

# PSEUDOMONAS AERUGINOSA - REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE

---

**Findri, Ivan**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:831127>

*Rights / Prava:* [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-19**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI**

**SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE**

**Ivan Findri**

**PSEUDOMONAS AERUGINOSA - REZISTENCIJA NA**

**ANTIBIOTIKE**

**Diplomski rad**

Rijeka, 2022.

**SVEUČILIŠTE U RIJECI**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI**

**SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE**

**Ivan Findri**

**PSEUDOMONAS AERUGINOSA - REZISTENCIJA NA**

**ANTIBIOTIKE**

**Diplomski rad**

Rijeka, 2022.



Mentor rada: Izv.prof.dr.sc. Marina Bubonja Šonje, dr.med.

Diplomski rad ocjenjen je dana \_\_\_\_\_ na Medicinskom fakultetu Sveučilište u Rijeci

pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof.dr.sc. Darinka Vučković, dr.med.
2. Doc.dr.sc. Tanja Grubić Kezele, dr.med.
3. Doc.dr.sc. Đurđica Cekinović Grbeša, dr.med.

Rad sadrži 48 stranica, 3 slike, 2 tablice i 27 literaturnih navoda.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. SVRHA RADA .....	2
3. ČIMBENICI VIRULENCIJE.....	3
3.1. ČIMBENICI VIRULENCIJE POVEZANI S BAKTERIJSKOM STANICOM.....	3
3.1.1. Čimbenici virulencije odgovorni za adheziju.....	3
3.1.1.1. <i>Prianjanje na epitelne stanice</i> .....	3
3.1.1.2. <i>Prianjanje na mucin</i> .....	4
3.1.1.3. <i>Prianjanje na nežive površine</i> .....	4
3.1.2. Endotoksin.....	5
3.2. IZVANSTANIČNI ČIMBENICI VIRULENCIJE.....	5
3.2.1. Čimbenici virulencije koji se izlučuju putem sustava izlučivanja tipa I....	6
3.2.2. Čimbenici virulencije koji se izlučuju putem sustava izlučivanja tipa II...6	
3.2.2.1. <i>Egzotoksin A</i> .....	7
3.2.2.2. <i>Elastaze LasB i LasA</i> .....	7
3.2.2.3. <i>Fosfolipaza C</i> .....	8
3.2.2.4. <i>Proteaza IV</i> .....	8
3.2.2.5. <i>Lipaze</i> .....	8
3.2.3. Čimbenici virulencije koji se izlučuju putem sustava izlučivanja tipa III...9	
3.2.3.1. <i>Egzoenzim S</i> .....	9
3.2.3.2. <i>Egzotoksin U</i> .....	10
3.2.3.3. <i>Egzoenzim Y</i> .....	10
3.2.4. Ostali čimbenici izvanstanične virulencije.....	11
3.2.4.1. <i>Ramnolipidi</i> .....	11
3.2.4.2. <i>Piocijanin</i> .....	11

3.2.4.3. Siderofore.....	11
3.2.4.4. Cijanovodik.....	12
3.3. Biofilm.....	12
3.3.1. Građa biofilma.....	12
3.3.2. Ciklus nastanka biofilma <i>P. aeruginosa</i> .....	13
3.3.3. Komunikacija unutar biofilma.....	14
<b>4. EPIDEMIOLOGIJA.....</b>	<b>16</b>
<b>5. KLINIČKE MANIFESTACIJE.....</b>	<b>17</b>
5.1. Infekcije respiratornog sustava.....	17
5.1.1. Pseudomonas i bronhiektazije.....	18
5.1.2. Pseudomonas i COVID 19.....	19
5.2. Bakterijemija i sepsa.....	19
5.3. Endokarditis.....	19
5.4. Infekcije središnjeg živčanog sustava.....	20
5.5. Infekcije uha.....	20
5.6. Infekcije oka.....	21
5.7. Infekcije kostiju i zglobova.....	22
5.8. Infekcije probavnog sustava.....	22
5.9. Infekcije mokraćnog sustava.....	23
5.10. Infekcije kože.....	23
<b>6. LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA.....</b>	<b>25</b>
<b>7. ANTIMIKROBNA TERAPIJA I REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE.....</b>	<b>27</b>
7.1. Prevencija i kontrola <i>P. aeruginosa</i> infekcija.....	27
7.2. Antibiotško liječenje <i>P. aeruginosa</i> infekcija .....	28
7.3. Mehanizmi rezistencije <i>P. aeruginosa</i> na antibiotike.....	31

7.3.1. Enzimima posredovana rezistencija.....	32
7.3.2. Efluksne pumpe.....	33
7.3.3. Propusnost vanjske membrane .....	34
7.3.4. Rezistencija na karbapeneme.....	35
7.3.5. Nove terapijske strategije za liječenje <i>P. aeruginosa</i> infekcija.....	37
<b>8. RASPRAVA.....</b>	<b>38</b>
<b>9. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>41</b>
<b>10. SAŽETAK.....</b>	<b>42</b>
<b>11. SUMMARY.....</b>	<b>43</b>
<b>12. LITERATURA .....</b>	<b>44</b>
<b>13. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>48</b>



## POPIS KRATICA

AIDS	acquiredimmunodeficiencysyndrome
CF	cistična fibroza
eDNA	extracellular DNA
ETA	egzotoksin A
Exo U	egzotoksin U
Exo Y	egzoenzim Y
IFN	interferon
LPS	lipopolisaharid
MALDI-TOF MS	matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry
MBL	metalobetalaktamaze
PVC	polivinil-klorid
RT-PCR	lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (eng. real-time polymerase chain reaction)
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
TNF	tumorski čimbenik nekroze (engl. tumor necrosis factor)
SŽS	središnji živčani sustav
QS	međustanična komunikacija (eng. Quorum sensing)

## 1. UVOD

Rod *Pseudomonas* sadrži više od 190 poznatih vrsta. Zbog raširene prisutnosti pseudomonasa u vodi, tlu, na biljkama i sl. pripadnici ovog roda izolirani su iz okoliša krajem 19.stoljeća. Vrsta *P. aeruginosa* je najučestaliji klinički izolat pseudomonasa, a prvi put ga je iz plavkastog gnoja rane ozlijeđenog vojnika izolirao vojni kirurg Sedillot. Ljekarnik Gessard 1882. godine uzročnika naziva *Bacillus pyocyaneus*, a botaničar Migula 1894. god. naziv mijenja u *Pseudomonas aeruginosa* (grč. pseudo i monas – lažna podjedinica, lat. aeruginosa – pun bakrene hrđe, zelen) što do današnjeg dana ostaje naziv za najznačajnijeg predstavnika cijelog roda. *P. aeruginosa* je ubikvitarna gram-negativna, aerobna štapićasta bakterija koja ne stvara spore. Oportunistički je patogen koji vrlo rijetko izaziva bolest u zdravih pojedinaca. Kateterizirani bolesnici, bolesnici na umjetnoj ventilaciji, bolesnici s cističnom fibrozom i imunološki oslabljeni bolesnici su pod velikim rizikom za razvoj infekcija kao što su infekcije kože i opekline, infekcije dišnog i mokraćnog sustava i dr. Za razvoj teških infekcija i sepse, koje imaju visoku stopu smrtnosti, odgovorna je kombinacija oslabljene obrane domaćina, činitelji virulencije bakterije, sposobnost stvaranja biofilma i izrazita otpornost bakterije na antibiotike što znatno otežava liječenje pseudomonasnih infekcija (1-4). Kako bi potaknula znanstvenike na pronalazak novih antibiotika, Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) je 2017. god. objavila popis bakterija koje predstavljaju ozbiljnu prijetnju javnom zdravlju zbog otpornosti na većinu antibiotika. Karbapenem rezistentni *P. aeruginosa* se nalazi pri samom vrhu ove liste, u grupi kritičnih bakterija za koju postoji prioritet za razvoj novih lijekova.

## **2. SVRHA RADA**

Svrha rada je uz pomoć literature na zadanu temu opisati čimbenike virulencije, epidemiologiju, kliničke manifestacije, laboratorijsku dijagnostiku, liječenje, prevenciju i kontrolu infekcija uzrokovanih bakterijom *P.aeruginosa* s naglaskom na antibiotsku rezistenciju, te prikazati pregled suvremenih spoznaja o toj bakteriji.

### 3. ČIMBENICI VIRULENCIJE

Patogenost bakterije *P. aeruginosa* pripisuje se proizvodnjirazličitih čimbenika virulencije od kojih su neki povezani s bakterijskom stanicom (strukturni) dok se drugi izlučuju izvan nje (sekrecijski). Činitelji virulencije uključeni su u različite faze patogeneze bolesti - adheziju, vezanje željeza, invaziju, izbjegavanje imunološkog odgovora i dr.

#### 3.1. ČIMBENICI VIRULENCIJE POVEZANI S BAKTERIJSKOM STANICOM

Prvi korak u patogenezi infekcija uzrokovanim *P.aeruginosa* je kolonizacija epitelnih površina čiju inicijaciju omogućuju specifični adhezini.

##### 3.1.1. Čimbenici virulencije odgovorni za adheziju

###### 3.1.1.1. *Prianjanje na epitelne stanice*

*P.aeruginosa* kolonizira sluznicu orofarinksa do 6% zdravih osoba dok se stopa kolonizacije u hospitaliziranih osoba približava 50% zbog oštećenja prirodne zaštite - mukocilijarnog aparata i fibronektina koji inače prekriva epitelne stanice i sprječava adheziju bakterija. Osobe s cističnom fibrozom (CF) imaju visoku stopu kolonizacije pluća koja započne još u djetinjstvu. Sputum bolesnika s CF sadrži visoke razine proteaza koje su vjerojatno zaslužne za razgradnju fibronektinskog sloja i pojačanu adheziju bakterija. Nakon što kolonizira pluća CF bolesnika, bakterija se nikada ne može potpuno eliminirati antibioticima zbog nastanka biofilma. Oštećenja epitela uzrokovana endotrahealnom intubacijom ili virusnim infekcijama kao što je influenza pospješuju adherenciju i kolonizaciju dišnih putova. Prilikom ozlijeda epitela komponente izvanstaničnog matriksa, kao što su laminin i kolagen tipa I, postaju izloženiji i omogućuju vezanje bakterije. Prianjanje pseudomonasa na epitelne

stanice uglavnom je posredovano pilima tipa IV kojima se pripisuje 90% adhezijskog kapaciteta (1,5). Specifične molekule na površini pila, kao što su manozna vežući lektin ili galaktoza, su ligandi koji reagiraju s komplementarnim sekvencama na stanicama domaćina kao što je ugljikohidratni dio glikosfingolipida ili površinski proteini epitela. Osim galaktoza i manozna vežućeg lektina, enzim s ADP-ribozilacijskom aktivnošću - egzoenzim S ima sposobnost vezanja za glikosfingolipide matriksa.

#### 3.1.1.2. *Prianjanje na mucin*

Tijekom kolonizacije sluznice dišnih putova *P. aeruginosa* nije samo u interakciji s epitelom već i s mucinom, glavnom komponentom sluzi koja tvori viskozni sloj na cilijarnom epitelu dišnih putova. Normalna je funkcija mucina hvatanje i odstranjivanje udahnutih čestica. Bakterijski receptor za mucin, u stanjima smanjene mukocilijarne pokretljivosti kao što je u bolesnika s CF, povećava vezanje za mucin što može olakšati kolonizaciju dišnih putova, no u tom slučaju ulogu ima i promijenjen sastav sluzi. Među raznim bakterijskih adhezinima najveći značaj ima flagelarni protein flagelin koji se veže za ugljikohidratne dijelove mucina.

#### 3.1.1.3. *Prianjanje na nežive površine*

Istraživanja su pokazala da bakterijski bičevi (flagele) i pili (fimbrije) sudjeluju u prianjanju bakterije na nežive površine. Bakterijske mutante defektne u formiranju flagelaslabije se vežu na plastične polivinil-klorid (PVC) površine (5). Mutante za pile tipa IV ne mogu formirati prave mikrokolonijena površini PVC-a, stvaraju samo tanki površinski sloj stanica.

