

MEDICINE AND PHARMACY

DOI 10.51582/interconf.7-8.11.2021.026

Balan Greta

MD, PhD, Associate Professor

Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy,
Republic of Moldova

Behta Emilia

University Assistant

Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy,
Republic of Moldova

Brînza Olga

Scientific Researcher

National Agency of Public Health, Republic of Moldova

Țapu Livia

Scientific Researcher

National Agency of Public Health, Republic of Moldova

Burduniuc Olga

MD, PhD, Associate Professor

National Agency of Public Health, Republic of Moldova

MECHANISMS OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE SPECIFIC FOR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND *ACINETOBACTER BAUMANNII*

***Abstract.** The exposure of bacteria to antibiotics has led to the development of resistance against every single agent utilized. Through a understanding the mechanisms of resistance, the clinician can better comprehend and predict resistance patterns even to antibiotics not reported on the antibiogram, and subsequently select the most appropriate antibiotic for the pathogen in question.*

***Keywords:** *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, mechanisms of antimicrobial resistance.*

P. aeruginosa reprezintă unul dintre cei mai importanți patogeni gram-negativi cu rezistență multiplă (MDR) și al doilea după *E. coli*, în ceea ce privește numărul de infecții și decese. Se estimează că tulpinile MDR de *P. aeruginosa* sunt responsabile de peste 72.000 de infecții și peste 4800 de decese anuale în țările Uniunii Europene. Dintre acestea, se estimează că 61.892 de cazuri și 4155 de decese sunt atribuite tulpinilor rezistente la carbapeneme, în timp ce 1262 de cazuri și 84 de decese sunt atribuite tulpinilor rezistente la colistină.

În timp ce unele bacterii posedă diferite mecanisme de rezistență intrinsecă pentru mai multe antimicrobiene, ceea ce le particularizează pe bacteriile *P. aeruginosa* este faptul că fiecare dintre mecanismele sale de rezistență intrinsecă conferă rezistență la mai multe antimicrobiene simultan. Membrana celulară a bacteriilor *P. aeruginosa* este impermeabilă pentru multe antimicrobiene, este de 12 -100 de ori mai puțin permeabilă decât membrana *E. coli*. Antimicrobienele care ajung în celula bacteriilor *P. aeruginosa* sunt expuse pompelor de eflux și enzimelor de inactivare a acestora. În plus, prin achiziționarea de mutații, *P. aeruginosa* poate dezvolta deficiențe în porine, care îi reduc și mai mult permeabilitatea, poate face modificări a țintelor de atac sau poate supraexprima pompele de eflux și enzimele de inactivare a antimicrobienele. Totodată, *P. aeruginosa* posedă și mecanisme adaptive de rezistență la antimicrobiene, cum ar fi generarea de biofilm și celule persistente. Biofilmele constau din comunități bacteriene care există într-o matrice formată din polizaharide, ADN extracelular, carbohidrați, proteine și alte componente bacteriene. Bacteriile dintr-un biofilm sunt protejate de sistemul imunitar al gazdei, precum și de factorii de stres din mediu. Celulele persistente sunt celule latente care opresc sinteza proteinelor țintă și, ca urmare, pot rezista la concentrații mari de antimicrobiene, în pofida faptului că nu sunt rezistente genetic la acestea.

Bacteriile *P. aeruginosa* posedă atât mecanisme intrinseci, cât și dobândite de rezistență la β -lactame. Mecanismele intrinseci includ pompe de eflux, precum și multiple β -lactamaze, în special β -lactamaze AmpC codificate cromozomial și β -lactamaze cu spectru extins (BLSE). Mecanismele de rezistență la β -lactame, dobândite de *P. aeruginosa* includ mutații la nivelul porinelor, cum ar fi deficiența

porinei OprD care duce la dezvoltarea rezistenței la imipenem și alte carbapeneme; supraexprimarea enzimelor hidrolizante cum ar fi AmpC; supraexprimarea pompelor de eflux, cum ar fi MexCD – OprJ, care reduce sensibilitatea la carbapeneme; modificarea proteinelor de legare a penicilinelor (PBP), care reduce sensibilitatea la mai multe β -lactamine; și în sfârșit, achiziția altor β -lactamaze, cum ar fi carbapenemazele din clasa B. Ultimul mecanism este asociat cu morbiditate și mortalitate înaltă, deoarece peste 85% din infecțiile și decesele asociate cu bacteriile *P. aeruginosa* MDR sunt atribuite tulpinilor rezistente la carbapenem.

