



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET

Nataša S. Stanković Nedeljković

FENOTIPSKE KARAKTERISTIKE
KLINIČKIH IZOLATA
PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Doktorska disertacija

Niš, 2015. godine



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET

Nataša S. Stanković Nedeljković

**FENOTIPSKE KARAKTERISTIKE
KLINIČKIH IZOLATA
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

Doktorska disertacija

Mentor

dr Branislava Kocić, red. prof.

Niš, 2015. godina



UNIVERSITY IN NIŠ
FACULTY OF MEDICINE

Nataša S. Stanković Nedeljković

**PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF
CLINICAL ISOLATES**

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

doctoral dissertation

Mentor

Prof. Branislava Kocić, PhD

Niš, 2015.

Podaci o komisiji za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

Mentor	Prof. dr Branislava Kocić	Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet
Članovi komisije	Prof. dr Branislava Kocić, mentor i član	Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet
	Prof. dr Marina Dinić, predsednik komisije i član	Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet
	Prof. Dr Lazar Ranin, član	Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
Datum odbrane		

Zahvaljujem svima koji su posredno ili neposredno pomogli u izradi disertacije, a posebno:

- mentoru prof. dr Branislavi Kocić na stručnoj pomoći i podršci svake vrste, razumevanju i toleranciji,
- prof. dr Marini Dinić na stručnoj pomoći i savetima,
- prof. dr Lazaru Raninu na podršci i razumevanju,
- mr sci med dr Snežani Antić Mladenović na stručnoj pomoći i prijateljskim rečima,
- doc dr Petru Kneževiću sa Departmana za biologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu na stručnoj pomoći i razumevanju,
- dr Dragani Stanković na stručnoj pomoći,
- laborantima Odseka mikrobiologije Opšte bolnice "Aleksinac" u Aleksincu
- svojoj porodici, sinovima Vladi i Stefanu i roditeljima na motivaciji, razumevanju i podršci

Prim. mr. sci. med. dr Nataša Stanković Nedeljković

Naslov doktorske disertacije: Fenotipske karakteristike kliničkih izolata *Pseudomonas aeruginosa*

Rezime: Uvod. *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) je jedna od najčešćih bakterija koja kolonizuje bolničku sredinu. Velika genetička raznovrsnost, fleksibilna fiziologija, adaptibilnost, metabolički potencijal, produkcija široke kapsule i biofilma, kontrola permeabilnosti spoljne membrane i rezistencija na antibiotike i dezinficijense omogućavaju bacilu da bude široko rasprostranjen. *P. aeruginosa* je čest uzročnik inflamacija, ako postoji oštećenje imunskog sistema iz bilo kog razloga: maligne bolesti, hemoterapija, neutropenija, diabetes mellitus, kardiovaskularne bolesti, alkoholizam, pušenje i debljina. **Ciljevi rada.** Ciljevi rada su analiza prisustva *P. aeruginosa* u bolesničkim materijalima hospitalizovanih i ambulantnih bolesnika, serotipizacija izolata, ispitivanje produkcije fluorescina i piocijanina, adhezivnih sposobnosti, formiranja biofilma, trzajućih pokreta, rojenja, otpornosti na oksidativni stres, osetljivosti na imipenem, meropenem, piperacilin-tazobaktam, kolistin, aztreonam, ceftazidim, cefepim, amikacin, gentamicin, netilmicin, tobramicin, ofloksacin i ciprofloksacin, određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) za piperacilin-tazobaktam, ciprofloksacin i amikacin, produkcije β laktamaza proširenog spektra (ESBL), karbapenamaza i metalo β laktamaza (MBL). **Metode.** U ispitivanje je uključeno 100 izolata *P. aeruginosa*, 50 iz materijala hospitalizovanih bolesnika i 50 iz materijala ambulantnih bolesnika. Serotipizacija je vršena reakcijom aglutinacije, po uputstvu proizvođača seruma (Bio-Rad, Francuska). Produkcija pigmenata je očitavana sa specijalizovanih podloga za produkciju pigmenata: *Pseudomonas* podloge za produkciju fluorescina i *Pseudomonas* podloge za produkciju piocijanina (HiMedia, Indija). Ispitivanje adhezivnih sposobnosti vršeno je u mikrotitar pločama u Lauril Bertoni bujonu (Liofilchem, Italija), nakon inkubacije od 60 min. Intenzitet boje je čitan na 610 nm (BioKit, Microwell EL 301, USA). Ispitivanje produkcije biofilma vršeno je u mikrotitar pločama u Lauril Bertoni bujonu nakon inkubacije od 24 časa, a intenzitet boje je čitan na 610 nm. (BioKit, Microwell EL 301, USA). Ispitivanje trzajućih pokreta je vršeno na 1% Lauril Bertoni agaru, a rojenja na 0,5% Lauril Bertoni agaru. Osetljivost na oksidativni stres je ispitivana na 2% triptikaza soja agaru sa sterilnim diskom filter papira prečnika 7 mm, na koji je nakapavano 10 μ l 30% H₂O₂. Osetljivost na antibiotike proveravana je disk difuzionom metodom po CLSI standardu (2013. godina, M-100-S-21). MIK za piperacilin-tazobaktam, amikacin i ciprofloksacin su određivane po uputstvu proizvođača traka sa antibiotikom (Liofilchem, Italija). Produkcija

ESBL je ispitivanja korišćenjem diskova cefotaksima, cefotaksima sa klavulonskom kiselinom, amoksicilina sa klavulonskom kiselinom, ceftazidima i ceftazidima sa klavulonskom kiselinom. Produkcija karbapenemaza je izvođena, tako što je na površinu Mueller-Hintovog agara zasejavana kultura referentnog soja *E.coli* ATCC 2522. U sredinu ploče je stavljan disk meropenema, a zatim je povlačena crta ispitivane kulture *P. aeruginosa* do diska. Produkcija MBL je određivana Hodge testom. **Rezultat.** *P. aeruginosa* je najčešće kultivisan iz briseva rana (54%) i urina (21%), dok su drugi bolesnički materijali manje zastupljeni. Serološki su identifikovani sledeći serotipovi: P1, P3, P4, P5, P6, P10, P11 i P12. Najčešće identifikovani serotipovi su P11 (20%), P6 (16%) i P1 (12%), a 29% izolata je netipibilno. *P. aeruginosa* produkuje češće fluorescein (86%) nego piocijanin (67%). Većina naših izolata (93%) je imala sposobnost adhezije na polivinil-hlorid nakon inkubacije od 60 min. Skoro svi izolati (99%) su imali sposobnost formiranja biofilma. Svi izolati su imali sposobnost trzajućih pokreta i rojenja. Znatno broj izolata je imao apsolutnu rezistenciju na toksično dejstvo 30% H₂O₂. Izolati su pokazali najveći stepen osetljivosti na kolistin i aztreonam (100%), meropenem (92% izolata hospitalnog porekla i 88% ambulantnog), imipenem (86%) i piperacilin-tazobaktam (84% izolata bolničkog porekla i 74% ambulantnog). Najveći broj izolata je imao MIK vrednost za piperacilin-tazobaktam 12 µg/ml (37,5%), za ciprofloksacin 0,125 µg/ml (43,75%). 24,19% je imao MIK vrednost 8µg/ml za amikacin. Samo jedan izolat je produkovao ESBL, 7% karbapenemaze i 10% MBL. **Zaključak.** *P. aeruginosa* je najčešće kultivisan iz briseva rana i urina, a znatno manje iz drugih materijala. Najprisutniji su serotipovi P11, P6 i P1. Bacil više produkuje fluorescein nego piocijanin. Većina izolata ima sposobnost adhezije i formiranja biofilma, rojenja, trzajućih pokreta i otporna je na oksidativni stres. Svi izolati su osetljivi na kolistin i aztreonam, a po osetljivosti slede meropenem, imipenem i piperacilin-tazobaktam.

Ključne reči: *Pseudomonas aeruginosa*, serotipovi, pigment, biofilm, rojenje, trzajući pokreti, antibiotici

Naučna oblast: Medicinske nauke

Uža naučna oblast: Mikrobiologija

UDK 616-02

Title of doctoral thesis: Phenotyping characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates

Apstract: Introduction. *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) is one of the most common bacteria colonizing the hospital environment. High genetic variability, flexible physiology, adaptability, metabolic potential, production of broad capsules, biofilm forming, control of external membrane permeability and resistance to antibiotics and disinfectants allow the bacillus to be widely dispersed. *P. aeruginosa* is a common cause of inflammation, if there is a disruption of the body's defense forces for any reason: malignant disease, chemotherapy, neutropenia, diabetes mellitus, cardiovascular diseases, alcoholism, smoking and obesity. **The aim.** The goals of testing are the analysis of the presence of *P. aeruginosa* in hospitalized patients' and outpatients' materials, isolates serotyping, testing of fluorescein and pyocyanin production, adhesive ability, biofilm formation, twitching motility, swarming, resistance to oxidative stress, susceptibility testing to imipenem, meropenem, piperacillin-tazobactam, colistin, aztreonam, ceftazidime, cefepime, amikacin, gentamicin, netilmicin, tobramycin, ofloxacin and ciprofloxacin, determination of the minimum inhibitory concentrations (MICs) of the piperacillin-tazobactam, ciprofloxacin and amikacin, and testing of the of extended spectrum beta lactamases (ESBL), carbapenemases and metallo beta-lactamases (MBL) productions. **Methods.** The study included 100 isolates of *P. aeruginosa*, 50 from inpatients and 50 outpatients materials. Serotyping of isolates was performed by agglutination reaction per the manufacturer's instructions serum (Bio-Rad, France). Production of pigments was read on specialized substrates for pigments production: *Pseudomonas* basis for differentiation of fluorescein and *Pseudomonas* basis for differentiation of pyocyanin (HiMedia, India). Testing of adhesive ability was performed in microtiter plates in Lauryl Bertoni broth (Liofilchem, Italy), after incubation of 60 min. The color intensity was read at 610 nm (Biokit, Microwell EL 301, USA). Investigation of biofilm production was performed in microtiter plates in Lauryl Bertoni broth after incubation for 24 hours, and the color intensity was read at 610 nm (Bio-kit, Microwell EL 301, USA). Testing of the twitching movements was performed on 1% Lauryl Bertoni agar, a swarming at 0.5% Lauryl Bertoni agar. The sensitivity to oxidative stress was studied on 2% trypticase soy agar with a sterile filter paper disk diameter of 7 mm, on which there was poured 10 µl of 30% H₂O₂. The sensitivity to antibiotics was evaluated by disk diffusion method according to CLSI standards (2013, M-100-S-21). MICs of piperacillin-tazobactam, amikacin and ciprofloxacin

were determined according to the manufacturers tapes with an antibiotic instructions (Liofilchem, Italy). ESBL production of *P. aeruginosa* was performed by using cefotaxime, cefotaxime with clavulanic acid, amoxicillin with clavulanic acid, ceftazidime, and ceftazidime with clavulanic acid discs. Production carbapenemases is performed so that the surface of Mueller-Hintovog agar is inoculated culture reference strain *E. coli* ATCC 2522. In the middle of the board was placed meropenem disk, and lines of tested culture of *P. aeruginosa* were dragged to disk. MBL production was determined by Hodge test. **Results.** *P. aeruginosa* was the most commonly cultured from wound swabs (54%) and urine (21%), while the other patient materials underrepresented. Following serotypes of *P. aeruginosa* were serologically identified: P1, P3, P4, P5, P6, P10, P11, and P12. The most common serotypes were: P11 (20%), P6 (16%) and P1 (12%), and 29% of the isolates were untypibile. *P. aeruginosa* produces more fluorescein (86%) than pyocyanin (67%). Most of our isolates (93%) had the ability of adherence to polyvinyl chloride, after incubation of 60 min. Almost all isolates of *P. aeruginosa* (99%) had the ability to form biofilm. All isolates had the abilities of twicing movement and swarming. A significant number of isolates had absolute resistance to toxic effect of 30% H₂O₂ solution. The isolates showed the greatest degree of susceptibility to colistin and aztreonam (100%), meropenem (92% of isolates of hospital origin and 88% of outpatient), imipenem (86%) and piperacillin-tazobactam (84% of nosocomial isolates and 74% of outpatient). The largest number of isolates had an MIC value for piperacillin-tazobactam 12 mg/ml (37.5%), ciprofloxacin 0.125 mg/ml (43.75%). For amikacin 24.19% of isolates had MIC value of 8 µg/ml. Only one isolate produced a ESBL, 7% carbapenemase and 10% MBL. **Conclusion.** *P. aeruginosa* is the most commonly cultured from wound swabs and urine, and much less from other materials. The most serotypes were P11, P6 and P1. *Bacillus* produces fluorescein more than pyocyanin. Most of isolates have the abilities adhesion and biofilm formation, gliding movement, swarming, and resistance to oxidative stress. All isolates were most susceptible to colistin and aztreonam, followed by meropenem, imipenem and piperacillin-tazobactam.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, serotypes, pigment, biofilm, twiching motility swarming, antibiotics

Scientific field: Medical science

Specific science fieldt: Mikrobiology

UDK 616-02

SADRŽAJ

Skraćenice.....	1
1.Uvod.....	3
2. Opšti deo.....	6
2.1.Karakteristike vrste.....	6
2.1.1. Morfologija bacila.....	6
2.1.2. Taksonomske karakteristike.....	7
2.2. Rasprostranjenost <i>P. aeruginosa</i>	7
2.3. Značaj vrste.....	8
2.4. Građa <i>P.aeruginosa</i>	8
2.4.1. Polisaharidi ćelijskog zida <i>P aeruginosa</i>	9
2.4.2. Uloga lipopolisaharida u fiziologiji i infekcijama izazvanim <i>P. aeruginosa</i>	10
2.4.3.Lipid A ćelijskog zida <i>P. aeruginosa</i>	14
2.4.4. Flagele.....	15
2.4.5. Pili.....	17
2.4.5.1. Struktura pila.....	17
2.4.5.2. Uloga pila u biologiji <i>P. aeruginosa</i>	19
2.4.5.3. Pokretljivost.....	20
2.5. Kulturelne karakteristike.....	22
2.6. Biohemijske osobine.....	25
2.7. Faktori patogenosti.....	26
2.7.1. Toksini.....	26
2.8. Adherencija.....	29
2.9. Produkcija biofilma.....	20
2.9.1. Faze u formiranju biofilma.....	31
2.9.2. Struktura biofilma.....	33
2.9.3. Uloga biofilma u fiziologiji <i>P. aeruginosa</i>	34
2.9.4. Quorum sensing.....	36
2.9.4.1. Quorum sensing signalni sistemi.....	38

2.9.4.2. Uloga quorum sensing signalnih sistema u fiziologiji. <i>P. aeruginosa</i>	40
2.10. Patogenost <i>P. aeruginosa</i> za ljude.....	44
2.10.1. Respiratorne infekcije.....	45
2.10.1.1. Cistična fibroza.....	45
2.10.2. Urinarne infekcije.....	47
2.10.3. Infekcije kože	47
2.10.4. Infekcije očiju.....	49
2.10.5. Infekcije potpornog sistema.....	49
2.10.6. Infekcije centralnog nervnog sistema.....	49
2.10.7. Ostale infekcije.....	50
2.11. Tipizacija <i>P. aeruginosa</i>	50
2.11.1. Serotipizacija <i>P. aeruginosa</i>	52
2.12. Produkcija pigmenata.....	54
2.12.1. Pioverdin.....	55
2.12.2. Biosinteza i regulacija fenazinskih produkata <i>P. aeruginosa</i>	56
2.13. Reakcija <i>P. aeruginosa</i> na oksidativni stres.....	59
2.14. Rezistencija <i>P. aeruginosa</i> na antibiotike.....	60
2.14.1. Prirodna rezistencija <i>P. aeruginosa</i> na antibiotike.....	62
2.14.2. Beta laktamaze	64
2.14.2.1. ESBL.....	66
2.14.2.2. Karbapenemaze.....	67
2.14.2.2.1. Metallo beta laktamaze.....	70
3. Ciljevi rada.....	73
4. Materijal i metode.....	74
4.1. Kultivacija i identifikacija <i>P. aeruginosa</i>	74
4.2. Serotipizacija.....	75
4.3. Produkcija pigmenata.....	76
4.4. Ispitivanje adhezivnih sposobnosti	76
4.5. Produkcija biofilma.....	77

4.6. Ispitivanje trzajućih pokreta	77
4.7. Ispitivanje rojenja.....	78
4.8. Reakcija na oksidativni stres	78
4.9. Osetljivost na antibiotike.....	78
4.9.1. Minimalna inhibitorna koncentracija.....	79
4.9.2. Produkcija ESBL.....	79
4.9.3. Produkcija karbapenemaza.....	80
4.9.4. Produkcija MBL.....	80
4.10. Statistička obrada podataka.....	80
5. Rezultati rada.....	81
5.1. Demografske karakteristike ispitivane populacije.....	81
5.2. Vrste bolesničkih materijala iz kojih je izolovan <i>P. aeruginosa</i>	83
5.3. Serotipovi <i>P.aeruginosa</i>	85
5.4. Produkcija pigmenata.....	88
5.5. Adhezivna sposobnost.....	93
5.6. Produkcija biofilma.....	95
5.7. Sposobnost trzajućih pokreta.....	96
5.8. Sposobnost rojenja.....	98
5.9. Reakcija na oksidativni stres.....	99
5.10. Osetljivost na antibiotike.....	100
5.10.1. Minimalne inhibitorne koncentracije.....	104
5.10.2. Produkcija ESBL.....	108
5.10.3. Produkcija karbapenemaza.....	108
5.10.4. Produkcija MBL.....	110
6.0. Diskusija.....	113
6.1. Demografske karakteristike ispitivane populacije.....	114
6.2. Vrste bolesničkih materijala iz kojih je kultivisan <i>P. aeruginosa</i>	115
6.3. Serotipizacija <i>P. aruginosa</i>	118
6.4. Produkcija pigmenata.....	123
6.5. Adhezivna sposobnost.....	128

6.6. Produkcija biofilma	129
6.7. Sposobnost trzajućih pokreta.....	135
6.8. Sposobnost rojenja.....	139
6.9. Reakcija na oksidativni stres.....	143
6.10. Osetljivost na antibiotike.....	148
6.10.1. Minimalne inhibitorne koncentracije.....	157
6.10.2. Produkcija ESBL.....	163
6.10.3. Produkcija karbapenemaza.....	166
6.10.4. Produkcija MBL.....	169
7. Zaključak.....	173
8. Literatura.....	177
Biografija.....	222

SKRAĆENICE

G+C- guanin +citozin

AIDS- immunodeficiency associated infective disease

rRNA- ribozomalna ribonukleinska kiselina

Oprf- protein F

LPS- lipopolisaharid

EDTA- etilendiaminotetrasirćetna kiselina

EDRF- endotelijum oslobađajući faktor

cGMP- ciklični guanin monofosfat

PML- polimorfonuklearni leukociti

CF- cistična fibroza

UV- ultravioletna

TLR5- toll like receptor

SDS- PAGE-elektroforeza u poliakrilamidnom polju u prisustvu natrijum dodecil sulfata

aSGM- asijalogangliozidi

SGM- sijalogangliozidi

ADP- adenzin difosfat

RT- respiratorni trakt

TNF- tumor necrosis factor

QS- quorum sensing

DNK- dezoksiribonukleinska kiselina

DT- digestivni trakt

RAPD- nasumično umnožena polimorfna DNK

RFLP- polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata

MLST- tipizacija na osnovu multilokularnih sekvenci

MLEE- enzimski elektroforeza multi lokusa

PFGE- elektroforeza u pulsirajućem polju

PBP- penicilin vezujući protein

ESBL- β laktamaza proširenog spektra

MBL- metalo β laktamaza

CLSI- Clinical Laboratory Standard Institute

NADPH- nikotinamid dinukleotid fosfat vodonik

MIK- minimalna inhibitorna koncentracija

1. UVOD

Za pseudomonade, kao i mnoge bakterije, postoje dokazi da su živele stotinama miliona godina ranije. Ipak, Schroeter je 1872. godine prvi opisao *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) i nazvao ga *Bacterium aeruginosum*. Imena *P. aeruginosa* su se zatim menjala: *Micrococcus pyocyaneus* (Zopf 1884. godine), *Bacillus aeruginosus* (Schroeter 1872. godine, Trevisan 1885. godine), *Bacillus pyocyaneus* (Zopf 1884. godine, Flügge 1886. godine), *Pseudomonas pyocyanea* (Zopf 1884. godine, Migula 1895. godine) i *Bacterium pyocyaneum* (Zopf 1884. godine). Vremenom su mnoge vrste uključivane i isključivane iz roda *Pseudomonas*. Danas, rod *Pseudomonas* uključuje vrste koje su ranije pripadale rodovima *Chryseomonas* i *Flavimonas*. Neke vrste *Pseudomonas sp.* su, međutim, prebačene u rodove *Burkholderia* i *Ralstonia*¹.

