

Rezistencija na antibiotike u *Pseudomonas aeruginosa*

Sanda SARDELIC⁽¹⁾, mr. sc., dr. med.,
specijalist mikrobiolog
Branka BEDENIC⁽²⁾, prof. dr. sc., dr. med.,
specijalist mikrobiolog

- ¹⁾Odjel za mikrobiologiju i parazitologiju,
KBC Split, Spinčićeva 1, Split
²⁾Klinički zavod za kliničku i molekularnu
mikrobiologiju, KBC Zagreb,
Kišpatićeva 12, Zagreb

Ključne riječi

Pseudomonas aeruginosa
rezistencija
 β -laktamaze
efluks

Key words

Pseudomonas aeruginosa
resistance
 β -lactamases
efflux

Primljeno: 2009-09-27

Received: 2009-09-27

Prihvaćeno: 2009-11-23

Accepted: 2009-11-23

Uvod

Pseudomonas aeruginosa je saprofitna gram-negativna nefermentativna bakterija koja je raširena u prirodi, posebice u vlažnim sredinama. U svakom okruženju pa tako i bolničkom lako preživljava; više od mjesec dana živi na suhom podu, u vodi više od 300 dana, na suhom filter papiru 150 dana [1]. Mogućnost dugotrajnog preživljavanja

Pregledni rad

Rezistencija *Pseudomonas aeruginosa* na antibiotike rezultat je smanjenja propusnosti stanične stijenke, pojačanog efluksa antibiotika iz bakterijske stanice, aktivnosti inaktivirajućih enzima te rjeđe promjene ciljnog mjesta. Urođena otpornost pseudomonasa na niz β -laktamskih antibiotika posljedica je aktivnosti kromosomske inducibilne ampC β -laktamaze (klasa C po Ambleru) čija derepresija dovodi do otpornosti na ureidopeniciline, cefalosporine 3. (i 4.) generacije, a u kombinaciji s gubitkom porina OprD i na karbapeneme. Stečene β -laktamaze u pseudomonasa mogu biti serinske, iz klase A i D te metalo- β -laktamaze (MBL) iz klase B koje posreduju rezistenciju na sve β -laktame uključujući karbapeneme. Rezistencija na aminoglikozide najčešće je posljedica aktivnosti modificirajućih enzima i efluksa. Rezistencija na fluorirane kinolone posljedica je uglavnom promjene ciljnog mjesta tj. mutacije DNA giraze ili topoizomerase i pojačanog rada efluksnih proteina.

Postotak rezistentnih izolata pseudomonasa nije se značajno promijenio u posljednjih 10 godina u Hrvatskoj. Među aminoglikozidima je 2008. godine bilo najmanje otpornih sojeva na amikacin, a najviše na gentamicin. Rezistencija na ciprofloksacin bila je 24 %, na ceftazidim 8 %, dok je karbapenem-rezistentnih izolata bilo oko 10 %.

Resistance to antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*

Review article

Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics is a result of cell wall impermeability, enhanced efflux of antibiotics from bacterial cells, inactivating enzymes and alterations in target molecules. Natural resistance of *P. aeruginosa* to a number of β -lactam antibiotics is a consequence of inducible ampC β -lactamase (Ambler class C) whose derepression leads to resistance to ureidopenicillines, 3rd (and 4th) generation cephalosporins, and in combination with the loss of porin OprD, to carbapenems. Acquired β -lactamases in pseudomonas can be of serine type from class A and D, and zinc metallo-hydrolases, so called metallo- β -lactamases (MBLs) from class B. MBLs confer resistance to all β -lactams, including carbapenems. Resistance to aminoglycosides is usually a result of activities of modifying enzymes and efflux. Fluoroquinolone resistance in *P. aeruginosa* is mediated through alterations in DNA gyrase or topoisomerase, as well as through active efflux.

Percentage of resistant pseudomonas isolates in Croatia was not significantly changed in the last 10 years. Among aminoglycosides the resistance rate in 2008 was lowest to amikacin and highest to gentamicin. Resistance to ciprofloxacin was 24 %, to ceftazidime 8 %, and to carbapenems around 10 %.

