

PSEUDOMONAS AERUGINOSA: FENOTIPURI DE REZISTENȚĂ LA ANTIBIOTICE

STANCA LUCIA PANDREA¹, LIA MONICA JUNIE²

¹ Clinica Medicală III, Cluj-Napoca

² Catedra de Microbiologie, UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca

Rezumat

Bacteriile aparținând genului Pseudomonas sunt recunoscute pentru rezistența intrinsecă la anumite clase de antibiotice, precum și pentru capacitatea lor de a achiziționa rapid gene ce codifică rezistența la antibiotice. Cele mai comune mecanisme de rezistență sunt producerea de β -lactamaze, precum și producerea de enzime de inactivare ale aminoglicozidelor. În plus, diminuarea expresiei proteinelor membranare externe, apariția unor mutații în topoizomeraze, precum și apariția sistemelor de eflux, joacă un rol important în rezistența la diferite clase de antibiotice, precum fluorochinolone, cloramfenicol, tetraciclina, dar și beta-lactamine. Acumularea acestor mecanisme duce la apariția tulpinilor multirezistente sau „panrezistente”.

Cuvinte cheie: *Pseudomonas aeruginosa*, rezistență intrinsecă, rezistență la antibiotice.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA: ANTIBIOTIC RESISTANCE PHENOTYPES

Abstract

Pseudomonas spp. are noted for intrinsic resistance of many antibiotics and ability to acquire gene encoding resistance determinants. Most common mechanisms or resistance of these pathogens is the production of β -lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes. Diminished expression of outer membrane proteins, mutations in topoisomerases and up-regulation of efflux pumps play an important part in antibiotic resistance, to quinolones, chloramphenicol, tetracyclines and β -lactams. The accumulation of multiple mechanism of resistance leads to the development of multiply resistant or even "panresistant" strains.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, intrinsic resistance, antibiotics resistance.

Introducere

Rezistența bacteriilor la antibiotice este fie naturală, fie dobândită. Rezistența naturală a unei specii sau a unui gen este o caracteristică proprie, aparținând unei specii sau a unui gen, indiferent de condițiile de izolare. Rezistența naturală este transmisibilă la descendenți, fiind cromozomială (transmisie verticală), ea determinând fenotipurile sălbatice la antibiotice. Transmiterea orizontală este rară sau inexistentă.

Rezistența dobândită se referă la o proporție de tul-

pini din cadrul unei specii sau gen bacterian, ea existând prin dobândirea unui mecanism sau a mai multor mecanisme de rezistență, care determină un fenotip de rezistență, diferit de fenotipul sălbatic și caracteristic tulpinilor care au dobândit acest mecanism.

Mecanismele rezistenței dobândite au ca suport genetic elemente mobile (plasmide, transpozoni), ele având capacitatea de a fi transmisibile orizontal, uneori între specii diferite. Transmiterea verticală este posibilă, dar uneori este aleatorie. Mecanismele de rezistență dobândită sunt mai bine cunoscute decât cele ale rezistenței naturale.

Mecanismele de rezistență dobândită se împart în trei categorii: diminuarea cantității de antibiotic care atinge

Articol intrat la redacție în data de: 11.01.2011

Acceptat în data de: 17.01.2011

Adresa pentru corespondență: stanca_lucia_pandrea@yahoo.com

ținta prin diminuarea permeabilității sau prin apariția sistemelor de eflux, modificarea țintei antibioticului și inactivarea antibioticului [1,2].

Diminuarea permeabilității apare mai ales la nivelul membranei externe a bacteriilor Gram-negative, la care porii se obțin parțial sau total sau pot uneori să dispară. Mutații care afectează lipopolizaharidul pot duce la scăderea accesibilității antibioticelor prin porii de la exteriorul membranei externe [1]. Modificările apărute la nivelul membranei citoplasmice pot fi implicate mult mai rar (rezistența la aminoglicozide prin modificarea sistemelor de transport). Sistemele de eflux sunt alcătuite din proteine particulare cu rol de pompe, care utilizează o forță proton-motrice care expulzează antibioticul de când pătrunde în celula bacteriană [1]. Aceste sisteme de eflux pot apărea la clase de antibiotice diferite: fluorochinolone, cloramfenicol, tetraciclone, dar și beta-lactamine, constituint sistemele de rezistență multiplă.

