Cefalosporynazy AmpC u *Escherichia coli*AmpC cephalosporinases in *Escherichia coli*

Magdalena Anna Nowakowska

¹Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy Instytut Badawczy,
Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych, Warszawa

Palczki *Escherichia coli* stanowią istotny czynnik etiologiczny zakażeń szpitalnych. Znaczącym problemem w terapii zakażeń wywoływanych przez te drobnoustroje jest ich narastająca oporność na antybiotyki z grupy β -laktamów. Jednym z najistotniejszych mechanizmów oporności na antybiotyki β -laktamowe jest wytwarzanie β -laktamaz. Oporność na cefalosporyny III generacji jest głównie warunkowana wytwarzaniem przez szczep β -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym – ESBL i/lub cefalosporynaz AmpC. Wytwarzanie cefalosporynaz AmpC może być uwarunkowane obecnością genów *ampC* chromosomowych jak i kodowanych plazmidowo. U *E. coli* ekspresja genów *ampC* może być warunkowana konstytutywną ekspresją chromosomowych genów *ampC* na niskim poziomie. Szczepy te nadal pozostają wrażliwe na antybiotyki β -laktamowe. Jednak, na skutek pojawienia się mutacji w rejonie promotorowym *ampC*, coraz częściej pojawiają się szczepy *E. coli*, u których dochodzi do podwyższenia poziomu ekspresji chromosomowych genów *ampC*. Wzrasta także znaczenie kodowanych plazmidowo cefalosporynaz typu AmpC - pAmpC (ang. *plasmid-mediated AmpC β -lactamase*). Ten mechanizm oporności jest istotny ze względu na potencjał szybkiego rozprzestrzeniania, ponieważ kodujące je geny są zwykle przenoszone na ruchomych elementach genetycznych takich jak plazmidy. W pracy podjęto próbę przeglądu i charakterystyki mechanizmów oporności związanych z wytwarzaniem cefalosporynaz typu AmpC u klinicznych izolatów *E. coli*.

Słowa kluczowe: *Escherichia coli*, chromosomalnie kodowane cefalosporynazy typu AmpC, plazmidowo-kodowane cefalosporynazy typu AmpC

ABSTRACT

Escherichia coli is an important pathogen causing nosocomial infections. A significant problem in the treatment of infections caused by these microorganisms is their increasing

resistance to β -lactam antibiotics, including third and fourth generation cephalosporins. The production of β -lactamases enzymes such as extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and AmpC β -lactamases is among the main mechanisms for resistance to third generation cephalosporins. The genes encoding AmpC cephalosporinases are chromosomal (cAmpC) or plasmid-mediated (pAmpC). In *E. coli*, the expression of the *ampC* genes may be conditioned by the constitutive expression of low level *ampC* chromosomal genes. These strains remain susceptible to β -lactam antibiotics. However, mutations in the promoter region of the *ampC* may result in increased level of expression of chromosomal *ampC* genes. This can leads to resistance to cephalosporins. Resistance to cephalosporins in *E. coli* can be also associated with plasmid-mediated AmpC β -lactamases (pAmpC). In *E. coli* the presence of one or more plasmid-mediated AmpC β -lactamases along with the negligible expression of chromosomal encoded AmpC enzyme can leads to resistance to broad-spectrum cephalosporins. This review is focused on a resistance mechanisms associated with the production of AmpC cephalosporinases in clinical *E. coli* isolates.

Key words: *Escherichia coli*, chromosomal encoded cephalosporinases AmpC, plasmid-mediated AmpC β -lactamases

WSTĘP

Escherichia coli, pałeczka okrężnicy, stanowi element flory fizjologicznej jelit człowieka i zwierząt, u których może wywoływać zakażenia oportunistyczne. Jest jednym z dominujących czynników etiologicznych zakażeń zarówno szpitalnych, jak i pozaszpitalnych. *E. coli* jest jednym z głównych czynników wywołujących zakażenia układu pokarmowego u ludzi. Ponadto, *E. coli* jest jednym z głównych czynników etiologicznych wywołujących zakażenia układu moczowego. Szacuje się, że jest odpowiedzialna za ok. 70% - 80% zakażeń układu moczowego – UTI (10, 59, 88). U chorych hospitalizowanych, *E. coli* może być czynnikiem etiologicznym zapalenia płuc, zapalenia otrzewnej, zapalenia dróg żółciowych oraz zakażenia ran. W warunkach szpitalnych, pałeczki *E. coli* mogą być przyczyną zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych u noworodków. Ponadto, u osób hospitalizowanych, pałeczki *E. coli* mogą wywoływać ciężkie zakażenia szpitalne tj. bakteriemia oraz posocznica (27, 50).

Jak wynika z danych zgromadzonych przez EARS-Net, znaczącym problemem w terapii zakażeń wywołanych przez pałeczki *Enterobacterales*, w tym *E. coli*, jest ich narastająca oporność m.in. na antybiotyki β -laktamowe (28). Badania prowadzone w wielu krajach wskazują, że wraz ze wzrostem stosowania w leczeniu antybiotyków β -laktamowych, obserwuje się wzrost częstości występowania pałeczek *Enterobacterales* wytwarzających β -laktamazy. W pracy podjęto próbę przeglądu i charakterystyki mechanizmów oporności związanych z wytwarzaniem cefalosporynaz typu AmpC u klinicznych izolatów *E. coli*.

ANTYBIOTYKI STOSOWANE W ZAKAŻENIACH PAŁECZKAMI *E. COLI*

W praktyce klinicznej w leczeniu zakażeń pałeczkami *E. coli* najczęściej stosowane są antybiotyki β -laktamowe, aminoglikozydy, glicylcykliny (tygecyklina), sulfonamidy, polimyksyny (kolistyna), fluorochinolony, fosfomycyna (27).

Antybiotyki β -laktamowe stanowią najliczniejszą i najbardziej zróżnicowaną grupę antybiotyków stosowaną w terapii niemal wszystkich rodzajów zakażeń o rozległej etiologii (13, 27, 43, 56). Aktywność przeciwbakteryjna antybiotyków β -laktamowych dotyczy zarówno bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych (13, 27, 43). β -laktamy stanowią jedną z grup antybiotyków najczęściej stosowanych w terapii. Według danych Bush i Bradford (13), w Stanach Zjednoczonych, ok. 65% antybiotyków stosowanych dożylnie stanowią β -laktamy.

Ze względu na częste stosowanie tej grupy antybiotyków obserwuje się wyraźne narastanie lekooporności i znaczne zróżnicowanie jej mechanizmów, w dużej mierze zależnych od struktury i właściwości poszczególnych grup antybiotyków β -laktamowych.

Wzrastająca oporność bakterii na antybiotyki stosowane w lecznictwie stanowi jeden z najpoważniejszych problemów współczesnej medycyny. Dane zebrane przez EARS-Net wskazują, że w wielu krajach Europy, w tym także w Polsce, wyraźnie wzrasta odsetek szczepów izolowanych z zakażeń inwazyjnych opornych na cefalosporyny III generacji. Z zestawienia danych z 2016 r. i 2018 r. wśród izolatów z naszego kraju zaobserwowano iż u *E. coli* odsetek opornych izolatów wzrósł z 13,7 % do 17,6 % (28).

