

JOANNA POTRYKUS

Katedra Biologii Molekularnej,

Uniwersytet Gdański

Kładki 24, 80-822 Gdańsk

e-mail: jpotryku@biotech.univ.gda.pl

OPORNOŚĆ NA ANTYBIOTYKI ZWIĄZANA Z GENAMI OBECNYMI NA PLAZMIDACH

WSTĘP

Nasilające się ostatnio zjawisko antybiotykooporności bakterii jest problemem złożonym, niewątpliwie niepokojącym pod względem medycznym. Tempo pojawiania się szczepów opornych wynika przede wszystkim z tego, iż w przyrodzie rzadko mamy do czynienia z zasiedleniem określonej niszy ekologicznej przez tylko jeden rodzaj mikroorganizmów. Znacznie częściej tworzą one dynamicznie rozwijające się mikrokosmosy, współpracując ze sobą, bądź współzawodnicząc, np. o dostęp do czynników wzrostowych (SALYERS i AMÁBILE-CUEVAS 1997). Nieuchronnie dochodzi do wymiany materiału genetycznego. Ponieważ przenoszeniu ulegają zarówno fragmenty chromosomu, jak i plazmidy, przekazywane są także geny oporności na antybiotyki (SÉVENO i współaut. 2002). Umożliwia to drobnoustrojom stosunkowo proste czerpanie z puli „ogólnodostępnych” determinant opornościowych, szybkie dostosowanie się do wymogów otoczenia i eliminację długotrwałego procesu wykształcenia przydatnego mechanizmu *de novo*. Najnowsze doniesienia wskazują, iż praktycznie nie ma granic dla przepływu informacji genetycznej – odbywa się on pomiędzy gatunkami, rzędami, bakteriami Gram-dodatni-

mi a Gram-ujemnym, m. in. dzięki mobilnym elementom genetycznym – plazmidom i transpozonom koniugacyjnym (OCHMAN i współaut. 2000). Ponadto, wyrażanie mechanizmów oporności może być również związane z ekspresją genów chromosomalnych, genów nabytych na drodze koniugacji bądź ubocznym efektem aktywacji genów pełniących nie zawsze jeszcze zdefiniowane przez badaczy funkcje (RECCHIA i HALL 1997).

Celem niniejszej pracy było przybliżenie Czytelnikowi złożoności zagadnienia antybiotykooporności bakterii, ze szczególnym uwzględnieniem oporności wynikającej z ekspresji genów niesionych na plazmidach. Poruszonych zostało wiele kwestii, zarówno aspekt epidemiologiczny, poprzez charakterystykę głównych mechanizmów oporności, omówienie ewolucji, rezerwuarów i przekazywania genów oporności, jak również alternatyw antybiotykoterapii i perspektyw ograniczenia skali problemu. Ze względu na obszerność zagadnienia, niektóre tematy zostały tylko zasygnalizowane, zaznaczone. Odnosiłki literaturowe odsyłają Czytelnika do aktualnych opracowań przeglądowych i powinny być pomocne w dokładniejszym zgłębieniu tematu.

EPIDEMIOLOGIA ANTYBIOTYKOOPORNOŚCI

Oporność mikroorganizmów na antybiotyki nie jest zjawiskiem nowym – odporne szcze-

py odnotowywano już ponad 50 lat temu, po wprowadzeniu do powszechnego użycia

pierwszego antybiotyku – penicyliny, jednakże w ciągu ostatnich kilkunastu lat obserwuje się jego wyraźne nasilenie (COHEN 1992). Za główny powód wzrostu oporności uważa się nadmierną i często nieuzasadnioną konsumpcję antybiotyków (SÉVENO i współaut. 2002, GOULD 1999). Obserwuje się zależność pomiędzy rodzajem regionalnie stosowanych antybiotyków a geograficzną dystrybucją szczepów opornych. Co istotne, sprawcami groźnych dla życia infekcji nie są już tylko „typowe” patogeny, ale także szczepy oportunistyczne, dotychczas o niewielkim znaczeniu klinicznym. W szpitalach np. najwięcej przypadków śmiertelnych jest spowodowanych infekcjami dróg moczowych i zapaleniem płuc nabytym w warunkach szpitalnych (tzn. w 48 godzin od przyjęcia na oddział), gdzie czynnikiem etiologicznym są m. in. bakterie z gatunków *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Pseudomonas* (VETTER i HAUER 2002). Duże zagrożenie stanowią też szczepy wieloopornego gronkowca złocistego, *Staphylococcus aureus*, nie tylko niewrażliwego na metycylinę (ang. methicillin resistant *S. aureus*, MRSA), ale również o obniżonej wrażliwości na antybiotyki glikopeptydowe (ang. glycopeptide-intermediate *S. aureus*, GISA) i wankomycynę (ang. vancomycin-intermediate *S. aureus*, VISA). Problemem stają się enterokoki, odpowiedzialne za 10% zakażeń szpitalnych, oporne m.in. na wankomycynę (ang. vancomycin resistant enterococci, VRE) (WITTE 1999).

Wbrew pozorom, odpowiedź na pytanie kto w największym stopniu przyczynił się do nadużycia antybiotyków nie jest prosta, gdyż oprócz lekarzy wypisujących recepty, pod uwagę trzeba brać też pacjentów często nalegających na przepisanie im antybiotyku. Podkreśla się, iż znaczący wpływ na spadek skuteczności antybiotyków może mieć niestosowanie się pacjenta do zaleceń lekarza (FINCH 1998). Antybiotykoterapia jest najczęściej zabiegiem parodniowym, wymagającym pewnej wewnętrznej dyscypliny (np. regularnego przyjmowania dawek leku w określonych odstępach czasowych). Samowolne przerywanie jej po ustąpieniu objawów chorobowych (np. obniżeniu temperatury) zdarza się nieoczekiwanie często (LECRLERCQ 2001). Tymczasem, subinhibitorowe stężenie leku w organizmie może, po pierwsze, wywrzeć efekt bakteriostatyczny a nie bakteriobójczy, a ponadto stwarza warunki sprzyjające wykształceniu, nabyciu, mechanizmu oporności (GOULD 1999).

Zbyt szybko przyzwyczailiśmy się, iż antybiotyki to leki uniwersalne, dzięki którym możemy zwalczać wszelkie choroby. Tak nie jest i mimo, iż zestaw stosowanych antybiotyków znacznie się poszerzył od czasów wprowadzenia penicyliny (jest ich ponad 160), coraz częściej jesteśmy bezradni wobec braku ich skuteczności (NEU 1992). Niewłaściwa diagnoza, zamiast do wyleczenia, przyczynia się to selekcji bakterii antybiotykoopornych. Znamienym przykładem nadużycia są wirusowe infekcje dróg oddechowych, błędnie diagnozowane jako bakteryjne. Oszacowano (Raport Światowej Organizacji Zdrowia, ang. World Health Organization, 2000), iż przepisywanie antybiotyku było zasadne tylko w 20% analizowanych przypadków! Nieuzasadnione stosowanie antybiotyków może prowadzić nie tylko do powikłań na tle pokarmowym, ale nie jest też obojętne naturalnej florze bakteryjnej (SAYLERS i AMÁBILE-CUEVAS 1997). Może np. wpływać na wykształcenie mechanizmów oporności wśród bakterii saprofitycznych, co może mieć niebezpieczne implikacje w kontekście rezerwuaru genów oporności (patrz poniżej).