### 3.1.2. Endotoksin

Lipopolisaharid (LPS) je endotoksin gram-negativnih bakterija koji se sastoji od hidrofobne lipidne A regije, središnje oligosaharidne regije i ponavljajućeg polisaharidnog O-antigena. Varijacije u imunogenom O-antigenu temelj su klasifikacije dvadeset do sada poznatih i priznatih serotipova. Serotipovičiji se O-antigen sastoji od mnogo dugih lanaca su znatno virulentniji od serotipova s kraćim polisaharidnim lancima. Što se tiče lipida A pseudomonasa, on je manje toksičan u usporedbi s lipidom A crijevnih enterobakterija što se objašnjava većom zastupljenošću pentaacilnih nego heksaacilnih lanaca. Specifične strukture lipida A koje sadrže palmitat i amino arabinozu povezane su s otpornošću ove bakterije na kationske antimikrobne peptide i pojačanim upalnim odgovorom. Lipid A sudjeluje u međusobnom vezanju bakterijskih stanica i vezanju za inertne površine, a istraživanja pokazuju da LPS također djeluje kao ligand za ulazak u eukariotske stanice. Nedavno je otkriveno da promjena strukture LPS-a dovodi do promjena u procesu lučenja LasB elastaza i lipaza pa je izgledno da LPS ima ulogu u održavanju stabilnosti bakterijskog sustava izlučivanja tipa II (3-5).

### 3.2. IZVANSTANIČNI ČIMBENICI VIRULENCIJE

*P.aeruginosa* proizvodi nekoliko izvanstaničnih produkata koji mogu uzrokovati oštećenja tkiva, omogućiti ulazak bakterije u krvotok i diseminaciju po tkivima. Poznato je da pseudomonas posjeduje pet različitih sustava izlučivanja proteina (sekrecijski sustavi I do V) od kojih sustavi tip II i tip III luče većinu poznatih toksina (5). Bakterijski sustavi izlučivanja proteina neophodni su zarast i preživljavanje te

ihbakterije koriste u nizu procesa koji im omogućavaju razmnožavanje i opstanak u određenoj ekološkoj niši. Neki sustavi izlučivanja nalaze se u gotovo svim bakterijama i luče mnogo različitih proteina, dok su drugi identificirani u manjem broju bakterijskih vrsta i izlučuju samo jedan ili nekoliko proteina. Bakterije koriste sustave izlučivanja kako bi izlučile određene proteine koje koriste prilikom invazije domaćina, prilagodbe novom okolišu ili kompeticije s drugim mikroorganizmima. Postoji nekoliko različitih tipova sustava za izlučivanje, a njihova se struktura, smještaj na membrani i aktivnosti razlikuju. Zbog njihove uloge u konjugaciji i prijenosu gena rezistencije, razvijaju se i alternativni antimikrobni lijekovi koji djeluju inhibitorno na neke od sustava izlučivanja (6).

U daljnjem tekstu sažeto su prikazani biološki učinci najčešće proučavanih čimbenika virulencije koji su povezani s uspostavom infekcije, lokalnim oštećenjem tkiva i diseminacijom bakterija. Razvrstani su prema načinu izlučivanja.

### 3.2.1. Čimbenici virulencije koji se izlučuju putem sustava izlučivanja tipa I

Sekrecijski sustav tipa I sastoji se od tri membranska proteina: AprD, AprE i AprF. Sustavom tipa I *P.aeruginosa* luči: alkalne proteaze, pioverdin, piocijanin, HasAp i AprX. Uloga HasAp-a i AprX-a kao čimbenika virulencije nije dovoljno ispitana. Alkalna proteaza je metaloproteaza čiju ekspresiju kontrolira međustanična komunikacija. Alkalna proteaza razgrađuje komponente komplementa, interferon gama (IFN- $\gamma$ ) i tumorski čimbenik nekroze alfa (engl. tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ) te hidrolizira fibrin i fibrinogen, sojevi koji ne luče alkalnu proteazu manje su virulentni (1,3,5).

### 3.2.2 Čimbenici virulencije koji se izlučuju putem sustava izlučivanja tipa II

Veći broj čimbenika virulencije se izlučuje putem sekrecijskog sustava tipa II. Proteini koji koriste ovaj put se sintetiziraju kao prekursori s N-terminalnim signalnim peptidom koji se cijepa tijekom transporta. Putem sustava izlučivanja tipa II izlučuje se egzotoksin A, elastaze LasA i LasB, proteaza tipa IV, fosfolipaza i lipolitički enzimi (6). Poznati su i drugi bakterijski produkti kao što su alkalna ceramidaza, aminopeptidaze i hitin vežujući protein čiju ulogu u patogenezi bolesti tek treba utvrditi.

#### 3.2.2.1. Egzotoksin A (ETA)

Egzotoksin A, protein kodiran *tox A* genom, proizvodi većina kliničkih izolata *P. aeruginosa*. ETA je izvanstanični protein koji ulazi u eukariotske stanice endocitozom, a kada dospije u citoplazmu katalizira ADP-ribozilaciju i inaktivaciju čimbenika elongacije 2 što dovodi do inhibicije sinteze proteina i smrti stanice.

#### 3.2.2.2. Elastaze LasB i LasA

Sposobnost *P. aeruginosa* da uništi elastin smatra se glavnom determinantom virulencije tijekom akutne infekcije. Protein elastin čini značajan dio tkiva pluća, odgovoran je za plućnu pokretljivost i važna je komponenta stijenke krvnih žila. Smatra se da je elastolitička aktivnost pseudomonasau plućnom tkivu odgovorna za krvarenja i uspostavu invazivne infekcije. LasA i LasB elastaze su cink metaloproteaze koje djeluju na niz proteina domaćina, uključujući elastin na koji djeluju sinergistički. Uz elastin LasB elastaza razgrađuje i druge komponente kao što su fibrin i kolagen. Ova elastaza može inaktivirati imunoglobuline G i A, lizozim, komponente komplementa i druge tvari uključene u zaštitu respiratornog sustava od



proteaza. Istraživanja su pokazala da LasBelastaza može razgraditi surfaktant i narušiti cijeljenje rana. LasB elastaza, osim navedenog, ometa obrambene mehanizme domaćina imunomodulacijskim djelovanjem - aktivacijom izvanstaničnog signalnog regulatora ERK kinazeu epitelnim stanicama i regulacijom ekspresije IL-8 (5,6).

#### 3.2.2.3.Fosfolipaza C

*P. aeruginosa* proizvodi hemolitičku i nehemolitičku fosfolipazu C. Dok za nehemolitički oblik nije dokazana nikakva patogena aktivnost, za hemolitičku fosfolipazu C je u animalnim modelima dokazana indukcija vaskularne propusnosti, oštećenje organa i smrt. Pročišćena hemolitička fosfolipaza C inducira oslobađanje upalnih medijatora, potiskuje oksidativnu aktivnost neutrofila interferirajući sa signalnim putem specifične protein kinaze C te smanjuje proizvodnju IL-8 iz monocita (2,5).

#### 3.2.2.4.Proteaza IV

Ova serinska proteaza razgrađuje komponente komplementa C1q i C3, imunoglobulin G, fibrinogen, plazmin i plazminogen. Proteaza IV ima značajnu aktivnost tijekom infekcije rožnice. Otkrivena je i endoproteazakoja je nazvana PrpL, čiji je N-terminalni kraj identičan proteazi IV. PrpL cijepa proteine koji vežu željezo-laktoferin, transferin, kazein, elastin i dekorinte se pretpostavlja da bi PrpL mogao doprinijeti patogenezi kroničnih infekcija pluća uzrokovanih pseudomonasom (4,5).

#### 3.2.2.5.Lipaze

*P. aeruginosa* proizvodi dvije lipaze LipA i LipC. Lipaze bi mogle imati ulogu u patogenezi infekcije pluća razgradnjom glavnog čimbenika plućnog surfaktanta dipalmitoilfosfatidilkolina. Pročišćena lipaza također pojačava indukciju upalnih medijatora te može biti štetna za domaćina izazivanjem značajne upale.

### 3.2.3. Čimbenici virulencije koji se izlučuju putem sustava izlučivanja tipa III

Sustav izlučivanja tipa III se sastoji od 30 različitih proteina te je jedan od najsloženijih sustava izlučivanja, a translokacija se odvija putem konformacijske promjene u kompleksu s molekularnim pratiteljem - chaperonom. Nakon bliskog kontakta bakterije sa stanicom domaćina efektorski se proteini (egzoenzim S, egzoenzim T, egzotoksin U i egzoenzim Y) ubrizgavaju izravno u citoplazmu ciljnih stanica. Studije sugeriraju da su bakterijski izolati koji izlučuju proteine ovisne o sustavu izlučivanja tip III (osobito ExoU) povezani s teškim infekcijama (1,5). Geni koji kodiraju sekreciju (*pse* i *per*), translokaciju (*popD* i *popB*) i regulatorni aparat (*exs*) sustava grupirani su na kromosomskom lokusu nazvanom egzoenzim S regulon (6).

#### 3.2.3.1. Egzoenzim S

Egzoenzim S (ExoS) je sastavljen od dva proteina, jednog koji posjeduje aktivnost ADP-riboziltransferaze nazvanog ExoS i drugog sa slabijom intrinzičnom aktivnošću ADP-riboziltransferaze nazvanog egzoenzim T (ExoT). Animalni modeli akutne i kronične infekcije sugeriraju da ExoS ne doprinosi početnoj kolonizaciji i uspostavi infekcije ali je zato odgovoran za oštećenje tkiva i širenje bakterija (5). Unutarstanična aktivnost amino kraja ExoS u eukariotskim stanicama ometa aktinske filamente što uključuje Rho ovisne GTP-aze. Karboksilni kraj ExoS sadrži domenu

ADP-riboziltransferaze koja je citotoksična i uključuje ribozilaciju proteina koji vežu GTP kao što je Ras28. Ras i Rho doprinose regeneraciji tkiva i cijeljenju rana. Ujedno ADP-ribozilacijska aktivnost ExoS potencijalno inducira apoptozu. Osim niske ADP-ribozilacijske aktivnosti, ExoT je GTPaza aktivirajući protein za Rho signalni put. Stoga se pretpostavlja da ExoT može ometati organizaciju aktina, egzocitozu, napredovanje staničnog ciklusa i fagocitozu (5,6).

#### 3.2.3.2. Egzotoksin U (*ExoU*)

Egzotoksin U (*ExoU*) je treći egzoprotein koji se izlučuje putem sustava izlučivanja tipa III. Gen *exoJ* dijeli s genima *exoS* i *exoT* slične promotore i identično vezno mjesto za transkripcijski aktivator ExsA. Toksin *ExoU* se ekspimirau većini kliničkih izolata koji uzrokuju infekciju rožnice, dok je prisutan u samo 40% sojeva izoliranih iz akutnih infekcija respiratornog trakta (5). Utvrđeno je da rekombinantni *ExoU* ima aktivnost lipaze *in vitro*, ali samo u prisutnosti ekstrakta kvasca. Navedeno sugerira da *ExoU* lipaza zahtijeva aktivaciju ili modifikaciju eukariotskim čimbenicima kako bi uništila eukariotsku membranu dovodeći do smrti stanice, povećane propusnosti i brze diseminaciji sojeva koji ju izlučuju.

#### 3.2.3.3. Egzoenzim Y (*Exo Y*)

Egzoenzim Y (*Exo Y*) je četvrti efektorski protein bakterije ovisan o *ExoS* regulonu. Ovaj enzim je adenilatciklaza koja se translocira u ciljne stanice putem aparata za izlučivanje tipa III što dovodi do nakupljanja cAMP unutar stanice (4,5). Uloga *Exo Y* u patogenezi *P. aeruginosa* infekcija nije do kraja razjašnjena.

Sekrecijski sustav tipa IV odgovoran je za konjugaciju, lučenje mukoidnog egzopolisaharida alginata i signalnih molekula za bakterijsku međustaničnu komunikaciju (6).

