

Problem lekooporności w rodzinie Chlamydiaceae

KATARZYNA PŁONECZKA-JANECZKO, KRZYSZTOF RYPUŁA, KAROLINA BIEROWIEC

Zakład Chorób Zakaźnych i Administracji Weterynaryjnej, Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Płoneczka-Janeczko K., Rypuła K., Bierowiec K.

Problem of drug resistance in the family Chlamydiaceae

Summary

Infections caused by microorganisms of the Chlamydiaceae family are widespread among people and animals all over the world. Recently, however, an increased number of reports has been noted that point to the inefficacy of treatment with antibiotics known until now as a “first choice” solution. Resistance to antibiotics in Chlamydiaceae is defined as phenotypic resistance, but it may result from heterotypic resistance. As far as antimicrobial resistance is concerned, genomic islands and efflux pump mechanism may also play a role in its development. Only few laboratories have the capacity for the culture of progeny strains and the assessment of their resistance to antibiotics. Therefore, the resistance of field strains to chemotherapeutics usually remains unrecognized, and the drugs applied may prove inefficacious.

Keywords: resistance to antibiotics, Chlamydiaceae, treatment

Antybiotykooporność w obrębie *Chlamydiaceae* jest zagadnieniem coraz częściej podejmowanym w związku z narastającą w medycynie liczbą doniesień klinicznych na temat braku skuteczności leczenia tych zakażeń antybiotykami uważanymi za tak zwane „leki z wyboru”, do których zalicza się tetracykliny (TET), ich pochodne oraz azytromycynę (ATM). Badania w tym zakresie prowadzone są wielokierunkowo, ponieważ bardzo prosty genom *Chlamydiaceae* uważano dotychczas za silnie konserwatywny, podlegający niewielkim zmianom związanym z wymianą informacji genetycznej zachodzącej na drodze poziomej (14). Dużym utrudnieniem w rozpowszechnieniu badań dotyczących lekooporności *Chlamydiaceae* jest konieczność pozyskiwania czystych hodowli tych drobnoustrojów, z dużą ilością ciałek elementarnych (elementary bodies, EB) oraz wysokie wymagania hodowlane wewnątrzkomórkowo bytujących bakterii, które do wzrostu wymagają określonych linii komórkowych, np. BGMK (Buffalo Green Monkey Kidney), HEp-2 (Human Epidermoid Carcinoma 2), Vero czy McCoy (12, 15).

Z diagnostycznego punktu widzenia ważnym tematem – ściśle powiązaniem z badaniami nad lekoopornością – jest zdolność wywoływania przez *Chlamydia* i *Chlamydophila* zakażeń przetrwałych. U ludzi zakażenia o przebiegu ostrym, związane z *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) czy *Chlamydophila pneumoniae* (*Cp. pneumoniae*) nie stanowią zazwyczaj problemu terapeutycznego, jeśli zostaną właściwie rozpoznane (1). Brak skuteczności leczenia odnoto-

wuje się najczęściej przy zakażeniach przewlekłych i przetrwałych, będących często konsekwencją nierozpoznanych zakażeń ostrych. Klinicznymi formami takich zakażeń u ludzi są stany zapalne w obrębie miednicy, niepłodność, zapalenia stawów oraz przewlekłe zapalenie płuc. Wykazano również powiązania tych zakażeń z chorobą Alzheimera oraz chorobami układu sercowo-naczyniowego (1). Sugeruje się, że przerwanie normalnego cyklu rozwojowego chlamydii i chlamydofilii może korelować z późniejszym brakiem skuteczności leczenia. Rozwój nie poddających się leczeniu zakażeń stymulowany jest niekiedy wcześniejszą terapią, wynikającą z konieczności leczenia zakażeń mieszanych, efekt terapeutyczny osiąga się jednak wówczas jedynie w odniesieniu do bakterii współistniejących (14). W badaniach *in vitro* rozwój zakażenia przetrwałego stymuluje dodatek do hodowli erytromycyny, penicyliny, ampicyliny, D-cykloseryny, doksycykliny, fluorochinolonów i azytromycyny, a także niektórych cytokin (IFN-gamma) (1). Podobny efekt, który przypuszczalnie również obserwowany jest *in vivo*, mogą wywoływać rozpowszechnione w środowisku bakteriofagi czy selektywne niedobory aminokwasów (5).

