

Mikroorganizmalarda Direnç Mekanizması Olarak Aktif Pompa Sistemleri

Dr. Pınar ZARAKOLU*

* Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İnfeksiyon Hastalıkları Ünitesi, Ankara.

Bakterilerin antimikrobiyal ajanlara karşı direnç geliştirme yeteneği infeksiyon hastalıklarının tedavisinde başarısızlıklara neden olmaktadır. Antibiyotiklerin uygun endikasyon dışında yaygın kullanımları direnç gelişiminde önemli bir faktördür. Bir diğer faktör antibiyotiklerin tedavi dozunun altında ve yetersiz süre uygunsuz kullanımlarıdır. Bu şekilde kullanım bakteri kolonizasyonunu arttırmakta, dirençli mutantların seleksiyonuna neden olmaktadır. Direnç geliştiğinde o sınıf antibiyotiğin hepsine yönelik olmakta ve sıklıkla çoğul direnç problemi doğmaktadır.

Antibiyotiklere karşı direnç zaman içinde (yıl) ve yere göre (ülke, şehir, hastane), bakterinin izole edildiği vücut bölgesi, infeksiyonun toplum ya da hastanede kazanılmış infeksiyon olması, hasta özellikleri (yaş, immün sistem, altta yatan hastalık, kalabalık ortamda yaşam), yakın zamanda antibiyotik tedavisi almış olmak, hastanede yatış süresi, uygulanan duyarlılık testlerinin farklı olması ve bu testlerin değerlendirilmesi sırasında yapılan yorum hataları gibi faktörler nedeniyle farklılıklar gösterebilmektedir.

DİRENÇ MEKANİZMALARI

Bakteriler antibiyotiklere karşı doğal dirence sahip olabildikleri gibi, kromozomal genlerde meydana gelen mutasyon veya kromozom dışı (plazmid, transpozon) genetik materyalin kazanılması sonucu da direnç geliştirebilmektedirler. Direnç gelişiminde enzim üretimi, bağlanma noktalarının modifikasyonu, membran geçirgenliğinin bozulması ve pompa mekanizması gibi çeşitli mekanizmalar sıklıkla bir arada rol oynamaktadır. Enzim üretimine bağlı direnç gelişimi beta-laktam, aminoglikozid ve kloramfenikol grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde rol oynamaktadır. Bağlanma noktalarının modifikasyonu penisilin, kinolon, makrolid ve tetrasiklin grubuna karşı direnç gelişimine neden olmaktadır. Membran geçirgenliğinin bozulması sonucu beta-laktam, penisilin, kinolon grubuna karşı direnç gelişebilmektedir. Pompa mekanizması ise karbapenem, kinolon, tetrasiklin ve makrolidlere karşı dirençte önem kazanmıştır.

Günümüzde antibiyotik direncinin temel mekanizmaları oldukça iyi anlaşılmış olmasına rağmen halen ortaya çıkarılmakta olan yeni mekanizmalar söz konusudur. Yeni tanımlanmakta olan ve hala üzerinde yoğun çalışmaların sürdüğü bu mekanizmalara pompa mekanizmasının yanı sıra "hypermutable", integronlar ve plazmid bağımlılığı gibi mekanizmalar örnek olarak verilebilmektedir.

Bu yazıda son yıllarda oldukça güncellik kazanmış ve direnç mekanizması olarak sıklıkla ra-

por edilmeye başlanmış olan pompa sistemleri ele alınmıştır.

AKTİF POMPA SİSTEMLERİ

Aktif pompa sistemlerinin varlığı ilk olarak 20 yıl kadar önce tetrasiklinler için belirlenmiştir. Günümüzde ise birçok antibiyotik sınıfına karşı sıklıkla doğal veya bazen kazanılmış dirençte önemli olduğu anlaşılmıştır. Özellikle gram-negatif bakterilerin çeşitli antibiyotiklere karşı doğal direncindeki mekanizmanın sanıldığı gibi dış membran geçirgenliğinden ziyade aktif pompa sistemlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Aktif pompa sistemleri her tür hücrede (bakteri, maya, küf, insan) bulunabilmekte ve çeşitli substratlardan ve çoğunlukla amfilik olan ilaçlardan hücreleri korumaktadır.