OPORNOŚĆ NA ANTYBIOTYKI β -LAKTAMOWE U PAŁECZEK GRAM-UJEMNYCH ZWIĄZANA Z WYTWARZANIEM β -LAKTAMAZ

Najbardziej istotnym mechanizmem oporności pałeczek Gram-ujemnych na antybiotyki β -laktamowe jest wytwarzanie β -laktamaz. Hydrolizują one wiązanie amidowe w pierścieniu β -laktamu, inaktywując w ten sposób jego aktywność. Jest to najistotniejszy mechanizm oporności na antybiotyki β -laktamowe u Gram-ujemnych pałeczek *Enterobacteriaceae* (14, 43, 56, 61).

U bakterii Gram-ujemnych, warunkujące wytwarzanie β -laktamaz geny *bla* mogą być zlokalizowane w chromosomie lub w plazmidach. β -laktamazy chromosomowe, to tak zwane β -laktamazy gatunkowo-specyficzne, wytwarzane przez większość pałeczek Gram-ujemnych. Przykładem są należące do klasy C β -laktamaz, cefalosporyny AmpC, występujące m.in. u pałeczek *Enterobacterales*. Enzymy te posiadają szeroki zakres substratów, obejmujący penicyliny, większość cefalosporyn oraz monobaktamy (15, 56).

Wraz z wprowadzeniem do lecznictwa β -laktamów oraz nowych ich rodzajów i generacji, nastąpiła mobilizacja chromosomowych genów β -laktamaz oraz ich horyzontalne rozprzestrzenianie się - HGT (ang. *Horizontal Gene Transfer*) (15). Kluczową rolę w mobilizacji i rozprzestrzenianiu się genów *bla* odgrywają ruchome elementy genetyczne tj.: plazmidy, transpozony, integrony, moduły transpozycyjne, kasety genowe czy sekwencje insercyjne (15, 56).

Do najistotniejszych plazmidowo-kodowanych β -laktamaz wytwarzanych przez pałeczki *Enterobacterales* należą: β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym

ESBL (ang. *extended-spectrum β -lactamases*); karbapenemazy klasy A należące do rodziny KPC (ang. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*); metalo- β -laktamazy klasy B (MBL; ang. *metallo- β -lactamases*); karbapenemazy klasy D – enzymy CHDL (ang. *carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases*) oraz plazmidowo-kodowane cefalosporynazy AmpC (pAmpC) (12, 15).

CEFALOSPORYNAZY

Większość pałeczek *Enterobacteriales* wytwarza chromosomowo kodowane, swoiste dla danego gatunku cefalosporynazy AmpC. Przykładem mogą być cefalosporynazy, wytwarzane przez pałeczki *Citrobacter* sp. (54), *Enterobacter* sp. (33), *Morganella morganii* (4), *Serratia marcescens* (70), *Hafnia alvei* (35, 90), *Aeromonas* sp. (17, 95), *Yersinia enterocolitica* (84) czy *Pseudomonas* sp. (58).

Cefalosporynazy AmpC, należą do klasy C według klasyfikacji Ambler oraz do grupy 1 według klasyfikacji Bush'a. Charakteryzują się szerokim spektrum substratowym, obejmującym penicyliny, cefamycyny, oksymino-cefalosporyny i monobaktamy (46, 91, 96). Wytwarzanie AmpC hamowane jest przez specyficzne inhibitory tj. kloksacylina, kwas 3-aminophenylboronowy. Enzymy te, nie są wrażliwe na działanie inhibitorów ESBL tj. kwasu klawulanowego (56, 96).

Antybiotyki β -laktamowe w różnym stopniu mogą wpływać na indukcję wytwarzania cefalosporynaz. Silnymi induktorami wytwarzania AmpC i zarazem dobrymi substratami dla nich są: benzylopenicyliny, ampicylina, amoksycylina oraz zaliczane do cefalosporyn I generacji – cefaleksyna i cefazolina. Cefoksytyna oraz imipenem również należą do silnych induktorów AmpC, są jednak słabiej hydrolizowane niż leki wymienione wcześniej. Do słabych induktorów i zarazem słabych substratów AmpC zaliczyć można cefotaksym, ceftriakson, ceftazydym, cefuroksym, piperacilinę oraz aztreonam. Jednak, leki te mogą być wydajnie hydrolizowane gdy wytwarzana jest odpowiednia ilość enzymu AmpC (46, 55). AmpC wykazują małą aktywność względem cefepimu, cefpiromu oraz karbapenemów. Inhibitory β -laktamaz ESBL takie jak kwas klawulanowy, nie hamują AmpC, mogą natomiast działać jako induktory ekspresji AmpC (46).

Poziom ekspresji chromosomowych cefalosporynaz u różnych gatunków bakterii może być zróżnicowany. Na przykład, *E. coli* i *Acintebacter* sp. wytwarzają cefalosporynazy stale, w sposób konstytutywny, na niskim poziomie. Ten sposób ekspresji β -laktamaz AmpC nie daje dzikim szczepom oporności na antybiotyki β -laktamowe w stężeniach terapeutycznych. U większości gatunków pałeczek Gram-ujemnych, np. *E. cloacae*, *C. freundii* czy *P. aeruginosa* ekspresja cefalosporynaz ma charakter indukowany, zależny od obecności induktora, jakim jest antybiotyk β -laktamowy (46).

PLAZMIDOWO-KODOWANE CEFALOSPORYNAZY TYPU AMPC

Od wielu lat wzrasta znaczenie kodowanych plazmidowo cefalosporynaz AmpC (pAmpC - ang. *plasmid-mediated AmpC β -lactamase*; ACBL - ang. *acquired AmpC-type β -lactamase*) (46, 53, 62, 66, 73, 79, 80). Znajdujące się na ruchomych elementach geny *bla*_{ampC} kodujące heterogenną grupę enzymów, wywodzą się z chromosomowego DNA: *Enterobacter* sp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei* i *Aero-*

monas sp. (46, 89). Jak wynika z danych piśmiennictwa, w ostatnich latach wzrasta udział pAmpC u gatunków, które naturalnie nie wytwarzają cefalosporynaz AmpC (tj. nie posiadają chromosomowych AmpC). Plazmidowo-kodowane cefalosporynazy AmpC najczęściej występują u *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* czy *Proteus mirabilis* (29, 53, 62, 63, 73, 80).

