

Sebastian Niestępski¹, Monika Harnisz^{1*}, Ewa Korzeniewska¹,
Adriana Osińska¹, Bartłomiej Dziuba²

¹Katedra Mikrobiologii Środowiskowej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
²Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wpłynęło w czerwcu 2016 r.
Zaakceptowano w październiku 2016 r.

1. Wstęp. 2. Systematyka bakterii z rodzaju *Bacteroides*. 3. Znaczenie kliniczne *Bacteroides* spp. 4. Oporność na leki u *Bacteroides* spp. 4.1. Bakterie z rodzaju *Bacteroides* jako rezerwuar determinantów oporności. 4.2. Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe. 5. Metody określania lekowrażliwości. 6. Podsumowanie

***Bacteroides* spp. – clinical significance, antibiotic resistance and identification methods**

Abstract: Anaerobic *Bacteroides* species are dominant microbiota of the digestive tract of mammals. Along with other symbiotic bacteria located in the gastrointestinal tract, they contribute to the proper functioning of the organism. Some *Bacteroides* species are highly pathogenic. Virulence of these bacteria is related to their polysaccharide capsule, lipopolysaccharide and a variety of enzymes and enterotoxin. In recent years, an increase of antibiotic resistance in *Bacteroides* spp. has been noted, therefore the changes to the antibiotic resistance patterns in these bacteria should be monitored. This study summarizes the current knowledge about the bacteria of *Bacteroides* species.

1. Introduction. 2. Taxonomy of *Bacteroides* species. 3. Clinical significance of *Bacteroides* spp. 4. Antibiotic resistance. 4.1. *Bacteroides* species as a reservoir of antimicrobial resistance determinants. 4.2. Antimicrobial resistance. 5. Methods of drug resistance determination. 6. Summary

Słowa kluczowe: antybiotykooporność, *Bacteroides*, chorobotwórczość

Key words: antibiotic resistance, *Bacteroides*, pathogenicity

1. Wstęp

Bakterie z rodzaju *Bacteroides* są bakteriami beztlenowymi, stanowiącymi dominującą mikrobiotę przewodu pokarmowego ssaków. Wraz z innymi bakteriami symbiotycznymi, znajdującymi się w przewodzie pokarmowym, przyczyniają się do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Biorą udział w koordynacji układu immunologicznego, pobudzaniu motoryki przewodu pokarmowego oraz przekształcaniu steroidów i kwasów żółciowych; zapobiegają też osiedlaniu się bakterii patogennych. Bakterie z rodzaju *Bacteroides* występują także w obrębie jamy ustnej, górnych odcinków układu oddechowego oraz w układzie moczowo-płciowym kobiet.

Niektóre gatunki z rodzaju *Bacteroides* zaliczane są do potencjalnych patogenów, np. *B. fragilis* jest oportunistycznym patogenem człowieka, wywołującym zakażenia jamy otrzewnej, przewodu pokarmowego oraz zapalenia wyrostka robaczkowego przez wytworzenie ropnia. Ponadto u *Bacteroides* spp. wykrywa się coraz częściej geny oporności na antybiotyki, co może stwarzać zagrożenie dla zdrowia ludzi.

2. Systematyka bakterii z rodzaju *Bacteroides*

Taksonomia rodzaju *Bacteroides* uległa w ostatnich latach wielu zmianom. Początkowo do tego rodzaju zaliczane były wszystkie ściśle beztlenowe, Gram-

-ujemne pałeczki, nie wytwarzające przetrwalników, które nie należały do *Fusobacterium* spp. czy *Leptotrichia* spp. Zmieniona systematyka *Bacteroides* i rodzajów spokrewnionych opiera się na analizach filogenetycznych sekwencji genu 16S rDNA i została przedstawiona w drugim wydaniu podręcznika „Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” [32].

Poniżej przedstawiono szczegółową systematykę rodzaju *Bacteroides*.

Królestwo: *Bacteria*

Gromada: *Bacteroidetes*

Klasa: *Bacteroidia*

Rząd: *Bacteroidales*

Rodzina: *Bacteroidaceae*

Rodzaj: *Bacteroides*

Gatunki: *Bacteroides acidifaciens*, *B. caccie*, *B. coprocola*, *B. coprosuis*, *B. dorei*, *B. eggerthii*, *B. fragilis*, *B. finegoldii*, *B. helcogenes*, *B. intestinalis*, *B. massiliensis*, *B. nordii*, *B. ovatus*, *B. plebius*, *B. pyogenes*, *B. salyeriae*, *B. stercoris*, *B. suis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*, *B. vulgatus*.

W 2006 roku z rodzaju *Bacteroides* wyodrębniono też nowy rodzaj nazwany *Parabacteroides*. W obrębie tego rodzaju znalazły wówczas miejsce następujące gatunki *P. distasonis*, *P. goldsteinii* i *P. merdae* [55]. W kolejnych latach rodzaj ten został uzupełniony

* Autor korespondencyjny: Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 2, 10-719 Olsztyn; Katedra Mikrobiologii Środowiskowej, ul. Prawocheńskiego 1, 10-720 Olsztyn; tel. 89 523 45 57; e-mail: monika.harnisz@uwm.edu.pl

o kolejne gatunki: *P. chartae*, *P. chinchillae*, *P. faecis*, *P. gordonii* i *P. Johnsonie* [56]. Gatunki te są fenotypowo bardzo zbliżone do *Bacteroides*, lecz różne, biorąc pod uwagę odległości filogenetyczne.

W obrębie rodzaju *Bacteroides* oraz *Parabacteroides* wyróżniana jest „grupa *Bacteroides fragilis*”. Grupa ta była wcześniej klasyfikowana jako podgatunek *B. fragilis* (tj. *B. f. ssp. fragilis*, *B. f. ssp. distasonis*, *B. f. ssp. ovatus*, *B. f. ssp. thetaiotaomicron* i *B. f. ssp. vulgatus*). Obecnie na podstawie badań homologii DNA bakterie należące do tej grupy zostały przeklasyfikowane do odrębnych gatunków [2]. Pomimo przegrupowania tych bakterii, grupa *B. fragilis* nie została rozwiązana. Bakterie należące do tej grupy są najczęściej izolowanymi beztlenowymi mikroorganizmami z zainfekowanych tkanek. Dotyczy to w szczególności gatunku *B. fragilis*, który stanowi od 41% do 78% izolatów tej grupy [62].

Śledzenie zmian systematyki w obrębie rodzaju *Bacteroides* jest ważne, ponieważ do przeprowadzenia prawidłowej diagnostyki mikrobiologicznej niezbędna jest znajomość aktualnej taksonomii bakterii. Wiedza ta może być pomocna w wyznaczaniu potencjału wirulencji czy oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe badanych bakterii.

