

REZISTENȚA LA ANTIBIOTICE A BACTERIILOR IMPLICATE ÎN INFECȚIILE SEVERE

*Antibiotic resistance of bacteria involved
in severe infections*

Șef Lucr. Dr. Adriana Slavcovici

REZUMAT

Există specii la care unele clone pot invada celula mamaliană sau din contră, evoluează extracelular (ex. *Pseudomonas aeruginosa*). În acest caz, tratamentul cu unele antibiotice va selecta clonele intracelulare cu un metabolism al peretelui celular modificat și în consecință cu un alt fenotip de sensibilitate/rezistență. Pompele de eflux tip MDR care intervin în rezistența bacililor Gram-negativ la diverse antibiotice sunt capabile de expulzia și a altor molecule și anume a moleculelor quorum-sensing, a defensinelor.

Cuvinte cheie: specii, molecule quorum-sensing, defensine, pompe de eflux

ABSTRACT

There are species in which several clones can invade the mammalian cell or on the contrary, evolve extracellularly (*Pseudomonas aeruginosa*). In this case treatment with some antibiotics will select intracellular clones with a modified cellular wall metabolism, and therefore with a different sensibility/resistance phenotype. MDR efflux pumps that interfere in the Gram-negative bacteria resistance to certain antibiotics are capable of extruding other molecules too - quorum-sensing molecules, defensins.

Key words: species, quorum-sensing molecules, defensins, efflux pumps

De exemplu localizarea intracelulară a bacteriilor determină un anumit fenotip de rezistență. În cazul tulpinilor intracelulare de *Salmonella* apar modificări importante în metabolismul peptidoglicanului și în consecință modificări ale sensibilității la betalactamine.

Există specii la care unele clone pot invada celula mamaliană sau din contră evoluează extracelular (ex. *Pseudomonas aeruginosa*). În acest caz tratamentul cu unele antibiotice va selecta clonele intracelulare cu un metabolism al peretelui celular modificat și în consecință cu un alt fenotip de sensibilitate/rezistență. Un alt exemplu al relației virulența-rezistența se întâlnește la *Bordetella pertussis*, la care doar tulpinile avirulente sunt sensibile la betalactamine. Tulpinile virulente prezintă fenotipul de toleranță deoarece liza bacteriană este controlată de locus *vir*, element cheie al virulenței (16).

Pompele de eflux tip MDR care intervin în rezistența bacililor Gram-negativ la diverse antibiotice sunt capabile de expulzia și a altor molecule și anume a moleculelor quorum-sensing, a defensinelor. Astfel reducerea sensibilității la antibiotice prin mecanism de eflux este asociată cu creșterea virulenței, adică selectarea unui mecanism de virulență determină ????????????

Antibioticele au avut un impact deosebit asupra lumii moderne prin scăderea morbidității, mortalității sau facilitarea managementului unor infecții severe. În timp, omul a avut o atitudine duplicitară față de bacterii: de minimalizare a rolului microorganismelor în evoluția noastră (neglijând măsurile de igienă și facilitând astfel modalitățile de transmitere a tulpinilor rezistente), sau paradoxal de exagerare a rolului microorganismelor (intervenind abuziv și agresiv cu antibiotice, respectiv realizând o presiune de selecție

Adresa de corespondență:

Șef Lucr. Dr. Adriana Slavcovici, UMF „Iuliu Hațieganu”, Str. Victor Babeș, Nr. 8, Cluj Napoca, Cod poștal 4012

a tulpinilor rezistente). Astfel medicina modernă se confruntă cu fenomenul de rezistență al bacteriilor, fenomen care a existat de milioane de ani, a precedat apariția omului, dar pe care îl percepem acut în acest moment.

Rezistența la antibiotice este o calitate funcțională și inevitabilă a bacteriilor, o modalitate elegantă de a eluda acțiunea letală a drogurilor antibacteriene. Rezistența conferă bacteriei capacitatea de a supraviețui la concentrații citotoxice de antibiotic.

Pentru a eficientiza acest mod de a se sustrage acțiunii antibioticelor, bacteriile posedă capacitatea de a modula expresia genelor de rezistență asigurându-se astfel o evoluție rapidă cu un cost energetic minim chiar în prezența agenților antimicrobieni (1).

Rezistența se manifestă atât la nivel individual cât și populațional (chiar la scară globală), consecințele fiind creșterea morbidității, mortalității, a costului/bolnav și a unei palete foarte reduse de antibiotice utilizabile în infecțiile cu bacterii rezistente sau multi-rezistente.

Înțelegerea rezistenței bacteriologice și clinic, controlul fenomenului de rezistență la nivel populațional (comunitar sau nosocomial), reprezintă un domeniu important la care își aduc aportul cercetările privind biologia și ecologia bacteriană, cercetările privind microbiomul, cercetările farmacogenetice precum și din industria farmaceutică.

În contextul cercetărilor mileniului III, expresia „lumea microbială“ este insuficientă pentru a contura temporal sau spațial rolul microorganismelor în dezvoltarea, starea de sănătate a individului sau tratamentul diverselor boli infecțioase. Ecologia microbială trebuie apreciată la o altă scară dacă ne imaginăm această lume a microorganismelor similară cu milioane de universuri și milioane de galaxii. În microbiologia modernă se impune elaborarea unui set de reguli necesar studiului descriptiv și predictiv al microorganismelor în relație cu gazda umană sau cu condițiile de habitat (2).

Bacteriile au precedat cu miliarde de ani speța umană la nivel planetar, perioada în care și-au perfecționat modalitățile de adaptare la mediul extern prin plasticitate și flexibilitate genetică (3). Evoluția omului a avut loc în prezența unei flore bacteriene endogene, relație de simbioză, comensalism, în care numărul celulelor bacteriene din microbiota umană depășește numărul de celule umane - 10^{14} vs. 10^{13} . De asemenea evoluția omului a avut loc în prezența unei flore exogene (trili-

oane de „parteneri“ microbieni), cu unele specii bacteriene fiind în relație de parazitism. Deci genomul uman a fost într-o relație permanentă cu genomul diferitelor specii microbiene (microbiom), relație cu consecințe asupra variabilității răspunsului gazdei umane la droguri (ex. antibiotice) și a variabilității genotipice și fenotipice a bacteriilor (ex. prezența și expresia genelor de rezistență) (4).