Modificarea țintei antibioticului: poate fi vorba de o modificare parțială sau a naturii țintei, o modificare a numărului (hiperproducție), o schimbare totală a țintei (țintă nouă) sau uneori o asociere a mai multor mecanisme din cele menționate. Aceste modificări se realizează prin mutații la nivelul genelor care codifică ținta antibioticului sau prin achiziționarea de gene străine. Un exemplu de mutație este rezistența dobândită la fluorochinolone prin modificarea ADN-girazei sau a topoisomerasei IV.

Inactivarea antibioticului este mecanismul cel mai frecvent întâlnit. Poate fi o distrugere a antibioticului (hidroliza beta-lactaminelor de către beta-lactamaze) sau modificarea moleculei prin anexare de radicali: esterificarea aminoglicozidelor de către aminoizidofotransferaze (APH), nucleotidiltransferaze (ANT), acetiltransferaze (AAT).

Rezistența la antibiotice la *Pseudomonas aeruginosa*

Rezistența naturală a *P. aeruginosa* este importantă, iar rezistențele dobândite sunt foarte frecvente. Rezistența generală a *P. aeruginosa* se datorează unei combinații de mai mulți factori: acesta este intrinsec rezistent la anumiți agenți microbieni, datorită permeabilității scăzute a peretelui celular; are capacitatea de a-și exprima genetic un larg repertoriu al mecanismelor de rezistență: el poate deveni rezistent prin mutații cromozomiale în genele care reglementează rezistența genetică, poate achiziționa gene suplimentare de rezistență de la plasmide, transpozoni sau bacteriofagi [1,2]. Un element suplimentar care contribuie la rezistența *P. aeruginosa* mai ales la izolatele provenite de la pacienți cu fibroză chistică [3,4] este modul său de creștere în plămâni. Agregatele de bacterii din plămâni sunt înconjurate de un strat de polizaharid alginat [5]. De acest strat se pot lega antibiotice cationice, cum ar fi aminoglicozidele, restricționând difuzia acestora [5].

Aceste microcolonii sau biofilme sunt extrem de rezistente la antibiotice, datorită unor mecanisme care rămân neclare.

Rezistența la beta-lactamine

Fenotipul sălbatic este legat de producerea unei cefalosporinaze inductibile de către aminopeniciline și cefalosporinele din prima și a doua generație, cuplată sau nu cu o impermeabilitate mai mult sau mai puțin marcată și de un sistem de eflux activ constitutiv. Acest fenotip se traduce printr-o rezistență la aminopeniciline, ca atare sau asociate cu inhibitori de beta-lactamaze (IBL) și la cefalosporinele de generația I sau a II-a.

Rezistențele dobândite sunt legate de mecanisme enzimatice (penicilinaze, cefalosporinaze, BLSE = beta-lactamaze cu spectru extins, metalo-enzime) sau neenzimatice (impermeabilitate, mecanism de eflux și modificarea țintei antibioticului).

Rezistența dobândită enzimatică se exprimă prin:

- penicilinaze plasmidice transferabile: PSE, TEM, OXA, cu rezistență la carboxipeniciline, ureidopeniciline, cefoperazonă și sensibilitate la: ceftazidim, cefepim, imipenem, IBL;
- BLSE tip penicilinază (TEM, SHV, PER, VEB): sensibilitate la imipenem, carboxipeniciline + IBL, ureidopeniciline + IBL;
- BLSE tip oxacilinază: OXA-2, OXA-10: sensibilitate la imipenem;
- cefalosporinaze cromozomiale dereprimate hiper-produse, cu rezistență la toate beta-lactaminele, cu excepția cefepimului și imipenemului;
- cefalosporinaze cromozomiale dereprimate hiper-produse la nivel înalt: cu sensibilitate doar la imipenem;
- carbapenemaze: sensibile doar la aztreonam [1,6]

Rezistența dobândită neenzimatică se exprimă prin trei sisteme de eflux:

- MexA-MexD-OprM, constitutiv, care conferă rezistență naturală, dar poate fi supraexprimată și poate induce o rezistență la carboxipeniciline și aztreonam [6];
- MexC-MexD-OprJ: rezistență la cefepim și cefpirom;
- MexC-MexF-OprN: adesea cuplată cu diminuarea D2, rezistență la imipenem;
- deficit de porine: pierderea porinelor D2, rezistență variabilă la carbapeneme (uneori asociată cu o cefalosporinază dereprimată) [8];
- modificarea lipopolizaharidului (LPS): permeabilitate diminuată pentru toate beta-lactaminele, cu excepția imipenemului;
- modificarea PLP-urilor (protein-binding-penicillin): PLP-urile 2 sau 4: rezistență la imipenem; PLP-3: rezistență la toate beta-lactaminele, cu excepția imipenemului.

Fenotipurile de rezistență ale *P. aeruginosa* la beta-lactamine sunt redate în tabelul următor.

Tabel nr. I. Fenotipuri de rezistență ale *P. aeruginosa* la beta-lactamine.

	Fenotip sălbatic	Penicilinaza	CHN	BLSE		CPM	Eflux			D2
ANTIBIOTIC				OXA	PER		OprM	OPRJ	OprN	
Ticarcilină	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S
Ticarcilină – acid clavulanic	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S
Piperacilină	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S
Piperacilină – tazobactam	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
Cefoperazon	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S
Ceftazidim	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S
Cefepim	S	S	S/R	R	R	R	S	R	S	S
Cefpirom	S	S	S/R	R	R	R	S	R	S	S
Aztreonam	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S
Imipenem	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R
Frecvență		+	+				+			+

Legendă: CHN – cefalosporinază (nivel ridicat); BLSE – β -lactamază cu spectru extins; CPM- carbapenemaze; S = sensibil; I = intermediar; R = rezistent.

Tabel nr. II. Fenotipuri de rezistență ale *P. aeruginosa* la aminoglicozide.

Fenotip	Enzima	G	T	Nt	A	I
G	AAC (3)-I	R	S	S	S	S
GNt	AAC (3)	R	S	R	S	S
GT	ANT (2'')-I	R	R	S	S	S
GNtT	AAC (6')-II AAC (3)-II, IV, V	R	R	R	S	S
TNtA	AAC (6')-I	S	R	R	R	?
GTNtA	AAC (6') + ANT (2'')-I	R	R	R	R	?
EFLUX (30-40%)	-	R	S	R	R	R

Legendă: G – Gentamicină; T – Tobramicină; Nt – Netilmicină; A – Amikacină; I – Isepamicină; AAC - Acetiltransferază; ANT - Nucleotidiltransferază.

Tabel nr. III. Fenotipuri de rezistență la fluorochinolone ale *P. aeruginosa*.

Fenotip	Norfloxacin	Pefloxacin	Ofloxacin Levofloxacin	Ciprofloxacin
I (sălbatic)	S	S	S	S
II	I	I	I	S
III	R	R	R	S
IV	R	R	R	R
Eflux	R	S	S	R

Legendă: NOR = Norfloxacin; PEF = Pefloxacin; OFX = Ofloxacin; CIP = Ciprofloxacin.

Rezistența la aminoglicozide

Tulpinile sălbatice de *P. aeruginosa* sunt sensibile la toate aminoglicozidele. Rezistența dobândită se datorează unor numeroase mecanisme gen impermeabilitate, eflux, inactivare enzimatică, mutante respiratorii sau combinații ale acestor mecanisme [1,2]. Rezistența prin impermeabilitate este frecventă.

Rezistența la fluorochinolone

Fenotipul sălbatic al tulpinilor de *P. aeruginosa* este sensibil in vitro la toate fluorochinolonele: norfloxacin, ofloxacin, pefloxacin, ciprofloxacin și levofloxacin.

P. aeruginosa este natural rezistent la trimetoprim-sulfametoxazol și Nitrofurantoin.

Rezistența la aminoglicozide și colistin s-a observat la tulpini de *P. aeruginosa* prin supraexpresia unei proteine din membrana externă, oprH, care protejează LPS, nepermițând legarea antibioticului [7].