u oskudnim uvjetima života te otpornost na brojne antibiotike i antiseptike, čini ga važnim nozokomijalnim patogenom, koji uzrokuje brojne bolničke infekcije, poglavito pneumonije povezane s mehaničkom ventilacijom, infekcije urinarnog trakta i bakterijemije [2]. Ova neuobičajena sposobnost prilagodbe na uvjete okoline dijelom je rezultat veličanstvenih genetskih mogućnosti. Tim koji je sekvencirao genom *P. aeruginosa* PAO1 bio je

zapanjen njegovom veličinom; genom sadržava 6,3 milijuna parova baza i kodira preko 5500 gena [3]. Ovaj genom za trećinu je veći od onog primjerice *Escherichia coli*, dvostruko veći od onog *Staphylococcus aureus*, kodira otprilike jednak broj gena kao i eukariot kvasac *Saccharomyces cerevisiae* i iako se radi o jednostavnom jednostaničnom prokariotu, ima 40 % genoma vinske mušice *Drosophila melanogaster* [3]. Karakteristike genoma *P. aeruginosa* su osim veličine i veliki broj regulatornih gena te gena koji kodiraju sisteme efluksa. *Pseudomonas aeruginosa* prilagođava se različitim uvjetima okoliša, bilo onog bez nutrijenata ili onog s antibiotikom, antiseptikom ili dezinficijensom pa autor članka naglašava da je *Pseudomonas aeruginosa* "tako adaptabilan da što god bacite na njega – on ima odgovor". Dalje u tekstu raspravljati ćemo o načinama pseudomonasne reakcije u dodiru s antibioticima.

Bakterija općenito može postati rezistentna na djelovanje antibiotika putem tri osnovna načina: [1] nedovoljna akumulacija antibiotika otežanim ili onemogućenim unosom antibiotika u bakterijsku stanicu odnosno aktivnim izbacivanjem antibiotika iz stanice, [2] inaktivacija antibiotika te [3] promjene ciljnog mjesta.

Rezistencija na antibiotike u *P. aeruginosa* posredovana promjenama na membrani stanice

U liječenju pseudomonasnih infekcija koriste se četiri osnovne skupine antibiotika: β -laktami, aminoglikozidi, fluorokinoloni i polipeptidi.

P. aeruginosa je prirodno otporan na penicilin G, amnopeniciline (uključujući i kombinacije s inhibitorima β -laktamaze), cefalosporine prve i druge generacije, makrolide, tetracikline, kotrimoksazol i kloramfenikol. Osjetljivi fenotip *P. aeruginosa* (ili tzv. divlji fenotip; fenotip bez rezistencije) uključuje osjetljivost na karboksipeniciline (karbenicilin, tikarcilin), ureidopeniciline (azlocilin, piperacilin), antipseudomonasne cefalosporine treće generacije i to ceftazidim i cefoperazon, četvrte generacije (cefepim i cefpirom), monobaktam aztreonam, karbapeneme imipenem, meropenem i doripenem, fluorirane kinolone i aminoglikozide (gentamicin, tobramicin, netilmicin, amikacin) te polimiksine.

Svi ovi antibiotici moraju ući u bakterijsku stanicu da bi došli do ciljnog mjesta djelovanja: β -laktami do transpeptidaze peptidoglikana, aminoglikozidi do 30S podjedinice ribosoma, fluorokinoloni do podjedinice A giraze, a polipeptidi do fosfolipida citoplazmatske membrane. Male hidrofilne molekule poput β -laktama i fluoriranih kinolona prolaze vanjsku membranu kroz vodene kanale koje okružuju porinski proteini. Većina porina oblikuju trimere koji se protežu preko cijele širine vanjske membrane. Iako je porin oprF najčešće prisutan, mutante bez

ovog porina ne pokazuju rezistenciju na antibiotike [4], dok međutim oprD, porin povezan s preuzimanjem pozitivno nabijenih aminokiselina, predstavlja i mjesto prolaza imipenema pa mutante bez oprD proteina pokazuju rezistenciju na imipenem s povećanjem MIK-a za imipenem na 8–32 $\mu\text{g/mL}$ [5, 6]. Ovaj kanal ne koristi meropenem pri prolasku vanjske membrane.

Aminoglikozidi i polimiksini vežu se za lipopolisaharid vanjske membrane narušavajući njezinu propustljivost i dolazeći do citoplazmatske membrane gdje aminoglikozidi dalje bivaju aktivnim prijenosom uneseni u citoplazmu dok polimiksini djeluju na citoplazmatskoj membrani mijenjajući njezinu strukturu.

Veliki broj gena uključen je u sisteme aktivnog efluksa, odnosno izbacivanja antibiotika te niza drugih kemijskih tvari (biocidi, boje, detergentski, organska otapala) iz bakterijske stanice. Ovaj mehanizam rezistencije uvelike objašnjava prirodnu otpornost pseudomonasa na niz antibiotika. Za sada se čini da genom kodira 10–12 efluksnih sustava od koji su najpoznatiji MexAB-oprM, MexXY-oprM, MexCD-oprJ, MexEF-oprN i MexJK-oprM [5, 7].