3. Znaczenie kliniczne *Bacteroides* spp.

Bakterie beztlenowe często uczestniczą w zakażeniach różnych układów oraz narządów u człowieka. Spośród wszystkich bakterii beztlenowych, bakterie z rodzaju *Bacteroides* są patogenami najczęściej izolowanymi z próbek klinicznych [45]. Rodzaj *Bacteroides* zazwyczaj dzieli się na dwie grupy bakterii – grupę *B. fragilis* oraz grupę zawierającą pozostałe bakterie z tego rodzaju. Pierwsza grupa zawiera istotne klinicznie gatunki, często wykrywane w zakażeniach wywołanych przez bakterie beztlenowe tj. *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *B. distasoni* oraz *B. vulgatus*. Druga grupa również zawiera kilka niebezpiecznych dla zdrowia gatunków np.: *B. ureolyticus* oraz *B. forsythus*. Zasadniczo wszystkie zakażenia spowodowane bakteriami *Bacteroides* spp. są endogenne, tzn. wywołują je szczepy obecne w organizmie pacjenta przed rozpoczęciem procesu patofizjologicznego, który prowadzi do zakażenia klinicznego [16]. *B. vulgatus* i *B. thetaiotaomicron* są najbardziej rozpowszechnionymi organizmami z rodzaju *Bacteroides* w okrężnicy człowieka. Jednakże od pacjentów z zakażeniami jamy brzusznej lub/i bakteriami najczęściej izolowanym gatunkiem tego rodzaju jest *B. fragilis*, który stanowi jedynie około 0,5% mikrobioty w jelitach człowieka [16]. Ta różnica pomiędzy występowaniem w jelitach a częstością izolacji z próbek klinicznych od pacjentów z zakażeniem

sugeruje, że niektóre gatunki *Bacteroides*, w tym *B. fragilis*, posiadają klinicznie istotne czynniki wirulencji.

Czynniki wirulencji dzieli się na trzy kategorie związane z: 1) udziałem w adherencji do tkanek gospodarza, 2) ochroną przed odpowiedzią immunologiczną (np. przed fagocytozą) oraz 3) niszczeniem tkanek.

Do czynników związanych z pierwszą grupą można zaliczyć wytwarzanie otoczki wielocukrowej, śluzu powierzchniowego oraz obecność fimbrii. U *B. fragilis* fimbrie i aglutyniny pełnią podobne funkcje jak adhezyny i umożliwiają bakterii przebywanie w tkankach gospodarza. Otoczka wielocukrowa *B. fragilis* jest odpowiedzialna za inicjację wytworzenia ropni i nie zawsze występuje u szczepów klinicznych *Bacteroides* [71].

Do czynników wirulencji związanych z unikaniem odpowiedzi systemu immunologicznego zalicza się występowanie otoczki, lipopolisacharydów oraz posiadanie szeregu zróżnicowanych enzymów. Lipopolisacharyd *B. fragilis* ma niezwykłą strukturę. Ma on budowę podobną do LPS bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, jednak występują różnice w budowie lipidu A. Różnica ta powoduje, że jest on od 10 do 1000 razy mniej toksyczny niż ten występujący u *E. coli* [70]. Przykładem enzymu związanego z wirulencją *Bacteroides* spp. jest neuraminidaza. Do produkcji tego enzymu są predysponowane *B. fragilis*. Neuraminidaza pozwala tym bakteriom nie tylko unikać odpowiedzi immunologicznej, ale ma swój udział także w adherencji do tkanek gospodarza oraz ich niszczeniu. Innymi enzymami związanymi z brakiem odpowiedzi systemu immunologicznego mogą być kolagenaza, fibrylizyna, hialuronidaza, chondroitynaza, heparynaza, lecytynaza, deoksyrybonukleazy, lipazy oraz fosfolipazy.

Niektóre szczepy gatunku *B. fragilis* wytwarzają enterotoksynę fragilizynę (*B. fragilis* enterotoxin – BFT). Toksyna ta jest metaloproteazą zależną od cynku. Szczepy, u których ona występuje nazywane są enterotoksycznymi *B. fragilis* (ETBF). Występują trzy izotypy BFT, które są kodowane przez geny *bft*: *bft-1*, *bft-2* oraz *bft-3*. Geny te występują w unikalnych dla tych szczepów odcinkach genomu i są nazywane wyspami zjadliwości [58]. BFT oddziałuje na białko powierzchniowe komórek eukariotycznych E-kadherynę, która odpowiada za przyleganie komórek. Fragilizyna umożliwia bakteriom hydrolizę wiązania peptydowego kadheryny, w następstwie czego zwiększa się przepuszczalność nabłonka jelitowego dla toksyn oraz innych antygenów. Działanie to może być przyczyną biegunek [73]. BFT indukuje cyklooksygenazę 2, która ulega aktywacji w czasie reakcji zapalnej i powoduje wydzielanie płynów w komórkach nabłonka jelit [30]. Ponadto fragilizyna jest czynnikiem stymulującym powstawanie nowotworów jelita grubego [67].

Schorzeniami wywołanymi przez *Bacteroides* spp. w obrębie jamy brzusznej są m.in.: ropnie wątroby,

trzustki, nerek, jajników oraz jajowodów. W układzie oddechowym bakterie te mogą powodować zakażenia zatok oraz płuc i opłucnej. Pęknięcie ropni może spowodować przedostanie się bakterii do krwi, co prowadzi do bakteriemii oraz rozległej infekcji organizmu. Obecności *Bacteroides* spp. przypisuje się również zakażenia innych narządów tj. mózgu, kości, szpiku oraz tkanek miękkich [29].

4. Oporność na leki u *Bacteroides* spp.

4.1. Bakterie z rodzaju *Bacteroides* jako rezerwuar determinantów oporności

Bakterie z rodzaju *Bacteroides*, izolowane z mikrobioty ludzkiej okrężnicy, mogą stanowić rezerwuar determinantów oporności (genów lekooporności). Mobilizacja i horyzontalny transfer genów (HGT) w jelitach stwarzają potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzi [68]. Mogą one być przekazywane znacznie bardziej zjadliwym bakteriom, występujących tylko okresowo w jelitach, np. bakteriom układu oddechowego, takim jak *Klebsiella pneumoniae* [43] czy *Acinetobacter baumannii* [9, 21, 27]. W ten sposób bakterie przechodzące przez jelita, zamiast na drodze mutacji i doboru naturalnego, uzyskują geny oporności na leki poprzez HTG [54, 59]. Ta genetyczna „elastyczność” umożliwia przekazywanie genów oporności między gatunkami bakterii w sposób nieprzewidywalny i sugeruje, że poziom wielolekooporności może nadal wzrastać [22]. U bakterii beztlenowych, występujących w jelitach człowieka, powszechnie stwierdza się oporność na tetracykliny, erytromycynę, leki β-laktamowe czy fluorochinolony. Związane jest to z rozpowszechnieniem najbardziej typowych markerów oporności, do których zaliczyć można geny *tet(Q)*, *ermF*, *cepA*, *cfxA* oraz *cfiA* [37, 68] oraz mniej powszechne geny *tet(X)*, *tet(X1)* i *bexA* [66]. Wexler [71] opisuje wzrost występowania u *Bacteroides* genu oporności na tetracyklinę *tet(Q)* z około 30% do ponad 80%, przy czym allele *tet(Q)* u różnych gatunków *Bacteroides* są w 96–100% identyczne na poziomie sekwencji DNA. Tenże autor stwierdza również wzrost występowania genu *erm* z poziomu > 2 do 23%.