Nierozstrzygniętą kwestią pozostaje czy szczepy o podwyższonej oporności są selekcjonowane głównie w środowiskach szpitalnych czy poza nimi. Antybiotyki są przecież stosowane i przepisywane zarówno pacjentom hospitalizowanym, jak i bywalcom przychodni rejonowych. Pojawiają się głosy, iż to szpitale są źródłami oporności, gdyż tam właśnie, np. na oddziałach intensywnej terapii, stosowane są nowinki farmaceutyczne, podczas gdy w przychodniach lekarze najczęściej korzystają z określonego, standardowego zestawu leków (WILLIAMS 2002).

Niektórzy, co również wzbudza kontrowersje, wskazują na nadużycia antybiotyków w hodowli zwierząt i roślin, gdzie stosowane są nie tylko w celach terapeutycznych (promotory wzrostu) (więcej o znaczeniu takich praktyk w rozprzestrzenianiu się mikroorganizmów antybiotykoopornych poniżej).

Sporną kwestią pozostaje selekcja antybiotykoopornych szczepów bakteryjnych wskutek stosowania biocydów (związków takich jak triklosan, chloroheksydyna czy czwartorzędowe związki amonowe), wchodzących w skład powszechnie używanych środków dezynfekcyjnych i czyszczących (FRAISE 2002; GILBERT i współaut. 2002). Niewłaściwe i niechlujne ich stosowanie, np. niedokładne spłukiwanie z powierzchni roboczych po użyciu (w kuchni, na

sali operacyjnej czy w zakładzie przetwórstwa żywności) powodowałoby niezamierzone tworzenie rezerwuarów o obniżonym stężeniu biocydów, co mogłoby prowadzić do selekcji niewrażliwych drobnoustrojów. Biocydy m. in. tym różnią się od antybiotyków, że najczęściej działają na kilka struktur komórkowych jednocześnie, podczas gdy działanie antybiotyków jest pod tym względem bardziej ukierunkowane (POOLE 2002). Często oporność bakterii wynika tu ze zmniejszenia wewnątrzkomórkowej akumulacji szkodliwej substancji, co z kolei związane jest przede wszystkim z syntezą

pomp błonowych (NIKAIDO 1994, POOLE 2002). Zwykle charakteryzują się one szerokim spektrum substratowym, co może przyczyniać się do oporności na antybiotyki. Taką oporność krzyżową, wynikającą z ekspresji genów pomp błonowych, odnotowano m. in. w szczepach *P. stutzeri*, *P. aeruginosa* oraz mutantach *mar Escherichia coli* (MUÑOZ BELLIDO i współaut. 2002). Zaobserwowano ją również w szczepach *S. aureus*, ale nie wydaje się, by (na razie) miała ona implikacje kliniczne (POOLE 2002).

MECHANIZMY OPORNOŚCI

Różnorodność stosowanych antybiotyków pociągnęła za sobą równoległe doskonalenie mechanizmów oporności wykształconych przez drobnoustroje. Zidentyfikowano setki genów niesionych na plazmidach, umożliwiających gospodarzom bakteryjnym przetrwanie w niekorzystnym środowisku, takim jak choćby oddział intensywnej terapii czy jeli to grube pacjenta poddawanego antybiotykoterapii (NEU 1992). Pomimo olbrzymiej liczby determinant genetycznych można wyróżnić trzy podstawowe mechanizmy oporności przez nie warunkowane (DAVIES 1994). Pierwszy, najczęściej spotykany, to synteza enzymu chemicznie modyfikującego antybiotyk. Drugi mechanizm sprowadza się do uniemożliwienia wiązania antybiotyku z miejscem oddziaływania (ang. target). Trzeci polega na aktywnym usuwaniu niezmiennego związku z komórki. Poniżej opisano najbardziej charakterystyczne i istotne pod względem epidemiologicznym przykłady poszczególnych mechanizmów.

Modyfikacja enzymatyczna, której konsekwencją jest unieczynnienie antybiotyku, jest osiągana poprzez jego hydrolizę, bądź poprzez tworzenie jego pochodnej chemicznej (NEU 1992). Najlepiej poznaną klasą enzymów hydrolitycznych są β -laktamazy, katalizujące rozszczepienie czteroramiennego pierścienia β -laktamowego antybiotyków go zawierających (penicyliny, cefalosporyny) (HERITAGE i współaut. 1999). Obecnie znanych jest ponad 190 β -laktamaz, sklasyfikowanych w czterech grupach (A – penicylinazy, B – metalo- β -laktamazy, C – cefalosporynazy, D – oksacylinazy), m. in. w zależności od podobieństwa sekwencji nukleotydowych kodujących je genów (POOLE 2002). Białka te stanowią przykład za-

dziwiającej możliwości przystosowywania mikroorganizmów do zmieniającej się presji selekcyjnej otoczenia – zmiana jednego aminokwasu w łańcuchu polipeptydowym, często wynikająca z mutacji punktowej w genie, powoduje zmianę specyficzności substratowej enzymu (THERRIEN i LEVESQUER 2002). Innym enzymem hydrolitycznym, warunkującym oporność gospodarza, jest hydrolaza chloramfenikolowa. Wydaje się jednak, iż nie ma ona większego znaczenia w kontekście klinicznym (DAVIES 1994).

Wśród enzymów katalizujących modyfikację antybiotyku, bardzo dobrze scharakteryzowaną grupę stanowią acetylotransferazy chloramfenikolowe (CAT). Mimo, iż grupa ta jest dość liczna i nie wydaje się, aby istniał jeden wspólny prototyp białkowy, wszyscy jej przedstawiciele katalizują tę samą reakcję, a mianowicie przeniesienie grupy acetylowej z acetylokoenzymu A na dwie konkretne reszty hydroksylowe cząsteczki antybiotyku (SHAW 1983). Taka modyfikacja powoduje utratę przez chloramfenikol powinowactwa do dużej podjednostki rybosomu, miejsca jego oddziaływania. Co jest dość niezwykle, białko CAT uczestniczy także w dodatkowym, nieenzymatycznym mechanizmie oporności – chroni komórkę bakteryjną przed kwasem fuzydowym, antybiotykiem sterydowym, którego działanie (podobnie do chloramfenikolu) powoduje zahamowanie translacji. Acetylotransferaza sekwestruje antybiotyk bez jego modyfikacji, a więc przyczynia się do oporności na niego niejako mimochodem (MURRAY i współaut. 1995).

β -laktamazy i acetylotransferazy chloramfenikolowe ilustrują wykształcenie się i dominację pojedynczego mechanizmu oporności w

walce z określoną klasą antybiotyków. Enzymy modyfikujące aminoglikozydy, antybiotyki zakłócające przebieg syntezy białek, są grupą bardziej heterogenną (DAVIES 1994). Znane są trzy sposoby chemicznej modyfikacji aminoglikozydów- acetylacja reszty aminowej oraz modyfikacja grupy hydroksylowej wskutek fosforylacji bądź przyłączenia nukleotydu (MINGEOT-LECLERCQ i współaut. 1999). W jednej cząsteczce antybiotyku może być modyfikowanych parę różnych reszt aminowych lub hydroksylowych (POOLE 2002). Najczęściej jeden enzym katalizuje określony typ reakcji, aczkolwiek w niektórych bakteriach Gram-dodatnich stwierdzono występowanie białek o podwójnej aktywności acetylo- i fosfo-transferazy. Budowa domenowa i obecność dwóch centrów katalitycznych sugeruje, iż enzymy te prawdopodobnie powstały na skutek fuzji dwóch genów kodujących, odpowiednio, acetylo- i fosfo-transferazę (MINGEOT-LECLERCQ i współaut. 1999).

