

P. aeruginosa'da Beta-Laktam Grubu Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları ve Direnç Fenotipleri

Dr. Bengül DURMAZ*, Dr. H. Esra AĞEL*

* İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.

Pseudomonas aeruginosa, birçok virülans faktörü ve çeşitli direnç mekanizmalarına sahip olması nedeniyle önemli bir nozokomiyal patojendir. Hastane infeksiyonlarının %10-20'sinden sorumludur. Özellikle kistik fibrozis ve nozokomiyal pnömoni gibi solunum sistemi infeksiyonlarında, sepsis, cerrahi yara, yanık infeksiyonları, deri ve yumuşak doku infeksiyonlarında sıklıkla patojen olarak bulunur. *P. aeruginosa*'nın duyarlı tiplerinin etken olduğu infeksiyonlarda tikarsilin, piperasilin, azlosilin, seftazidim, sefeperezon, sefepim, sefpirom, aztreonam, imipenem ve meropenem tedavi edici olarak kullanılan beta-laktam antibiyotiklerdir (1,2).

P. aeruginosa'nın beta-laktam grubu antibiyotiklere direncinde doğal direnç ve kazanılmış direnç mekanizmaları rol oynar.

DOĞAL DİRENÇ

P. aeruginosa'nın hücre duvarında dış membran geçirgenliğinin az olması ve yapısal olarak bulunan aktif pompalama (aktif efluks) sistemlerinin doğal dirençte rolü vardır (2,3). Ayrıca minimal seviyede sentez edilmesine rağmen; Amp C tipi beta-laktamazları, penisilin G'ye, aminopenisi-

linlere ve 1. kuşak sefalosporinlere doğal dirence sebep olur. Bu tip beta-laktamaz, beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmediğinden aminopenisilinlerin sulbaktam ve klavulanik asitle oluşturduğu beta-laktamaz inhibitörlü kombinasyonlara da dirençlidirler (4-6). Sefotaksim ve seftriaksonun MİK₅₀ değeri, 8 mg/L' nin üzerinde olduğundan psödomonal infeksiyonlarda klinik kullanımını yoktur (2).

KAZANILMIŞ DİRENÇ MEKANİZMALARI

1. Aşırı Beta-Laktamaz Salgılanmasına Bağlı Direnç

P. aeruginosa'da kazanılmış dirençten sorumlu esas mekanizma enzim salgılanmasıdır. Bu bakteride 20'den daha fazla farklı beta-laktamaz enzimi tanımlanmıştır.

Sınıf C kromozomal beta-laktamaz, doğal olarak salgılanan sefalosporinaz aktivitesine sahip bir enzimdir. Beta-laktam antibiyotiklerle tedavi esnasında direnç oluşan vakaların çoğundan sorumludur. Bu enzimi kodlayan AmpC geni antibiyotik baskısı olmadığı durumlarda negatif "feedback" mekanizması ile regülatör AmpR geninin kontrolündedir. Beta-laktam antibiyotik ile tedavi esnasında antibiyotik baskısı sonucu peptidoglikan tabakanın yıkım hızı ile doğru orantılı olarak yapımı artar. Özellikle imipenem, beta-laktamaz salgılanmasını bu yolla indükler. Böylece baskılanması engellenmiş deprese mutantlar oluşur. Antibiyotik baskısı devam ettiği süreçte oluşan deprese mutant subpopülasyonu seleksiyona uğrar ve duyarlı indüklenebilir popü-