#### 3.2.4. Ostali čimbenici izvanstanične virulencije

##### 3.2.4.1. *Ramnolipidi*

*P. aeruginosa* proizvodi dva citotoksična hemolizina: fosfolipazu C i ramnolipide, za koje se pretpostavlja da djeluju sinergistički u razgradnji lipida i lecitina. Čini se da ramnolipidi otapaju fosfolipide plućnog surfaktanta čineći ih pristupačnijim za cijepanje fosfolipazi C. Gubitak plućnog surfaktanta može biti odgovoran za nastanak atelektaza u akutnoj i kroničnoj infekciji pluća. Pokazalo se da ramnolipidi inhibiraju mukocilijarni aparat. Istraživanja biofilma pokazuju da su mutante koje ne proizvode ramnolipidne nesposobne za aktivno održavanje otvorenih kanala kojima prolaze nutrijenti i kisik unutar složene strukture biofilma (5).

##### 3.2.4.2. *Piocijanin*

Piocijanin je plavi redoks aktivni pigment koji se reducira NAD(P)H-om, a zatim reagira s kisikom stvarajući superoksid i vodikov peroksid i uzrokujući oksidativni stres. Piocijanin modificira imunološki odgovor domaćina inhibicijom stvaranja neutrofilne superoksidaze, limfocitne proliferacije i povećanjem proizvodnje IL-8 od strane epitelnih stanica dišnih putova. Piocijanin inducira apoptozu neutrofila (1,5).

##### 3.2.4.3. *Siderofore*

U uvjetima niske koncentracije željeza *P. aeruginosa* luči dva siderofora-pioverdin i piohelin koji se natječu s transferinom plazme za vezanje željeza. Vezano se željezo zatim oslobađa radi ugradnje u bakterijske proteine. Osim uloge kelatora željeza, pioverdin regulira proizvodnju drugih čimbenika virulencije – endoproteaze i egzotoksina A (4,5).

#### 3.2.4.4. Cijanovodik

Cijanovodik je snažan otrov koji blokira citokrom-oksidadzu što dovodi do inhibicije staničnog disanja. Sudjeluje u razaranju tkiva i doprinosi toksičnosti bakterije (5).

### 3.3. Biofilm

Biofilm je izrazito raširen način oblika života mikroorganizama u okolišu. *P. aeruginosa* stvara guste i postojane biofilmove na biotičkim i abiotičkim površinama koji mu omogućuju preživljavanje unatoč promjeni životnih uvjeta (varijacije temperature i dostupnost hranjivih tvari). Biofilm stvara 40-100% izolata *Pseudomonasa*, a postoji značajna korelacija između formacije biofilma i antibiotske rezistencije (7,8). Biofilm je složeni agregat bakterija smještenih u samonastalom matriksu izvanstaničnih polimera (polisaharidni polimeri čine više od 90% biomase biofilma). Bakterije unutar biofilma mogu međusobno komunicirati, izbjeći imunološki odgovor domaćina i oduprijeti se antibioticima do tisuću puta bolje nego samostalne bakterije. Biofilm pruža zajednicu za njihovu hranjive tvari kao što su esencijalne hranjive tvari, enzimi i proteini. *P. aeruginosa* često sukolonizira s drugim bakterijama kao što su *S. aureus*, *Burkholderia cenocepacia* i *S. parasanguinis*.

### 3.3.1. Građa biofilma

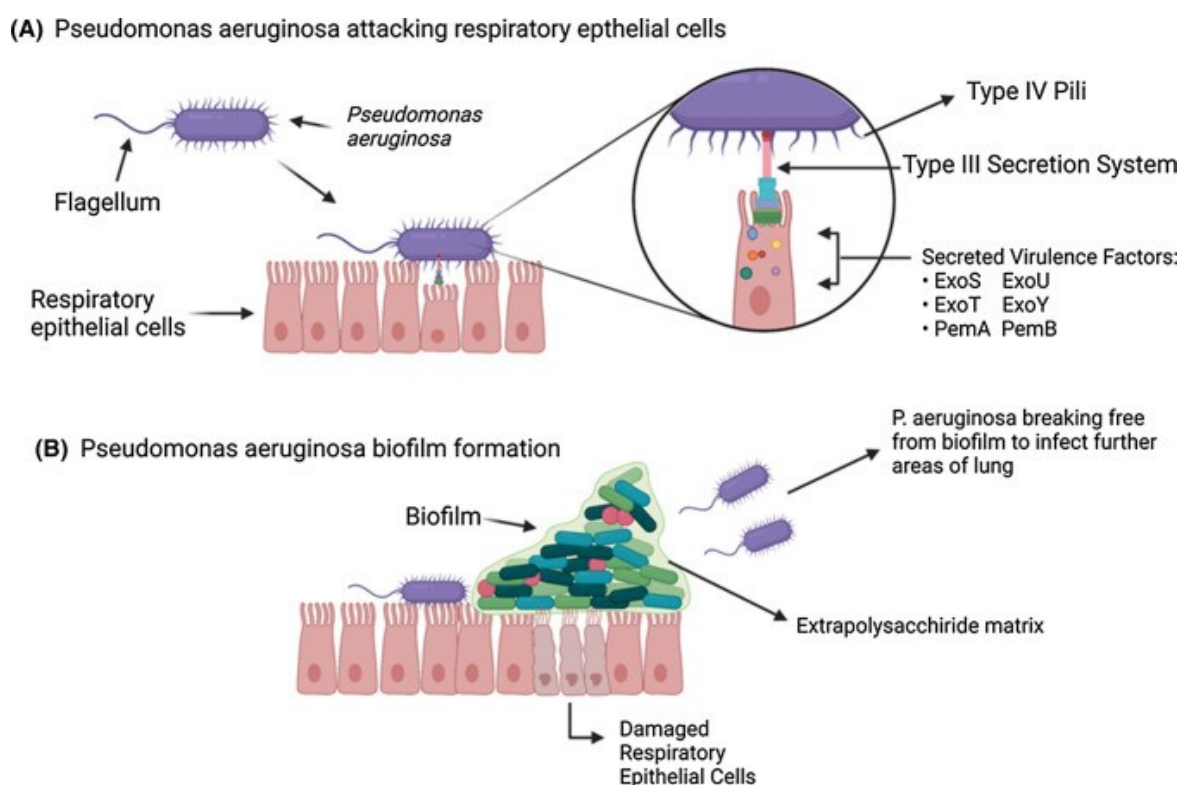
Biofilmovi *P. aeruginosa* sastoje se od polisaharida, izvanstanične DNA, proteina i lipida. Tri polisaharida - Psl, Pel i alginat odgovorni su za prijanjanje na površine, formiranje i stabilnost arhitekture biofilma. **Polisaharid Psl** je neophodan za adheziju na površine, interakciju između stanica tijekom stvaranja biofilma i zaštitu od antimikrobnih sredstava i fagocitoze neutrofila. **Polisaharid Pel** je važna komponenta biofilma uključena u ranu fazu adhezije i održavanja integriteta biofilma (5,7). Sinteza Psl i Pel je specifična za soj, no može se mijenjati ovisno o odgovoru na vanjske uvjete. Pel je odgovoran za toleranciju bakterija na aminoglikozide, za rezistenciju na kolistin i smanjenu osjetljivost na ubijanje posredovano neutrofilima.

**Alginat** pretežno proizvode mukoidni sojevi pseudomonasa zbog mutacije u alelu *mucA22* (7). Takvi su klonovi pretežno prisutni u kliničkim uzorcima osoba oboljelih od CF. Alginat je polimer koji se sastoji od manuronske i guluronske kiseline čiji omjer određuje viskoznost biofilma. Dokumentiran je širok raspon funkcija alginata uključujući sazrijevanje biofilma, zaštitu od fagocitoze i opsonizacije te smanjenje difuzije antibiotika kroz biofilm.

**Izvanstanična DNA** (engl. extracellular, eDNA) je jedan od ključnih sastojaka izvanstaničnog matriksa. Nakon lize stanica oslobađa se u okoliš i kao eDNA postaje izvor hranjivih tvari bakterijama u biofilmu te podržava staničnu organizaciju. eDNA kalcijev (Mg<sup>2+</sup> i Ca<sup>2+</sup>) na vanjskoj membrani, dovodi do izlučivanja čimbenika virulencije i snižavanja pH što dodatno ograničava prodor antimikrobnih sredstava. **Biopolimer polihidroksialkanoat (PHA)** služi kao skladište ugljika i energije, a također je uključen u toleranciju bakterija na stres i pričvršćivanje za nežive površine (7,8).

### 3.3.2. Ciklus nastanka biofilma *P. aeruginosa*

Ciklus započinje vezanjem bakterije za površinu i proizvodnjom izvanstaničnog matriksa (Slika 1). Zatim dolazi do diobe stanice i prijelaza reverzibilne povezanosti u ireverzibilnu. Sljedeći korak je stvaranje mikrokolonija i daljnji razvoj mikrokolonija u gljivolike strukture. Međustanična interakcija i proizvodnja čimbenika virulencije imaju važnu ulogu u sazrijevanju biofilma. Autolizom stanica u središtu mikrokolonije nastaje šupljina koja omogućava oslobađanje raspršenih jedinki iz matriksa zrelog biofilma. Potrebno im je otprilike dva sata za prijelaz u planktonski način života(7).



Slika 1. Činitelji virulencije i nastanak biofilma u *P. aeruginosa* infekciji

(Izvor: Reynolds i sur. 2021) (9)

### 3.3.3. Komunikacija unutar biofilma

Regulacija različitih procesa važnih za prilagodbu i opstanak bakterija u okolišu, kao što je stvaranje biofilma, kontrolirana je međustaničnom komunikacijom (engl. quorumsensing, QS). QS se temeljina reguliranju ekspresije različitih gena kao odgovor na autoinduktore, male difuzibilne signalne molekule. QS uključuje proizvodnju, izlučivanje i akumulaciju signalnih molekula čiju specifičnost i koncentraciju registriraju transkripcijski regulatori što za posljedicu ima ekspresiju specifičnih gena na razini cijele populacije. Dakle, međustanična se komunikacija zasniva na tri principa:

- Proizvodnji autoinduktora
- Detekciji autoinduktora receptorima u citoplazmi ili na membrani stanica
- Aktivaciji genske ekspresije

QS omogućava bakterijama da komuniciraju i orkestriraju kolektivno ponašanje važno za prilagodbu i opstanak cijele zajednice. Osim za razvoj biofilma, QS je odgovoran za regulaciju fizioloških procesa uključujući proizvodnju čimbenika virulencije, toleranciju na stres, metaboličku prilagodbu i interakciju s domaćinom.

*P. aeruginosa* posjeduje nekoliko važnih i hijerarhijski organiziranih QS putevaka koji koriste različite signalne molekule – IQS sustav (eng. Integrated Quorum Sensing System), PQS sustav (eng. *P. aeruginosa* Quinolone Signal), Rhl i Las sustav. Las i Rhl sustavi se pokreću povećanjem gustoće stanica u ranoj fazi rasta, dok se PQS i IQS sustavi aktiviraju u kasnoj fazi rasta, posebno u uvjetima niskih koncentracija željeza i fosfata. Sustavi Las, Rhl i PQS u QS komunikacijskoj mreži *P. aeruginosa* imaju važnu ulogu u proizvodnji funkcionalnih elemenata koji utječu na biofilm što uključuje ramnolipid, pioverdin, piocijanin, Pel polisaharide i lektine (7).



#### 4. EPIDEMIOLOGIJA

Vrste roda *Pseudomonas* nalaze se posvuda u prirodi, na biljkama, tlu i vodama. *P. aeruginosa* je proširen i u bolničkom okruženju te je jedan od najčešćih uzročnika bolničkih infekcija. Bakterija može rasti u dezinficijensima, kremama, sapunu, kapima za oči, opremi za dijalizu, ovlaživačima zraka, sanitarnim odvodima, umivaonicima, hidroterapijskim bazenima što ga čini ubikvitarnim bolničkim patogenom(1,10). Nedavnim preispitivanjem njegove prisutnosti u okolišu ustanovljeno je kako se *P. aeruginosa* općenito rijetko otkriva u nekontaminiranom tlu i vodi. Znatno je češće otkriven u okruženjima pod ljudskim utjecajem što sugerira da je prisutnost *P. aeruginosa* usko povezana s čovjekovim djelovanjem, a ljudski i životinjski izmet se smatraju prirodnim rezervoarom bakterija (11). Izolacija pseudomonasa iz okoliša, kao što je npr. bolnički sudoper ili pod, nije od kliničkog značaja osim ako kontaminirano mjesto nije rezervoar bolničke infekcije. Izolacija pseudomonasa iz kliničkog uzorka hospitaliziranog bolesnika može predstavljati kolonizaciju (najčešće probavnog sustava, nazalne sluznice i pregiba kože). Dodatan dijagnostički problem predstavlja mogućnost kontaminacije uzorka ovom ubikvitarnom bakterijom, do koje može doći tijekom sakupljanja i obrade kliničkih uzoraka.

