

Mechanizmy oporności na antybiotyki β -laktamowe *Haemophilus influenzae* w świetle rekomendacji EUCAST

Marlena Kiedrowska

Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków

WPROWADZENIE

Haemophilus influenzae to Gram-ujemne ziarniako-pałeczki, wywołujące przede wszystkim zakażenia układu oddechowego takie jak ostre zapalenie ucha środkowego, ostre zapalenie błony śluzowej nosa i zatok przynosowych, zapalenie nagłośni (bardzo rzadkie po wprowadzeniu szczepionki przeciwko Hib), zaostrzenia POChP (wiodąca etiologia bakteryjna). Stanowi także etiologię innych ciężkich zakażeń jak zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, sepsa, zapalenie stawów oraz zakażenia skóry i tkanek miękkich.

Szczepki *H. influenzae* zazwyczaj kolonizują błonę śluzową nosogardzieli, skąd mogą się rozprzestrzeniać i zasiedlać okoliczne tkanki. Po przedostaniu do krwi mogą przenikać do różnych narządów i wywoływać tzw. zakażenia inwazyjne. W populacji ogólnej częstość kolonizacji wynosi 20-80%, a grupą o najwyższym stopniu kolonizacji są małe dzieci (1). Kolonizacja w tej grupie ma charakter dynamiczny, ze zmieniającymi

się szczepami (zarówno bezotoczkowymi jak i otoczkowymi), natomiast u dorosłych nosicieli stwierdza się najczęściej jeden rodzaj szczepów, zwykle bezotoczkowych. Wyłącznym źródłem zakażenia jest człowiek, przy czym może to być zarówno chory jak i bezobjawowy nosiciel.

W leczeniu zakażeń wywoływanych przez *H. influenzae* najistotniejszą rolę odgrywają antybiotyki β -laktamowe. Powszechnie stosowana od wczesnych lat 60. ampicylina zrewolucjonizowała leczenie zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych oraz innych poważnych zakażeń (2,3). Wraz z obserwowanym od lat 70-tych ubiegłego wieku rozwojem oporności na aminopenicyliny, związanej głównie z wytwarzaniem β -laktamaz, w leczeniu zakażeń *H. influenzae* coraz powszechniej zaczęto stosować cefalosporyny.

Większość cefalosporyn (za wyjątkiem I generacji) ma w swoim spektrum działania izolaty *H. influenzae*. Cefalosporyny II generacji nie powinny być stosowane w ciężkich zakażeniach

natomiast cefalosporyny III generacji (zwłaszcza cefotaksym i ceftriakson) wykazują bardzo silne działanie bakteriobójcze na pałeczki hemofilne i dobrze penetrują do ośrodkowego układu nerwowego (4). Ostatnio wprowadzona ceftarolina – przedstawiciel V generacji cefalosporyn – została zatwierdzona przez Europejską Agencję Leków do leczenia pozaszpitalnych zapaleń płuc o etiologii *H. influenzae* u dorosłych (5). Inne opcje leczenia antybiotykami β -laktamowymi obejmują penicyliny w połączeniu z inhibitorami β -laktamaz (np. amoksycylina z kwasem klawulanowym) oraz karbapenemy. Oporność na antybiotyki β -laktamowe systematycznie narasta w związku z coraz szerszą obecnością szczepów wytwarzających β -laktamazy i pojawieniem się nowego mechanizmu oporności polegającego na zmianach w genie *ftsI*, kodującym białko wiążące penicylinę (PBP3; penicillin-binding protein 3).

MECHANIZMY OPORNOŚCI NA ANTYBIOTYKI β -LAKTAMOWE

1. Wytwarzanie β -laktamaz

Pierwszym opisanym mechanizmem oporności było wytwarzanie β -laktamaz (6,7). Inaktywują one antybiotyk po jego przejściu przez błonę zewnętrzną, hydrolizując wiązania amidowe w pierścieniu β -laktamowym. Szczepy wytwarzające β -laktamazę określa się jako **BLPAR** (ang. β -Lactamase Positive Ampicillin Resistant). Najczęściej spotykane są β -laktamazy typu TEM i ROB-1, należące do tzw. klasy A, czyli β -laktamaz o szerokim spektrum substratowym. Wobec szczepów BLPAR aktywne pozostają połączenia antybiotyków β -laktamowych z inhibitorami β -laktamaz.