Badania, sprawdzające transfer genów między gatunkami bakterii, są retrospektywne i polegają na porównaniu sekwencji DNA determinantów oporności różnych gatunków bakterii np. występujących w ludzkim jelicie grubym. Jeśli geny znajdujące się u różnych gatunków są w >95% identyczne, przyjmuje się, że gen został przeniesiony poprzez horyzontalny transfer z jednego gatunku do drugiego. Porównanie sekwencji genów *erm* izolowanych z bakterii, które albo nie bytują na stałe w ludzkiej okrężnicy (*Streptococcus pneumoniae*) albo

występują tam w niewielkich ilościach (*Clostridium perfringens* i *Enterococcus faecalis*), z genami wykrytymi u *Bacteroides* spp. wskazują, że nastąpił transfer genów (bezpośredni lub pośredni) między tymi gatunkami [59]. Elementy zawierające geny oporności są bardzo stabilne, nawet w przypadku braku występowania presji antybiotykami [57]. Jednym z mechanizmów utrzymania ich stabilności może być organizacja genów w integrony, gdzie determinanty oporności na antybiotyki występują w tym samym integronie co enzymy, które zapewniają korzyści dla bakterii (np. zdolność do skutecznej kolonizacji). Zatem badania potencjału mobilizacji, ekspresji genów oporności na środki przeciwbakteryjne oraz ich transferu między bakteriami występującymi w jelitach, w tym *Bacteroides* spp., są konieczne do oceny ich znaczenia jako rezerwuaru genów z ekologicznego i klinicznego punktu widzenia.

4.2. Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe

W ciągu ostatnich dziesięcioleci obserwuje się wzrost częstości występowania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe oraz genów oporności na antybiotyki. W roku 2001 w Indiach wyizolowano pierwszy oporny na metronidazol szczep *Bacteroides fragilis* [8], 10 lat później w Europie izolowano szczepy tych bakterii posiadające gen *cfiA*, który jest odpowiedzialny za oporność na kabapenemy [24]. W roku 2016 Sóki i współpracownicy opisali szczepy *Bacteroides fragilis* odporne na 7 antybiotyków [63]. Narastanie zjawiska niewrażliwości na leki prawdopodobnie związane jest z zwiększoną presją tych związków [4, 41]. Kliniczne szczepy *Bacteroides* spp. wykazują wzrastającą oporność na wiele antybiotyków, w tym na cefoksytynę, klindamycynę, metronidazol, karbapenemy oraz fluorochinolony (np. gatifloksacynę, lewofloksacynę i moksyflokscynę). Tylko najnowszej generacji fluorochinolony np. sitafloksacyna, klinafloksacyna i garenoksacyna, wykazują zazwyczaj wyższą aktywność względem *Bacteroides* spp. [60].

Antybiotyki β-laktamowe. Antybiotyki β-laktamowe stanowią największą i najbardziej zróżnicowaną grupę leków przeciwdrobnoustrojowych, stosowanych w leczeniu prawie wszystkich rodzajów zakażeń [42]. Leki β-laktamowe uznawane są za bardzo aktywne środki przeciwko *B. fragilis* [62]. Mechanizm działania środków β-laktamowych polega na hamowaniu działania enzymów biosyntezy ściany komórkowej tych bakterii (peptydoglikanu), tzw. białek PBP (Penicillin-Binding Proteins). Mechanizmy oporności bakterii na te antybiotyki są warunkowane przez cztery strategie: 1) syntezę PBP o niskim powinowactwie do środków β-laktamowych; 2) zmniejszanie przepuszczalności błon komórkowych bakterii; 3) aktywne wypompowywanie leków z komórki bakteryjnej; 4) produkcję

β -laktamaz tj. enzymów hydrolizujących cząsteczki β -laktamów [42]. U *Bacteroides* spp. występują wszystkie te strategie oporności.

Najbardziej rozpowszechnionym mechanizmem oporności na środki β -laktamowe jest produkcja enzymu, należącego do β -laktamaz, cefalosporynazy klasy 2e. Kodowany jest on przez umiejscowiony chromosomalnie gen *cepA* [13, 25]. Enzym ten, hydrolizujący cefalosporyny (z wyjątkiem cefoksytyny) oraz penicyliny, występuje w niemal wszystkich gatunków *Bacteroides* spp. [53]. Jego wytwarzanie jest hamowane przez najpowszechniej stosowane inhibitory β -laktamaz tj. sulbaktam, kwas klawulanowy i tazobaktam, a środki zawierające te inhibitory są aktywne wobec szczepów wytwarzających β -laktamazę. Oporność na cefoksytynę warunkowana jest przez gen *cfxA* [13]. Jego ekspresja może być zależna od obecności struktur IS [64]. Gen *cfxA* u *B. vulgatus* jest odległym homologiem genu *cepA* *B. fragilis* [53].

Struktura antybiotyków β -laktamowych ułatwia ich wiązanie z miejscem aktywnym PBP. Wykazanie korelacji między aktywnością β -laktamu i powinowactwem PBP u *B. fragilis* jest trudne. Do niedawna większość badań prowadzono poprzez znakowanie komórek lub ekstraktów komórkowych znacznikami przeciwbakteryjnymi i analizę wyników za pomocą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecylu sodu (SDS) [11]. Zsekwencjonowanie całego genomu *B. fragilis* pozwoliło na pełniejszą analizę struktur tej bakterii, dzięki czemu zidentyfikowano siedem domniemanych genów kodujących PBP. Sekwencje genów dla homologów najbliższych do PBP *E. coli* w genomie *B. fragilis* (*pbp1abBfr*, *pbp1cBfr*, *pbpABfr*, *pbpBBfr*, *pbp4Bfr* i *pbp7Bfr*), opracowano odpowiednio na podstawie ortologów genów *ponBEco*, *pbpCEco*, *pbpAEco*, *pbpBEco*, *dacBEc* oraz *pbpGEco* występujących u *E. coli* [49].

Pomimo powyższych trudności Georgopapadakou i wsp. [19] potwierdzili związek pomiędzy zmniejszonym powinowactwem związków β -laktamowych i PBP u *Bacteroides* a ich opornością na działanie tych leków. U opornych szczepów *B. fragilis* zaobserwowano zmniejszone powinowactwo PBP (80 kDa) do imipenemu, piperacyliny, cefoperazonu, cefotaksymu i ceftazydymu. Zmiany w PBP, głównie w PBP1 lub/i PBP2, są powiązane z innymi niż β -laktamazowe mechanizmy oporności na cefoksytynę u cefoksytynoopornych mutantów gatunków *B. fragilis* [48]. Fang i wsp. [17] stwierdzili, że powinowactwo kompleksu PBP1 (86 kDa) pochodzącego z *B. thetaiotaomicron* do cefoksytyny i piperacyliny jest > 100-krotnie i ~ 70-krotnie mniejsze, w porównaniu z ich działaniem na macierzysty szczep wrażliwy. Ponadto, autorzy wykazują, że ortolog genu *E. coli* PBP3 (*pbpBBfr*, kodującego białko PBP2Bfr) jest zaangażowany w wiązanie imipenemu [1, 49].