Spektrum substratowe enzymów pAmpC jest zbliżone do chromosomowych cefalosporynaz. Niektóre enzymy pAmpC, np. ACC, mniej wydajnie hydrolizują cefoksytynę. W Niemczech, w 1999 r. *Bauernfeind* i wsp. (8) po raz pierwszy opisali izolat *K. pneumoniae* KUS wytwarzający enzymy pAmpC należące do rodziny ACC (ACC-1). Co ciekawe izolat ten, *in vitro* wykazywał wrażliwość na cefoksytynę i posiadał wartość MIC cefoksytyny równą 4 µg/ml. W następnych latach, fonemem wrażliwości bądź obniżonej wrażliwości na cefoksytynę u izolatów posiadających enzymy ACC obserwowali także inni badacze (11, 36, 65, 69). Spektrum substratowe enzymów pAmpC może być poszerzone o słabe substraty. Przykładowo, wyniki badań Li i wsp. (53) wskazują, iż oporność na ceftazydim i cefotaksym, antybiotyki które nie są najlepszymi substratami dla AmpC, występowała odpowiednio u 94% i 83% izolatów *E. coli* wytwarzających pAmpC, podczas gdy u izolatów wytwarzających chromosomalnie kodowane AmpC oporność na te leki wynosiła odpowiednio 12% i 14%. Co więcej, jak wskazują dane piśmiennictwa (26, 75), niektóre warianty enzymów pAmpC np. CMY-33 czy CMY-44 mogą wykazywać zdolność do hydrolizy cefepimu.

W 1989 roku, *Bauernfeind* i wsp. (9) scharakteryzował pierwszą plazmidowo-kodowaną cefalosporynazę (pAmpC) znaną u *K. pneumoniae*. Enzym ten nazwano CMY-1, jego nazwa była związana z aktywnością hydrolityczną względem cefamycyn. Analiza sekwencji nukleotydowej CMY-1 wykazała ponad 80% podobieństwo do sekwencji nukleotydowej chromosomalnego genu *ampC* *A. hydrophila* (9). W 1990 roku, Papanicolaou i wsp. opisali plazmidowo-kodowaną cefalosporynazę MIR-1 warunkującą oporność na α -metoksy- i oksyimino- β -laktamy. Wynik porównawczej analizy sekwencji nukleotydowej badanego enzymu MIR-1 w 99% wykazywał podobieństwo do sekwencji nukleotydowej chromosomalnego genu *ampC* *E. cloacae* (72). W kolejnych latach nabyte geny AmpC były znajdowane w genomach różnych gatunków bakterii. W 1993 roku Horii i wsp. (42) opisali cefalosporynazę pAmpC należącą do rodziny MOX-1 zlokalizowaną na plazmidzie *K. pneumoniae*, pierwotnie wywodzącą się z chromosomu *A. hydrophila*. W 1997 roku opisano geny pAmpC należące do rodziny DHA-1, znalezione na plazmidzie *S. enteritidis*, a pierwotnie pochodzącą z chromosomalnego DNA *M. morganii* (5). W 1997 r., Bradford i wsp. na plazmidzie *K. pneumoniae* zidentyfikowali nabyte geny *bla*_{ACT-1}, które pierwotnie zlokalizowane były w chromosomie *E. asburiae* (6).

Grupa pAmpC obejmuje enzymy należące do jednej z kilku rodzin, wyodrębnionych na podstawie różnic w sekwencjach nukleotydowych genów *bla* tj. CMY, FOX, ACC, LAT, MIR, ACT, MOX i DHA. Te najczęściej występujące należą do rodzin CMY, DHA i FOX (20, 25, 31, 64, 66, 73, 79, 85).

Plazmidowo-kodowane cefalosporynazy AmpC są białkami o wielkości od 30 do 42 kDa. β -laktamazy te najczęściej posiadają punkt izoelektryczny (pI) mieszczący się w granicach 6.4 – 9.4. pAmpC należące do rodziny FOX charakteryzują się punktem izoelektrycznym w zakresie 6.4 -7.2 (46, 74).

Od lat 90-tych notuje się wzrastający udział plazmidowo-kodowanych AmpC u *Enterobacteriales* (53, 62, 66, 73, 80, 79). Najlepiej poznane i scharakteryzowane są, wywodzące się z chromosomalnie kodowanych cefalosporynaz *Citrobacter freundii* geny z rodziny CMY np. CMY-2, -4, -12, -14, -15 czy *Aeromonas hydrophila* np. CMY-1, -8, -9, -10, -19, które to według piśmiennictwa najczęściej występują u *P. mirabilis*, *E. coli* i *K. pneumoniae*. Zaś enzymy z rodziny DHA najczęściej występują u *K. pneumoniae*. Według danych piśmiennictwa, wariant CMY-2 jest najbardziej rozprzestrzeniony geograficznie (20, 25, 31, 66, 73, 85).

W Polsce, nabyte geny warunkujące wytwarzanie cefalosporynaz typu AmpC należących do rodzin CMY i DHA zostały zidentyfikowane m.in. u *P. mirabilis*, *E. coli* oraz *K. pneumoniae* (3, 29, 45, 57, 67). U izolatów *E. coli* stwierdzono występowanie genów pAmpC warunkujących wytwarzanie m.in. CMY-2, CMY-4, CMY-15, i DHA (1, 3, 29, 45, 67). Nabyte cefalosporynazy typu AmpC, należące do rodziny CMY (np. CMY-4, -12, -14 i -15), zostały zidentyfikowane w chromosomie izolatów *P. mirabilis*. Według badań przeprowadzanych przez Empel i wsp. najczęściej obserwowany był wariant CMY-15 (29, 57).

REGULACJA EKSPRESJI CEFALOSPORYNAZ TYPU AmpC

Podobnie jak cefalosporynazy naturalne, nabyte enzymy AmpC wykazują dwa rodzaje ekspresji, tj. indukcyjną bądź konstytutywną. Przykładowo, enzymy AmpC należące do rodziny DHA-1, DHA-2, ACT-1 czy CMY-13 są przeważnie eksprymowane w wyniku indukcji (ekspresja indukcyjna), podczas gdy CMY, MIR wytwarzane są zazwyczaj w sposób konstytutywny. U gatunków naturalnie posiadających geny *ampC*, w regulacji ich ekspresji znaczącą rolę odgrywają geny *ampR*, *ampD* oraz *ampG*. AmpR należy do czynników regulacyjnych transkrypcji, jego funkcją jest m.in. aktywacja transkrypcji genów *ampC*. Drugi ważny czynnik regulacyjny AmpD, kodowany jest przez gen *ampD*. Mutacje w genach *ampD* mogą prowadzić do ekspresji genów *ampC* na wysokim poziomie w sposób konstytutywny bądź indukcyjny. Warto zaznaczyć, że poziom ekspresji plazmidowo-przenoszonych genów *ampC* może mieć różny charakter, w zależności od tego czy gen *ampC* uległ przeniesieniu wraz z genami otaczającymi (np. genem *ampR*) (16, 51, 64, 76, 83, 89). Na przykład, Reisbig i wsp. (76), w swoich badaniach, że u mutantu *E. coli* AmpD⁻ wytwarzającego ACT-1 (*E. coli* ΔpACT-1), stwierdził od 2- do 16-krotny wzrost wartości MIC dla β-laktamów. Dane literaturowe wskazują, że poziom ekspresji genów *ampC*, w tym plazmidowo-przenoszonych genów *ampC*, może być bardzo zróżnicowany i zależeć od różnych czynników. Reisbig i wsp. (76), w przeprowadzonych badaniach, stwierdzili, że poziom ekspresji plazmidowych genów, zarówno indukowanych (*bla*_{ACT-1}), jak i konstytutywnie eksprymowanych (*bla*_{MIR-1}) jest odpowiednio 33 i 95 razy wyższy w porównaniu do chromosomalnie kodowanych genów *ampC* szczepu *Enterobacter cloacae* o dzikim fenotypie. Co więcej, badacze Ci odnotowali zwiększoną liczbą kopii genów *ampC* na plazmidzie (2 kopie genu *bla*_{ACT-1} i 12 kopi genu *bla*_{MIR-1}). Ponadto, badacze Ci stwierdzili, że, stosunek (ratio) poziomu ekspresji genów do liczby kopii *ampC* dla *bla*_{ACT-1} wynosił 17 zaś dla *bla*_{MIR-1} wynosił 8. Dodatkowo, wyższy poziom ekspresji genów *ampC*, Reisbig i wsp. (76, 77), wiąźali z mutacjami w sekwencji promotorów i genetyczną rearanzacją rejonu promotorowego w poszczególnych badanych genach.