lasyonun önüne geçerek yayılır. Bu tip direncin insidansı %7-12'dir. Ancak, hastalardan izole edilen P. aeruginosa izolatlarında kromozomal beta-laktamazın aşırı salgılanmasına yol açan genetik olaylar kesin olarak açıklanmamıştır. AmpC depresyonu hala bir hipotezdir. Hastalardan alınan örneklerde aşırı beta-laktamaz üreten suşların bazılarında AmpD-AmpR gen bölgesinde nükleotid değişiklikleri görülmesine rağmen, bu birkaç aminoasit değişimi ile sonuçlanmaktadır. beta-laktamazın aşırı salgılanmasına başka gen bölgelerindeki mutasyonlar sebep olabilir (7). Tedavi esnasında direnç gelişiminden kromozomal beta-laktamazlar yanında porin-efluks sistemi de sorumludur. Karbapenemlere ve kinolonlara da direnç oluşur. Psödomonal infeksiyonların tedavisi sırasında direnç geliştirme riski açısından; karbapenemler, piperasilin ve antipsödomonal sefalosporinlerden daha risklidir (2,4).

2. Plazmid ve İntegronlar Aracılığı ile Kazanılan Beta-Laktamazların Salgılanması

P. aeruginosa plazmid, transpozon, integron gibi hareketli genetik elementleri kazanarak konağa özgül olarak sınıf A, B veya D tipi beta-laktamazları salgılayabilirler.

Sınıf A enzimleri (grup 2-beta-laktamazları); PSE-1, PSE-4, CARB-3, CARB-4 olmak üzere 4 ayrı geniş spektrumlu penisilinaz içerir (4,8).

Bu grupta bulunan diğer bir beta-laktamaz grubu ise genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL)'lar olup klinik önemi olmaksızın klavulanik asit ve tazobaktam ile inhibe olur. Ayrıca üredopenisilinlere, seftazidime, sefepim, sefpiroma ve aztreonama direnç sağlar. TEM-4, TEM-24, TEM-42, SHV 2a Fransa'da tespit edilmiştir. Bu grup enzimlerden OXA-18, Fransa'da ve İtalya'da; VEB-1, Tayland ve Vietnam'da; PER-1, Türkiye'de P. aeruginosa suşlarında bulunmuştur. Türkiye'de P. aeruginosa suşlarının %11'i bu tip enzim taşır (2,9-11).

Sınıf B enzimleri; karbapenemazlardır. IMP-1, VIM-1, VIM-2. Bu tip enzimler, oksiiiminocefalosporinleri, karbapenemleri hidroliz ederler. Aztreonamı hidroliz edemezler. Klavulanik asit veya tazobaktam ile inhibe olmazlar. Japonya'da epidemi yapan suşlar yanında Fransa ve İtalya'dan birer suş bildirilmiştir (2,12).

Sınıf D enzimleri; geniş spektrumlu oksasilineazlardır. Özellikle seftazidim ve aztreonamı hidroliz eder, genellikle klavulanik asit ile inhibe olmazlar. Ancak OXA-20 klavulanik asitle inhi-

be olurlar. OXA-10 ve OXA-2'nin mutasyonu sonucu oluşan türevleridirler. OXA-11, OXA-14, OXA-16, OXA-17, OXA-19, OXA-20, OXA-23, OXA-10'dan, OXA-15 ve OXA-3, OXA-2'den nokta mutasyonu ile oluşmuş türevlerdir. Bu enzimlerin sefepimi hidroliz; değişkendir. OXA-10, OXA-15 sefepimi hidroliz ederken, OXA-11 veya OXA-14 sefepime etkili değildir. Türkiye'de ve Fransa'da birkaç suş olup insidansı artmaktadır, ancak tanımlanması güçtür (13-17).

3. Dış Membran Permeabilitesinin Azalması ile Kazanılan Direnç

İmipenem dirençli P. aeruginosa klinik izolatlarının çoğu Opr D2 azalması veya kaybı gösterir (18,19). Opr D temel aminoasitlerin ve karbapenemlerin girişi sağlayan özgül bir kanaldır. Opr D2 yetersizliğinden meropenem, imipenemden daha az etkilenir. Bu mekanizma ile imipeneme dirençli, meropeneme dirençli ya da duyarlı olabilen fenotipe sahip suşlar görülebilir (4). Opr D2 yetersizliği kromozomal beta-laktamaz varlığında, bu tip dirence sebep olur (20). Bu direncin insidansı %10-25'dir.