Karbapenemy. Karbapenemy należą do związków β -laktamowych, ale ze względu na odmienną strukturę, często są traktowane jako odrębna grupa antybiotyków. Oporność bakterii na te leki jest rzadko spotykana. Pomimo, że notuje się wzrost oporności na te środki, to karbapenemy uważa się za jedne z najbardziej aktywnych leków wobec *B. fragilis* [62]. Oporność na te środki przeciwdrobnoustrojowe warunkuje ekspresja genów *cfiA* oraz *ccrA* kodujących m.in. syntezę enzymu metalo- β -laktamazy klasy B [13, 35]. Geny te nadają bakteriom oporność zarówno na karbapenemy, β -laktamy oraz β -laktamy ze środkami zawierającymi inhibitory β -laktamaz. Niektóre szczepy *Bacteroides* spp. zawierają „milczące” geny karbapenemaz, a ich poziom ekspresji jest zależny od promotora zawierającego sekwencje insercyjne (IS) powyżej sekwencji genu *cfiA/ccrA* [64, 71]. Innym mechanizmem oporności na karbapenemy mogłyby być zmiany w budowie białek wiążących penicylinę (PBP) i białek porynowych, umożliwiających przenikanie karbapenemom do komórki [1]. Badania szczepów bakterii wielolekoopornych, izolowanych z próbek klinicznych, prowadzone przez Pumbwe i in. [50] wykazały, że zwiększona czynność pomp do aktywnego usuwania antybiotyków z komórki bakterii, może być przyczyną oporności na karbapenemy.

Aminoglikozydy. Aminoglikozydy są inhibitorami syntezy białka, które wiążą się z podjednostką 30S rybosomu bakteryjnego. Wychwyt tego leku wymaga łańcucha tleno- lub azotano-zależnego transportu elektronów, którego brakuje u bakterii z rodzaju *Bacteroides* [7]. Pomimo tego, zauważa się u tych bakterii podwyższony poziom oporności na te związki [33].

Makrolidy, linkozamidy i chloramfenikol. Antybiotyki makrolidowe (np. erytromycyna) hamują syntezę białek przez wiązanie się z cząsteczką 23S rRNA (w podjednostce 50S) rybosomu bakteryjnego, blokując wyjście rosnącego łańcucha peptydowego. Linkozamidy (np. klindamycyna) również wiążą się z podjednostką 50S rybosomu [71]. Oporność na klindamycynę, powszechnie stosowanego w ciągu ostatnich lat leku przeciw bakteriom beztlenowym, wykazuje ciągle tendencję wzrostową [62]. Niewrażliwość na te antybiotyki kodowana jest przez różne geny, do których należą głównie geny *ermB*, *ermF* i *ermG*. Gen *linAn2* nadaje oporność na linkomycynę i erytromycynę; natomiast geny *mrsSA* oraz *mefA* pośredniczą w nabywaniu oporności na makrolidy i linkozamidy [13]. Geny te są zbliżone do genów, występujących u mikroorganizmów Gram-dodatnich, wywołujących oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B poprzez metylację rybosomu. Ekspresja genów należących do grupy *erm* może być zwiększona dzięki aktywności sekwencji insercyjnych [64].

Chloramfenikol wiąże się z rybosomalną transferazą peptydową zapobiegając w ten sposób biosyntezie

białek. Enzym acetylotransferaza chloramfenikolu przenosi grupy acetylowe z acetylo-koenzymu A do pierwszorzędowych grup hydroksylowych chloramfenikolu w pozycji C-6, zapobiegając wiązaniu się zmodyfikowanego antybiotyku z rybosomem i jego oddziaływaniem na komórkę bakterii [5]. Badania poziomu oporności bakterii z rodzaju *Bacteroides* na chloramfenikol prowadzone w szpitalach w Stanach Zjednoczonych, nie wykazały występowania *Bacteroides* spp. opornych na ten związek przeciwbakteryjny [61].

Tetracykliny. Tetracykliny hamują syntezę białek bakteryjnych poprzez blokowanie przyłączania kompleksów tRNA-aminokwas do rybosomów. Środek ten był kiedyś stosowany jako antybiotyk pierwszego wyboru w leczeniu zakażeń wywołanych przez bakterie beztlenowe, a wszystkie izolowane szczepy *Bacteroides* spp. w 1950 roku były na niego wrażliwe [20]. Antybiotyk ten pozostawał skutecznym środkiem przeciw bakteriom beztlenowym aż do roku 1970 [31]. Obecnie, prawie wszystkie kliniczne izolaty *Bacteroides* spp. (>80–90%) są tetracyklinooporne [3, 66, 71]. Jednym z mechanizmów tetracyklinooporności, opisywanym u *B. fragilis*, jest aktywne usuwanie leku z komórki bakterii za pomocą pomp tzw. effluksu [52]. Odmianą strategię oporności na tetracykliny warunkuje gen *tet(Q)*. Koduje on cytoplazmatyczne białko, które wchodzi w interakcję z rybosomem bakterii, przez co zablokowane jest działanie leku na bakterie [52]. Mechanizm ten jest najbardziej rozpowszechnionym u *Bacteroides* spp. typem oporności na te antybiotyki [34]. Innymi genami warunkującymi oporność na tetracykliny, wykrywanych u ścisłych beztlenowców np. *Bacteroides* spp., są geny *tet(X)* oraz dwa jego ortologi *tet(X1)* oraz *tet(X2)*. Geny te u *Bacteroides* spp. są często związane z plazmidami i transpozonomi. Warunkują one enzymatyczną inaktywację tetracykliny [52]. Gen *tet(X)* umiejscowiony jest na transpozonomach Tn4351 oraz Tn4400 i koduje enzym oksydoreduktazę zależną od FAD i NADPH, która inaktywuje tetracykliny w obecności tlenu [74]. Geny *tet(X1)* oraz *tet(X2)* zidentyfikowano na transpozonie koniugacyjnym CTnDOT wraz z genem *ermF* [72].

Nitroimidazole. Metronidazol jest powszechnie stosowanym środkiem w leczeniu zakażeń beztlenowych. Oporność *Bacteroides* spp. na metronidazol jest rzadko wykrywana, przy czym nie można wykluczyć, że dzieje się tak ze względu na przesiewowy sposób wykrywania beztlenowców. Prawdziwa częstotliwość występowania oporności na metronidazol u *B. fragilis* może być znacznie wyższa niż przyjmowana [69].