Ciekawym zagadnieniem jest oporność wynikająca z modyfikacji docelowego miejsca działania antybiotyku. Może być ona osiągnięta co najmniej w dwojaki sposób – albo poprzez enzymatyczną modyfikację struktury miejsca docelowego, albo poprzez jego wymianę (NEU 1992). Zmieniona struktura nadal pełni swoją fizjologiczną rolę w komórce, jednak nie jest już podatna na działanie substancji antybakteryjnej. W przypadku oporności plazmidowej, w obydwu tych rodzajach modyfikacji zmianie ulegają struktury już obecne w komórce, w odróżnieniu od oporności chromosomalnej, gdy miejsce działania antybiotyku jest nań niewrażliwe z powodu modyfikacji wynikających z mutacji genu chromosomalnego (ROBERTS 2002). Niektóre szczepy *Streptococcus* zawierają plazmidy niosące gen kodujący specyficzną metylotransferazę. Enzym ten modyfikuje określony nukleotyd (adeninę) 23S rRNA (cząsteczki RNA wchodzącej w skład dużej podjednostki rybosomu), będącego miejscem wiązania erytromycyny (MUÑOZ BELLIDO i współaut. 2002). Prowadzi to do utraty powinowactwa antybiotyku do rybosomu, czego konsekwencją jest oporność. Oporność *Enterococcus* na antybiotyki glikopeptydowe warunkowana obecnością genów *vanA* i *vanB* ilustruje drugi z wymienionych powyżej typów modyfikacji. Glikopeptydy są związkami hamującymi syntezę peptydoglikanu, ważnego składnika ściany komórkowej (DAVIES 1994). Zakłócają tę reakcję pośrednio, łącząc się z sub-

stratami enzymów w niej uczestniczących, a nie z samymi enzymami. Wspomniane geny oporności kodują enzymy, które przekształcają resztę D-alaniny na końcu karboksylowym tworzonego łańcucha w resztę D-mleczanową. Taka wymiana jest tolerowana przez enzymy komórkowe zaangażowane w tworzenie peptydoglikanu, podczas gdy zmodyfikowane cząsteczki nie wiążą już glikopeptydów (ARTHUR i współaut. 1996). Innym przykładem jest oporność na trimetoprim, syntetyczny antybiotyk zakłócający syntezę kwasu foliowego poprzez hamowanie reduktazy dihydroksyfoliowej (w skrócie DHFR). Oporne bakterie, zarówno Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne, często niosą na plazmidzie gen kodujący białko DHFR niewrażliwe na działanie trimetoprimu (ROBERTS 2002).

Nieenzymatyczna oporność na antybiotyk najczęściej wynika z syntezy pompy błonowej, aktywnie usuwającej dany związek z komórki. Wśród pomp wyróżnia się białka o wąskim lub szerokim spektrum substratowym, wykorzystujące energię pochodzącą z hydrolizy ATP bądź działające na zasadzie anty- lub sym-portera (NIKAIDO 1994). Białka antyporterowe wypompowują antybiotyk z jednoczesnym wprowadzaniem innej cząsteczki do komórki (np. wymieniając go na jon wodoru), natomiast w drugim przypadku, obydwie cząsteczki są transportowane w tym samym kierunku (NIKAIDO 1994, POOLE 2002). Najlepiej poznаныmi pompami substratowo-specyficznymi są białka Tet, warunkujące oporność na tetracyklinę. Znanych jest kilkadziesiąt genów *tet* kodujących pompy, zidentyfikowano je zarówno w mikroorganizmach Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych (nazwę „*tet*” nadano również genom, których produkty są zaangażowane w inny mechanizm oporności na tetracyklinę) (ROBERTS 1996). Ponieważ pompa zlokalizowana jest w błonie cytoplazmatycznej, w przypadku bakterii Gram-ujemnych posiadających dodatkowo błonę zewnętrzną oznaczałoby to, iż tetracyklina jest wypompowywana do przestrzeni periplazmatycznej, skąd, drogą dyfuzji, mogłaby z powrotem przedostać się do cytoplazmy. Uważa się, iż transport antybiotyku do przestrzeni periplazmatycznej jest procesem zachodzącym efektywniej niż jego bierna dyfuzja, co wystarcza do osiągnięcia antybiotykooporności (THANASSI i współaut. 1995). Oprócz mechanizmów specyficznych, pojawia się coraz więcej doniesień o występowaniu pomp usuwających rozmaite, niezwiązane ze

sobą strukturalnie, związki z komórki (np. antybiotyki β -laktamowe, chloramfenikol, makrolidy) (NIKAIDO 1994, MUÑOZ BELLIDO i współaut. 2002). Z jednej strony, ekspresja takiego niespecyficznego mechanizmu oporności powoduje niebezpieczeństwo, iż arsenał skutecznych środków antybakteryjnych dramatycznie się skurczy, z drugiej jednak, unieczynnienie danej pompy być może pozwoli na zastosowanie dosyć szerokiego wyboru farmaceutyków.

POCHODZENIE PLAZMIDOWYCH GENÓW OPORNOŚCI

Istnieją różne teorie dotyczące pochodzenia i ewolucji genów oporności. Niektórzy postulują, iż są to pochodne naturalnie występujących genów o funkcjach pierwotnie nie związanych z lekoopornością. Ich uaktywnienie (nadekspresja), bądź akumulacja mutacji adaptacyjnych spowodowane presją selekcyjną, prowadziłyby do wybiórczej propagacji organizmów opornych i utrzymywaniu się zaistniałych zmian genotypowych (OCHMAN i współaut. 2002). Przykładem mogą być tu wspomniane mutanty *mar*. Mutacje punktowe w chromosomalnym locus *mar* (ang. multiple antibiotic resistance, szeroka antybiotykooporność) kodującym specyficzny represor, powodują zmianę w regulacji kilkudziesięciu innych loci, m.in. wzmożenie transkrypcji genów kodujących pompy o szerokim spektrum substratowym (POOLE 2002). Innym przykładem jest opisana już reduktaza kwasu dihydrofoliowego, niewrażliwa na działanie trimetoprimu. Po nabyciu korzystnej, pod względem zwiększenia przeżywalności gospodarza, mutacji dalsza presja selekcyjna byłaby motorem do kolejnych zmian, warunkujących jeszcze większą specjalizację (NEU 1992). Wystarczy przypomnieć ponad 190 genów kodujących β -laktamazy, by uzmysłwić sobie bezustanny wyścig pomiędzy postępiem medycyny a zdolnościami adap-

Geny kodujące białka tego typu zidentyfikowano na plazmidach (np. *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella aerogenes*, *S. aureus*), lecz oporność wynikająca z aktywności wielosubstratowej pompy jest często związana też z nadekspresją genów chromosomalnych (np. systemy Mex-Opr *P. aeruginosa*, mutanty *mar* *E. coli* i *Salmonella typhimurium*) (MUÑOZ BELLIDO i współaut. 2002, POOLE 2002).

tacyjnymi drobnoustrojów (THERRIEN i LEVESQUER 2002).