Kinolonlara dirençte majör mekanizma DNA giraz enziminde mutasyondur ve Opr D proteini kaybı, imipenem ve florokinolonlara birlikte direnç şeklinde klinik pratikte de gözlenir (21,22).

4. Aktif Pompalama Sistemi ile İlacın Dışarı Atılmasına Bağlı Direnç

P. aeruginosa'da beta-laktam antibiyotiklere karşı son zamanlarda tanımlanmış bir mekanizmadır. En az 4 ayrı genetik olarak farklı aktif pompalama mekanizması vardır. Herbiri 3 proteinden oluşur;

- Bir stoplazmik membran proteini (Mex B, Mex D veya MEX F), enerji bağımlı pompa olarak hareket eder.

- İkinci protein (Opr M, Opr J veya Opr N), dış membranda lokalize olmuştur. İlacın dışarı pompalanması sisteminde porin proteini olarak bulunur.

- Üçüncü protein (Mex A, Mex C veya Mex E) periplazmik boşlukta bulunan bağlayıcı protein, diğer iki protein arasında bağlantı oluşturur.

Aktif pompalama sistemi, bir operon üzerinde düzenlenmiş genlerle kodlanır ve bir düzenleyici genin kontrolü altındadır. Çoklu ilaç direncine sahip fenotipler oluşturur (3, 23).

1. Yapısal olarak eksprese edilen Mex AB-Opr M aktif pompalama sistemi, beta-laktamla-

rın çoğuna, kinolonlara, tetrasikline, kloramfenikole, trimetoprim sulfametoksazole doğal dirence sebep olur. Ayrıca genetik olarak depresyona uğradığında da, yine aynı ilaçlara direnç kazanır. İmipenem hariç, tüm beta-laktam antibiyotiklere direnç oluşturur.

2. Mex CD-Opr J aktif pompalama sistemi, yapısal değildir, mutasyonla oluşur. nfx B tip mutantları oluşturur. Dördüncü kuşak sefalosporinlere (sefepim, sefpirom) direnç oluşturur. Mex CD-Opr Y'nin aşırı ekspresyonuyla birlikte.

3. Mex EF-Opr N aktif pompalama sistemi, yapısal değildir, mutasyonla oluşur. nfxC tip mutantları şeklinde eksprese olur. Opr D ekspresyonunun azalması ile ilişkilidir. Karbapenemlere dirence yol açar (22).

Aktif pompalama sistemleri düşük seviyede dirençten sorumludurlar, ancak yüksek seviyede dirençten sorumlu mutantların seleksiyonuna sebep olmaktadır.

5. Hedefin Değişmesine Bağlı Direnç

Değişime uğramış penisilin bağlayan proteiner, beta-laktamlarla tedavi sırasında oluşan direnç gelişimi ile nadir de olsa ilişkilidir. Fakat, imipenem ile tedaviden sonra değişmiş PBP-4 rapor edilmiştir. Kistik fibrozisli bir hastada piperasilinin yüksek dozlarından sonra PBP'nin penisilin G'ye afinitesinde derece derece azalma, PBP-6 ekspresyonunda artış ve beta-laktam direncinde artış ile bağlantılı bulunmuştur. Son zamanlarda aşırı PBP-3 üreten P. aeruginosa'nın beta-laktam antibiyotiklere duyarlılığında azalma gösterilmiştir (2).

P. AERUGINOSA'DA KAZANILMIŞ DİRENCE BAĞLI OLARAK GÖZLENEN DİRENÇ FENOTİPLERİ

1. Direnç Fenotipi

Sefepim, sefpirom gibi dördüncü kuşak sefalosporinler ve karbapenemler hariç, tüm beta-laktamlara direnç ile karakterizedir. Bu fenotipin sebebi Amp C kromozomal beta-laktamazın depresyonu olup, beta-laktam seviyesine bağlı olarak farklı derecelerde etkilenir.