Ansamblul genelor de rezistență ale bacteriilor constituie rezistomul, respectiv genele de rezistență ale bacteriilor patogene, oportuniste, genele de rezistență criptice și genele pentru precursori proteici care indirect pot avea un rol în rezistența la antibiotice.

Noile domenii de cercetare vor furniza un cadru diferit al terapiei antibiotice bazat pe markeri farmacogenetici/farmacogenomici, markeri genetici de rezistență constitutivă sau inductibilă, markeri de răspândire a rezistenței. Diversitatea microorganismelor, variatele genotipuri și fenotipuri de sensibilitate/rezistență la antimicrobiene, sunt în curs de studiere pe baza metodelor automate de secvențiere a genelor. Diferențele secvențelor ADN ale microorganismelor determină diversitatea genetică fiind responsabile de varietatea existentă în cadrul aceleiași specii.

Utilizarea în viitor a markerilor farmacogenomici/farmacogenetici sau a celor de rezistență va sta la baza elaborării de algoritmi terapeutici cu alegerea antibioticului adecvat sau a dozelor corespunzătoare (5, 6).

În condiții standard de laborator este posibilă creșterea/cultivarea doar a <1% dintre microorganismele existente în natură deci aprecierea sensibilității/rezistenței la antibiotice este foarte limitată prin metodele clasice (difuzimetric, determinarea CMI, CMB, E-test). Metagenomică și programe computerizate au realizat o modalitate de nouă de studiu comprehensiv al secvențelor nucleotidice, al structurii, reglării și funcției lor, oferind informații cu aplicabilitate terapeutică sau utile menținerii stării de sănătate.

O mare parte a antibioticelor își au originea în bacteriile existente în ambient, prezența unora fiind estimată la > 240 milioane de ani: eritromicină, streptomycină, vancomicină, altele fiind biosintetizate de > 30 milioane de ani: daptomicină (7).

În egală măsură aceste bacterii prezintă mecanisme precise de protecție față de proprii produși, mecanisme care transferate patogenilor sau oportuniștilor reprezintă o armă sofisticată de anulare a acțiunii antibioticelor. Deci originea

rezistenței este mediul ambiental, astfel rezistența la vancomicină este prezentă la *Streptomyces coelicolor*, *Paenibacillus Rhodococcus* iar betalactamazele au o vechime de cel puțin 2 bilioane de ani (8, 9, 10).

În lumina acestor date rezistența la antibiotice reprezintă un eisberg al microbiomului pe care-l percutăm în mod acut datorită presiunii de selecție exercitată de variații factori de mediu dar preponderent de utilizarea excesivă, mai mult sau mai puțin corectă, a antibioticelor în patologia umană și veterinară.

Este necesară abordarea rezistenței sub aspect genetic, biochimic, clinic și epidemiologic cu atât mai mult cu cât bacteriile sau doar genele de rezistență nu au nevoie de un pașaport pentru răspândirea în comunitate sau în spital.

Rezistența este naturală sau dobândită. Rezistența naturală reprezintă o caracteristică intrinsecă a unor specii bacteriene. De exemplu rezistența la ampicilină a tulpinilor de *Ps. aeruginosa*, *Klebsiella* spp.; rezistența anaerobilor la aminoglicozide, rezistența la cefalosporine gen.1,2 a tulpinilor de *Listeria monocytogenes*.

Rezistența dobândită prezintă o importanță clinică și epidemiologică deosebită datorită transmiterii în cadrul aceleiași specii dar și între specii, genuri îndepărtate taxonomic.

Genetica rezistenței. Există 2 mecanisme de rezistență dobândită: prin mutații la nivelul ADN-ului endogen sau achiziții de material genetic exogen. Mutațiile sau achiziția de material genetic exogen sunt permanente reflectând modificările ADN-lui bacterian.

a. mutații la nivelul ADN-ului bacterian

Mutațiile punctiforme sau extinse sunt responsabile de rezistența la peniciline, cefalosporine, fluoroquinolone, rifampicină. Mutațiile apar

spontan fie în genele structurale determinând modificări ale moleculelor țintă sau sinteza enzimelor ce inactivează antibioticul, fie în genele reglatorii cu activarea în consecință a pompelor de eflux pentru antibiotic și/sau modificarea porinelor. Genele de rezistență sau represorii lor pot fi activați sau inactivați prin migrarea secvențelor de inserție.