Jest coraz więcej dowodów na to, iż niektóre geny warunkujące oporność wykształciły się na wiele lat przed wprowadzeniem antybiotyków do powszechnego użycia (AMINOV i współaut. 2002). Nie wyklucza się również, iż część genów oporności „krążąca” w przyrodzie wywodzi się pierwotnie z mikroorganizmów syntetyzujących antybiotyki. Obecność w ich genomie determinant oporności byłaby naturalną konsekwencją potrzeby obrony przed własnymi toksycznymi metabolitami (RENSING i współaut. 2002). Późniejsza mobilizacja tych genów (np. poprzez włączenie do integronu, bądź transpozonu, patrz poniżej) umożliwiłaby im zaistnienie w puli „ruchomych” genów i dalszą propagację (BENNETT 1999).

Warto wspomnieć, iż niektórzy jako czynnik napędzający wymianę i przekazywanie materiału genetycznego pomiędzy bakteriami uważają dążenie samych cząsteczek DNA – plazmidów, integronów, transpozonów, do propagacji i „infekcji” komórek dotychczas ich nie posiadających. Jest to teoria tzw. samolubnego DNA (ang. selfish DNA), minimalizująca bezpośrednią zależność pomiędzy selekcyjnymi warunkami środowiskowymi a plastycznością materiału genetycznego bakterii (RENSING i współaut. 2002).

REZERWUARY GENÓW OPORNOŚCI

Jednym z głównych rezerwuarów genów oporności są zwierzęta. Kontrowersje i coraz więcej wątpliwości wzbudza powszechne stosowanie antybiotyków w hodowli, nie tylko w celach terapeutycznych, ale też jako czynników promujących wzrost (SÉVENO i współaut. 2002). Udokumentowano przypadki, kiedy dany mechanizm oporności, zidentyfikowany

wśród flory bakteryjnej zwierzęcia, zostawał również stwierdzony u bakterii ludzkiej pomimo, iż dany środek nie był uprzednio stosowany w leczeniu człowieka. Na przykład, w Europie Środkowej, na początku lat 80. ubiegłego stulecia, zaczęto wykorzystywać pochodną streptomycyny jako dodatek do pasz wspomagający wzrost świń. Gen kodujący acetylotrans-

ferazę, przenoszony na plazmidzie, stwierdzono w szczepach *E. coli* kolonizujących przewód pokarmowy świń już po roku. Po dwóch latach geny oporności wykryto w *E. coli* występujących u osób opiekujących się tymi zwierzętami. W ciągu kolejnych dwóch lat, determinanty opornościowe były już identyfikowane wśród osób nie związanych z trzodą chlewną, a później nie tylko w szczepach pałeczki okrężnicy, ale również *Shigella* i *Salmonella* (TEALE 2001).

Nabywanie opornych mikroorganizmów przez człowieka może mieć aspekt trywialny. Istnieje przecież prawdopodobieństwo zakażenia poprzez spożycie nieodpowiednio przygotowanego, skażonego pokarmu. W samych tylko Stanach Zjednoczonych Ameryki rocznie odnotowuje się ponad 70 milionów przypadków zatrucia pokarmowych (WHITE i współaut. 2002). Wprawdzie nie należy wpadać w panikę i dopatrywać się salmonelli w każdej porcji mięsa, czy bakterii z gatunku *Campylobacter* w każdym kawałku kurczaka, aczkolwiek łatwo wyobrazić sobie, iż spożyte antybiotykooporne drobnoustroje mogłyby skomplikować późniejsze leczenie. Nawet człowiek jest prawdopodobnie rezerwuarem genów oporności (SALYERS 2002). Drobnoustroje bytują nie tylko na powierzchni ciała, sam przewód pokarmowy jest skolonizowany przez około 400 gatunków bakterii, m. in. z rodzaju *Bacteroides*, *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* (TANNOCK 1997). Należy pamiętać, iż przyjmowanie antybiotyków wpływa na naszą mikroflorę. Biorąc pod uwagę stosunkową łatwość przekazywania materiału genetycznego (np. na drodze koniugacji, patrz poniżej), saprofity mogłyby służyć jako „przechowalnie” genów oporności, wprawdzie pobierając determinanty opornościowe od bakterii patogennych, by następnie przekazać je kolejnym szczepom zewnątrzpo pochodnym. Niedawno, np. u licznych w przewodzie pokarmowym przedstawicieli gatunków *Bacteroides* zidentyfikowano mobilne elementy genetyczne, NBU (ang. nonreplicating *Bacteroides* units), potencjalnie mogące uczestniczyć w rozprzestrzenianiu determinant oporności (WATERS 1999, SALYERS i AMÁBILE-CUEVAS 1997).

Antybiotyki są wykorzystywane w hodowli roślin, podczas nawożenia czy spryskiwania, warzyw, krzewów i drzew owocowych, itp. (np. streptomycyna znalazła zastosowanie jako związek przeciwdziałający gniciu jabłek, gruszek i nektarynek) (SÉVENO i współaut. 2002).

Nie wydaje się, aby powierchniowe stosowanie roztworów antybiotyków stwarzało zagrożenie w ich bezpośredniej konsumpcji, co mogłoby potencjalnie niekorzystnie wpłynąć na zdrowie konsumenta – dotychczas nie wykazano skażenia owoców, warzyw, tudzież ich przetworów (BAILAR III i TRAVERS 2002). Większe zaniepokojenie budzi odnotowywanie antybiotykoopornych fitopatogenów, np. streptomycyno-opornej *Erwinia amylovora* (SÉVENO i współaut. 2002).

Gleba jest równie ważnym rezerwuarem genów oporności (RENSING i współaut. 2002). Wykorzystanie antybiotyków w hodowli zwierząt i roślin nie jest obojętne dla szeroko rozumianego środowiska. W efekcie dodawania związków antybakteryjnych do pasz, pojawiają się one w wydalinach zwierzęcia. Nawożenie tzw. nawozem naturalnym może wywrzeć wówczas skutek podobny do spryskiwania arealów upraw roztworami antybiotyków i, w konsekwencji, skażenie gleby. Wiele drobnoustrojów charakteryzuje się naturalnym stanem kompetencji (zdolnością do pobrania egzogenego DNA), np. *Streptococcus pneumoniae* czy *Neisseria meningitidis* (RICE, 1998). W przeciwieństwie do powszechnego mniemania, nagie DNA, nawet liniowe, jest dosyć stabilne. Zaadsorbowane na cząsteczkach gleby zachowuje zdolność transformacji bakterii nawet do dwóch dni (SÉVENO i współaut. 2002). Jednym z czynników wpływających na częstość przekazywania materiału genetycznego w glebie jest, dość oczywista, ilość drobnoustrojów w danym podłożu. Kolonizacja rozmaitych środowisk przez bakterie jest ogromna, np. w 30 gramach ściółki leśnej zidentyfikowano blisko pół miliona różnych gatunków! Świat bakteryjny nie jest oczywiście zamknięty na wpływy z zewnątrz i takie czynniki jak np. obecność dżdżownic (spulchniających i poruszających ziemię) również mogą wpłynąć na wzmożenie częstości przekazywania DNA (RENSING i współaut. 2002).

