MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2017, 69: 115 - 126

Współwystępowanie plazmidowo kodowanych mechanizmów oporności: DHA-7, CTX-M-15, *qnr*B6 i *aac(6')-Ib-cr* u pałeczek *Klebsiella pneumoniae* wytwarzających nabyte AmpC

Co-existence of plasmid-mediated resistance: DHA-7, CTX-M-15, *qnr*B6 and *aac(6')-Ib-cr* among acquired AmpC-producing *Klebsiella pneumoniae*

Rzeczkowska Magdalena[1], Piekarska Katarzyna[1], Wołkowicz Tomasz[1], Semczuk Katarzyna[2], Kamińska Teresa[3], Gierczyński Rafał[1]*

[1] Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Zakład Bakteriologii, Warszawa
[2] Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka", Zakład Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej, Warszawa
[3] Mazowieckie Centrum Leczenia Chorób Płuc i Gruźlicy, Laboratorium Mikrobiologiczne, Otwock

Gram-ujemne pałeczki *Klebsiella pneumoniae* są jednym z dominujących etiologicznych czynników zakażeń szpitalnych. Często napotykanym problemem w terapii zakażeń wywoływanych przez te pałeczki jest ich narastająca oporność, w tym na antybiotyki ß-laktamowe i fluorochinolony. Celem pracy była ocena współwystępowania wybranych, kodowanych plazmidowo mechanizmów oporności na antybiotyki β-laktamowe i fluorochinolony u pałeczek *K. pneumoniae* wytwarzających nabyte cefalosporynazy typu AmpC. Przeprowadzone badania wskazują na zdolność szpitalnych szczepów pałeczek *K. pneumoniae* do nabywania i akumulacji genów kodujących mechanizmy oporności tj. pAmpC, ESBL i PMQR. Fakt akumulowania PMQR, AmpC i ESBL stanowić może formę skutecznej odpowiedzi na presję selekcyjną wynikłą ze skojarzonego stosowania ß-laktamów i fluorochinolonów w lecznictwie.

Słowa kluczowe: *Klebsiella pneumoniae, plazmidowo-kodowane cefalosporynazy typu AmpC, pAmpC, ESBL, PMQR*

ABSTRACT

Introduction: Increasing antimicrobial resistance, especially towards third and fourth generation cephalosporins, aminoglycosides and fluoroquinolones have been reported last decade and poses serious therapeutic problems with treating *K. pneumoniae* infections in humans. Extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) constitute the predominant mechanism of

acquired antibiotic resistance to β-lactams. During the past few years, increasing occurrence of plasmid-mediated AmpC β-lactamases (pAmpCs) was increasingly reported. Moreover, plasmid-mediated quinolone-resistance (PMQR) has been reported in co-existence with pAmpCs and ESBLs. Therefore, the aim of our study was to analyse the diversity of ESBLs and plasmid-mediated PMQR among *K. pneumoniae* pAmpC-producing isolates.

Material and Methods: Twenty-two clinical isolates of *K. pneumonia* resistant to third-generation cephalosporins were prospectively collected in 3 hospitals in the Warsaw city and suburbs, Poland during period of 3-months. AmpCs and ESBLs were detected by phenotypic methods: sensitivity to cefoxitin, disk potentiation test (DPT) and duble-disk synergy test (DDST). MICs of 8 antimicrobial agents were determined by E-test. pAmpC, ESBL, QNR and *QepA* genes were detected by PCR and DNA sequencing. The *aac(6')-Ib* was detected by PCR, the presence of *aac(6')-Ib-cr* gene variant was identified by digestion of the PCR product with BtsCI. PFGE with XbaI endonuclease was performed to investigate the clonality of the tested isolates.

Results: Five of 22 tested isolates of *K. pneumoniae produced* AmpC β-lactamases of DHA family. All the isolates were found to co-produce extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) of CTX-M-15 family. Furthermore, 4 of the AmpC producing isolates were positive for PMQR determinants. Two of them carried sole *aac(6')-Ib-cr* variant gene while the remaining 2 isolates harbored *qnrB6* in addition to the *aac(6')-Ib-cr* variant. No clonality was found by XbaI-PFGE.

Conclusions: Accumulation of plasmid-mediated AmpC, ESBL and PMQR resistance traits by *K. pneumoniae* may be the *ad hoc* strategy to cope with the third generation beta-lactams and fluoroquinolones. Horizontal transfer seem to play the primary role in dissemination of these resistance traits among *K. pneumoniae*.