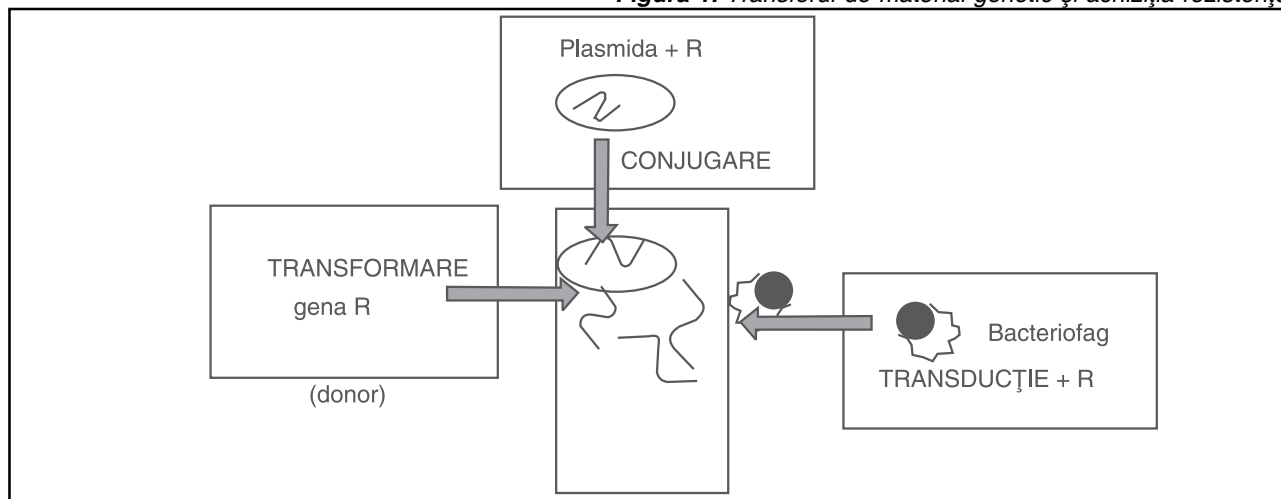
În patologia infecțioasă, acest tip de rezistență se întâlnește la tulpinile de *Streptococcus pneumoniae* rezistente la peniciline și/sau cefalosporine, tulpinile de *S.aureus* cu rezistență la oxacilină, mutațiile determinând modificări ale moleculelor țintă respectiv PBP-urile esențiale. Unele mutații ale genelor responsabile de sinteza clasicelor betalactamaze (TEM1, SHV1) au determinat apariția de betalactamaze cu spectru extins (ESBL), betalactamaze frecvent întâlnite în infecții nosocomiale. Rata mutațiilor este de 10^{-8} (10^{-5} - 10^{-11}) dar crește de 200x la tulpinile hipermutabile în condițiile de stress oxidativ, în prezența antibioticelor. Acest fenomen se întâlnește la tulpinile de *E.coli* cu rezistență la quinolone sau în cazul fibrozei chistice la tulpinile de *Ps.aeruginosa* cu multi-rezistență la cefalosporine, aminoglicozide, cloramfenicol.

Datorită mutațiilor apare multi-rezistența prin eflux (MexAB-OprM, MexCD-Opr J, MexEF-Opr N) în asociere cu alterarea porinelor OprD sau modificări ale moleculelor țintă (11). În infecțiile cu bacili Gram-negativ tratamentul cu cefalosporine selectează mutante derepresate, hiperproductoare de betalactamaze de tip AmpC cu rezistență la toate cefalosporinele.

b. achiziția de material genetic exogen

Purtător al informației de rezistență (transferul genelor de rezistență între specii diferite sau intraspecie prin elemente mobile).

Figura 1. Transferul de material genetic și achiziția rezistenței



Transferul se realizează prin: transformare, transducție (mediat de bacteriofag) sau conjugare (prin pili de conjugare) de la un donor la un primitor și asigură bacteriei o capacitate nelimitată de a dezvolta și disemina rezistența. Achiziția de gene „R” este urmată de recombinații fie legitime (între specii înrudite) fie nelegitime (între specii, genuri îndepărtate taxonomic). Astfel are loc transferul genelor „R” de la streptococi viridans la *S.pneumoniae* sau de la enterococi vanco-rezistenți la MRSA. Elementele genetice mobile extracromozomiale implicate sunt: plasmidele, transpozonii, segmentele de inserție, integronii. Aceste elemente sunt responsabile de apariția tulpinilor multirezistente îndeosebi în infecțiile nosocomiale cu bacterii Gram-pozitiv sau Gram-negativ. Bacteriofagii transferă gena de rezistență *mecA* la stafilococi. Plasmidele, transpozonii vehiculează gene de rezistență pentru betalactamaze, gene cu caracter epidemic. Detectarea lor prin tehnici moleculare este importantă în stabilirea caracterului de infecție comunitară sau nosocomială. Aceste gene vehiculate de elemente mobile își au originea în ADN-ul cromozomial al altor specii bacteriene *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Morganella*

morganii, *Enterobacter cloacae*, *Kluyvera* spp. (12,13).

2. MECANISME BIOCHIMICE DE REZISTENȚĂ

În rezistența bacteriană la antibiotice se descriu următoarele mecanisme distincte: inactivarea enzimatică a antibioticelor, impermeabilitatea membranei celulare față de antibiotice, efluxul de antibiotic, modificări ale moleculelor țintă (subunități ribozomale, PBP-uri, modificări ale enzimelor țintă pentru quinolone), modificarea precursorilor peretelui celular sau bypassul unor mecanisme de acțiune ale antibioticelor.

a. Inactivarea enzimatică a antibioticelor este un mecanism de rezistență descris la betalactamine, aminoglicozide, cloramfenicol, macrolide.

- **Betalactamazele** hidrolizează betalactaminele.

Nivelul de rezistență mediat de betalactamaze este determinat de mai mulți factori: rata de hidrolizare a antibioticului, afinitatea enzimelor față de antibiotic, cantitatea de betalactamaze produse, difuzibilitatea antibioticului prin membrana externă, afinitatea antibioticului față de

Tabelul 1 – Principalele betalactamaze plasmidice la bacteriile Gram-negative

Betalactamaza	Rezistența la inhibitori de beta-lactamaza	Bacterii	Antibiotice inactivate	Caracteristici
Betalactamaze cu spectru larg TEM 1,2; SHV 1 (clasa A)	Nu	Enterobacteriacee <i>Ps.aeruginosa</i> <i>H.influenzae</i>	peniciline cefalosp. G1,2	cele mai frecvente betalactamaze
Oxacilinaze OXA 1,2 (clasa A)	Nu	Enterobacteriacee <i>Ps.aeruginosa</i>	oxacilină, piperacilina, ticarcilina	frecvente
Carbencilinaze (clasa A)		Enterobacteriacee <i>Ps.aeruginosa</i>	aminopen. cefalosp.G1	frecvente
CARB 2; BRO 1,2,3	Nu Nu	<i>Acinetobacter</i> spp.	carbencilina	
ESBL TEM 3,29,42,43, 46 (clasa A) SHV 2,12 OXA11,14,16 (clasa D) TEM 30,40,44,45	Nu Nu Nu Da	<i>K.pneumoniae</i> Enterobacteriacee <i>Ps.aeruginosa</i> <i>E.Coli</i>	ureidopen. ceftazidim cefotaxim ceftriaxon cefepim aztreonam	Frecvente în infecții noso-comiale dar și comunitare -tulp. „S” la carbapeneme
Alte oxyimino-betalactamaze (clasa A) CTX-M 1,2,3,4 PER 1,2	Nu Nu	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>E.Coli</i> <i>Ps.aeruginosa</i>	ceftibuten cefuroxim aztreonam	în general tulp. sensibile la ceftazidim
Carbapenemaze IMP 1 (clasa B)	Da	<i>Ps.aeruginosa</i> <i>S. marcescens</i> <i>K.pneumoniae</i>	imipenem meropenem cefalosporine	infecții nosocomiale; tulp.„S” la piperacilina
Cefamicinaze ACT-1 FOX-1,2,3 (clasa C)	Da Da	<i>E.Coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	cefoxitin cefotetan	„R” imipenem la tulp. nosocomiale deficiente în porine