Gessard je 1882. godine opisao dva pigmenta koje luči ova bakterija. Wasserman je diferencirao antitela protiv egzotoksina *P. aeruginosa* i baktericidna antitela. Achard je 1902. godine opisao aglutinaciju *P. aeruginosa* serumom bolesnika koji je bio inficiran bacilom. Eisenberg je 1903. godine pokušao da upotrebi antiserum za diferenciranje *Bacillus fuorescens* od *P. aeruginosa*^{2,3}.

Najnovija ispitivanja vezana za *P. aeruginosa* se uglavnom odnose na analizu genetičkog materijala. Kompletne ispitivanja 16S rRNK sekvenci su završena 2000. godine, prvo kod *P. aeruginosa* P1. Genom *P. aeruginosa* je veličine između 6 i 7 Mbp i sadrži oko 5570 parova baza⁴ (Slika 1.).



Slika 1. Genom *Pseudomonas aeruginosa* (Centar za biološka istraživanja USA, <http://www.pseudomonas.com/>)

Količina genetičkog materijala se razlikuje kod različitih serotipova. Značajan deo genetičkog materijala je vezan za regulatorne procese. Veliki genom i kompleksnost gena omogućavaju preživljavanje u različitim okruženjima i produkciju brojnih faktora patogenosti. Karakteristike genoma, procenat G+C, procenat kodiranja i broj gena pojedinih vrsta *Pseudomonas sp.* su prikazani u tabeli 1.^{4,5}.

Tabela 1.

Karakteristike genoma, procenat G+C, procenat kodiranja i broj gena pojedinih vrsta *Pseudomonas sp.*

Bakterija	Veličina genoma	G +C	Procenat kodiranja	Broj gena
<i>P. aeruginosa</i> 2192	6826253	66.2	85	5546
<i>P. aeruginosa</i> C3719	6146988	66.5	86	5065
<i>P. aeruginosa</i> LES	6601757	66.3	80	5326
<i>P. aeruginosa</i> PA7	6663529	66.4	84	5309
<i>P. aeruginosa</i> PACS2	6492423	66.3	86	5317
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	6264404	66.6	89	5568
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP/PA14	6537648	66.3	89	5592
<i>P. aeruginosa</i> L48	5888780	64.2	88	5134
<i>P. aeruginosa</i> Pf-5	7074893	63.3	88	6137
<i>P. aeruginosa</i> PfO-1	6438405	60.5	89	5892
<i>P. aeruginosa</i> ymp	5072807	64.7	89	4594
<i>P. putida</i> F1	5925059	61.9	88	4735
<i>P. putida</i> GB-1	6053195	62.0	90	5494
<i>P. putida</i> KT2440	6181863	61.5	86	5350
<i>P. putida</i> W619	5748550	61.5	89	4624
<i>P. putida</i> A1501	4567418	63.9	89	4624
<i>P. syringae</i> pv.phaseolicola	5928787	57.9	84	4984
<i>P. syringae</i> pv.suringe B728a	6093698	59.2	85	5089
<i>P. syringae</i> pv. tomato str DC3000	6397126	58.3	85	5470

Osnovne karakteristike *P. aeruginosa* su da:

1. produkuje karakteristične pigmente,
2. može da preživi na temperaturi od 42°C
3. bacil je katalaza i oksidaza pozitivan.

Vrste *Pseudomonas sp.* su ubikvitarni bacili koji opstaju u vazuhu, vodi i zemlji. Kolonizuju biljke, životinje i ljude. Bacili, najčešće *P. syringae* grupe, ali i drugih grupa, su patogeni biljaka. *P. syringae* grupa ima preko 50 biovara, a mnogi od njih pokazuju visok stepen vrsne specifičnosti pri izazivanju oboljenja biljaka. Najčešći patogeni životinja su *P. aeruginosa*, *P. oryzae* i *P. plecoglossicida*¹.

Pseudomonas sp. ima vrlo važnu ulogu u metabolizmu zagađivača u prirodi. Ta njihova sposobnost se može iskoristiti u bioremedijaciji. *P. alcaligenes* može razgraditi policiklične aromatične ugljene hidrate, a *P. mendocina* i *P. putida* toluene. Vrste *P. stutzeri* grupe mogu vršiti degradaciju ugljen tetrahlorida. *P. pseudoalcaligenes* koristi cijanide kao izvore azota¹.

P. aeruginosa spada u najrasprostranjenije i za humanu patologiju najvažnije mikroorganizme. To je oportunistički patogena bakterija. Može izazvati oboljenja kod svih domaćina koje kolonizuje. Veoma je rezistentan na najčešće korišćena dezinfekciona sredstva. Često je prisutan u bolničkoj sredini. Uglavnom izaziva oboljenja kod imunokompromitovanih bolesnika⁶. Dovodi do infekcija rana, opekotina i urina, ali može izazvati inflamaciju svih organskih sistema. Česti su hronične infekcije i doživotno kliconoštvo. Vremenom *P. aeruginosa* je evoluirao u multirezistentnu bakteriju, čija terapija je skupa i teška i za države sa veoma razvijenim zdravstvenim sistemom. Bez preterivanja se može reći da ovaj bacil spada među najvažnije u humanoj patologiji.

2. OPŠTI DEO

2.1. KARAKTERISTIKE VRSTE

2.1.1. MORFOLOGIJA BACILA

P. aeruginosa su Gram negativni, aerobni, asporogeni i pokretni bacili (Slike 2. i 3.). Bacili su pravi ili malo savijeni, tanki i produkuju kapsulu. Dimenzija su 0,5 μm do 1,0 μm i 1,5 μm do 5,0 μm . Mogu biti i kraći i zadebljani. Razmešteni su pojedinačno, u parovima ili u kratkim lancima. Slika je obično uniformna, polimorfizam bacila se retko sreće⁷. Imaju jednu ili više subpolarnih, retko lateralnih flagela. Rezultati nekih ispitivanja pokazuju da može da ima 3 do 6 flagela⁸.



Slika 2. Bakterijske ćelije *P. aeruginosa* obojene po Gramu (en.wikipedia.org)



Slika 3. Bakterijske ćelije *P. aeruginosa* (elektronska mikroskopija)
(globalmedicaldiscovery.com)

2.1.2. TAKSONOMSKE KARAKTERISTIKE

Taksonomske karakteristike *P. aeruginosa* po Breneru su sledeće⁹ (Tabela 2.).

Tabela 2.

Taksonomske karakteristike *P. aeruginosa* po Breneru

Carstvo	<i>Bacteria</i>
Razdeo	<i>Proteobacteria</i>
Klasa	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Red	<i>Pseudomonadales</i>
Familija	<i>Pseudomonadaceae</i>
Rod	<i>Pseudomonas</i>
Vrsta	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Po Bergey klasifikaciji red *Pseudomonales* svrstan je u IV grupu u kojoj su Gram-negativni aerobni ili mikroaerofilni bacili i koke⁹. Porodica *Pseudomonaceae* ima 171 vrstu¹. Vrste koje pripadaju familiji *Pseudomonaceae* dele se u tri grupe: fluorescentnu grupu, *Pseudomallei* grupu i ostale pseudomonade⁷. Najveći medicinski značaj imaju fluorescentna grupa i vrsta *P. aeruginosa* koja je jedina patogena za ljude.

2.2. RASPROSTRANJENOST *P. AERUGINOSA*

P. aeruginosa se sreće svuda u našem okruženju: vodi, vazduhu, zemlji i predmetima opšte upotrebe. Bacil je ubikvitarna bakterija koja kolonizuje ljude, životinje i biljke. Veoma je otporan na faktore spoljne sredine, mnogo otporniji nego druge bakterije. Mesecima može živeti u vodi. Danima može opstati na suvim površinama, ako se nalazi u biološkim ekskretima. Izolovan je iz često korišćenih dezinfekcionih sredstava⁷. Naučnici Rensselaer Polytechnic Institute, koji sarađuje sa NASA, su izvestili da je za vreme svemirskog leta u

International Space Station, uočeno prilagođavanje gravitaciji i formiranje biofilma kakav nije uočen na površini Zemlje¹.

P. aeruginosa je izolovan iz benzina, kerozina, farmaceutskih proizvoda, deterdženata i sapuna. Formiranje biofilma omogućava opstanak u vodama i sistemima za njenu distribuciju. Bacil je izolovan skoro iz svih voda: flaširane, mineralne i destilovane vode i vode iz bazena, osim morske¹.

Velika genetička raznovrsnost, fleksibilna fiziologija, sposobnost produkcije biofilma i široke kapsule, kontrole permeabilnosti spoljne membrane, adherencije na različite površine, adaptibilnost i metabolički potencijal omogućavaju *P. aeruginosa* da bude široko rasprostranjena bakterija¹⁰⁻¹².

2.3. ZNAČAJ VRSTE U HUMANOJ PATOLOGIJI

Kod ljudi *P. aeruginosa* se nalazi na koži, češće na delovima koji su vlažni, u brisevima grla i nosa i stolicama kao normalni stanovnik. Kolonizacija ovom bakterijom je učestalija tokom i nakon hospitalizacije. *P. aeruginosa* je oportunistički patogeni bakterija¹³. Kod osoba sa očuvanim imunitetom uglavnom ne izaziva oboljenja. Ako iz bilo kog razloga dođe do slabljenja imunskog odgovora, bakterija izaziva najrazličitija patološka stanja. Izaziva niz infektivnih oboljenja koja se jednim imenom zovu pseudomonijaze¹⁴. Spada među najčešće uzročnike infekcija opekotina, rana, urinarnog i respiratornog trakta. Kod bolesnika sa opekotinama, malignim bolestima i AIDS uzrokuje oko 50% letalnih ishoda¹⁵.

Decenijama unazad se smatra jednim od najčešćih uzročnika bolničkih infekcija. *P. aeruginosa* izaziva oko 10% nozokomijanih infekcija, kod kojih je smrtnost 10-60%¹⁶. Izaziva oko 3-7% od ukupnog broja bakterijemija¹⁷. Smatra se da je uzročnik oko 1,5 miliona bolničkih infekcija godišnje¹⁸.

2.4. GRAĐA *P. AERUGINOSA*

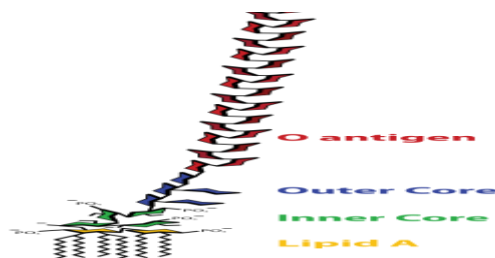
P. aeruginosa ima tipičnu građu Gram negativnih bacila. Citoplazmatska membrana pokriva citoplazmu, u središnjem sloju ćelijskog zida je peptidoglikan, a na površini je spoljna membrana. Spoljnu membranu čine fosfolipidi, proteini i lipopolisaharidi (LPS)⁷.

Najčešći proteini spoljne membrane su srodni. Spoljna membrana sadrži protein F (OprF). OprF funkcioniše kao porin, dozvoljavajući samo izvesnim molekulima i jonima da uđu u bakterijsku ćeliju. Porin ograničava ulazak u ćeliju molekula mase do 500 Da, što snižava propustljivost spoljne membrane, pa antibiotici teže prodiru u ćeliju. Neki sojevi su obavijeni sluzavom ovojnicom¹⁹.

2.4.1. POLISAHARIDI ĆELIJSKOG ZIDA *P. AERUGINOSA*

Polisaharidi *P. aeruginosa* su lokalizovani u spoljnoj membrani, a kod sojeva koji nemaju kapsulu na površini ćelije. LPS su najvažniji polisaharidi. LPS *P. aeruginosa* je opisan 1937. godine, ali je i dalje predmet brojnih ispitivanja.

LPS je glikolipid sačinjen od 3 glavna dela: hidrofobnog lipida A, hidrofilnog polisaharidnog lanca jezgra i hidrofilnog bočnog polisaharidnog lanca (Slika 4.). Lipid A, koji je odgovoran za toksičnost molekula i proksimalni region jezgra su relativno stabilne strukture, dok je bočni lanac varijabilne strukture²⁰. LPS je prilično stabilan prema povišenoj temperaturi, kiselinama, alkalijama i agensima koji izazivaju denaturaciju proteina⁷.



Slika 4. Građa LPS *P. aeruginosa* (Jones, 1979.)

Jezgro LPS *P. aeruginosa*, kao i kod ostalih Gram negativnih bakterija, ima spoljašnji i unutrašnji deo. Polisaharid jezgra je bogat monosaharidima i fosfatnim ostacima. Središnji deo jezgra sadrži L-glicero-D-mano-heptozu i 3-deoksi-D-mano-oktulosoničnu kiselinu. Spoljašni region jezgra oligosaharida sadrži D-glukozu, L-ramnozu, D-galaktozamin i L-alanin. Identifikovani su i 2-amino-2-deoksiglukoza, 2-amino-2-deoksigalaktoza, 2-amino-2,6-dideoksiglukoza, 2-amino-2,6-dideoksigalaktoza, 2-amino-2-deoksigalakturonska kiselina i 2,3-2,3-dideoksimanuronska kiselina^{7, 21}.

Chester sa saradnicima je ispitivao LPS 15 sojeva *P. aeruginosa* i došao do podataka da svi sadrže glukozu, ramnozu, glukozamin, galaktozamin, 2-keto-3-deoksioktoničnu

kiselinu i alanin. Mnogi sojevi su sadržali dodatne šećere i amino komponentne. Na osnovu hemijskih karakteristika i produkata metabolizma LPS je klasifikovan u dvanaest grupa, od kojih devet ima jednu serogrupu, a tri dve serogrupe. Svi LPS su imali istu masnu kiselinu 3-OH 10:0, 2-OH 12:0, 3-OH 12:0 i svi su aglutinimali sa homolognim antiserumom²².

LPS se sintetiše van ćelijskog zida, tako što se polimerizovani polisaharid veže za lipid preko 2-ketodeoksioktanata. LPS je osnova za sintetisanje O antigena, koji je somatski antigen *P. aeruginosa*. Visoka antigenska specifičnost je uzrokovana redosledom monosaharida. Šećeri, njihove sekvence i način vezivanja određuju serološku O specifičnost soja. Sojevi koji imaju O antigen su tipični. Oni obrazuju glatke kolonije⁷.

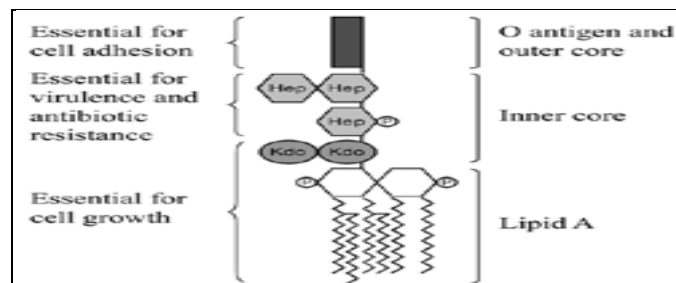
O antigen može varirati u težini. Molekularna masa nije najvažnija, može biti od 1000Da do 4000 Da. U čistijoj formi, u prisustvu površinski aktivnih agenasa i odsustvu dvovalentnih katjona, bakterijski endotoksin se sastoji od makromolekula mase 10 kDa do 20kDa. U odsustvu površinski aktivnih agenasa i prisustvu dvovalentno sekvencioniranih agenasa kao što je etilendiaminotetrasirćetna kiselina (EDTA), LPS se prestrukturira u strukture molekularne težine oko 1000 kDa. Ovo se dešava molekulima LPS bakterija u tečnoj sredini. U prisustvu dvovalentnih katjona, kao što su Mg ili Ca, formiraju se strukture koje mogu da prolaze kroz membrane veličine 0,2 μm , a ne prolaze kroz pore veličine 0,025 μm ⁷.

Osnovne razlike u strukturi LPS *P. aeruginosa* i drugih Gram negativnih bakterija uključuju građu masnih kiselina i visok nivo fosforilacija. Neobično visok sadržaj fosfata u LPS je delom objašnjen prisustvom relativno visokog procenta R forme molekula, kojima nedostaje O specifični lanac. Dok LPS enterobakterija sadrži 4 fosfatna ostatka u regionu jezgra i dodatna 2 ili 3 u lipidu A, LPS *P. aeruginosa* može sadržati 10 ili više fosfatnih ostataka po molekulu⁷.

2.4.2. ULOGA LPS U FIZIOLOGIJI I INFEKCIJAMA IZAZVAZNIM *P. AERUGINOSA*

LPS ćelijskog zida *P. aeruginosa* značajno utiče na način života bakterije. Doprinosi integritetu spoljašne membrane i štiti od žuči i lipofilnih antibiotika. Osim što je zaštitna barijera, on je medijator u odnosu bakterije i ćelija domaćina, jer utiče na vezivanje bakterije za različite površine.

Uloga koju LPS ima u nastanku i održavanju patološkog procesa u tkivu domaćina je višestruka (Slika 5.). Lipid A je neophodan za ćelijski rast. Polisaharidi jezgra su važni u spečavanju prodora antibiotika u bakterijsku ćeliju. Važni su faktori virulencije. Polisaharidi spoljašnjeg jezgra učestvuju u adherenciji bakterije.



Slika 5. Prikaz pojedinih delova LPS kao faktora virulencije *P. aeruginosa*

<http://www.science.mcmaster.ca/biochem/faculty/junop/LPSBiosynthesis.htm>

Lipid A je toksičan i naziva se endotoksin, jer ostaje u bakterijskoj ćeliji, a oslobađa se samo razaranjem ćelije. Endotoksini su slabiji antigeni u odnosu na egzotoksine. Endotoksin za razliku od egzotoksina ne pokazuje afinitet prema pojedinim vrstama tkiva domaćina, pa zbog toga i ne izaziva specifične kliničke manifestacije⁷.

LPS *P. aeruginosa* je manje toksičan nego kod bacila iz porodice *Enterobacteriaceae*¹⁴. LPS može da izazove su sledeće simptome bolesti: povećanje telesne temperature, leukocitozu, trombocitopeniju, diseminovanu vaskularnu koagulaciju, povećanje permeabilnosti kapilara, što dovodi do hipotenzije, krvarenje u plućima, crevima i drugim trbušnim organima, prostraciju, dijareju, kongestiju, edem, šok i smrt⁷. Endotoksin je veoma važan u izazivanju sepse.

Hipotenzija, koja vodi u septični šok, često prati bakterijemiju izazvanu *P. aeruginosa*. Vaskularna intima krvnih sudova obolelih oslobađa endotelijum oslobađajući faktor (EDRF), što izaziva vazodilataciju vaskularnih glatkih mišića. Aktivna komponenta EDRF su radikali azot oksida (NO)²³. Evora sa saradnicima je dokazao dejstvo LPS na endotelijum zavisnu relaksaciju femoralne, renalne, mezenterične, hepatične i epikardijalne arterije pasa. Izlaganje endotoksinima stimuliše ekspresiju inducibilne forme NO sintetišućeg enzima i dejstvo na glatke mišićne ćelije periferne vaskulature. Posledica je tako veliko povećanje produkcije NO da se vazodilatacija ne može neutralisati primenom vazokonstriktivnih sredstava. Glikokortikoidi, koji inhibišu ekspresiju inducibilne forme NO, izazivaju kasnije opadanje vaskularnog tonusa i hipotenziju. LPS deluje na perifernu

vaskulaturu tako što stimuliše endotelne ćelije da produkuju NO iz L-arginina. U ranim fazama sepse, vaskularni glatki mišići ne doprinose NO sintezi i reaguju na dejstvo vazokonstriktora. Međutim, u kasnijim fazama, hipotenzija može biti ireverzibilna. NO deluje na krvne sudove preko cGMP zavisnog mehanizma, tako da ne reaguju na vazokonstriktorne supstance²³.