Opisano także pojedyncze przypadki wytwarzania enzymów typu VAT-1, wykazujących aktywność wobec cefalosporyn i inhibitorów β -laktamaz: kwasu klawulanowego, sulbaktamu i tazobaktamu (8). Efekt działania β -laktamaz zależy od ilości wytwarzanego enzymu, jego aktywności i powinowactwa do określonego antybiotyku.

2. Zmiany w białkach PBP3

Inny mechanizm oporności na antybiotyki β -laktamowe związany jest ze zmianami w strukturze białka wiążącego penicy-

linę PBP3, które mogą prowadzić do zmniejszenia lub utraty powinowactwa do antybiotyków β -laktamowych. Odpowiadają za to mutacje w domenie transpeptydazy genu *ftsI*. Zmiany w sekwencjach aminokwasowych w pobliżu lub w obrębie istotnych funkcjonalnie domen (KTG, SSN, STVK) mogą zaburzać przestrzenną strukturę centrum aktywnego białek PBP. Ponadto fragmenty genu *ftsI* mogą być przekazywane między różnymi gatunkami rodzaju *Haemophilus* na drodze horyzontalnego transferu genów.

Szczepy ze zmienionymi PBP3 określa się mianem **BLNAR** (ang. B-Lactamase Negative Ampicillin Resistant). W zależności od liczby i rodzaju wykrytych mutacji w genie *ftsI*, w obrębie kategorii BLNAR wyróżniane są różne podkategorie (9, 10, 11, 12). Przykładowo, w zależności od poziomu oporności na ampicylinę identyfikuje się tzw. szczepy low- oraz high-BLNAR (13).

Nie obserwuje się globalnego rozpowszechnienia szczepów BLNAR, natomiast w krajach takich jak np. Japonia czy Korea Południowa odnotowuje się ich dużo częstszą obecność. Na poziomie światowym ich udział w zakażeniach może być jednak niedoszacowany, ze względu na trudności z ich wykrywaniem w rutynowo stosowanych procedurach mikrobiologicznych.

3. Wytwarzanie β -laktamaz wraz ze zmianami w PBP3

Poza izolatami z pojedynczymi mechanizmami oporności niekiedy można mieć do czynienia z kombinacjami różnych mechanizmów. Do ich powstawania może dochodzić w drodze nabywania przez szczep o zmienionym PBP3 genu kodującego β -laktamazę. Takie szczepy definiuje się jako tzw. **BLPACR** (ang. β -Lactamase Positive Amoxicillin/Clavulanate Resistant).