Aktif pompa sistemleri, gerek gram-negatif gerekse gram-pozitif bakterilerde bulunabilen, antibiyotikler dahil toksik maddelerin hücre dışına atılmasını sağlayan transport proteinleridir. Tek bir substrata özgül olabildikleri gibi yapısal olarak birbirinden farklı maddeleri de substrat olarak kullanabilirler. Bu durum çoğul antibiyotik direncine ve yanı sıra substrat profilinin genişliğine bağlı olarak bazı boyalara, deterjanlara, dezenfektanlara karşı dirence neden olmaktadır. Pompa sistemi proteinlerinin normalde bulunan operonun bir parçası olabileceği ve düzenleyici bir genin kontrolü altında ortaya çıktığı da düşünceler arasında yer almaktadır.

Mekanizmanın aktivasyonu çevresel uyarılar ya da düzenleyici genlerin yapısında meydana gelen mutasyonlar sonucu olabilmekte ve enerji gerektirmektedir; bu enerji gereksinimi ya proton aktivasyonu ya da ATP bağımlı olarak sağlanmaktadır.

Pompa sistemleri kullandıkları enerji kaynağı, transport yolu, filogenetik özellikleri, yapısal özellikleri ve substrat profiline göre birincil ve ikincil olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Birincil olarak isimlendirilen grupta "ATP-Binding Cassette (ABC)" üst ailesine bağlı altı aile mevcuttur. Bu aileler özellikle ökaryot hücrelerden antibiyotik atılımında rol oynamaktadır. İkincil aktif pompa sistemleri ise "Small Multidrug Resistance (SMR)", "Multidrug Endosomal Transporter (MET)", "Multiantimicrobial Resistance (MAR)", "Resistance Nodulation Division (RND)" ve "Major Facilitator Superfamily (MFS)" olmak üzere beş üst aile içermektedir. SMR ve

RND üst aileleri sadece prokaryot hücrelerde bulunmaktadır. Gram-negatif bakterilerin antibiyotik direnci açısından en önemli grup RND üst ailesidir (Tablo 1). Bu ailenin üyeleri tipik olarak pompa, füzyon ve dış membran proteini olmak üzere üç proteinden oluşmaktadır. Bu durum pompa mekanizmasının en çok incelendiği bakterilerden biri olan *Pseudomonas aeruginosa*'nın kinolon direnci için Tablo 2'de sunulmuştur.

Pompa Mekanizması ile Direnç Kazanma Yeteneğine Sahip Bazı Bakteriler

***Streptococcus pyogenes*:** *S. pyogenes* suşlarının eritromisin direnci yapısal, indüklenebilen ve M tipi olarak sınıflanırken, direnç determinantları sırasıyla *ermB*, *ermTR* ve *mefA* olarak belirlenmiştir. Bunlar içinde *ermB* ve *ermTR* genleri ile belirlenen mekanizma en sık görülen, 23s rRNA metilasyonu sonucu gelişen ve makrolidler, linkozamid ve streptogramin B'ye karşı çapraz dirence neden olmaktadır. M tipi fenotip olarak bilinen diğer mekanizma ise makrolidlerin pompa mekanizması ile dışarı atılması sonucu gelişmektedir.

***Streptococcus pneumoniae*:** Penisiline dirençli *S. pneumoniae* suşları diğer birçok antibiyotiğe karşı dirençli olabilmektedir. Eritromisine dirençli suşlar yeni makrolid antibiyotiklere karşı da direnç gösterebilmektedir. Makrolid direnci gösteren M-fenotipi olarak adlandırılan bu grup suşların MFS pompa üst ailesinden PmrA pompa proteinine (eritromisin minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri 1-8 µg/mL) sahip oldukları saptanmıştır.

***Staphylococcus aureus*:** Bakterinin sahip olduğu ve çoğul direnç gelişimine neden olan bazı proteinler QacA, NorA ve daha spesifik olarak MsrA ve TetK proteinleridir. Bunların varlığı florokinolonların, makrolid ve tetrasiklin grubu antibiyotiklerin hücre dışına atılmasına neden olmaktadır.

***P. aeruginosa*:** *P. aeruginosa*'nın karbapenemlere karşı direnç geliştirmesinde, penisilin bağlayan proteinler (PBP)'in yapısında ya da afinitesinde meydana gelen değişiklikler, beta-laktamaz üretimi, porin D eksikliği gibi çeşitli mekanizmaların yanı sıra pompa mekanizması da rol oynamaktadır.