Kao glavni antigen, LPS je uključen u različite reakcije domaćina i bakterije. Serotip specifični imunski odgovor nakon infekcije je usmeren prema LPS²⁴. LPS štiti Gram negativne bakterije od fagocitoze i lize. Pomaže bacilu u izbegavanju imunskog odgovora. Endotoksin snažno utiče na funkciju leukocita. Vezuje se za polimorfonuklearne neutrofile leukocite (PML) i utiče na njihovu adherenciju, agregaciju, hemotaksu, izaziva oksidativne poremećaje i oslobađanje lizozomalnih enzima. Kharazmi²⁵ je ispitivao efekat LPS *P. aeruginosa*, izolovanih kod cistične fibroze (CF) na PML i monocite. Dokazano je da LPS povećava adherenciju i agregaciju leukocita i deluje inhibitorno na hemotaksu i pokretljivost leukocita.

Antitela prema O polisaharidima su efikasnija nego antitela prema drugim komponentama LPS. U eksperimentima koje je izvodio Terashima sa saradnicima²⁶, korišćena su IgM antitela za koja se smatra da prepoznaju region spoljašnjeg jezgra, naročito neredukujući kraj ostatka L-ramnoze. Antitela su reagovala kao opsonini i efektivno su štitila eksperimentalne životinje od bakterijemije. Sva antitela su se vezivala za epitope na LPS i bila su aktivna jedino protiv specifičnih serotipova. Dokazano je da IgM antitela reaguju protektivno protiv dva ili više Fisherovih imunotipova. Antitela su delovala protektivno protiv A, F, G, H i K, a ne protiv M serotipa. Pokazano je da ista antitela deluju protektivno u odnosu na infekcije izazvane *E. coli*.

Nivo IgG antitela protiv *P. aeruginosa* je viši kod bolesnika sa hroničnom infekcijom nego kod onih koji nisu inficirani ili su intermitentno inficirani. Zbog položaja na površini bakterijske ćelije i antigenih karakteristika, LPS se često ispituje zbog pravljenja vakcina²⁷.

Predhodna vakcinacija primenom partikula LPS utiče na adherenciju *P. aeruginosa* na kornealne epitelne ćelije. Flecher²⁸ je ispitivala ulogu LPS u vezivanju *P. aeruginosa* za korneu i kontaktna sočiva. *P. aeruginosa* izaziva progresivnu ulceraciju kornee koja može da dovede do gubitka vida. Prva faza bolesti je inokulacija bakterije u oko. Rezultati pokazuju da bacili iz kolonija u S formi bolje adherišu na kontaktna sočiva i na korneu pacova, nego iz R forme.

Polisaharidi čine osnovu biofilma. Egzopolisaharidalginat je linearni kopolimer β -1,4 D-manuronične kiseline i L-glukuronske kiseline²⁹. Odnos kiselina u biofilmu varira i određuje viskoznost biofilma. Egzopolisaharidi se obilnije stvaraju na podlogama sa glicerinom i u prisustvu vodonik peroksida. *Pel* i *psl* su genski lokusi odgovorni za formiranje egzopolisaharida. Visokomolekularni polisaharidi sa O specifičnošću su identifikovani iz biofilma sojeva izolovanih iz nežive prirode, imunokompromitovanih bolesnika i kod CF.

P. aeruginosa produkuje 2 različite vrste LPS, označene kao A i B. O antigen tipa A sadrži kraće lance, a sačinjen je od homopolimernih ponovljenih lanaca D-ramnoze²⁰. B tip LPS je visokomolekularan, sačinjen od heteropolimera, ponovljenih jedinica od di do pentasaharida, sačinjenih od različitih monosaharida²¹. Na osnovu razlike u građi B antigena *P. aeruginosa* se deli u 20 različitih serotipova, što je definisano u International Antigenic Typing Schemi³⁰⁻³².

Genetska ispitivanja i definisanje gena vezanih za produkciju LPS omogućavaju bolje razumevanje sinteze A lanca polisaharida. Curiae³³ je definisao *gca* gen koji učestvuje u sintezi LPS. Bélanger sa saradnicima³⁴ je ispitivala organizaciju *wbp* gena i karakteristike genskih klastera koji učestvuju u sintezi LPS serotipa P6 *P. aeruginosa*. Klasteri sadrže *wzx* gene (koji kodiraju O antigen, lipaze/translokaze) i *wzz* gene (koji moduliraju dužinu lanca) zavisne od *wzy* gena. Komplet *wzy* gena nije nađen u klasteru, a nađena su 4 sintetička gena: *wbpO*, *wbpP*, *wbpV* i *wbpM* i 4 putativna glikoziltransferazna gena: *wbpR*, *wbpT*, *wbpU* i *wbpL*. Da bi se dokazala njihova uloga u biosintezi LPS generisane su nulte mutante *wbpO*, *wbpP*, *wbpV*, *wbpL* i *wbpM*. Mutacije u svakom od ovih gena su imale za posledicu poremećaj u biosintezi B tipa LPS. *WbpL* mutantni sojevi su imali poremećaj u produkciji A i B tipa LPS. *WbpL_{O6}* je bifunkcionalni gen koji učestvuje u genezi A i B tipa LPS. *WbpV* je homologan sa *wbpK* klasterima za P5 serotip.

Rahim²¹ je ispitivao gene koji učestvuju u produkciji L-ramnoze. L-ramnoza je komponenta jezgra LPS, nekoliko antigena polisaharida i surfaktanta ćelijskog zida. Klonirana su i ispitivana četiri gena odgovorna za biosintezu L-ramnoze (*rmlBDAC*). *RmlC* mutante su ugrađene u LPS P5 i P6 serotipova. LPS je ekstrahovan i ispitivan SDS-PAGE Western imunoblot analizom. Rezultati ispitivanja pokazuju da je L-ramnoza receptor na jezgru LPS za vezu sa O polisaharidom.

Ako se divlji sojevi bakterija izlože dejstvu UV svetlosti ili se izlože mutagenim supstancama dolazi do mutacije gena. Mutacije koje nisu letalne dovode do formiranja hrapavih kolonija, koje se ne nalaze u prirodi³⁵.

Geni koji kodiraju formiranje LPS mogu biti promenjeni, pa će LPS biti sa kraćim lancima. Nastaju mutante koje su označene kao Ra, Rb, Rc i Re. Ra i Re su mutante sa najdužim i najkraćim lancem. Najekstremnije mutante su Re, koje daju LPS sačinjen od lipida A i 2-keto-3-deoksioktanata, kao jedine komponente jezgra³⁵.

2.4.3. LIPID A ČELIJSKOG ZIDA *P. AERUGINOSA*

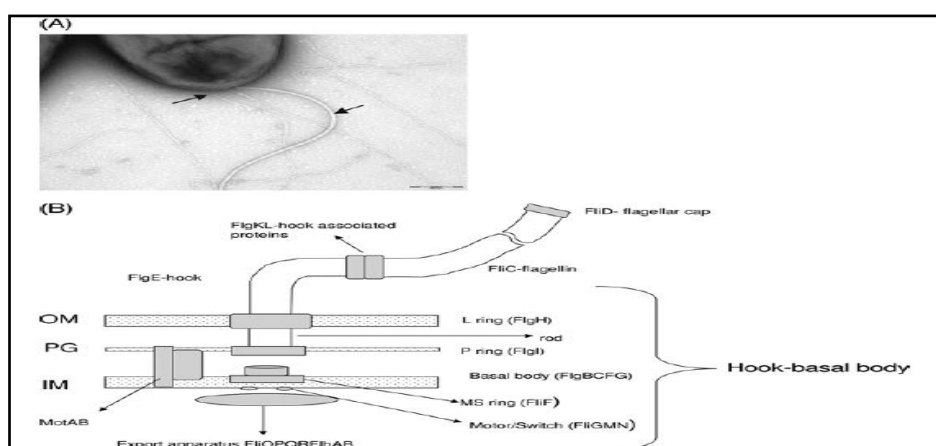
Uprkos razlikama u detaljima, osnova lipida A LPS *P. aeruginosa* je slična lipidima LPS enterobakterija. Lipid A je građen od serije disaharidnih jedinica glukozamina esterifikovanih dugim lancima masnih kiselina. Lanci masnih kiselina su međusobno povezani pirofosfornim vezama. Razlikuju se od lipida drugih Gram negativnih bakterija, po tome što 4-amino-4-deoksiarabinoza nije nađena kod LPS *P. aeruginosa*³⁶.

LPS *P. aeruginosa*, kao većina LPS, sadrži hidroksilne i nehidroksilne masne kiseline. Struktura masnih kiselina je vrsno specifična i relativno slična drugim pseudomonadama. Kvantitativne varijacije nisu od fundamentalnog značaja. Zajedničko sa hidroksilnim kiselinama LPS drugih bakterija je da 3-hidroksi kiseline *P. aeruginosa* pripadaju D seriji, dok 2-hidroksidodekanična kiselina ima L konfiguraciju. Struktura masnih kiselina je slična onima kod *Azomonas agilis*, *Chromobacterium violaceum*, *Rodomicrobium vannielli*, ali se razlikuje od enterobakterija. Enterobakterije sadrže malo ili ne sadrže 2-hidroksilne kiseline i samo jednu 3-hidroksilnu kiselinu³⁶.

Odvajanjem hidrolizom polisaharidnog lanca iz LPS oslobađa se lipid A u citotoksičnoj difosforilnoj formi ili manje u toksičnoj monofosforilnoj formi. Duži polisaharidni lanac ima relativno niži sadržaj lipida A koji se mora prečistiti iz velike količine produkata hidrolize. LPS sa kraćim lancima iz mutantnih sojeva se koristi za sintezu produkata lipida A. Odvajanje lipidnog dela iz lipida A rezultira u detoksikaciji LPS sa nivoom endotoksina 10000 puta nižim nego kod početnog LPS³⁷.

2.4.4. FLAGELE

Flagele *P. aeruginosa* imaju tri dela: bazalno telo, zakrivljeni deo i filament (Slika 6.). Bazalno telo je ugrađeno u bakterijsku ćeliju i ima tri prstena. Zakrivljeni deo je fleksibilan. Filament čine polimerizovani monomeri flagelina. Pokriveni su flagelarnom kapom, koja je sačinjena od mucina adhezina (FliD)³⁸. Postoje a i b tipovi flagela u zavisnosti FliC flagelarnog gena³⁹. Tipovi se razlikuju po strukturi glikosijalina i molekularnoj težini. U okviru tipa a postoje subtipovi A1 i A2^{40,41}. Neki sekvencionirani genomi serotipova P1 i P14 imaju tip b flagelina⁴¹. Većina kliničkih izolata ima tip a flagelina.



Slika 6. A. Prikaz flagela i fimbija koje su označene strelicom pod elektronskim mikroskopom. B. Shematski prikaz strukture flagela *P. aeruginosa*, koji pokazuje flagelarne proteine i njihovu lokaciju (Jyot, 2008.)

Flagele su važne u ranim fazama bolesti zbog pričvršćivanja bacila na ciljna tkiva i prodora u tkivo domaćina. Ako se eksperimentalno na modelu miša dodaju pasivno anititela prema flagelama, ona štite od infekcije izazavane *P. aeruginosa*⁴². Gubitak flagela kod bakterija dovodi do gubitka virulentnosti⁴³. Ako se hemijski izazovu mutacije, uočena je manja virulencija mutantnih nego divljih sojeva na modelu opekotine kod miša. Nepokretni sojevi proliferišu na opekotini, ali se ne javlja bakterijemija. Divlji sojevi izazivaju karakterističnu sistemsku infekciju miša. Ako se izazove pneumonija kod neonatusa miševa inflamacija je manje izražena, ako su izročnici mutantni sojevi. FliC mutante izazivaju fokalne inflamatorne lezije, ali se bakterija ne širi kroz pluća kao kod divljih sojeva⁴⁴.

Flagele deluju višestruko u patogenezi inflamacija izazvanih *P. aeruginosa*. U provodnim putevima pluća flagelin se veže za toll like receptor (TLR5). Posledica je produkcija i oslobađanje proinflamatornih citokina, koji privlače PML u inflamirano tkivo. Proces se označava i kao hiperinflamatorni zbog velikog broja neutrofilnih leukocita, koji se akumuliraju i izazivanju oštećenje pluća⁴⁵. Flagelin se vezuje za sluz u respiratornom traktu, što olakšava eliminaciju bacila iz respiratornog trakta. Služi i kao ligand za makrofage. Flagelin utiče na produkciju IL-8, pa je produkcija ovog interleukina manja za 50% kod mutantnih sojeva u odnosu na divlje. Slični podaci su dobijeni u ispitivanju Ramphal⁴⁶. Praćena je patogenost mutantnih sojeva bez flagela, sojeva sa paralizovanim flagelama i sojeva sa flagelama bez glikosijalina. Nepokretne mutante su bile manje patogene i najčešće su izazivale fokalne infekcije.

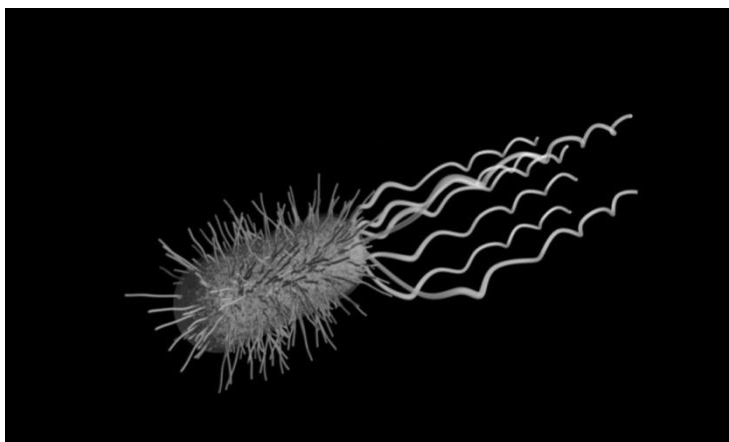
Formiranje flagela je genetski određeno i strogo regulisano. U mukopurulentnom mukusu, kod obolelih od CF i bronhiektazija bacil smanjuje produkciju flagelina⁴⁷. Ova reakcija bacila isključuje potencijalni imunski odgovor posredovan reakcijom flagelina i TLR5. U obolelim plućima flagele, ako su prisutne u manjoj količini, stimulišu imunski sistem. Ako ih ima više, mogu da dovedu do letalnog ishoda. Elastin oslobođen iz PML deluje proteolitički na flagelin, pa se oslobađaju veće količine FlgM, koji se akumulira i dovodi do supresije stvaranja flagelina. Posledica je akumulacija PML na mestu infekcije. Ciklične egzacerbacije kod CF se mogu povezati sa povećanom produkcijom ili represijom produkcije flagelina⁴⁸.

Monoklonalna antitela miša prema tipu a i b flagela *P. aeruginosa* pružaju specifičnu profilaktičku i terapijsku zaštitu mišu u modelu opekotina i sepse^{49,50}. N-terminalni domen flagelina nosi važan bioaktivni domen za vezivanje antitela, što se može iskorisiti u terapiji infekcija izazvanih *P. aeruginosa*⁴². Imunoterapijom sa anti-flagelarnim antitelima prema N-terminalnom kraju flagelina se smanjuju morbiditet i mortalitet u modelu opekotina kod miša⁵¹. Terapijski efekat je bolji, ako se u terapiji koriste karbapenemi i aminoglikozidi sa anti-flagelarnim antitelima⁵².

Flagele nose flagelarni, termolabilni antigen (H), koji se koristi u tipizaciji flagelarnog antigena.

2.4.5. PILI

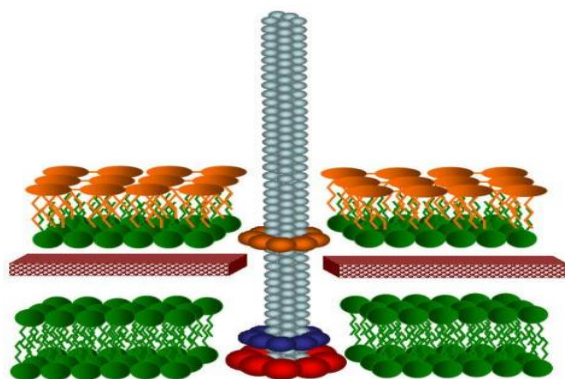
P. aeruginosa ima dve vrste pila. Svi sojevi imaju duge i tanke pile koji su uglavnom smešteni unipolarno, tačnije subpolarno. Lateralne pile imaju samo neki sojevi. Oni su deblji i obično nose plazmide. Pili *P. aeruginosa* su fleksibilni filamenti, polimeri pojedinačnih genskih produkata zvanih pilini (PilA) čija funkcija zahteva produkte najmanje 30 gena⁵³. Pilin ima hidrofobni aminoterminalni kraj i hidrofilni spoljašni protein, sa varijabilnim domenom, adaptiranim za različite funkcije^{54,55} (Slika 7.)



Slika 7. Prikaz flagela i pila *P. aeruginosa* (elektronska mikroskopija),
(kronos.com)

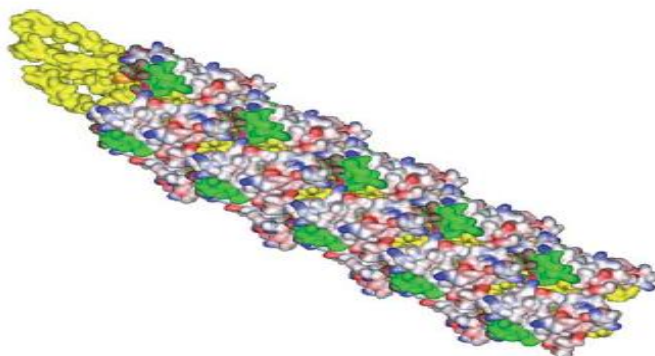
2.4.5.1. STRUKTURA PILA

Pili *P. aeruginosa* su na prvi pogled jednostavne građe. Izgrađeni su od asimetričnog linearnog vlakna heliksne strukture, sačinjenog od strukturalnog proteina PilA (Slika 8.).



Slika 8. Struktura pila (http://cronodon.com/BioTech/Bacteria_pili.html)

Posle decenija ispitivanja prihvaćen je levo zaokrenut, tri puta zavijen model pilarne strukture. Pili imaju tri receptor vezujuća proteina, kao tri izolovana filamenta, koja se završavaju u vrhu pila i asijalo-GM1. Ranije se smatralo da se N-terminalni α -heliks nalazi na bazi pilusa, a sada se predpostavlja, da je N-terminalni α -heliks na vrhu pila. Dokazano je da pilin receptor domen sadrži 128-144 rezidua amino kiselina. PilA domen je neophodan i dovoljan za vezivanje za epitelne ćelije⁵⁶ (Slika 9.).



Slika 9. Levi tri puta zavijeni model PAK proteina nanotuba (Craig, 2004.)

Parge je predpostavio da je centralna zona pilusnog vlakna sačinjena od vezanih N-terminalnih α -heliksa, koji posreduju u spajanju vlakana, dijametra oko 10 Å. Odsecanje inicijalnih 28 aminokiselinskih rezidua strukturalnih proteina pilina dovodi do odsecanja monomernog pilina. Uloga N-terminalnih α -heliksa je da učestvuju u transportu subjedonica pilina. Izlaganje monomera PilA alkil tiolu dovodi do konformacionih promena u monomerima pilina, što povećava dužinu pilina za stotine mikrometara⁵⁵.