Key words: *Klebsiella pneumoniae, plasmid-encoded AmpC cephalosporinases, pAmpC, ESBL, PMQR*

WSTĘP

Należące do rodziny *Enterobacteriaceae,* Gram-ujemne pałeczki *Klebsiella pneumoniae* stanowią jeden z dominujących czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych. Znaczącym problemem w terapii zakażeń wywoływanych przez te drobnoustroje jest ich narastająca oporność na antybiotyki z grupy ß-laktamów, aminoglikozydów i fluorochinolonów. Dane EARS-Net wskazują, że w Polsce w latach 2011-2013 nastąpił wzrost z 37,1% do 52,5% szczepów *K. pneumoniae* opornych jednocześnie na cefalosporyny III generacji, aminoglikozydy i fluorochinolony (7).

Oporność na cefalosporyny III generacji jest przede wszystkim warunkowana wytwarzaniem przez szczep β-laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym – ESBL (*ang. extended-spectrum beta-lactamase)* i/lub cefalosporynaz AmpC. Mechanizmy te są istotne ze względu na potencjał szybkiego rozprzestrzeniania, bowiem kodujące je geny są zwykle przenoszone na ruchomych elementach genetycznych takich jak plazmidy (1, 12, 21, 33).

Jak dotąd, najbardziej rozpowszechnionym nabytym mechanizmem oporności na antybiotyki β−laktamowe wytwarzanym przez pałeczki *Enterobacteriaceae* są enzymy typu ESBL, zwłaszcza należące do rodziny CTX-M (1, 2). Niemniej jednak, w ostatnich latach wzrosło także znaczenie cefalosporynaz typu AmpC, zwłaszcza tych kodowanych plazmidowo – pAmpC (*ang. plasmid-mediated AmpC β−lactamase*) (12, 16, 17, 19, 26). Wytwarzanie

tych nabytych enzymów AmpC stwierdzano głównie u *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. i *Proteus mirabilis*. Są to gatunki które nie wytwarzają chromosomalnie kodowanych cefalosporynaz typu AmpC z wyjątkiem niektórych szczepów *E. coli* wytwarzających konstytutywnie chromosomalne AmpC na bardzo niskim poziomie ekspresji. Plazmidowo kodowane β – laktamazy pAmpC, podobnie do ESBL, hydrolizują szerokie spektrum antybiotyków β – laktamowych, w tym penicyliny, oksyimino-cefalosporyny, cefamycyny i aztreonam (12, 33). Ze względu na znaczne zróżnicowanie aktywności enzymów pAmpC, w praktyce laboratoryjnej przydatnym czynnikiem preselekcyjnym jest stwierdzenie oporności badanego szczepu na cefoksytynę (4, 5, 15, 32).

Wśród enzymów pAmpC dotychczas wyodrębniono 8 rodzin: CMY, FOX, ACC, LAT, MIR, ACT, MOX i DHA. U pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* najczęściej spotykane są enzymy z rodzin: CMY, DHA i FOX. Natomiast, wywodzące się od *Morganella morganii* enzymy DHA, należą do najczęściej występujących pAmpC u *K. pneumoniae* (6, 12, 29, 18,19).

Jak wskazują dane piśmiennictwa, geny kodujące plazmidowo przenoszone β-laktamazy tj. ESBL i pAmpC, często współwystępują z innymi plazmidowo kodowanymi mechanizmami oporności, w tym na fluorochinolony (17, 25, 27, 34). Do najczęściej występujących u pałeczek *Enterobacteriaceae* plazmidowo kodowanych mechanizmów oporności na fluorochinolony - PMQR (*ang. plasmid-mediated quinolone resistance*) należą: a) białka Qnr (chroniące gyrazę przed działaniem chinolonów), b) AAC(6')-Ib-cr (wariant acetylotransferazy aminoglikozydowej powodujący oporność na antybiotyki aminoglikozydowe tj. amikacynę, tobramycynę, kanamycynę i hydrofilowe fluorochinolony tj. ciprofloksacynę oraz norfloksacynę) i c) QepA (plazmidowo kodowana pompa błonowa) (27). Powszechnie wiadomo, że nabycie mechanizmu PMQR powoduje jedynie obniżoną wrażliwość na fluorochinolony (MIC ciprofloksacyny 0,25 – 1 mg/l). Obecność genów warunkujących PMQR sprzyja jednak selekcji mutacji w genach chromosomalnych kodujących podjednostki gyrazy i topoizomerazy IV, przyczyniając się tym samym do wystąpienia oporności na wysokie stężenia fluorochinolonów (25, 27).

W Polsce, w odróżnieniu od innych krajów (3, 9, 30, 34, 26), problem współwystępowania plazmidowo - kodowanych mechanizmów AmpC, ESBL i PMQR wśród pałeczek *K. pneumoniae* nie był dotychczas często opisywany. Z tego względu celem prezentowanych badań była ocena współwystępowania wybranych, kodowanych plazmidowo mechanizmów oporności na antybiotyki β-laktamowe i fluorochinolony u pałeczek *K. pneumoniae* wytwarzających cefalosporynazy typu pAmpC.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne. Materiał do badań stanowiły 22 izolaty *K. pneumoniae* oporne na cefoksytynę i cefalosporyny trzeciej generacji. Izolaty zostały wyodrębnione z materiału klinicznego od ludzi w trzech szpitalach zlokalizowanych w Warszawie i okolicach. Izolaty te uzyskano w okresie od 01.11.2013 r. do 31.01.2014 roku w ramach badania prospektywnego. Przynależność gatunkową i profil lekowrażliwości badanych izolatów określono przy użyciu komercyjnego systemu automatycznego Vitek 2 (BioMérieux, Francja).