W przypadku zakażeń ludzi brak wrażliwości na stosowane w leczeniu antybiotyki dotyczy zakażeń powodowanych przez *C. trachomatis* i *Cp. pneumoniae*, przy czym definiowana jest tzw. antybiotykooporność fenotypowa (phenotypic resistance) oraz antybiotykooporność genotypowa (genotypic resistance), związana z występowaniem mutacji punktowych (5).

Antybiotykooporne fenotypowo szczepy *C. trachomatis* opisane przez Jones i wsp. (6) nie reagowały na tetracyklinę, doksycylinę, erytromycynę, klindamycynę i sulfametoksazol. Inne, oporne fenotypowo szczepy *C. trachomatis* pochodzące z przypadków klinicznych wykazywały z kolei oporność tylko wobec tetracyklin, zachowując wrażliwość na inne badane chemioterapeutyki, jak: azytromycyna, erytromycyna, ofloksacyna, pristinamycyna (8). Fenotypowo oporne izolaty powstawały najprawdopodobniej wskutek podjęcia terapii na etapie zakażeń przetrwałych. Możliwe jest także występowanie tzw. oporności heterotypowej HeR (heterotypic resistance), będącej odmianą oporności genotypowej. W oporności tego typu tylko mała część populacji danego gatunku drobnoustroju jest w stanie wykazywać oporność nawet na wysokie stężenia wybranych chemioterapeutyków, natomiast większość populacji pozostaje wrażliwa na stężenia dużo niższe. Przytoczone takie wysnuto, porównując zakażenia powodowane przez opisywane drobnoustroje (*Chlamydia spp.* i *Chlamydophila spp.*) oraz gronkowce (*Staphylococcus spp.*), u których opisano wymieniony fenomen. Istnieje również możliwość konwersji (w odniesieniu do antybiotykooporności) populacji heterotropowej w homotropową (4, 14).

W medycynie weterynaryjnej antybiotykooporność wśród gatunków *Chlamydia spp.* i *Chlamydophila spp.* występujących u zwierząt opisano dotychczas jedynie u świń. Zakażenia świń powodowane są przez *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydophila psittaci* oraz *Chlamydia suis*, potwierdzenie antybiotykooporności (fenotypowej) udokumentowano jak dotąd tylko w przypadku *Chlamydia suis* (*C. suis*) (3, 10).

W 2001 r. Lenart i wsp. (9) prowadząc badania na terenowych izolatach rozpoznanych jako *C. suis*, opisać 2 szczepy – R19 i R27. W toku badań hodowlanych w obecności antybiotyków oba szczepy wykazywały wzrost przy znacznie wyższym stężeniu tetracykliny (4 µg/ml) niż szczep świński *C. suis* S45, uznawany powszechnie za wrażliwy (0,1 µg/ml). Zaobserwowano przy tym, iż w obecności wyższych stężeń tetracykliny drobnoustroj ten tworzył w zakażonych komórkach mniej form zdolnych do dalszego namnażania się przez podział ciałek retikularnych (RB) (reticulate body RB) – inhibicja na poziomie 85-97%. Wzrastał odsetek postaci atypowych RB, które nie podlegały podziałowi w ogóle. Zdolności replikacyjne i ponowne przekształcenie się chlamydii w zakaźne ciała elementarne (EB) powracały natomiast już po upływie doby od usunięcia z hodowli antybiotyku. Szczepy te opisano jako tzw. TET^r (tetracycline resistant) *C. suis*. Dalsze badania prowadzone na izolatach *C. suis* wykazały obecność determinant genetycznego uwarunkowania fenotypowej antybiotykooporności. Spośród poznanych dotychczas 13 genów – tet (A), (B), (C), (D), (E), (G), (H), (K), (L), (M), (O), (Q), (S)