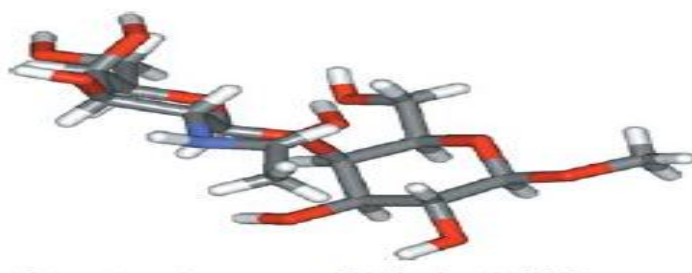
Pili su čvrste, ali dinamične strukture, koje imaju sposobnost retrakcije i ekstenzije. X zraci pokazuju šuplje cilindre sa spoljnim dijametrom 52 Å, unutrašnjim 12 Å i grubim prstenom prečnika 31 Å⁵⁷. Cilindri su od hidrofobnih rezidua, sačinjenih od 5 subjedonica u nizu⁵⁸, pakovanih u heliksnu strukturu^{59,60}. Kreću se "brzinom" oko $0,5 \mu s^{-1}$ sa tenzionom silom oko 10 pN bez opterećenja, koja fizički vuče ćeliju preko čvrste površine. Pojedinačnom retrakcijom pilus može proizvesti silu oko 100 pN i izdržati pritisak oko 120 pN po pilusu, pre nego što pukne. Pili imaju sposobnost da kontrolišu snagu retrakcije i ekstenzije sensorima snage koji limitiraju prekomernu silu. Ovaj senzor je uključen u proces hemotakse. Čvrstinu omogućavaju hidrofobne, jonske veze među subjedinicama. Brzina retrakcije i

esktenzije pila je neuobičajeno velika, oko 1000 pilin strukturalnih subjedinica se pomera sa baze pilusnog vlakna u s^{-1} . Ovo ukazuje da se svaki od tri pilusna filamenata retrahuje ili izduži sa oko 333 monomera u $s^{-1(61)}$.

Na osnovu aminokiselinskih sekvenci postoji pet filogenetskih grupa pilina označenih od I do V. Pili tipa IV se na osnovu težine i aminokiselinskog niza dele na subklase IVa i IVb. Pili tipa IVa se sreću kod većeg broja Gram negativnih bakterija⁵⁷. Pili tipa IV učestvuju u proseku adherencije, olakšavaju kretanje bacila i omogućavaju rojenje.

2.4.5.2. ULOGA PILA U BIOLOGIJI *P. AERUGINOSA*

Pili poboljšavaju adherenciju na mukozne površine, epitelne ćelije, ali i nežive površine⁵⁵. Vezuju se za tip specifične receptore epitelnih ćelija sisara⁶². Učestvuju u adherenciji za polarizovane i nepolarizovane epitelne ćelije vezivanjem za glikosfingolipide raspoređene u ćelijskoj membrani epitelnih ćelija. Ovi glikolipidi služe kao receptori adhezina na humanim tkivima pluća. *P. aeruginosa* se veže za asijalogangliozide aGM1 i aGM2, ali ne za sijaloidnu formu GM1 i GM2. Bacil adheriše za bronhijalne epitelne ćelije, tako što pili prepoznaju disaharide (GalNAc β 1–4Gal) na aGM1 i aGM2 (Slika 10.). Vezivanje je prva stepenica u razvoju inflamatornog procesa. Deluje kao okidač za produkciju proinflamatornih enzima u epitelnim ćelijama⁵⁵. Pili su stabilni i rezistentni na depolimerizaciju i razgradnju *in vitro*. Sintaza, transport i razgradnja pila tipa IV je kompleksna i uključuje veliki broj izolovanih, strogo kontrolisanih genskih produkata.



Slika 10. Struktura receptora GalNAc β 1–Gal (β -d-N-acetil-galaktozamin (1-4)- β -d-galaktoza (Seth, 2012.)

Pili su trovalentni pri vezivanju za receptore. Ispitivano je vezivanje K122-4 pila, monomenih pila i nanotuba na humane epitelne ćelije u različitim koncentracijama. Pili su se vezivali mnogo efektivnije od monomernih pila i nanotuba. Koncentracija PilA u pilima je mnogo manja nego kod monomernih pilina, ali je aviditet viši. Valenca pila i nano tuba je

slična, ali nije ista. Vezivanje monomera i nano tuba je bilo isto, iako je valenca nanotuba viša. Rezultati ukazuju da se funkcija vezujućeg domena pila razlikuje od domena monomera pila i nanotuba. Vezujući domeni su trovalentni, pa se postavlja pitanje, kako se simultano vezuju za tri različita receptora, a da α -heliks ne proдре u membranu domaćina. Struktura ukazuje da vezivanje počinje na uglu od jednog, pa drugog vezujućeg domena, a postoji mogućnost inicijalnog simultanog angažovanja odvojenih receptora⁶³.

Pili osiguravaju čvrsto vezivanje za površinu ćelija domaćina, tako da uobičajeni protok tečnosti ne skida kolonije sa površine. Trzajući pokreti po čvrstim površinama *in situ* su obično "brzine" 2 mm/h. Energetski su zahtevni, prilično kontrolisani i omogućavaju hemotaktičnu aktivnost. Pri tome pilus mora da se veže za površinu i inicira retrakciju. Drugi pilus se ispravlja, veže za površinu dalje od prvog i sakuplja se. Prvi pilus se zatim odvaja od površine, za koju je bio vezan i omogućava sledeće pokrete. Odvajanje od površine je isto tako važan proces kao i vezivanje⁶⁴. Mutante koje su deficitarne u YpilU mogu se vezati za metalnu površinu, ali se ne mogu odvojiti. Odvajanje je takođe fiziološki regulisano i kontrolisano⁶³.

Kolonije koje formiraju sojevi *P. aeruginosa*, koji imaju pile, su sa neravnim ivicama zbog trzajućih pokreta. Obrnuto, kolonije mutanti bez pila imaju glatke ivice, jer nema trzajućih pokreta⁵⁵. Mutacije pojedinih gena za pile onemogućavaju bacilu fenomen rojenja. Pili funkcionišu kao receptori za vezivanje i prodor bakteriofaga. Važnost pila tipa IV u biologiji *P. aeruginosa* se smatra toliko bitnom, da postoje pokušaji pravljenja vakcina protiv tog dela bakterijske ćelije.

2.4.5.3. POKRETLJIVOST

Pseudomonas ima sposobnost da se kreće na tri različita načina: da pliva, kreće se rojenjem i trzajućim pokretima⁶⁵. Plivanje omogućavaju flagele, rojenje flagele i pili⁶⁶, a trzajuće pokrete pili⁶⁷. Bacili plivaju u tečnoj sredini, roje u vlažnoj i na čvrstim površinama, a trzajućim pokretima se pomeraju na čvrstoj podlozi.

Bakterije plivaju kad postoji tečna, dovoljno debela prevlaka. Pokreti u tečnoj sredini, plivanjem ili duž zidova, mogu se podeliti u nekoliko tipova. Divlji tipovi *Pseudomonasa* se obično kreću plivanjem sa povremenim premetima. Većina bakterija se kreće "brzinom" od

$20 \mu\text{s}^{-1}$ do $50 \mu\text{s}^{-1}$. Na polučvrstim podlogama (0,2 do 0,4% agar) bacili plivaju kroz vodom ispunjene kanale, pa formiraju hemotaktične prstenove⁶⁸.

Rojenje se češće sreće na čvršćim površinama. Ako je tečna prevlaka relativno tanka bakterije se izdužuju, formiraju više flagela, kreću se koordinisanije i nastaje rojenje. *Pseudomonas sp.*, koji ima mogućnost rojenja, može imati više flagela ili nemati ni jednu. Fenomen rojenja koji bacil pokazuje je veoma važan u formiranju biofilma i patogenezi bolesti. PilT i PilU su proteini, koji su važni u rojenju i imaju ulogu u citotoksičnim reakcijama sa epitelnim ćelijama⁶⁵.

Brza kolonizacija površina, u uslovima kad ima dovoljno hranljivih materija, se odvija procesima koji se opisuju kao trzajući pokreti. Trzajući pokreti su vrsta translokacije na suvoj, čvrstoj površini, kod koje je mikromorfološki obrazac organizovan⁶⁹. Omogućavaju *P. aeruginosa* da se kreće brže i dalje preko čvrste površine, nego što bakterije plivaju u slabije viskoznoj sredini. Osnova trzajućih pokreta je da se pili čvrsto vezuju za površinu. Ovi pokreti su važni pri kolonizaciji domaćina, formiranju biofilma, patogenezi bolesti i opstanku bacila uopšte⁶⁷. Formiraju se ravne, široke kolonije grubog izgleda sa malim perifernim izdancima, koji se sastoje od tankog sloja ćelija⁷⁰.

Adherencija *P. aeruginosa* za nežive, a naročito metalne površine i njihova kolonizacija su od presudnog značaja za rasprostranjenost bacila u neživoj prirodi i što je važno u humanoj patologiji, u bolničkoj sredini. Slični procesi se dešavaju i pri kolonizaciji sistema za vodosnabdevanje.

Osnova pokreta *P. aeruginosa* je detekcija razlike u nivou koncentracija hemijskih supstanci u okruženju bacila. *P. aeruginosa* se kreće se u pravcu ili suprotno od detektovane materije. Podsticaj pokreta kod *P. aeruginosa*, kao i kod drugih bakterija, su hemijski nadražaji, pre svega pozitivna hemotaksa^{69,71}. Pravac kretanja zavisi od toga da li je neka supstanca za njih hemoatraktant ili repelent. Neka istraživanja pokazuju da hemoatraktivnost može povećati gustinu populacije u istom okruženju, dok nasumična pokretljivost smanjuje gustinu mikroorganizama u nekoj populaciji.

Pokretljivost omogućava optimalnu kolonizaciju, prebacivanje u povoljniju sredinu i izbegavanje toksičnih supstanci. Različite vrste pokretljivosti omogućavaju bakterijama da stvore simbiotičke i patogene asocijacije sa biljkama i životinjama. Sinteza i kontrola pokreta kroz hemotaktički signalni transdukcioni sistem za kretanje je višestruka. Utrošak energije pri

pokretljivosti je značajan zbog sinteze različitih komponenti flagela i pila. *P. aeruginosa* ima kompleksan sistem hemotakse, koju omogućavaju nekoliko setova *che* i MPC gena⁶⁹.

U aerobnim i anaerobnim uslovima nitrati i nitriti su snažni hemoatraktanti za *P. aeruginosa*. Amino kiseline, neorganski fosfati i etilen takođe deluju hemotaktično na bacil. Hemotaktični odgovor se stimuliše redukcijom fosfata. *P. aeruginosa* ima dva hemotaktična proteina za fosfate koji reaguju na različitim koncentracijama fosfora. CtpL služi kao glavni hemoatraktant kada je koncentracija fosfata niska. CtpH reaguje kada je koncentracija fosfata visoka. Hemotaktični mehanizmi za fosfor su komplikovani. Kiseonik ima na *P. aeruginosa* snažno aeroatraktantno dejstvo⁷⁰.

Hloroetilen je repelent kod divljih sojeva bacila. Kod mutanti kojima nedostaju geni za tri glavna hemosenzorna proteina, trihloroetilen je atraktant. Ista supstanca može podsticati bacil da se kreće u suprotnim pravcima, u zavisnosti od koncentracije⁷².

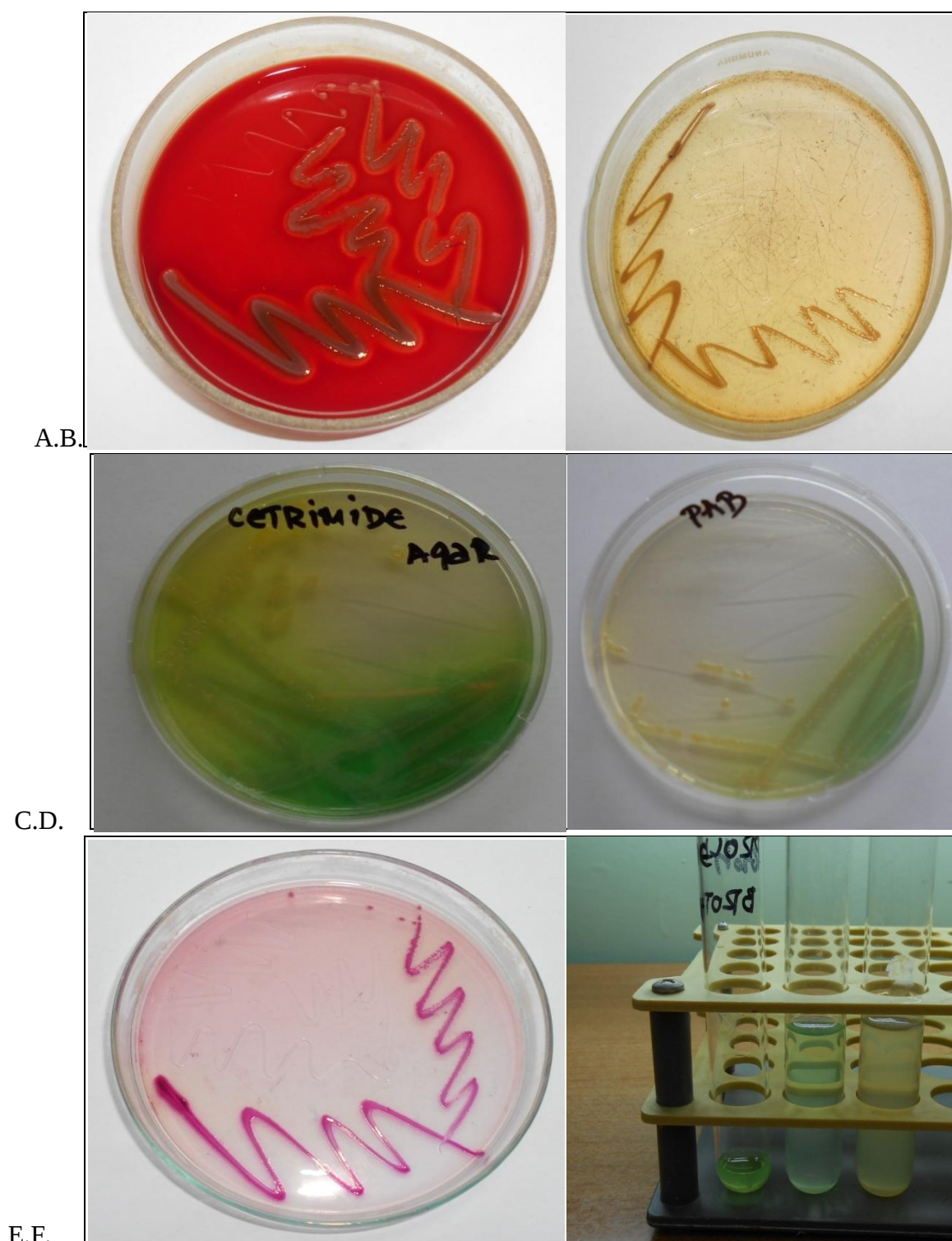
2.5.KULTURELNE KARAKTERISTIKE

P. aeruginosa je nefermentativna aerobna bakterija, koja energiju dobija oksidacijom, češće nego fermentacijom ugljenih hidrata¹⁴. Bacil može da opstane i u sredinama sa niskim koncentracijama kiseonika ili bez njega, pa ga mnogi smatraju mikroaerofilnim mikroorganizmom. Bakterija je hemoheterotrofna sa respiratornim tipom metabolizma, kod koga je kiseonik krajnji akceptor elektrona. Može koristiti kao akceptore oko 75 različitih organskih jedinjenja¹⁴. Opstaje bez kiseonika, ako se u njegovom okruženju nalaze nitrati i arginin, kao akceptori elektrona⁷³. Zahvaljujući toj sposobnosti preživljava u mnogim tkivima u ljudskom organizmu sa malo ili bez kiseonika. Ako nema dovoljno kiseonika sintetiše superoksid-dismutazu i katalazu.

Optimalna temperatura za razvoj *P. aeruginosa* je 37°C. Međutim, može se kultivisati na 42°C, ali ne može opstati na temperaturama 4°C ili 44°C¹⁴. Ova osobina se može koristiti u njegovoj identifikaciji.

Bacil ima minimalne nutritivne zahteve, pa može opstati u okruženju sa vrlo malo hranljivih sastojaka. Raste na skoro svim podlogama: hranljivom agaru, krvnim i čokoladnim agar pločama, Endo agaru, MacConcey agaru, SS agaru, glukoznom i tioglikolatnom bujonu (Slika11.). Postoje brojne specijalizovane podloge za *P. aeruginosa*: Cetrimid agar, King A i King B podloga, Pseudomonas izolacioni agar, Malahit zeleno, Pseudomonas agar baza i

podloge koje omogućavaju identifikaciju pigmenta. Na skoro svim podlogama je uočljiva produkcija pigmenta, a na podlogama sa krvlju beta hemoliza. U glukoznom i tioglikolatnom bujonu uočava se uglavnom zelekasta prebojenost. Produkcija piocijanina ispituje se na King A podlozi koja sadrži kalijum i magnezijum. Ovi joni suprimiraju stvaranje fluorescina. Na King A podlozi i *Pseudomonas chororaphis* produkuje zeleni pigment hlororafin⁷⁴. Produkcija pioverdina se ispituje na King B podlozi.



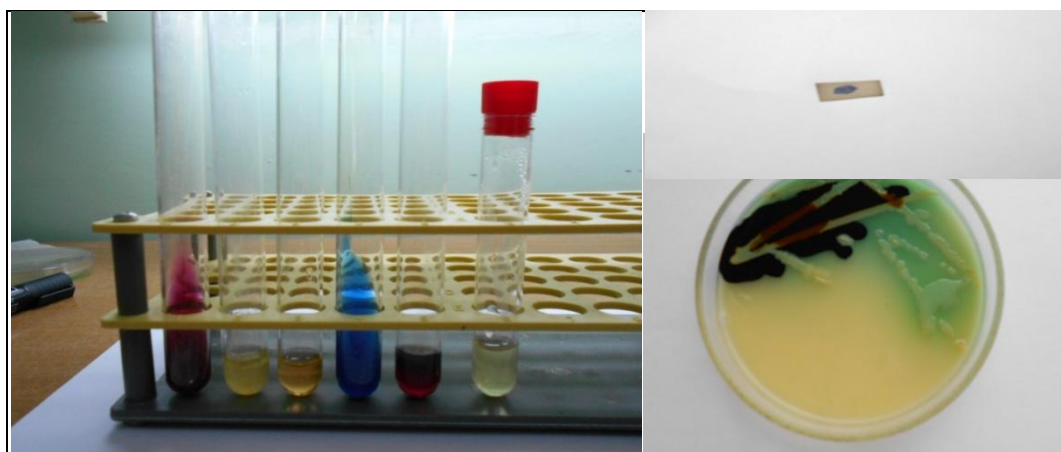
Slika 11. Kolonije *P.aeruginosa* na A. Krvnoj agar ploči, B. SS agaru, C. Ceftrimid agaru. D.Pseudomonas agar bazi, E. Endo agaru. F. Asparagin prolin bujonu, glikoznom bujonu i tioglikolatom bujonu (Stanković Nedeljković, 2015.)

Selektivnost podlogama obezbeđuju i antibiotici: nitrofurantoin, cikloheksimid i nalidiksna kiselina⁷⁴.

Polimorfizam kolonija je tipičan za *P. aeruginosa*. Bacil formira 3 vrste kolonija. Bacili izolovani iz vazduha, vode i nežive prirode formiraju krupne i hrapave kolonije. Sojevi kultivisani iz živih organizama daju sjajne, krupne i glatke kolonije. Bacili iz urinarnog i digestivnog trakta, koji prate hronične procese, daju izrazito mukoidne kolonije^{20,74}. Ako se sojevi iz sputuma ispitanika sa CF subkultivišu na hranljivom agaru gube sposobnost produkcije alginata, pa su kolonije manje sluzave. Isti soj može formirati više vrsta kolonija, naročito, nakon subkultivacije. *P. aeruginosa* formira najtipičnije kolonije na hranljivom agaru: nepravilno okrugle, razlivene, neke mutne, a druge sjajnije, slivaju se ili pokazuju fenomen rojenja. Kolonije imaju miris lipe koji neki autori opisuju i kao sladunjav, a potiče od aminoacetofenona⁷⁵.