Wyniki przytoczonych badań pokazują, że poziom ekspresji genów *ampC* może być bardzo zróżnicowany i zależeć od więcej niż jednego czynnika. Może to przekładać się na różny stopień oporności na antybiotyki β -laktamowe. Według Ding i wsp. (25) przeniesienie plazmidu zawierającego geny z rodziny DHA-1 z *K. pneumoniae* i *E. coli* do szczepu biorcy *E. coli* J53Az^R skutkowało 16-32 wzrostem wartości MIC cefoksytyny. Zjawisko to obserwowane było także przez innych badaczy (82, 85). Jest ono niezwykle istotne z klinicznego punktu widzenia, gdyż znacznie obniża możliwości terapeutyczne i sprzyja rozpowszechnianiu szczepów, w tym MDR (*Multidrug Resistance*) w środowisku szpitalnym.

OPORNOŚĆ TYPU AmpC U IZOLATÓW *E. COLI*

U *Escherichia coli* ekspresja genów *ampC* może być warunkowana trzema mechanizmami: konstytutywną ekspresją chromosomowych genów *ampC* na niskim poziomie; podwyższonym poziomem ekspresji chromosomowych genów *ampC* (hiperprodukcja) oraz wytwarzaniem nabytych β -laktamaz AmpC. W dzikich szczepach *E. coli* ekspresja chromosomowych genów *ampC* zachodzi w sposób konstytutywny, na niskim poziomie i podlega regulacji poprzez atenuację (47). Szczepy te nadal pozostają wrażliwe na antybiotyki β -laktamowe. Jednak, na skutek pojawienia się mutacji (np. w obrębie promotorów) pojawiają się szczepy *E. coli*, u których dochodzi do podwyższenia poziomu ekspresji chromosomowych genów *ampC*. U mutantów ekspresja genów *ampC* ma charakter konstytutywny, lecz na wyższym poziomie. Według niektórych autorów (47, 48) szczepy te mogą wykazywać oporność na wiele β -laktamów, w tym cefalosporyny trzeciej generacji.

Stosunkowo dawno wykazano, że w wyniku zmiany odległości pomiędzy sekwencją -35 box TTGTCA i sekwencją -10 box TACAAT w rejonie promotorowym *ampC* *E. coli*, może dochodzić do modyfikacji miejsca inicjacji transkrypcji i wzrostu poziomu ekspresji genów *ampC* (49, 71). Jednym z pierwszych opisanych mechanizmów nadekspresji genów *ampC* (hiperprodukcji) u *E. coli* była mutacja w rejonie promotora polegająca na insercji, która spowodowała zwiększenie odległości pomiędzy rejonem promotora -35 box TTGTCA a -10 box TACAAT, z 16 do 17 pz (40). Inne dane literaturowe opisywały insercje powodujące zwiększenie tego rejonu do 18 pz (68, 93). Przykładami omawianych wyżej wymienionych mutacji polegających na insercji są np. insercje w pozycji -13.1 i -13.2 (68). W rejonie promotorowym/atenuatora genów *ampC* może dochodzić do wbudowania sekwencji inercyjnych. Sekwencje te mogą prowadzić do powstania nowych „silnych” sekwencji promotorowych np. -35 box, bądź mogą przenosić inne silne sekwencje promotorowe. Przykładami takich sekwencji insercyjnych są: IS2, IS911 czy IS10 (49, 68).

Ponadto, w rejonie promotorowym genów *ampC* mogą występować tzw. mutacje „znaczące”, których częstym przykładem mogą być substytucje nukleotydów w pozycjach: -42 (C→T), -32 (T→A) czy -11 (C→T). Mutacja w pozycji -42 prowadzi do powstania alternatywnego regionu promotora -35 box. Mutacja -32 prowadzi do powstania nowego consensusu promotora -35 TTGTCA box (zmiana na TTGACA), mutacja -11 prowadzi do powstania nowego consensusu promotora -10 TACAAT box (zmiana na TATAAT), co w konsekwencji prowadzi do wzmocnienia siły/aktywności promotora (68, 93). Inne przykłady mutacji spotykanych w rejonie regulatorowym genów *ampC* dotyczą rejonu

spejsera pomiędzy -35 box i -10 box (21, 38, 39, 52, 53, 68). Co więcej, mutacjom „znaczącym”, często towarzyszą dodatkowe mutacje w pozycjach: -88, -82, -18, -1 bądź +58 (21, 38, 39, 52, 53, 68, 93). Ponadto, mutacje polegające na np. na substytucji nukleotydu, mogą również występować w rejonie atenuatora transkrypcji genów *ampC*. Mutacje te, wpływają na destabilizację mRNA struktury „szpilki do włosów”, co w konsekwencji może prowadzić do wzrostu ekspresji genów *ampC* (47). Według niektórych autorów (93), pojedyncze mutacje występujące w rejonie atenuatora, nie wpływają w sposób znaczący na wzrost ekspresji genów *ampC*.

Zdaniem niektórych autorów (39, 92), pomimo znaczącego zwiększenia poziomu ekspresji genów *ampC*, będącego skutkiem mutacji w obrębie rejonu promotora, nie obserwowali znaczących zmian w wartości MIC badanych cefalosporyn. Może to świadczyć o tym że, same zmiany poziomu ekspresji *ampC* nie zawsze wystarczają do efektywnej hydrolizy tzw. trudnych substratów. Sugeruje to, że poziom ekspresji genów chromosomalnych *ampC* może być bardzo zróżnicowany. Tak też *in vitro*, obok szczepów wysokoopornych na cefalosporyny (hiperprodukcja AmpC) mogą występować szczepy z zaledwie obniżoną wrażliwością.