moleculele țintă. Această rezistență enzimatică este constitutivă sau inductibilă, genele fiind localizate plasmidic sau cromozomial. Betalactamazele stafilococilor (penicilinaze) secretate extracelular determină rezistența la penicilină în timp ce meticilina și oxacilina prezintă stabilitate față de aceste enzime. Genele de rezistență, localizate la nivelul transpozoniilor sau plasmidic, sunt transferate prin conjugare. La bacilii Gram-negativ betalactamazele sunt extrem de variate realizând mecanismul major al rezistenței inductibile sau constitutive.

Studiile recente (APUA apr. 2008) precizează existența a cel puțin 700 de betalactamaze.

Enzimele sunt eliberate în spațiul periplasmic, protejând PBP-urile de acțiunea antibioticului. Betalactamazele bacililor Gram-negativ au afinitate diferită față de betalactamine, iar unele sunt inhibitate de clavulanat, sulbactam sau tazobactam.

Rezistența prin betalactamaze se asociază frecvent și cu alte mecanisme de rezistență determinând apariția tulpinilor multirezistente mai ales în infecțiile nosocomiale. Principalele betalactamaze plasmidice sunt redată în tabelul 1.

- **Rezistență enzimatică la aminoglicozide**

Inactivarea enzimatică a aminoglicozidelor (foforilare, acetilare, nucleotidare), are loc în timpul procesului de transport transmembranar, fiind corelată cu rata de transport și cu afinitatea enzimelor față de antibiotic (aproximativ 30 tipuri de enzime de inactivare). Genele de rezistență pentru enzime sunt localizate plasmidic sau cromozomial fiind transferate prin transpozoni. Prevalența anumitor fenotipuri de rezistență se corelează cu presiunea de selecție a antibioticului utilizat. Rezistența enzimatică se întâlnește atât în infecțiile comunitare cât și în infecțiile nosocomiale cauzate de stafilococi, streptococi, enterobacteriacee. De importanță clinică este rezistența enterococilor la aminoglicozide în asociere cu rezistența la betalactamine, rezultând pierderea efectului sinergic al celor două clase de antibiotice.

- **Rezistență enzimatică la macrolide, lincosamide, streptogramine**

Enzimele de inactivare determină hidrolizarea, acetilarea sau adenilarea acestor antibiotice. Rezistența de nivel înalt la eritromicină, se întâlnește la unele tulpini de *E.coli* limitând astfel utilizarea antibioticului în decolonizarea colonului înaintea procedurilor chirurgicale. Rezistența enzimatică la lincosamide sau streptogramine s-a descris la *S.aureus*.

B. REDUCEREA PERMEABILITĂȚII MEMBRANEI CELULARE

1. Reducerea permeabilității membranei externe

Lipopolizaharidele membranei externe, la bacilii Gram-negativ, se opun pasajului antibioticelor hidrofoabe. Pasajul antibioticelor hidrofile este facilitat de existența porinelor. Permeabilitatea membranei externe față de antibiotice este corelată cu numărul porinelor, mărimea lor și proprietățile fizico-chimice ale antibioticelor. Reducerea permeabilității membranei prin mutații genetice care afectează porinele (pierderea porinelor specifice), determină rezistența la betalactamine, aminoglicozide, imipenem, quinolone. Acest mecanism se întâlnește la enterobacteriacee, *Ps.aeruginosa*, *Serratia* spp., *Bacteroides* spp. Emergenta tulpinilor rezistente se realizează în cursul terapiei antibiotice.

2. Reducerea permeabilității membranei citoplasmatică

Pasajul antibioticelor prin membrana citoplasmatică are loc printr-un sistem de transport activ cu consum de energie (forța protonică), bazat pe diferența de potențial electric la nivelul membranei celulare. Rezistența apare frecvent la aminoglicozide prin mutații cromozomiale care afectează permeabilitatea membranei. Acest mecanism s-a descris la stafilococi, *E.Coli*, *Salmonella* spp. Rezistența apare mai ales în cursul monoterapiei cu aminoglicozide. Deoarece pasajul aminoglicozidelor este dependent de metabolismul oxidativ, bacteriile anaerobe și facultativ aerobe prezintă rezistență intrinsecă la aminoglicozide.

C. REZISTENȚA PRIN EFLUX DE ANTIBIOTIC

Efluxul de antibiotic se realizează la nivel membranar prin sisteme de transport energo-dependente și este o cauză importantă a rezistenței sau multi-rezistenței la enterobacteriacee (*E.coli*, *Shigella* spp., etc.), *Ps.aeruginosa*, *S.pneumoniae*, *Streptococcus* grup B, stafilococi. Rezistența este în general indusă de concentrații subinhibitorii de antibiotic și apare la tetraciclină, fluoroquinolone, macrolide, betalactamine. Mecanismul de eflux determină rezistența tulpinilor de *Str.pyogenes*, *Str.pneumoniae*, *S.aureus* (prin gena *mef* și *msr*) la macrolidele clasice, azalide, streptogramine B.