Pośrednie lub bezpośrednie skażenie źródła wody może powodować powstanie i utrzymywanie się presji selekcyjnej, propagację genów oporności (aczkolwiek wykazano niedawno, iż presja selekcyjna nie jest czynnikiem niezbędnym do utrzymywania plazmidów w populacji bakteryjnej), ich rozprzestrzenienie wśród mikroorganizmów glebowych, zwierzęcych, roślinnych, ludzkich (SALYERS i AMÁBILE-CUEVAS, 1997, BAILAR III i TRAVERS 2002). Koło się zamyka. Warto zauwa-

żyć, iż przekazywanie genów i mikroorganizmów, nie tylko opornych na antybiotyki, jest obserwowane nie tylko w kierunku od zwierzęcia do człowieka, ale i również w odwrot-

nym (poprzez zanieczyszczone odchody, ang. faecal-oral recycling) (SÉVENO i współaut. 2002).

PRZEKAZYWANIE GENÓW OPORNOŚCI

Jest wiele udokumentowanych przykładów przekraczania granic w kontekście przekazywania genów, nie tylko oporności, pomiędzy drobnoustrojami. Geny o wysokim stopniu homologii są identyfikowane wśród mikroorganizmów odległych od siebie ewolucyjnie (OCHMAN i współaut. 2000). Ponieważ, o czym już wspomniano, prawdopodobieństwo wykształcenia przez nie identycznych mechanizmów oporności jest niewielkie, można przypisać te przypadki przepływowi informacji genetycznej z jednej bakterii do drugiej, z jednej niszy ekologicznej do drugiej. Dla przykładu, allele genów *tetK* i *tetL* wykryto wśród przedstawicieli glebowych pałeczek (*Bacillus* spp.) i typowych saprofitów układu pokarmowego (*Bacteroides* spp.) (SALYERS i AMÁBILE-CUEVAS 1997).

Mikroorganizmy zasiedlające określoną niszę ekologiczną oddziałują ze sobą. Ponieważ jest mało prawdopodobne, aby każdemu wprowadzeniu nowego antybiotyku towarzyszyło wykształcenie mechanizmu oporności od podstaw, a jednak drobnoustroje stają się niewrażliwe na określony związek w stosunkowo krótkim czasie, intuicyjnie zakłada się istnienie „ogólnodostępnej” puli genów oporności (WATERS 1999). Wektorami, czyli nośnikami genów, są plazmidy, transpozony i bakteriofagi (wirusy bakteryjne) (DAVIES 1994). Istnieje szereg procesów, w skutek których dochodzi do rozprzestrzeniania determinant opornościowych. Największą rolę odgrywa koniugacja, w mniejszym stopniu transformacja (bezpośrednie pobieranie zewnątrzkomórkowego DNA) i transdukcja (przenoszenie materiału genetycznego za pośrednictwem bakteriofagów) (NEU 1992).

Najważniejszym nośnikiem informacji genetycznej są plazmidy. Często niosą one geny oporności, pojedyncze bądź zorganizowane w integronach, czy też wchodzące w skład transpozonów (RECCHIA i HALL 1997). Integrony są elementami genetycznymi o określonych cechach strukturalnych – zawierają gen kodujący integrację (enzym umożliwiający włączenie do integronu determinanty oporności na drodze

rekombinacji), promotor kierujący transkrypcją w kierunku przeciwnym do kierunku transkrypcji genu integrazy, oraz przylegające do niego konserwowane miejsce rekombinacji (ROWE-MAGNUS i MAZEL 2001). Najlepiej scharakteryzowano integrony Enterobacteriaceae i Pseudomonadaceae. Dotychczas zidentyfikowano ponad 70 różnych integronowych determinant oporności, jednak w pojedynczym integronie nie jest ich więcej niż dziesięć (ROWE-MAGNUS i MAZEL 1999). Są to tzw. kasetty genowe (ang. gene cassettes), przenoszone jako kółeczka zamknięte cząsteczki, niezdolne do replikacji. Ich pochodzenie pozostaje dyskusyjne. Właściwie są to otwarte ramki odczytu, najczęściej zawierające sekwencję kodującą, bez promotora, z przyległym miejscem rekombinacji, wykorzystywanym np. podczas włączania do integronu. Po integracji, transkrypcja genu odbywa się z promotora pierwotnie wchodzącego w skład integronu (BENNETT 1999).

Pod względem rozprzestrzeniania się genów oporności na antybiotyki ważną rolę odgrywają również tzw. transpozony koniugacyjne (WATERS 1999). Między innymi tym różnią się one od klasycznych transpozonów, iż mogą być przekazywane nie tylko w obrębie cząsteczek DNA jednej komórki, ale też pomiędzy komórkami. Występują w formie zintegrowanej z plazmidem bądź chromosomem gospodarza. Po wycięciu tworzą kolistę, niereplikującą się, intermediat, które z kolei zostają przeniesione do komórki biorcy na drodze koniugacji (TOUSSAINT i MERLIN 2002). Miejsca włączenia danego transpozonu do wyższej rzędem struktury materiału genetycznego nie są przypadkowe, mogą mieć wpływ na dalszą jego propagację. Na przykład, miejsca integracji transpozonu Tn916 *Enterococcus faecalis* zidentyfikowano w plazmidach, których replikacja jest uwarunkowana obecnością feromonów (RICE 1998). Wymieniono już przewód pokarmowy jako jeden z potencjalnych rezerwuarów genów oporności. Stwierdzono, iż transpozony koniugacyjne są powszechne wśród mikroorganizmów go kolonizujących, zwłaszcza bakte-

rii z rodziny *Bacteroides* i enterokokach (SALYERS i AMÁBILE-CUEVAS 1997).

Plazmidy i transpozony koniugacyjne to mobilne elementy genetyczne o szerokim spektrum gospodarza (COHEN 1992). Plazmidy koniugacyjne (np. IncP) mogą powodować przenoszenie plazmidów koegzystujących w tym samym gospodarzu bakteryjnym w *cis* lub *trans*. Mechanizm mobilizacji w *trans* polega na „wypożyczeniu” własnych białek niezbędnych do transferu koniugacyjnego, natomiast mobilizacja w *cis* zachodzi dzięki utworzeniu

kointegratu z przenoszoną cząsteczką. Dodatkową możliwością jest tzw. retrotransfer, podczas którego plazmid koniugacyjny dawcy powoduje przekazywanie plazmidu znajdującego się w innej komórce (SALYERS i AMÁBILE-CUEVAS 1997). Ponieważ mechanizm koniugacyjnego przekazywania materiału genetycznego jest tak powszechny, rozważa się wykorzystanie jego inhibitorów jako potencjalnych środków pomocnych w ograniczaniu antybiotykooporności (WATERS 1999).