Szczepy kontrolne. W testach fenotypowych jako kontrole posłużyły szczepy wzorcowe pochodzące z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Typowych (American Type Culture Collection – ATCC): *E. coli* ATCC 25922 – kontrola ujemna (szczep niewytwarzający β-laktamaz, wrażliwy na kwas nalidyksowym i fluorochinolony); *E. cloacae*

ATCC®BAA-1143 – kontrola wysokiej ekspresji AmpC (szczep wytwarzający na wysokim poziomie chromosomalnie kodowaną β-laktamazę typu AmpC); *K. pneumoniae* ATCC®BAA-1144 - kontrola niskiej ekspresji AmpC (szczep wytwarzający na niskim poziomie cefalosporynazę z rodziny DHA-1); *K. pneumoniae* ATCC 700603 – kontrola dodatnia ESBL – (szczep wytwarzający ESBL – SHV-18).

Do celów kontrolnych posłużono się także szczepami uzyskanymi z kolekcji Narodowego Instytutu Leków: *K. pneumoniae* 2102/06 - kontrola dodatnia (szczep wytwarzający β-laktamazę DHA-1); *P. mirabilis* 1662/00 - kontrola dodatnia (szczep wytwarzający β-laktamazę CMY-15).

Dodatkowo, w reakcji PCR jako dodatnie kontrole użyto preparaty DNA uzyskane ze szczepów wzorcowych: *E. coli*J53 zawierający plazmid pMG252 (*qnrA*); *Salmonella* Convallis (*qnrB*); *S.* Typhimurium (*qnrS*); *K. pneumoniae* (nr. 60) (*aac(6')-Ib-cr*) (24); *Salmonella* Oranienburg (32/01) ($bla_{\text{CTX-M-3}}$) (10); *K. pneumoniae* 2102/06 ($bla_{\text{DHA-1);}}$ *P. mirabilis* 1662/00 ($bla_{\text{CMY-15).}}$

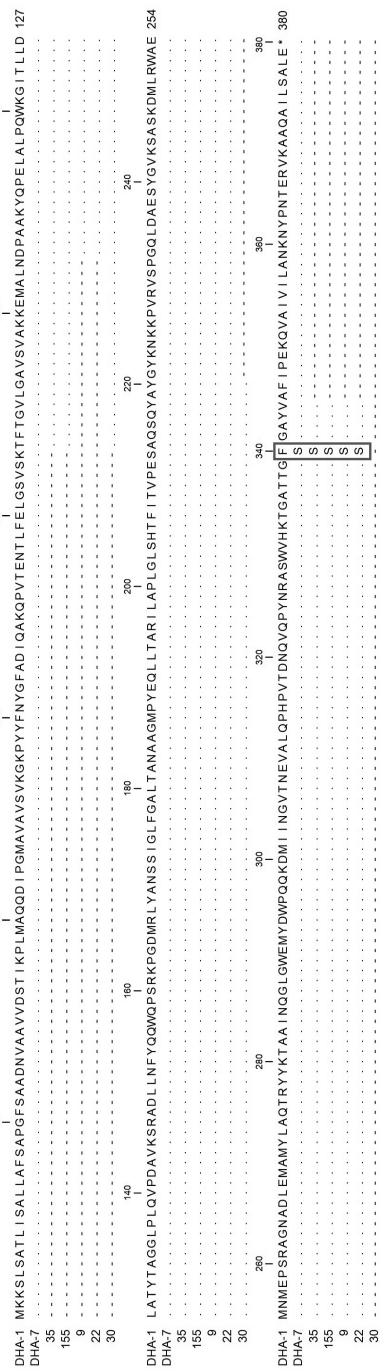
Zastosowane testy fenotypowe:

1. U badanych izolatów *K. pneumoniae* opornych na cefoksytynę i cefalosporyny 3-generacji (n=22) oceniono zdolność wytwarzania β-laktamaz pAmpC stosując test synergii dwóch krążków - DDST (ang. *duble-disk synergy test*) i test synergizmu - DPT (ang. *disk potentation test*) wykonane zgodnie z wcześniej opisaną metodyką (28). W przypadku obu testów, jako inhibitor AmpC zastosowano kwas phenyloboronowy (PBA).
2. Zdolność wytwarzania ESBL określono stosując test DDST (ang. *duble-disk synergy test*) (14).
3. Oznaczenia wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii (MIC) dla amoksycyliny z kwasem klawulanowym (AMC) aztreonamu (ATM), cefoksytyny (FOX), cefotaksymu (CTX), ceftriaksonu (CRO), cefepimu (FEP), kwasu nalidyksowego (NA) oraz ciprofloksacyny (CIP) dokonano przy zastosowaniu pasków z gradientem stężeń antybiotyku (bioMerieux).