Mecanismele de eflux în asociere cu prezența betalactamazelor, contribuie la rezistența tulpinilor de *Ps.aeruginosa* la toate betalactaminele. Un loc aparte îl ocupă rezistența prin eflux la fluoroquinolone.

Pompele de eflux determină fie rezistența multiplă (ex. norA) fie rezistența specifică față de quinolone (ex. EmrAB, AcrAB). Diseminarea genelor de rezistență la diferiți patogeni este frecventă în comunitate datorită presiunii de selecție a antibioticelor. La ora actuală există studii centrate pe sinteza unor inhibitori ai pompelor de eflux.

D. MODIFICĂRI LA NIVELUL MOLECULELOR „ȚINTĂ“

• Modificări ale subunităților ribozomale

Afectarea subunităților 50S sau 30S determină rezistența la tetraciclină, macrolide, lincosamide, streptogramine, aminoglicozide, antibiotice care intervin în sinteza proteică și creșterea bacteriană. Rezistența la grupul de antibiotice MLSB este cromozomială sau plasmidică, cauzată de o enzimă metilază care modifică molecula „țintă“ a subunității ribozomale. Poate fi inductibilă sau constitutivă și caracterizează tulpinile de stafilococi, streptococi orali, *Str.pneumoniae*, *Bacteroides* spp., *Clostridium perfringens*. Enterococii ca și streptococii prezintă o rezistență naturală de nivel scăzut la aminoglicozide. La aceste specii rezistența de nivel înalt la gentamicină, tobramicină sau amikacină apare secundar unor mutații multiple care afectează subunitatea 30S și 50S, în timp ce rezistența la streptomycină apare printr-o mutație la nivelul subunității 30S. Cu toate acestea sunt mai frecvente tulpinile de enterococi rezistenți la gentamicina de cât la streptomycină.

• Modificarea precursorilor peretelui celular

Rezistența la glicopeptide este cauzată de aceste modificări structurale. La enterococi rezistența este determinată de genele *vanA*, *vanB* și *vanC* care vor genera sinteza unui precursor modificat (ex. terminația D-alanina-D-alanina este înlocuită cu D-alanina-D-lactat).

Apar variate fenotipuri cu rezistență la vancomicina și/sau la teicoplanina. Rezistența se poate transfera de la *E.faecium* la *E.faecalis*, *Str.pyogenes*, *Str.sanguis* sau *Listeria monocytogenes*, patogeni întâlniți în infecții la copii. În USA s-au izolat 4 tulpini de *S.aureus* vanco-rezistente VRSA (MIC >32mg/ml) iar în Japonia

și USA s-au izolat tulpini cu rezistență intermediară la vancomicina VISA (MIC 8-16g/ml). Genele de rezistență înaltă la vancomicina la tulpinile VRSA sunt transferate de la enterococi vanco-rezistenți. Mecanismul de rezistență la VISA nu este determinat de gene pentru rezistența la vancomicina ci de mutații +/- modificări la nivelul genelor reglatorii care vor determina modificări importante în metabolismul peretelui celular și o pondere crescută a reziduurilor D-ala-D-ala din peretele celular (un perete cu reducerea autolizei, cu puține legături încrucișate și cu o reducere a turnover-ului).

Astfel are loc sechestrarea antibioticului în peretele celular la nivelul legăturilor D-ala-D-ala neprocesate, aceste legături D-ala-D-ala reprezentând un fals substrat pentru vancomicina (14). Este bine demonstrat eșecul terapeutic în cazul tratamentului cu vancomicină a infecțiilor cu MSSA, deoarece vancomicina este o moleculă mare, greu difuzibilă la nivelul precursorilor peretelui celular și care se poate lega de un substrat fals (legături neprocesate D-ala-Dala) la periferia peretelui celular constituind, mai ales în cazul stafilococilor cu perete gros și dens. Același lucru are loc și în cazul MRSA. În infecțiile cu MSSA oxacilina are indicație absolută. De importanță clinică sunt tulpinile heterorezistente h-VISA (subpopulații sensibile și subpopulații rezistente), la care utilizarea vancomicinei va determina selectarea subpopulațiilor VISA și deci eșec terapeutic. Metodele clasice sunt insuficiența pentru detectarea h-VISA. Se utilizează macro-Etest sau plăci cu mediu BHI + vancomicina 6 mg/mL (15). Aprecierea sensibilității sau rezistenței în funcție de CMI (Clinical Laboratory Standards Institute) este redată în tabelul 2.

Tabelul 2 – Sensibilitatea la vancomicina a tulpinilor de Staphylococcus aureus

Sensibilitatea/rezistență la vancomicină	Tipul	MIC, μg/mL
sensibil	VSSA	2
heterorezistent	h-VISA sau h-GISA	1-2a
intermediar	VISA sau GISA	4-8
rezistent	VRSA	16b

• Rezistența la betalactamine prin modificarea PBP

Betalactaminele au efect bactericid prin legarea covalentă de enzime specifice la nivelul membranei citoplasmice, enzime care catalizează formarea peretelui celular (PBP).