Patogeneza infecției cu *P. aeruginosa* este complexă, așa cum se evidențiază prin diversitatea clinică a bolilor legate de acest microorganism și prin multitudinea factorilor de virulență pe care acesta îi produce.

P. aeruginosa determină rar boala la o gazdă sănătoasă. Totuși, poate suferi o transformare „malignă” atunci când:

- barierele mucoase sau cutanate normale sunt lezate sau ocolite (arsuri, traumatism penetrant, intervenție chirurgicală, intubație endotraheală, cateterizarea vezicii urinare sau abuzul de medicamente intravenoase);

- mecanismele imunologice de apărare sunt compromise (neutropenia indusă de chimioterapie, hipogamaglobulinemia, vârstele extreme, diabet zaharat, fibroză chistică, SIDA sau cancer);

- funcția protectoare a florei bacteriene normale este afectată de tratamentul cu antibiotice cu spectru larg și/sau când pacientul a fost expus la rezervoare existente în mediul de spital.

Răspândirea generală a microorganismului, necesitățile sale metabolice și nutriționale flexibile, rezistența sa în mediu și rezistența relativă la antibiotice sunt factorii răspunzători de frecvența implicării ca un patogen oportunist [9].

P. aeruginosa este un microorganism care pune astfel mari probleme de terapie antibiotică, în special datorită nivelului înalt de rezistență la antibiotice.

Sistemul de supraveghere europeană a rezistenței microbiene, EARSS, reprezintă o rețea europeană ce colectează date legate de rezistența microbiană a unor germeni specifici, printre care și *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* sau *P. aeruginosa* în vederea monitorizării tendințelor din diferite țări.

Cu toate că EARSS are cea mai completă bază de date despre rezistența germenilor la chimioterapicele antiinfecțioase din Europa, sistemul are unele limite. EARSS nu testează bacteriile, ci preiau date, EUCAST și statele membre UE fac eforturi să standardizeze testarea sensibilității la chimioterapicele antiinfecțioase în Europa.

EARSS organizează regulat cursuri pentru îmbunătățirea calității testării sensibilității la chimioterapice antiinfecțioase în laboratoarele care aparțin EARSS. Cu toate acestea, EARSS se bazează pe datele raportate de statele membre conform protocolului său. Pentru unele state membre nu există date relevante din toate regiunile geografice ale țării. Cu toate acestea, datele sunt de obicei estimate pentru fiecare țară în parte, lipsind date doar pentru foarte puține țări.

În țările Europei de Nord se observă că procentul tulpinilor de *P. aeruginosa* rezistente la cefalosporine de generația a III-a este descendent în majoritatea țărilor participante la studiul EARSS (Irlanda de la 10% în 2005 la 4% în 2008; Islanda de la 8% în 2005 la <1% în 2008).

Tabel nr. IV. Procentul tulpinilor de *P. aeruginosa* rezistente la cefalosporine de generația a III-a din Europa de Nord [adaptat 10,11,12,13].

ȚARI	2005	2006	2007	2008
Suedia	5	6	4	5
Danemarca	-	-	2	3
Norvegia	3	5	3	4
Finlanda	5	3	5	5
Irlanda	10	6	5	4
Islanda	8	<1	<1	<1
Marea Britanie	3	3	7	4

În majoritatea țărilor Europei de Sud se remarcă creșterea semnificativă a procentului tulpinilor de *P. aeruginosa* rezistente la cefalosporine de generația a III-a, după cum urmează: Italia de la 20% în 2006 la 24% în 2008; Grecia de la 27% în 2005 la 37% în 2008; Spania de la 6% în 2005 la 11% în 2008; Croația de la 6% în 2005 la 13% în 2008.

Tabel nr. V. Procentul tulpinilor de *P. aeruginosa* rezistente la cefalosporine de generația a III-a din Europa de Sud [adaptat 10,11,12,13].