AmpC sunt cefalosporinaze, care pot hidroliza majoritatea penicilinelor, cefalosporinelor din primele generații și combinații de β -lactame și inhibitori de β -lactamaze. De asemenea, aceste enzime hidrolizează aztreonamul, însă într-o măsură mai mică decât penicilina. Important este de menționat că, AmpC este o enzimă inductibilă. Prin urmare, rezistența poate să se dezvolte rapid chiar și la izolatele de *P. aeruginosa* care păreau a fi sensibile la începutul tratamentului. Cefalosporinele antipseudomonas, cum ar fi ceftazidima sau cefepima, deși sunt încă sensibile la AmpC, sunt inductori slabi ai expresiei sale. Cu toate acestea, administrarea îndelungată de β -lactame antipseudomonas poate duce la selecția izolatelor de *P. aeruginosa* care produc în exces AmpC și, ulterior, pot duce la eșecul tratamentului.

Betalactamazele cu spectrul extins sunt o categorie largă de enzime, care include diferite tipuri de β -lactamaze de clasă A, cum ar fi Temoniera (TEM), cefotaxim β -lactamaze (CTX-M) și β -lactamaze sulfhidril variabile (SHV). Ele hidrolizează penicilinele, cefalosporinele cu spectru îngust și larg, precum și aztreonamul. Cu toate acestea, ele nu pot hidroliza cefamicinele, cum ar fi cefoxitina, sau combinațiile de β -lactame și inhibitori de β -lactamaze, care pot fi utilizate pentru a diferenția tulpinile pozitive BLSE de tulpinile pozitive AmpC. În plus, spre deosebire de AmpC, BLSE sunt exprimate constitutiv. Prin urmare, atunci când antibiograma efectuată la antimicrobienele menționate anterior sugerează prezența unei tulpini pozitive BLSE, este puțin probabil ca administrarea de antimicrobiene precum cefoxitina sau combinații de β -lactame și inhibitori de β -lactamaze să ducă la dezvoltarea rezistenței în timpul tratamentului și la eșec

terapeutic. Bacteriile *P. aeruginosa* produc diverse BLSE de clasă A, dar și BLSE de clasă D, cum ar fi β -lactamazele de tip oxacilinază (OXA), care pot hidroliza cefotaxima, ceftazidima și aztreonamul, care, de regulă, nu sunt inhibate de acidul clavulanic.

Pe plan internațional, de la 10% până la 50% dintre tulpinile de *P. aeruginosa* prezintă rezistență la carbapeneme. Rezistența la carbapeneme este mediată prin mecanisme multiple, cele mai frecvente fiind deficiențele porinelor sau supraexprimarea pompei de eflux, în timp ce prezența carbapenemazelor este întâlnită mai rar. În timp ce bacteriile *P. aeruginosa* produc serin carbapenemaze, cum ar fi carbapenemazele de tip OXA, majoritatea carbapenemazelor sunt metalo- β -lactamaze (Clasa B, după Ambler). Acestea includ imipenemaze (IMP), metalo- β -lactamaza codificată cu integronul Verona (VIM), metalo- β -lactamaza din São Paulo (SPM), imipenemaza germană (GIM) și metalo- β -lactamaza din New Delhi (NDM). *P. aeruginosa* este considerată principalul rezervor al acestor metalocarbapenemaze. Metalo- β -lactamazele hidrolizează toate categoriile de β -lactame, cu excepția aztreonamului. În timp ce această particularitate ajută la diferențierea lor de alte carbapenemaze la efectuarea antibiogramei, aceasta nu este neapărat asociat cu eficacitatea terapeutică a aztreonamului în infecțiile cu acești germeni patogeni.

Rezistența bacteriilor *P. aeruginosa* la aminoglicozide este asociată, în mare măsură, cu impermeabilitatea lor intrinsecă, ceea ce face ca aceste antimicrobiene să fie incapabile să penetreze peretele celular și să atingă concentrații intracelulare suficiente. În plus, alte mecanisme intrinseci de rezistență includ pompe de eflux, precum și enzime care modifică aminoglicozidele, cum ar fi aminoglicozide fosfotransferaze, acetiltransferaze și nucleotidiltransferaze. Fiecare dintre aceste enzime conferă rezistență la diverse combinații de aminoglicozide cu nucleotidiltransferaze aminoglicozidice, permițând bacteriilor *P. aeruginosa* să dezactiveze aminoglicozidele utilizate în mod obișnuit împotriva acestora, cum ar fi tobramicina, amikacina și gentamicina. Pentru a depăși aceste mecanisme a fost conceput un aminoglicozid nou, plazomicina, care este rezistent la câteva dintre aceste enzime. Mecanismele dobândite de rezistență la aminoglicozide includ

supraexprimarea pompei de eflux MexXY și modificările țintei ribozomale, fie prin mutația subunității ribozomale 30S, fie prin metilarea situsului de legare pentru aminoglicozide. Este important de remarcat că, mutațiile ribozomale pot conferi o rezistență înaltă la aminoglicozide.