2. Direnç Fenotipi

OXA tip (oksasilinaz) beta-laktam salgılanmasına bağlı olup, özellikle tikarsilin, azlosilin ve piperasilin gibi penisilinlerin varlığında sefalosporinlerden daha fazla etkilenir, sefalosporinlere duyarlıdır.

3. Direnç Fenotipi

Diğer beta-laktamlar etkilenmediği halde karbapenemlerin MİK değerinde artış ile karakterizedir. Bu fenotipin sebebi dış membranda özgül porin proteini Opr D'nin ekspresyonunda azalmadır.

4. Direnç Fenotipi

Meropenem dahil, imipenem hariç olmak üzere birçok beta-laktam antibiyotiğin MİK değerlerinde 4-8 kat artış olması ile karakterizedir. Karbenisiline doğal direnç olarak da adlandırılır. Bu fenotipe sahip P. aeruginosa aynı zamanda kinolonlar, trimetoprim, tetrasiklin ve kloramfenikol gibi beta-laktam olmayan antibiyotiklere de direnç gösterebilir. Bu fenotipin sebebi aktif pompalama sisteminin aktivasyonu veya depresyonudur.

Diğer direnç fenotipleri, sekonder olarak hareketli genetik elementlerle kazanılan, genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlarla oluşur.

Pratikte aynı klinik suşta birçok direnç mekanizması birlikte bulunabilir ve bu mekanizmalar arasında aditif etki olmaz (19). Tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençli P. aeruginosa gözlenebilir.

Tüm beta-laktamlara dirençli P. aeruginosa suşları olmasına rağmen, klinik izolatların çok az bir kısmı tüm beta-laktamlara dirençli bulunmuştur. Beta-laktamlar, ciddi P. aeruginosa infeksiyonlarını tedavi etmede hala en iyi silahımızdır. Klinisyen en uygun molekülü nasıl seçeceğini bilmelidir. İnfeksiyon etkeni patojenin tanımlandığı durumda; duyarlılık, uygulama şekli, fiyatı, lokal tercih gibi kullanım durumlarına bağlı olarak bir beta-laktam antibiyotik seçilir.

Etken izole edilmediği, empirik tedavi verileceği durumda; bu antibiyotiğin lokal epidemiyolojisi bilinmelidir. Böylece bir bilgi için mikrobiyolojik etkene dayalı epidemiyolojik bilgi hazır olmalıdır.

Aynı hastanede, belli bir zaman periyodunda aynı endikasyon için aynı ilaç daha sonra, yine belli bir periyotta farklı ilacın kullanılması şeklinde devirli ilaç kullanım politikası izlenmesi durumunda; aynı periyotta aynı ilacın kullanıldığı yerde bir direnç modu gelişeceğinden, direnç kolay izlenerek epidemiyolojik veri elde edilebilir. P. aeruginosa daha çok nozokomiyal bir patojen olduğundan hastane suşları birçok antibiyotik tedavisi alan hastaları infekte edebilir. Bu durum bakterileri çok farklı direnç mekanizmaları geliştirmeye zorlar. Bunun sonucu olarak da di-

renç mekanizmalarını tespit etmek zor olmaktadır.

Günümüzde, *P. aeruginosa*'nın beta-laktam fenotiplerini tam olarak tanımlama kapasitesinde bir otomatize antimikrobiyal duyarlılık test sistemi olan VITEK 2 Advanced Expert System (AES), bu amaçla kullanılmaktadır. Bu sistemde; VITEK 2 ile her bir suşun antibiyotik duyarlılığı tanımlanmakta ve sonuçlar beta-laktam fenotipini belirlemek için AES ile analiz edilmektedir (24).