Radi se o transmembranskim sustavima s tri proteina od kojih je jedan lociran u citoplazmi i djeluje na principu o energiji ovisne crpke (Mex), drugi koji se nalazi na vanjskoj membrani – odnosno porin (Opr) i protein koji povezuje opisana dva. Iako su geni koji kodiraju ove proteine prisutni u genomu pseudomonasa, mutacijom regulatornih gena može doći do pojačane ekspresije i pojačanog rada crpki s aktivnim izbacivanjem niza antibiotika, ovisno o supstratima pojedine crpke [8]. Najpoznatija crpka – MexAB sustav izbacuje aktivno β -laktame (karbenicilin, piperacilin, ceftazidim, cefepim, aztreonam, meropenem; dakle samo je imipenem pošteđen), β -laktamaza inhibitori, fluorokinolone, kloramfenikol, makrolide, trimetoprim, tetracikline. Imipenem nije zahvaćen ovim efluksnim sustavom vjerojatno zbog hidrofobnog postraničnog lanca kojeg ima meropenem, a koji nedostaje imipenemu. Mutacije koje dovode do pojačanog rada crpke mogu nastati tijekom terapije fluorokinolonima i cefalosporinima [9]. MexCD eksportira β -laktame (posebice cefepim i cefpirom), fluorokinolone, kloramfenikol, tetracikline, makrolide; MexEF fluorokinolone, kloramfenikol, trimetoprim – ova crpka pri mutaciji (tzv. *nfxC* mexT lokusa) posreduje rezistenciju i na imipenem budući da je povezana sa smanjenom ekspresijom oprD proteina. MexXY crpka izbacuje aktivno fluorokinolone, aminoglikozide, tetracikline i makrolide te usko povezana s oprM pridonosi također intrinzičnoj rezistenciji pseudomonasa.

Promjene ciljne molekule, odnosno PBP-a nije mehanizam rezistencije tipičan za pseudomonasa i β -laktame; postoje međutim izvješća o promjenama PBP-5 koje se povezuju s intrinzičkom rezistencijom na β -laktame, kao i stečene rezistencije na imipenem povezane s ekspresijom PBP-4 sa smanjenim afinitetom na imipenem [10,11].

Rezistencija na antibiotike u *P. aeruginosa* posredovana inaktivacijom antibiotika i drugim mehanizmima

Rezistencija na β -laktame

P. aeruginosa posjeduje kromosomsku AmpC β -laktamazu koja pripada klasi C po Ambleru, a nedavno je otkrivena i kromosomska β -laktamaza iz klase D, OXA-50, iako ova posljednja malo pridonosi rezistenciji [12, 13]. Hidrolizi enzimom AmpC podložni su ampicilin i cefalosporini uskog spektra budući da oni jako induciraju enzim, dok su ureidopenicilini i cefalosporini proširenog spektra slabi induktori, aktivni na inducibilne sojeve, ali inaktivni na dereprimirane. Karbapenemi, iako dobri induktori su ili granično labilni (imipenem) ili učinkovito stabilni (meropenem) pa ostaju djelotvorni bez obzira na način ekspresije β -laktamaze. U nedostatku induktora, aktivnost AmpC β -laktamaze poprima bazalne vrijednosti.

U slučaju mutacije regulatornih gena, i to najčešće AmpD, β -laktamaza AmpC postaje dereprimirana bilo parcijalno, što je češće, ili trajno, s posljedičnom stabilnom rezistencijom na oksiminopeniciline.

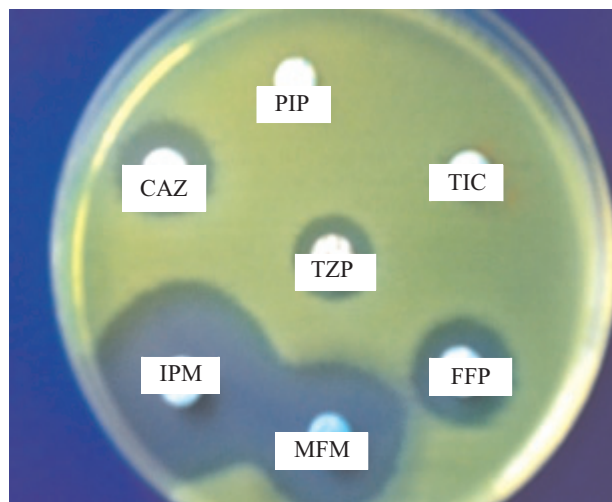
Ova mutacija je rjeđa nego primjerice u izolata *Enterobacter* spp. u kojih dolazi do pojave potpuno dereprimiranih mutanata s frekvencijom od 10^{-5} do 10^{-7} , dok u pseudomonasa potpuno dereprimirane mutante nastaju s učestalosti od oko 10^{-9} [14, 15].