Oporność na te środki jest zazwyczaj spowodowana zmianami w genach *nim* i genach z nimi związanych (na przykład w strukturach IS) [13, 64, 65]. Gen *nim* niekiedy bywa „milczący”, ale może zostać aktywowany przez elementy IS [23]. Cztery geny *nim* (*nimA-D*) mogą

wystąpić w każdym gatunku *Bacteroides*. Każdy z tych genów jest związany z odrębnym ruchomym mobilnym elementem genetycznym, jak również każdy z nich ma specyficzny aktywujący element IS [23, 36]. Obecność genu *nim* nie jest jednoznaczna z opornością bakterii na metronidazol na poziomie leczenia klinicznego. W niektórych przypadkach, gen ten może ulegać ekspresji na niskim poziomie lub pozostać nieaktywny [18].

Chinolony. Leki z tej grupy działają poprzez hamowanie dwóch specyficznych enzymów – gyrazy DNA i topoizomerazy IV, które uczestniczą w replikacji DNA bakterii. Mutacje tych genów są najczęstszą przyczyną oporności na chinolony. Mutacje genu *gyrA*, powodujące oporność na fluorochinolony u *B. fragilis*, zostały określone w pozycjach hot-spot 82 i 86 (równoważne z pozycjami 83 i 87 u *E. coli*) [44, 51]. Substytucje w genach *gyrB*, *parC* i *parE* są dotychczas rzadkością u *B. fragilis* i nie są dobrze poznane. Bakterie te mogą także stać się odporne na chinolony poprzez zwiększenie ich eksportu na zewnątrz komórki. Miyamae i in. [38] znaleźli mechanizm czynnego usuwania norfloksacyny z komórki u *B. fragilis* i sugerują, że mechanizm ten jest katalizowany przez pompę podobną do NorA/Bmr. Ponadto, u *B. thetaiotaomicron* stwierdzono występowanie MATE – systemu aktywnego usuwania wielu leków (m.in. fluorochinolonów i aminoglikozydów) z komórki bakterii np. białko BexA, które jest odpowiedzialne za eksport fluorochinolonów i bromku etyldyny z komórki [13, 39, 47]. U szczepów pochodzenia klinicznego i laboratoryjnego wykazano również oporność na chinolony związaną ze wzrostem aktywności pomp z rodziny RND [50]. Rodzina transporterów RND to pompy wielolekowe, szeroko rozpowszechnione u bakterii Gram-ujemnych [47]. Między innymi Snyderman i in. [62] wykazali wzrost oporności bakterii z rodzaju *Bacteroides* na moksyflokscynę z grupy fluorochinolonów.

Zwiększające się z roku na rok wykorzystywanie antybiotyków w leczeniu ludzi i zwierząt powoduje, że bakterie coraz szybciej zmniejszają swoją wrażliwość na leki. Dlatego konieczne jest dalsze zgłębianie wiedzy na temat lekooporności u bakterii, szczególnie u tych wykazujących cechy zjadliwości jak *Bacteroides* spp.

4. Metody określania lekowrażliwości

Określenie wrażliwości bakterii beztlenowych na antybiotyki jest jednym z elementów rozpoznania i leczenia chorób przez niewywołanych. Istnieje wiele metod badania antybiotykooporności. Do najczęściej stosowanych należą metody oparte na hodowli bakterii *in vitro*. Do tych badań zalicza się metodę seryjnych rozcieńczeń antybiotyku w podłożu stałym lub płynnym oraz testy oparte na dyfuzji antybiotyków

do podłoża – antybiogram oraz Epsilometer test. Istnieje też druga grupa coraz powszechniej stosowanych metod, niezależnych od hodowli. Zalicza się do niej metody molekularne oparte m.in. na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), ilościowej reakcji PCR (qPCR), a także metagenomikę. W niniejszej pracy zostały opisane wybrane metody, najczęściej stosowane do oznaczania antybiotykooporności bakterii.

Metody oparte na hodowli bakterii w porównaniu z badaniami molekularnymi są stosunkowo niedrogi i proste w wykonaniu. Jednakże tylko znikomy procent bakterii można namnażać w warunkach laboratoryjnych.

Opisane poniżej metody hodowlane służą do określenia minimalnych stężeń inhibitujących (MIC) – czyli najniższego stężenia antybiotyku, w którym bakterie przestają rosnąć. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) co roku przedstawia wykaz leków stosowanych przeciwko poszczególnym grupom bakterii wraz z wartościami MIC i ich interpretacją. EUCAST do zwalczania beztlenowych bakterii Gram-ujemnych proponuje stosowanie następujących leków: penicyliny benzylowej, ampicyliny, amoksycyliny, piperacyliny, tikarcyliny, doripenemu, ertapenemu, imipenemu, meropenemu, klindamycyny, chloramfenikolu oraz metronidazolu [15]. Rozkłady wartości MIC tych antybiotyków dla bakterii z grupy *Bacteroides fragilis* zostały przedstawione w tabeli I [15].

Metoda rozcieńczeń w agarze polega na wprowadzeniu różnych stężeń środka przeciwbakteryjnego do pożywki z agarem odżywczym (*Brucella* agar z krwią) z dodatkiem heminy oraz witaminy K, która następnie zaszczipiana jest normalizowaną liczbą komórek badanych drobnoustrojów. Płytki odczytywane są po 48 godzinach inkubacji poprzez porównanie wizualnie wzrostu bakterii z różnych szczepów i serii rozcieńczeń oraz określenie MIC [6].

Metoda rozcieńczeń w pożywce płynnej polega na dodaniu do kolejnych dołków, zawierających płynną pożywkę *Brucella* bulion z krwią, seryjnych 2-krotnych rozcieńczeń leku, a następnie zaszczipienie ich przygotowanym roztworem komórek bakteryjnych. Do tej metody wykorzystuje się specjalne płytki z tworzywa sztucznego lub tace. Wartości MIC są odczytywane po 48 godzinach inkubacji. Zaletą tej metody jest możliwość badania w jednym czasie wielu antybiotyków. Jednakże technika ta jest ograniczona przez słaby wzrost bakterii beztlenowych wrażliwych na tlen, i obecnie zatwierdzona przez Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) do badania tylko bakterii z grupy *B. fragilis* [10].

Do zalet tych dwóch metod należy stosunkowo niski koszt badania, a także duża dokładność i powtarzalność wyników. Do wad natomiast należy zaliczyć dużą

praco- i czasochłonność, spowodowaną koniecznością wykonania rozcieńczeń oraz ręcznego zaszczipienia bakteriami każdej płytki czy dołka z pożywką [10, 46].