BAKTERYJNY KOSZT ANTYBIOTYKOOPORNOŚCI

Dla człowieka antybiotykooporność bakterii wiąże się z kosztami rzędu setek milionów dolarów. Pocieszające jest to, iż nabycie przez drobnoustroje genów oporności nie jest, jak by się to mogło zdawać, procesem wyłącznie dla nich korzystnym. Pod nieobecność presji selekcyjnej, ekspresja tych genów często wiąże się z upośledzeniem wzrostu bakterii, w porównaniu ze szczepami wrażliwymi. Wykazały to zarówno badania *in vitro* (w laboratorium), jak i *in vivo* (obserwacje szczepów klinicznych) (ANDERSSON i LEVIN 1999). Częściowo wynika to z dodatkowego obciążenia metabolicznego powodowanego syntezą dodatkowych białek, zwłaszcza, jeśli ekspresji ulega gen plazmidowy, a więc występujący w większej liczbie kopii. Sama ekspresja genu jest procesem energochłonnym, transkrypcja i translacja wymagają działania skomplikowanych kompleksów złożonych z białek i kwasów nukleinowych (STRYER 1997). Pomijając wydatek energetyczny, obecność aktywnego białka oporności może wywierać niepożądane skutki uboczne. Duże ilości białka TetA, pompy specyficznie usuwającej tetracyklinę (patrz powyżej) zlokalizowanej w błonie cytoplazmatycznej, mogą doprowadzić do zaburzeń potencjału błonowego (ECKERT i BECK 1989). Zwiększenie

spektrum substratowego enzymu może, paradoksalnie, niekorzystnie wpłynąć na antybiotykooporność danego organizmu, czego przykładem są β -laktamazy. Mutacje punktowe w centrum katalitycznym, mimo iż poszerzają ilość kompatybilnych substratów, mogą spowodować obniżenie się efektywności katalizowanej reakcji, gdyż w centrum aktywnym reszty katalityczne i wiążące substrat fizycznie oddala się od siebie (THERRIEN i LEVESQUER 2002). Odwrotna sytuacja, tzn. niekorzystne efekty zbyt wysokiej specjalizacji, są również odnotowywane. Mechanizm oporności polegający na modyfikacji docelowego miejsca działania antybiotyku nie zawsze jest kompatybilny z zestawem białek gospodarza. I tak, np., niektóre enterokoki odporne na antybiotyki glikopeptydowe dzięki ekspresji genów *vanA* i *vanB* (patrz wyżej) są wrażliwe na β -laktamy. Jedno z białek zaangażowanych w biosyntezę ściany komórkowej (PBP5) nie może wykorzystywać zmodyfikowanych intermediatów peptydoglikanu jako substratów. Inne enzymy muszą wówczas funkcjonalnie je zastąpić, a ponieważ hamowane są przez niższe stężenia antybiotyków β -laktamowych niż PBP5, prowadzi to do zwiększonej wrażliwości bakterii (ARTHUR i współaut. 1996).

PRO-, PRE- I SYN-BIOTYKI – ZDROWA ALTERNATYWA?

Powracając do kwestii ekosystemu układu pokarmowego człowieka, należy sobie uświadomić jak znaczącą rolę odgrywa kolonizująca go flora bakteryjna. Jak wspomniałam, przyjmowanie antybiotyków nie jest jej obojętne. Pomijając fakt, iż drobnoustroje te mogą być rezerwuarem genów oporności, podczas leczenia dochodzi do zmian ilościowo-jakościowych,

co z kolei umożliwia nadmierny wzrost gatunków dotychczas niedoreprezentowanych, oportunistów, np. *Clostridium*, czy zasiedlenie przez zewnątrzpo pochodne patogeny (ROLFE 2000). Przedłużającej się antybiotykoterapii może towarzyszyć biegunka, związana właśnie z zachwianiem stanu równowagi. Podawanie kolejnych farmaceutyków mogłoby

nie odnosić zamierzonego skutku, zwłaszcza gdy patogen niesie geny oporności (KAUR i współaut. 2002).

Rozważaną i intensywnie badaną alternatywą, nie tylko pod kątem profilaktyki, mającą na celu zmniejszenie stosowania antybiotyków („chemii”) są tzw. probiotyki. Zdefiniowane jako żywe kultury mikroorganizmów (nie tylko bakterii), działające wspomagająco w zapobieganiu i leczeniu określonych stanów chorobowych, znane są od początku ubiegłego stulecia (BERG 1998). Jest wiele przesłanek, wskazujących na ich właściwości terapeutyczne, np. podczas leczenia biegunek, w którym czynnikiem etiologicznym jest oportunistą, *Clostridium difficile* (probiotyk – *Saccharomyces boulardii*), rotawirusy (*Lactobacillus* spp.), czy leczenia wrzodów żołądkowych wywołanych *Helicobacter pylori* (*Lactobacillus* spp.) (ROLFE 2000). Obecnie prowadzi się badania mające na celu wyjaśnienie molekularnych podstaw ich działania terapeutycznego. Wśród czynników, które powodują, iż obserwuje się terapeutyczne efekty probiotyków wymienia się m.in. indukcję niespecyficznego odpowiedzi immunologicznej; współzawodnictwo w zasiedlaniu nabłonka jelitowego z drobnoustrojami oportunistycznymi, czy też patogenami pochodzenia zewnętrznego; wytwarzania substancji umiarkowanie toksycznych dla powodujących infekcję bakterii (np. kwasów organicznych, nadtlenu wodoru, bakteriocyn); neutralizację receptorów toksyn wytwarzanych przez patogeny (np. w przypadku wymienionego powyżej układu *S. boulardii*–*C. difficile*) (ROLFE 2000). Obserwuje się też antynowotworową

aktywność probiotyków, wyrażającą się neutralizacją potencjalnych substancji mutagennych (*Lactobacillus acidophilus*), czy degradacją potencjalnych związków kancerogennych (*Bifidobacterium longum*) (KAUR i współaut. 2002). Dla porządku należy dodać, iż kontrolowanych badań z udziałem ludzi przeprowadzono stosunkowo niewiele i nie zawsze efekt terapeutyczny był obserwowany lub utrzymywał się dostatecznie długo (BERG 1998).

Oprócz probiotyków coraz większe zainteresowanie budzą prebiotyki, czyli składniki pokarmu nie ulegające strawieniu, lecz selektywnie stymulujące wzrost i/lub aktywność określonych mikroorganizmów w jelicie grubym, co w rezultacie wpływa na utrzymanie korzystnego dla zdrowia stanu równowagi mikroflory. Zidentyfikowane dotychczas prebiotyki to oligosacharydy, związki znajdujące się np. w cebuli, czosnku, fasoli i karczochach (MACFARLANE i CUMMINGS 1999).

Potencjalne zastosowanie wydają się mieć także kombinacje pro- i prebiotyków, tzw. synbiotyki (ROLFE 2000). Co istotne, pro-, pre- i synbiotyki być może staną się również atrakcyjne w hodowli zwierząt, zastępując antybiotyki jako czynniki promujące wzrost. W wielu ośrodkach na całym świecie prowadzone są obecnie badania nad bakteryjnymi domieszkami do pasz dla bydła domowego, trzody chlewnej i drobiu. Należy zaznaczyć, iż mikroorganizmy wchodzące w skład preparatów „biotycznych” nie są równocenne, tzn. szczepy stosowane w przypadku ludzi różnią się od preparatów dla zwierząt, co wynika chociażby z odmiennego składu mikroflory układu pokarmowego (TANNOCK 1997).

ANTYBIOTYKOOPORNOŚĆ – PERSPEKTYWY

Tak jak wiele kwestii składa się na problem zaistnienia i rozprzestrzeniania antybiotykooporności mikroorganizmów, nie ma jednego, właściwego remedium na ograniczenie tego zjawiska. Cały czas prowadzone są prace nad nowymi, skuteczniejszymi lekami, w efektywniejszy sposób blokującymi mechanizmy oporności czy zapobiegającymi (w zamyśle) szybkiemu wykształceniu mechanizmów opornościowych, lecz badania te są czasochłonne, podczas gdy z podjęciem zdecydowanego działania nie należy zwlekać (LECLERCQ 2001). Rozważa się, m. in., następujące środki: obniżenie konsumpcji antybiotyków, staranny dobór stosowanych specyfików, edukację lekarza i

pacjenta oraz utworzenie międzynarodowych baz danych pozwalających na monitorowanie aktualnych trendów opornościowych (ang. surveillance) (LEWIS 2002).