warunkujących oporność drobnoustrojów na tetracykliny (Tc^r), we wszystkich badanych izolatach *C. suis* wykazano jedynie strukturalny gen tet (C), będący genem tzw. pompy efluksowej oraz przylegający do niego gen represorowy tet R(C) (3). Pompy efluksowe są nowo poznany mechanizm oporności bakterii, działającym na zasadzie transportowania poza komórkę („wypompowywanie”) m.in. leków. Pompy te mogą być specyficzne wobec jednego substratu, ale mogą także transportować wiele różniących się od siebie strukturalnie związków – co w odniesieniu do antybiotyków określa się jako pompy MDR (multidrug resistance). Mechanizm wyrzutu opisany u różnych bakterii uruchamia się w korelacji z występowaniem u nich określonych mutacji w lokalnych genach represorowych lub regulatorowych, w regionach promotorowych genów transportujących bądź na skutek insercji w obrębie genów transportujących (13, 16). W antybiotykoopornych szczepach *C. suis* zidentyfikowano jednocześnie tzw. wyspy genomowe (genomic islands GEIs), opisane jako wyspy tet (C) (3). Są to unikalne, odrębne fragmenty chromosomalnego DNA o odmiennym zawartości par GC (guanina-cytosyna), odmiennym funkcjonowaniu kodonów oraz obecności genów i sekwencji warunkujących w niektórych przypadkach możliwość mobilności wysp (2). Możliwość integracji z chromosomami gospodarza sprawia, iż wyspy uważa się aktualnie za jeden z mechanizmów ewolucyjnych bakterii służących rozpowszechnianiu „korzystnych” dla nich genów – w tym genów antybiotykooporności. Takie same segmenty DNA odnajduje się w bardzo odległych od siebie w analizie filogenetycznej organizmach (7). W przypadku izolatów *C. suis* identyfikowalne sekwencje nukleotydów były bardzo zbliżone do sekwencji plazmidowych stwierdzanych wśród bakterii Gram-ujemnych, odpowiadających za antybiotykooporność. Przemawia to za nabywaniem oporności przez wewnątrzkomórkowo bytujące chlamydie/chlamydofile również na drodze poziomej (3).

Klinicznie, na podstawie objawów trudno jest zatem wnioskować, czy brak efektu terapeutycznego przy podejrzeniu chlamydiozy/chlamydofilozy mógł się pojawić już po rozwoju zakażenia przetrwałego, czy jest to wynik zakażenia powtórnego (*reinfectio*) (14). Stosowanie antybiotyków w medycynie weterynaryjnej u zwierząt gospodarskich i towarzyszących może w sposób nieświadomiony kształtować obraz zakażeń powodowanych przez *Chlamydia spp.* i *Chlamydophila spp.* Ocena antybiotykooporności izolatów z przypadków klinicznych wymaga pozyskania ich z materiału diagnostycznego i namnożenia szczepów potomnych. Nie jest to praktycznie możliwe poza nielicznymi, wyspecjalizowanymi laboratoriami badawczymi. Badaniom nad opornością nie sprzyjają również różnice, jakie *Chlamydia/Chlamydophila* wykazują w warunkach *in vitro* i *in vivo* w zakresie charakterystyki atypowych ciałek retikularnych RB,

tworzących się w zakażeniu przetrwałym. Oprócz różnic morfologicznych w ciałkach tych zachowana jest synteza białek i replikacja DNA, natomiast wstrzymane zostają podziały komórkowe. W efekcie, w zakażonych komórkach powstają struktury zawierające małą liczbę atypowych RB, badane *Chlamydiaceae* mogą pozostawać więc żywotne, ale niezdolne do hodowli komórkowej (14).

Nasuwa się zatem kolejne pytanie: czy hodowlę i izolację *Chlamydia/Chlamydophila* można określać mianem „złotego standardu” w rozpoznawaniu tych zakażeń, a przede wszystkim w diagnostyce zakażeń przetrwałych, skoro ich specyfika w przypadku rodziny *Chlamydiaceae* uniemożliwia często efektywną hodowlę nawet na selektywnych podłożach? Dodatkowo izolaty pozyskiwane z przypadków klinicznych charakteryzują się zróżnicowanym wskaźnikiem wzrostu na różnych liniach komórkowych, przy czym często jest on słabszy w stosunku do szczepów referencyjnych – trudno zatem o optymalizację metod. Na wzrost *Chlamydiaceae* w warunkach hodowlanych wpływa również miejsce, z którego zostały pozyskane próbki do badań (14).