Bolesnici s visokim rizikom za razvoj infekcija su neutropenične ili imunokompromitirane osobe, oboljeli od CF, bolesnici s opeklinama, bolesnici koji primaju antibiotike širokog spektra te bolesnici na umjetnoj ventilaciji. U takvih bolesnika pseudomonas može kolonizirati i donje dijelove respiratornog sustava (10,11).

## 5.KLINIČKE MANIFESTACIJE

Infekcije pseudomonasom mogu zahvatiti bilo koji organski sustav. Pseudomonas je čest uzročnik bolničkih infekcija koje se manifestiraju kao upala pluća, infekcija mjesta kirurškog zahvata, infekcija mokraćnog sustava ili sepsa. Rizični čimbenici za stjecanje infekcije navedeni su u Tablici 1.

Tablica 1. Rizični čimbenici za nastanak *P. aeruginosa* infekcije

---

Prethodna kolonizacija <i>P. Aeruginosa</i>
Strukturne bolesti pluća (cistična fibroza, bronhiektazije)
Hematološke bolesti/ neutropenija
Transplantacije
Opekline
Prethodna antimikrobna terapija unutar 90 dana
Prisutnost katetera (vaskularnih i/ ili urinarnih)
Produljena hospitalizacija
Mehanička ventilacija

---

(Izvor: Reynolds i sur. 2021)(9)

### 5.1. Infekcije respiratornog sustava

Infekcije dišnih puteva uzrokovane pseudomonasom mogu imati kliničku sliku u rasponu od asimptomatske kolonizacije preko traheobronhitisa do teške nekrotizirajuće bronhopneumonije (9). Pneumonija se obično razvija u bolesnika na mehaničkoj ventilaciji, imunokompromitiranih bolesnika i u osoba s kroničnom plućnom bolešću. Pseudomonas je čest uzročnik bolničkih pneumonija, osobito u bolesnika smještenih u jedinicama intenzivne skrbi. Upala pluća može biti primarna,

nakon aspiracije organizma iz gornjih dišnih puteva, osobito u bolesnika na mehaničkoj ventilaciji ili se može pojaviti kao posljedica bakterijemijeskog širenja. To se često opaža u bolesnika nakon neutropenije izazvane kemoterapijom ili u oboljelih od sindroma stečene imunodeficijencije (engl. Acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) (12). Simptomi u bolesnika s cističnom fibrozom variraju od čestih infekcija gornjih dišnih puteva i trajnog kašlja do ponavljajućih pneumonija. Većina bolesnika razvija kronični produktivni kašalj, slabijeg su apetita, gube na težini i smanjene su tjelesne aktivnosti. Ostali simptomi uključuju tahipneju i razdražljivost. Niska tjelesna temperatura često prati egzacerbacije bolesti dok je visoka neuobičajena. Dokazi sugeriraju da kronična infekcija pluća ima ulogu u razvoju bronhiektazija (13).

#### 5.1.1. *Pseudomonas* i bronhiektazije

*P. aeruginosa* je među najčešćim patogenima izoliranim iz iskašljaja bolesnika s bronhiektazijama, a njegova je izolacija jedan od kriterija za procjenu težine bronhiektazija. Mnoga istraživanja bilježe povezanost kolonizacije *P. aeruginosa* s jačinom upale, većim oštećenjem plućne funkcije, s više egzacerbacija bolesti, pogoršanjem kvalitete života bolesnika s bronhiektazijama te većom stopom smrtnosti. U kroničnoj infekciji u izoliranih uzročnika su uočene promjene genske regulacije. Dolazi do gubitka pokretljivosti, smanjenje produkcije čimbenika virulencije i povećanja rezistencije na antibiotike. Istraživanja su pokazala različite fenotipove kao i genotipove sojeva ovisno o vrsti bolesti - CF ili bronhiektazijama. Kod bronhiektazija moguća je i spontana eradikacija bakterija, što se rijetko događa kod CF. Eradikacija bakterije korelira s boljom prognozom bolesti (14).

### 5.1.2. Pseudomonas i COVID-19

Metaanaliza iz 2020. god. kojom je obuhvaćeno 30 različitih studija, pokazala je da oko 7% hospitaliziranih COVID-19 bolesnika imabakterijsku koinfekciju (15). Postotak je rastao do 14% slučajeva koinfekcije u studijama koje su obuhvatile isključivo bolesnike smještene u jedinicama intenzivne njege. Ipak, istraživanja pokazuju da su bakterijske koinfekcije manje zastupljene u bolesnika s COVID-19 nego u bolesnika s gripom. Bakterije koje najčešće uzrokuju superinfekciju u bolesnika oboljelih od gripe su one koje obično koloniziraju nazofarinks, kao što su *S. pneumoniae*, *S. aureus* i *S. pyogenes*, dok su najčešći bakterijski patogeni izolirani u COVID-19 bolesnika *Mycoplasma pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* i *K. pneumoniae* (15).

### 5.2. Bakterijemija i sepsa

Većina pseudomonasnih bakterijemija potječe od infekcije donjih dišnih puteva, mokraćnog sustava, te kože i mekih tkiva. Klinički simptomi bakterijemije i sepse su groznica, tahipneja i tahikardija, a mogu se razviti žutica, hipotenzija i šok (12). Povećan rizik za razvoj pseudomonasne bakterijemije i sepse imaju osobe oslabljenog imuniteta (uključujući novorođenčad), osobe koje su dugo vremena hospitalizirane, koje su dugotrajno primale antibiotike ili imaju trajne katetere (13).

### 5.3. Endokarditis

*P. aeruginosa* može inficirati prirodne i umjetne srčane zaliske. Pojavnost je češća u intravenskih ovisnika. Najčešći nespecifični simptomi infekcije uključuju

vrućicu i groznicu. Specifični simptomi ovise o strani srca koja je zahvaćena pa će se tako npr. lijevostrani endokarditis manifestirati simptomima kongestivnog zatajenja srca i septičkom embolijom. Može se razviti novi srčani šum ili promijeniti karakter postojećeg, iako šum nužno ne prati endokarditis. Klinički znakovi uključuju pojavu Rothovih mrlja, Janewayeve lezija, Oslerovih čvorića, petehijalna krvarenja i splenomegaliju (12,13).

#### 5.4. Infekcije središnjeg živčanog sustava (SŽS)

Većina infekcija SŽS ima za izvorište okolne strukture, kao što su uho, mastoidni nastavci i paranazalni sinusi. U nekih bolesnika zahvaćenost SŽS-a je posljedica hematogenog širenja mikroorganizama iz inficiranih srčanih zalistaka, koloniziranih dišnih putova ili urinarnog trakta. Bolesnici mogu razviti meningitis ili moždani apsces, a prezentiraju se groznicom, fotofobijom, kočenjem šije, letargijom, dezorijentacijom, komom, ataksijom, glavoboljom i smetenošću. Početak može biti fulminantan ili subakutan, što je često ovisno o imunološkom statusu bolesnika. Znakovi infekcija SŽS-a u novorođenčadi često su nespecifični i suptilni kao što su groznica, hipotermija, letargija, napadaji, razdražljivost, ispupčena fontanela, respiratorni distres, netolerancija na hranjenje, povraćanje (12,13).

#### 5.5. Infekcije uha

Pseudomonas uzrokuje upalu vanjskog zvukovoda (lat. *otitis externa*) koja se manifestira bolovima, svrbežom i iscjetkom iz uha. Bol se pogoršava pritiskom na tragus. Nekrotizirajući vanjski otitis (lat. *otitis externa maligna*) je invazivna infekcija

koja se opaža u bolesnika s nekontroliranim dijabetesom ili AIDS-om. Više od 95% slučajeva malignog vanjskog otitisa uzrokuje *P. aeruginosa*. Infekcija počinje kao obična upala vanjskog zvukovoda koja ne reagira na terapiju antibioticima. Simptomi su trajna bol, edem i osjetljivost mekih tkiva uha s gnojnim iscjetkom, a bubnjić može rupturirati. Moguća je lokalna limfadenopatija. Proširenje infekcije na temporalnu kost može dovesti do osteomijelitisa baze lubanje i osteomijelitisa temporomandibularnog zgloba, daljnje proširenje može dovesti do paralize kranijalnih živaca i infekcije središnjeg živčanog sustava. Djeca s malignim vanjskim otitisom imaju veću učestalost facijalne paralize zbog nerazvijenosti mastoidnog nastavka te bližeg položaja facijalnog živca zvukovodu. Od kranijalnih živaca mogu biti zahvaćeni glosofaringeus, vagus, akcesorius i hipoglosus, rijede trigeminalni živac, a zabilježena je i zahvaćenost vidnog živca (12,13).

## 5.6. Infekcije oka

Ozljeda oka te ulazak pseudomonasa (najčešće preko kontaminirane vode) u rožnicu, očnu vodicu i staklasto tijelo dovodi do progresivne i destruktivne lezije oka za što su odgovorni mnogobrojni enzimi bakterije. *P. aeruginosa* je čest uzrok keratitisa, skleralnog apscesa i endoftalmitisa u odraslih te oftalmije u novorođenčadi. Pseudomonas keratitis je brzo razvijajući, nekrotičan, sivkasti stromalni infiltrat.

Progresija bolesti može biti brza i zahvatiti cijelu rožnicu unutar 48 h i dovesti do perforacije. Pseudomonasni ulkusi rožnice mogu dovesti do brzog gubitka vida i smatraju se hitnim medicinskim stanjem. Lezije rožnice mogu napredovati u endoftalmitis i orbitalni celulitis. Pseudomonasni endoftalmitis napreduje brže od drugih bakterijskih infekcija. Kliničke značajke mogu uključivati bol, hiperemiju

konjunktive, kemozu, edem kapaka, smanjenu vidnu oštrinu, hipopion ili teški prednji uveitis sa zahvaćenošću staklastog tijela i panoftalmitisom. Predisponirajući uvjeti za zahvaćenost rožnice su trauma, korištenje kontaktnih leća, izloženost okruženju intenzivnog liječenja i AIDS (12,13).

#### 5.7. Infekcije kostiju i zglobova

Najčešće zahvaćena mjesta skeleta su kralješci, zdjelica i sternoklavikularni zglobovi. Infekcija se može prenositi krvlju ili nastati lokalno kao posljedica traume ili kirurškog zahvata. U rizične skupine spadaju bolesnici s perifernom vaskularnom bolešću, intravenski ovisnici ili oboljeli od šećerne bolesti. Vertebralni osteomijelitis može zahvatiti vratnu kralježnicu, a bolesnici imaju bolove u vratu ili leđima koji traju tjednima. Fizički znakovi u bolesnika s vertebralnim osteomijelitisom uključuju lokalnu osjetljivost i smanjen raspon pokreta kralježnice. Prisutni neurološki deficiti upućuju na zahvaćenost leđne moždine, a obično su blagi i javljaju se u otprilike 15% slučajeva (12,13). Čest je osteohondritis kod penetrantnih ozljeda stopala (9).

#### 5.8. Infekcije probavnog sustava

Iako je pseudomonas rijetko dio normalne mikrobiote crijeva, u hospitaliziranih bolesnika kolonizacija crijeva iznosi do 20%. Pseudomonasne infekcije mogu zahvatiti svaki dio probavnog sustava, a javljaju se u djetes hipogamaglobulinemijom i odraslih odoba s hematološkim malignomima i neutropenijom. Kolonizacija gastrointestinalnog sustava prethodi diseminaciji bakterije u krvotok i nastanku sepse. Simptomi Šangajske groznice, infektivnog sindroma koji uključuje groznicu, proljev i sepsu, mogu varirati od vrlo blagih do teškog nekrotizirajućeg stanja (11).

## 5.9. Infekcije mokraćnog sustava

Pseudomonasne urinarne infekcije obično se stječu tijekom hospitalizacije, a najčešće su povezane s kateterizacijom, dijagnostičkim ili operativnim zahvatom. Infekcije mogu zahvatiti urinarni trakt i širiti se uzlazno, a čest su izvor bakterijemije. Nema posebnih karakteristika koje razlikuju ovu vrstu infekcije od drugih urinarnih infekcija. Rijetka iznimka je razvoj ulceroznih lezija sluznice mokraćnog mjehura, uretera i bubrežne nakapnice, dok je druga, također vrlo rijetka karakteristika razvoj višestrukih infarkta bubrega (13).

## 5.10. Infekcije kože

Pseudomonas znatno lakše kolonizira vlažnu kožu nego suhu. Sindrom zelenih noktiju je paronihija koja se može razviti kod osoba čije su ruke često uronjene u vodu. Sekundarne infekcije rana javljaju se u bolesnika s dekubitisom, ekcemom i tineom. Ove infekcije mogu imati karakterističan modro-zeleni eksudat sa slatkastim voćnim mirisom. Pseudomonas je čest uzrok folikulitisa koji se javlja nakon kupanja u kadi ili bazenu. Bolesnici imaju pruritične folikularne, makulopapulozne, vezikularne ili pustularne lezije na dijelu tijela koji je bio uronjen u vodu.

Pseudomonasna bakterijemija u bolesnika s neutropenijom praćena je karakterističnim lezijama kože poznatim kao *ecthyma gangrenosum*. Eritematozne promjene su hemoragične, nekrotične i ulcerirane, obično se nalaze aksilarno, ingvinalno ili perianalno, ali mogu zahvatiti bilo koji dio tijela (12). Mikroskopski pregled bioptata lezije pokazuje mnogo bakterija i vaskularnu destrukciju, što objašnjava hemoragičnu prirodu lezija uz odsutnost neutrofila što je i za očekivati u neutropeniji (10). Mogu se pojaviti i potkožni čvorići, duboki apscesi, celulitis i



fasciitis. *Pseudomonas* je značajan uzročnik sepse podrijetla opeklinskih rana. Inficirane rane obično imaju crnu ili ljubičastu diskoloraciju. Sustavne manifestacije sepse u bolesnika s opeklinama mogu uključivati pojavu groznice ili hipotermije, dezorijentaciju, hipotenziju, oliguriju, ileus i leukopeniju (12).

## 6. LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Odabir kliničkog uzorka za mikrobiološku dijagnostiku predodređen je mjestom infekcije. Budući da *Pseudomonas* uzrokuje infekcije različitih tkiva i organa klinički uzorci mogu biti obrisci kože ili rane, urin, krv, likvor, iskašljaj, aspirat traheje, bronho-alveolarni lavat i drugi. Bakterija je jednostavna za uzgoj, raste na uobičajenim krutim hranjivim podlogama kao što su krvni agar ili na selektivnim podlogama za uzgoj enterobakterija. Neki sojevi hemoliziraju krv. Bez nitrata u podlozi neophodna im je aerobna atmosfera za uzgoj. U tekućoj hranjivoj podlozi vidljiv je rast na granici sa zrakom zbog viših koncentracija kisika (1). *P. aeruginosa* tvori glatke, plosnate i okrugle kolonije fluorescentne zelenkaste boje i metalnog odsjaja, mirisa sličnog lipi. Često proizvodi nefluorescentni plavkasti pigment pircijanin, koji difundira u agar. Mnogi sojevi *P. aeruginosa* također proizvode fluorescentni pigment pioverdin koji daje žuto-zelenkastu boju agaru. Neki sojevi proizvode tamnocrveni pigment piorubin ili crni pigment piomelanin. Pigmente je najlakše uočiti na bezbojnim podlogama kao što su obični hranjivi agar ili Muller-Hintonov agar. *P. aeruginosa* uzgojen na krutom hranilištu može proizvesti različite kolonije koje mogu imati različitu biokemijsku i enzimsku aktivnost te osjetljivost na antibiotike. Kulture izolirane iz kliničkih uzoraka pacijenata s cističnom fibrozom često stvaraju mukoidne kolonije zbog prekomjerne proizvodnje alginata. Bakterija raste aerobno pri temperaturi 37-42°C. Biokemijska karakteristika koja razlikuje *Pseudomonas* od enterobakterija je izostanak fermentacije šećera te pozitivna reakcija oksidaze. Iako *Pseudomonas* ne fermentira ugljikohidrate, mnogi sojevi oksidativno razgrađuju glukozu (4). Dodatne, preciznije metode identifikacije ovog uzročnika su serotipizacija poraslih kolonija metodom aglutinacije primjenom komercijalnih seruma čime se može razlikovati oko 20 serotipova. Ipak, najtočnije razlikovanje sojeva dobiva se molekularnim metodama

kao što je cijepanje genoma restrikcijskim enzimima i elektroforezau gelu u pulsirajućem polju (1).

Manualnim ili automatiziranim biokemijskim metodama identifikacije često nedostaje osjetljivost i specifičnost, a vrijeme koje je potrebno za izdavanje nalaza (24h-48h) često rezultira kašnjenjem s uvođenjem antibiotske terapije. Stoga se u novije vrijeme u laboratorijskoj praksi biokemijske metode identifikacije sve više zamjenjuju analizom proteina bakterija masenom spektrometrijom (engl, matrix-assisted laser desorptionionization time-of-flightmassspectrometry, MALDI-TOF MS). Iako je MALDI-TOF metoda brza i pouzdana, visoka cijena uređaja usporava njezino uvođenje u kliničke mikrobiološke laboratorije u Republici Hrvatskoj (RH).

Molekularne metode omogućavaju postavljanje dijagnoze unutar dva sata, a u kliničkim mikrobiološkim laboratorijima sve se više primjenjuje lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (eng. real-time polymerase chain reaction, RT-PCR). Sindromsko testiranje tzv. Multipleks RT-PCR panelima omogućava istovremenu detekciju većeg broja različitih patogena koji uzrokuju istu kliničku sliku (sindrom). *Pseudomonas* je tako uključen u pneumonija panel i sepsa panel budući da je jedan od češćih uzročnika ovih sindroma u hospitaliziranih bolesnika.

Ipak, važno je imati na umu da molekularne metode daju podatak o prisutnosti genetskog materijala, a ne i o prisutnosti/broju vijabilnih bakterijskih stanica što može značiti i kolonizaciju (npr. dišnih putova ili rane) te je stoga važno provoditi molekularno testiranje samo ako postoji čvrsta klinička indikacija.

## 7. ANTIMIKROBNA TERAPIJA I REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE

### 7.1. Prevencija i kontrola *P. aeruginosa* infekcija

Jedan od najvažnijih aspekata kontrole infekcija *P. aeruginosa* je prevencija. Postoji niz preporuka i smjernica za sprječavanje širenja rezistentnih sojeva *P. aeruginosa* i drugih gram-negativnih bacila, koje uključuju i standardne mjere kao što su higijena ruku i oprez pri kontaktu s bolesnikom (9). Smjernice za zdravstveno osoblje sadrže preporuke o indikacijama za higijenu ruku, tehniku higijene ruku, kiruršku pripremu ruku, odabir sredstava za higijenu ruku, njegu kože, noktiju, upotrebu rukavica, higijenu ruku bolesnika i posjetitelja, ulogu edukacije, ulogu zdravstvene ustanove i državne uprave. Pristup „Pet trenutaka za higijenu ruku“ definira kritične trenutke kada zdravstveni djelatnici trebaju provoditi higijenu ruku (16).

Druge relevantne mjere koje mogu smanjiti učestalost i širenje višestruko rezistentnih sojeva *P. aeruginosa* uključuju antimikrobne programe, čišćenje okoliša i postupke dekolonizacije. Prevencija pneumonija može se postići izbjegavanjem intubacije bolesnika kada je to moguće, dnevnom procjenom za ekstubaciju, minimaliziranjem sedacije i podizanjem uzglavlja bolesničkog kreveta. Prevencija infekcija povezanih sa zdravstvenom skrbi odnosi se na infekcije povezane s kateterizacijom mokraćnog mjehura ili centralnih vena, kao i na infekcije mjesta kirurških rana, a postiže se aseptičkim uvjetima rada, čestim ponovnim procjenama za potrebom centralnog venskog i urinarnog katetera te njihovim uklanjanjem. Najučinkovitija kombinacija mjera za sprječavanje razvoja višestruko rezistentnih gram negativnih infekcija u JIL-u obuhvaća standardne mjere (higijenu ruku i mjere opreza pri kontaktu), programe upravljanja antimikrobnom terapijom, čišćenje okoliša i kontrolu izvora zaraze (9).

Program upravljanja antimikrobnom terapijom sustavno je nastojanje da se educiraju osobe koje propisuju antibiotike te da slijede propisivanje utemeljeno na dokazima kako bi se spriječila prekomjerna upotreba i razvoj rezistencije. Koncept rezervnih antibiotika (cefalosporini III generacije, karbapenemi, novije kombinacije  $\beta$ -laktama s inhibitorima  $\beta$ -laktamaza i dr.) se primjenjuje u mnogim bolničkim ustanovama, a podrazumijeva primjenu rezervnog antibiotika samo u slučaju rezistencije uzročnika na prvu liniju lijekova ili neuspjeha prethodne terapije. Prevenciji razvoja i širenja otpornih sojeva bakterija u bolničkoj sredini doprinosi i rotacija antibiotika u upotrebi. Ovaj se pristup zasniva na unaprijed napravljenom rasporedu, a podrazumijeva korištenje određenog antibiotika kao prve linije liječenja u određenom razdoblju nakon čega se mijenja antibiotikom druge klase, sličnog spektra djelovanja. Ovi se ciklusi izmjenjuju u jednakim vremenskim periodima (9).

## 7.2. Antibiotičko liječenje *P. aeruginosa* infekcija

Infekcije koje ova bakterija uzrokuje teško je izliječiti zbog izrazite prirodene i stečene rezistencije na antibiotike. *P. aeruginosa* jedna je od "ESKAPE" bakterija uz *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* i *Enterobacter* vrste. Akronim obuhvaća šest višestruko otpornih bakterija, najčešćih uzročnika bolničkih infekcija. *P. aeruginosa* nalazi se i na prioritetnom SZO popisu bakterija za koje je potreban hitni razvoj novih antibiotika. *P. aeruginosa* je bakterija intrinzično otporna na širok spektar antibiotika, a ima naglašenu sposobnost prilagodbe na nepovoljne uvjete okoliša.

Nekoliko skupina antibiotika koristi se za liječenje infekcija koje uzrokuje *P. aeruginosa*: aminoglikozidi (gentamicin, amikacin, netilmicin, tobramicin),

karbapenemi (imipenem, meropenem, doripenem), karbapenemi s inhibitorima  $\beta$ -laktamaza (imipenem s relebaktamom), cefalosporini (ceftazidim, cefepim, cefiderokol), cefalosporini s inhibitorima  $\beta$ -laktamaza (ceftazidim-avibaktam, ceftolozan-tazobaktam), fluorokinoloni, penicilini s inhibitorima  $\beta$ -laktamaze (tikarcilin-klavulanska kiselina, piperacilin-tazobaktam), monobaktami (aztreonam) i polimiksini (kolistin) (17). Karbapenemi, cefalosporini, aminoglikozidi i fluorokinoloni općenito se koriste kao empirijska - prva linija liječenja (2). Aminoglikozidi se obično koriste u kombinaciji s  $\beta$ -laktamimata se ne bi trebali koristiti kao monoterapija osim za liječenje nekompliciranih urinarnih infekcija. Aminoglikozid tobramicin ima izraženu antipseudomonasnu aktivnosti te se u obliku inhalacija koristi za liječenje kroničnih infekcija pluća u oboljelih od CF. Fluorokinoloni su jedina skupina antibiotika čija oralna formulacija ima djelovanje protiv pseudomonasa. Karbapenemi, osobito imipenem, primijenjeni u monoterapiji imaju sposobnost indukcije rezistencije za vrijeme trajanja terapije. Stoga empirijsko liječenje pseudomonasnih infekcija često uključuje kombiniranu terapiju s dva lijeka s različitim mehanizmima djelovanja, obično  $\beta$ -laktam i aminoglikozid (9). Primjena novijih antibiotika ograničena je na bolničke ustanove i liječenje infekcija uzrokovanih višestruko rezistentnim sojevima. Višestruko rezistentne bakterije su definirane kao bakterije koje su stekle rezistenciju na barem jednog predstavnika iz tri ili više različitih skupina antibiotika (10). Novi antibiotik cefiderokol te kombinacije kao što su cefalosporin ili karbapenem s inhibitorima  $\beta$ -laktamaza (ceftolozan-tazobaktam i ceftazidim-avibaktam, imipenem-relebaktam) sve se češće koriste za liječenje infekcija uzrokovanih višestruko rezistentnim izolatima, dok je primjena starog polimiksinog antibiotika kolistina sverjeđ zbog značajnih nuspojava (10). Kolistin je rezerviran za liječenje teških

infekcija uzrokovanih rezistentnim sojevima kada se obično daje s drugim antibioticima i to obično u višim inicijalnim dozama od standardnih.

Antibiotici koji se koriste za liječenje pseudomonasnih infekcija prikazani su u Tablici 2. Doze se odnose na primjenu u bolesnika s normalnom bubrežnom funkcijom. U bolesnika s oslabljenom bubrežnom funkcijom doze je potrebno prilagoditi.

Tablica 2. Antibiotici koji se koriste za liječenje pseudomonasnih infekcija

Skupina	Lijek	Doza
<b>Penicilin s inhibitorom <math>\beta</math> laktamaze</b> <b>Cefalosporini</b>	Piperacilin-tazobaktam	4.5 g IV svakih 6 h
	Ceftazidim	2 g IV svakih 8 h
	Cefepim	2 g IV svakih 8 ili 12 h
	Cefiderokol	2 g IV svakih 6-8 h
<b>Monobaktami</b>	Aztreonam	2 g IV svakih 8 h
<b>Fluorokinoloni</b>	Ciprofloksacin	IV ili PO 400 mg svakih 8-12 h
	Levofloksacin	750 mg IV ili jednom dnevno PO
<b>Karbapenemi</b>	Meropenem	1 g IV svakih 8 h
	Imipenem	500 mg IV svakih 6 h
<b>Nove kombinacije <math>\beta</math>-laktama s inhibitorima <math>\beta</math>-laktamaza</b>	Ceftazidim-avibaktam	2.5 g IV svakih 8 h
	Ceftolozan-tazobaktam	1.5 - 3 g IV svakih 8 h
	Imipenem-cilastatin-relebaktam	1.25 g IV svakih 6 h
<b>Aminoglikozidi</b>	Tobramicin	IV 7 mg/kg dnevno
	Gentamicin	IV 7 mg/kg dnevno
	Amikacin	IV 20 mg/kg dnevno
<b>Polimiksini</b>	Kolistin	IV 2.5 - 5 mg/kg dnevno podijeljeno u 2-4 doze

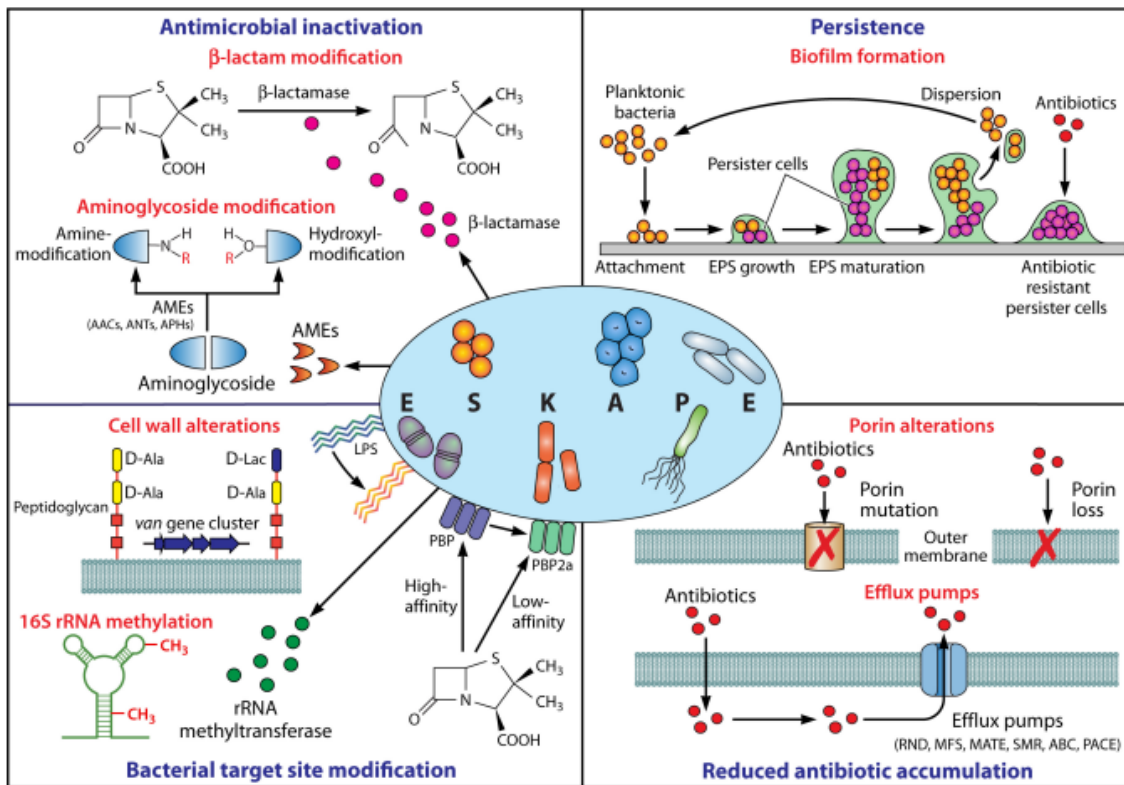
Kratice: IV=intravenski, PO=peroralno (Izvor: Reynolds i sur. 2021) (9)

### 7.3. Mehanizmi rezistencije *P. aeruginosa* na antibiotike

U nastanku antibiotske rezistencije bitnu ulogu ima horizontalni prijenos gena, no spontana mutacija je glavni pokretač procesa. *P. aeruginosa* može razviti otpornost na širok spektar antibiotika, uglavnom zbog kombinacije intrinzične i stečene i/ili adaptivne rezistencije. Glavna intrinzična značajka *P. aeruginosa* je slaba propusnost vanjske membrane koja je u usporedbi s *E. coli* propusna svega 10%. Slaba propusnost bakterijske membrane, zajedno s proizvodnjom AmpC enzima te MexAB-OprM efluksne pumpe koje izbacuju antibiotike izvan bakterijske stanice doprinose intrinzično niskoj osjetljivosti *P. aeruginosa* na antibiotike (17).

Prilagodljivost genoma *P. aeruginosa* zasnovana na repertoaru regulatornih gena koji čine više od 8% njegovog genoma ključna je značajka u sposobnosti ovog patogena da kronično perzistira u domaćinu i izbjegne liječenje antibioticima (18). Kao i ostale ESKAPE bakterije, *Pseudomonas* može razviti rezistenciju na više ili čak na sve antibiotike nekim od poznatih mehanizama: inaktivacijom antibiotika, modifikacijom ciljnog mjesta, pojačanim efluksom, a metabolički inaktivne stanice u biofilmu su dodatno zaštićene od djelovanja antibiotika (Slika 2).





**Slika 2. Mehanizmi rezistencije ESKAPE patogena.** Enzimaska inaktivacija antibiotika, postojanost biofilma, modifikacija ciljnog mjesta, smanjeno nakupljanje antibiotika (promjene porina i efluks) (Izvor: De Oliveira i sur. 2020) (19)

### 7.3.1. Enzimima posredovana rezistencija

AmpC  $\beta$ -laktamaze su klinički značajne cefalosporinaze kodirane genima koji se nalaze na bakterijskom kromosomu. Posreduju razvoj otpornosti na cefazolin, cefoksitin, većinu penicilina i kombinacije  $\beta$ -laktama s inhibitorima  $\beta$ -laktamaza. Enzimi AmpC su inducibilni, a mutacija dovodi do pojačane ekspresije. Prekomjerna ekspresija enzima rezultira rezistencijom na cefalosporine širokog spektra, uključujući cefotaksim, ceftazidim i ceftriakson i predstavlja terapijski problem posebno kada je izolat u početku osjetljiv, a razvija rezistenciju tijekom terapije. Plazmidi koji sadrže gene za AmpC enzime se mogu pojaviti u bakterijama koje nemaju ili slabo

ekspimiraju kromosomski *bla<sub>AmpC</sub>* gen. Karbapenemi se obično mogu koristiti za liječenje infekcija uzrokovanih bakterijama koje proizvode AmpC β-laktamaze (20). Izloženost antibioticima ali i čimbenici okoliša mogu biti poticaj za pojačanu ekspresiju *ampC* gena i efluks pumpi. Osim AmpC enzima, *P. aeruginosa* ima druge dvije

β-laktamaze kodirane kromosomima koje utječu na bazalnu razinu osjetljivosti na β-laktame: β-laktamazu OXA-50 klase D i brojne metalobetalaktamaze (MBL) klase B (IMP, VIM, GIM, FIM, AIM, NDM). MBL su karbapenemaze koje mogu biti smještene na integronima, plazmidima, transpozonima ili kromosomu te prenosive na druge bakterije. Nadalje, valja spomenuti FosA enzime pseudomonasa koji su odgovorni za prirodenu rezistenciju bakterije na fosfomicin kao i specifične mutacije u genima *gyrA*, *gyrB*, *parC* i *parE* koji kodiraju DNA girazu i topoizomerazu IV, enzime čije lučenje rezultira razvojem rezistencije na fluorokinolone (20,21).

### 7.3.2. Efluksne pumpe

Mutacije na regulatornim genima efluksne pumpe, kao što su *nalC* i *nfxB*, mogu rezultirati pojačanim izbacivanjem antibiotika iz iste ili različitih skupina (β-laktami, fluorokinoloni i aminoglikozidi) što nazivamo pleiotropnom rezistencijom. S druge strane, razvoj rezistencije na kolistin u *P. aeruginosa* je složen proces u više koraka, koji vjerojatno nastaje mutacijom u najmanje pet neovisnihgenskih lokusa (17). Uz gene koji kodiraju AmpC, GyrA/GyrB i ParC/ParE enzime, važni su i oni koji kodiraju četiri efluksne pumpe MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexXY i MexEF-OprN. Ekspresija gena za MexAB-OprM efluksnu pumpu odgovorna je za nisku osjetljivost na gotovo sve β-laktame i fluorokinolone s izuzetkom imipenema. Prekomjerna ekspresija i/ili

modifikacija ove pumpe, uz brisanje specifičnih kromosomskih regija i mutacije koje dovode do modifikacije  $\beta$ -laktama, mogu potaknuti otpornost na  $\beta$ -laktamski antibiotik neovisnu o AmpC produkciji (17).

### 7.3.3. Propusnost vanjske membrane

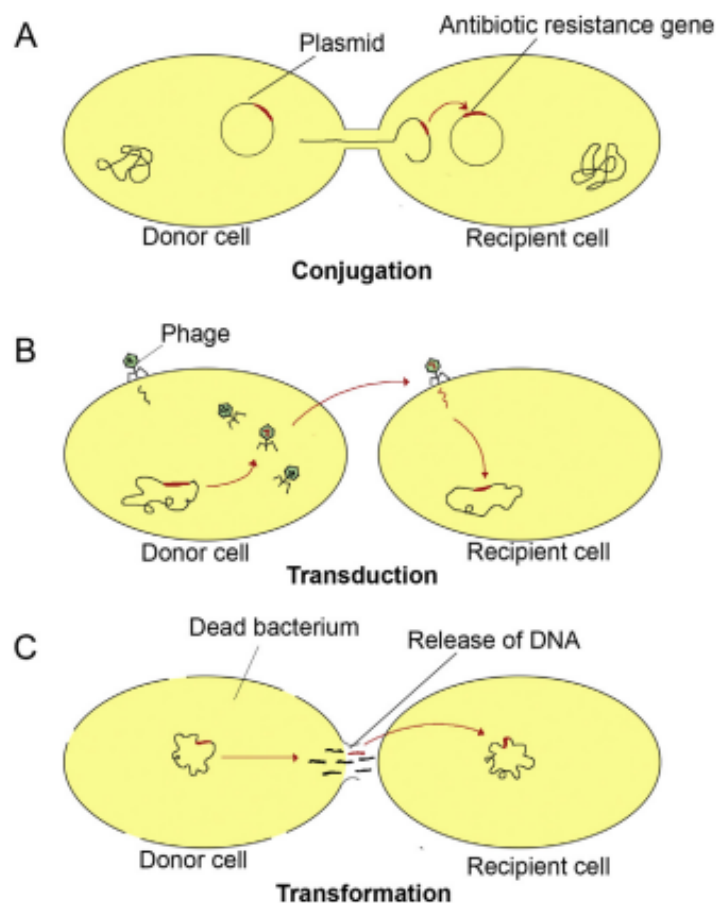
Većina antibiotika koji se koriste za liječenje pseudomonasnih infekcija moraju prodrijeti kroz staničnu membranu bakterijekako bi dosegli unutarstanične ciljeve. Aminoglikozidni antibiotici inhibiraju sintezu bakterijskih proteina vezanjem na ribosomske 30S podjedinice. Kinolonski antibiotici ometaju replikaciju DNA inhibirajući DNA girazu i topoizomerazu IV.  $\beta$ -laktamski antibiotici blokiraju biosintezu bakterijske stanične stijenke ciljajući na proteine koji vežu penicilin. Polimiksini se vežu na lipopolisaharide na vanjskoj membrani gram negativnih bakterija, što dovodi do povećane propusnosti stanične membrane i poboljšanog unosa antibiotika. Polimiksin B i polimiksin E, također poznat kao kolistin ubijaju bakterije indukcijom hidroksilnih radikala. Da bi ušli u stanicu bakterije,  $\beta$ -laktami i kinoloni prodiru u stanične membrane kroz porinske kanale, dok aminoglikozidi i polimiksini pospješuju vlastiti unos interakcijom s bakterijskim LPS-om na vanjskoj membrani gram-negativnih bakterija. Vanjska membrana *P. aeruginosa* i ostalih gram-negativnih bakterija djeluje kao selektivna barijera za prodor antibiotika, sačinjena od fosfolipidnog dvosloja i LPS-a s ugrađenim porinima koji tvore proteinske kanale. Porine se može podijeliti u četiri klase: nespecifični porini koji omogućuju sporu difuziju većine malih hidrofilnih molekula, specifični porini koji posjeduju specifična mjesta za vezanje određenog skupa molekula, zatvorene porine koji su ionski regulirani i odgovorni su za unos ionskih kompleksa i efluksne porine koji su važne

komponente efluksnih pumpi. U *P. aeruginosa*, protein OprF je glavni nespecifični porin; OprB, OprD, OprE, OprO i OprP su specifični porini; a OprC i OprH pripadaju klasi zatvorenih porina. Klasa efluksnihporina uključuje OprM, OprN i OprJ. Propusnost vanjske membrane *P. aeruginosa* izrazito je ograničena, otprilike 10 do 100 puta niža od propusnosti *E. coli*. OprFje prevladavajući porin *P. aeruginosa* odgovoran za nespecifični unos iona i saharida, ali ima nisku učinkovitost za prodiranje antibiotika. OprF se može naći u dvije konformacije: otvorenoj i zatvorenoj. Prisutnost uglavnom zatvorenih OprF porina odgovorena je za slabu propusnost vanjske membrane *P. aeruginosa* u odnosu na druge gram negativne bakterija. Među raznim porinima, OprD je uključen u unos antibiotika. Sadrži vezna mjesta za karbapeneme i  $\beta$ -laktame, a odsutnost OprD porina u *P. aeruginosa* povećava otpornost na ovu klasu antibiotika. OprH je najmanji porin *P. aeruginosa*, a utvrđeno je da je prekomjerna ekspresija OprH povezana s povećanom otpornošću na polimiksin B i gentamicin jer dovodi do stabilizacije vanjske membrane indukcijom modifikacije LPS-a (21,22).

#### 7.3.4. Rezistencija na karbapeneme

Sve je učestalija rezistencija izolata *P. aeruginosa* iz kliničkih uzoraka na karbapeneme. Mehanizmi rezistencije na karbapeneme obično su kombinirani te uključuju: nedostatak ili mutacijeporina (OprD) koji smanjuju propusnost za imipenem, prekomjernu ekspresiju gena *mexAB-oprM* efluksne pumpe, prekomjernu ekspresiju kromosomskog gena *ampC* koji kodira intrinzičnu cefalosporinazu te stjecanje gena koji kodiraju karbapenemaze VIM ili IMP. Inaktivacija ili gubitak *oprD* gena koji kodira porin kojim karbapenemi ulaze u periplazmatski prostor bakterijske

stijenke ima ključnu ulogu u rezistenciji na imipenem, a također smanjuje osjetljivost na meropenem. Iako su kromosomske mutacije, kao što su one koje dovode do gubitka ili inaktivacije OprD porina i/ili do prekomjerne ekspresije efluksnih pumpi, još uvijek najčešći uzrok rezistencije na karbapeneme u *P. aeruginosa*, stjecanje gena koji kodiraju karbapenemazu izuzetno je važan mehanizam. Ove  $\beta$ -laktamaze mogu hidrolizirati karbapeneme i dati otpornost na gotovo sve  $\beta$ -laktamske antibiotike. Karbapenemaze nisu intrinzično izražene u *P. aeruginosa*, već ih kodiraju heterologni geni dobiveni horizontalnim prijenosom (Slika 3), te imaju epidemijski potencijal (17).



**Slika 3. Mehanizmi horizontalnog prijenosa gena**

- A) Konjugacija - proces prijenosa DNA izravnim kontaktom B) Transdukcija- prijenos DNA pomoću bakteriofaga C) Ugradnja slobodne DNA iz okoliša transformacijom

(Izvor: Pang i sur. 2019) (21)

Nakon što je uočena povećana prevalencija karbapenem - rezistentnih izolata *P. aeruginosa* u Kliničkom bolničkom centru (KBC) Rijeka 2011. i 2012. god. sojevi izolirani iz različitih kliničkih uzoraka bolesnika su genotipizirani u svrhu utvrđivanja epidemiološke povezanosti (23). Klonska distribucija sojeva odgovarala je lokaciji pojedinih bolničkih odjela, što ukazuje na epidemijsko širenje nekolicine epidemijskih sojeva unutar bolnice. Molekularna analiza genske ekspresije kliničkih izolata je pokazala smanjenu ekspresiju porina OprD koji je važan za ulazak karbapenema te prekomjernu ekspresiju efluksnih sustava MexAB-OprM, MexCD-OprJ i MexEF-OprN. Dakle, u podlozi rezistencije na karbapeneme bila je kombinacija mehanizama rezistencije (23). U navedenom istraživanju u izolata nije utvrđena produkcija karbapenemaza iako su istom periodu u drugim zdravstvenim ustanovama u Hrvatskoj i susjednim regijama već bili prijavljeni karbapenemaza-producirajući *P. aeruginosa* izolati. Izvanredna sposobnost prilagodbe *P. aeruginosa* nameće potrebu stalnog praćenja razvoja rezistencije, istraživanja podležećih mehanizama, kontrolu bolničkih infekcija te istraživanja novih terapijskih opcija.

#### 7.3.5. Nove terapijske strategije za liječenje *P. aeruginosa* infekcija

Noviji terapijski pristupi, posebno inhibicija QS i redukcija nastanka biofilma, terapija fagima i primjena nanočestica, pokazuju značajne antimikrobne učinke protiv rezistentnih bakterijskih sojeva *in vitro* i na animalnim modelima infekcije, te se razmatraju kao alternativna ili pomoćna sredstva antibiotskoj terapiji (21). Međutim, do danas je samo nekoliko novijih pristupa liječenja ušlo u klinička istraživanja, bilo zbog visoke cijene, značajnih nuspojava ili zabrinutosti za sigurnost ispitanika. Budući bi

pristupi liječenja mogli biti kombinacija novih metoda i konvencionalnih antibiotika no potrebno je usmjeriti istraživanja na poboljšanje novih terapijskih metoda, smanjenje nuspojave i povećanje sigurnosti ispitanika.

## 8. RASPRAVA

*P. aeruginosa* je oportunistički patogen koji rijetko uzrokuje infekcije u zdravih osoba. Uglavnom inficira hospitalizirane bolesnike s opeklinama, kirurškim i drugim ranama, intubirane i imunološki oslabljene osobe. *Pseudomonas* je po svojoj prirodi rezistentan na veliki broj antibiotika te lako stječe gene rezistencije što otežava izbor i djelotvornost antimikrobne terapije. Razvoj višestruke rezistencije u *P. aeruginosa* je povezan s produženim trajanjem hospitalizacije i povećanom smrtnošću bolesnika (22). Zbog ubikvitarnosti prisutnosti bakterije u okolišu i izrazitoj sposobnosti prilagodbe te posjedovanju različitih čimbenika virulencije, *P. aeruginosa* je ESKAPE patogen, jedan od šest vodećih uzročnika bolničkih infekcija koji danas predstavljaju globalnu zdravstvenu prijetnju zbog izrazite otpornosti na antibiotike. Zbog izražene prirodne otpornosti *P. aeruginosa* je osjetljiv samo na ograničene klase antibiotika, a karbapenemi su dugo godina smatrani najmoćnijim antibioticima za liječenje pseudomonasnih infekcija. Međutim, *Pseudomonas* posjeduje molekularne mehanizme koji mu omogućavaju brzu prilagodbu i brzi razvoj rezistencije na sve antibiotike, pa tako i na karbapeneme (24). Zabrinjava kontinuirani porast rezistencije *P. aeruginosa* na karbapeneme u zdravstvenim ustanovama u Hrvatskoj. Dok je prema izvještaju Odbora za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u 2010. god. rezistencija na karbapeneme nacionalnoj razini iznosila oko 12%, u 2020. god. prosječna rezistencija na karbapeneme gotovo udvostručila te je iznosila oko 22%

(25,26). Uz kombinacije različitih mehanizama rezistencije kao što su pojačano izbacivanje antibiotika i smanjena propusnost stanične membrane, *Pseudomonas* ima i sposobnost produkcije različitih enzima od kojih najviše zabrinjavaju karbapenemaze – enzimi koji cijepaju gotovo sve postojeće  $\beta$ -laktamske antibiotike (21). Izvanredna sposobnost prilagodbe ove bakterije oslanja se na veliki broj regulatornih ili kontrolnih čimbenika unutar integriranih i složenih puteva obrade signala koji omogućavaju bakteriji da osjetipromjenu u okolišu sa svrhom prilagodbe nepovoljnim uvjetima (24). Djelotvornost antibiotika višestruko je umanjena sposobnošću bakterije da stvara guste i postojane biofilmovene biotičkim (sluznice, rane) i abiotičkim površinama (kateteri, implantati itd.). eDNA koja se nalazi u matriksu biofilma dodatno štiti bakterijske zajednice od stresa uzrokovanog antimikrobnim sredstvima.

*P. aeruginosa* je bolnički patogen koji se često pojavljuje na rizičnim odjelima kao što su odjeli intenzivne skrbi i hematološki odjeli. Od izrazite je važnosti pravovremeno započinjanje antimikrobne terapije jer je odgođena terapija povezana s povećanom smrtnošću bolesnika. No, unatoč pravodobnom i odgovarajućem odabiru antibiotika bez kontrole izvora infekcije gotovo se nemoguće riješiti infekcije. U tu je svrhu najčešće neophodno ukloniti ili zamijeniti urinarni ili CVK kateter, drenirati apsces ili kirurški otkloniti postojeće opstrukcije. Za uspješnu kontrolu i sprječavanje širenja bolničkih infekcija od presudnog je značenja edukacija zdravstvenog osoblja o ispravnoj higijeni ruku.