Epsilometer test (E-test) jest to metoda gradientowo-dyfuzyjna, umożliwiająca określenie MIC oraz wartości granicznej. Zasada testu opiera się na dyfuzji ze specjalnego plastikowego paska, powlekanego środkiem przeciwdrobnoustrojowym w wrastającym gradientie stężeń, do podłoża agarowego uprzednio zaszczipionego badanym szczepem. Dla bakterii beztlenowych najczęściej stosowanym podłożem w tej technice jest *Brucella* agar z krwią z dodatkiem heminy i witaminy K. Wyniki odczytuje się po inkubacji poprzez sprawdzenie symetrycznej elipsoidalnej strefy hamowania wzrostu wzdłuż paska. Wartość MIC określa się sprawdzając na skali paska, miejsce, w którym taśma przecina się ze strefą zahamowanego wzrostu [14]. Zaletą tej metody jest możliwość dokładnego ustalenia stopnia oporności mikroorganizmu na dany lek. Test ten jest jednak stosunkowo drogi. E-test, tak jak antybiogram, nie został jeszcze uznany za standardową metodę badania lekowrażliwości bakterii beztlenowych, pomimo że wyniki wielu badań są porównywalne z wynikami jakie uzyskuje się stosując metodę rozcieńczeń w agarze [6, 10, 40].

Metody molekularne wykazują wysoką specyficzność, a także umożliwiają badanie wszystkich bakterii obecnych w próbkach. Jednakże są one nadal dużo droższe od metod opartych na hodowli oraz nie są standaryzowane. Pomimo tego, wykorzystanie metod molekularnych do badania oporności bakterii na antybiotyki staje się obecnie coraz bardziej powszechne.

Metody molekularne opierają się na wykryciu genów warunkujących oporność bakterii na antybiotyki, np. genów *cepA*, *cfxA*, *cifA* czy też *tet(X)* kodujących oporność odpowiednio na penicyliny, cefalomycynę, karbapenemy i tetracykliny. W szczególnych przypadkach, tak jak to ma częściowo miejsce u *Bacteroides* sp., geny te mogą być uśpione, a ich aktywność jest zależna od występowania sekwencji insercyjnych [66]. W celu wykrycia genów oporności na antybiotyki stosuje się reakcje PCR i qPCR. Wykorzystują one działanie enzymu polimerazy DNA do amplifikacji (wielokrotnego kopiowania) sekwencji genów oporności. Aby reakcja przebiegła prawidłowo, konieczne jest użycie specyficznych starterów przyłączających się do analizowanego DNA w miejscu przed i za sekwencją genu. Na przykład w celu wykrycia genu *cifA* wykorzystuje się startery GBI-1 and GBI-2 [28]. Aby badać profil lekooporności konkretnego rodzaju czy gatunku bakterii konieczne jest wyizolowanie DNA z badanego materiału, a następnie przeprowadzenie reakcji PCR czy qPCR. Reakcja PCR pozwala tylko określić jakościowo występowanie analizowanych genów w badanym materiale DNA. Natomiast qPCR

Tabela I
 Procentowy rozkład MIC antybiotyków stosowanych w leczeniu chorób wywołanych przez bakterie z grupy *Bacteroides fragilis*
 na podstawie [15]

związek \ dawka w mg/l	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	n
Amoksycyлина	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,7	3,4	4,0	2,8	1,8	1,1	6,3	22,4	24,2	6,5	26,2	0,0	0,0	1568
Ampicylina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	2,2	2,9	7,1	25,8	33,9	5,9	4,0	9,4	7,5	1289
Penicylina benzylowa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,2	0,2	1,9	1,7	8,6	15,4	28,4	13,4	17,8	3,6	5,8	3,2	591
Klindamycyna	0,0	0,0	0,1	0,2	2,2	10,2	7,5	10,0	16,4	12,5	9,4	5,9	2,1	0,3	0,5	1,0	0,6	4,7	16,4	1777
Dorypenem	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	1,4	10,9	57,7	17,1	4,9	2,9	1,9	1,6	1,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	515
Ertapenem	0,0	0,0	0,0	0,0	11,6	0,0	0,7	20,4	24,5	12,9	12,2	11,6	4,8	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	147
Imipenem	0,0	0,1	0,7	3,0	13,6	18,1	24,2	17,2	12,7	6,2	2,2	0,5	0,3	0,1	0,2	0,3	0,3	0,0	0,0	2082
Meropenem	0,0	0,0	0,0	9,2	2,6	8,8	19,0	32,0	13,7	6,0	4,3	1,9	0,4	0,6	0,9	0,0	0,6	0,0	0,0	532
Metronidazol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	1,1	3,3	7,7	19,4	44,7	16,8	3,8	1,1	0,6	0,1	0,4	0,1	0,0	0,0	3160
Piperacylina	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1	0,9	1,7	2,9	3,5	6,4	13,4	10,6	11,2	15,8	10,7	7,8	5,6	7,8	1,3	1063
Piperacylina-tazobaktam	0,0	0,0	0,1	0,7	0,4	4,3	8,8	16,7	7,9	9,9	13,1	10,6	8,5	4,7	5,0	8,0	0,5	0,6	0,2	3498
Tikarcylina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,6	0,3	0,6	0,9	1,5	5,0	24,2	24,5	13,3	10,9	6,0	11,5	1275
Tikarcylina – kwas klawulanowy	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	22,4	17,6	15,5	9,5	8,6	8,6	4,8	4,6	1,0	0,6	1,1	0,9	0,9	1226

n – ilość badanych szczepów z grupy *Bacteroides fragilis*

ponadto umożliwia ilościowe określenie obecności genów w materiale biologicznym czy też badanie ekspresji genów lekooporności.

Inną, bardziej postępową, metodą określania antybiotykkooporności bakterii, jest **metagenomika**. Polega ona na bezpośrednim klonowaniu materiału genetycznego izolowanego z próbek badawczych, a następnie jego sekwencjonowaniu i funkcjonalnej analizie. Metoda ta umożliwia np. stosunkowo szybkie określenie występowania jednocześnie wszystkich genów oporności na leki, a także wielu innych genów obecnych w analizowanej próbce. Technika ta, do prawidłowego działania, wymaga stworzenia rzetelnej bazy danych zawierającej informacje o genomach gatunków referencyjnych np. GenBank, PubMed czy Entrez. Metoda ta została wykorzystana przez Hu i in. [26] do wykrycia genów lekooporności ludzkiej mikrobioty jelitowej. Wykorzystując narzędzie bioinformatyczne BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) opisano 4,1 mln genów bakterii jelitowych, z czego 1093 genów odpowiedzialnych było za oporność na antybiotyki.

Metoda ta, ze względu na spadek kosztów sekwencjonowania DNA i rozszerzającą się bazę danych, będzie sukcesywnie wypierać tradycyjne metody badawcze oparte na hodowli bakterii w warunkach *in vitro* [12].

7. Podsumowanie

Beztlenowe bakterie z rodzaju *Bacteroides* są najliczniejszą grupą bakterii w przewodzie pokarmowym ssaków. Stanowią ważny element w prawidłowym funkcjonowaniu układu pokarmowego. Niektóre gatunki bakterii z rodzaju *Bacteroides* wykazują silne właściwości chorobotwórcze, które są związane z obecnością otoczki polisacharydowej, lipopolisacharydów, możliwością wytwarzania różnorodnych enzymów oraz enterotoksyny fragilizyny. W ostatnich latach zauważa się wzrost oporności *Bacteroides* spp. na wiele grup antybiotyków i coraz częściej stwierdza się konieczność monitoringu zmian profilu lekooporności tych bakterii. Niniejsza praca stanowi podsumowanie aktualnej wiedzy na temat bakterii z rodzaju *Bacteroides*.