2.6.BIOHEMIJSKE OSOBINE

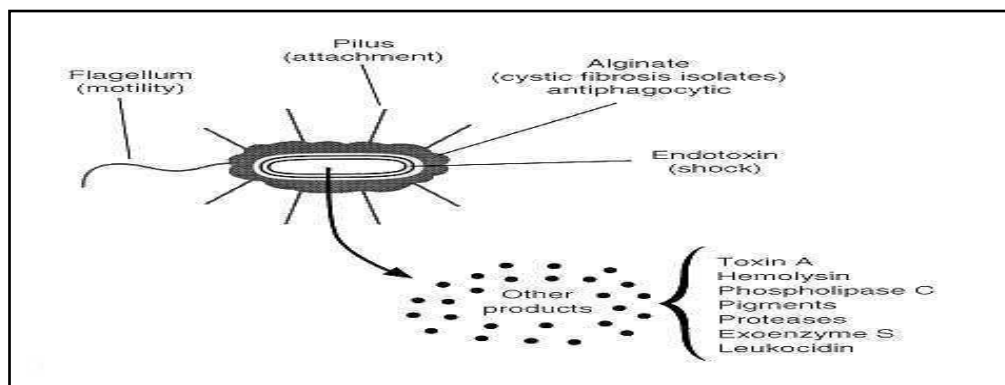
P. aeruginosa ne fermentuje šećere osim glukoze koju razlaže oksidativnim putem. Pri tome produkuje male količine kiseline, a ne oslobađa se gas. *P. aeruginosa* ne razlaže skrob. Može koristiti citrate kao jedine izvore ugljenika, razlaže želatin i produkuje lipaze. Bacil ima pozitivne testove oksidaze, katalaze i superoksidativni test. Indol i H₂S ne stvara. Metil-red i Voges Proskauer reakcija su negativne. Bacil redukuje nitrate u nitrite⁷ (Slika 12.).



Slika 12. A. Biohemijske osobine *P. aeruginosa*. B. Pozitivan test oksidaze. C. Negativan test razgradnje skroba. (Stanković Nedeljković, 2015.)

2.7.FAKTORI PATOGENOSTI

Faktori patogenosti *P. aeruginosa* su brojni i raznovrsni po hemijskoj građi i mehanizmu dejstva (Slika 13.).



Slika 13.Struktura i patogeni mehanizmi *P. aeruginosa* (Van Delden, 2008.)

Infekcije izazvane *P. aeruginosa* imaju 3 stadijuma: bakterijske adhezije i kolonizacije, lokalne infekcije i diseminovane sistemske infekcije¹⁴. Adheziju omogućavaju: pili, fimbrije, protein spoljne membrane nazvan protein F, površinski lektini, polisaharidi kapsule (glikokaliks) i egzopolisaharidi biofilma. U nastanku inflamacije važni su produkcija egzotoksina i enzima, koji oštećuju tkiva, rezistencija na fagocitozu i druge komponente imunskog sistema, ali i odbrambene karakteristike fiziološke barijere domaćina¹⁴.

Invazini su elastaza (ekstracelularna zink-proteaza), alkalna proteaza, metalo-proteaza, hemolizini (fosfolipaze i lecitinaze), citotoksin (leukocidin) i piocijanin⁷⁶. Elastaza razara imunoglobuline i serumske alfa proteine. Antifagocitna svojstva imaju kapsula, LPS i biofilm. Odbranu bacila protiv serumske baktericidne aktivnosti omogućavaju naslage sluzi, biofilm, kapsula, LPS, egzopolisaharid i proteazna aktivnost^{14,7}. Produkcija vanćelijskih faktora patogenosti je regulisana quorum sensing signalima.

2.7.1. TOKSINI

P. aeruginosa sadrži i luči toksine, enzime i biološki aktivne supstance koje su važan faktor patogenosti: endotoksin, egzotoksin A, egzoenzim S, egzoenzim T, egzoenzim U,

fosfolipaze, proteaze i faktor vaskularnog permeabiliteta⁷. Oko 90% sojeva *P. aeruginosa* produkuje egzotoksine^{14,77}.

Egzotoksin A je po hemijskoj građi termolabilni enzim. Izlučuju ga svi sojevi *P. aeruginosa*, koji luče proteinaze. Egzotoksin A je dobar antigen. U ćelijama eukariota inhibiše elongacioni faktor 2, bez koga je sinteza proteina nemoguća, pa dovodi do smrti ćelije. Slično dejstvo ima i egzotoksin *Corynebacterium dyphteriae* (*C. dyphteriae*). Toksini *P. aeruginosa* i *C. dyphteriae* se međutim, vežu za različite receptore. Egzotoksin se luči kod lokalnih i sistemskih infekcija. Toksin izaziva nekrozu na mestu kolonizacije. Sojevi koji luče toksin izazivaju patogenije pneumonije, od onih koji ga ne luče^{7,14,77}.

Egzoenzim S je ekstracelularni toksični protein. Po hemijskom sastavu je ADP ribozil-transferaza⁷⁸. Deluje na ADP eukariotskih ćelija. Egzoenzim S je adhezin za glikolipide epitelnih ćelija respiratornog trakta (RT). Ima tipičnu subjediničnu strukturu A komponentne bakterijskih toksina. Inhibiše sintezu proteina, ali drugačijim mehanizmima nego egzotoksin A. Egzoenzim je dobar antigen. Produkuje se u inficiranim opekotinama i njegovo prisustvo u krvi se može detektovati pre same bakterije. Pretpostavlja da enzim deluje na imunski sistem i tkiva, tako da predhodi kolonizaciji bakterije⁷⁹.

Ekstacelularna sluz, koja čini osnovu biofilma, je glikolipopolisaharid. Deluje letalno na miševе. Glavni je faktor patogenosti sluzavih sojeva.

Elastaze LasA, LasB i alkalne proteaze su važni egzoenzimi¹⁴. Elastin je glavna komponenta tkiva humanih pluća i odgovoran je za ekspanziju i kontrakciju pluća. Takođe, ima ga i u krvnim sudovima. Elastinolitička aktivnost *P. aeruginosa* razara elastin pluća i izaziva hemoragije. Neke elastaze cepaju elastin oka i creva. Elastaze utiču na kolagen, IgG, IgA, lizozim, komplement, bazalne membrane ćelija i mucin. Takođe inaktiviraju TNF i γ -interferon. LasA je serin-proteaza, koja deluje sinergistički sa LasB u razgradnji elastina. LasA oštećuje elastin, pa postaje osetljiv na degradaciju drugim enzimima: LasB elastazu, alkalnu fosfatazu i neutrofilnu elastazu⁸⁰. LasB je zink-metaloproteinaza koja razlaže dosta proteina. Obe elastaze su nađene u plućima bolesnika sa CF za vreme egzacerbacije. Uloga LasB elastaze u destukciji tkiva za vreme hronične faze CF je manje jasna. Elastaza razlaže i fibrin, kolagen, fibronektin na epitelu i omogućava adherenciju bacila. Organizam se brani od elastaza inhibitorom proteaza. Prisutna antitela neutrališu LasA elastaze⁸¹. Alkalne fosfataze razlažu fibrin⁸².

P. aeruginosa proizvodi više vrsta hemolizina. Sojevi izolovani iz RT proizvode raznovrsnije hemolizine nego sojevi iz nežive prirode. Hemolizini mogu biti termostabilni i termolabilni. Ove supstance citotoksičnim efektom pomažu u invaziji tkiva. Zajedno razlažu lipide i lecitin⁷.

Najviše ima podataka o sastavu i funkciji fosfolipaza, naročito o fosfolipazi C, koja je termolabilni toksin i lecitinaza (ramnolipid). Sve fosfolipaze imaju antigena svojstva. Fosfolipazu C proizvode skoro svi sojevi *P. aeruginosa*. Mehanizam dejstva je sličan dejstvu toksina *Clostridium perfringens*. Hidrolizuje lecitin, pri čemu se proizvode acetyl-holin, a ima i hemolitičko dejstvo. Fosfolipaza razara fosfolipide koji sadrže kvateralne amonijumske grupe. Fosfatidil holin je sastojak plućnih surfaktanata i osetljiv je na dejstvo ovog enzima. Osim toga, fosfolipaza lizira leukocite i ima ciliostatski efekat. Kod eksperimentalnih životinja izaziva edem, eritem i hemoragičnu kožnu inflamaciju^{83,14}.

Lecitinaza ima strukturu sličnu deterdžentima. Inhibira mukocilijarni transport i cilijarnu funkciju humanog respiratornog epitela. Rastvara fosfolipide plućnih surfaktanata čineći ih podložnijim za dejstvo fosfolipaze C. Gubitak surfaktanta može biti odgovoran za atelektatične promene koje prate hronične ili akutne infekcije⁸⁴.

Termostabilni hemolizin se sastoji od 2 molekula: L-ramnoze i 1b-hidroksidecenionične kiseline.

Hamish je ekstracelularne proteine *P. aeruginosa* P1 u stacionarnoj fazi analizirao dvodimenzionalnom gel elektroforezom i Western blot testom⁸⁵. Korišćeni su serum i 4 hronično inficirana bolesnika. U serumu sva 4 bolesnika je detektovao ekstracelularne proteine. Proizvodi najmanje 4 proteina, azurina i 3 proteaze: elastase, PrpL i PasP je koordinisana quorum sensing signalima (QS). Prisustvo etilen-diamina omogućava detekciju dodatnih proteina. Poređenje sa ekstracelularnim proteinima drugih serotipova pokazuje da su mnogi prepoznati proteini zajednički za više serotipova, a da su neki tip specifični.

Glikolipidi su toksični za alvelarne makrofage, pa ovo ukazuje na njihovu ulogu u nastanku infekcija pluća.

Smatra se da isti faktori koji učestvuju u lokalnoj degradaciji tkiva, učestvuju i u nastanku sistemskih lezija.

2.8. ADHERENCIJA

Bakterijska adherencija podrazumeva reakciju vezivanja bakterijske ćelije za receptor na površini ćelija domaćina, ali i za bilo kakvu živu ili neživu površinu⁸⁶. Proces bakterijske adherencije se razlikuje od jednostavnih procesa interakcije. Interakcije se dešavaju često i posledica su formiranja kompleksa između dve ili više interaktivnih površina. Interakcija bakterija sa supstratom uključuje specifične i nespecifične reakcije.

Adherencija zavisi od specifičnih komponenti na površini bakterije, nazvanih adhezini, koji reaguju sa supstratom ili receptorima. Pri adherenciji afinitet bakterija za vezivanje je viši u poređenju sa nespecifičnim vezivanjem. Za interakciju su potrebni viša koncentracija bakterija ili viša ekspresija receptora. Merenje specifične bakterijske adherencije za pojedine receptore zahteva korišćenje najmanje koncentracije bakterija koje se mogu registrovati. Broj bakterija, koje reaguju sa receptorima, je značajno viši pri adherenciji, nego pri nespecifičnom vezivanju pri istim eksperimentalnim uslovima.

P. aeruginosa koristi različite adhezine koji posreduju u vezivanju za žive i nežive površine: pile, alginat kapsule⁸⁷, flagele i proteine spoljne membrane⁸⁸. Postojanje većeg broja alternativnih adhezina ukazuje da je adherencija kritična ili u najmanju ruku veoma važna za bakteriju. Nepilusne adhezin-receptor interakcije su nižeg afiniteta i one čine manje od 10% ukupnih reakcija vezivanja⁸⁹. Prečišćeni pili i cele bakterijske ćelije su u konkurenciji za adherenciju za bukalne ćelije⁹⁰. Ove reakcije se ne javljaju u početnim fazama infekcije, kad je nivo bakterijske koncentracije nizak.

P. aeruginosa se vezuje za epitelne ćelije vrhom pila. Purifikovani pili se ne mogu povezivati međusobno ili sa ćelijama domaćina⁹¹. Pili specifično prepoznaju disaharid β -D-N-acetil-galaktozamin(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-galaktoza (GalNac-Gal) receptora na površini ćelija domaćina⁵⁶. Kad se vežu za GalNac-Gal ili unakrsno reagujuća antitela struktura peptida se ne menja. Interakcija zavisi od hidrofobne površine receptora. Adherencija je intenzivnija pri povećanju hidrofobnosti C₈ alkil veze sintetičkih analoga disaharida⁹². Strukturalna osnova, zbog koje postoji povišen afinitet pila prema hidrofobnim analozima receptora, nije do kraja razjašnjena. Dokazano je da i druge, brojne mukozalne površinske komponente mogu da funkcionišu kao površinski receptori⁹³. Pili se vezuju i za brojne površinske komponente koje imaju sličnu strukturu GalNac-Gal, kao što su različiti glikokonjugati.

Pili, koji učestvuju u vezivanju za receptore, mogu imati različiti broj domena⁹⁴. Domeni pila, koji učestvuju u vezivanju za receptore, variraju u broju amino kiselinskih sekvenci. Kinetika vezivanja pila značajno varira kod različitih sojeva⁵⁶. Postoji kompeticija za vezivanje za receptore na respiratornim epitelnim ćelijama. Vezivanje *P. aeruginosa* za humane cilijarne trahealne ćelije se menja kad je bolesnik manje ili više osetljiv za razvoj pneumonije⁹⁵. Postoji korelacija adherencije sa nivoom ekspresije asijalo-GM1 u plućima. Sa povećanom sklonošću ka pneumoniji se ne povećava broj receptora, ali se povećava afinitet vezivanja. Tripsinizacija respiratornih ćelija dovodi do povećanog vezivanja za njih⁹⁶.

Kapsularna komponenta, alginat, kod izvesnih sojeva učestvuje u adherenciji. Alginati kapsule učestvuju u reakciji vezivanja za humane mukozne ćelije⁹⁷. Vezuju se sa površinskim lektinom domaćina. Ako se formiraju mikrokolonije, polimer alginata omogućava vezivanje cele mikrokolonije. Postoje alginati koji se ne vežu za respiratorne epitelne ćelije. Alginat međutim nema visok afinitet vezivanja⁸⁷.

Interakcija flagela sa epitelom domaćina je od velikog značaja za adherenciju. Flagele se vezuju specifično sa površinom epitela preko proteina flagelina FliC i FliD⁹⁸ za mucin⁴⁶ i asijalo-GM1⁹⁹. Interakcija flagela sa epitelom sluzokože dovodi do promene ćelijskog signalnog sistema domaćina i sekrecije brojnih proinflamatornih citokina. Flagele reaguju sa TLR, naročito sa TLR-5, što dovodi do inflamatornog odgovora¹⁰⁰. Utiču na ćelijske kanaliće za natrijum i menjaju transport natrijuma¹⁰¹. FliC i PilA su slične i obe se vezuju za asijalo-GM1⁶².

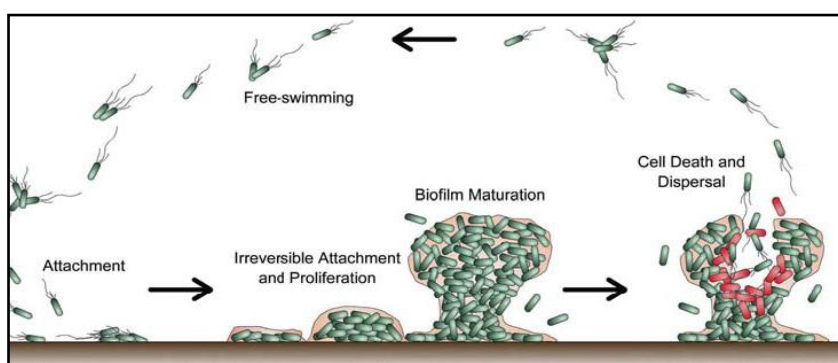
2.9. PRODUKCIJA BIOFILMA

Ranije je većina teorija o mikroorganizmima polazila od pretpostavke da bakterije žive kao slobodno suspendovani mikroorganizmi. Sada se smatra da je biofilm, koji je pričvršćen za čvrstu podlogu ili suspendovan u tečnosti, jedan od osnovnih načina organizacije života bakterija. Biofilm mogu činiti bakterije iste ili različitih vrsta. To je uglavnom sesilni, biološki aktivan kompleks, veoma komplikovane strukture, koga čine bakterijske ćelije i ekstracelularni produkti. U biofilmu se uspostavljaju mnogobrojne pozitivne i negativne veze koje zavise od brojnih fizičko-hemijskih, fizioloških i genetičkih faktora¹⁰². Za formiranje biofilma neophodan je QS. Bakterije su povezane polisaharidima međusobno i za površinu na kojoj se biofilm formira. Biofilm omogućava bacilu opstanak u različitim okruženjima¹⁰³.

2.9.1. FAZE U FORMIRANJU BIOFILMA

U in vitro ispitivanjima je dokazano da formiranje biofilma ima nekoliko faza (Slika 14.)¹⁰⁴:

- početno, reverzibilno vezivanje bakterija,
- ireverzibilno vezivanje bakterija,
- formiranja mikrokolonija,
- sazrevanje i diferencijacija biofilma,
- odvajanja bakterijskih ćelija sa površine biofilma.



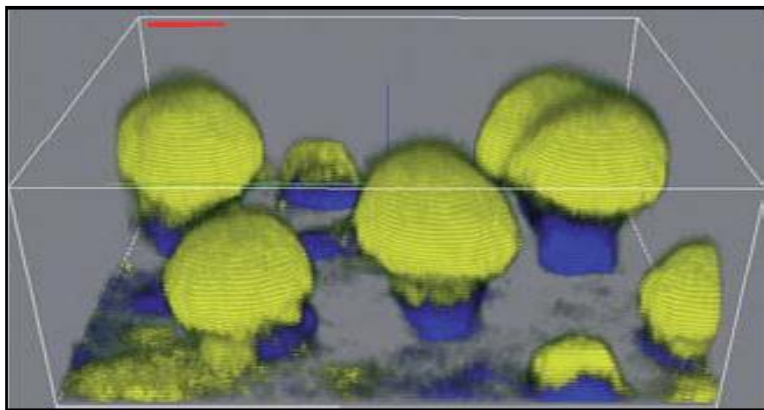
Slika 14. Ciklus formiranja biofilma: faza približavanja, ireverzibilnog vezivanja, sazrevanja biofilma i ćelijske smrti i disperzije (McDougald, 2008.)

Prva faza u formiranju biofilma podrazumeva približavanje i vezivanje bakterijskih ćelija za površinu. Postoje tri mehanizma kojima se bakterije približavaju površini: Braunovo kretanje, pokretljivost koju omogućavaju flagele i fizičko-hemijska privlačnost. Najčešće bakterije dopiru do površine difuzijom, dok pokretljivost dodatno olakšava formiranje biofilma. Nepokretni sojevi sporije i teže formiraju biofilm. Bakterije se mogu vezivati za žive (pluća kod CF) i nežive površine (kateteri, kontaktna sočiva, površine implantanta i sistemi za vodosnabdevanje)¹⁰⁵.

U vezivanju bakterija za površinu bitne su privlačne elektostatične i hidrofilne veze. Adhezija bakterija može biti pasivna i aktivna. Ulogu pasivne adhezije vrše flagele i pili, a aktivne egzopolisaharidi koje luče bakterije. Neki autori smatraju da su flagele odgovorne za prevazilaženje odbojnih sila između čvrste površine i tečnosti i doprinose primarnom vezivanju specifičnim interakcijama. Flagelarni protein FliD reaguje sa mucinom, koji je

uobičajen kod CF. Postoje i drugačija mišljenja. Pri prelasku reverzibilne u ireverzibilnu adherenciju, citoplazmatski protein SadB se aktivira i delimično smanjuje ćelijsku pokretljivost¹⁰⁶.

Za vreme sazrevanja biofilma formira se pečurkasta formacija sa sistemom međusobno povezivanih kanalića koji omogućavaju dopremanje hranljivih supstanci, a odvođenje štetnih¹⁰⁷ (Slika 15.).



Slika 15. Pečurkasta formacija biofilma *P. aeruginosa* (McDougald, 2008.)