KAYNAKLAR

- Berezin EB. *Pseudomonas* and Miscellaneous Gram-Negative Bacilli. In: Armstrong D, Chen J (eds). Infectious Diseases. 1st ed, London: Mosby, 1999;8: 18.1-12.
- Pechere JC, Köhler T. Patterns and modes of beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect 1999;5:15-8.
- Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. Science 1994;264:382-8.
- Bonfiglio G, Laksai Y, Franchino L, Amicosante G, Nicoletti G. Mechanisms of beta-lactam resistance amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolated in an Italian survey. J Antimicrob Chemother 1998;42:697-702.
- Livermore DM, Pitt TL. Dissociation of surface properties and "intrinsic" resistance to beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol 1986;22:217-24.
- Li XZ, Ma D, Livermore DM, Nikaido H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: Active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance. Antimicrob Agents Chemother 1994;38:1742-52.
- Langaee TY, Gaynon L and Huletsky A. Inactivation of the ampD gene in *Pseudomonas aeruginosa* leads to moderate-basal-level and hyperinducible AmpC beta-lactamase expression. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2000;44:583-9.
- Sanschagrın F, Bejaoui N, Levesgue Structure of CARB-4 and AER-1 carbenicillin hydrolyzing beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42:1966-72.
- Jacoby GA. Genetics of extended-spectrum beta-lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13:2-11.
- Naas T, Philippon L, Poirel L, Ronco E, Nordman P. An SHV-derived extended spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1281-4.
- Nordman P, Guibert M. Extended spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1998;42:128-31.
- Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo beta-lactamase and its plasmid-and Integron-Borne Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. Antimicrob Agents Chemother 2000;44: 891-7.
- Marchandin H, Lean-Pierre H, Champs C, et al. Production of a TEM-24 plasmid-mediated, extended-spectrum beta-lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:213-16.
- Danel F, Hall LMC, Duke B, Gür D, Livermore DM. OXA-17, a further extended spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1362-6.
- Danel F, Hall LMC, Gür D, Livermore DM. OXA-16, a further Extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42:3117-22.
- Mugnier P, Casin I, Bouthors AT, Collatz E. Novel OXA-10 derived extended spectrum beta-lactamases selected in vivo or in vitro. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:3113-6.
- Naas T, Sougakoff W, Casetta A, Nordman P. Molecular characterization of OXA-20, a novel Class D beta-lactamase, and its integron from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42:2074-83.
- Yoneyama H, Nakae T. Mechanism of efficient elimination of proteni D2 in outer membrane of imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob agents Chemother 1993;37:2385-90.
- Dib C, Trias J, Jarlier V. Lack of additive effect between mechanisms of resistance to carbapenems and other beta-lactam agents in *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995;14:979-86.
- Livermore DM. Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1992;36:2046-8.
- Cambau E, Perani E, Dib C, Petinon C, Trias J, Jarlier V. Role of mutations in DNA gyrase genes in ciprofloxacin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptible or resistant to imipenem. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:2248-52.
- Arita K, Daido K, Ohashi N, Nakamura K, Takeshima Y, Kohara T. Study on antibiotics susceptibility and mechanism of carbapenem-resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Jpn J Antibiot 1999;52:491-6.
- Pechere JC, Mihea-Hamzhepour M, Kohler T. Antibiotic efflux, a mechanism of multiple resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Bull Acad Natl Med 1998; 18:599-61.
- Sanders CC, Peyret M, Moland ES, et al. Ability of the VITEK 2 advanced experts system to identify beta-lactam phenotypes in isolates of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 2000;38:570-4.

YAZIŞMA ADRESİ:

Prof. Dr. Bengül DURMAZ
Turgut Özal Tıp Merkezi
Mikrobiyoloji Laboratuvarı
MALATYA

Makalenin Geliş Tarihi: 24.06.2000 Kabul Tarihi: 23.10.2000