzi szczepy tych pałeczek wykazujące oporność na trzy różne aminoglikozydy, przy czym wartość MIC dla części tych szczepów przekraczała 256 μg/ml (17). Ze względu na te dwie cechy, niektóre spośród szczepów opisywanych we wspomnianej pracy mogły być zdolne do wytwarzania 16S rRNA metylaz. Ponadto, o występowaniu w Polsce pałeczek *Enterobacteriaceae* wytwarzających metylazę typu ArmA świadczą także inne doniesienia (14, 13), potwierdzające, że metylaza ta może być wytwarzana przez część szczepów produkujących ESBL z rodziny CTX-M-3.

W przedstawianych badaniach poszukiwano 16S rRNA metylaz u izolatów pałeczek *Enterobacteriaceae* opornych na wybrane antybiotyki aminoglikozydowe. Badaniom poddano liczną (n=2359) grupę izolatów tych drobnoustrojów wyosobnionych od pacjentek i noworodków w szpitalu ginekologiczno-położniczym w Warszawie, w okresie od marca do grudnia 2009 r. W tej grupie dominowały pałeczki *E. coli*. Licznie występowały też pałeczki *Klebsiella* i *Enterobacter*, których izolaty w odróżnieniu od tych wyosabnianych od pacjentów poddawanych długotrwałej hospitalizacji i antybiotykoterapii (2, 23 29), charakteryzowały się wysoką wrażliwością na użyte w badaniach aminoglikozydy. Stwier-

dzono, że ponad 95% badanych izolatów było wrażliwych na wszystkie użyte w badaniach aminoglikozydy. W tym świetle, nie dziwi zatem fakt izolacji jedynie niewielkiej liczby izolatów (n=14) wykazujących podwyższoną oporność na gentamicynę. W tej grupie zaledwie jeden izolat (*E. coli* 384/09) charakteryzował się opornością na wysokie stężenie (MIC 1024 μg/ml) dwóch różnych aminoglikozydów. Jednak, nawet u tego izolatu nie stwierdzono obecności żadnego z genów kodujących występujące w Europie metylazy ArmA, RmtB i RmtC (Raport WP29 Med.Vet.Net. 2009 r.). O braku zdolności wytwarzania 16S rRNA metylaz przez izolat *E. coli* 384/09 może też świadczyć jego względnie niska oporność na amikacynę (MIC poniżej 128 μg/ml). Na uwagę zasługuje natomiast fakt, że u 6 badanych izolatów stwierdzono oporność na wysokie stężenie (512 μg/ml) gentamicyny, amikacyny lub kanamycyny. Przeprowadzone uprzednio badania wskazują, że cecha ta może być warunkowana przez nadprodukcję enzymu modyfikującego dany antybiotyk (16). Wyniki genotypowania metodą PFGE izolatów charakteryzujących się podwyższoną opornością na gentamicynę wskazują, że izolaty te nie posiadają charakteru klonalnego, co może przemawiać za stwierdzeniem, że w Szpitalu Klinicznym im Ks. Anny Mazowieckiej nie stanowią one zagrożenia epidemicznego.

Wśród badanych izolatów przeważały (81%) pałeczki *Enterobacteriaceae* uznane za saprofityczną florę kolonizującą kobiety w okresie przed i okołoporodowym. Natomiast pałeczki stanowiące etiologiczny czynnik zakażeń, były znacznie mniej liczne (19%). Z tych względów można założyć, że przedstawione w prezentowanych badaniach wyniki można uznać za reprezentatywne dla populacji zdrowych kobiet w wieku reprodukcyjnym w kraju, a pośrednio także ich partnerów seksualnych. Za zasadnością tej tezy przemawiać może też stwierdzony, wysoki odsetek (powyżej 95%) izolatów wrażliwych na wszystkie użyte w badaniach aminoglikozydy.

Przedstawione w tej pracy wyniki wskazują, że nosicielstwo pałeczek *Enterobacteriaceae* wytwarzających 16S rRNA metylazy, praktycznie nie występuje u osób zdrowych w kraju. W świetle wyników przedstawianych w tej pracy i we wcześniejszych doniesieniach (13, 16) można natomiast przypuszczać, że w Polsce problem wytwarzania 16S rRNA metylaz ograniczony jest, jak dotychczas, do populacji pałeczek *Enterobacteriaceae* występujących u pacjentów poddawanych długotrwałej hospitalizacji.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują Prof. Yoshichika Arakawa z National Institute of Infectious Diseases w Tokio za udostępnienie referencyjnych próbek DNA zawierających geny: *armA, rmtA, rmtB* i *rmtC*.