U pravilu se antibiotici koji se koriste za liječenje infekcija koja uzrokuje *P. aeruginosa* primjenjuju u većoj dozi od standardne. Odabir odgovarajućeg antibiotika ovisi o lokalizaciji infekcije, lokalnoj stopi rezistencije, prethodnom antibiogramu, alergiji bolesnika na penicilin te dostupnosti lijeka. Novi cefalosporin



cefiderokol i kombinirani antibiotici koji uključuju cefalosporin ili karbapenem uz inhibitor  $\beta$ -laktamaze općenito su rezervirani za liječenje infekcija uzrokovanih višestruko otpornim sojevima. Za razliku od dodatka relebaktama imipenemu koji mu može povratiti djelotvornost, dodavanje vaborbaktama meropenemu ne pojačava kliničku aktivnost meropenema protiv *P. aeruginosa* otpornog na karbapeneme (22). Kolistin, iako aktivan protiv pseudomonasa, općenito se koristi samo u slučaju otpornosti na sve ostale antibiotike zbog izražene toksičnosti lijeka. Druge potencijalne terapijske opcije su još u razvoju. Daljnje razumijevanje regulatornih sustava pseudomonasa i čimbenika koji doprinose stvaranju biofilma može pomoći u pronalaženju uspješnih rješenja za smanjenje stope bolničkih infekcija. Povećano širenje sojeva otpornih na antibiotike i uloga biofilma u ovom fenomenu zahtijevaju istraživanje alternativnih metoda liječenja. Terapeutska upotreba bakteriofaga za liječenje bakterijskih infekcija je primjer takve alternativne metode liječenja u budućnosti. Iako su mnoge prekliničke studije pokazale djelotvornost fagoterapije, još uvijek postoje mnoge poteškoće i izazovi za kliničku upotrebu (27). Do pronalaska novih antibiotika, napretka u fagoterapiji ili drugim alternativnim metodama liječenja potrebno je slijediti opća načela liječenja ozbiljnih infekcija. Upotrebu antibiotika je poželjno reducirati na najmanju moguću mjeru da bi se spriječio razvoj višestruke rezistencije. Prije odabira odgovarajuće empirijske ili ciljane terapije prethodno je potrebno procijeniti rizik od razvoja rezistencije. Kombinirana terapija koja može uključivati stare i nove antibiotike indicirana je za liječenje visokorizičnih bolesnika kao što su bolesnici s neutropenijom, odnosno teških infekcija kao što je sepsa ili septički šok.

## 9. ZAKLJUČCI

- *P. aeruginosa* je čest uzročnik bolničke pneumonije, infekcije kirurških rana, infekcije mokraćnog sustava i seapse
- Kronična pseudomonasna infekcija dišnih putova u oboljelih od CF ili infekcija bolesnika s bronhiektazijama dovodi do pogoršanja plućne funkcije zbog čega se preporučuje rana primjena antibiotika
- Utvrđeno je nekoliko QS signalnih puteva koji dovode do boljeg preživljavanja bakterija i slabijeg imunološkog odgovora domaćina na infekciju
- Prisutnost sustava sekrecije tipa III povezana je s lošijim ishodima bolesnika uključujući perzistenciju infekcije i povećanu smrtnost
- Sindromsko testiranje tzv. „multipleks PCR paneli“, dostupni su za bržu dijagnostiku bolničke pneumonije i seapse uzrokovane s *P. aeruginosa*.
- Pseudomonas posjeduje intrinzičnu rezistenciju na veći broj antibiotika te može brzo razviti rezistenciju tijekom liječenja
- Pravovremena i odgovarajuća primjena antibiotika je presudna, neprikladan početni izbor antibiotika povezan je s povećanom smrtnošću
- Sve češće infekcije s višestrukorezistentnim sojevima su povezane s produženim trajanjem hospitalizacije i povećanom smrtnošću bolesnika
- Za liječenje infekcija uzrokovanih višestrukorezistentnim sojevima dostupni su noviji antibiotici, kao što je ceftolozan-tazobaktam, ceftazidim-avibaktam, cefiderokol i imipenem-cilastatin-relebaktam
- Empirijsko liječenje pseudomonasnih infekcija često uključuje ranu kombiniranu terapiju koja se povezuje s poboljšanim ishodima liječenja

## 10. SAŽETAK

*P. aeruginosa* je ubikvitarna gram-negativna, aerobna štapićasta bakterija koja ne stvara spore. Oportunistički je patogen, a visoka stopa smrtnosti posljedica je kombinacije oslabljene obrane domaćina, otpornosti bakterija na antibiotike, proizvodnje izvanstaničnih bakterijskih enzima, toksina i stvaranja biofilma. Bakterije unutar biofilma mogu međusobno komunicirati, izbjeći imunološki odgovor, oduprijeti se antimikrobnoj terapiji te koristiti zalihu hranjivih tvari. Regulacija različitih procesa važnih za adaptaciju i opstanak bakterije u okolišu, kao što je stvaranje biofilma, kontrolirana je QS sustavom. Infekcije *P. aeruginosa* mogu zahvatiti bilo koji dio tijela. Čest je uzročnik bolničkih infekcija koje se manifestiraju kao upala pluća, infekcije kirurških rana, mokraćnog sustava ili bakterijemije. Jedan od najvažnijih aspekata kontrole infekcija *P. aeruginosa* je prevencija. Infekcije koje uzrokuje ova bakterija teško je izliječiti zbog izražene prirodene i stečene rezistencije na antibiotike. Empirijsko liječenje pseudomonasnih infekcija često uključuje ranu kombiniranu terapiju s dva antipseudomonasna antibiotika. Sve je učestalija rezistencija kliničkih izolata *P. aeruginosa* na karbapeneme. Stjecanje gena koji kodiraju karbapenemazu izuzetno je važan mehanizam rezistencije. Ove  $\beta$ -laktamaze mogu hidrolizirati karbapeneme i dati otpornost na gotovo sve  $\beta$ -laktamske antibiotike. Karbapenemaze nisu intrinzično izražene u *P. aeruginosa*, već ih kodiraju heterologni geni stečeni horizontalnim prijenosom, te imaju epidemijski potencijal.

### Ključne riječi:

Antibiotska rezistencija, biofilm, čimbenici virulencije, infekcije, mikrobiološka dijagnostika, *P. aeruginosa*

## 11. SUMMARY

*P. aeruginosa* is a ubiquitous gram-negative, aerobic rod-shaped, non-spore-forming bacterium. It is an opportunistic pathogen with high mortality due to a combination of weakened host defenses, antibiotic resistance, production of extracellular bacterial enzymes, toxins and biofilm production. Bacteria within the biofilm can communicate with each other, evade immune defenses, resist microbial therapy, and obtain nutrients. The regulation of various processes important for the adaptation and survival of bacteria in the environment, such as biofilm production, is controlled by QS. *P. aeruginosa* infection can affect any part of the body. It is a common cause of nosocomial infections that manifest as pneumonia, surgical wound infections, urinary tract infections, or bacteremia. One of the most important aspects of controlling *P. aeruginosa* infections is prevention. Infections caused by this bacterium are difficult to cure due to its intrinsic and acquired antimicrobial resistance. Empiric treatment of *P. aeruginosa* infections often includes early combination therapy with two antipseudomonal antibiotics. Resistance of clinical isolates of *P. aeruginosa* to carbapenems is increasing. Acquisition of carbapenemase encoding genes is an extremely important mechanism. These  $\beta$ -lactamases can hydrolyze carbapenems and confer resistance to almost all  $\beta$ -lactam antibiotics. Carbapenemases are not intrinsically expressed in *P. aeruginosa*, but are encoded by heterologous genes acquired by horizontal transfer and have epidemic potential.

### Keywords:

Antimicrobial resistance, biofilm, microbiological diagnostics, infections, *P. aeruginosa*, virulence factors

## 12. LITERATURA

1. Kalenić S i sur. Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2019
2. Wilson MG, Pandey S. *Pseudomonas aeruginosa*. U: StatPearls(mrežne stranice). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.(ažurirano 1. svibanj 2022; citirano 10. svibnja 2022). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557831/>
3. Iglewski BH. *Pseudomonas*. U: Baron S, ur. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 27
4. Morse SA, Mietzner, Miller S, Riedel S. *Jawetz Melnick and Adelberg's Medical Microbiology*. 28. izd. McGraw-Hill Education, 2019
5. van Delden C. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. U: Ramos JL, ur. *Virulence and gene regulation*. Springer, Boston, MA; 2004. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9084-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9084-6_1)
6. Green ER, Meccas J. Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol Spectr*. 2016; 4(1):10.1128. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015>
7. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8671. doi: 10.3390/ijms21228671
8. Hadadi-Fishani M, Khaledi A, Fatemi-Nasab ZS. Correlation between biofilm formation and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: a meta-analysis. *Infez Med*. 2020;28(1):47-54

9. Reynolds D, Kollef M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs*. 2021;81(18): 2117-31. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6>
10. Murray PR, Rosenthals KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. 9. izd. Elsevier; 2020.
11. Crone S, Vives-Flórez M, Kvich L, Saunders AM, Malone M, Nicolaisen MH. The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS*. 2020;128(3):220-31. doi: 10.1111/apm.13010
12. Qureshi S. *Pseudomonas aeruginosa* Infections Clinical Presentation (mrežne stranice). Medscape. (ažurirano 3. ožujak 2020; citirano 10. svibnja 2022). Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/226748-clinical/>.
13. Chen SSP. *Pseudomonas* Infection Clinical Presentation (mrežne stranice). Medscape. (ažurirano 17. prosinac 2018; citirano 10. svibnja 2022). Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/970904-clinical/>
14. Chai YH, Xu JF. How does *Pseudomonas aeruginosa* affect the progression of bronchiectasis? *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(3):313-318. doi: 10.1016/j.cmi.2019.07.010
15. Lansbury L, Lim B, Baskaran V, Lim WS. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J Infect*. 2020;81(2):266-275. doi: 10.1016/j.jinf.2020.05.046
16. Kalenić S, Budimir A, Bošnjak Z, Acketa L, Belina D, Benko I i sur. Smjernice za higijenu ruku u zdravstvenim ustanovama. *LijecVjesn*. 2011; 133: 155-70.

17. Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat*. 2019;44:100640. doi:10.1016/j.drug.2019.07.002
18. Gellatly SL, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis*. 2013;67:159-73
19. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA *et al*. Antimicrobial resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(3):e00181-19. doi: 10.1128/CMR.00181-19.
20. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(1):161-82. doi:10.1128/CMR.00036-08
21. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. 2019;37(1):177-92. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
22. 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 (Basel)*. 2021;10(1):42. doi: 10.3390/antibiotics10010042
23. Bubonja-Sonje M, Matovina M, Skrobonja I, Bedenic B, Abram M. Mechanisms of carbapenem resistance in multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Croatian hospital. *Microb Drug Resist*. 2015;21(3):261-9. doi:10.1089/mdr.2014.0172

24. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:39. doi: 10.3389/fcimb.2017.00039.
25. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotikeu Republici Hrvatskoju 2010.god. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske: Zagreb; 2010.
26. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotikeu Republici Hrvatskoju 2020.god. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske: Zagreb; 2020.
27. Wrafi F, Brzozowska E, Górska S, Gamian A. Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* - the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2017;71(0):78-91. doi: 10.5604/01.3001.0010.3792



### **13. ŽIVOTOPIS**

Ivan Findri rođen je 09. lipnja 1995. godine u Zagrebu. Osnovnoškolsko obrazovanje stekao je u Osnovnoj školi Ksavera Šandora Đalskog u Donjoj Zelini, a srednjoškolsko u Školi za medicinske sestre Mlinarska u Zagrebu. Po završetku srednje škole, 2015. godine zapošljava se kao tehničar opće njege na Klinici za psihijatriju u KB Dubrava. 2016. godine upisuje Integrirani preddiplomski i diplomski studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Tijekom studija sudjelovao je na kongresima i radionicama, a aktivno se služi engleskim i njemačkim jezikom.