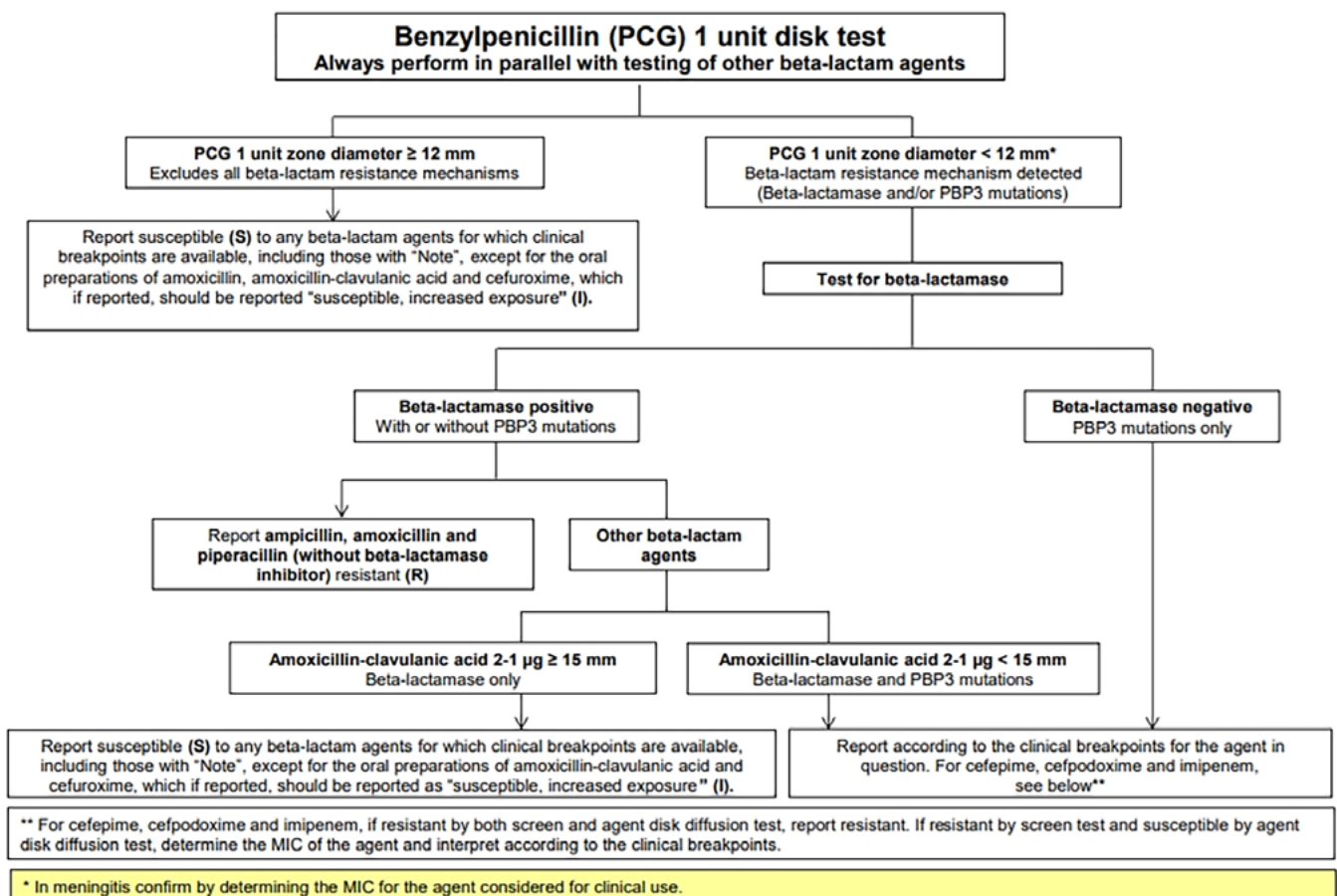
H. influenzae – trudności klasyfikacyjne

Aktualne rekomendacje EUCAST nie wyszczególniają fenotypowych kategorii BLNAR, BLPAR i BLPACR do określania szczepów *H. influenzae*. Wciąż jednak funkcjonują one w literaturze naukowej i wydają się użyteczne zwłaszcza z epidemiologicznego punktu widzenia. Jednak ich przydatność dla praktyki klinicznej jest ograniczona między innymi ze względu na dość powszechne rozbieżności pomiędzy fenotypem a genotypem szczepów. W Europie większość szczepów identyfikowanych jako BLNAR (tzn. ze zmianami w genie *ftsI* potwierdzonymi

sekwencjonowaniem) to tzw. szczepy low-BLNAR, o niskiej oporności, często w zakresie pełnej wrażliwości klinicznej na ampicylinę. Podobna sytuacja dotyczy kategorii BLPACR, gdzie – wbrew nazwie – nie stwierdza się oporności na amoksycylinę z kwasem klawulanowym. Dlatego poruszanie się w powyższej terminologii staje się coraz bardziej kłopotliwe. Identyfikowane są kolejne mutacje, a same definicje są przez różnych autorów stosowane niekonsekwentnie lub też ich znaczenie bywa każdorazowo modyfikowane, co utrudnia odnoszenie się do prac wcześniejszych. Ponadto, ustalone wartości graniczne dla aminopenicylin zmieniają się na przestrzeni lat i wciąż słabo oddzielają szczepy „dzikie” (bez nabytych mechanizmów oporności) od szczepów ze zmienionym białkiem PBP3. Trzeba mieć także świadomość, że powyższe mechanizmy nie są jedynymi możliwymi i szczepy zaklasyfikowane do tej samej grupy (tzn. posiadające te same zmiany w *ftsI*) mogą w rzeczywistości mieć różne profile wrażliwości i poziomy MIC (ang. minimal inhibitory concentration – minimalne stężenie hamujące). Przyczyną

mogą być rzadsze (np. pompy oporności wielolekowej AcrAB/ToIC) lub jeszcze nieznane mechanizmy oporności (14).