Izolacja plazmidowego DNA. Preparaty plazmidowego DNA przygotowano przy użyciu komercyjnego zestawu Plasmid Mini AX (A&A Biotechnology, Polska) zgodnie z instrukcją producenta.

Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR). Do wykrycia wybranych genetycznych markerów oporności zastosowano łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) stosując niżej wymienione startery i warunki reakcji:

a) Geny kodujące pAmpC: bla_{DHA}, bla_{ACC}, bla_{CIT}, bla_{EBC}, bla_{FOX} i bla_{MOX} wykrywano stosując startery oraz warunki reakcji multipleks PCR opisane przez *Pèrez-Pèrez* i wsp. (20). Do reakcji sekwencjonowania zastosowano startery opisane uprzednio (31) oraz startery opracowane we własnym zakresie, dla których temperatura przyłączania wynosiła 61°C (DHA-F:5'AATGATCCGGCGGCAAAATACCAG-3' oraz DHA-R: 5' CGACATAGGCGCCGGAACCAGT-3').
b) Konserwatywnego, rdzeniowego fragmentu genu $bla_{\text{CTX-M,}}$ poszukiwano stosując startery oraz warunki reakcji PCR opisane uprzednio (10). Natomiast do reakcji sekwencjonowania genu $bla_{\text{CTX-M}}$ zastosowano startery opracowane we własnym zakresie, dla których temperatura przyłączania wynosiła 66°C (CTX--MLF: 5'-GCTGATGGCGACGGCAACC-3' oraz CTX-MLR: 5-CTAATA-CATCGCGACGGCTTTCTG-3').



Rycina 1. Zestawienie przewidywanej sekwencji aminokwasowej β-laktamazy pAmpC z rodziny DHA (DHA-1: GenBank accession no.Y16410; DHA-7: GenBank accession no. HQ456945). F – fenyloalanina, S – seryna.

c) Wybrane fragmenty genów PMQR**:** *qnrA*, *qnrB*, *qnrS, aac(6')-Ib-cr* oraz *qepA* wykrywano stosując startery i termiczne warunki reakcji PCR opisane uprzednio (22, 23, 24). Dodatkowo, obecność wariantu genu *aac(6')-Ib-cr* potwierdzano poprzez analizę restrykcyjną produktu PCR stosując endonukleazę BtsCI (Fermentas, Litwa) według metodyki opisanej uprzednio (23, 24).

Sekwencjonowanie. Produkty amplifikacji PCR oczyszczono przy użyciu odczynnika ExoSAP-IT (Affymetrix) a następnie poddano reakcji sekwencjonowania obu nici DNA metodą Sangera (Genomed, Polska). Uzyskane sekwencje nukleotydowe porównywano z sekwencjami referencyjnymi znajdującymi się w bazie GenBank oznaczonymi odpowiednio: Y16410 (DHA-1), HQ456945 (DHA-7), AY044436 (CTX-M-15), EF520349 (QNR B6). Analizę sekwencji nukleotydowych przeprowadzono przy użyciu programu BLAST oraz CLC Sequence Viewer v.6.9.1. (CLC Inc., Aartus, Dania).

PFGE. Analizy polimorfizmu długości restrykcyjnych fragmentów chromosomalnego DNA dokonano przy użyciu endonukleazy XbaI (Fermentas Life Science) oraz aparatu CHEF DR II (Biorad, USA) zgodnie z warunkami opisanymi uprzednio (24). Analizę stopnia podobieństwa uzyskanych genotypów PFGE prowadzono przy użyciu oprogramowania komputerowego BioNumerics Software v. 6.6 firmy Applied Maths (Belgia) stosując algorytm klasteryzacji UPGMA (*ang. unweighted pair group method with arithmetic mean*) oraz współczynnik podobieństwa Dice'a (zastosowano współczynnik optymalizacji 1,5% i współczynnik tolerancji 1,5%).

