

TOPLUM KÖKENLİ İNFEKSİYONLARDA GRAM NEGATİF ÇOMAK DİRENCİ

Çiğdem BAL

İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL
cigdem@istanbul.edu.tr

ÖZET

Toplum kökenli infeksiyonlara yol açan Gram negatif çomaklarda beta-laktamaza bağlı olmayan direnç mekanizmaları içinde pompa direnci (efluks) önem kazanmıştır. Pompa direnci enterik çomaklarda florokinolon, nonfermentatif çomaklarda florokinolon ve karbapenem direnci gibi önemli direnç türlerine yol açan ve yaygın etkinliği yeni anlaşılan bir mekanizmadır. Pompa etkisi, toplum kökenli infeksiyonlarda önemli rolü olan Haemophilus influenzae'nin makrolid direncinde de rol alır; fakat beta-laktamaz negatif ampisiline dirençli BLNAR-H.influenzae'de esas mekanizma PBP değişikliği ile oluşan dirençtir.

Anahtar sözcükler: beta-laktamaz dışı direnç, BLNAR-H.influenzae, efluks, Gram negatif çomak, PBP, pompa

SUMMARY

Gram Negative Bacillary Resistance in Community-acquired Infections

Efflux systems have gained importance in non-beta-lactamase-mediated resistance among Gram negative bacilli. Pumps, the widespread influence of which has only recently been understood, play role in fluoroquinolone-resistance of Enterobacteriaceae, or in carbapenem and fluoroquinolone resistance of the non-fermenters. Pumps are active in macrolide-resistant Haemophilus influenzae, as well, but the essential mechanism is PBP changes in beta-lactamase negative but ampicillin-resistant strains.

Keywords: BLNAR-H.influenzae, efflux, Gram negative bacilli, non-beta-lactamase-mediated resistance, PBP, pump

Toplum kökenli infeksiyonlara yol açan enterik ve nonfermentatif Gram negatif çomaklarda beta-laktamaz direnci kadar gündemi işgal eden mekanizmalardan biri olarak pompa direnci (efluks) öne çıkmaktadır. Nonfermentatif Gram negatif çomaklar genellikle hastane infeksiyonu etkenleri olmakla birlikte, başta *Pseudomonas*'lar olmak üzere, immün sistem yetersizliği veya altta yatan ciddi hastalığı olanlarda toplum kökenli infeksiyon etkeni olarak da rol oynayabilmektedirler. Geçirgenlik azalması, hedef molekül değişikliği gibi antibiyotik direnç mekanizmaları yıllardır bilinmektedir. Pompa direnci de tetrasiklin örneği ile eskiden beri bilinen, fakat bakterilerdeki yaygınlığı ve etkinliği daha yeni anlaşılmaya başlanan bir mekanizmadır. Bu bölümde Gram negatif çomaklardaki pompa direnci üzerinde durulacak; ayrıca toplum kökenli infeksiyonlarda önemli rolü olan *Haemophilus influenzae*'nin beta-laktamaz negatif fakat antibiyotik-dirençli grubuna değinilecektir.

POMPA DİRENCİ (Efluks)

Bakterilerdeki pompa sistemleri transport proteinlerinden oluşur. Duyarlı ve dirençli tüm bakterilerde, hatta mantar (*Candida albicans*'ta azol direnci) ve protozoonlarda (*Plasmodium falciparum*'da klorokin direnci) da bulunur. Bakteri genlerinin % 5-10'u transport yapar ve özellikle metabolik artık ya da gereksiz/zararlı maddeleri dışarı pompalar. Pompa geni bir operonun parçasıdır, antibiyotiği ya da hedefini modifiye etmez. Bu gen kromozomal ve indüklenbilir veya plazmidik olabilir. Pompa sistemi, ekspresyon düzenleyici bir gen kontrolünde çalışır. Pompa substratı spesifik tek bir antibiyotik, farklı sınıflardan bir çok antibiyotik veya biyosidler (dezenfektan, antiseptik ve koruyucular) olabilir. Antibiyotik dışarı pompalanınca bakteride hücre içi antibiyotik düzeyi düşer, ribozom antibiyotik etkisinden korunur ve protein yapımı yani bakteri üremesi devam eder. Substratlardan herhangi biri ile karşılaşma sonucu pompa sistemi indüklenirse,

düzenleyici (baskılayıcı) gende mutasyon ile pompa proteinlerinin aşırı üretimi başlayabilir. Sonuç bir ya da birden çok substrata direnç şeklindedir (MDR/mar fenotipi). Gelişen direnç düşük düzeylidir fakat bir mutasyon başka mutasyonları tetikleyebildiği için, genellikle düzenleyici gen mutasyonunun ardından hedef molekül değişikliği, permeabilite azalması gibi diğer bir mutasyon daha gelişir ve direnç düzeyi katlanarak artar. “Wild type” duyarlı *Escherichia coli*'ye oranla *E.coli mar* mutantlarının antibiyotik baskısı altında seleksiyonu 1000 kat daha sıktır. Bakteri pompa sistemleri beş gruptur: MF, ABC, SMR, DMT, MATE ve Gram negatif bakterilerde yaygın olan RND (resistance-nodulation-division). RND pompaları üç elemandan oluşur: iç (sitoplazmik) membran proteini, periplazmik aralıkta membran füzyon proteini ve dış membran kanal proteini. RND pompalarına örnek olarak *E.coli*'nin Acr ve *Pseudomonas*'ların Mex sistemleri verilebilir. RND pompa proteinlerinin aşırı üretimi beta-laktam, florokinolon, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprimi içeren çoklu ilaç direncine yol açar^(18-20,27).

***E.coli* ve *Klebsiella*'da kinolon direnci**

Enterik Gram negatiflerde florokinolon direnci artışı dikkat çekecek boyuttadır. Uluslararası çok merkezli MYSTIC çalışmasında siprofloksasine direnç 1997-2002 arası *E.coli*'de % 8, *Klebsiella*'da % 6 daha artmıştır⁽²⁵⁾. *E.coli* ve *Klebsiella*'larda florokinolon direncinin genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimiyle doğru orantılı olduğunu gösteren yayınlar vardır^(17,24). Türkiye'de GSBL oranlarıyla birlikte florokinolon direnci de yükselmiştir. Ek olarak enterik Gram negatif bakterilerde, özellikle *E.coli* ve *Klebsiella*'larda, pompa direnci ek bir mekanizma olarak önem kazanmaktadır^(4,27). Bu bakterilerdeki kromozomal AcrAB-TolC pompası en sık florokinolon tedavisi sırasında indüklenir ve temel olarak yine florokinolon grubuna, ayrıca tetrasiklinlere ve kloramfenikole dirence yol açar^(19,20).

***Pseudomonas aeruginosa*'da karbapenem direnci**

P.aeruginosa'daki Mex (Multiple EffluX) sistemi içinde MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM gibi pompalar vardır; bunlardan en yaygın olarak aşırı üretim sonucu dirence yol açan MexAB-OprM pompasıdır. Kromozomal olarak düzenlenen konstitutif MexAB-OprM pompası en sık beta-laktam tedavisi sırasında indüklenerek aşırı üretilmeye başlar ve sonuç anti-*psödomonal* beta-laktamlara, florokinolonlara, tetrasiklinlere, aminoglikozidlere, trimetoprim, kloramfenikole, meropeneme ve ayrıca triklosan gibi bazı dezenfektanlara direnç gelişimidir. MexEF-OprN pompası florokinolonlarla indüklenir. Hem MexEF-OprN pompasının, hem de imipenemin hücre içine girişini sağlayan OprD porininin çalışmasını düzenleyen gen aynıdır ve bu gen inaktive olduğu zaman MexEF pompası fazla çalıştığı için

karbapenemler dışarı pompalanır, OprD proteinleri de fazla üretildiği için imipeneme geçirgenlik azalması olur. Sonuç olarak karbapenem MİK değerlerinde artış olur, florokinolon direnci de birlikte görülür. Kromozomal MexXY-OprM florokinolon, aminoglikozid, tetrasiklin ve makrolid direnciyle ilgilidir. Plazmidik olan MexCD-OprJ ise benzalkonyum klorid ve klorheksidin gibi dezenfektanlar tarafından indüklenip tetrasiklin, kloramfenikol, streptomisin, eritromisin, roksitromisin ve florokinolonları; beta-laktamlardan ise seçici olarak 4.kuşak sefalosporinleri (sefepim) dışarı pompalar^(11,13,15,19,20,26).

***H.INFLUENZAE*'DE BETA-LAKTAMAZA BAĞLI OLMAYAN AMPİSİLİN DİRENCİ**

Beta-laktamaz üretmedikleri halde ampisiline dirençli bulunan *H.influenzae* suşları kısaca BLNAR (beta-lactamase negative ampicillin resistant) olarak adlandırılmışlardır. BLNAR-*H.influenzae* suşlarında direnç profili tek başına ampisilin direnci şeklinde değil, yapısal değişiklikler sonucu PBP3A ve 3B'nin çoğu beta-laktam antibiyotige afinitesinde azalma şeklinde ortaya çıkar. Aynı zamanda sefaklor, sefuroksim gibi 2. kuşak sefalosporinler de içinde olmak üzere bazı beta-laktam antibiyotiklerin ve amoksisilin/klavulanik asitin MİK değerlerinde yükselme görülür^(2,12). Kaczmarek ve ark.⁽⁸⁾ PBP3 mutasyonlarıyla birlikte *H.influenzae*'de Acr pompa proteinlerinin aşırı üretiminin yüksek düzey ampisilin direnciyle sonuçlandığını bildirmişlerdir. Aynı pompa sisteminin eritromisin, azitromisin, klaritromisin ve ketolid direncinden de sorumlu olduğu bilinmektedir. Öte yandan yakın zamana kadar *H.influenzae*'de seftriakson gibi 3. kuşak sefalosporinlere direnç hiç görülmemekteydi ve bu nedenle hâlâ ampirik menenjit tedavisi için 3. kuşak sefalosporinler önerilir⁽¹⁾. Yeni bir bulgu olarak Kubota ve ark.⁽⁹⁾ ampisilin direnci için sınır değeri 2 µg/mL aldıkları çalışmada BLNAR-*H.influenzae*'nin (% 17), beta-laktamaz pozitif (% 15) suşlara oranla Okinawa-Japonya'da daha yüksek oranda bulunduğunu; tüm sefalosporin ve karbapenem MİK değerlerinin BLNAR grubu için daha yüksek ve bazı 3. kuşak sefalosporinlere tam direnç şeklinde olduğunu; genetik incelemelerinde PBP 3A ve 3B'nin amino asit dizilimindeki değişikliklere bağlı olarak beta-laktam direncinin 3.kuşağa kadar uzandığını bildirmişlerdir.

Yıllarca çeşitli ülkelerden <% 1 oranında bildirilen, dört kıtada sürdürülen Alexander Projesi'ndeki 1998-2000 verilerine göre sıklığı % 0.2 olan, dünyadaki ortalama sıklığı % 0-5 olarak bilinen, bugün Kuzey Amerika ve Avrupa'da seyrek rastlanan BLNAR-*H.influenzae* bazı ülkelerde yüksek oranlarda bulunmuştur⁽⁶⁾. 1992-1993 dönemine ilişkin İspanya % 1-17, 1998 kistik fibroz izolatlarına ilişkin Hollanda % 8.2 gibi artmış oranlar bildirmiştir^(3,14). 1996-1997 çocuk solunum

yolu izolatlarında ampisilin MİK değeri ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$ olan *H.influenza*-BLNAR oranının % 44.47'e çıktığına dikkat çeken Japonya'da bugünkü ortalama oran % 25-30'dur^(5,22). Çalışmaların bazılarında ampisilin direnç sınır değeri olarak ≥ 1 , bazılarında ise ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$ 'nin alınmış olması, karşılaştırmayı zorlaştırmaktadır. Bazı merkezlerden zaman zaman yüksek oranlar bildirilmiş olmakla birlikte, Türkiye'de BLNAR-*H.influenzae* ortalama oranları dünyadakiyle uyumlu şekilde <% 5 olarak seyretmektedir⁽²³⁾.

Dokuz binin üzerinde *H.influenzae* suşunun incelendiği uluslararası çok merkezli SENTRY çalışmasında klaritromisine duyarlılığın Kuzey Amerika'da (ABD ve Kanada) % 98'den % 81'e, Avrupa'da ve Güney Amerika'da % 99'dan % 90'a düştüğü; en düşük aktiviteli antibiyotik olan kotrimoksazole direncin Kuzey Amerika'da % 17'den % 21'e, Güney Amerika'da % 31'den % 41'e, Avrupa'da % 18'den % 24'e çıktığı bildirilmiştir. Bu çalışmada ampisiline direnç oranları Avrupa'da ve Güney Amerika'da % 16, Kuzey Amerika'da % 28'dir⁽⁷⁾. İtalya'nın dört bölgesinde yürütülen SENTINEL Projesinde kronik obstrüktif akciğer hastalığının (KOA) akut ataklarından izole edilen *H.influenzae* suşları, pnömoni izolatlarına oranla daha az duyarlı bulunmuş, kronik hastalıkta daha uzun süreli antibiyotik kullanımı sonucu göreceli azalmış duyarlılığın ortaya çıktığı düşünülmüştür. KOAH florasını oluşturan ve akut eksaserbasyonlardaki etkenler arasında kabul edilen *H.para**influenzae*'nin klaritromisin ve kotrimoksazole direnci her iki antibiyotik için de % 40, *H.influenzae*'de ise % 11 ve % 20 olarak bildirilmiştir⁽¹⁰⁾. Özyılmaz ve ark.⁽¹⁶⁾, kantitatif kültür yöntemini de kullanarak "infeksiyon" kararını verdikleri çalışmada, toplum kökenli alt solunum yolu infeksiyonlarında *H.influenzae*'yi % 46 oranında ve ilk sırada saptamışlardır. Türkiye'de son beş yıl içinde yapılan bir *H.influenzae* bildiriminde kotrimoksazole % 52, ampisiline % 21, sefaleksine % 10 direnç bulunmuş, seftriakson direnci görülmemiştir⁽²¹⁾. Bir diğer çalışmada ampisilin, ampisilin/sulbaktam ve levofloksasine direnç saptanmamış; klaritromisine % 8, kotrimoksazole % 32 direnç bulunmuştur⁽²⁸⁾.

KAYNAKLAR

- Booy R, Kroll SJ: Is Haemophilus influenzae finished? J Antimicrob Chemother 1997;40(2):149-53.
- Clairoux N, Picard M, Brouchu A, Rousseau N, Gourde P, Beauchamp D, Parr TR, Bergeron MG, Malouin F: Molecular basis of the non- β -lactamase-mediated resistance to β -lactam antibiotics in strains of Haemophilus influenzae isolated in Canada, Antimicrob Agents Chemother 1992;36(7):1504-13.
- Felmingham D, Grüneberg RN and the Alexander Project Group: A multicenter collaborative study of the antimicrobial susceptibility of community-acquired lower respiratory tract pathogens 1992-1993: The Alexander Project, J Antimicrob Chemother 1996;38(Suppl A):1-57.
- Hasdemir UO, Chevalier J, Nordmann P, Pages JM: Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae strains from Turkey, J Clin Microbiol 2004;42(6):2701-6.
- Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, Kobayashi R, Nagai K, Jacobs MR, Appelbaum PC, Sunakawa K, Ubukata K: Diversity of ampicillin-resistance genes in Haemophilus influenzae in Japan and the United States, Microb Drug Res 2003;9(1):39-46.
- Jacobs MR, Felmingham D, Appelbaum PC, Grüneberg RN: The Alexander Project 1998-2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents, J Antimicrob Chemother 2003; 52(2):229-46.
- Johnson DM, Sader HS, Fritsche TR, Biedenbach DJ, Jones RN: Susceptibility trends of Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis against orally administered antimicrobial agents: five-year report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, Diag Microbiol Infect Dis 2003;47(1):373-6.
- Kaczmarek FS, Gootz TD, Dib-Hajj F, Shang W, Hallowell S, Cronan M: Genetic and molecular characterization of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant Haemophilus influenzae with unusually high resistance to ampicillin, Antimicrob Agents Chemother 2004;48(5):1630-9.
- Kubota T, Higa F, Kusano N, Nakasone I, Haranage S, Tateyama M, Yamane N, Fujita J: Genetic analyses of beta-lactamase negative ampicillin-resistant strains of Haemophilus influenzae isolated in Okinawa, Japan, Jpn J Infect Dis 2006;59(1):36-41.
- Marchese A, Ardito F, Fadda G, Fontana R, Lo Cascio G, Nicoletti G, Speciale AM, Schito GC: The Sentinel Project: an update on the prevalence of antimicrobial resistance in community-acquired respiratory Streptococcus pneumoniae and Haemophilus spp in Italy, Int J Antimicrob Agents 2005;26(1):8-12.
- Maseda H, Sawada I, Saito K, Uchiyama H, Nakae T, Nomura N: Enhancement of the mexAB-oprM efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the mexEF-oprN efflux pump operon in Pseudomonas aeruginosa, Antimicrob Agents Chemother 2004;48(4):1320-8.
- Mendelman PM, Chaffin DO, Stull TL, Rubens CE, Mack KD, Smith AL: Characterization of non-beta-lactamase-mediated ampicillin resistance in Haemophilus influenzae, Antimicrob Agents Chemother 1984;26(2):235-44.
- Middlemiss JK, Poole K: Differential impact of MexB mutations on substrate selectivity of the MexAB-OprM multidrug efflux pump of Pseudomonas aeruginosa, J Bacteriol 2004;186(5):1258-69.
- Moller LV, Regelink A, Grasselie H, van Alphen L, Dankert J: Antimicrobial susceptibility of Haemophilus influenzae in the respiratory tract of patients with cystic fibrosis, Antimicrob Agents Chemother 1998;42(2):319-24.
- Morita Y, Murata T, Mima T, Shiota S, Kuroda T, Mizushima T, Gotoh N, Nishino T, Tsuchiya T: Induction of mexCD-oprJ operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type Pseudomonas aeruginosa PAO1, J Antimicrob Chemother 2003;51(4):991-4.

16. Ozyilmaz E, Akan OA, Gulhan M, Ahmed K, Nagatake T: Major bacteria of community-acquired respiratory tract infections in Turkey, *Jpn J Infect Dis* 2005;58(1):50-2.
17. Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Von Gottberg A, Mohapatra S, Trenholme GM, Klugman KP, McCormack JG, Yu VL: Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia, *Clin Infect Dis* 2000;30(3):473-8.
18. Piddock LJ: Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update 1994-1998, *Drugs* 1999;58(Suppl 2):11-8.
19. Poole K: Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria, *Clin Microbiol Infect* 2004;10(1):12-26.
20. Poole K: Efflux-mediated antimicrobial resistance, *J Antimicrob Chemother* 2005;56(1):20-51.
21. Poyrazoglu S, Komec S, Gokcay G, Ongen B: *Haemophilus influenzae* type b carriage among 3- to 24-month-old Turkish children, *Epidemiol Infect* 2005;133(6):1113-7.
22. Seki H, Kasahara Y, Ohta K, Saikawa Y, Sumita R, Yachie A, Fujita S, Koizumi S: Increasing prevalence of ampicillin-resistant, non-beta-lactamase-producing strains of *Haemophilus influenzae* in children in Japan, *Chemotherapy* 1999;45(1):15-21.
23. Şener B, Haşçelik G, Günalp A: *Haemophilus influenzae* suşlarının antimikrobik maddelere in-vitro duyarlılıkları ve beta-laktamaz aktiviteleri, 8. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Poster no.N-9, Antalya (1997).
24. Tolun V, Kucukbasmacı O, Torumkuneş-Akbulut D, Catal C, Ang-Kuçuker M, Ang O: Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains, *Clin Microbiol Infect* 2004;10(1):72-5.
25. Turner PJ: Trends in antimicrobial susceptibilities among bacterial pathogens isolated from patients hospitalized in European medical centers: 6-year report of the MYSTIC Surveillance Study (1997-2002), *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;51(4):281-9.
26. Vedel G: Simple method to determine beta-lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disk agar diffusion test, *J Antimicrob Chemother* 2005;56(4):657-64.
27. Yang S, Clayton SR, Zechiedrich EL: Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*, *J Antimicrob Chemother* 2003;51(3):545-56.
28. Zarakolu P, Soyletir G, Gur D, Unal S: Antimicrobial resistance patterns of respiratory pathogens: a local report from Turkey, *Clin Microbiol Infect* 2003;9(12):1257-8.