Bu bakterinin birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirmesine neden olan dört farklı pompa sistemi tanımlanmıştır; bunlar MexAB-OprM, MexEF-OprN, MexCD-OprJ ve MexGH genleri ile ifade edilmektedir (Şekil 1). MexAB-OprM imipe-

Tablo 1. Antibakteriyel Dirençten Sorumlu Pompa Proteini Üst Aileleri, Substratları ve Konak Bakterileri.

Üst aile	Kimyasal substratlar	Konak bakteriler (genus)
“Major Facilitator Superfamily”	Antibiyotikler, kuarterner amonyum bileşikleri, bazik boyalar, fosfonium iyonları	<i>Mycobacterium</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Bacillus</i> <i>Escherichia</i> <i>Streptococcus</i> <i>Vibrio</i>
“Resistance Nodule Cell Division Family”	Bazik boyalar, deterjanlar, antibiyotikler, yağ asitleri	<i>Escherichia</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Neisseria</i> <i>Haemophilus</i>
“Small Multidrug Resistance Family”	Antibiyotikler, kuarterner amonyum bileşikleri, antiseptikler, tetrafenil fosfonium	<i>Bacillus</i> <i>Escherichia</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Staphylococcus</i>
“ABC Type Transporters”	İyonoforlar, etidium alkaloidleri, fosfolipidler	<i>Escherichia</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Mycobacterium</i>
“Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family”	Boyalar, florokinolonlar, aminoglikozidler	<i>Haemophilus</i> <i>Vibrio</i> <i>Bacillus</i>

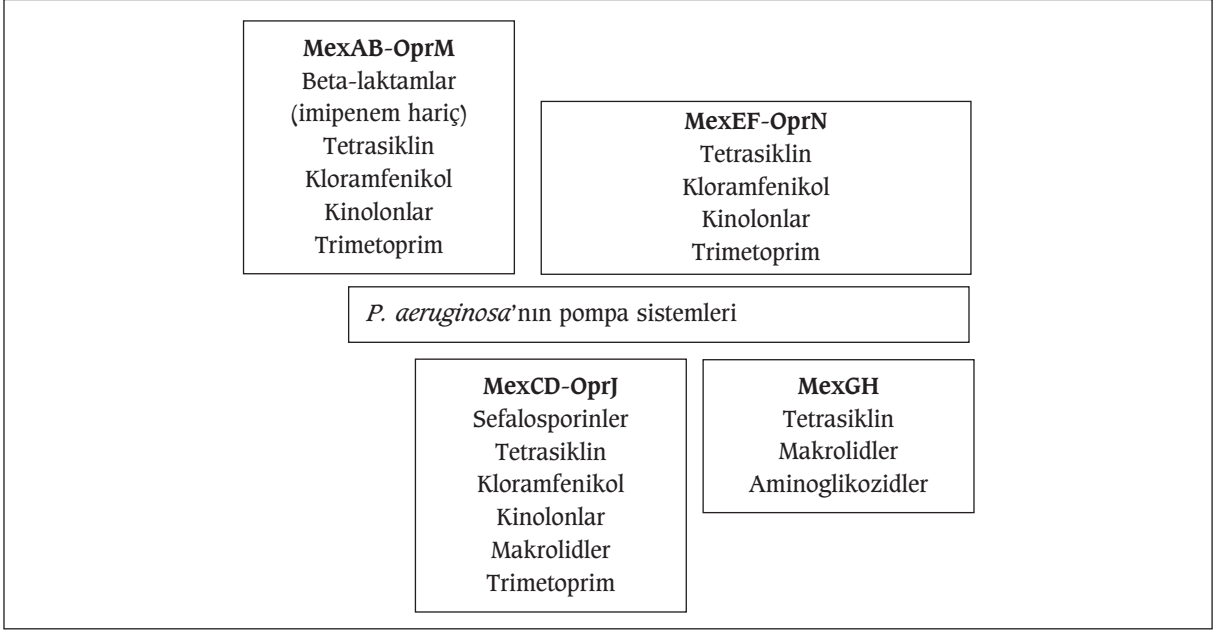
Tablo 2. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Kinolon Direncinde Önem Taşıyan Pompa Sistemleri.