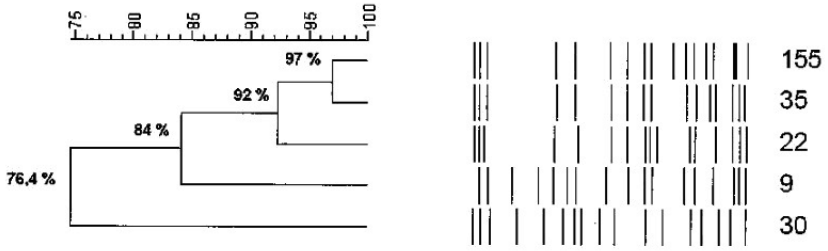
WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Pałeczki *K. pneumoniae* są jednym z najczęściej izolowanych czynników zakażeń szpitalnych zarówno wśród dorosłych, jak i dzieci. Infekcje przez nie wywoływane stanowią istotny problem terapeutyczny, co jest ściśle związane z narastającą opornością tych drobnoustrojów na różne grupy leków przeciwbakteryjnych. Co więcej, powszechne stosowanie antybiotyków doprowadziło do pojawienia się szczepów kumulujących mechanizmy warunkujące oporność na różne grupy antybiotyków, tzw. szczepów MDR (*ang. multidrug resistant*). Aktualnie szczepy takie stanowią problem o zasięgu globalnym (7).

Większość genów warunkujących oporność na klinicznie istotne grupy antybiotyków, występuje na ruchomych elementach genetycznych, co umożliwia ich szerokie rozprzestrzenianie się wśród szczepów zarówno tego samego gatunku, jak i pomiędzy gatunkami. W ostatnich latach obserwuje się wzrost znaczenia nabytych β-laktamaz typu AmpC (pAmpC) (12, 16, 19, 15, 26). Ze względu na swe szerokie spektrum substratowe (podobne jak w przypadku ESBL), enzymy typu AmpC odgrywają szczególne znaczenie zwłaszcza wśród gatunków, które nie posiadają chromosomalnie kodowanych cefalosporynaz (12).

Pomimo, że wśród *Enterobacteriaceae* nabyte β-laktamazy pAmpC wykrywane są na całym świecie, to nie są one jednak tak powszechne jak ESBL (2, 12). Jak wskazują wyniki badań przeprowadzonych przez *Mata* i wsp. (16), w Hiszpanii, na przestrzeni lat częstość występowania pałeczek *Enterobacteriaceae* wytwarzających nabyte AmpC wzrosła ponad dwudziestokrotnie z 0,06% w roku 1999 do 1,3% w roku 2007. W Irlandii, *Roche* i wsp. (26) określił częstość występowania pAmpC wśród izolatów *K. pneumoniae* na poziomie 3%. Natomiast w Korei Południowej, *Park* i wsp. (19) stwierdzili, że częstość występowania nabytych cefalosporynaz pAmpC u *K. pneumoniae* występuje na poziomie 7,2%.

W prezentowanych badaniach wytwarzanie pAmpC potwierdzono zarówno fenotypowo, jak i genotypowo u 5 izolatów *K. pneumoniae* (Tabela I), co stanowi 5% łącznej liczby izolatów (n=100) tego gatunku zebranych w trakcie badania prospektywnego w trzech szpitalach (dane niepublikowane). Ponieważ liczba izolatów ze stwierdzonym mechanizmem pAmpC jest niska a jednocześnie wskazuje ona na wysoki szacunkowy udział (5%) pAmpC w całkowitej populacji *K. pneumoniae* dlatego obiektywna ocena tego zjawiska w kraju wymaga zbadania większej liczby szczepów.



Rycina 2. Dendrogram genetycznego podobieństwa badanych izolatów *K. pneumoniae* wytwarzających nabyte AmpC różnicowanych metodą PFGE.

Pałeczki *K. pneumoniae* stanowiące przedmiot naszych badań wytwarzały β-laktamazę pAmpC należącą do rodziny DHA. Uzyskane wyniki są zgodne z obserwacjami innych autorów (3, 6, 18, 19, 29) według których geny bla_{DHA} są jednymi z najczęściej występujących determinant pAmpC u *K. pneumoniae*.

Jak dotąd, w ogólnodostępnej bazie danych zamieszonej na stronie Lahey Clinic (http://www.lahey.org/other.asp#table1) zamieszczono 23 warianty sekwencji genu DHA. Wariantem najczęściej stwierdzanym u *K. pneumoniae* jest DHA-1 (6, 15, 18, 30, 31). W naszych badaniach dominującym wariantem okazał się DHA-7 stwierdzony u 4 z 5 badanych izolatów. Wariant DHA-7 (sekwencja odniesienia: GenBank accession no. HQ456945) różni się od DHA-1 (sekwencja odniesienia: GenBank accession no. Y16410) jedną substytucją Phe340→Ser (F340S). W przypadku jednego izolatu oznaczonego nr. 30 (Tabela I, Rycina 1) nie udało się określić wariantu z zastosowanymi starterami. Szczep ten poddany zostanie dalszym badaniom.

Zgodnie z naszą wiedzą, niniejsza praca stanowi pierwsze doniesienie wskazujące na występowanie DHA-7 u pałeczek *K. pneumoniae*. Jak dotąd, obecność tego wariantu stwierdzono w genomie *E. cloacae* (18).