Mutații la nivel cromozomial determină alterarea afinității unor PBP-uri, pierderea de PBP-uri sau apariția unor noi PBP-uri lipsite complet de afinitate față de betalactamine. Un loc aparte îl ocupă *S.aureus*-meticilino-rezistent (MRSA) la care rezistența este determinată de gena *mecA*, cu producerea unui PBP2a lipsit de afinitate față de toate betalactaminele. Gena *mecA* face parte dintr-un element genetic mobil caseta cromozomială SCCmec care este flancată de genele unei recombinaze utile în facilitarea transferului orizontal. În mod frecvent la MRSA se asociază și alte mecanisme de rezistență, tulpinile fiind multirezistente (rezistente la macrolide, lincosamide, fluoroquinolone, aminoglicozide). Originea casetei SCCmec este la stafilococii coagulazonegativ. Există mai multe clone MRSA unele având caracter epidemic. Distribuția geografică a acestor clone este foarte variată. De importanță clinică și epidemiologică este tipul caseta SCCmec respectiv tipul I, II, III și IV. Tipul SCCmec IV este comunitar și se asociază cu insule de patogenicitate respectiv cu producerea leucocidinei Panton-Valentine. În schimb tipurile SCCmec I-II și III sunt izolate din infecții nosocomiale sau asociate îngrijirilor medicale. Se apreciază o creștere alarmantă a infecțiilor cu MRSA atât comunitar cât și nosocomial. La *Str.pneumoniae* mutații punctiforme, determină variate fenotipuri de rezistență în funcție de modificările PBP-urilor principale (PBP2X, PBP2A, PBP1A, PBP2B, PBP1B) sau ale PBP-urilor cu rol secundar. Aceste tulpini de *Str.pneumoniae* prezintă rezistența la peniciline, asociată cu sensibilitate sau rezistența la cefalosporine.

Tulpinile sunt sensibile la rifampicina, glicopeptide. O incidență crescută a MRSA și *Str.pneumoniae* rezistent la penicilină se întâlnește în infecțiile invazive comunitare sau nosocomiale (infecții respiratorii, infecții cutanate sau ale sistemului nervos central). Sunt interesante studiile care demonstrează asocierea unor factori de virulență cu tulpinile de pneumococi rezistente la penicilină, distribuția lor geografică fiind foarte variată: 0.9% (Finlanda, Germania); 7% (Anglia); 12% (Italia); 20% (Slovenia); 24% (Slovacia); > 40% (Franța); datele sunt publicate de ECDC 2006 (Pneumococcal disease Surveillance in Europe sept.2006).

- **Rezistența la quinolone prin modificarea „țintei“**

Quinolonele acționează la nivelul ADN-girazei și topoizomerazei IV. Rezistența apare prin mutații care afectează una dintre cele 2 subunități ale

enzimelor. Frecvența apariției este corelată cu concentrația de antibiotic, durata terapiei. Mutantele rezistente la fluoroquinolone din generația II își pot menține sensibilitatea față de fluoroquinolonele generației III (ex. moxifloxacin, gatifloxacin). Mutații multiple determină rezistența de nivel înalt.

- **Rezistența la sulfonamide și trimetoprim prin modificarea „țintei“**

Sulfonamidele prezintă afinitate față de dihidropteridin-sintetaza (DPS), iar trimetoprimul față de dihidrofolat-reductaza (DHFR), enzime implicate în sinteza acizilor nucleici. Rezistența este determinată de formarea unor enzime cu afinitate scăzută față de antibiotic. Genele de rezistență sunt descrise atât la bacterii Gram-positiv, cât și Gram-negativ, izolate la copii cu infecții digestive, urinare, respiratorii.

3. INFECȚIA, VIRULENȚA ȘI EVOLUȚIA REZISTENȚEI

Fenotipul de rezistență este influențat de condițiile de habitat ale populației bacteriene, de existență și expresia determinantilor de patogenicitate.

Deși achiziția unor noi determinanți de virulență și/sau rezistență determină o creștere a costului fitness-ului bacterian, costul este compensat parțial prin plasticitatea genomului și numărul mare de populații mutante selectate. Achiziția sau expresia unor caractere are un efect negativ față de expresia altor determinanți. În practica clinică sunt limitate tulpinile multi-rezistente asociate cu o virulență crescută. De exemplu: *E.coli* multi-rezistent determină în general cistite și nu pielonefrite, *S.pneumoniae* rezistent la penicilină este izolat mai frecvent la purtători nazo-faringieni decât în cazul infecțiilor invazive (datele sunt însă controversate). Mortalitatea în infecțiile severe produse de tulpini rezistente sau multi-rezistente este determinată în primul rând de tratamentul inadecvat și de tardivitatea diagnosticului.

Totuși există un echilibru în privința asocierii virulenței cu rezistența la antibiotice la tulpinile patogene. Astfel rezistența la antibiotice este rar întâlnită la *Neisseria meningitidis*, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Shigella dysenteriae*, *Bordetella pertussis*, *Leptospira icterohaemorrhagica*, *Brucella melitensis*. Mutațiile în structura genetică sunt limitate altfel creșterea mutațiilor letale ar determina dispariția microorganismelor.

4. BIOFILMUL, MODALITATE DE REZISTENȚĂ LA ANTIBIOTICE

Biofilmul facilitează expresia fenotipică a tulpinilor rezistente. Biofilmul, recunoscut a fi prezent în 70% dintre procesele infecțioase, reprezintă o arhitectură aparte, o comunitate realizată de microorganisme înglobate într-o matrice proprie secretată de bacterii (matrice polizaharidică sau „slime“) la nivelul suprafețelor biotice sau abiotice. Pentru prima dată biofilmul s-a descris la nivelul plăcii dentare, ulterior pe suprafețele diverselor dispozitive implantate (catetere intravenoase, pentru sunt LCR, catetere intravezicale, proteze valvulare, proteze articulare etc.) dar și în lipsa dispozitivelor implantate, respectiv la nivelul interfeței dintre mediu lichid și solid sau aer unde există turbulențe crescute ale fluxului lichidian (în infecțiile realizate în fibroza chistică, bronșite cronice, în infecțiile urinare recurente fără cateter, otite recurente sau cronice, osteomielite cronice, etc).

Formarea biofilmului are loc în mai multe etape: aderarea ireversibilă a microorganismelor la nivelul suprafeței, colonizarea cu formarea matricei polizaharidice care înglobează bacteriile, creșterea și dezvoltarea biofilmului pe seama masei celulare și a creșterii matricei.

Bacteriile frecvent implicate în producerea biofilmului sunt: stafilococii, streptococii, enterococii, *Ps.aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *E.coli*. Bacteriile sesile din structura biofilmului prezintă o biologie și o anatomie diferită dar și fenotipuri diferite de sensibilitate/rezistență comparativ cu bacteriile planctonice.