U zrelom biofilmu ima više vrsta ćelija: nepokretnih subtipova, koji čine osnovu biofilma i pokretnih subtipova, kod kojih postoji tip IV pila i čine spoljašni sloj. Još nije dokazano kako dolazi do migracije subpopulacija, koje imaju tip IV pila, tako da formiraju formaciju, koja liči na kapu pečurke. Produkcija surfaktanta ramnolipida i ekstracelularne DNK je vezana za nepokretnu subpopulaciju. Subpopulacija na površini pokazuje povećanu rezistenciju na antibiotike.

Uslovi koji dovode do disperzije zrelog biofilma nisu do kraja razjašnjeni. Proces počinje kad se jedan deo mase odvoji i disperguje, a zatim na drugom mestu počinje formiranje novog biofilma. Okidači disperzije mogu biti promene u okruženju, nutritivne promene, naročito u snabdevanju ugljenikom, količini gvožđa i kiseonika. Smanjenje količine kiseonika u pojedinim delovima biofilma dovodi do stvaranja mikroaerofilnih, pa i anaerobnih uslova. Akceptori elektrona postaju nitrati, nitriti i azot dioksid. Posledica je produkcija azot dioksida koji ima snažnu sposobnost da pokrene disperziju biofilma. Natrijum nitroprusid kao izvor azot dioksida može u malim količinama da smanji masu biofilma za 80% i promeni

pokretljivost bacila. U anaerobnim uslovima azot dioksid inhibiše gene koji utiču na adherenciju, pa dolazi do disperzije biofilma¹⁰⁸.

Opisan je i fenomen suspendovanog biofilma. U tečnoj sredini *P. aeruginosa* formira ćelijske agregate veličine 40×10^{-6} - 400×10^{-6} m. Oni funkcionišu slično kao biofilm. Ako bacil nema dovoljno hranljivih materija, kiseonik, ugljenik ili azot, ćelijski agregati se raspadaju, dolazi do lize ćelije, povećanja količine DNK u medijumu, a na ćelijskom nivou, smanjuje se količina ciklične diGMP¹⁰⁹.

2.9.2. STRUKTURA BIOFILMA

Formirani biofilm karakteriše trodimenzionalna strukturna i prostorna heterogenost. Hranljive materije se zadržavaju na površini i u unutrašnjosti biofilma, dok se otpadne materije eliminišu iz biofilma. Vodeni kanali omogućavaju protok vode. Sojevi koji gube sposobnost produkcije pila se razmnožavaju, ali ne ulaze u sastav biofilma. Sposobnost menjanja adhezivnosti u uslovima koji su nepovoljni za bacil je genetski određena^{110,102}. Unutar biofilma, zbog pokretljivosti bakterija, dolazi do stvaranja praznih haloa, ali se ti procesi razlikuju od disperzije ili pasivnog osipanja zbog strujanja tečnosti. Stvaranje haloa uključuje ekstracelularne enzime koji razaraju ekstracelularni polisaharidni matriks. Enzimi se nalaze u matriksu nakon smrti ćelije i oslobađaju se u ekstracelularni prostor¹¹¹.

Formiranje i očuvanje bakterijske zajednice zavisi od prisustva supstance koja povezuje ćelije. Ekstracelularni matriks biofilma povezuje ćelije i označava se kao mreža u biofilmu. Sastoji se od polisaharida, alginata, proteina, teihinske kiseline, ramnolipida i DNK¹¹²⁻¹¹⁴. U sastav polisaharidnih molekula ulaze celuloza i poli-1,6-N-acetilglukozamin. Dokazano je da nakon vezivanja bakterija dolazi do aktivacije gena *algC*, *algD*, *algU* i *lacZ* koji su potrebni u biosintezi ekstracelularnih polisaharida¹¹⁵. Vezivanje samo po sebi inicira sintezu ekstracelularnih polisaharida i ukazuje da bakterije mogu imati neki "osećaj za dodir".

Proteni spoljne membrane, flagele, fimbrije i pili imaju sposobnost povezivanja ćelija i deo su biofilma. Pojedinačna ćelija može proizvoditi više komponenti biofilma u različitim okruženjima. Mogućnost ćelije da proizvodi različite komponente biofilma omogućava preživljavanje u različitim okruženjima. *P. aeruginosa*, u zavisnosti od soja i uslova sredine, može proizvoditi 3 egzopolisaharida: alginat i heteropolisaharide, PEL i PSL. Glavni

polimer PEL je glukoza, a PSL trehaloza. Egzopolisaharidi čine biofilm trodimenzionalnim i stabilizuju ga. Mukoidna forma *P. aeruginosa*, koja se često sreće kod CF, proizvodi alginat koji sadrži manuronsku i glukuronsku kiselinu. Kod nemukoidnih sojeva PEL i PSL čine kritičnu masu polisaharida. Povišena ekspresija PEL i PSL ima za posledicu naborane kolonije. Postoje dokazi da je PSL bitan u prvim fazama formiranja biofilma, a PEL u kasnijim fazama. Produkcija ekstracelularnih komponenti biofilma je pod kontrolom QS¹¹⁶.

DNK je važan sastojak ekstracelularnog matriksa kod mukoidnih sojeva. *P. aeruginosa* proizvodi ekstracelularnu DNK koja funkcioniše kao međucelijska komponenta matriksa biofilma¹¹⁷. Ova DNK je slična DNK genoma. Oslobođanje DNK je maksimalno u kasnijoj logaritamskoj fazi koja korelira sa maksimalnim nivoom QS^{118,119}. Mutantni sojevi sa promenama u *pqsA* oslobađaju manje količine DNK i njihov biofilm sadrži manje količine DNK nego biofilm, koji formiraju divlji sojevi¹²⁰.

Murakawa je analizirao hemijski sastav sluzave supstance biofilma kod 20 serotipova i dokazao da kod 8 sojeva sadrži DNK, a kod 2 poliuronsku kiselinu. Bazalni nivo DNK u prvim fazama nije povezan sa QS, dok je velika količina DNK u kasnijim fazama u vezi sa QS. Veće količine DNK su posledica lize nekih ćelijskih subpopulacija i odvajanja ćelija iz biofilma. DNK se u biofilmu pojavljuje po specifičnom obrascu. U četiri dana starom biofilmu pečurkaste strukture, DNK je primarno lokalizovana u centralnom stubičastom delu sa najvećom koncentracijom u spoljnom stubičastom delu¹²¹.

Produkcija biofilma je vezana za nivo gvožđa. Subinhibitorne koncentracije laktoferina, koje su prisutne u mukusu, otežavaju produkciju biofilma. U sredinama siromašnim gvožđem pioverdin je neophodan za sazrevanje biofilma. Egzogeni nosioci gvožđa, ferihlorid, fericitrat i feroksamin mogu zameniti pioverdin i pomoći u formiranju biofilma¹²².

2.9.3. ULOGA BIOFILMA U FIZIOLOGIJI *P. AERUGINOSA*

Kao i sva živa bića *P. aeruginosa* nutritivno zavisi od hranljivih supstanci u svom okruženju. Bakterija se kreće haotično, ali ako se nađe u mikroekosistemu koji je nutritivno bogat razmnožava se i formira organizovanu zajednicu. Zajednica ima veću mogućnost organizacije, prilagođavanja, menjanja okruženja i pruža mogućnost boljeg iskorišćavanja nutritivnih potencijala mikroekosistema, nego što to pojedinačne ćelije mogu¹²³. U formiranju

zajednice važan je trenutak u kome se ćelija menja od individue u dispergovanom mikroekosistemu do jedinke koja funkcioniše sa drugima. Bakterija ulaže deo svojih resursa i menja mikroekosistem. Koncept zajedništva, kao način opstanka bakterija, počeo je da se prihvata 1960. godine ispitivanjem *Myxococcus xanthus*, pa *Streptomyces gryseus*, *Streptococcus pneumoniae* i morskih vrsta vibriona¹²⁴. Dokazano je da postoje sistemi koji regulišu multicelualarni opstanak zajednice uz pomoć malih signalnih molekula¹²⁴.

Bakterije u biofilmu imaju sposobnost komunikacije i saradnje u nizu radnji, koje su važne za sve jedinke. Komunikacija je bitna u razvoju, virulenciji i opstanku *P. aeruginosa*. Poslednjih godina mnogi autori se bave ispitivanjem načina prenošenja informacija među bacilima u formiranju biofilma. Dokazano je da se informacije o formiranju biofilma i njegovom okruženju mogu prenositi bakteriofagima¹²⁵.

Biofilm sadrži različite mikroekosisteme. Postoji stroga selekcija koju mogu da prežive samo pojedini subtipovi. U inicijalnoj fazi kolonizacije postoji velika raznovrsnost fenotipova. Raznolikost se vremenom smanjuje. Nutritivna kompeticija među bakterijama omogućava opstanak samo onima koje mogu da prežive u uslovima nutritivnih ograničenja. Biofilm vrši stalnu selekciju samo najprilagodljivijih sojeva. Stalne genotipske promene, mutacije i rekombinacije najčešće imaju za posledicu znatnu genetičku raznovrsnost unutar biofilma. Ove promene su najuočljivije kod CF. Nivo mutacija se povećava, ako je biofilm izložen dejstvu stresa. Često su sojevi u biofilmu kod CF genetički različiti od početnih sojeva.

Formiranje biofilma se javlja i kao odgovor na subletalne koncentracije aminoglikozida i iznenadne promene u prisustvu hranljivih materija, nedostatka ugljenika, fosfora i azot dioksida. QS mutante i divlji sojevi formiraju drugačiji biofilm, ako se glukoza koristi kao jedini izvor ugljenika, nego kada su citrati izvori ugljenika. Ako se kao izvor ugljenika koriste glutamati dobija se isti biofilm, ali ako se koriste sukcinati formiraju se mikrokolonije, ili se uopšte ne formira biofilm, uz smanjenu pokretljivost¹²⁶. Metabolizam azota reguliše formiranje QS, pa time posredno deluje na nastanak biofilma.

U pojedinim delovima biofilma su različite koncentracije kiseonika, a razlike se lakše uočavaju na mestu preklapanja dve sredine. Produkcija proteina je viša u delovima gde ima više kiseonika nego u anaerobnim¹²⁷. Azot dioksid, koji se nagomilava unutar anaerobnih delova, dovodi do ćelijske lize. Koncentracija ramnolipida i DNK se takođe razlikuju u pojedinim delovima biofilma.

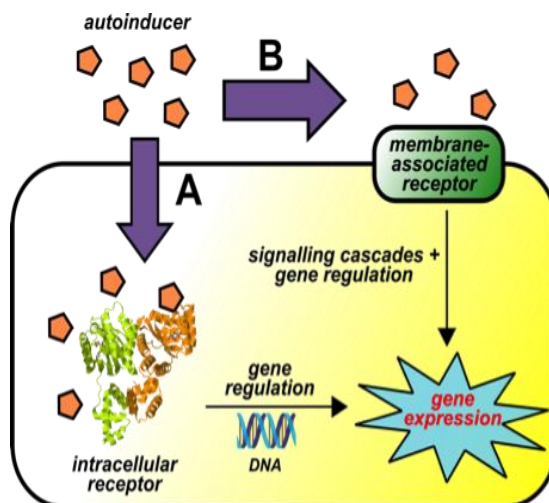
Biofilm štiti bacile od dejstva antibiotika¹²⁸ i drugih hemijskih agenasa. Klasična biocidna sredstva su ponekad nemoćna u eradikaciji infekcija izazvanih *P. aeruginosa*, koji proizvodi biofilm. Postoji nekoliko objašnjenja za tu pojavu, uključujući nesposobnost antibiotika da prodru u džepove biofilma. Pri dejstvu antibiotika mikroekosistem se menja hemijski, a ćelije se transformišu u "spora like formu" koja im omogućava da prežive¹²⁹.

U laboratoriji se na čvrstim podlogama može vizualizirati izgled kolonija iz biofilma. Kolonije se najčešće opisuju kao karakteristične, spororastuće, male i naborane. Bakterijske ćelije pokazuju autoagregativni fenomen, što ima za posledicu povećanu adheziju ćelija. Ove ćelije imaju dosta pila, defekte u pokretljivosti, mogućnosti rojenja, hemotakse i produkcije pigmenata. Ćelije imaju redukovanu aktivnost transportnog lanca elektrona, što usporava metabolizam šećera i smanjenu produkciju ATP. Neke ćelije vrše autoagregaciju u tečnoj sredini i imaju sposobnost adhezije na čvrste podloge¹³⁰.

Potrebne su nove strategije u terapiji infekcija izazvanih *P. aeruginosa*. Zato se ispituju alternativne metode dejstva na biofilm. U terapiji infekcija počinju da se koriste ultrazvuk, inhibitori QS, bakteriofagi⁷⁵ i različiti enzimi i antibiotici¹³¹. Ponekad je svrsishodnija promena sredine u kojoj se bacili razvijaju nego upotreba antibiotika. QS je predmet brojnih ispitivanja, jer utiče na produkciju biofilma. QS mutante pokazuju veću osetljivost na antibiotike¹³².

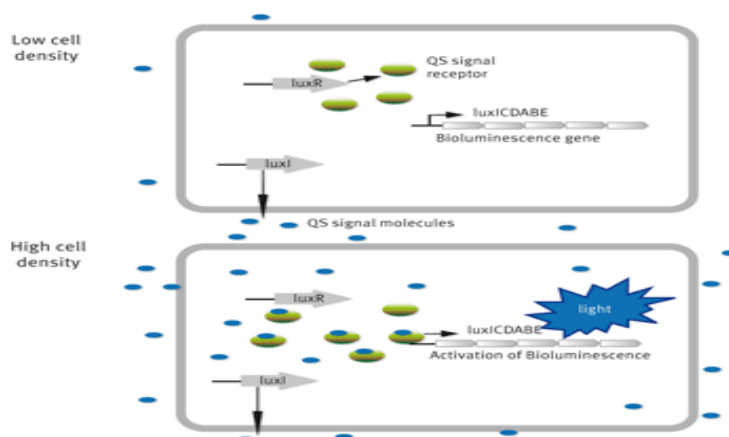
2.9.4. QUORUM SENSING

P. aeruginosa prati ćelijsku gustinu u svom okruženju i održava međućelijsku komunikaciju cell-to-cell sistemom koji je označen kao QS. QS integriše odgovore bakterije na različite signale iz spoljašnje sredine (ćelijska gustina, temperatura, pH, osmolarnost i oksidativni stres) da bi se razvila prava strategija opstanka bakterije^{133,134}. QS se može definisati kao mehanizam kojim bakterije utiču na ciljane gene. QS sistem čine signalni molekuli (autoinduceri), transkripcioni regulatorni protein (protein R) koji služi kao signalni receptor i transkripcioni regulator (Slika 16.).



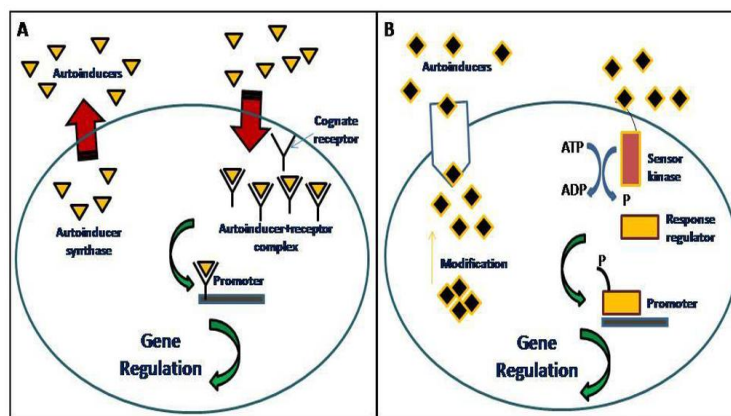
Slika 16. Mehanizam funkcionisanja QS sistema (blackwell.chem.wisc.edu)

Autoinducer i protein R se proizvode na bazalnom nivou kada je gustina ćelija niska, pa difunduju u okolinu ćelije, gde se rastvaraju. Ako se poveća gustina, molekuli autoinducera se akumuliraju. Nakon trostrukog uvećanja koncentracije, autoinduceri formiraju kompleks sa R proteinom. Sam R protein nije aktivan bez komunikacije sa autoinducerom. Kompleks ima sposobnost da reguliše ciljane gene. Kompleks R protein-autoinducer se veže sa specifičnim sekvencama DNK i izaziva transkripciju ciljnih gena (Slika 17.). Ekspresija gena se povećava do hiljadu puta¹³⁵⁻¹³⁷.



Slika 17. Funkcionisanje QS sistema na bazalnom i povišenom nivou (www.bmglabtech.com)

QS kod Gram negativnih i Gram pozitivnih bakterija su slični, ali se i razlikuju (Slika 18.).



Slika 18. QS kod Gram negativnih (A) i Gram pozitivnih bakterija (B)
(<http://www.mdpi.com/1424-8220/13/5/6217/htm>)

2.9.4.1. QUORUM SENSING SIGNALNI SISTEMI

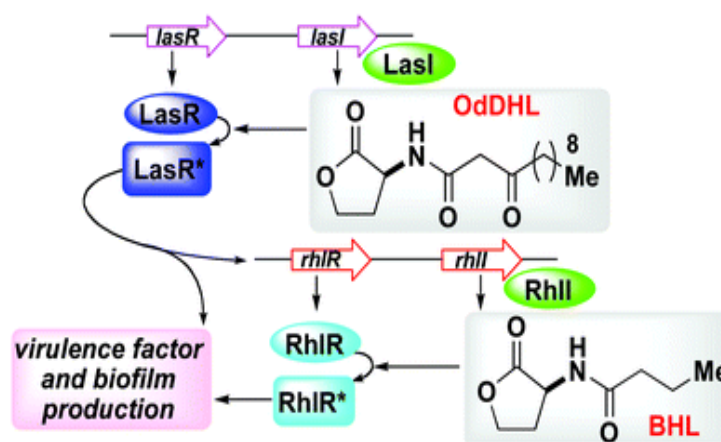
Kod *P. aeruginosa* najvažniji su povezani acil-homoserin lakton (AHL) QS signalni sistemi. To su *LasR-LasI*, *RhlR-RhlI*, *QscR* i *Pseudomonas quinolone signalni sistemi* (PQS)¹²⁶. Ovi sistemi su glavni regulatori genske ekspresije. Povezani su međusobno i koordinisano funkcionišu¹³⁸. N-acil-homoserin lakton (AHL) zavisni QS je prvi opisan kod *Vibrio fischeri* (*V. fischeri*) i do 1992. godine se vezivao samo za *V. fischeri*. Kod Gram negativnih bakterija osim AHL, postoje i drugi QS signalni sistemi: 2-alkil-4-hinoloni, furanoni i neke masne kiseline. Gram pozitivne bakterije proizvode dodatne supstance koje potiču od γ butirolaktone i feromone.

Las i *rhl* su najvažniji i najpoznatiji signalni sistemi. *Las* sistem uključuje *LasI* i *LasR* proteine, a *rhl* *RhlI* i *RhlR*. *LasI* katališe produkciju signalnog molekula N-(3-oksododekanoil)-L-homoserin laktone (3O-C₁₂-HSL) koji se veže za transkripcioni regulator protein *LasR*. *Las* sistem je važan u sekretornim procesima i produkciji biofilma. Reguliše produkciju elastaze, *LasA* proteaze i endotoksina A¹³⁹⁻¹⁴¹. Protein označen kao *luxR* učestvuje u sintezi 3O-C₆-AHL, kao inducera u AHL zavisnom QS. Kada se koncentracija 3O-C₆-AHL utrostruči on se veže za transkripcioni regulator *luxI*. Rezultat je aktivacija *luxIDCABC* promotera¹⁴².

RhlR je otkiven kasnije i reguliše produkciju ramnolipida¹⁴³. *RhlI* katališe sintezu inducera N-butanoil-L-homoserin laktone (C₄-HSL), koji se veže za *RhlR* protein¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Analiza sekvenci amino kiselina *LasR* i *RhlR* ukazuje da oba proteina imaju vezujuća mesta

za autoinducere u amino terminalnim delovima i DNK vezujuće domene u karboksiterminalnim domenima¹⁴⁷. LasR i RhlR se vezuju sa visokom specifičnošću sa svojim autoinducerima.