W prezentowanych badaniach wszystkie badane izolaty *K.* pneumoniae wytwarzające nabytą β-laktamazę AmpC posiadały również ESBL z rodziny CTX-M. Współwystępowanie tych dwóch mechanizmów oporności było obserwowane przez wielu autorów (17, 9, 11, 30). Aktualnie znanych jest kilkaset enzymów o aktywności ESBL (http://www.lahey.org), należących gównie do trzech rodzin – TEM, SHV i CTX-M. W Polsce, podobnie jak i w innych krajach na świecie, do najbardziej rozpowszechnionych należą enzymy z rodziny CTX-M (2, 8). Jeszcze w ubiegłej dekadzie w naszym kraju dominował wariant CTX-M-3, jednak w prezentowanych badaniach, podobnie do obserwacji innych autorów, wszystkie badane izolaty *K. pneumoniae* wytwarzające ESBL typu CTX-M, posiadały gen $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ warunkujący wytwarzanie β-laktamazy CTX-M-15 (Tabela I).

Tabela I. Charakterystyka izolatów *K. pneumoniae* wytwarzających cefalosporynazy AmpC.

Nr izolatu*	**Materiał**	**Testy fenotypowe**												**PCR**		
		ESBL (DDST)	**AmpC**			**MIC[4] (mg/l)**										
			FOX[1] (mm)	**DPT[2]**	**DDST[3]**	AMC	ATM	FOX	CTX	CRO	FEP	NA	CIP	**pAmpC**	**ESBL**	**PMQR**
30	mocz	+	15	−	+	NT	>256	12	>32	>256	24	>256	8	DHA-like	CTX-M-15	*qnr*B6, *aac(6')-Ib-cr*
35	płyn z j. otrzewnej	+	6	−	+	24	>256	>256	>32	>256	32	>256	>24	DHA-7	CTX-M-15	*qnr*B6, *aac(6')-Ib-cr*
155	miniBAL	+	6	+	−	24	>256	>256	>32	192	6	>256	>32	DHA-7	CTX-M-15	*aac(6')-Ib-cr*
9	mocz	+	17	+	+	64	>256	12	>32	>256	16	>256	>32	DHA-7	CTX-M-15	*aac(6')-Ib-cr*
22	wymaz z odleżyny	+	6	+	+	24	NT	>256	12	3	32	>256	>32	DHA-7	CTX-M-15	−

**Klebsiella pneumoniae*; [1]FOX – cefoksytyna (R<19 mm); [2]DPT - test synergizmu; [3]DDST- test synergii dwóch krążków; [4]MIC - minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii; AMC – amoksycylina/kwas klawulanowy; ATM – aztreonam; CTX – cefotaksym; CRO – cefrtiakson; FEP – cefepim; NA – kwas nalidyksowy; CIP – ciprofloksacyna; NT – nie testowano.

Plazmidy zawierające genetyczne determinanty warunkujące wytwarzanie β-laktamaz typu AmpC i ESBL mogą zawierać również geny warunkujące oporność na inne grupy antybiotyków, w tym fluorochinolony (3, 17, 34). Co ciekawe, w prezentowanych badaniach 4 z 5 izolatów wytwarzających DHA i CTX-M-15 posiadały wariant acetylotransferazy aminoglikozydowej - AAC(6')-Ib-cr, który jest związany także z obniżoną wrażliwością na hydrofilowe fluorochinolony tj. ciprofloksacynę i norfloksacynę. Ponadto, u dwóch izolatów (nr 30 i 35) wykryto dodatkowo obecność innego, plazmidowo kodowanego mechanizmu oporności na fluorochinolony (PMQR) tzn. QnrB6. Podobne współwystępowanie determinant oporności w swoich badaniach stwierdzili *Compain* i wsp. (3), który w genomie *K. pneumoniae* wykrył geny $bla_{\text{DHA-1}}$, $bla_{\text{CTX-M-15}}$ i *qnrB4*. Natomiast *Yang* i wsp. (34) potwierdzili obecność zarówno genów: $bla_{\text{DHA-1}}$, $bla_{\text{CTX-M-14}}$, $bla_{\text{TEM-1}}$, *qnrB4* jak i *aac(6')-Ib-cr*. Według danych piśmiennictwa (13, 17, 24, 27) spośród PMQR opisywanych u *Enterobacteriaceae* zarówno gen *qnrB*, jak i *aac(6')-Ib-cr* należą do najbardziej rozpowszechnionych, co potwierdziły także nasze wcześniejsze badania (24). U badanych izolatów nie stwierdzono innych genów warunkujących mechanizm oporności typu PMQR takich jak: *qnr*A, *qnr*S oraz *qepA*.

Profil lekooporności badanych izolatów *K. pneumoniae* przedstawiono w tabeli 1. Charakteryzowały się one wysokimi wartościami MIC zarówno antybiotyków β-laktamowych, jak i fluorochinolonów.