Biorąc pod uwagę tak liczne ograniczenia, diagnostyka zakażeń na tle *Chlamydiaceae* w zakresie badań podstawowych, jak również w zakresie badań dotyczących ich antybiotykooporności w dużej mierze opiera się aktualnie na technikach biologii molekularnej i genetycznej charakterystyce badanych izolatów. Czułość technik molekularnych przewyższa technikę hodowlaną – szacuje się, że nawet o 20-30%. Z drugiej strony, brak przystosowania większości laboratoriów do badań hodowlanych *Chlamydiaceae* uniemożliwia prowadzenie badań nad antybiotykoopornością tych drobnoustrojów na szeroką skalę, nawet jeśli podejrzewa się obecność takich izolatów w stanach klinicznych (2, 14).

Podsumowując, jeśli w praktyce terenowej lekarze spotykają się z problemem antybiotykooporności w odniesieniu do zakażeń powodowanych przez *Chlamydia spp.* i/lub *Chlamydophila spp.* u zwierząt towarzyszących i gospodarskich oraz u ludzi, to problem ten w odniesieniu do konkretnych przypadków chorobowych pozostaje na dzień dzisiejszy zupełnie nierozwiązany, a stosowane i zalecane antybiotyki wydają się po prostu „nie działać” efektywnie.

Piśmiennictwo

1. Binet R., Maurelli A. T.: Frequency of spontaneous mutations that confer antibiotic resistance in *Chlamydia* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49, 2865-2873.
2. Dera-Tomaszewska B.: Na wyspach Salmonella. Czternaście wysp patogenności bakterii z rodzaju Salmonella. *Post. Mikrobiol.* 2011, 50, 51-58.
3. Dugan J., Rockey D. D., Jones L., Andersen A. A.: Tetracycline resistance in *Chlamydia suis* mediated by genomic islands inserted into the *Chlamydia* inv-like gen. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48, 3989-3995.
4. Finan J. E., Rosato A. E., Dickinson T. M., Ko D., Archer G. L.: Conversion of Oxacillin-Resistant Staphylococci from Heterotypic to Homotypic resistance expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002, 46, 24-30.
5. Hogan R. J., Mathews S. A., Mukhopadhyay S., Summerville J. T., Timms T.: Chlamydial persistence: beyond Biphase Paradigm. *Infect. Immunol.* 2004, 72, 1843-1855.
6. Jones R. B., van der Pol B., Martin D. H., Shepard M. K.: Partial characterization of *Chlamydia trachomatis* isolates resistant to multiple antibiotics. *J. Infect. Dis.* 1990, 162, 1309-1315.
7. Juhas M., Meer J. R. van der, Gaillard M., Harding M. R., Hood D. W., Crook D. W.: Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 2009, 33, 376-393.
8. Lefevre J. C., Lepargneur J. P.: Comparative in vitro susceptibility of a tetracycline-resistant *Chlamydia trachomatis* strain isolated in Toulouse (France). *Sex Transm. Dis.* 1998, 25, 350-352.
9. Lenart J., Andersen A. A., Rockey D. D.: Growth and development of tetracycline-resistant *Chlamydia suis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45, 2198-2203.
10. Li D., Vaglenov A., Kim T., Wang C., Gao D., Kaltenboeck B.: High-yield culture and purification of *Chlamydiaceae* bacteria. *J. Microbiol. Methods* 2005, 61, 17-24.
11. Papp J. R., Shewen P. E.: Localization of chronic *Chlamydia psittaci* infection in a reproductive tract of sheep. *J. Infect. Dis.* 1996, 174, 1296-1302.
12. Pawlikowska M., Deptuła W.: Chlamydie i chlamydofile u ludzi i zwierząt. Wydawnictwo Uniwersytetu Szczecińskiego, Szczecin 2012.
13. Piddock L. J.: Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006, 19, 382-402.
14. Sandoz K. M., Rockey D. D.: Antibiotic resistance in *Chlamydiae*. *Future Microbiol.* 2010, 5, 1427-1442.
15. Vanrompay D., Geens T., Desplanques A., Hoang T. Q. T., De Vos L., Van Loock M., Huyck E., Mirry C., Cox E.: Immunoblotting, ELISA and culture evidence for *Chlamydiaceae* in sows on 258 Belgian farms. *Vet. Microbiol.* 2004, 99, 59-66.
16. Wasząnik A., Grinholc M., Bielawski K. P.: Czynne usuwanie leku z komórki jako jeden z mechanizmów oporności bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe i metody jego zwalczania. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2009, 63, 123-133.

Adres autora: dr wet. Katarzyna Płoneczka-Janeczko, pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław; e-mail: ploneczka@poczta.onet.pl