Jak wcześniej wspomniano, wzrost antybiotykooporności wiąże się ze zwiększoną konsumpcją antybiotyków, jednakże ograniczenie zużycia danego leku niekoniecznie musi dawać wymierne rezultaty na zasadzie: usunięcie przyczyny – cofnięcie skutku. Odnawiano przypadki, kiedy zmniejszenie stosowania określonego farmaceutyku pociągało za sobą spadek oporności (np. w Finlandii, po redukcji o połowę zużycia erytromycyny zaobserwowano spadek występowania opornego

szczepu *Streptococcus pyogenes* z 19% w 1993 roku do 8,6% w 1996 roku) (GOULD 1999), lecz pojawiają się też kontr-doniesienia wskazujące na to, iż proste wycofanie leku nie zawsze odnosi wymierny efekt (LECLERCQ 2001). Co więcej, nie można koncentrować się na tylko jednym mikroorganizmie czy jednej klasie leków, gdyż podobne postępowanie może mieć niezamierzone konsekwencje. Tak było np. w przypadku szczepów *Klebsiella* opornych na leki β -laktamowe w szpitalach francuskich – wprowadzie zmniejszone zużycie cefalosporyn doprowadziło do zmniejszenia liczby opornych drobnoustrojów, lecz towarzysząca temu zwiększona konsumpcja imipenemu (leku zastępczego) przyczyniła się do równoległego wzrostu przypadków opornego na imipenem *P. aeruginosa* (GUILLEMOT 1999). Ważne jest, by stosowane leki miały wąskie spektrum działania (oddziaływały na określony mikroorganizm). Istotne, aby nie powodowały wykształcenia bądź nabycia oporności przez bakterie „przypadkowo” narażone na jego działanie, np. przez mikroflorę pacjenta (wracamy tu do zagadnienia układu pokarmowego człowieka jako potencjalnego rezerwuaru genów oporności) (LECLERCQ 2001).

Dostrzegając potencjalne znaczenie nadużywania antybiotyków w hodowli zwierząt w rozprzestrzenianiu się opornych szczepów bakterii, w wielu krajach prowadzi się działania mające na celu redukcję ich stosowania zwłaszcza w przypadkach celów nieterapeutycznych. W Europie pionierem takich działań była Szwecja, już w 1985 r. zakazująca stosowania antybiotyków jako środków promujących wzrost. Na terenie Unii Europejskiej

w hodowli zwierząt nie można stosować antybiotyków używanych w leczeniu ludzi od 1998 r. W Stanach Zjednoczonych Ameryki jednak takie restrykcje nie zostały wprowadzone, m.in. z powodu silnego lobby producentów antybiotyków domieszek do pasz (MELLON 2000).

Niewątpliwie ważne w obliczu nasilającej się antybiotykooporności jest prowadzenie jej ewidencji, zarówno na skalę lokalną jak i międzynarodową, odnotowywanie przypadków zachorowań, wyników antybiogramów, domniemanego źródła zakażenia oraz stanu chorego (LEWIS 2002). Dysponując takimi danymi, można w bardziej racjonalny sposób prowadzić i planować leczenie, optymalizując terapię i np. minimalizując kolonizację opornymi szczepami w przypadku zakażeń szpitalnych. W Europie działa kilka centr monitorujących antybiotykooporność (ang. surveillance), jak np. ESAR – Europejski Program Monitorowania Antybiotykooporności (ang. European Surveillance of Antibiotic Resistance), skupiający badaczy z Niemiec, Polski, Słowacji i Szkocji. Tego typu przedsięwzięcia nie są, niestety, wolne od problemów natury organizacyjnej, czy pewnego subiektywizmu podczas analizy i interpretacji danych. Wynika to m.in. z trudności standaryzacji procedur i niemożliwości zastosowania jednolitych zasad do wszystkich partycypujących w projekcie stron (często np. spotyka się rozbieżności w sposobie pobierania materiału biologicznego do analizy) (MORRIS i MASTERSON 2002). Niemniej jednak, dane uzyskane dzięki współpracy specjalistów i naukowców wielu placówek badawczych i leczniczych są niewątpliwie cennym źródłem informacji.

PODSUMOWANIE

Problem antybiotykooporności mikroorganizmów, którego nasilanie się obserwujemy od kilkunastu lat, jest zagadnieniem złożonym, dotyczącym wielu kwestii. Najczęściej dostrzegamy jego aspekt kliniczny, gdy stosowany antybiotyk nie wywiera pożądanego efektu terapeutycznego z powodu niewrażliwości patogena bakteryjnego. Jednakże równie ważne co skutki są także przyczyny tego stanu rzeczy. Nadmierna konsumpcja antybiotyków, ich niewłaściwe stosowanie i nadużywanie doprowadziły do selekcji opornych mikroorganizmów. Nierzadko jeden drobnoustrój dysponuje całym zestawem rozmaitych genów, pla-

zmidowych i chromosomalnych, warunkujących oporność. Niebanalne znaczenie w rozprzestrzenianiu się zjawiska oporności ma przepływ informacji genetycznej między bakteriami. Geny niesione na plazmidach, pozachromosomalnych cząsteczkach DNA, mogą być przekazywane nie tylko w obrębie jednego gatunku, ale także pomiędzy mikroorganizmami mniej spokrewnionymi ze sobą. Szeroka skala zjawiska skłania do podjęcia konkretnych działań, nie tylko w strefie poszukiwania nowych, skuteczniejszych specyfików antybakteryjnych. Dzięki międzynarodowej współpracy powstało wiele zakrojonych na szeroką skalę

działań monitoringowych i zapobiegawczych. Obecny stan wiedzy i podjęte działania napa-

wają ostrożnym optymizmem, aczkolwiek do osiągnięcia celu jeszcze daleko.

ANTIBIOTIC RESISTANCE AND PLASMID-ENCODED RESISTANCE DETERMINANTS

S u m m a r y

The increasing antibiotic resistance of bacterial pathogens is an alarming phenomenon of worldwide prevalence. The feasibility with which microorganisms obtain the resistance genes and express novel resistance mechanisms is becoming a serious problem in treatment of many infectious diseases. Selective pressure exerted by the abuse of antibiotics in and outside of human and veterinary medicine, their wide employment in animal husbandry and farming, is one of the main factors driving the dissemination and maintenance of resistance. This article briefly reviews the epidemiology of resistance as well as molecular mechanisms underlying the resistance. Significance of the

phenomenon from the clinical point of view is considered. Types of mechanisms that have evolved for evasion of antimicrobial agent action are characterized. The spread of genetic determinants in the microbial community is described, with special emphasis on plasmid-encoded genes. The ways whereby plasmids capture the resistance genes, whether in the form of gene cassettes, integrons or transposons, and the modes of their transfer, as well as their importance from an epidemiological standpoint are presented. Lastly, this review focuses on various means of circumventing the antibiotic resistance problem.