Piśmiennictwo

1. Ayala J., Quesada A., Vadillo S., Criado J. Piriz S.: Penicillin-binding proteins of *Bacteroides fragilis* and their role in the resistance to imipenem of clinical isolates. *J. Med. Microbiol.* **54**, 1055–1064 (2005)
2. Baron E.J., Allen S.D.: Should clinical laboratories adopt new taxonomic changes? If so, when? *Clin. Infect. Dis.* **16**, 449–450 (1993)
3. Bartha N.A., Soki J., Edit U., Nagy E.: Investigation of the prevalence of *tetQ*, *tetX* and *tetX1* genes in *Bacteroides* strains with elevated tigecycline minimum inhibitory concentrations. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **38**, 522–525 (2011)
4. Boyanova L., Kolarov R., Mitov I.: Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades. *Anaerobe*, **31**, 4–10 (2015)
5. Britz M.L., Wilkinson R.G.: Chloramphenicol acetyl-transferase of *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**, 105–111 (1978)
6. Brook I., Wexler H.M., Goldstein E.J.: Antianaerobic antimicrobials: spectrum and susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 526–546 (2013)
7. Bryan L.E., Kowand S.K., Van Den Elzen H.M.: Mechanism of aminoglycoside antibiotic resistance in anaerobic bacteria: *Clostridium perfringens* and *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **15**, 7–13 (1979)
8. Chaudhry R., Mathur P., Dhawan B., Kumar L.: Emergence of metronidazole-resistant *Bacteroides fragilis*, India. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 485–486 (2001)
9. Cisneros J. M., Rodriguez-Bano J., Fernandez-Cuenca F., Ribera A., Vila J., Pascual A., Martinez-Martinez L., Bou G., Pachon J.: Risk-factors for the acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain: a nationwide study. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**, 874–879 (2005)
10. Wayne P.A.: Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard. CLSI publication number M11-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007
11. Edwards R.: Resistance to beta-lactam antibiotics in *Bacteroides* spp. *J. Med. Microbiol.* **46**, 979–986 (1997)
12. Eisen J.A.: Environmental shotgun sequencing: its potential and challenges for studying the hidden world of microbes. *PLoS Bio.* **5**, 82 (2007)
13. Eitel Z., Soki J., Urban E., Nagy E.: The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries. *Anaerobe*, **21**, 43–49 (2013)
14. Engberg J., Neimann J., Nielsen E.M., Aerestrup F.M., Fussing V.: Quinolone-resistant *Campylobacter* infections: risk factors and clinical consequences. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 1056–1063 (2004)
15. EUCAST Website, <http://www.eucast.org> (21 czerwca 2016 roku)
16. Falagas M.E., Siakavellas E.: *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* species: a review of antibiotic resistance and therapeutic options. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **15**, 1–9 (2000)
17. Fang H., Edlund C., Nord C.E., Hedberg M.: Selection of cefoxitin-resistant *Bacteroides thetaiotaomicron* mutants and mechanisms involved in beta-lactam resistance. *Clin. Infect. Dis.* **35**, 47–53 (2002)
18. Gal M., Brazier J.S.: Metronidazole resistance in *Bacteroides* spp. carrying *nim* genes and the selection of slow-growing metronidazole resistant mutants. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**, 109–116 (2004)
19. Georgopapadakou N.H., Smith S.A., Sykes R.B.: Penicillin binding proteins in *Bacteroides fragilis*. *J. Antibiot.* **36**, 907–910 (1983)
20. Gillespie W.A., Guy J.: *Bacteroides* in intra-abdominal sepsis. *Lancet*, **270**, 1039–1041 (1956)
21. Goh B.K., Alkouder G., Lama T.K., Tan C.E.: Multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* intra-abdominal abscess. *Surg. Infect.* **6**, 345–347 (2005)
22. Gootz T.D. The forgotten Gram-negative bacilli: what genetic determinants are telling us about the spread of antibiotic resistance. *Biochem. Pharmacol.* **71**, 1073–1084 (2006)
23. Haggoud A., Reyssset G., Azeddoug H., Sebald M.: Nucleotide sequence analysis of two 5-nitroimidazole resistance determinants from *Bacteroides* strains and of a new insertion sequence upstream of the two genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1047–1051 (1994)