ROZPRZESTRZENIANIE SIĘ GENÓW *ampC*

Geny warunkujące wytwarzanie pAmpC mogą być zlokalizowane na plazmidach koniugacyjnych (42, 81, 87). Dla przykładu, geny z rodziny DHA-1 znaleziono na plazmidzie koniugacyjnym pSAL1 *Salmonella enteritidis* (5, 32), geny z rodziny FOX-1 na plazmidzie koniugacyjnym pGLK1 *K. pneumoniae* (37). Według danych literaturowych, niektóre plazmidy przenoszące geny *ampC* mogą być niezdolne do koniugacji lecz mogą być one mobilizowane przez inne plazmidy koniugacyjne lub opornościowe.

Dane piśmiennictwa wskazują, iż oporność na cefoksytynę i cefalosporyny trzeciej generacji, związana z mechanizmem pAmpC, może być przenoszona na drodze koniugacji (7, 23, 34, 60, 81, 82, 86). Na przykład, *Singtohin* i wsp. (86), w swoich badaniach wykazali iż plazmidy niosące geny *bla*_{CMY-2} u ok. 54% badanych izolatów *E. coli* i *K. pneumoniae* były zdolne do koniugacyjnego transferu. We Francji *Decré* i wsp. (23) wykazali, że ze szczepów dawców posiadających geny *bla*_{CMY-2} lub *bla*_{CMY-4} na drodze koniugacyjnego transferu do biorcy zostaje przeniesiona oporność na cefoksytynę, cefotkasy i ceftazydym. Mając na uwadze spostrzeżenia innych autorów można przypuszczać, iż oporność na cefamycyny i cefalosporyny III generacji, związana z nabytym mechanizmem AmpC może być łatwo przekazywana do innych bakterii. Zjawisko to jest niezwykle istotne z klinicznego punktu widzenia, gdyż horyzontalne przeniesienie może skutkować nabyciem przez szczep dziki wysokiej oporności. Skutkiem czego, może być eliminacja wielu antybiotyków β-laktamowych, jako przydatnych w terapii. Ponadto, należy podkreślić, że horyzontalny transfer genów sprzyja rozpowszechnianiu szczepów, w tym MDR (ang. *Multidrug Resistance*) w środowisku szpitalnym. Co więcej, na ruchomych elementach genetycznych, w których zlokalizowane są geny warunkujące wytwarzanie pAmpC mogą znajdować się i podlegać wspólnej selekcji geny determinujące wytwarzanie innych β-laktamaz tj. ESBL oraz geny warunkujące oporność na inne grupy antybiotyków, jak fluorochinolony czy aminoglikozydy (3, 30, 78, 79).

Wielkość plazmidów przenoszących geny pAmpC, mieści się w zakresie od ok. 7 do ok. 400 kb (2, 3, 63, 74, 78, 87). Plazmidy przenoszące geny *ampC* mogą należeć do różnych grup niezgodności Inc (ang. *incompatibility*) np. IncFII czy IncI. Geny pAmpC znaleziono m.in. na plazmidach o szerokim zakresie gospodarza. Warunkuje to rozprzestrzenianie genów *ampC* nawet pomiędzy szczepami należącymi do różnych gatunków. Wyniki badań Alonso i wsp. (2) wskazują, że u izolatów *E. coli* posiadających geny CMY, najczęściej występowały plazmidy należące do grupy niezgodności IncII, zaś u izolatów posiadających geny DHA - IncF. Ponadto, wyniki analiz tych badaczy wykazały, że geny z rodziny CMY mogą być przenoszone na plazmidach o wielkości 40-185 kpz, zaś geny z rodziny DHA na dużych plazmidach o wielkości 70-185 kpz. Według obserwacji autorów (2, 19, 63, 78, 86), u *E. coli*, geny CMY zlokalizowane są w dużych plazmidach, o wielkościach w zakresie od ok. 40 do ponad 300 kpz. Na przykład, w Hiszpanii, Alonso i wsp. (2) u *E. coli*, zidentyfikowali geny z rodziny CMY zlokalizowane na plazmidach o wielkości od ok. 40 kpz do ok. 185 kpz. Także w Hiszpanii, Mata i wsp. (63), wykazali obecność genów *bla*_{CMY} u izolatów *E. coli* w dużych plazmidach o wielkościach od ok. 40 do ponad 400 kpz. Ponadto, wyniki badań uzyskane przez innych autorów (2, 19, 30, 63, 78) wskazują, że, geny z rodziny CMY u *E. coli* często zlokalizowane są w dużych plazmidach, należących do plazmidowych grup niezgodności: IncI, IncF, IncFII i IncK. Na przykład, Mata i wsp. (63) w swoich badaniach wykazali, że wśród *E. coli* CMY(+) kolekcjonowanych z terenu Hiszpanii, do najczęściej występujących replikonów plazmidowych należały: A/C, II, K, F, FIA czy FIB. W Polsce u izolatów *E. coli* stwierdzono występowanie genów pAmpC warunkujących wytwarzanie CMY-2, CMY-4 w plazmidach należących do grupy niezgodności IncX3 i IncC (3, 45).

Istotną rolę w rozprzestrzenianiu lekooporności u pałeczek *Enterobacterales* odgrywają mobilne elementy genetyczne takie jak integrony i kasyety genowe, często zlokalizowane na plazmidach koniugacyjnych bądź transpozonach. W obrębie integronów, u lekoopornych izolatów *Enterobacterales*, identyfikowano m.in. geny warunkujące oporność na antybiotyki β-laktamowe, aminoglikozydy czy trimetoprim. Wśród pałeczek *Enterobacterales* najpowszechniej występują integrony klasy 1 (18, 24, 44). Według danych piśmiennictwa, geny warunkujące pAmpC mogą być mobilizowane do transferu na mobilnych elementach takich jak transpozony czy integrony. Nabyte geny *ampC* tj.: *bla*_{DHA-1}, *bla*_{FOX-4}, *bla*_{CMY-1}, *bla*_{CMY-8} czy *bla*_{MOX-1} zostały znalezione na integronie klasy 1 (74, 94). Wyniki badań przeprowadzonych przez Mokracką i wsp. (67) wskazują, że w Polsce, w latach 1999-2001 oraz 2008-2010, nastąpił wzrost częstości występowania izolatów *E. coli* posiadających integrony z 31,6% do 80,7%. Jednocześnie Mokracka i wsp., w prowadzonych badaniach zaobserwowali wzrost częstości występowania pałeczek *E. coli* wykazujących oporność na różne grupy antybiotyków oraz wzrost częstości występowania genów kodujących wytwarzanie β-laktamaz. Co więcej, wchodząca w skład kompleksu integronu klasy 1, sekwencja insercyjna ISCR, odpowiada m.in. za transfer genów należących do rodziny DHA i MOX. Zaś sekwencja insercyjna IS26, składająca się z genu transpozazy *tnpA*, odpowiada m.in. za transfer genów z rodziny CMY (np. CMY-13) wraz z przylegającym czynnikiem regulującym transkrypcję - genem *ampR* (46, 74). Verdet i wsp. (94) w swoich badaniach wykazali, iż sekwencja insercyjna IS26 związana jest także z mobilizacją i transferem genów *bla*_{DHA-1}. Potwierdzają to także wyniki uzyskane

przez Zamorano i wsp. (97), wskazujące, iż u 86% izolatów *Enterobacteriaceae* posiadających geny *bla*_{DHA} były związane z sekwencją insercyjną IS26.