Datorită stresului metabolic al microorganismelor (prezența radicalilor de oxigen, a unui potențial redox scăzut, o scădere a substanțelor nutritive, prezența unor molecule quorum-sensing) apar celule bacteriene cu fenotipuri de rezistență: rezistența prin eflux, prin modificări ale moleculelor „țintă“ și persisteri, celule bacteriene deficitare în apoptoză, cu rezistență față de majoritatea antibioticelor. În plus suprafața biofilmului interacționează cu unele antibiotice (betalactami, aminoglicozide) împiedicând penetrarea lor. Pe de altă parte biofilmul prezintă o structură care împiedică difuzibilitatea antibioticelor și a componentelor răspunsului imun în profunzimea biofilmului. Se asociază astfel diferite mecanisme: concentrația de antibiotic este foarte redusă în biofilm, prezența persisterilor rezistenți la antibiotice, bacterii cu fenotipuri variate de rezistență, lipsa componentelor celulare sau

umorale care facilitează bactericidia. Studii recente demonstrează o acțiune diferită a noilor antibiotice la nivelul biofilmului produs de MRSA: cea mai eficientă acțiune este a daptomicinei, apoi a minociclonei și tigeocyclinei (17).

5. REZISTENȚA LA NIVEL POPULAȚIONAL, STRATEGII DE SUPRAVEGHERE

Creșterea prevalenței infecțiilor severe dar și a portajului cu tulpini rezistente sau multi-rezistente impune reducerea utilizării nejustificate a antibioticelor și utilizarea unor protocoale de supraveghere a rezistenței cu scopul de prelungire a duratei de viață a antibioticelor aflate în uz. Supravegherea rezistenței la antibiotice a tulpinilor MRSA izolate din infecțiile invazive în Europa relevă variații importante ale distribuției geografice, în funcție de politica de utilizare a antibioticelor, datele sunt redată în figura 2.

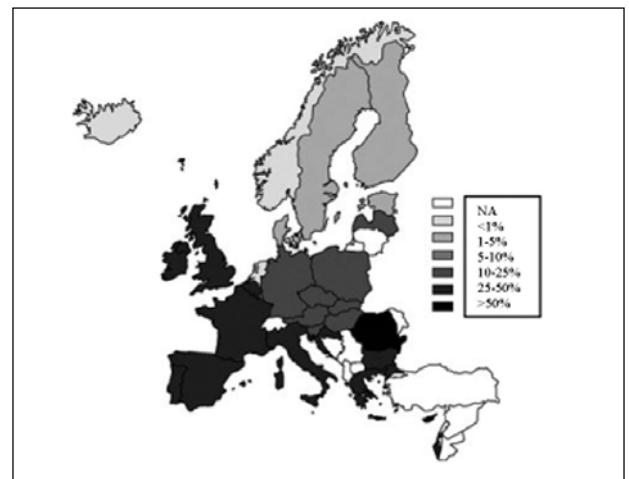


Figura 2 – Proportia tulpinilor MRSA invazive izolate în Europa în 2005, date raportate de EARSS (18)

Factorii de risc pentru infecțiile cu bacterii rezistente sau multi-rezistente sunt (19):

- tratamentul cu antibiotice cu cel puțin 90 zile anterior;
- spitalizări recente în ultimele 3 luni (cu o durată > 2-5 zile);
- frecvența crescută a rezistenței în comunitate sau în spital;
- imunosupresia realizată prin terapie sau boli cu afectarea statusului imun;
- contact cu diverse servicii medicale (inclusiv servicii de îngrijire permanentă a pacientului);
- terapia intravenoasă ambulatorie (cu sau fără antibiotice);
- dializa cronică (în ultima lună).
- membrii din familie purtători de germeni multi-rezistenți

Strategia de reducere și prevenire a rezistenței include următoarele puncte cheie:

a. Prevenirea infecției: prin aplicarea vaccinurilor și utilizarea restrictivă a dispozitivelor intracardiacă, intravasculare, articulare etc. Astfel s-a constatat o creștere a prevalenței bacteriemiiilor cu MRSA asociată utilizării dispozitivelor intracardiacă și intravasculare, asociată cu procedurile invazive: 43% în 2002 în USA, 40% în Europa în deosebi în Anglia, Irlanda, Grecia, Portugalia, România (20). Tulpinile MRSA au origine fie comunitară (casetă SCCmecA-IV) fie sunt caracteristice infecțiilor nosocomiale (casetă SCCmecA I-II-III) în acest caz achiziția lor fiind corelată cu durata spitalizării, cu durata tratamentului antibiotic sau cu terapia neadecvată.

b. Diagnostic bacteriologic rapid și corect, asociat cu un tratament antibiotic corect (atât de prima intenție cât și țintit): prin introducerea testelor rapide de diagnostic microbiologic cu acuratețe maximă (PCR), utilizarea markerilor genetici, inițierea cât mai rapidă a unui tratament antibiotic țintit și prevenirea complicațiilor septice care ar determina o durată mare de spitalizare și un consum crescut de antibiotice. În infecțiile severe cu bacterii rezistente, terapia adecvată se va realiza fie cu antibiotice clasice fie cu noi molecule de antibiotic, în funcție de prevalența rezistenței în areal: pentru cocci Gram-pozitiv ? vancomicina, teicoplanina, lipoglicopeptide de tip dalbavancin sau telavancin, linezolid, ceftobiprol, daptomicina (lipopeptida ciclică), tigeciclina (gliciliclina) iar pentru bacilli Gram-negativi și/sau anaerobi ? carbapeneme, tigeciclina.