K. Zacharczuk, K. Piekarska, J. Szych, M. Sulik, M. Jagielski, R. Gierczyński

AMINOGLYCOSIDE RESISTANCE IN ENTEROBACTERIACEAE ORIGINATED IN A GYNECOLOGY-OBSTETRICAL HOSPITAL: A SURVEY FOR 16S rRNA METHYLASES: ArmA, RmtB AND RmtC

SUMMARY

We examined the resistance of 2359 clinical isolates of *Enterobacteriaceae* to gentamicin, amikacin, netilmicin and neomycin by the disc-diffusion assay. The isolates originated from female-patients and newborn infants in a gynecology-obstetrical hospital in Warsaw, Poland. Isolates from adults predominated. Most of the isolated bacteria were considered non-pathogenic, colonization flora. The majority (above 95%) of the isolates were sensitive to all of the tested aminoglycosides. Forty five (1,90%) isolates were resistant to one or more agents. In this group, *E. coli* was prevalent (73,33%). As little as 14 isolates had no growth inhibition around the gentamicin disc (10 mcg) (contact-growth). MICs of seven isolates ranged from 256 to 1024 (mcg/ml) of the tested agents. One isolate had MIC 1024 for amikacin and kanamycin. All the contact-growth isolates were examined for genes encoding for TEM, SHV and CTX-M beta-lactamases, and genes *armA*, *rmtB* and *rmtC* for 16S rRNA methylases reported in Europe. All of them produced TEM enzyme while SHV and CTX-M was expressed by one and two isolates respectively. None of the tested 16S rRNA methylases was detected. Our results show the low carriage of the aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* in healthy pregnant-women and most probably their sexual partners. Our findings may argue that production of the 16S rRNA methylases is still limited to patients with a long-term antibiotic-therapy in regular hospitals rather than to non-hospitalized population in Poland.

PIŚMIENNICTWO

1 *Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL.* GenBank. Nucleic Acids Res 2008; 36:D25-30
2. *Bogaerts P., Galimand M., Bauraing C* i inni. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. JAC 2007; 59:459-64.
3 *CLSI*. Performance Standards for Antimicriobial Disc Suseptibility Tests, Eighteenth Informational Supplement, CLSI document M100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA, USA, 2008
4. *Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL*. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51:852-6
5. *Doi Y, Yokoyama K., Yamane K., Wachino J., Shibata N., Yagi T., Shibayama K., Kato H., Arakawa Y.* Plasmid mediated 16S rRNA methylase in *Seratia marcescens* confering high level resistance to aminoglycosides. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:491-6
6. *Doublet B., Weill F.-X., Fabre L., Chaslus-Dancla E., Cloeckaert A.* Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster containing a novel 3'-N-aminoglycoside acetyltransferase gene cassette, aac(3)-Id, in *Salmonella enterica* serovar Newport. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:3806-12
7 *Du XD, Wu CM, Liu HB, Li XS, Beier RC, Xiao F, Qin SS, Huang SY, Shen JZ*. Plasmid-mediated ArmA and RmtB 16S rRNA methylases in *Escherichia coli* isolated from chickens. J Antimicrob Chemother 2009; 64:1328-30