Za rozprzestrzenianie się pierwotnie chromosomalnie-kodowanych genów *ampC* odpowiedzialne są m.in. ruchome elementy genetyczne znajdujące się w plazmidach, takie jak sekwencja insercyjna *ISEcp1*. *ISEcp1* związana jest m.in. z transferem wielu wariantów chromosomalnych genów z rodziny CMY oraz niektórych wariantów genów AAC (22, 30, 46). Na przykład, sekwencję *ISEcp1* znaleziono m.in. w sąsiedztwie genów *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CMY-4}, *bla*_{CMY-7}, *bla*_{CMY-15}, *bla*_{CMY-31}, *bla*_{CMY-36} czy *bla*_{CMY-42} u *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis* czy *S. enterica* (22, 30, 39, 98). Nabyte geny np. *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CMY-4}, *bla*_{CMY-12}, *bla*_{CMY-14} czy *bla*_{CMY-36} związane z sekwencją *ISEcp1* (*ISEcp1-bla*_{CMY}) zostały znalezione w m.in. w genomie szczepów *P. mirabilis* wyizolowanych na terenie Polski, Włoch i Grecji. W Polsce, sekwencja *ISEcp1* została znaleziona 106 pz powyżej nabytych genów *bla*_{CMY-12}, *bla*_{CMY-4}, *bla*_{CMY-15} i *bla*_{CMY-14} u *P. mirabilis* (29, 57). Zaś D'Andrea i wsp. (22), określili pozycję *ISEcp1* 110 pz powyżej nabytych genów *bla*_{CMY-4}, *bla*_{CMY-12}, *bla*_{CMY-14}, *bla*_{CMY-15}, *bla*_{CMY-16} czy *bla*_{CMY-45} wbudowanych w genom *P. mirabilis*. Wyniki zarówno polskich jak i zagranicznych badaczy (22, 57) wskazują, że sekwencja *ISEcp1* związana jest z m.in. z mobilizacją pierwotnie chromosomalnych genów *ampC* *Citrobacter freundii* oraz towarzyszących im genów *b1c* i *sugE* i wbudowaniem ich w chromosomalne DNA *Proteus mirabilis*. Obecność genów *b1c* i *sugE* w genetycznym sąsiedztwie *bla*_{CMY} została także zidentyfikowana w genomie *Escherichia coli* (30, 41).

PODSUMOWANIE

Oporność na antybiotyki β-laktamowe związana z wytwarzaniem cefalosporynaz AmpC u *Escherichia coli* jest problemem złożonym. U *E. coli* wytwarzanie cefalosporynaz AmpC może być uwarunkowane konstytutywną ekspresją chromosomowych genów *ampC* na niskim poziomie. Na skutek pojawienia się mutacji w rejonie promotorowym *ampC* pojawiają się szczepy *E. coli*, u których dochodzi do konstytutywnego, podwyższonego poziomu ekspresji chromosomalnych genów *ampC*, co sprzyja selekcji izolatów opornych na antybiotyki β-laktamowe, w tym cefalosporyny. Ponadto, istotna jest obecność nabytych β-laktamaz pAmpC z indywidualnym systemem regulacji ekspresji. Geny kodujące pAmpC zwykle są przenoszone na ruchomych elementach genetycznych, takich jak plazmidy, przez co rośnie potencjał szybkiego przekazywania genów warunkujących pAmpC pomiędzy różnymi gatunkami pałeczek *Enterobacterales*.

PIŚMIENNICTWO

1. Adamus-Bialek W., Baraniak A., Wawszczak M. i inni. The genetic background of antibiotic resistance among clinical uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Mol Biol Rep* 2018; 45:1055-65.
2. Alonso N., Miró E., Pascual V. i inni. Molecular characterisation of acquired and overproduced chromosomal blaAmpC in *Escherichia coli* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2016; 47: 62-8.

3. Baraniak A., Machulska M., Żabicka D. i inni. NDM-PL Study Group. Towards endemicity: large-scale expansion of the NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 lineage in Poland, 2015-16. *J Antimicrob Chemother* 2019; 74: 3199-204.
4. Barnaud G., Arlet G., Danglot C., Philippon A. Cloning and sequencing of the gene encoding the AmpC beta-lactamase of *Morganella morganii*. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 148: 15-20.
5. Barnaud G., Arlet G., Verdet C. i inni. Salmonella enteritidis: AmpC plasmid-mediated inducible beta-lactamase (DHA-1) with an ampR gene from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2352-8.
6. Bradford P.A., Urban C., Mariano N. i inni. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 563-9.
7. Bauernfeind A., Stemmlinger I., Jungwirth R., Giamarellou H. Characterization of the plasmidic β -lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother* 1996; 40: 221-4.
8. Bauernfeind A., Schneider I., Jungwirth R. i inni. A Novel Type of AmpC β -Lactamase, ACC-1, Produced by a *Klebsiella pneumoniae* Strain Causing Nosocomial Pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1924-31.
9. Bauernfeind A., Chong Y., Schweighart S. Extended broad spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection* 1989; 17:316-21.
10. Bollestad M., Vik I., Grude N., Blix H.S., i inni. Bacteriology in uncomplicated urinary tract infections in Norwegian general practice from 2001-2015. *BJGP Open* 2017; 4:1(4).
11. Brenwald N.P., Jevons G., Andrews J. i inni. Disc methods for detecting AmpC β -lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 600-1.
12. Bush K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr Opin Microbiol* 2010; 13: 558-64. Lub Bush K. Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Crit Care* 2010; 14:224.
13. Bush K., Bradford P.A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016; 1:6 (8).
14. Bush, K., Jacoby G.A., Medeiros A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother* 1995; 39:1211-1233.
15. Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62 (10).
16. Carrasco-López C., Rojas-Altuve A., Zhang W. i inni. Crystal structures of bacterial peptidoglycan amidase AmpD and an unprecedented activation mechanism. *J Biol Chem.* 2011; 286: 31714-22.
17. Chen P.L., Ko W.C., Wu C.J. Complexity of β -lactamases among clinical *Aeromonas* isolates and its clinical implications. *J Microbiol Immunol Infect* 2012; 45: 398-403.