Las i *rhl* sistemi ne funkcionišu nezavisno jedan od drugog¹⁴⁶ (Slika 19.). *Las* sistem delimično kontroliše *rhl* sistem. Čelije *P. aeruginosa* nisu slobodno permeabilne za molekule 3O-C₁₂-HSL. Efluksini sistem aktivno pumpa ovu supstancu van ćelije. Koncentracija 3OC₁₂-HSL je tri puta viša u ćeliji nego van nje. Nasuprot tome C₄-HSL slobodno difunduje u ćeliju i koncentracije u ćeliji i van nje se izjednačavaju za 30 sekundi^{148,149}.



Slika 19. Funkcionalna veza Las i RhlR sistema (pubs.rsc.org)

QscR sistem^{150,151} vrši represiju sinteze piocijanina i vodonik cijanida, pa je produkcija piocijanina drastično povišena kod *qscR* mutanti. *VqsR* je homolog *luxR* i vrši modulaciju brojnih QS kontrolnih gena¹⁵². Odsustvo *vqsR* dovodi do gubitka AHL i vanćelijske produkcije. Menja se produkcija *lasI* mRNK, a ne *lasR*, ukazujući da se pozitivan efekat *vqsR* na QS odvija preko *lasI*.

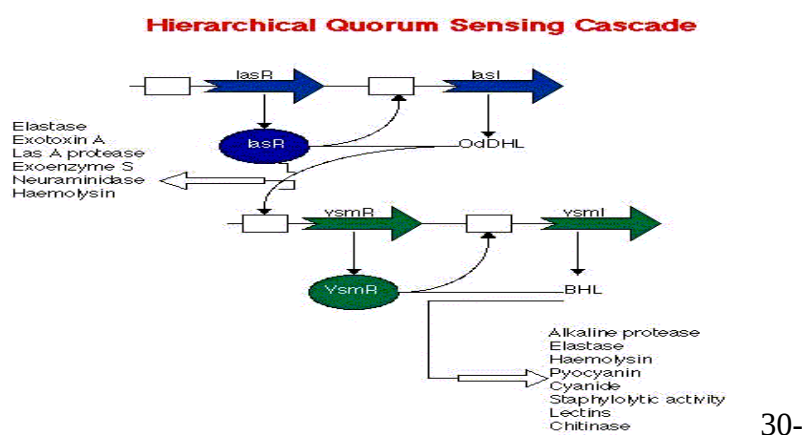
P. aeruginosa koristi i HSL nezavisni QS sistem, preko 2-heptil-3-hidroksi-4-hinolona, označen i kao *Pseudomonas* qinolon signalni sistem (PQS)¹⁵³. Ovaj sistem deluje na *lasB* ekspresiju.

Mutantni sojevi, koji imaju poremećaj QS regulatora *lasR*, se često sreću kod CF. Ispitivana su 135 soja izolovana od 8 ispitanika. Kod istog ispitanika je bilo prisutno 9 do 20 izolata. Većina je imala mešavinu sojeva, koji su imali defekt u produkciji QS i sojeve, koji su produkovali QS¹⁵⁴.

Drugi Gram negativni bacili uključujući *Serratia marcescens*, *S. liquefaciens*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemoliticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter agglomerans*, *Hafnia alvei* i *Rahnella aquatis* proizvode homoserin laktonske autoinducere¹⁵⁴. Ove bakterije imaju cell-to-cell signalne sisteme analogne las i rhl sistemima.

2.9.4.2. ULOGA QUORUM SENSING SIGNALNIH SISTEMA U FIZIOLOGIJI *P. AERUGINOSA*

Veliki broj gena sa mnogo regulatornih mehanizama, uključujući i QS, omogućava veliku adaptibilnost *P. aeruginosa*. QS se aktivira u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi rasta. Svrha aktivacije QS sistema je neutralisanje različitih mehanizama imunskog sistema domaćina i opstanak u invadiranom organizmu. Pojedinačne bakterijske ćelije ne mogu da proizvode dovoljno faktora patogenosti da inaktiviraju mehanizme imunskog sistema. Koordinisana ekspresija gena faktora virulencije, koju podržava QS sistem, omogućava produkciju faktora patogenosti, onda kada je to potrebno i u nivou koji je neophodan, da se prevaziđe imunski sistem domaćina, opstanak *P. aeruginosa* i kao posledica izaziva inflamaciju¹⁵⁵ (Slika 20.). Ciljni geni QS su odgovorni za simbiozu, kompeticiju, konjugaciju, kretanje i sporulaciju bacila¹⁰⁷. Ipak uloga QS u razvoju humane infekcije nije još uvek do kraja rasvetljena.



Slika 20. Veze među pojedinim AHL zavisnim sistemima i njihova uloga u produkciji faktora patogenosti (www.Bio.cmu.edu)

C12-HSL snažno deluje na imunski sistem preko citokina. AHL deluje na kardiovaskularni sistem domaćina, time što remeti vazokonstrikciju koronarnih i plućnih krvnih sudova kod svinja. U eksperimentima kod pacova AHL je okidač bradikardijalnih poremećaja¹⁵⁶. Vazodilatacija povećava mogućnost snabdevanja hranljivim materijama koje su potrebne bakteriji i inhibiše dejstvo imunskog sistema. QS sistem ima mogućnost snažnijeg dejstva na imunski sistem preko inhibicije T ćelijske proliferacije¹⁵⁷. Ako se humani PML izlože dejstvu supernatanta QS kompetentnih *P. aeruginosa* *in vitro* i *in vivo* dolazi do njihove brze nekroze¹⁵⁸. Ramnolipid dovodi do oštećenja PML. Kad se interferon γ veže za protein spoljne membrane Oprf *P. aeruginosa* proizvodi se LecA lektin, čija je produkcija povezana sa QS¹⁵⁹.

Akutne infekcije uzorkovane *P. aeruginosa* izazivaju slobodne bakterijske ćelije. Kod hroničnih i perzistentnih infekcija bacil je organizovan u biofilm koji ga štiti od antibiotika, dezinfekcionih sredstava i imunskog sistema domaćina^{160,161}. Kod pojedinačnih bakterijskih ćelija detektovane su veće količine 3O-C12-HSL, dok su u biofilmu u sputumu bolesnika sa hroničnom infekcijom prisutne veće količine C4-HSL. Jedan od najreprezentativnijih dokaza o učešću QS u patogenezi inflamacije je prisustvo transkripta mRNK za *lasR* i *lasI* u sputumu bolesnika¹⁶²⁻¹⁶⁴. Eksperimenti sa QS mutantnim sojevima pokazuju da se u toku infekcije razvija mnogo manje oštećenje tkiva^{165,95}.

QS može da poveže dve različite bakterijske vrste koje koegzistiraju u istom biofilmu. Patogene bakterije koordiniraju aktivnosti među sobom posredstvom QS. *P. aeruginosa* na takav način funkcioniše sa *Bacillus cepacea* i *S. aureus*¹⁶⁶. QS signali omogućavaju bakterijama da komuniciraju i sa eukariotskim ćelijama.

Broj gena koji učestvuju u virulenciji *P. aeruginosa* je regulisan *las* QS sistemom, *rhII* sistemom ili/i jednim i drugim¹²⁶. *RhII* QS je pod regulatornom kontrolom *las* sistema na transkripcionom i posttranskripcionom nivou. QS utiče na produkciju elastaze, ramnolipida i piocijanina. Reguliše mnoge intracelularne metaboličke funkcije. Neke od njih služe da omoguće regeneraciju AHL, prekursora metionina i S-adenozil-metionina. *In vitro* LasR mutante imaju veću sposobnost da izbegnu lizu u stacionarnoj fazi pod alkalnim uslovima¹⁶⁷.

Uloga QS u nastanku biofilma je prvi put opisana 1998. godine. QS višestruko utiče na produkciju biofilma. *LasI* mutante, koje ne mogu da proizvode 3O-C12-HSL, formiraju biofilm sa nepravilnom strukturom i osetljivije su na dejstvo biocida. Biofilm koji formiraju divlji sojevi *P. aeruginosa* je rezistentan na dejstvo natrijum dodecilsulfata, dok se biofilm

koji formira *lasI* mutanta lako dezintegriše. Nasuprot tome, *rhlI* mutante produkuju biofilm koji liči na biofilm divljeg soja. Zaključak je da *las* QS sistem, a ne *rhlI* sistem važan za produkciju biofilma¹⁰⁸.

QS reguliše produkciju lektina LecA i LecB koji vezuju šećere i važni su u formiranju biofilma. *LecA* i *lecB* mutante produkuju biofilm izmenjene strukture. Dodatak egzogenog QS rastućoj kulturi menja razvoj biofilma verovatno povećanjem uticaja na produkciju lektin A¹¹⁸.

QS reguliše produkciju surfaktanta ramnolipida koji je neophodan za održavanje međucelijskog prostora u biofilmu¹⁶⁸. Ramnolipid učestvuje u formiranju zrele pečurkaste formacije¹⁶⁹. QS direktno reguliše ekspresiju *pel* operona koji je odgovoran za sintezu, glukozom bogate, egzopolisaharidne komponente matriksa biofilma¹⁷⁰.

O'Tool¹⁰⁵ je u eksperimentima koristio mutantne kolonije, gajene u mikrotitar pločama, koje nisu mogle da formiraju biofilm. Došlo se do zaključka da je flagelarna pokretljivost neophodna u primarnoj adheziji, a da su pili tipa IV neophodni u koagregaciji. Glessner¹⁷¹ je dokazao da su *las* i *rhl* QS signali potrebni za pilus IV zavisnu pokretljivost. C4-HSL utiče na produkciju pila tipa IV, dok 3O-C12-HSL utiče na funkcionisanje u cell to cell prostoru i trzajuće pokrete.

Schwarzer sa saradnicima¹⁷² je ispitivao efekat *N*-(3-oksododekanoil)-L-homoserin laktona na epitelne ćelije disajnih puteva kod CF. Dokazano je da efekat na ćelije počinje već posle 5 minuta, a potpuno dejstvo se ispolji posle 1-2 časa. C12 iz biofilma deluje na epitelne ćelije posredstvom više mehanizama, a posledica je apoptoza epitelnih ćelija. QS signal u epitelnim ćelijama dovodi do depolarizacije membrane mitohondrija, oslobađanja citohroma C u citozol i redukcije redox sistema. Deluje na endoplazmatski retikulum i dovodi do oslobađanja jona kalcijuma. Sličan efekat se javlja kod različitih ćelija.

Boşgelmez-Tinaz sa saradnicima¹⁷³ je u vitro ispitivanjima analizirao 50 laboratorijskih i patogenih sojeva. Izolati I-457, I-458, I-459 i I-461 nisu imali sposobnost produkcije C4-HSL signalnih molekula i faktora virulencije: elastaze, proteaze, pirocjanina i ramnolipida. Analize genskih sekvenci *lasR*, *lasI*, *rhlR* i *rhlI* su pokazale da su dva od četiri izolata imala mutacije na *rhlR* i *rhlI* genima, dok su druga dva izolata imala samo mutacije *rhlI* gena. Kombinacija *rhlR* i *rhlI* mutacija ili samo *rhlI* mutacija objašnjava poremećaj u funkciji QS. Došlo se do zaključka da QS deficijentni sojevi ipak mogu izazvati infekciju. Smatra se da u tome učestvuju faktori virulencije koji do sada nisu do kraja opisani.

Činjenica da je QS veoma važan u virulenciji *P. aeruginosa* pruža nove terapijske mogućnosti. Ako bi se neutralisala komunikacija među pojedinačnim bakterijskim ćelijama, patogeni efekat bacila bi bio znatno oslabljen¹⁷⁴. Humane epitelne ćelije imaju mogućnost inaktivacije 3O-C12-HSL otvaranjem homoserinskog laktonskog prstena¹⁷⁵. AHL signali se inaktiviraju u alkalnoj sredini, dejstvom pH zavisne laktonolize, hidrolizom prstena. *Bacillus* sp. 240B1 proizvodi laktanaze¹⁷⁶. Ekspresija *aiiA* gena smanjuje nivo AHL molekula.

Sledeći način inaktivacije AHL je acilazna aktivnost, kod koje dolazi do cepanja amidne veze¹⁷⁷. Furanoni su prirodni antagonisti AHL, pa bakterija u prisustvu furanona gubi sposobnost produkcije biofilma^{178,179}. Furanon ima sposobnost represije velikog broja gena potrebnih za funkcionisanje QS, uključujući gene za mnoge faktore patogenosti. Primena ove supstance na modelu miša smanjuje drastično infekcije pluća¹⁸⁰. Beli luk ima specifično dejstvo protiv QS¹¹¹. Novija istraživanja i borba protiv *P. aeruginosa* podrazumevaju i pokušaj izrade vakcine sa 3O-C12-AHL reagujućim proteinima. Kod miševa ova vakcina štiti od letalnog dejstva kod infekcije pluća. Specifična antitela protiv 3O-C12-AHL imaju protektivnu ulogu kod akutnih infekcija, modifikujući imunski odgovor, tako da ne nastaje oštećenje pluća.

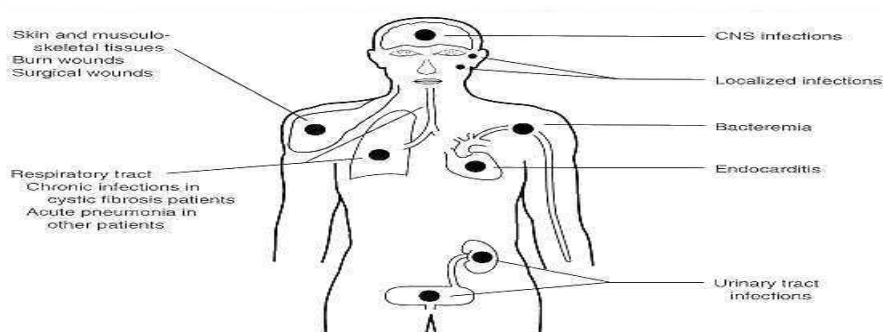
Favre-Bonté¹⁸¹ sa saradnicima je analizirao QS kao ciljno mesto eventualnog preventivnog i terapijskog dejstva na *P. aeruginosa*. Analizirani su sojevi koji su izolovani iz aparata za intubaciju osam bolesnika. Produkcija 3O-C12-HSL je detektovana kod osam bolesnika, a C4-HSL kod šest. Detektovana su tri QS zavisna fenotipa. Produkcija 3O-C12-HSL je bila veća kod izolata sa aparata za intubaciju, a produkcija C4-HSL viša kod izolata iz aspirata. Izolati iz aspirata proizvode veće količine elastaze, a manje količine biofilma i imaju redukovane adhezione sposobnosti. Nivo produkcije 3-okso-C12-HSL i elastaze koreliraju statistički značajnije kod trahealnih izolata. Produkcija 3-okso-C12-HS i adhezioni sposobnost slabije koreliraju među sojevima iz tubusa.

Poslednjih godina ima mnogo ispitivanja koja se bave uticajem antibiotika, pre svega makrolida, na biofilm *P. aeruginosa*. Skindersoe¹⁸² je pratio efekat antibiotika na QS. Analiziran je uticaj azitromicina, ceftazidima i ciprofloksacina na QS, a time i posredno na faktore virulencije *P. aeruginosa*. Svi ispitivani antibiotici su inhibisali funkciju ovog regulatornog sistema. Ali, rezultati kliničke studije Nick sa autorima¹⁸³ su suprotni ovim tvrdnjama. Oni su koristili azitromicin u kombinaciji sa inhalatorno primenjenim

tobramicinom kod bolesnika sa cističnom fibrozom, ali nije dokazana opravdanost korišćenja azitromicina u terapiji.

2.10.PATOGENOST *P. AERUGINOSA* ZA LJUDE

P. aeruginosa je za ljude uslovno patogena bakterija. Ima dovoljno patogenog potencijala da izazove inflamacije svih tkiva i organskih sistema (Slika 21.).



Slika 21. Najčešće lokalizacije infekcija izazvanih *P. aeruginosa* na ljudskom telu
(intranet.tdmu.edu.te.ua)

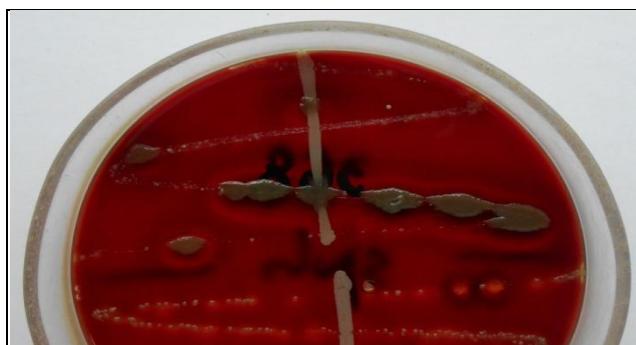
Osobe sa narušenim imunskim odgovorom češće oboljevaju i imaju ozbiljnije oblike bolesti¹⁸⁴. Početak bolesti uglavnom podrazumeva oštećenje prve linije odbrane organizma. Infekcija se nadovezuje na oštećenje kože ili sluzokože ili zaobilazanje barijere koju oni predstavljaju (trauma, hirurške intervencije, ozbiljne operacije). Oštećenje normalne mukozalne flore antibioticima širokog spektra olakšava infekcije. Većina infekcija izazvanih *P. aeruginosa* je invazivna i toksikogena. Infekcije mogu da budu akutne i hronične. Akutne infekcije, kao što su infekcije opekotina, se karakterišu brzim bakterijskim rastom, sepsom i ako se ne leče, visokom smrtnošću bolesnika. Hronične infekcije, kao što je na primer inflamacije pluća kod CF i infekcije rana, mogu da traju godinama.

Većina sojeva *P. aeruginosa* je otporna na dejstvo samog seruma, ali ako se dodaju PML bacil bude uništen. Fagocitoza je važna, ali opsonizujuća antitela imaju najvažniju ulogu u eliminaciji *P. aeruginosa*. Uništenje bacila je efikasnije u prisustvu tip-specifičnih antitela usmerenih primarno prema LPS. Ako dođe do razvoja inflamacije u najvišem titru se formiraju IgM, IgG2a i IgG3 antitela. Antitoksini su važni u kontroli već razvijene bolesti.

CF je izuzetak. Većina bolesnika sa CF ima visok nivo cirkulišućih antitela na bakterijske antigene, ali ona nisu sposobna da eradikiraju *P. aeruginosa*^{20,185}.

2.10.1. RESPIRATORNE INFEKCIJE

Respiratorne infekcije izazvane *P. aeruginosa* često se javljaju, ako su pluća oštećena ili imunski sistem bolesnika oslabljen. Sreću se kod bolesnika na veštačkoj ventilaciji, malignih bolesti, intravenskih narkomana i hroničnih bolesti. *P. aeruginosa* je uzročnik 7% pneumonija, od kojih se 28% završava letalno¹⁸⁶. Oboljevanje i smrtnost su mnogo veći kod bolesnika sa AITS-om. Primarna pneumonija se javlja kod hroničnih bolesti pluća ili srčanog zastoja. Nekat pneumonija može biti nekrotična (Slika 22).



Slika 22. Kolonije *P. aeruginosa* iz sputuma na krvnoj agar ploči (Stanković Nedeljković, 2015.)

2.10.1.1. CISTIČNA FIBROZA

Cistična fibroza je nasledni autozomalni recesivni genetički poremećaj, koji prati mutaciju sedmog hromozoma¹¹⁴. U plućima se ne mogu adekvatno transportovati hlor, natrijum i voda. Posledica je produkcija i nagomilavanje gustog mukusa koji je idealna podloga za mnoge patogene mikroorganizme¹⁸⁷.