Analiza profili genetycznych XbaI-PFGE przeprowadzona u badanych izolatów *K. pneumoniae* wytwarzających pAmpC wykazała, że ich podobieństwo genetyczne mieściło się w zakresie od 76 % do 97 % (Rycina 2). Najwyższy stopień podobieństwa (97%) stwierdzono pomiędzy izolatami nr 35 i 155, co mogłoby wskazywać na ich wzajemne powiązanie epidemiologiczne. Jednakże, izolaty te wyosobniono od dwóch pacjentów przebywających w dwóch różnych szpitalach. Wynik ten mógłby wskazywać na potencjalne szerzenie się klonu epidemicznego pomiędzy szpitalami, jednak takie stwierdzenie wymagałoby zbadania szczepów *K. pneumonie* wyosobnionych w tym samym przedziale czasowym w większej liczbie szpitali.

PODSUMOWANIE

Po raz pierwszy zaobserwowano mechanizm AmpC typu DHA-7 u *Klebsiella pneumoniae*, co potwierdza wyjątkową zdolność tego gatunku pałeczek *Enterobacteriaceae* do nabywania nowych mechanizmów oporności. Co więcej, współwystępowanie mechanizmów oporności AmpC wraz z ESBL znacząco ogranicza możliwe opcje terapeutyczne z użyciem antybiotyków β-laktamowych. Jednocześnie, fakt obecności mechanizmów PMQR u badanych izolatów wskazuje na proces dostosowawczy tych drobnoustrojów do presji selekcyjnej wynikającej z powszechnego stosowania fluorochinolonów. Łącznie zebrane wyniki pokazują, że pałeczki *K. pneumoniae* zdolne do wytwarzania nabytych mechanizmów oporności typu AmpC przejawiają właściwości adaptacyjne typowe dla endemicznych szczepów szpitalnych, o czym świadczy kumulacja lokalnie rozpowszechnionych mechanizmów oporności na dwie grupy antybiotyków najczęściej stosowane w terapii.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują prof. Markowi Gniadkowskiemu i dr Annie Baraniak z Narodowego Instytutu Leków w Warszawie za udostępnienie szczepów: *K. pneumoniae* 2102/06 (DHA-1) i *P. mirabilis* 1662/00 (CMY-15), które posłużyły jako dodatnie kontrole w testach fenotypowych oraz w reakcji PCR.

Część wyników została opublikowana w postaci doniesienia zjazdowego na XXVIII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Bydgoszcz 25 –27. 09. 2016, w ramach realizacji zadania statutowego NIZP-PZH nr.: 5/EMMŁ/2014 i 3/EM/2016.

Badania wykonane w ramach zadania statutowego NIZP-PZH nr.: 5/EMMŁ/2014 i 3/EM/2016.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bush K*. Alarming β-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae.* Curr Opin Microbiol 2010; 13: 558-64.
2. *Baraniak A, Izdebski R, Fiett J* i inni. Comparative population analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum β-Lactamases colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57: 1992-7.
3. *Compain F, Decré D, Fulgencio JP* i inni. Molecular characterization of DHA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates collected during a 4-year period in an intensive care unit. Diagn Microbiol Infect Dis 2014; 80: 159-61.
4. *Coudron PE, Moland ES, Thomson KS*. Occurrence and detection of AmpC β-lactamase among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a Veterans' Medical Center. J Clin Microbiol 2000; 38: 1791-6.
5. *Coudron PE*. Inhibitor-basted methods for detection of plasmid-mediated AmpC β-lactamase in *Klepsiella* spp., *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. J Clin Microbiol 2005; 43: 4163-7.
6. *Ding H, Yang Y, Lu Q* i inni. The prevalence of plasmid-mediated AmpC β-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from five children's hospitals in China. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008; 27: 915-21.
7. *EARS-Net Annual Reports.* Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (www.ecdc.europa.eu).
8. *Empel J, Baraniak A, Literacka E* i inni. Beta-PL Study Group: Molecular survey of beta-lactamases conferring resistance to newer beta-lactams in *Enterobacteriaceae* isolates from Polish hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(7):2449-54.
9. *Gharout-Sait A, Touati A, Guillard T* i inni. Molecular characterization and epidemiology of cefoxitin resistance among *Enteroba- cteriaceae* lacking inducible chromosomal *ampC* genes from hospitalized and non-hospitalized patients in Algeria: description of new sequence type in *Klebsiella pneumoniae* isolates. Braz J Infect Dis 2015; 19: 187-95.
10. *Gierczyński, R, Szych J, Cieślik A* i inni. The occurrence of the first two CTX-M-3 and TEM-1 producing isolates of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg in Poland. 2003. Int J Antimicrob Agents 2003; 21**:** 497-49.
11. *Han C, Yang Y, Wang M* i inni. The prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among clinical isolates of ESBL or AmpC-producing *Escherichia coli* from Chinese pediatric patients. Microbiol Immunol 2010; 54: 123-8.
12. *Jacoby GA*. AmpC β-lactamases. Clin Microbiol Rev 2009; 22: 161-82.