c. Utilizarea rațională a antibioticelor în deosebi în spital: presupune existența unui comitet de control în utilizarea antibioticelor a cărui componentă să includă infecționistul (sau infectologul), farmacistul clinician, epidemiologul, microbiologul și reprezentanți manageriali. Acest comitet va elabora o politică clară, rațională, de utilizare a antibioticelor bazată pe: cunoașterea prevalenței tulpinilor rezistente sau multirezistente în arealul respectiv, ciclizarea antibioticelor la anumite intervale de timp, diagnosticul corect de infecție cu germeni rezistenți (eliminând tratamentul incorect al colonizării sau contaminării

cu bacterii rezistente), utilizarea restrictivă a unor antibiotice care se adresează țintit bacteriilor rezistente (ex.glicopeptide) pentru a limita presiunea de selecție exercitată de antibiotic, utilizarea terapiei de deescaladare în infecțiile severe, durata corectă a terapiei adică stoparea terapiei când s-a obținut vindecarea sau dacă infecția este improbabilă.

d. Prevenirea transmiterii tulpinilor rezistente: se realizează prin colaborarea cu epidemiologul și vizează în deosebi tulpinile de enterococi vanco-rezistenți, MRSA sau hVISA, bacili Gram-negativ multi-rezistenți (*Ps.aeruginosa* *Klebsiella* spp., *Acinetobacter* spp.). Prevenirea transmiterii tulpinilor multi-rezistente se referă inclusiv la tulpinile izolate la purtători, acestea fiind un risc de infecție nosocomială mai ales în secțiile de terapie intensivă. Screeningul portajului de tulpini multi-rezistente este un marker predictiv pentru infecțiile nosocomiale (21).

Rezistența este o consecință naturală a adaptării, un factor inerent în evoluția microorganismelor și cu impact asupra populației. Eforturile ar trebui focalizate pe încetinirea procesului.

Cum să rezolvăm problema?

- a. Prin implicarea comunității medicale și a organizațiilor guvernamentale în supravegherea, prevenirea și controlul rezistenței, în stimularea cercetării și dezvoltării producției de noi antibiotice, în aplicarea metodelor de genetică moleculară în monitorizarea rezistenței.
- b. De asemenea se impune colaborarea cu sectorul veterinar și industrial, în scopul reducerii utilizării nejustificate de antibiotice.
- c. Educarea populației și promovarea mijloacelor simple, dar eficiente de igienă individuală. Respectarea cu strictețe a prescripției medicale, cu dozele și durata menționată.
- d. Implicarea altor organizații non-guvernamentale în susținerea strategiei de minimalizare a fenomenului de rezistență.

Antibioticele salvează vieți dar noi trebuie să salvăm antibioticele!!!

BIBLIOGRAFIE

1. **Depardieu F et al** – Modes and Modulations of Antibiotic Resistance Gene Expression, *Clinical Microbiology Reviews*, January 2007, Vol. 20, No. 1, p. 79-114
2. **Curtis T** – Environmental Microbiology (2007) 9(1), 1–11
3. **Cupsa A** – Boli Infecțioase transmisibile; Ed. Med. Universitară Craiova, 2007, pag. 1.2-1.7
4. **Ley RE et al** – The human microbiome: eliminating the biomedical/environmental dichotomy in microbial ecology, *Environmental Microbiology* –Vol.9 Issue 1, Jan.2007, pag. 3-4
5. **Roden DM et al** – Pharmacogenomics: Challenges and Opportunities, *Annals of Internal Medicine*, 21 November 2006, Vol. 145, Issue 10, Pag. 749-757;

6. **Huang N, et al** – Genetics of P450 oxidoreductase: Sequence variation in 842 individuals of four ethnicities and activities of 15 missense mutations; *Proceedings of the National Academy of Sciences*, February 5, 2008; 105(5): 1733–1738
7. **Baltz RH** – Antibiotic discovery from actinomycetes: will a renaissance follow the decline and fall? *SIM News* 55, 186–196, 2005
8. **Hall BG, Barlow M** – Evolution of the serine beta-lactamases: past, present and future. *Drug Resist. Updat.* 7, 111–123, 2004;
9. **Tomasz A** – Microbiology: Weapons of Microbial Drug Resistance Abound in Soil Flora. *Science* 2006, 311, 342–343;
10. **Josephson J** – The microbial resistome *Environmental Science & Technology*, 2006, vol.40, iss.21, p.6531-6534
11. **Livermore DM** – Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology and Impact *CID* 2003;26, suppl.1, S11-S23
12. **Bauernfeind A, Chong Y, Lee K** – Plasmid-encoded AmpC b-lactamases: how far have we gone 10 years after the discovery? *Yonsei Med J* 1998; 39:520–5
13. **Philippon A, Arlet G, Jacoby GA** – Plasmid-determined AmpC-type b-lactamases, *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1–11
14. **Jenkins SG** – Trends Associated with Glycopeptides: Heteroresistance, Tolerance, and Lack of Detection, *Clinical Updates in Infectious Diseases*, 2006, vol. III, issue 2, pag 1-6
15. **Sakoulas G, Moellering RC, Jr** – Increasing Antibiotic Resistance among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains; *Clinical Infectious Diseases* 2008;46:S360–S367
16. **Martinez JL, Baquero F** – Interactions among Strategies Associated with Bacterial Infection: Pathogenicity, Epidemicity, and Antibiotic Resistance; *Clinical Microbiology Reviews*, October 2002, p. 647-679, Vol. 15, No. 4
17. **Issam Raad, Hend Hanna et al** – Comparative Activities of Daptomycin, Linezolid, and Tigecycline against Catheter-Related Methicillin-Resistant *Staphylococcus* Bacteremic Isolates Embedded in Biofilm Antimicrobial Agents and Chemotherapy, May 2007, p. 1656-1660, Vol. 51, No. 5
18. EARSS. The European Antimicrobial Resistance Surveillance System. 2005. <http://www.rivm.nl/earss>
19. **Chastre J** – Evolving problems with resistant pathogens *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 (Suppl. 3): 3–14
20. **Naber CK** – Future strategies for treating *Staphylococcus aureus* bloodstream infections *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 (Suppl. 2): 26–34
21. **Galoisy-Guibal L et al** – Screening for Multidrug-Resistant Bacteria as a Predictive Test for Subsequent Onset of Nosocomial Infection *Infection control and hospital epidemiology* november 2006, vol. 27, no. 11