18. Chen C.M., C.L., Wu H.J, Wu L.T. Genetic characteristic of class 1 integrons in *Proteus mirabilis* isolates from urine samples. Biomedicine (Taipei) 2017; 7: 9.
19. Chérif T., Saidani M., Decré D. i inni. Cooccurrence of Multiple AmpC β -Lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* in Tunisia. Antimicrob Agents Chemother 2016; 60: 44-51.
20. Compain F., Decré D., Fulgencio J.P. 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.
21. Corvec S., Prodhomme A., Giraudeau C. i inni. Most *Escherichia coli* strains over-producing chromosomal AmpC beta-lactamase belong to phylogenetic group A. J Antimicrob Chemother 2007; 60: 872-6.
22. D'Andrea M.M., Literacka E., Zioga A. i inni. Evolution and spread of a multidrug-resistant *Proteus mirabilis* clone with chromosomal AmpC-type cephalosporinases in Europe. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55: 2735-42.
23. Decré D., Verdet C., Raskine L. i wsp. Characterization of CMY-type beta-lactamases in clinical strains of *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in four hospitals in the Paris area. J Antimicrob Chemother 2002; 50: 681-8.
24. Deng Y., Bao X., Ji L. i inni. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2015; 20: 14-45.
25. 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.
26. Doi Y., Paterson D.L., Adams-Haduch J.M. i inni. Reduced susceptibility to cefepime among clinical isolates producing novel variants of CMY-2 β -lactamase. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 3159–61.
27. Dzierżanowska D. Antybiotykoterapia praktyczna. Alfa-Medica Press. Wydanie VI. Bielsko-Biała 2018.
28. EARS-Net Annual Reports. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2018. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (www.ecdc.europa.eu).
29. Empel J., Baraniak A., Literacka E. i inni. Beta-PL Study Group. 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: 2449-54.
30. Feng Y., Yang P., Xie Y. i inni. *Escherichia coli* of sequence type 3835 carrying bla_{NDM-1}, bla_{CTX-M-15}, bla_{CMY-42} and bla SHV-12. Sci Rep 2015; 21: 12275.
31. Freitas F., Machado E., Ribeiro T.G., Novais Á., Peixe L. Long-term dissemination of acquired AmpC β -lactamases among *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* in Portuguese clinical settings. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014; 33: 551-8.
32. Gaillot O., Clément C., Simonet M., Philippon A. Novel transferable beta-lactam resistance with cephalosporinase characteristics in *Salmonella enteritidis*. J Antimicrob Chemother 1997; 39: 85-7.
33. Galleni M., Lindberg F., i inni. Sequence and comparative analysis of three *Enterobacter cloacae* ampC beta-lactamase genes and their products. Biochem J 1988 Mar 15; 250: 753-60.

34. Gharout-Sait A., Touati A., Guillard T. i inni. Molecular characterization and epidemiology of cefoxitin resistance among *Enterobacteriaceae* 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.
35. Girlich D., Naas T., Bellais S. i inni. Heterogeneity of AmpC cephalosporinases of *Hafnia alvei* clinical isolates expressing inducible or constitutive ceftazidime resistance phenotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 A;44: 3220-3.
36. Girlich D., Karim A., Spicq C., Nordmann P. Plasmid-mediated cephalosporinase ACC-1 in clinical isolates of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000 B; 19: 893-5.
37. Gonzalez Leiza M., Perez-Diaz J.C., Ayala J. i inni. Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase with two molecular variants. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 2150-7.
38. Gude M.J., Seral C., Sáenz Y. i inni. Evaluation of four phenotypic methods to detect plasmid-mediated AmpC β -lactamases in clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 2037-43.
39. Haldorsen B., Aasnaes B., Dahl K.H. i inni. The AmpC phenotype in Norwegian clinical isolates of *Escherichia coli* is associated with an acquired ISEcp1-like *ampC* element or hyperproduction of the endogenous AmpC. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 694-702.
40. Hawley D. K., McClure W.R. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 1983; 11: 2237-55.
41. Hentschke M., Kotsakis S.D., Wolters M. i inni. CMY-42, a novel plasmid-mediated CMY-2 variant AmpC beta-lactamase. *Microb Drug Resist* 2011;17: 165-9.
42. Horii T., Arakawa Y., Ohta M. i inni. Characterization of a plasmid-borne and constitutively expressed bla_{MOX-1} gene encoding AmpC-type β -lactamase. *Gene* 1994; 139: 93-8.
43. Hryniewicz W., Mészáros J. Antybiotyki w profilaktyce i leczeniu zakażeń: Wydaw. Lekarskie PZWL. Warszawa 2001.
44. Hsu S.C., Chiu T.H., Pang J.C. i inni. Characterization of antimicrobial resistance patterns and class 1 integrons among *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis isolates isolated from humans and swine in Taiwan. *Int J Antimicrob Ag* 2006; 27: 383-91.
45. Izdebski R., Baraniak A., Żabicka D. i inni. *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases in Poland, 2013-January 2017. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Mar 1;73(3)
46. Jacoby G.A. AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 161-82.
47. Jaurin B., Grundstrom T., Edlund T. i inni. The *E. coli* β -lactamase attenuator mediates growth rate-dependent regulation. *Nature*. 1981;290: 221-5.
48. Jaurin B., Grundstrom T., Normark S. Sequence elements determining *ampC* promoter strength in *E. coli*. *EMBO J*; 1982; 1: 875-81.
49. Jaurin B., Normark S. Insertion of IS2 creates a novel *ampC* promoter in *Escherichia coli*. *Cell* 1983;32: 809-16.

50. Kim K.S. Human Meningitis-Associated *Escherichia coli*. EcoSal Plus 2016;7(1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0015-2015. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0015-201510>.
51. Lee M., Zhang W., Hessek D. i inni. Bacterial AmpD at the crossroads of peptidoglycan recycling and manifestation of antibiotic resistance. J Am Chem Soc. 2009 131: 8742-3.
52. Lewis J.A., Moore P.C., Arnold D.L. i inni. Multi-locus sequence typing of *Escherichia coli* isolates with acquired ampC genes and ampC promoter mutations. Diagn Microbiol Infect Dis 2016; 86(3):265-267.
53. Li Y.Y., Cassidy F., Salmon A., Keating D. i inni. Detection and epidemiology of plasmid-mediated AmpC β -lactamase producing *Escherichia coli* in two Irish tertiary care hospitals. J Glob Antimicrob Resist 2015; 3: 242-246.
54. Lindberg F., Normark S. Sequence of the *Citrobacter freundii* 0S60 chromosomal ampC beta-lactamase gene. Eur J Biochem 1986; 156: 441-5.
55. Livermore D.M. Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. Eur J Clin Microbiol 1987; 6: 439-45.
56. Livermore D.M. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 557-84.
57. Literacka E., Empel J., Baraniak A. i inni. Four variants of the *Citrobacter freundii* AmpC-Type cephalosporinases, including novel enzymes CMY-14 and CMY-15, in a *Proteus mirabilis* clone widespread in Poland. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 4136-43.
58. Lodge J.M., Minchin S.D., Piddock L.J. i inni. Cloning, sequencing and analysis of the structural gene and regulatory region of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal ampC beta-lactamase. Biochem J 1990; 272: 627-31.
59. Malmartel A., Ghasarossian C. Epidemiology of urinary tract infections, bacterial species and resistances in primary care in France. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2016; 35: 447-51.
60. Manageiro V., Ferreira E., Pinto M. i inni. Two novel CMY-2-type β -lactamases encountered in clinical *Escherichia coli* isolates. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2015; 14:12.
61. Markiewicz Z., Kwiatkowski Z.A. Bakterie, antybiotyki, lekooporność. Wydawnictwo Naukowe PWN. Wydanie I. Warszawa 2012.
62. Mata C., Miró E., Riviera A. i inni. Prevalence of acquired AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal ampC genes at a Spanish hospital from 1999 to 2007. Clin Microbiol Infect 2010; 16: 472 – 6.
63. Mata C., Miró E., Alvarado A. i inni. Plasmid typing and genetic context of AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal ampC genes: findings from a Spanish hospital 1999-2007. J Antimicrob Chemother 2012; 67: 115-22.
64. Meini S., Tascini C., Cei M. i inni. AmpC β -lactamase-producing *Enterobacterales*: what a clinician should know. Infection 2019; 47: 363-75.
65. Miró E., Mirelis B., Navarro F. i inni. *Escherichia coli* producing an ACC-1 class C beta-lactamase isolated in Barcelona, Spain. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 866-7.