O altă clasă de antimicrobiene, utilizată frecvent în tratamentul infecțiilor cu *P. aeruginosa*, sunt fluorochinolonele. Rezistența la fluorochinolone depinde de acțiunea pompelor de eflux, care fie este intrinsecă, cum ar fi pompele de eflux din familia de rezistență-nodulare-diviziune celulară (RND), fie dobândită prin mutații ale genelor care reglează producerea pompelor de eflux, ducând la supraexprimarea pompelor de eflux precum MexAB-OprM. Un alt mecanism important este mutația enzimelor țintă, care codifică topoizomeraza IV și ADN giraza. Astfel de mutații pot conferi un nivel ridicat de rezistență la flurochinolone, mai ales în cazul în care genele pentru ambele enzime au suferit mutații sau există mai multe mutații punctiforme într-o singură genă.

Bacteriile *P. aeruginosa* sun, de asemenea, rezistente și la alte antimicrobiene, cum ar fi tetracilinele, macrolidele, TMP/SMX și rifampicina. Producerea de pompe de eflux conferă rezistență la tetraciline și într-o măsură mai mică la tigeciclină, deoarece aceasta din urmă este un substrat inferior pentru pompele de eflux ale *P. aeruginosa*. Macrolidele, precum și rezistența TMP/SMX sunt, de asemenea, mediate prin producerea de pompe de eflux. Rezistența la rifampicină apare prin mutații ale genei ARN polimerazei. Colistinul, un antimicrobian de rezervă pentru bacilii gram-negativi cu rezistență multiplă, acționează prin solubilizarea membranei celulare prin interacțiunea cu lipidul A. Rezistența la colistin se bazează pe modificarea sarcinii negative a membranei celulare, care este necesară pentru interacțiunea cu molecula de colistin încărcată pozitiv. Aceasta este mediată prin sinteza N4-aminoarabinozei, o moleculă care se leagă de lipidul A și îi neutralizează sarcina negativă.

Mecanisme de rezistență la antimicrobiene a bacteriilor *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii este un microorganism implicat în infecțiile asociate asistenței medicale, caracterizat prin capacitatea sa de a se adapta repede la presiunile

selective, ducând la dezvoltarea rapidă a rezistenței la antimicrobiene. În ultimul timp, tot mai mult sunt întâlnite tulpini de *A. baumannii* cu rezistență multiplă la antimicrobiene, iar cca 30% din izolate, la nivel global, sunt rezistente la carbapeneme. Un alt atribut important al bacteriilor *A. baumannii* este capacitatea lor de a supraviețui pe suprafețele din spitale, cum ar fi paturile din terapie intensivă și butoanele echipamentului medical, care servesc rezervor important pentru focarele spitalicești de *A. baumannii*.

Bacteriile *A. baumannii* produc diverse β -lactamaze. În primul rând, toate tulpinile de *A. baumannii* produc o cefalosporinază AmpC codificată cromozomial, care este comună tuturor tulpinilor. Deși este neinductibilă, producerea sa poate fi majorată prin achiziționarea unei secvențe de inserție, care conține un promotor și poate duce la supraexprimarea AmpC, conferind rezistență la cefalosporine cu spectru extins. *A. baumannii* produce, de asemenea, diverse alte β -lactamaze, cum ar fi β -lactamaze de tip TEM-1, CTX-M și SHV. Totodată, mai multe tulpini produc BLSE, cum ar fi TEM, cu o prevalență raportată de 59% la izolatele de *A. baumannii*.