	Pompa üst ailesi	Pompa proteini	Füzyon proteini	Dış membran proteini	Düzenleyici gen
<i>P. aeruginosa</i>	RND	MexB	MexA	OprM	<i>mexR</i>
		MexD	MexC	OprJ	<i>nfxB</i>
		MexF	MexE	OprN	<i>nfxC, mexT</i>
		MexY	MexX	OprM	<i>mexZ</i>

nem dışında tüm beta-laktam antibiyotiklerin, tetrasiklin, kloramfenikol, kinolonlar ve trimetoprimin hücre dışına atılmasına neden olmaktadır. MexEF-OprN tetrasiklin, kloramfenikol, kinolonlar ve trimetoprime etkilidir. MexCD-OprJ dördüncü kuşak sefalosporinlere, tetrasiklin, kloramfenikol, kinolonlar, trimetoprim ve makrolidlere karşı dirençte etkili olmaktadır. MexGH'nin ise tetrasiklin, makrolidler ve aminoglikozidlere karşı dirence neden olduğu saptanmıştır. Adı ge-

çen pompa proteinlerinin RND pompa üst ailesine ait oldukları bilinmektedir.

MexAB-OprM ile kodlanan pompa mekanizması *P. aeruginosa* suşlarının imipeneme duyarlı, meropeneme dirençli olmasına neden olmaktadır. İmipenemin meropenemden farklı olarak hücre dışına atılmasına engel olan bu durum her iki antibiyotiğin C₂ yan zincirindeki yapının farklı olmasından kaynaklanmaktadır. MexAB-OprM varlığında beta-laktam antibiyotiklere karşı di-



Şekil 1. P. aeruginosa'nın Pompa Sistemleri.

rençte dört-altı kat artış gözlenmektedir. Düşük düzeyde beta-laktamaz üretmekte olan suşların %50 kadarında bu pompa sisteminin aktivasyonu gözlenmektedir. Düşük düzeyde beta-laktam direnci gösteren suşların %75'inde pompa sisteminin aktivasyonu söz konusudur. Pompa sistemi için substrat niteliği taşıyan herhangi bir antibiyotik ile tedavi edilen hastalarda pompa sisteminin overekspresyonu meydana gelmektedir. Ayrıca, bu durumda MexR supresör geninde de baskılanma söz konusudur. MexR supresör geni, MexAB ve OprM pompa proteinlerinin yapısını düzenlemektedir.

MexEF-OprN beta-laktam antibiyotiklerin direkt olarak dışarı pompalanmasına neden olmakla birlikte, OprD mekanizmasını etkileyerek porin D yapısını azaltmakta ve dış membran proteinlerinin geçirgenliğinin azalmasına neden olmaktadır. Sonuçta karbapenem grubu tüm antibiyotiklere karşı direnç gelişmektedir.

Bu mekanizmaların klinik kullanıma önemli etkileri söz konusudur. Antimikrobiyal tedavinin doğru ve uygun şekilde seçilmesi birçok antibiyotiklerin daha uzun yıllar kullanımına olanak sağlayacak, dirençli suşların ortaya çıkışını azaltacaktır. Örneğin; kloramfenikol ve siprofloksasin gelişmekte olan ülkelerde oldukça yoğun kullanılmış antibiyotiklerdir. Bu antibiyotiklerin MexEF-OprN aracılığıyla OprD eksikliğine neden olabilecekleri düşünülmektedir.

MexXY ise amikasin, tobramisin gibi aminoglikozidlerin ve kinolonların hücre dışına atılmasını sağlayan yeni tanımlanmış bir pompadır. Özellikle kistik fibrozisli hastalardan izole edilen belli suşlarda saptanmıştır. Bu mekanizmada da en az üç adet düzenleyici genin rol aldığı belirtilmektedir.

Escherichia coli: Çoğul direnç geni (multiple antibiotic resistance, mar) sadece E. coli'de değil, diğer Enterobacteriaceae üyelerinde de dirence neden olmaktadır. Örnek olarak; AcrAB pompası, triklosan, klorheksidin, kuarterner amonyum bileşiklerinin yanı sıra birçok antibiyotiğe karşı da dirence neden olmaktadır.