ȚARI	2005	2006	2007	2008
Italia	-	20	25	24
Grecia	27	34	40	37
Spania	6	7	10	11
Portugalia	-	19	16	16
Malta	11	30	3	33
Polonia	31	42	21	27
Croația	6	11	14	13

În Bulgaria, valoarea procentuală a tulpinilor de *P. aeruginosa* rezistente la cefalosporine de generația a III-a raportată în 2008 este de 55%. Turcia și România, în anul 2005, raportau la EARSS aproximativ aceleași procente (respectiv 50%, versus 52%). În Ungaria se raportează, în 2005, 10% tulpini de *P. aeruginosa* rezistente la cefalosporine de generația a III-a, scăzând la 8% în 2006, respectiv 9% în 2007, ca apoi să crească la 11% în 2008.

Tabel nr. VI. Procentul tulpinilor de *P. aeruginosa* rezistente la cefalosporine de generația a III-a din Europa de Est [adaptat 10,11,12,13].

ȚARI	2005	2006	2007	2008
România	52	<1	<1	13
Turcia	50	24	23	21
Bulgaria	45	13	21	55
Republica Cehă	40	31	33	44
Ungaria	10	8	9	11

Cel mai ridicat procent al tulpinilor de *P. aeruginosa* rezistente la cefalosporine de generația a III-a din Europa Centrală și de Vest s-a înregistrat în Germania în anul 2007, respectiv 17%.

Tabel nr. VII. Procentul tulpinilor de *P. aeruginosa* rezistente la cefalosporine de generația a III-a din Europa Centrală și de Vest [adaptat 10,11,12,13].

ȚARI	2005	2006	2007	2008
Franța	9	6	7	8
Olanda	5	5	4	6
Germania	11	12	17	8
Belgia	-	-	-	-
Austria	7	9	5	6
Luxemburg	<1	10	11	3

Cele mai recente date (05.01.2011) ale EARSS indică în România (singura țară din Europa cu acest nivel de rezistență) un procent al rezistenței la carbapeneme (meropenem) de peste 50%. Rezistența la aminoglicozide (gentamicina) și fluoroquinolone (ciprofloxacin), precum și la piperacilin se situează între 25-50%, alături de: Bulgaria, Ungaria, Polonia, Cipru, Grecia, Italia. În ceea ce privește rezistența la ceftazidim, nu au fost suficiente date raportate (sau numărul lor a fost sub 10 izolate raportate), pentru un raport privind rezistența la acest antibiotic [14].

Datele îngrijorătoare privind rezistența la antibiotice a *P. aeruginosa* în Europa și mai ales în România implică necesitatea cunoașterii mecanismelor de rezistență la antibiotice ale *P. aeruginosa*, recunoașterea fenotipurilor de rezistență, cu aplicarea antibioterapiei corecte, dar și administrarea rațională a antibioticelor.

Bibliografie

- Jehl F, Chomarat M, Weber M., Gerard A. De l'antibiogramme à la prescription. 2^{ème} Edition, BioMérieux, 2004
- Hancock RE. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. Clin Infect Dis 1998; 1(suppl): S93-99
- Henwood CJ, Livermore DM, James D, Warner M.

- Pseudomonas Study Group. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: results of UK survey and evaluation of the British Society for Antimicrobial chemotherapy disc susceptibility test. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 789-799
4. Pitt TL, Sparrow M. Survey of antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients in the United Kingdom. Abstracts of the 24th European Cystic Fibrosis Conference. Vienna: ECFS, 2001
5. Nichols WW, Dorrington SM, Slack MP, Walmsley HL. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 518-523
6. Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2001; 3: 255-264
7. Gilleland LB, Gilleland HE, Gibson JA, Champlin FR. Adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 1989; 29: 41-50
8. Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 247-250
9. Landman D, Quale JM, Mayorga D, et al. Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned. *Arch Intern Med* 2002, 163(13): 1515-1524
10. *** EARSS Annual Report 2005 Available from: http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202005_tcm61-34899.pdf
11. *** EARSS Annual Report 2006 Available from: http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202006%20Def_tcm61-44176.pdf
12. *** EARSS Annual Report 2007 Available from: http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202007_FINAL_tcm61-55933.pdf
13. *** EARSS Annual Report 2008 Available from: http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202008_final_tcm61-65020.pdf
14. *** <http://www.ndsc.ie/hpsc/A-Z/MicrobiologyAntimicrobialResistance/>