24. Hartmeyer G.N., Sóki J., Nagy E., Justesen U.S.: Multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* group on the rise in Europe? *J. Med. Microbiol.* **61**, 1784–1788 (2012)
25. Hecht D.W.: Anaerobes: antibiotic resistance, clinical significance, and the role of susceptibility testing. *Anaerobe*, **12**, 115–121 (2006)
26. Hu Y., Meng, Z. i wsp.: Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nature Com.* **4** (2013)
27. Jain R., Danziger L.H.: Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. *Ann. Pharmacother.* **38**, 1449–1459 (2004)
28. Kato N., Yamazoe K., Han C.-G., Ohtsubo E.: New insertion sequence elements in the upstream region of *cfiA* in imipenem-resistant *Bacteroides fragilis* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 979–985 (2003)
29. Kierzkowska M., Majewska A., Sawicka-Grzelak A., Młynarczyk G.: Pałeczki Gram-ujemne beztlenowo rosnące – diagnostyka i znaczenie kliniczne. *Post. Mikrobiol.* **55**, 91–98 (2016)
30. Kim J.M., Lee J.Y., Yoon Y.M., Oh Y.K., Kang J.S., Kim Y.J., Kim K.H.: *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces cyclooxygenase-2 and fluid secretion in intestinal epithelial cells through NF-kappa B activation. *Eur. J. Immunol.* **36**, 2446–2456 (2006)
31. Kislak J.W.: The susceptibility of *Bacteroides fragilis* to 24 antibiotics. *J. Infect. Dis.* **125**, 295–298 (1972)
32. Krieg NR, Ludwig W, Euzeby JP, Whitman WB. Phylum XIV. *Bacteroidetes* phyl. nov. (w) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, red. W. Whitman, Springer, New York, 2011, s. 25–41
33. Lacombe-Anttoneli A., Piriz S., Vadillo S.: In vitro antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from caprine footrot. *Acta Vet. Hung.* **55**, 11–20 (2007)
34. Leng Z., Riley D.E., Berger R.E., Krieger J.N., Roberts M.C.: Distribution and mobility of the tetracycline resistance determinant *tet Q*. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**, 551–559 (1997)
35. Livermore D.M., Woodford N.: Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 489–495 (2000)
36. Lofmark S., Fang H., Hedberg M., Edlund C.: Inducible metronidazole resistance and *nim* genes in clinical *Bacteroides fragilis* group isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1253–1256 (2005)
37. Lorenzo M., Garcia N., Alfonso Ayala J., Vadillo S., Piriz S., Quesada A.: Antimicrobial resistance determinants among anaerobic bacteria isolated from footrot. *Vet. Microbiology*, **157**, 112–118 (2012)
38. Miyamae S., Nikaido H., Tanaka Y., Yoshimura F.: Active Efflux of norfloxacin by *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2119–2121 (1998)
39. Miyamae S., Ueda O., Yoshimura F., Hwang J., Tanaka Y., Nikaido H.: A MATE family multidrug efflux transporter pumps out fluoroquinolones in *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3341–3346 (2001)
40. Nagy E., Justesen U.S., Eitel Z., Urbán E.: Development of EUCAST disk diffusion method for susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group isolates. *Anaerobe*, **31**, 65–71 (2015)
41. Nagy E., Urban E., Nord C.E.: Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 371–379 (2011)
42. Nikonow E., Baraniak A., Gniadkowski M.: Oporność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* na antybiotyki β -laktamowe wynikająca z wytwarzania β -laktamaz. *Post. Mikrobiol.* **52**, 261–271 (2013)
43. Ogawa W., Li D.W., Yu P., Begum A., Mizushima T., Kuroda T., Tsuchiya T.: Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae* MGH78578 and cloning of genes responsible for the resistance. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 1505–1508 (2005)
44. Oh H., El Amin N., Davies T., Appelbaum P.C., Edlund C.: *gyrA* mutations associated with quinolone resistance in *Bacteroides fragilis* group strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1977–1981 (2001)
45. Papaparaskevas J., Katsandri A., Pantazatou A., Stefanou I., Avlami A., Legakis N., Tsakris A.: Epidemiological characteristics of infections caused by *Bacteroides*, *Prevotella* and *Fusobacterium* species: A prospective observational study. *Anaerobe*, **17**, 113–117 (2011)
46. Parija S.C.: Textbook of microbiology and immunology. Elsevier Health Sciences, New Delhi, 2014
47. Piddock L.J.V. Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance. *Nature Rev. Microbiol.* **4**, 629–636 (2006)
48. Piddock L.J.V., Wise R.: Cefoxitin resistance in *Bacteroides* species: evidence indicating two mechanisms causing decreased susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* **19**, 161–170 (1987)
49. Piriz S., Vadillo S., Quesada A., Criado J., Cerrato R., Ayala J.: Relationship between penicillin-binding protein patterns and beta-lactamases in clinical isolates of *Bacteroides fragilis* with different susceptibility to beta-lactam antibiotics. *J. Med. Microbiol.* **53**, 213–221 (2004)
50. Pumbwe L., Wareham D.W., Aduse-Opoku J., Brazier J.S., Wexler H.M.: Genetic analysis of mechanisms of multidrug resistance in a clinical isolate of *Bacteroides fragilis*. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 183–189 (2007)
51. Ricci V., Peterson M.L., Rotschafer J.C., Wexler H., Piddock L.J.: Role of topoisomerase mutations and efflux in fluoroquinolone resistance of *Bacteroides fragilis* clinical isolates and laboratory mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1344–1346 (2004)
52. Roberts M.C.: Update on acquired tetracycline resistant genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **245**, 195–203 (2005)
53. Rogers M.B., Parker A.C., Smith C.J.: Cloning and characterization of the endogenous cephalosporinase gene, *cepA*, from *Bacteroides fragilis* reveals a new subgroup of Ambler class A beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 2391–2400 (1993)
54. Sachs J.: Are antibiotics killing us? *Discover*, **26**, 36 (2005)
55. Sakamoto M., Benno Y.: Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteini* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteini* comb. nov. and *Parabacteroides merdae* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 1599–1605 (2006)
56. Sakamoto M., Tanaka Y., Benno Y., Ohkuma M.: *Parabacteroides faecis* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 1342–1346 (2015)
57. Salyers A.A., Amabile-Cuevas C.F.: Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 2321–2325 (1997)
58. Sears C.L. The toxins of *Bacteroides fragilis*. *Toxicon*, **39**, 1737–1746 (2001)
59. Shoemaker N.B., Vlamakis H., Hayes K., Salyers A.A.: Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. And among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 561–568 (2001)
60. Snyderman D.R., Gorbach S.L., I wsp.: In vitro activities of newer quinolones against *Bacteroides* group organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3276–3279 (2002)
61. Snyderman D.R., Gorbach S.L., I wsp.: National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends in the United States from 1997 to 2004. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1649–1655 (2007)
62. Snyderman D.R., Hecht D.W. i wsp.: Update on resistance of *Bacteroides fragilis* group and related species with special attention to carbapenems 2006–2009. *Anaerobe*, **17**, 147–151 (2011)

63. Sóki J., Hedberg M., Patrick S., Bálint B., Herczeg R., Nagy I., Hecht D.W., Nagy E., Urbán E.: Emergence and evolution of an international cluster of MDR *Bacteroides fragilis* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 2441–2448 (2016)
64. Sóki J.: Extended role for insertion sequence elements in the antibiotic resistance of *Bacteroides*. *World J. Clin. Infect. Dis.* **3**, 1–12 (2013)
65. Sutter V.L., Citron D.M., Edelstein M.A.C., Finegold S.M.: Wadsworth anaerobic bacteriology manual, 4th ed. Star Publishing Co., Belmont, 1985
66. Székely E., Eitel Z., Molnár S., Szász I.É., Bilca D., Sóki J.: Analysis of Romanian *Bacteroides* isolates for antibiotic resistance levels and the corresponding antibiotic resistance genes. *Anaerobe*, **31**, 11–14 (2015)
67. Toprak N.U., Yagci A., Gulluoglu B.M., Akin M.L., Demirkalem P., Celenk T., Soyletir G.: A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**, 782–786 (2006)
68. Vedantam G., Hecht D.W.: Antibiotics and anaerobes of gut origin. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 457–461 (2003)
69. Wareham D.W., Wilks M., Ahmed D., Brazier J.S., Millar M.: Anaerobic sepsis due to multidrug-resistant *Bacteroides fragilis*: microbiological cure and clinical response with linezolid therapy. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 67–68 (2005)
70. Weintraub A., Larsson B.E., Lindberg A.A.: Chemical and immunochemical analyses of *Bacteroides fragilis* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* **49**, 197–201 (1985)
71. Wexler H.M.: *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 593–621 (2007)
72. Whittle G., Hund B.D., Shoemaker N.B., Salyers A.A.: Characterisation of the 13-kilobase ermF region of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3488–3495 (2001)
73. Wu S., Lim K.C., Huang J., Saidi R.F., Sears C.L.: *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14979–14984 (1998)
74. Yang W., Moore I.F., Koteva K.P., Bareich D.C., Hughes D.W., Wright G.D.: *TetX* is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics. *J. Biol. Chem.* **279**, 52346–52352 (2004)