Selekcija mutanata nastaje najčešće tijekom anti-pseudomonasne terapije i to sa slabim induktorima poput ureidopenicilina te cefalosporina proširenog spektra [16, 17].

U rutinskom laboratorijskom radu najčešće se uočava nekoliko fenotipova rezistencije na β -laktame, od koji su samo neki posredovani modificirajućim enzima [18]:

- (1) rezistencija na većinu β -laktama (MIK 4–8 puta veći), osjetljivost na imipenem. Ovaj tip rezistencije najčešće uključuje i rezistenciju na fluorokinolone te je posljedica slabe permeabilnosti i pojačane ekspresije efluksnog sustava. Lako se detektira izrazitim porastom MIK-a na karbencilin pa se koji puta i naziva "intrinzička rezistencija na karbencilin".
- (2) Rezistencija na većinu β -laktama izuzev cefepima i karbapenema. Ovaj tip rezistencije najčešće je posljedica derepresije AmpC β -laktamaze (Slika 1).
- (3) Rezistencija na peniciline, odnosno piperacilin ili tikarcilin, dok cefalosporini i karbapenemi nisu obuhvaćeni. Obično se radi o OXA-enzimima (ali ne ESBL varijantama).
- (4) Izolirana rezistencija na karbapeneme. Obično je posljedica smanjenja količine oprD porina.

Ostali fenotipovi rezistencije posljedica su najčešće djelovanja stečenih ili sekundarnih β -laktamaza, poput onih proširenog spektra iz različitih molekularnih klasa.



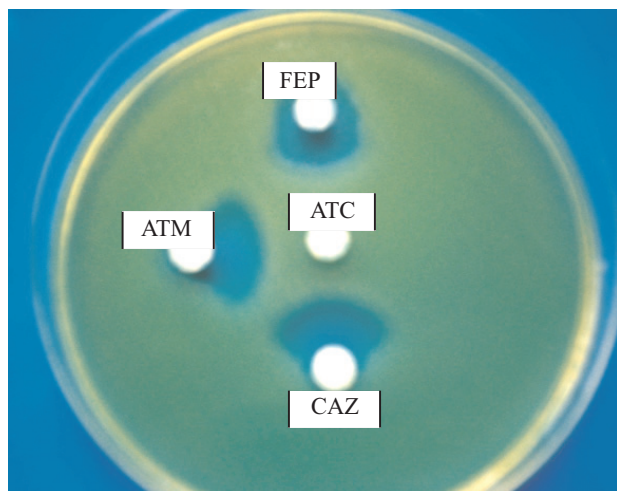
Slika 1. Antibiogram izolata *Pseudomonas aeruginosa* s dereprimiranom AmpC β -laktamazom. Karbapenemi nisu podložni hidrolizi, cefepim manje od ceftazidima. PIP-piperacilin, TIC-tikarcilin, TZP-piperacilin s tazobaktamom, CAZ-ceftazidim, FEP-cefepim, IPM-imipenem, MEM-meropenem

Figure 1. Antibiogram of *Pseudomonas aeruginosa* isolate with derepressed AmpC β -lactamase. Carbapenems are not hydrolysed, cefepime less than ceftazidime. PIP-piperacillin, TIC-ticarcillin, TZP-piperacillin with tazobactam, CAZ-ceftazidime, FEP-cefepime, IPM-imipenem, MEM-meropenem

Sekundarne β -laktamaze su u *P. aeruginosa* rijetke. Primjerice u studiji u Velikoj Britaniji provedenoj na gotovo dvije tisuće izolata, učestalost sekundarnih β -laktamaza bila je 0,7 % [19].

Iz molekularne klase A po Ambleru, u pseudomonasa su dominantne PSE-1 (CARB-2) i PSE-4 (CARB-1) β -laktamaze, iako se opisuju i CARB-3 i CARB-4 [20]. Hidroliziraju karboksipeniciline i ureidopeniciline. U istoj klasi u *P. aeruginosa* opisane su β -laktamaze proširenog spektra čija je aktivnost *in vitro* inhibirana klavulanskom kiselinom i tazobaktamom. Po preporuci nove terminologije u *P. aeruginosa* ovi se enzimi svrstavaju u klasu ESBL_A, od kojih su nešto češći enzimi tipa TEM [4, 21, 24, 42], SHV [2a, 5, 12], PER-1 i VEB [1, 1a, 1b], dok su GES/IBC [1, 2, 5, 8, 9] te BEL-1 nešto rjeđi [21, 22]. Hidrolitički profil im je vrlo sličan budući da su im supstrat osim penicilina uskog spektra, cefalosporini proširenog spektra (3. i 4. generacija) i aztreonam. Iznimka je GES-2, β -laktamaza nastala točkastom mutacijom gena za GES-1 s proširenim spektrom djelovanja koji uključuje i imipenem. U rutinskom laboratorijskom radu teško se detektiraju fenomenima sinergije dvostrukog diska zbog istovremene prisutnosti AmpC β -laktamaze (Slika 2).

U molekularnoj klasi D nalaze se oksacilinaze, i to klasične oksacilinaze (OXA-1, -2 i -10) koje posreduju rezistenciju na karboksipeniciline i ureidopeniciline [23, 24]. Ceftazidim, cefepim, ceftiprom i aztreonam supstrati



Slika 2. Test sinergije dva diska u izolata *Pseudomonas aeruginosa* koji luči ESBL enzim (PER-1). Proširenje zona inhibicije prema disku koji sadržava klavulansku kiselinu koja inhibira enzim PER potencirano je dodatkom boronične kiseline na svaki disk, kako bi se inhibiralo djelovanje AmpC enzima.

AMC-amoksicilin s klavulanskom kiselinom, FEP-cefepim, CAZ-ceftazidim, ATM-aztreonam

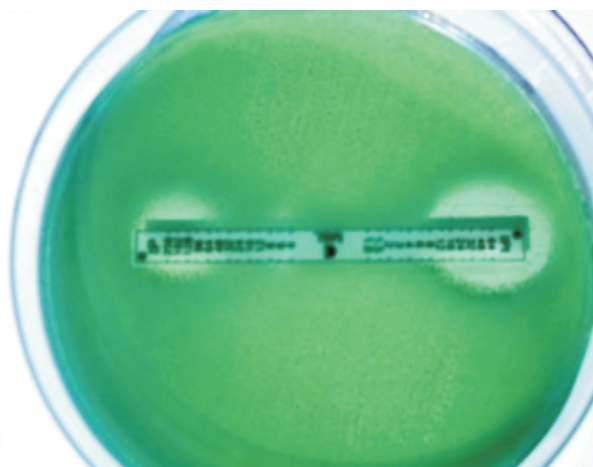
Figure 2. Double disk synergy test in *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing ESBL (PER-1). Widening of inhibition zone toward the disk containing clavulanic acid, inhibiting PER, is potentiated by addition of boronic acid to each disk, thus inhibiting the AmpC enzyme activity.

AMC-amoxycillin with clavulanic acid, FEP-cefepim, CAZ-ceftazidime, ATM-aztreonam

su oksacilinaza proširenog spektra, koje se po preporuci za novu terminologiju nazivaju "miješane ESBL" odnosno ESBL_M, dok se oznaka molekularne klase D dodaje oznaci "M" pa su ESBL koje pripadaju molekularnoj klasi D nazvane ESBL_{M-D} [22]. Uobičajeno se oksacilinaze u pseudomonasa svrstavaju u 5 različitih grupa (I–V) [23]. U grupi I nalazi se OXA-5, -7, -10 s ESBL derivatima OXA-11, -14, -16, -17 te OXA-13 s ESBL derivatima OXA-19 i OXA-28. Većina ih hidrolizira ceftazidim bolje od cefepima. Druga grupa uključuje OXA-2, -3, -15 (varijanta OXA-2 koja je ESBL) i -20. Grupa III uključuje OXA-1 i derivate (-4, -30 i -31), grupa IV OXA-9 te grupa V LCR-1.

Osim derivata OXA-2, većina ESBL OXA enzima derivati su oksacilinaze OXA-10. Izolirano se još opisuju oksacilinaze proširenog spektra OXA-18 i OXA-45, također izolirane iz multirezistentnih sojeva *Pseudomonas aeruginosa* od kojih je samo OXA-18 inhibirana klavulanskom kiselinom, dok ostale oksacilinaze nisu inhibirane klavulanatom ni tazobaktamom što otežava njihovu identifikaciju u rutinskom laboratorijskom radu [25].

U molekularnoj klasi B nalaze se β -laktamaze proširenog spektra poznate i kao karbapenemaze ili metalo- β -laktamaze, budući da im aktivno mjesto sadržava cinkove ione [26]. Ove β -laktamaze po novim preporuka-



Slika 3. MBL E-test u izolata *Pseudomonas aeruginosa* koji luči VIM-2 metalo- β -laktamazu. Minimalna inhibicijska koncentracija za imipenem (lijeva strana; IP) je 64 μ g/mL, a s dodatkom EDTA (desna strana; IPI) je 8 μ g/mL

Figure 3. MBL E-test in *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing VIM-2 metallo- β -lactamase. Minimal inhibitory concentration for imipenem (left, IP) is 64 μ g/mL, and with EDTA added (right; IPI) 8 μ g/mL, respectively

ma nose oznaku ESBL_{CARBA} [22]. Karbapenemaze iz ove klase posreduju rezistenciju na sve β -laktame uključujući i karbapeneme. Izuzet je samo aztreonam. Nisu inhibirane inhibitorima serinskih β -laktamaza, klavulanatom i tazobaktamom već kelatorima iona metala poput EDTA koji nemaju terapijsku primjenu, ali pomažu pri fenotipskoj detekciji u laboratorijskom radu (Slika 3). Do sada su opisane metalo- β -laktamaze tipa IMP (s alelskim varijantama 1–24), VIM (s alelskim varijantama 1–23), SPM-1, GIM-1, te nedavno AIM-1 metalo- β -laktamaza [27–29].

Enzimi IMP porodice prvi su puta otkriveni u Japanu 1988. godine, opisani su 1991. g. [30], ali iako prošireni uglavnom po Japanu, relativno su rijetki u *P. aeruginosa* [31]. Ostale varijante nađene su u drugim bakterijskim vrstama i ostalim zemljama svijeta. U *P. aeruginosa* izolata u Europi opisane su varijante IMP-13, IMP-16 te posljednja opisana alelska varijanta, IMP-22, sve iz nozokomijalnih izolata iz Italije [28, 32]. MBL iz porodice VIM (Veronska imipenemaza) prvi puta je otkrivena 1997. godine, a opisana 1999. u Italiji [33]. Francuska je 2001. godine opisala pojavu nove alelske varijante VIM-2 u *Pseudomonas aeruginosa* koja je do danas najčešće opisana i najviše proširena u Europi i svijetu [28, 34, 35]. U Europi su osim Italije, Francuske i Grčke, pojavu VIM-2 zabilježile i Portugal, Španjolska, Poljska, Belgija, Njemačka te Hrvatska, a nedavno i Srbija [28, 35–38]. Ova alelska varijanta VIM enzima proširena je i u Aziji te Južnoj i Sjevernoj Americi te Kanadi [35]. Iz svijeta stižu opisi i novih alelskih varijanata s posljednjom opisanom, VIM-18 u multirezistentnom izolatu *P. aeruginosa* iz Indije [39].

Treći tip metalo- β -laktamaze, SPM-1 iz *Pseudomonas aeruginosa* izolata iz Brazila opisan je 2002. godine, a četvrti, GIM-1, 2004. godine u *Pseudomonas aeruginosa* iz Njemačke. Posljednja opisana metalo- β -laktamaza je AIM-1 iz izolata *P. aeruginosa* iz Australije [29].

Geni za IMP i VIM enzime uglavnom se nalaze, slično kao i geni za ESBL-OXA enzime, u genskim kazetama na integronima, koji su prirodni sustavi genske rekombinacije s nizom stečenih gena unutar varijabilnog dijela integrona koji slijede gen integreaze i promotor u konzerviranom dijelu integrona. Unutar ovog varijabilnog dijela vrlo se često nalaze i aminoglikozid-modificirajući enzimi pa su izolati s MBL često osjetljivi samo na aztreonam, fluorokinolone i polimiksine. Ako je dodatno i crpka MexAB-OprM u pojačanoj ekspresiji ili ako izolat ima mutacije topoizomeraze ili AmpD (koja dovodi do derepresije AmpC) jedina terapijska mogućnost ostaju polimiksini [14].

Rezistencija na aminoglikozide

Nemogućnost postizanja dovoljne koncentracije u citoplazmi može biti posljedica nedovoljnog prolaza aminoglikozida, što je opisano najčešće u izolata bolesnika s cističnom fibrozom, ali i pojačanog efluksa kao posljedica hiperekspresije MexXY proteina i OprM [40, 41].

Rezistencija na aminoglikozide ipak je najčešće posljedica djelovanja inaktivirajućih enzima koji se dijele u tri skupine [42]: aminoglikozid fosforiltransferaze (APH), adeniltransferaze (AAD ili ANT) i acetiltransferaze (AAC). Najčešće se opisuju AAC(6')-II (rezistencija na gentamicin, netilmicin, tobamicin, osjetljivost na amikacin), AAC(3)-I (rezistencija samo na gentamicin), AAC(6')-I (rezistencija na tobramicin, netilmicin, amikacin, osjetljivost na gentamicin) te ANT(2')-I (rezistencija na gentamicin i tobramicin, osjetljivost na amikacin i netilmicin).