Campylobacter jejuni: Bu bakterinin florokinolon direncinin dünyada giderek yaygınlaşmakta olduğu ifade edilmektedir. Bakterinin *gyrA* geninde meydana gelen nokta mutasyonu ve Cme-ABC pompası florokinolonlara dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Neisseria gonorrhoeae: Penisiline karşı gelişen düşük düzeyde dirençte rol oynayan üç genetik bölge tespit edilmiştir. Bunlardan birisi *penA* olup, PBP'lerden PBP-2'nin yapısında değişikliğe ve penisiline karşı afiniteye azalmaya neden olmaktadır. Diğer gen bölgeleri *penB* ve *mtr* olup, penisilin yanısıra diğer antibiyotiklere karşı da düşük düzeyde dirence neden olmaktadır. Bunlardan *mtr* pompa mekanizması aracılığıyla

Tablo 3. Bakteriyel Pompa Proteinleri, Konak Bakteriler, Antibiyotikler, Bazı Bileşikler ve Pompa Üst Aileleri.

Pompa proteini	Konak bakteriler	Antibiyotikler/bileşikler	Pompa üst ailesi
AmrA/AmrB	<i>Burkholderia</i>	Aminoglikozidler, makrolidler	RND
AcrA	<i>Escherichia</i>	Bazik boyalar, deoksikolat, deterjanlar	MFS
AcrB	<i>Escherichia</i>	Bazik boyalar, deoksikolat, deterjanlar, kloramfenikol, kinolonlar, rifampin, tetrasiklinler	RND
AcrEF	<i>Escherichia</i>	Bazik boyalar, deoksikolat, deterjanlar	RND
Bcr	<i>Escherichia</i>	Safra tuzları, safranin	MFS
Bmr/Blt	<i>Bacillus</i>	Kloramfenikol, hidrofilik kinolonlar	MFS
Bmr3	<i>Bacillus</i>	Puromisin, Tosufloksasin, norfloksasin	MFS
EbrAB	<i>Bacillus</i>	Katyonik boyalar, deoksikolat, anyonik antibiyotikler	SMR
EmrD	<i>Escherichia</i>	Karbonil siyanid klorofenilhidrazon	MFS
EmrE (MvrC)	<i>Escherichia</i>	Etidyum bromid, makrolidler, eritromisin, tetrasiklinler, sülfonamidler	SMR
EmrAB	<i>Escherichia</i>	Çeşitli antibiyotikler	MFS
HI0894/HI0895	<i>Haemophilus</i>	Eritromisin, rifampisin, katyonik boyalar	RND
LfrA	<i>Mycobacterium</i>	Hidrofilik kinolonlar, kloramfenikol	MFS
LmrA	<i>Lactococcus</i>	Aminoglikozidler, beta-laktamlar, kloramfenikol, makrolidler, kinolonlar, tetrasiklinler	ABC
LmrP	<i>Lactococcus</i>	Makrolidler, tetrasiklinler	MFS
MexA	<i>Pseudomonas</i>	Çeşitli antibiyotikler	MFS
MexB	<i>Pseudomonas</i>	Çeşitli antibiyotikler	RND
MexE	<i>Pseudomonas</i>	Çeşitli antibiyotikler	MFS
MexF	<i>Pseudomonas</i>	Çeşitli antibiyotikler	RND
MtrCDE	<i>Neisseria</i>	Yağ asitleri, safra tuzları, beta-laktamlar, kloramfenikol, tetrasiklinler	RND
MdfA	<i>Escherichia</i>	Nötral/katyonik bileşikler	MFS
Mmr	<i>Mycobacterium</i>	Tetrafenil fosfonium, etidium bromid, akriflavin	SMR
MsrA	<i>Staphylococcus</i>	Eritromisin	ABC
NorA	<i>Staphylococcus</i>	Florokinolonlar, kloramfenikol, tetrasiklinler	MFS
NorM	<i>Vibrio</i>	Bazik boyalar, hidrofilik kinolonlar, aminoglikozidler	MATE
PmrA	<i>Streptococcus</i>	Akriflavin, eritromisin, florokinolonlar, siprofloksasin, norfloksasin	MFS
QacA	<i>Staphylococcus</i>	Organik katyonlar, kloramfenikol	MFS
QacB	<i>Staphylococcus</i>	Monovalan organik katyonlar	MFS
QacG/QacH	<i>Staphylococcus</i>	Eritromisin, kinolonlar	SMR
Tap	<i>Mycobacterium</i>	Aminoglikozidler, tetrasiklinler	MFS
TehA	<i>Escherichia</i>	Monovalan organik katyonlar	SMR
TetA, B, E	<i>Escherichia</i>	Kloramfenikol, tetrasiklinler, nalidiksik asit	MFS
TetK	<i>Staphylococcus</i>	Tetrasiklinler	MFS
TetV	<i>Mycobacterium</i>	Tetrasiklinler	MFS
VceAB	<i>Vibrio</i>	Deterjanlar, nalidiksik asit, kloramfenikol	MFS