Sulbactamul, un inhibitor al mai multor β -lactamaze de clasă A, este un adjuvant important în infecțiile cu *A. baumannii*. Pe lângă activitatea sa împotriva β -lactamazelor, sulbactamul inhibă și PBP1 și PBP3 ale *A. baumannii* (dar nu PBP2). În timp ce sulbactamul este disponibil numai în combinație cu ampicilina, studiile *in vitro* au demonstrat că activitatea antibacteriană a combinației ampicilină-sulbactam, împotriva *A. baumannii*, se datorează componentei sulbactam. În infecțiile cu *A. baumannii*, sulbactamul se administrează în combinație cu carbapenemele sau colistina, deoarece, sunt necesare doze mari de ampicilină-sulbactam pentru a obține doze adecvate de sulbactam. Un studiu de meta-analiză a relatat că, tratamentele care conțin sulbactam în doză mare, în combinație cu alte antimicrobiene au demonstrat cele mai bune șanse de tratament în infecțiile cu *A. baumannii* MDR. Cu toate acestea, rezistența la sulbactam poate apărea la tulpinile de *A. baumannii*, deoarece sulbactamul este mai puțin activ împotriva tulpinilor producătoare de TEM-1 sau metalo- β -lactamaze, cum ar fi VIM sau NDM.

Cele mai importante β -lactamaze produse de *A. baumannii* sunt

carbapenemazele de clasă D asemănătoare OXA-51. Enzimele asemănătoare OXA-51, care sunt penicilinaze cu activitate carbapenemazică slabă, sunt omniprezente la *A. baumannii* și, prin urmare, servesc ca un marker de identificare genetică pentru această specie. *A. baumannii* produce, de asemenea, alte carbapenemaze de tip OXA, cum ar fi OXA-23, OXA-40 și OXA-58, găsite fie în cromozomul bacterian, fie în plasmide. În plus, *A. baumannii* poate dobândi și carbapenemaze din clasa B, cum ar fi VIM și IMP, care conferă niveluri ridicate de rezistență la carbapeneme. Totodată, modificările proteinelor și porinelor care leagă penicilinele pot contribui, de asemenea, la dezvoltarea rezistenței la carbapeneme.

Rezistența la tetraciline a bacteriilor *Acinetobacter* spp. apare fie prin producerea de proteine de protecție ribozomale, fie prin producerea de pompe de eflux, cum ar fi TetA și TetB. Rezistența la tigeciclină a fost, de asemenea, observată și este asociată cu producerea pompei de eflux AdeABC sau cu mutații în gene precum gena *plsC*, care codifică o proteină integrală din membrană, necesară pentru permeabilitatea membranei, ceea ce duce la scăderea pătrunderii tigeciclinei în celulă sau gena *trm*, care codifică o metiltransferază, a cărei producție redusă are ca rezultat o sensibilitate redusă la tigeciclină printr-un mecanism necunoscut. Cu toate acestea, trebuie remarcat faptul că pompele de eflux AdeABC nu afectează sensibilitatea *A. baumannii* la minociclină și, prin urmare, chiar și tulpinile rezistente la tigeciclină pot rămâne sensibile la minociclină. Prin urmare, în cazul infecțiilor cu *A. baumannii* rezistente la tigeciclină, sensibilitatea la minociclină trebuie testată permanent.

Rifampicina este, de asemenea, utilizată în tratamentul infecțiilor cu *A. baumannii*, de obicei în combinație cu alți agenți antimicrobieni, cum ar fi colistina. Rifampicina a demonstrat sinergism cu colistina împotriva *A. baumannii*, care se bazează pe pătrunderea crescută a rifampicinei în celula bacteriană, în urma efectului colistinei asupra membranei exterioare. Rifampicina este, de asemenea, sinergică cu sulbactamul. Rezistența la rifampicină este mediată prin mutații ale genei *rpoB*, prin pompe de eflux sau prin modificarea enzimatică a rifampicinei de către o ADP riboziltransferază.

Rezistența la aminoglicozide a *A. baumannii* apare prin producerea tuturor tipurilor de enzime modificatoare de aminoglicozide, inclusiv aminoglicozide

acetiltransferaze, nucleotidiltransferaze și fosfattransferaze. Rezistența la fluorochinolone este mediată prin mutații ale genelor ADN girazei și topoizomerazei IV, reducând afinitatea acestora pentru fluorochinolone și prin producerea de proteine de protecție de tip *qnr*, care inhibă legarea fluorochinolonei de topoizomeraza IV și ADN giraza. În plus, *A. baumannii* poate produce pompe de eflux și poate scădea expresia porinelor, reducând concentrațiile intracelulare de fluorochinolone. Producția pompei de eflux, cum ar fi pompa de eflux AdeABC, conferă rezistență la mai multe antimicrobiene simultan, inclusiv cefalosporine, carbapeneme, aminoglicozide și fluorochinolone.

Mai multe mecanisme de rezistență la colistină au fost descrise la *A. baumannii*, inclusiv producerea de pompe de eflux, dezvoltarea mutațiilor în genele enzimelor inițiale ale biosintezei lipopolizaharidelor (LPS) care au ca rezultat pierderea completă a producției de LPS și modificări structurii lipidului A. Au fost observate niveluri foarte ridicate de rezistență la colistină la *A. baumannii*, probabil mediate prin producerea de pompe de eflux. Tulpinile de *A. baumannii* rezistente la colistină sunt dotate, de asemenea, cu câteva alte gene de rezistență, făcând tratamentul lor extrem de dificil.

La elaborarea articolului au fost utilizate date obținute în cadrul proiectului 20.80009.8007.09 „Studierea rezistenței bacililor gramnegativi la antimicrobiene în vederea fortificării sistemului național de supraveghere și control al bolilor transmisibile”.

References:

1. Cassini, A.; Diaz Högberg, L.; Plachouras, D. et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A population-level modelling analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2019.
2. Behzadi, P.; Baráth, Z.; Gajdács, M. It's Not Easy Being Green: A Narrative Review on the Microbiology, Virulence and Therapeutic Prospects of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics* 2021, 10, 42.
3. Pang, Z.; Raudonis, R.; Glick, B.R.; Lin, T.J.; Cheng, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* 2019, 37, 177–192.

4. Burduniuc, O.; Cojocaru, R.; Bălan, G. ș. a. Determinarea unor markeri ai rezistenței enterobacteriilor la preparatele antimicrobiene. Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții. 2012, 3(318): 151-158. ISSN 1857-064X.
5. Halat, D.H.; Moubareck, C.A. The current burden of carbapenemases: Review of significant properties and dissemination among gram-negative bacteria. *Antibiotics* 2020, 9, 186.
6. Huovinen, P. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clin. Infect. Dis.* 2001, 32, 1608–1614.
7. De Oliveira, D.M.P.; Forde, B.M.; Kidd, T.J.; Harris, P.N. et al. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 2020, 33.
8. Rocha, I.V.; Xavier, D.E.; de Almeida, K.R.H.; de Oliveira, S.R.; Leal, N.C. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clones persist on hospital inanimate surfaces. *Brazilian J. Infect. Dis.* 2018, 22, 438–441.
9. Abdar, M.H.; Taheri-Kalani, M.; Taheri, K.; Emadi, B.; Hasanzadeh, A.; Sedighi, A.; Pirouzi, S.; Sedighi, M. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase genes in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from nosocomial infections in Tehran, Iran. *GMS Hyg. Infect. Control* 2019, 14, Doc02.
10. Liu, J.; Shu, Y.; Zhu, F.; Feng, B.; Zhang, Z.; Liu, L.; Wang, G. Comparative efficacy and safety of combination therapy with high-dose sulbactam or colistin with additional antibacterial agents for multiple drug-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: A systematic review and network meta-analysis. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2021, 24, 136–147.
11. Jamal, S.; Al Atrouni, A.; Rafei, R.; Dabboussi, F.; Hamze, M.; Osman, M. Molecular mechanisms of antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*, with a special focus on its epidemiology in Lebanon. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2018, 15, 154–163.
12. Lashinsky, J.N.; Henig, O.; Pogue, J.M.; Kaye, K.S. Minocycline for the Treatment of Multidrug and Extensively Drug-Resistant *A.baumannii*: A Review. *Infect. Dis. Ther.* 2017, 6, 199–211.
13. Vázquez-López, R.; Solano-Gálvez, S.G.; Juárez Vignon-Whaley, J.J. et al. *Acinetobacter baumannii* Resistance: A Real Challenge for Clinicians. *Antibiotics* 2020, 9, 205.
14. Mohammadi, M.; Khayat, H.; Sayehmiri, K.; Soroush, S.; et al. Synergistic Effect of Colistin and Rifampin Against Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Open Microbiol. J.* 2017, 11, 63–71.
15. Pachón-Ibáñez, M.E.; Docobo-Pérez, F.; Jiménez-Mejias, M.E. et al. Efficacy of rifampin, in monotherapy and in combinations, in an experimental murine pneumonia model caused by panresistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011, 30, 895–901.