13. *Jiang Y, Zhou Z, Qian Y* i inni. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6')-Ib-cr in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. J Antimicrob Chemother 2008; 61: 1003-6.
14. *Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A*. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 1988; 10: 867-78.
15. *Luk S, Wong WK, Ho AY* i inni. Clinical features and molecular epidemiology of plasmid-mediated DHA-type AmpC β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* blood culture isolates, Hong Kong. J Glob Antimicrob Resist 2016; 7: 37-42.
16. *Mata C*, *Miró E*, *Riviera A* i inni. Prevalence of acquired AmpC β-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal *amp*C genes at a Spanish hospital from 1999 to 2007. Clin Microbiol Infect 2010; 16: 472 – 6.
17. *Mata C, Miró E, Toleman M, Rivera MA* i inni. Association of bla(DHA-1) and *qnr*B genes carried by broad-host-range plasmids among isolates of *Enterobacteriaceae* at a Spanish hospital. Clin Microbiol Infect 2011; 17: 1514-7.
18. *Miró E , Agüero J*, *Larrosa MN* i inni. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC β-lactamases and carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates from 35 hospitals in Spain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2013; 32: 253-9.
19. *Park MJ, Kim TK, Song W* i inni. An increase in the clinical isolation of acquired AmpC β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Korea from 2007 to 2010. Ann Lab Med 2013; 33: 353-5.
20. *Pérez-Pèrez FJ, Hanson ND*. Detection of plasmid-mediated AmpC β-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol 2002; 40: 2153-62.
21. *Philippon A, Arlet G, Jacoby GA*. Plasmid-determined AmpC-type β-lactameses. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1-11.
22. *Piekarska K, Rzeczkowska M, Zacharczuk K* i inni. Występowanie genów *qnr* u niewrażliwych na fluorochinolony pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* izolowanych z materiału klinicznego. Med Dośw Mikrobiol 2012; 64: 211-9.
23. *Piekarska K, Rzeczkowska M, Chróst A* i inni. Występowanie i charakterystyka genu acc(6')-Ib-cr kodującego enzym modyfikujący fluorochinolony u opornych na ciprofloksacynę szczepów *Enterobacteriaceae* wyizolowanych od ludzi. *Med Dośw Mikrobiol* 2013; 65: 39 - 46.
24. *Piekarska K, Wołkowicz T, Zacharczuk K* i inni. Co-existence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and mutations in gyrA and parC among fluoroquinolone-resistant clinical *Enterobacteriaceae* isolated in a tertiary hospital in Warsaw, Poland. Int J Antimicrob Agents 2015; 45: 238-43.
25. *Poirel L, Cattoir V, Nordmann P*. Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinical significant problem? *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 295-7.
26. *Roche C, Boo TW, Walsh F, Crowley B*. Detection and molecular characterisation of plasmidic AmpC b-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary-care hospital in Dublin, Ireland. Clin Microbiol Infect 2008; 14: 616–8.
27. *Rodríguez-Martínez JM, Machuca J, Cano ME* i inni. Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. Drug Resist Updat 2016; 29: 13-29.

28. *Rzeczkowska M, Piekarska K, Gierczyński R.* Charakterystyka opornych na fluorochinolony izolatów z gatunku *K. pneumoniae, P. mirabilit* i *E. coli* wytwarzających β – laktamazy typu ESBL i AmpC. Med Dosw Mikrobiol 2012; 64: 285-95.
29. *Shi WF, Zhou J, Qin JP.* Transconjugation and genotyping of the plasmid-mediated AmpC beta-lactamase and extended-spectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae*. Chin Med J 2009; 122: 1092-6.
30. *Seo MR, Park YS, Pai H.* Characteristics of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum cephalosporin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Korea. Chemotherapy 2010; 56: 46-53.
31. *Singtohin S, Chanawong A, Lulitanond A* i inni. CMY-2, CMY-8b, and DHA-1 plasmid-mediated AmpC β-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from a university hospital, Thailand. Diagn Microbiol Infect Dis 2010; 68: 271-7.
32. *Tan TY, Ng LSY, He J* i inni. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae,* and *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 146-9.
33. *Thomson KS*. Extender-spectrum-β-lactamase, AmpC and carbapenemase issues. J Clin Microbiol 2010; 48: 1019-25.
34. *Yang H, Chen H, Yang Q, Chen M* i inni. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes qnr and aac(6')-Ib-cr in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from nine teaching hospitals in China. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 4268-73.

Otrzymano: 26 VI 2017 r.
Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie