

DİRENÇ MEKANİZMALARI VE DİRENÇ BELİRLEME YÖNTEMLERİ

Zerrin AKTAŞ

İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL
aktaszerrin@yahoo.com

ÖZET

Acinetobacter spp. izolatlarında beta-laktam antibiyotiklere direncin ana mekanizması beta-laktamaz enzimlerinin üretimidir. Karbapenemlere direnç çoğunlukla metallo-beta-laktamaz ve karbapenemleri hidrolize eden oksasilineazların sentezi ile ilgilidir. Geniş spektrumlu beta-laktamlara direnç genellikle kromozomal AmpC enzimlerinin aşırı sentezlenmesi veya genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların üretiminden (GSBL) kaynaklanmaktadır. Dış membran geçirgenliğinde azalma, penisilin bağlayan proteinlerin modifikasyonları, aktif pompa sistemleri gibi diğer mekanizmalar da antibiyotiklere direnç gelişimine katkıda bulunur. Direnç genleri transpozonlar, integronlar ve associated insertion sequence (IS) elementleri veya plazmidler üzerinde bulunmaktadır.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter* spp., beta-laktamazlar, çoğul direnç, efluks pompaları

SUMMARY

Mechanisms of Resistance and Methods for Detection of Drug Resistance

One of the main mechanisms of resistance to beta-lactam molecules in *Acinetobacter* spp. is the production of beta-lactamases. Resistance to carbapenems is mostly related to production of metallo-beta-lactamases or carbapenem-hydrolyzing oxacillinases. Resistance to broad-spectrum cephalosporins usually results from overexpression of the natural AmpC-type enzyme or from production of extended-spectrum beta-lactamases. Other resistance mechanisms such as decreased permeability modification of PBPs or active efflux pumps contribute to resistance against antibiotics. The resistance genes have been found on transposons, integrons and associated insertion sequence (IS) elements or plasmids.

Keywords: *Acinetobacter* spp., beta-lactamases, efflux pumps, multi-drug resistance

Acinetobacter cinsi içerisinde 23 tür bulunmakla birlikte *Acinetobacter baumannii* insan infeksiyonlarında en sık izole edilen türdür⁽⁸⁾. Nozokomiyal infeksiyonlarda önemli rol oynayan *A.baumannii* sıklıkla hastanede yatan hastalarda solunum yolu infeksiyonu, özellikle ventilatörle ilişkili pnömoni etkenidir⁽⁸⁾. Bunun dışında üriner sistem infeksiyonu, bakteremi, menenjit deri ve yumuşak doku infeksiyonu gibi infeksiyonlara neden olmaktadır. Bu cinste bulunan bakterilerde geniş-spektrumlu beta-laktamlar, aminoglikozidler, florokinolonlar ve karbapenemleri de kapsayan çoğul antibiyotik direncinin ortaya çıkması ciddi infeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır. *Acinetobacter* cinsi bakteriler çeşitli beta-laktam antibiyotiklere intrinsek dirençli olmasının yanı sıra diğer kazanılmış farklı mekanizmalarla antibiyotiklere direnç

kazanır. *A.baumannii* izolatlarında beta-laktam antibiyotiklere direncin ana mekanizması beta-laktamaz enzimlerinin üretimidir. Karbapenemlere direnç metallo-beta-laktamaz ve karbapenemleri hidrolize eden oksasilineazlar ile ilgilidir. Geniş spektrumlu beta-laktamlara direncin nedeni ise kromozomal AmpC enzimlerinin aşırı sentezlenmesi veya genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzimlerini sentez eden genlerin kazanılmasından kaynaklanmaktadır⁽²⁾. Bunların dışında dış membran geçirgenliğinde azalma, penisilin bağlayan proteinlerin modifikasyonları, aktif pompa sistemleri ve azalmış porin ekspresyonu gibi çeşitli mekanizmalarla da antibiyotiklere direnç gelişmektedir. Penisilin ve sefalosporinlere direnç genellikle AmpC tipi kromozomal beta-laktamazlardan kaynaklanmaktadır. *A.baumannii*'de karbapenem direncin-

den sorumlu enzimler Sınıf A KPC, Sınıf B IMP, VIM ve NDM tipi metallo-beta-laktamazlar, Sınıf D kazanılmış OXA 23, 40, 58 ve 163 tipi karbapenemazlardır⁽¹⁶⁾. *A.baumannii*'de en sık saptanan GSBL enzimleri VEB, GES veya PER enzimleridir, TEM ve SHV'nin türevleri daha az sıklıkta bildirilmektedir⁽²⁾. Direnç genleri transpozonlar, integronlar ve associated insertion sequence (IS) elementleri veya plazmitler üzerinde bulunmaktadır. *A.baumannii*'de karbapenem direnci porin proteinlerindeki değişiklikler, penisilin bağlayan proteinlerdeki modifikasyonlar ve Sınıf B veya sınıf D beta-laktamazları sentezleyen genlerin kazanılmasıyla ilişkilidir. *A.baumannii*'de karbapenem direncine neden olan en yaygın beta-laktamaz tipi bu türe spesifik olan kazanılmış oksasilineazlardan OXA-23, OXA-40, OXA-58, OXA-143 enzimleri serin beta-laktamazlardır⁽¹⁶⁾. Ayrıca OXA-51 tip doğal oksasilineazın aşırı üretimi de kazanılmış karbapenem direncine neden olmaktadır. Oksasiline klasik penisilinlerden daha hızlı hidrolize etmeleri nedeniyle oksasilineazlar olarak tanımlanmışlardır. Klavulanik asit ve EDTA ile zayıf bir inhibisyon gösterirler, tazobaktam ve sulbaktamdan etkilenmezler, in vitro olarak NaCl₂ (100 mM) ile inhibe olurlar. Genel olarak oksasilineazlar, seftazidim, sefotaksim ve aztreonamı ya hiç hidrolize etmezler ya da zayıf bir şekilde hidrolize ederler⁽²²⁾. OXA tipi karbapenemazların çoğu imipenem ve özellikle meropeneme karşı zayıf hidrolitik aktivite gösterirler. Ayrıca dış membran proteinlerinin kaybı veya eflüks pompalarının artmış aktivitesi ile birlikte olduklarında daha geniş spektrumlu direncin gelişmesine neden olurlar. Kazanılmış Sınıf D beta-laktamaz genleri çoğunlukla Sınıf 1 integron veya IS elementleri üzerinde bulunurlar⁽¹⁶⁾.

A.baumannii'de kolistin direnci bakteri hücre membranındaki lipopolisakkaritin modifikasyonu, aminglikozidlere direnç ise aminoglikozid modifiye eden enzimler ve/veya eflüks pompaları ile oluşmaktadır.

Son zamanlarda yapılan çeşitli araştırmalar Gram negatif bakterilerde çoğul dirence neden olan aktif eflüks pompalarının rolüne odaklanmıştır^(6,7,18). Bakterilerde çoğul dirençten sorumlu aktif pompalarla ilgili beş aile tanımlanmıştır; "Multidrug and toxic compound ext-

rusion (MATE)" ailesi, "resistance-nodulation-cell division (RND)" ailesi, "adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC)" ailesi, "major facilitator süperailisi (MFS)" ve "small multidrug resistance (SMR)" ailesi^(3,10,12,21,23). *A.baumannii* izolatlarında RND sistemi en yaygın olarak bulunmaktadır. Bu ailede bulunan AdeABC, AdeIJK ve AdeFGH tipi atım pompalarının aktive olması ile antibiyotikler, boyalar, biyositler, deterjanlar ve antiseptiklere karşı direnç gelişmektedir. RND ailesinin dışında AmyA (MFS ailesi) ve AbeM (MATE ailesi) atım pompa sistemleri de *A.baumannii* izolatlarında bildirilmiştir. Bakterilerdeki pompa sistemleri, substratları olan ilaçlardan herhangi birinin kullanımı ile indüklenebilir ve tüm substratlara karşı direnç gelişimine neden olur. Spesifik pompa inhibitörleri pompaların aktivitelerini baskılar ve bu suşlar *A.baumannii* enfeksiyonlarında yaygın olarak kullanılan ilaçlara duyarlı olarak bulunur. Bu bakterilerde aktif pompa sistemlerinin çeşitli antibiyotik sınıflarına karşı direnç gelişimindeki rolü, Carbonyl Cyanide M-Chlorophenylhydrazone (CCCP) gibi bir inhibitörün kullanıldığı in vitro sinerji veya ilaç akümüilasyon deneyleri ile anlaşılabilir^(5,16). İn vitro sinerji testlerinde [MC-207,110 (phenylalanyl-arginyl-β-naphthylamide)], CCCP veya 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) gibi inhibitörlerin eklenmesiyle antibiyotiklerin minimum inhibisyon değerlerinde (MİK) dört kat veya daha fazla azalma olması anlamlı olarak değerlendirilmektedir. CCCP inhibitörü dışında PAβN inhibitörü eklenince gentamisin, tobramisin, kloramfenikol, çeşitli beta-laktamlar ve tigesiklinin MİK değerlerinde azalma olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir⁽¹³⁾. Diğer bir çalışmada çoğul dirençli *A.baumannii* izolatlarında diğer bir eflüks pompa inhibitörü olan 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) analiz edilmiş ve aktivitesi PAβN ile karşılaştırılmıştır. Düşük konsantrasyonda (25 mg/L) rifampisin ve klaritromisinin MİK değerlerinde azalmaya neden olmuş ve yüksek konsantrasyonlarda (100 mg/L) kullanıldığında ise NMP PAβN'den daha aktif bulunmuştur⁽¹¹⁾.

Mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan fenotipik testler: Karbapenemleri hidrolize

eden enzimler, karbapenemleri ve diğer beta-laktamları hidrolize etmek açısından farklı nitelikleri olan çeşitli enzimlerden oluşmaktadır. KPC, OXA ve MBL'ler plazmit, integron ve transpozonlar gibi hareketli elementler üzerinde bulunduklarından dolayı, direnç yayılımını sınırlamak ve tedaviye yön vermek amacıyla karbapenem direnç tiplerinin rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında tespit edilmesi gerekmektedir.

Acinetobacter türlerinde GSBL'leri saptamak için geliştirilmiş standart bir yöntem bulunmamaktadır. Karbapenemazların identifikasyonu için çeşitli fenotipik yöntemler geliştirilmiştir ve bu testler bu enzimlerin spesifik inhibitörleri kullanılarak belirlenebilmektedir. Fenotipik testlerin klinik laboratuvarlarda rutin olarak hızlı ve doğru olarak uygulanması klinik ve epidemiyolojik açıdan önemlidir.

Modifiye Hodge testi (MHT): MHT testi *Enterobacteriaceae* ailesinde karbapenem grubu antibiyotikler için saptanan ertapenem için >0.5 mg/L, imipenem, meropenem için MİK değeri >1 mg/L ise KPC tipi karbapenemaz aktivitesini belirlemek için tarama testi olarak kullanılmakla birlikte, diğer karbapenemazlardan ayırımını yapamamaktadır⁽⁴⁾. Bu test KPC, OXA ve MBL enzimlerinin hepsini birden tespit edebilmesi nedeniyle oldukça kullanışlı bir yöntemdir.

KPC tipi karbapenemazların tespiti için inhibitör olarak boronik asit (3 aminofenil boronik asit), metallo-beta-laktamazların tespiti için etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) ya da dipikolinik asidin inhibitör olarak kullanılması önerilmektedir^(9,20). NDM-1'de diğer MBL enzimleri gibi EDTA ile inhibe edilir⁽¹⁾. E-test, kombine disk sinerji testi veya disk sinerji testleri, bu enzimlerin EDTA ya da 2-merkaptopropionik asit (2-MPA) gibi metal şelatörler varlığında inhibe olma özelliğinden faydalananarak geliştirilmiştir.

OXA enzimlerini tespit eden güvenilirliği onaylanmış ve standardize edilmiş fenotipik bir test günümüze kadar geliştirilememiştir. Bu enzimler ancak PCR gibi moleküler yöntemler kullanılarak tespit edilebilmektedir⁽⁸⁾.

Karbapenemazları saptamak için kullanılan diğer testler izoelektrik odaklama yöntemi

(IEF) ve spektrofotometrik yöntemlerdir⁽¹⁾. Tanımlama için enzim kinetikleri, substrat hidroliz ve inhibisyon özellikleri spektrofotometrik yöntemlerle saptanabilir. Yaygın olarak uygulanmakla beraber izoelektrik noktalar sadece enzim ailesi hakkında bir fikir verebilir.

Moleküler yöntemler: Karbapenemazların tesbit edilmesinde genotipik yöntemler de kullanılmaktadır. Genotipik yöntemlerin fenotipik yöntemlere göre duyarlılığı daha yüksektir. Bakterinin karbapenemaz geni taşıyıp taşımadığını, enzimi ve tipini PCR yöntemi ile saptamak olasıdır. DNA problemleri kullanılarak da bu direnç genleri tesbit edilebilir^(8,15,16). Moleküler yöntemlerin altın standardı ise dizi analizi, protein analizi ve klonlama yöntemleridir^(8,17).

Ülkemizde de en sık izole edilen tür olması nedeniyle özellikle *A.baumannii* izolatlarında karbapenem direncine neden olan enzimlerin prevalansının belirlenmesi için çok merkezli çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Sadece fenotipik yöntemlerin uygulanması yeterli değildir, fenotipik test sonucu pozitif bulunan izolatlarda daha ileri karakterizasyon moleküler yöntemler kullanılarak yapılmalıdır. Direnç yayılımını sınırlamak ve tedaviye yön vermek amacıyla direnç tiplerinin rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında tespit edilmesi ve epidemiyolojik analizlerinin yapılması gerekmektedir, ancak bu şekilde gerçek prevalans hakkında bilgi sahibi olunabilir.

KAYNAKLAR

1. Bonnin RA, Naas T, Poirel L, Nordmann P. Phenotypical-, biochemical- and molecular-based techniques for detection of metallo-β-lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*, *J Clin Microbiol* (2012) [Epub ahead of print].
2. Bonnin RA, Nordmann P, Potron A, Lecuyer H, Zahar JR, Poirel L. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*, *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(1):349-54.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00773-10>
PMid:20956589 PMCID:3019676
3. Brown MH, Paulsen IT, Skurray RA. The multid-

- rug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters, *Mol Microbiol* 1999; 31(1):394-5.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01162.x>
 PMid:9987140
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; update, CLSI document M100-S20, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne PA (2010).
 5. Cortez-Cordova J, Kumar A. Activity of the efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine β -naphthylamide against the AdeFGH pump of *Acinetobacter baumannii*, *Int J Antimicrob Agents* 2011;37(5):420-4.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.01.006>
 PMid:21377839
 6. Coyne S, Courvalin P, P  richon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp., *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(3):947-53.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01388-10>
 PMid:21173183 PMCID:3067115
 7. Fernando D, Kumar A. Growth phase-dependent expression of RND efflux pump- and outer membrane porin-encoding genes in *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *J Antimicrob Chemother* 2012;67(3):569-72.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr519>
 PMid:22146875
 8. Figueiredo S, Bonnin RA, Poirel L, Duranteau J, Nordmann P. Identification of the naturally occurring genes encoding carbapenem-hydrolysing oxacillinases from *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, and *Acinetobacter calcoaceticus*, *Clin Microbiol Infect* (2011). doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03708.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03708>
 9. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen O, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-beta-lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin, *Clin Microbiol Infect* 2011;17(4):552-6.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03294.x>
 PMid:20597925
 10. Marger MD, Saier MH Jr. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport, *Trends Biochem Sci* 1993;18(1):13-20.
[http://dx.doi.org/10.1016/0968-0004\(93\)90081-W](http://dx.doi.org/10.1016/0968-0004(93)90081-W)
 11. Pannek S, Higgins PG, Steinke P et al. Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-beta-naphthylamide, *J Antimicrob Chemother* 2006;57(5):970-4.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl081>
 PMid:16531429
 12. Paulsen IT, Skurray RA, Tam R et al. The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs, *Mol Microbiol* 1996;19(6):1167-75.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02462.x>
 PMid:8730859
 13. Peleg AY, Adams J, Paterson DL. Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*, *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(6):2065-9.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01198-06>
 PMid:17420217 PMCID:1891386
 14. Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance, *Nat Rev* 2006;4(8):629-36.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1464>
 PMid:16845433
 15. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species, *IUBMB Life* 2011;63(12):1061-7.
<http://dx.doi.org/10.1002/iub.532>
 PMid:21990280
 16. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamase, *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(1):24-38.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01512-08>
 PMid:19721065 PMCID:2798486
 17. Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, Vázquez GJ. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico, *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(3):1354-7.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00899-09>
 PMid:20038618 PMCID:2825984
 18. Ruzin A, Immerman FW, Bradford PA. RT-PCR and statistical analyses of adeABC expression in clinical isolates of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex, *Microb Drug Resist* 2010;16(2):87-9.
<http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2009.0131>
 PMid:20438348
 19. Sohrabi N, Farajnia S, Akhi MT et al. Prevalence of OXA-type β -lactamases among *Acinetobacter baumannii* isolates from Northwest of Iran, *Microb Drug Resist* (2012) [Epub ahead of print]
 20. Tsakris A, Kristo I, Poulou A et al. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the

- clinical laboratory, *J Clin Microbiol* 2009;47(2):362-7.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01922-08>
 PMid:19073868 PMCID:2643660
21. van Veen HW, Konings WN. The ABC family of multidrug transporters in microorganisms, *Biochim Biophys Acta* 1998;1365(1-2):31-6.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00039-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00039-5)
 22. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases, *J Antimicrob Chemother* 2006;57(3):373-83.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dki482>
 PMid:16446375
 23. Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, Zórawski M, Krawczyk M, Tryniszewska E. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics, *Folia Histochem Cytobiol* 2008;46(3):257-67.
<http://dx.doi.org/10.2478/v10042-008-0056-x>
 PMid:19056528