LITERATURA

- AMINOV R. I., CHEE-SANFORD J. C., GARRIGUES N., KRAPAC I. J., MACKIE R. I., 2002. *Evolutionary and ecological implications of antibiotic resistance*. *Reprod. Nutr. Dev.* 42, S27.
- ANDERSSON D. I., LEVIN B. R., 1999. *The biological cost of antibiotic resistance*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 489–493.
- ARTHUR M., REYNOLDS P., COURVALIN P., 1996. *Glycopeptide resistance in enterococci*. *Trends Microbiol.* 4, 401–407.
- BAILAR III J. C., TRAVERS K., 2002. *Review of assessments of the human health risk associated with the use of antimicrobial agents in agriculture*. *Clin. Infect. Dis.* 34 (Suppl. 3), S135–43.
- BENNETT P. M., 1999. *Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria*. *J. Antimicrob. Chemother.* 43, 1–4.
- BERG R. D., 1998. *Probiotics, prebiotics or „conbiotics“?* *Trends Microbiol.* 6, 89–92.
- COHEN M. L., 1992. *Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era*. *Science* 257, 1050–1055.
- DAVIES J., 1994. *Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes*. *Science* 264, 375–381.
- ECKERT B., BECK C. F., 1989. *Overproduction of transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein results in cell death and loss of membrane potential*. *J. Bacteriol.* 171, 3557–3559.
- FINCH R. G., 1998. *Antibiotic resistance*. *J. Antimicrob. Chemother.* 42, 125–128.
- FRAISE A. P., 2002. *Biocide abuse and antimicrobial resistance- a cause for concern?* *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 11–12.
- GILBERT P., MCBAIN A. J., BLOOMFIELD S. F., 2002. *Biocide abuse and antimicrobial resistance: being clear about the issues*. *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 137–139.
- GOULD I. M., 1999. *A review of the role of antibiotic policies in the control of antibiotic resistance*. *J. Antimicrob. Chemother.* 43, 459–465.
- GUILLEMOT D., 1999. *Antibiotic use in humans and bacterial resistance*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 494–498.
- HERITAGE J., M'ZALI F. H., GASCOYNE-BINZE D., HAWKEY P. M., 1999. *Evolution and spread of SHV extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria*. *J. Antimicrob. Chemother.* 44, 309–318.
- KAUR I. P., CHOPRA K., SAINI A., 2002. *Probiotics: potential pharmaceutical applications*. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15, 1–9.
- LECLERCQ R., 2001. *Safeguarding future antimicrobial options: strategies to minimize resistance*. *Clin. Microbiol. Infect.* 7 (Suppl. 3), 18–23.
- LEWIS D., 2002. *Antimicrobial resistance surveillance: methods will depend on objectives*. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 3–5.
- MACFARLANE G. T., CUMMINGS J. H., 1999. *Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health?* *BMJ* 318, 999–1003.
- MELLON M., 2000. *Europe just says no*. *Nucleus* 21, 8–9.
- MINGEOT-LECLERCQ M.-P., GLUPCZYNSKI Y., TULKENS P. M., 1999. *Aminoglycosides: activity and resistance*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 727–737.
- MORRIS A. K., MASTERSON R. G., 2002. *Antibiotic resistance surveillance: action for international studies*. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 7–10.
- MUÑOZ BELLIDO J. L., YAGÜEGUIRAO G., GUITÉRREZ ZUFIAURRE N., MANZANARES A. A., 2002. *Efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-positive bacteria*. *Rev. Med. Microbiol.* 13, 1–13.
- MURRAY I. A., CANN P. A., DAY P. J., DERRICH J. P., SUTCLIFFE M. J., SHAW W. V., LESLIE A. G. W., 1995. *Steroid recognition by chloramphenicol acetyltransferase: engineering and structural analysis of a high affinity fusidic acid binding site*. *J. Mol. Biol.* 254, 993–1005.

- NEU H. C., 1992. *The crisis in antibiotic resistance*. Science 257, 1064–1072.
- NIKAIDO H., 1994. *Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux*. Science 254, 382–388.
- OCHMAN H., LAWRENCE J. G., GROISMAN E. A., 2000. *Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation*. Nature 405, 299–304.
- POOLE K., 2002. *Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance*. J. Applied Microbiol. 92, 55S–64S.
- RECCHIA G. D., HALL R. M., 1997. *Origins of the mobile gene cassettes found in integrons*. Trends Microbiol. 5, 389–394.
- RENSING C., NEWBY D. T., PEPPER I. L., 2002. *The role of selective pressure and selfish DNA in horizontal gene transfer and soil microbial community adaptation*. Soil. Biol. Biochem. 34, 285–296.
- RICE L. B., 1998. *Tn916 family conjugate transposons and dissemination of antimicrobial resistance determinants*. Antimicrob. Agents. Chemother. 42, 1871–1877.
- ROBERTS M., 2002. *Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes*. Mol. Biotech. 20, 261–283.
- ROBERTS M. C., 1996. *Tetracycline resistance determinants: mechanism of action, regulation of expression, genetic mobility and distribution*. FEMS Microbiol. Rev. 19, 1–24.
- ROLFE R. D., 2000. *The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health*. J. Nutr. 130, 396S–402S.
- ROWE-MAGNUS D. A., MAZEL D., 1999. *Resistance gene capture*. Curr. Opin. Microbiol. 5, 389–394.
- ROWE-MAGNUS D. A., MAZEL D., 2001. *Integrons: natural tools for bacterial genome evolution*. Curr. Opin. Microbiol. 4, 565–569.
- SALYERS A. A., 2002. *Transfer of antibiotic resistance genes between gut bacteria- are gut bacteria reservoirs for resistance genes?* Reprod. Nutr. Dev. 42, S27.
- SALEYERS A. A., AMÁBILE-CUEVAS C. F., 1997. *Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination?* Antimicrob. Agents Chemother. 41, 2321–2325.
- SÉVENO N. A., KALLIFADAS D., SMALLA K., VAN ELSAS J. D., COLLARD J.-M., KARAGOUNI A. D., WELLINGTON E. M. H., 2002. *Occurrence and reservoirs of antibiotic resistance genes in the environment*. Rev. Med. Microbiol. 13, 15–27.
- SHAW W. V., 1983. *Chloramphenicol acetyltransferase: enzymology and molecular biology*. CRC Crit. Rev. Biochem. 14, 1–46.
- STRYER 1997. *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- TANNOCK G. W., 1997. *Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D*. Trends Biotech. 15, 270–274.
- TEALE C., 2001. *Antimicrobial resistance and the food chain*. Society for Applied Microbiology Swansea Summer Conference, S11.
- THANASSI D. G., SUH G. S. B., NIKAIDO H., 1995. *Role of outer membrane barrier in efflux-mediated tetracycline resistance of Escherichia coli*. J. Bacteriol. 177, 998–1007.
- THERRIEN C., LEVESQUE R., 2002. *Molecular basis of antibiotic resistance and β -lactamase inhibition by mechanism based inactivators: perspectives and future directions*. FEMS Microbiol. Rev. 24, 251–262.
- TOUSSAINT A., MERLIN C., 2002. *Mobile elements as a combination of functional modules*. Plasmid 47, 26–35.
- VETTER N., HAVER E., 2002. *Hospital-acquired pneumonia: a complex killer*. Clin. Microbiol. Infect. 8 (Suppl. 1), 38.
- WATERS V. L., 1999. *Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance*. Frontiers Biosci. 4, d416–d439.
- WHITE D. G., ZHAO S., SIMJEE S., WAGNER D. D., MCDERMOTT P. F., 2002. *Antimicrobial resistance of foodborne pathogens*. Microbes Infect. 4, 405–412.
- WILLIAMS J. D., 2002. *Antibiotic use in humans and bacterial resistance*. Curr. Opin. Microbiol. 2, 494–498.
- WITTE W., 1999. *Antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: epidemiological aspects*. J. Antimicrob. Chemother. 44, 1–9.