Na przestrzeni lat, dla ułatwienia wykrywania mechanizmów oporności *H. influenzae* na antybiotyki β-laktamowe, proponowano stosowanie różnych testów fenotypowych, najczęściej z wykorzystaniem krążków antybiotykowych. W świetle wytycznych EUCAST do wykrywania mechanizmów oporności rekomenduje się obecnie krążek z penicyliną benzylową (P 1U), a do fenotypowego odróżnienia szczepów produkujących β-laktamazę jako jedyny mechanizm oporności od szczepów z obydwoma mechanizmami oporności dodatkowo krążek z amoksycyliną i kwasem klawulanowym (2-1 μg). Powyższe testy wykonuje się równolegle z oznaczaniem wrażliwości szczepu na inne antybiotyki β-laktamowe (aminopenicyliny i ich połączenia z inhibitorami, cefalosporyny, karbapenemy). Obowiązujący algorytm wykrywania mechanizmów oporności na antybiotyki β-laktamowe przedstawiono na Rycinie 1, poniżej (15).



Ryc. 1. Wykrywanie oporności na antybiotyki β-laktamowe *H. influenzae*, EUCAST 2021

PODSUMOWANIE

Z uwagi na powszechnie narastającą oporność na antybiotyki, ważne jest stałe monitorowanie lekooporności *H. influenzae* oraz badanie mechanizmów leżących u jej podstaw. Dlatego z epidemiologicznego punktu widzenia posługiwanie się kategoriami BLPAR, BLNAR i BLPACR jest uzasadnione. Natomiast w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej przydatność praktyczna tych definicji wydaje się być mniej znacząca a stosowanie aktualnych wytycznych EUCAST wystarczające.

PIŚMIENNICTWO:

1. Mukundan D, Ecevit Z, Patel M, Marrs CF, Gilsdorf JR. Pharyngeal colonization dynamics of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* in healthy adult carriers. J Clin Microbiol. 2007;45(10):3207-3217.
2. Nelson JD: Should ampicillin be abandoned for treatment of *Haemophilus influenzae* disease? JAMA 1974, 229: 322-324.
3. Shackelford PG, Bobinski JE, Feigin RD, Cherry JD: Therapy of *Haemophilus influenzae* Meningitis Reconsidered. N Engl J Med 1972, 287: 634-638.
4. Barriere SL, Flaherty JF: Third-generation cephalosporins: a critical evaluation. Clin Pharm 1984, 3:351-373.
5. Ceftarolina - Charakterystyka Produktu Leczniczego. www.ema.europa.eu
6. Thornsberry C, Kirven LA: Ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* as determined by a rapid test for beta-lactamase production. Antimicrob Agents Chemother 1974, 6: 653-654.
7. Thornsberry C, Kirven LA: Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 1974, 6: 620-624.
8. Dhar R., Wilson S. et al.: Present Status of Antimicrobial Susceptibility of *Haemophilus influenzae* isolates in Kuwait as Determined by E-Tes Med Principles Pract 2001; 10:123-128.
9. Dabernat H, Delmas C: Epidemiology and evolution of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae* in children 5 years of age or less in France, 2001-2008: a retrospective database analysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012, 31: 2745-2753.
10. Hasegawa K, Chiba N, Kobayashi R, Murayama SY, Iwata S, Sunakawa K et al.: Rapidly increasing prevalence of beta-lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b in patients with meningitis. Antimicrob Agents Chemother 2004, 48: 1509-1514.
11. Osaki Y, Sanbongi Y, Ishikawa M, Kataoka H, Suzuki T, Maeda K et al.: Genetic approach to study the relationship between penicillin-binding protein 3 mutations and *Haemophilus influenzae* beta-lactam resistance by using site-directed mutagenesis and gene recombinants. Antimicrob Agents Chemother 2005, 49: 2834-2839.
12. Garcia-Cobos S, Campos J, Lazaro E, Roman F, Cercenado E, Garcia-Rey C et al.: Ampicillin-resistant non-beta-lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. Antimicrob Agents Chemother 2007;51: 2564-2573.
13. Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. Clin Microbiol Rev. 2007; 20(2):368-389.
14. Kaczmarek FS, Gootz TD, Dib-Hajj F, Shang W, Hallowell S, Cronan M. Genetic and molecular characterization of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(5):1630-1639.
15. Tabele wartości granicznych EUCAST: wersja 11.0, obowiązująca od 01.01.2021