U novije vrijeme opisana je i rezistencija posredovana metilazama 16S rRNA [43]. U tom slučaju obično postoji rezistencija na sve aminoglikozide.

Rezistencija na fluorokinolone

Kao što je već spomenuto, aktivni efluks igra važnu ulogu u rezistenciji *Pseudomonas aeruginosa* na fluorokinolone koji su supstrat svim opisanim efluks sustavima [8].

S druge strane, modifikacija ciljnog enzima – bilo primarnog cilja (giraze ili topoizomeraze II) ili sekundarnog (topoizomeraza IV) može mutacijom gena za ove enzime promijeniti aminokiselinski sastav ciljnog enzima i smanjiti afinitet prema fluorokinolonu [44].

Noviji kinoloni vrlo često selekcioniraju mutante *nfxB* s posljedičnom pojačanom ekspresijom *mexCD-oprJ* operona i tripartitne crpke koja eksportira cefeme proširenog spektra (cefepim, cefpirom) te fluorokinolone [45, 46].

Rezistencija *P. aeruginosa* u Hrvatskoj

Prema podacima Odbora za praćenje rezistencije na antibiotike pri Akademiji medicinskih znanosti Hrvatske, najviša rezistencija za *P. aeruginosa* bilježi se kontinuirano od 1997. godine do danas na gentamicin, pa je 2008. godine 30 % izolata bilo otporno na ovaj antibiotik [47]. Gotovo da je prati rezistencija na netilmicin koja je 2008. godine iznosila 26 %, dok je iste godine samo 13 % praćenih izolata *P. aeruginosa* bilo otporno na amikacin [47]. Rezultati variraju ovisno o pojedinim ustanovama, pa je za istaknuti visoki postotak izolata *P. aeruginosa* rezistentnih na amikacin u KB Merkur 2008. godine, čak 31 % [47]. Posljednjih godina nije se značajno promijenio ni udio izolata rezistentnih na ciprofloksacin, a 2008. godine iznosio je 24 % [47]. Od ukupnog broja izolata njih 8 % bilo je 2008. godine otporno na ceftazidim, a 10 % na piperacilin s tazobaktomom [47]. Među kliničkim ustanovama, KB Merkur ističe se visokom rezistencijom *P. aeruginosa* na ciprofloksacin (33 %) i piperacilin s tazobaktomom (29 %) [47]. Rezistencija na karbapeneme (imipenem i meropenem) također se ne mijenja značajno te se posljednjih 5 godina kreće od 9–11 %, iako je u kliničkim bolničkim centrima viša (npr. 2008. godine Rijeka i Zagreb 17 %, Split 12 %) [47].

Zaključak

P. aeruginosa važan je uzročnik bolničkih infekcija. Posjeduje nebrojene mogućnosti urođene i stečene rezistencije na antibiotike te se izvanrednim genetskim mogućnostima prilagođava uvjetima svakog životnog okruženja pa tako i onog s antibiotikom. Budući da se u skoroj budućnosti ne očekuju novi antipseudomonasni antibiotici, samo racionalna antimikrobna terapija te učinkovita kontrola bolničkih infekcija mogle bi ograničiti daljnji razvoj rezistencije na β -laktame, aminoglikozide i fluorokinolone kako bi ih i dalje mogli koristiti u liječenju infekcija uzrokovanih *P. aeruginosa*.

Literatura

- [1] Hurst V, Sutter V. Survival of *Pseudomonas aeruginosa* in the hospital environment. *J Infect Dis* 1966; 116: 151–4.
- [2] National Nosocomial Infection Surveillance System. National nosocomial infections surveillance (NNIS) report, data summary from October 1986–April 1996, issued May 1996. *Am J Infect Control* 1996; 24: 380–8.
- [3] Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, i sur. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000; 406(6799): 959–64.
- [4] Woodruff WA, Hancock RE. Construction and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* protein F-deficient mutants after *in vitro* and *in vivo* insertion mutagenesis of the cloned gene. *J Bacteriol* 1988; 170: 2592–8.