8. *Francois B, Russell RJM., Murray JB, Aboulela F, Masquida B, Vicens Q, Westhof E.* Crystal structures of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides: role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding. Nuc Acids Res 2005; 17:5677-90
9. *Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES*. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* from Europe, North America, and Latin America. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52:1843-5
10. *Galimand M, Corvalin P, Lambert T.* Plasmid-mediated high level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:2565-71
11. *Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P, Lambert T.* Wordlwide Disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn*1548*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:2949-53
12. *Gierczyński R, Szych J, Rastawicki W, Jagielski M.* The molecular characterisation of the extended spectrum belactamase (ESBL) producing strain of *Salmonella enterica* serovar Mbandaka isolated in Poland. Acta Microbiol Polonica 2003; 52:183-90
13 *Gierczyński R, Szych J, Wardak S, Ławrynowicz-Paciorek M.* Occurrence of 16S rRNA methylase ArmA in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Poland. Med.Vet.Net. Third Annual Scientific Meeting, 27-30 czerwiec 2007 , Lucca, Włochy, MVN- Abstract-Book str. 23
14. *Gołębiewski M, Kern-Zdanowicz I, Zienkiewicz M, Adamczyk M, Zylinska J, Baraniak A, Gniadkowski M, Bardowski J, Cegłowski P*. Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum β-lactamase gene $bla_{CTX\text{-}M\text{-}3}$. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51:3789-95
15. *Gonzalez-Zorn B, Teshager T, Cascas M, Porrero MC, Moreno MA, Courvalin P, Dominguez L. armA* and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis 2005; 11:954-56
16 *Hidalgo L, Gieczyński R, Gutierrez B, Escudero JA, San Mllan A, Szych J, Wardak S, Gonzalez--Zorn B*. Characterization of a novel aac(3)-IId gene encoding a high-level gentamicin resistance modifying enzyme in a *E coli* clinical isolate from Poland. 4th Med-Vet-Net Annual Scientific Conference, 11-14 czerwiec 2008, Saint Malo, Francja MVN- Abstract-Book str. 50.
17. *Kowalska-Krochmal B, Dolna I, Dobosz A, Wrzyszcz E, Gościniak G*. Ocena stopnia wrażliwości na aminoglikozydy szczepów bakteryjnych izolowanych od chorych z zakażeniami układowymi i uogólnionymi. Med Dośw Mikrobiol 2008; 60:205-14
18. *Ma L, Lin CJ, Chen JH* i inni. Widespread dissemination of aminoglycoside resistance genes *armA* and *rmtB* in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Taiwan producing CTX-M-type extended-spectrum β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53:104-11
19. *Meszaros J, Hryniewicz W*. Antybiotyki w profilaktyce i leczeniu zakażeń. PZWL Warszawa 2001; str. 216-249
20. *Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM*. Aminoglycosides: activity and resistance. Antmicrob Agents Chemother 1999; 43:727-37
21. *Piekarska K, Zacharczuk K, Szych J, Zawidzka E, Wilk E, Wardak S, Jagielski M, Gierczyński R.* Występowanie w jednym z warszawskich szpitali pałeczek *Klebsiella pneumoniae* wytwarzających karbapenemazę typu KPC. Med Dośw Mikrobiol 2010; 62:9-20
22. *Poole K*. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:479-87
23. *Sabtcheva S, Saga T, Kantardjiev T, Ivanova M, Ishii Y, Kaku M*. Nosocomial spread of *armA*-mediated high-level aminoglycoside resistance in *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-3 β-lactamase in a cancer hospital in Bulgaria. J Chemother. 2008; 20:593-9
24. Shaw KJ, Wright GD. Aminoglycoside resistance in Gram-positive bacteria. W: „Gram-positive pathogens. Red. *Fischetti V.A., Novick R.P., Ferretti J.J., Portnoy D.A., Rood J.I.* ASM Press, Washington D.C. 2000 str. 635-646

25. *Wachino J, Shibayama K, Kurokawa H, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, Shibata N, Ike Y, Arakawa Y.* Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51:4401-9
26. *Wachino J., Yamane K., Shibayama K., Kurokawa H., Shibata N., Suzuki S., Doi Y., Kimura K., Ike Y., Arakawa Y.* Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase , RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50:178-84
27. *Yamane K, Doi Y, Yokoyama K, Yagi T,Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Kato H, Arakawa Y.* Genetic environments of the *rmtA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:2069-74
28. *Yan JJ, Wu JJ, Ko WCh, Tsai SH, Chuang ChL, Wu HM, Lu YJ, Li JD*. Plasmid mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese hospitals. J Antimicrob Chemother 2004; 54:1007-12
29. *Yu F, Wang L, Pan J* i inni. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Chinese teaching hospital: coexistence of *rmtB* and *armA* genes in the same isolate. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009; 64:57-63
30. *Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Kimura K, Kai K, Ishikawa S, Ozawa Y, Konda T, Arakawa Y.* 16S rRNA methylase-producing, gram-negative pathogens, Japan. Emerg Infect Dis 2007; 13:642-6

Otrzymano: 24 V 2010 r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii NIZP-PZH