antibiyotiklerin hücre içi konsantrasyonunun düşmesine neden olmaktadır. *PenB*'nin por yapısından tam olarak ayrımı saptanamamıştır. Direnç gelişiminde bir diğer mekanizma plazmid varlığında sentezlenen TEM-1 tipi beta-laktamaz üretimidir. Bu plazmidlerin transpozon Tn2 taşıdıkları gösterilmiştir. *N. gonorrhoeae*'ya bu plazmidlerin *Haemophilus ducreyi*'den geçmiş olduğu saptanmıştır.

***Haemophilus influenzae*:** *H. influenzae*'nin kinolon direncinde RND üst ailesinden, AcrB proteini ve AcrA füzyon proteininin rol oynadığı saptanmıştır.

***Stenotrophomonas maltophilia*:** *S. maltophilia* RND üst ailesinden bir pompa sistemine sahiptir. Bu sistemin pompa proteini SmeB, füzyon proteini SmeA ve dış membran proteini SmeC olarak bilinmektedir. Kinolon direncine neden olan bu mekanizmanın kontrolünün *smeRS* geni tarafından yapılmakta olduğu belirlenmiştir.

Çeşitli bakterilerin pompa proteinleri, ait oldukları pompa üst aileleri, hücre dışına attıkları çeşitli antibiyotikler ve bazı bileşikler Tablo 3'te sunulmuştur.

SONUÇ

Günümüzde pompa inhibitörlerinin kullanımı ile hücre dışına atılmakta olan antibiyotiklerin aktivitesini arttırmaya yönelik çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Pompa proteinlerinin belli bir yapısı olduğu için, üretilen pompa inhibitörünün birçok bakteri türüne karşı etkili olacağı düşünülmektedir. Bu konuda yapılmakta olan araştırmalar özellikle *P. aeruginosa* ve kinolonlar üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Pompa mekanizmasının bakterilerin antimikrobiyallere karşı sahip oldukları yüksek düzeyde dirençten tek başlarına sorumlu olmaları beklenen bir durum olmamakla birlikte, dirence önemli düzeyde katılımları kesinlik kazanmıştır. Pompa mekanizması bakterilerin özellikle doğal direncinden sorumlu tutulmaktadır.

Bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesi oldukça kompleks ve dinamik bir durumdur. Antibakteriyel ilaçların daha az ve uygun kullanımları, infeksiyon kontrolünün daha iyi ya-

pılması ve yeni ajanların geliştirilmesi bu alanda önemi vurgulanan hususlardır. Ancak antibakteriyel ajanların kullanımının azaltılmasının direncin azalmasında her zaman etkin rol oynamadığı belirtilmektedir. Antibiyotik direnci ortadan kaldırılamayacağı için, direncin gelişiminin yavaşlatılması ve en azından yeni ajanların geliştirilmesinden geride tutulabilmesinin önemi hatırlanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Bambecke FV, Balzi E, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol* 2000;60:45-70.
2. Gibbons S, Oluwatuyi M, Kaatz GW. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:13-7.
3. Kaye KS, Fraimow HS, Abrutyn E. Pathogens resistant to antimicrobials agents; epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infect Dis Clin North Am* 2000;14:293-319.
4. Livermore DM. Bacterial resistance: Origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis* 2003;36:11-23.
5. Luo N, Sahin O, Lin J, Michel LO, Zhang O. In vivo selection of *Campylobacter* isolates with high levels of fluoroquinolone resistance associated with *gyrA* mutations and the function of the CmeABC efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:390-4.
6. Pechere JC. Efflux mediated resistance. The symposium antibiotic resistance: The challenge of the new millennium. 21st International Congress of Chemotherapy. July 5, 1999, Birmingham, UK.
7. Poole K, Srikumar R. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: Components, mechanisms and clinical significance. *Curr Top Med Chem* 2001;1:59-71.
8. Webber MA, Piddock LJV. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 2001;51:9-11.

YAZIŞMA ADRESİ

Uzm. Dr. Pınar ZARAKOLU
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
İnfeksiyon Hastalıkları Ünitesi
ANKARA

Makalenin Geliş Tarihi: 05.02.2003 Kabul Tarihi: 12.02.2003