- [5] Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 247–50.
- [6] Ochs MM, McCusker MP, Bains M, Hancock RE. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1085–90.
- [7] Schweizer HP. Efflux as mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res* 2003; 2: 48–62.
- [8] Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organism. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2001; 3: 255–64.
- [9] Ziha-Zarifi I, Llanes C, Köhler T, Pechere JC, Plesiat P. *In vivo* emergence of multidrug resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 43: 287–91.
- [10] Livermore DM. Radiolabeling of penicillin-binding proteins (PBPs) in intact *Pseudomonas aeruginosa* cells: consequences of β -lactamase activity by PBP-5. *J Antimicrob Chemother* 1987; 19: 733–42.
- [11] Bellido F, Veuthey C, Blaser J, i sur. Novel resistance to imipenem associated with an altered PBP-4 in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother* 2001; 45: 480–4.
- [12] Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211–33.
- [13] Girlich D, Naas T, Nordmann P. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(6): 2043–8.
- [14] Livermore DM, Woodford N. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiol* 2006; 14(9): 413–20.
- [15] Livermore D. Clinical significance of β -lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. *Eur J Clin Microbiol* 1987; 19: 439–45.
- [16] Livermore DM. Multiple mechanisms of resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002; 34: 634–40.
- [17] Shanon KP, King A, Philips I. Development of resistance to β -lactam antibiotics during therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Lancet* 1982; i:1466.
- [18] Pechere JC, Kohler T. Patterns and models of β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 1999; 5(supl. 1): S15–8.
- [19] Chen HY, Yuan M, Livermore D. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *J Med Microbiol* 1995; 43:300–9.
- [20] Sanschagrín F, Bejaoui N, Levasque RC. Structure of CARB-4 and AER-1 carbenicillin hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(8): 1966–72.
- [21] Bradford PA. Extended-Spectrum β -lactamases in 21st century: characterisation, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4): 933–51.
- [22] Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, i sur. Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(1): 1–4.
- [23] Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 11–8.
- [24] Naas T, Nordmann P. OXA-type β -lactamases. *Curr Pharm Des* 1999; 5: 865–79.
- [25] Philippon LN, Naas T, Bouthors AT, Barakett V, Nordmann P. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2188–95.
- [26] Gupta V. Metallo- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17(2): 131–43.
- [27] Livermore DM, Woodford N. Carbapenemase: a problem waiting? *Curr Opin Microbiol* 2000; 3: 489–95.
- [28] Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:306–25.
- [29] Yong D, Bell JM, Ritchie B, Pratt R, Toleman MA, Walsh TR. A novel sub-group metallo- β -lactamase (MBL), AIM-1, emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. *Abstr. 47th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. 2007. abstr. C1-593.*
- [30] Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35(1): 147–51.
- [31] Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, i sur. PCR detection of metallo- β -lactamase gene (*bla_{IMP}*) in gram-negative rods resistant to broad spectrum β -lactams. *J Clin Microbiol* 1996; 34(12): 2909–13.
- [32] Pellegrini C, Mercuri PS, Celenza G, i sur. Identification of *bla(IMP-22)* in *Pseudomonas* spp. in urban wastewater and nosocomial environments: biochemical characterization of a new IMP metallo-enzyme variant and its genetic location. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(5): 901–8.
- [33] Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, i sur. Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(7): 1584–90.
- [34] Poirel L, Lambert T, Turkoglu S, Ronco E, Gaillard J, Nordmann P. Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *bla_{VIM-2}* carbapenem hydrolyzing β -lactamase gene and two novel aminoglycosides resistance gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(2): 546–52.
- [35] Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol* 2009; 58: 1133–48.
- [36] Srdelic S, Pallecchi L, Punda Polic V, Rossolini GM. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying VIM-2 metallo- β -lactamase determinants, Croatia. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1022–3.
- [37] Bedenic B, Mazzariol A, Jarza-Davila N, Plecko V, Cornaglia G, Fontana R. VIM-2 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* strains from Zagreb, Croatia. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(Suppl 4):P928. (Abstracts from the 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease, Nice, France April 1–4, 2006).
- [38] Lepsanovic Z, Libisch B, Tomanovic B, Nonkovic Z, Balogh B, Füzi M. Characterisation of the first VIM metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Serbia. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2008; 55(4):447–54.
- [39] Castanheira M, Bell JM, Turnidge JD, Mathai D, Jones RN. Carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains from India: evidence for nationwide endemicity of multiple metallo- β -lactamase clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the newly characterized VIM-18). *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 1225–7.

- [40] MacLeod DL, Nelson LE, Shawar RM, i sur. Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. *Infect Dis* 2000; 181(3): 1180–4.
- [41] Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(12): 3322–7.
- [42] Vakulenko SB, Mobashery S. Versality of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 430–50.
- [43] Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo- β -lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(3): 852–6.
- [44] Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 337–41.
- [45] Li XZ, Barré N, Poole K. Influence of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46(6): 885–93.
- [46] Kohler T, Michea-Hamzhepour M, Pesiat P, Kahr AL, Pechere JC. Differential selection of multidrug efflux system by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2540–2543.
- [47] Tambić Andrašević A, Tambić T. Rezistencija bakterijskih izolata u 2008. godini. U: Tambić T, Tambić Andrašević A, ur. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2008. godini. Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2009: 9–98.