66. Miró E., Agüero J., Larrosa M.N., Fernández A. 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.
67. Mokracka J., Oszyńska A., Kaznowski A. Increased frequency of integrons and β -lactamase-coding genes among extraintestinal *Escherichia coli* isolated with a 7-year interval. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2013; 103: 163-74.
68. Mulvey M.R., Bryce E., Boyd D.A., Ofner-Agostini M. i inni. Paton S. Molecular characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* from Canadian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 358-65.
69. Nadjar D., Rouveau M., Verdet C. i inni. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing transferable AmpC-type beta-lactamase (ACC-1) originating from *Hafnia alvei*. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 187: 35-40.
70. Nomura K., Yoshida T. Nucleotide sequence of the *Serratia marcescens* SR50 chromosomal ampC beta-lactamase gene. *FEMS Microbiol Lett* 1990; 58: 295-9.
71. Olsson O., Bergström S., Lindberg F.P., Normark S. ampC beta-lactamase hyperproduction in *Escherichia coli*: natural ampicillin resistance generated by horizontal chromosomal DNA transfer from *Shigella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 7556-60.
72. Papanicolaou G. A., Medeiros A. A., Jacoby G. A. Novel plasmidmediated β -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and α -methoxy β -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 2200-9.
73. Park M.J., Kim T.K., 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.
74. Philippon A., Arlet G., Jacoby G.A. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1-11.
75. Pires J., Taracila M., Bethel C.R. i inni. In vivo evolution of CMY-2 to CMY-33 β -lactamase in *Escherichia coli* ST131: characterization of an acquired extended-spectrum AmpC (ESAC) conferring resistance to cefepime. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 7483-8.
76. Reisbig M.D., Hossain A., Hanson N.D. Factors influencing gene expression and resistance for Gram-negative organisms expressing plasmid-encoded ampC genes of *Enterobacter* origin. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1141-51.
77. Reisbig M.D., Hanson N.D. Promoter sequences necessary for high-level expression of the plasmid-associated ampC betalactamase gene blaMIR-1. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4177-82.
78. Ribeiro T.G., Novais Á., Rodrigues C. i inni. Dynamics of clonal and plasmid backgrounds of *Enterobacteriaceae* producing acquired AmpC in Portuguese clinical settings over time. *Int J Antimicrob Agents* 2019; 53: 650-6.
79. Rizi K.S., Mosavat A., Youssefi M. i inni. High prevalence of bla_{CMY} AmpC beta-lactamase in ESBL co-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates in the northeast of Iran. *J Glob Antimicrob Resist* 2020; 22: 477-82.

80. Roche C., Boo T.W., Walsh F. i inni. Detection and molecular characterisation of plasmidic AmpC β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary-care hospital in Dublin, Ireland. Clin Microbiol Infect 2008; 14: 616–8.
81. Santiago G.S., Gonçalves D., da Silva Coelho I. i inni. Conjugative plasmidic AmpC detected in *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae* human clinical isolates from Portugal. Braz J Microbiol 2020; 51: 1807-12.
82. Sasirekha B., Shivakumar S. Occurrence of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases Among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in a Tertiary Care Hospital in Bangalore. Indian J Microbiol 2012; 52: 174-9.
83. Schmidtke A.J., Hanson N.D. Model system to evaluate the effect of *ampD* mutations on AmpC-mediated beta-lactam resistance. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 2030-7.
84. Seoane A., Francia M.V., García Lobo J.M. Nucleotide sequence of the ampC-ampR region from the chromosome of *Yersinia enterocolitica*. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 1049-52.
85. Shi W.F., Zhou J., Qin J.P. 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.
86. 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.
87. Stapleton, P. D., Shannon K. P., French G. L. Carbapenem resistance in *Escherichia coli* associated with plasmid-determined CMY-4 β -lactamase production and loss of an outer membrane protein. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1206–10.
88. Stefaniuk E., Suchocka U., Bosacka K. i inni. Etiology and antibiotic susceptibility of bacterial pathogens responsible for community-acquired urinary tract infections in Poland. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2016; 35: 1363-9.
89. Tamma P.D., Doi Y., Bonomo R.A. i inni. Antibacterial Resistance Leadership Group. A Primer on AmpC Beta-Lactamases: Necessary Knowledge for an Increasingly Multidrug-Resistant World. Clin Infect Dis 2019; Mar 6. pii: ciz173. doi: 10.1093/cid/ciz173.
90. Thomson K.S., Sanders C.C., Washington JA II. Ceftazidime resistance in *Hafnia alvei*. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37: 1375-6.
91. Thomson K.S. Extender-spectrum- β -lactamase, AmpC and carbapenemase issues. J Clin Microbiol 2010; 48: 1019-25.
92. Tracz D.M., Boyd D.A., Bryden L. i inni. Increase in ampC promoter strength due to mutations and deletion of the attenuator in a clinical isolate of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* as determined by RT-PCR. J Antimicrob Chemother 2005; 55: 768-72.
93. Tracz D.M., Boyd D.A., Hizon R. i inni. Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. *ampC* gene expression in promoter mutants of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. FEMS Microbiol Lett 2007; 270: 265-71.
94. Verdet C., Benzerara Y., Gautier V. i inni. Emergence of DHA-1-producing *Klebsiella* spp. in the Parisian region: genetic organization of the ampC and ampR genes originating from *Morganella morganii*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 607-17.

95. *Walsh T.R., Stunt R.A., Nabi J.A. i inni.* Distribution and expression of β -lactamase genes among *Aeromonas* spp. *J. Antimicrob. Chemother* 1997; 40: 171-8.
96. *Walther-Rasmussen J., Høiby N.* Plasmid-borne AmpC beta-lactamases. *Can J Microbiol* 2002; 48: 479-93.
97. *Zamorano L., Miró E., Juan C. i inni.* Mobile genetic elements related to the diffusion of plasmid-mediated AmpC β -lactamases or carbapenemases from *Enterobacteriaceae*: findings from a multicenter study in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 5260-6.
98. *Zioga A., Whichard J.M., Kotsakis S.D. i inni.* CMY-31 and CMY-36 cephalosporinases encoded by ColE1-like plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 1256-9.

Otrzymano: 27 VIII 2021 r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH-Państwowy Instytut Badawczy