Cistična fibroza se karakteriše hroničnom polimikrobnom infekcijom i inflamacijom disajnih puteva^{188,189}. Infekcija pluća *P. aeruginosa* kod obolelih od CF je glavni uzrok mortaliteta kod ove bolesti¹²⁸. Obično kolonizacija pluća nastaje u toku prve tri godine života. Do desete godine oko 38% dece se kolonizuje *P. aeruginosa*²⁷. *P. aeruginosa* je kod oko 80% bolesnika predominantno izolovan mikroorganizam¹⁹⁰. Sojevi koji prvobitno kolonizuju

pluća su saprofiti, pokretni su i i formiraju nemukoidne kolonije. Imaju ekspresiju tipa IV fimbrija, koje se vezuju za mucin ili epitelne ćelije, razvijen QS signalni sistem i proizvode brojne faktore patogenosti (toksine, proteaze i pirocjanin). Mikroorganizmi vremenom oštećuju tkiva i ubrzavaju kolonizaciju, agregaciju i formiranje mikrokolonija. Prve infekcije izazvaju bacili osetljivi na antibiotike, pa se mogu eradicirati efikasnim antibioticima. Kasnije predominiraju bacili, koji daju mukoidnu formu kolonija. U bakterijskoj zajednici ima puno egzopolisaharida, dolazi do gubitka fimbrija⁶ i flagela tipa IV kod pojedinačnih bakterijskih ćelija. Formiraju se velike bakterijske zajednice i biofilm, koji se ne mogu eradicirati ni velikim dozama antibiotika. Sojevi koji imaju veću sposobnost adaptacije mogu decenijama opstati⁸⁵. Odnos domaćina i bacila je dinamičan i zavisi od odnosa snaga, ali ne treba zanemariti i kompeticiju među različitim sojevima¹⁹¹. Bitku sa *P. aeruginosa* bolesnici sa CF često gube zbog oštećenja pluća koje izaziva ovaj bacil.

U respiratornom delu pluća normalno vladaju aerobni uslovi. Ako dođe do nagomilavanja mukusa uslovi postaju mikroaerofilni, a u formiranom apscesu anaerobni. U anaerobnim uslovima krajni akceptori elektrona su nitrati. Vremenom, klonovi imaju sve manju sposobnost produkcije biofilma i smanjuje im se pokretljivost. Kod mukoidnih sojeva se smanjuje produkcija faktora patogenosti, QS molekula i klonovi postaju hipermutabilni.

Organizam obolelog definiše imunski odgovor posredovan alveolarnim makrofagima, antigen prezentujućim ćelijama i PML u odnosu na alginate. Zahvaćene alveole su okružene PML, dok ih unutar tog prostora zbog dejstva alginata ima malo ili nema uopšte. U pokušaju PML da fagocituju bakterije oslobađaju se visoko reaktivni kiseonični radikali. Radikali dovode do oštećenja tkiva i uništavanja bakterije ili izazivaju mutacije gena. Odgovor organizma prema takvim alveolama dovodi do oštećenja tkiva i remećenja funkcije pluća. Ovakva fokalna infekcija zahvata nova područja pluća i respiratorna funkcija opada uprkos antibiotskoj terapiji. Neretko se izoluju dva ili više različita serotipa kod jednog bolesnika. Sojevi izolovani iz pluća nemaju bočne lance, pa je njihova serotipizacija teška ili nemoguća. Ovi sojevi su veoma osetljivi na proteine plazme, pa retko uzrokuju bakterijemiju. Sojevi se obilnije raznožavaju, ako su u njihovom okruženju nalaze veće količine metionina, ornitina, arginina i lecitina. Kod obolelih bacil se prenosi direktno, iako su uzročnici bolesti sojevi koji se nalaze u okruženju¹⁴.

Danski autori su pratili populaciju *P. aeruginosa* i dinamiku infekcije. Identifikovana su 2 različita dominantna klona koja su učestvovala u inflamaciji. Važna osobina tih sojeva je

sposobnost transmisije među obolelima od CF. Druge osobine, kao što su transformacija u mukoidnu formu i produkcija faktora patogenosti, igraju manje važnu ulogu u nastanku i održavanju inflamacija¹⁹².

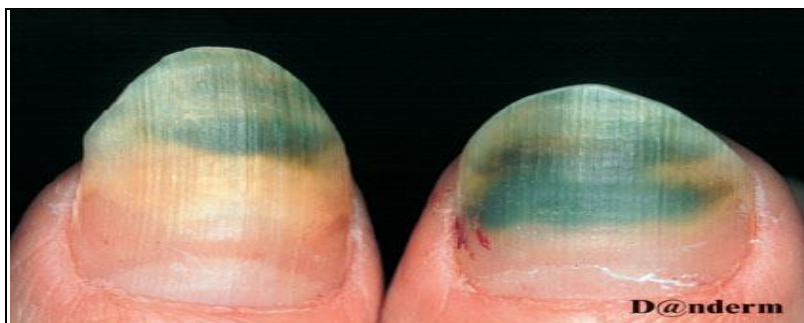
Stopa mutacije *P. aeruginosa* je i do sto puta veća u odnosu na sojeve iz drugih kliničkih uzoraka¹⁹³. Smatra se da kod obolelih od CF ima 54% mutantnih sojeva. Prvih pet godina oboljevanja skoro da ih nema. Transformacija bacila iz senizitivnog u rezistentni regulisana je proteinom PvrR. Uticaj na ekspresiju tog proteina bi mogao biti važan u terapiji CF¹²⁸.

2.10.2. INFEKCIJE URINARNOG TRAKTA

P. aeruginosa veoma često izaziva infekcije urinarnog trakta (UT). Infekcije urinarnog trakta su skoro uvek bolničkog porekla. Povezane su sa operacijama, skopijama, kateterizacijom, urođenim anatomskim malformacijama, povredama kičme i primenom irigacionih postupaka. Ipak, nošenje katetera je najčešći faktor rizika. Bakterija ima veliku sposobnost adherencije za sluzokožu mokraćne bešike. *P. aeruginosa* je treći uzročnik hospitalnih infekcija UT i izaziva oko 12% svih infekcija. Infekcija može nastati ascendentno ili descedentno¹⁴. Iz UT *P. aeruginosa* može prodrati u krv i čini 40% bakterijemija izazvanih ovom bakterijom¹⁹⁴.

2.10.3. INFEKCIJE KOŽE

P. aeruginosa često izaziva različite infekcije kože, podkožnog tkiva i rana i pratećih tkiva (Slika 24.).



Slika 24. Izgled oštećene nokatne ploče izazvane *P. aeruginosa* (www.dandem-pvd.is.kkh.dk)

Uglavnom, bacil izaziva infekcije, ako dođe do narušavanja integriteta kože, izazvanog povredama, dermatitisom i opekotinama (Slika 25).



Slika 25. Opekotina na šaci i podlaktici inficirana *P. aeruginosa* (Stanković Nedeljković, 2015.)

Do infekcije dolazi nakon kolonizacije rane bakterijama iz susednih delova tela i iz spoljne sredine. Zarastanje rana je dinamičan i kompleksan proces koji počinje odmah po oštećenju kože. Bakterije usporavaju taj proces. Ako se zarastanje prolongira nastaje hronična rana. Hronične rane se uglavnom sreću kao dijabetične ulceracije i ulcus cruris (Slika 25.). Sreću se u oko 1-2% svetske populacije, a oko 1% ljudi boluje od ulceracija zbog varikoziteta¹⁹⁵. Nastaju zbog poremećaja venske cirkulacije i poremećaja pritiska.

P. aeruginosa je najčešći izročnik infekcija opekotina. Opekotine inficirane *P. aeruginosa* se mnogo teže i duže leče. Na površini rana ili opekotina se može uočiti fluorescentni pigment u kome se nalazi produkt hemoglobina, verdoglobin¹⁴ (Slika 26.).



Slika 26. Ulcus cruris inficiran *P. aeruginosa* (Stanković Nedeljković, 2015.)

Povišena vlažnost kože je faktor rizika za infekcije uva i kože plivača, stopala sportista i vojnika, perianalnog predela ili delova tela ispod pelena. *P. aeruginosa* je predominantni uzročnik infekcija spoljnog ušnog kanala, a najpoznatiji je sindrom ’’uva plivača’’. Opisane su i infekcije nakon pirsinga. Izaziva acne vulgaris, folliculitis i ecthyma gangrenosum. Hemoragična nekroza kože, ecthyma gangrenosum se javlja kod sepse. Kod dijabetičara infekcije protiču mnogo teže¹⁴.

2.10.4.INFEKCIJE OČIJU

P. aeruginosa je jedan od najčešćih uzročnika bakterijskog keratitisa, neonatalne oftalmije i infekcija sočiva. Bakterija kolonizuje epitel vezujući se za receptore. Ako je imunski sistem kompromitovan, zbog dejstva proteolitičkih enzima, izaziva razarajuću infekciju oka koja može dovesti do gubitka oka.

2.10.5.INFEKCIJE KOSTIJU I POTPORNOG SISTEMA

Infekcije kostiju i potpornih tkiva nastaju direktnim prodorom bacila, nakon mehaničkih oštećenja ili hematogeno sa mesta primarne infekcije. Hematogena diseminacija je češća kod intravenskih narkomana, ako postoje upalni procesi u karlici ili infekcije UT. *P. aeruginosa* ima tropizam za spojeve fibroznog tkiva i hrskavice. Izaziva kontagiozni hronični osteomijelitis i najčešći je uzročnik osteohondritisa kod ubodnih rana stopala.

2.10.6.INFEKCIJE CENTRALNOG NERVNOG SISTEMA

P. aeruginosa prodire u centralni nervni sistem (CNS): iz unutrašnjeg uva, paranazalnih sinusa, direktno povredom glave, hirurški, posle lumbalne punkcije, preko

invazivnih dijagnostičkih procedura ili hematogeno. Najčešće bacil izaziva meningitis i apsces mozga.

2.10.7.OSTALE INFEKCIJE

Bacil izaziva bakterijemiju, primarno kod imunikompromitovanih bolesnika, dece i starijih. Predisponirajući faktori su hematološke maligne bolesti, AIDS, neutropenija, diabetes melitus i ozbiljne opekotine. Većina bakterijemija se javlja u bolnicama. Mortalitet kod bakterijemija je visok.

P. aeruginosa može izazvati oboljene bilo kod dela digestivnog trakta (DT) od usne duplje do rektuma. Može učestvovati u dijarejama dece, perirektalnim infekcijama, tipičnim gastroenteritisima i nekrotičnim enterokolitisima. Često bacili prodiru u organizam preko digestivnog trakta.

Bacil izaziva inflamacije srčanih valvula kod intravenskih narkomana. Endokard invadira direktno iz krvi.

2.11. TIPIZACIJA *P. AERUGINOSA*

Tipizacija izolata *P. aeruginosa* je važna pre svega zbog epidemioloških ispitivanja, jer pomaže da se lakše lociraju izvori infekcija, prati kretanje pojedinih sojeva i rezistencija bacila. Nemaju svi serotipovi jednaki klinički značaj. Različiti serotipovi su predominantni u pojedinim regionima i imaju različiti klinički i epidemiološki značaj.

U tipizaciji *P. aeruginosa* može se koristiti više fenotipskih i molekularnih metoda¹⁹⁶ (Tabela 3.). ESGEM grupa u okviru ESCMID grupe se bavi standardizacijom tipizacionih metoda³¹.

Tabela 3.

Metode tipizacije <i>P. aeruginosa</i>	
Fenotipske tehnike	Molekularne tehnike
Serotipizacija	Specifični PSR
Biotipizacija	RAPD
Rezistotipizacija	Ribotipizacija

Piociin tipizacija	RFLP
	Makrorestrikcija (PFGE)
	Hibridizacija-DNK probe
	MLST
	Bakteriofag tipizacija
	Ispitivanja plazmida

Svaka od metoda tipizacije ima prednosti i nedostatke.

Karakteristike fenotipskih metoda su sledeće¹⁹⁷:

- Serotipizacija *P. aeruginosa* je reproducibilna, jednostavna, brzo se izvodi i osetljiva je. Princip je reakcija aglutinacije sa specifičnim antiserumima. Jedan od nedostataka je da može da bude lažno pozitivna. Ipak, serotipizacija je adekvatna tipizaciona metoda za epidemiološka ispitivanja.
- Biotipizacijom se ispituju različite metaboličke karakteristike bacila. Prednost ove metode je laka automatizacija.
- Rezistotipizacija je jednostavna za izvođenje, jeftina, ali je nesvrishodna kod multirezistentih izolata.
- Bacteriocin tipizacija nije reproducibilna. Kod svih metoda problem može da bude pogrešna identifikacija.

Specifičnosti molekularnih metoda su sledeće¹⁹⁷.

- Specifičnom polymerase chain reakcijom (PSR) vrši se detekcija pojedinačnih gena ili pravljenje mape gena. Lako se izvodi i može se analizirati više gena odjednom.
- RAPD (nasumično umnožena polimorfna DNK) je PSR bazirana metoda, pri kojoj se koristi početna sekvenca koja amplifikira pojedine delove genoma. Prednost metode je što se može analizirati veliki broj uzoraka odjednom. Nedostaci su visoka cena i nemogućnost poređenja rezultata sa drugim rezultatima.
- Ribotipizacija je PSR bazirana metoda sa amplifikacijom ribozomalne DNK uz restriksijsku analizu uz različite enzime. Metoda je poznata. Nedostatak je loša diskriminacija i nemogućnost poređenja rezultata sa drugim rezultatima.

- RFLP (polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata) je restrikcijska analiza uz različite enzime. Metoda je pouzdana, razlikuje više varijanti gena, ali je skupa.
- Elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE) se zasniva na analizi genoma restrikcijom i separacijom u pulsirajućem polju. Ovo je standardna metoda tipizacije. Nedostaci ove metode su visoka cena, dugotrajna je i nema poređenja rezultata sa drugim rezultatima.
- Nedostaci bakteriofag tipizacije su slabija reproducibilnost i povremeno nedovoljna dostupnost bakteriofaga.
- Analiza plazmidskih ispitivanja daje brze rezultate, ali ta metoda može biti nedovoljno osetljiva.
- MLST (tipizacija na osnovu multilokusnih sekvenci) podrazumeva parcijalno sekvencioniranje sedam alela PSR-om. Ovo je precizna metoda koja omogućava poređenje podataka. Ali metoda je skupa i dugotrajna.
- Hibridizacija DNK se zasniva na detekciji i lokaciji gena poređenjem specifičnim probama. Prednost je dobra detekcija i pouzdanost. Može se analizirati veliki broj uzoraka odjednom. Nedostaci su dugotrajnost i cena izvođenja.

Molekularne metode većini kliničkih laboratorija nisu dostupne. Ispitivanja su skupa i zahtevaju dodatnu opremu. Najpotpuniji rezultati dobijaju se kombinacijom više metoda. Neophodna je koordinacija metodoloških postupaka, koji se izvode u različitim delovima sveta.

2.11.1.SEROTIPIZACIJA *P. AERUGINOSA*

Po Međunarodnoj tipizacionoj šemi (IATS) *P. aeruginosa* ima 20 serotipova, ali se ne koristi ista šema u svim delovima sveta. Odnos između serotipova različitih klasifikacionih šema je prikazan na tabeli 4.¹⁹⁸

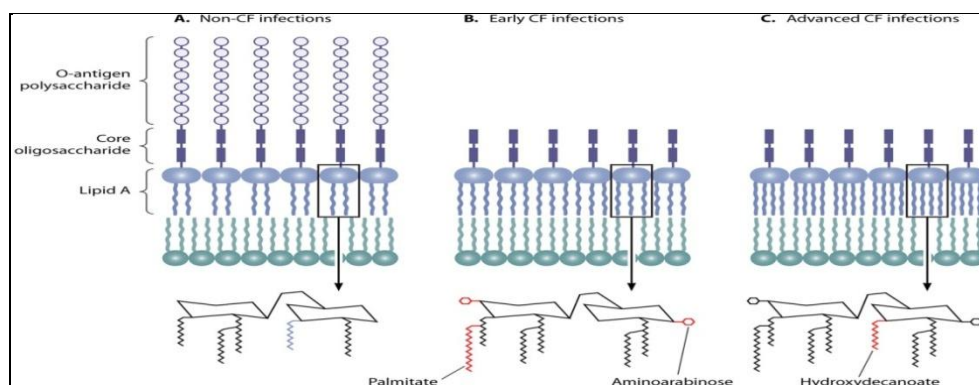
Tabela 4.

Odnos između pojedinih serogrupa u različitim klasifikacionim šemama

IATS	Serogrupe u šemama								
	Habs (11)	Sandvik (31)	Veron (35)	Verder- Evans (34)	Lanyi (17)	Homma (12)	isher (9)	Meitert (24)	Lanyi- Bergan (18)
1	1	VII	1	IV	6	10	4	9	1
2	2		2	I	3	2	3	2	2a,2c
3	3	III	3	VI	1	1		5	3
4	4	IV	4		11	6		8	4a,4c
5	5		5	X		7		6	2a,2d
6	6	V	6	II	4	8		1	6a
7	7		7						7a,7b,7c
8	8	VIII	8	VIII	5	3	6	6	7a,7b,7d
9	9		9	IX	9,10	4			9a
10	10		10		2	9	5	8	10a,10b
11	11	VI	11	III	7			7	11a,11b
12			12	VII	13				12
13		II	13			12			13a,13b
14				V					13a,13c
15					11	11			15
16					13	13			2a,2b
17								10	14

U serotipizaciji se primenjuje slide aglutinaciona tehnika sa antiserumima kunića. Reakcija nastaje između antiseruma i B LPS *P.aeruginosa*. Jedno od ograničenja je da su neki sojevi neaglutibilni, poliaglutibilni ili autoaglutibilni. U različitim ispitivanjima procenat netipibilnih sojeva može biti 10% do skoro 40%^{198,199}.

U anaerobnim uslovima i kod hroničnih infekcija se smanjuje količina B LPS²⁰. Sojevi izolovani kod hroničnih bolesti, naročito kod CF, zbog smanjene količine LPS, preciznije zbog manjka D-glukoze i L-ramnoze, ne mogu dati pozitivnu reakciju aglutinacije (Slika 27.). Mogućnost aglutinacije se povećava, ako se u glukozni bujon sa kulturom *P.aeruginosa* doda amikacin u količini od 1/6 minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za taj izolat. Kod serotipa P12 D-glukoza i L-ramnoza nisu prisutni, pa su ovi sojevi uvek tipibilni²⁰⁰.



Slika 27. Karakteristike građe LPS *P.aeruginosa* kod akutnih i hroničnih infekcija na primeru CF (gopixpic.com)

Serotizacija može biti otežana kod sojeva koji su kultivisani na krvnim agar pločama ili nakon subkultivacije. Ovi sojevi mogu biti poliaaglutibilni. Za kultivaciju sojeva koji se aglutinišu treba koristiti triptikaza soja agar. Kod neuspešne aglutinacije preporučuje se zagrevanje soja u Lauril bujonu 10 minuta na 120° C. Nakon hlađenja ponovlja se izvođenje reakcije aglutinacije¹⁹⁷. Većina netipibilnih sojeva ima grube kolonije¹¹. Ako izolat ne aglutiniše ni sa jednim od korišćenih seruma, postoji mogućnost da je ima novi antigen. Postoji i mogućnost neadekvatne identifikacije bacila, jer i druge vrste *Pseudomonas sp.* mogu da proizvode pigmente. U tom slučaju se preporučuje da se izolat inkubiše na temperaturi od 41° C, proveriti mogućnost fermentacije D-glukoze i redukcija nitrata u nitrite.

Serotipovi P2, P5, P16, P18 i P20, koji čine 2 serogrupu, pokazuju imunohemijski ukršenu reaktivnost kad se aglutinišu polivalentnim zečjim antiserumom. Hemijski se razlikuju među sobom na osnovu tipa glikozidne veze ili izomera monosaharida i po prisustvu ili odsustvu acetil supstituenta u šećerima antigena²⁰⁰.

Unakrsna reakcija aglutinacije između pojedinih sojeva nastaje zbog različitih, uglavnom manjih količina termolabilnih antigena. Antigeni potiču od flagela, pila i različitih površnih struktura. Prepoznavanje i klasifikacija tih termolabilnih antigena je mnogo komplikovanija i teža nego klasifikacija termostabilnih antigena.

2.12. PRODUKCIJA PIGMENATA

P. aeruginosa proizvodi više vrsta pigmenata:

1. žuto-zeleni fluorescin (pioverdin ili pseudobaktin),

2. plavo-zeleni piocijanin,

3. crveni piorubin,

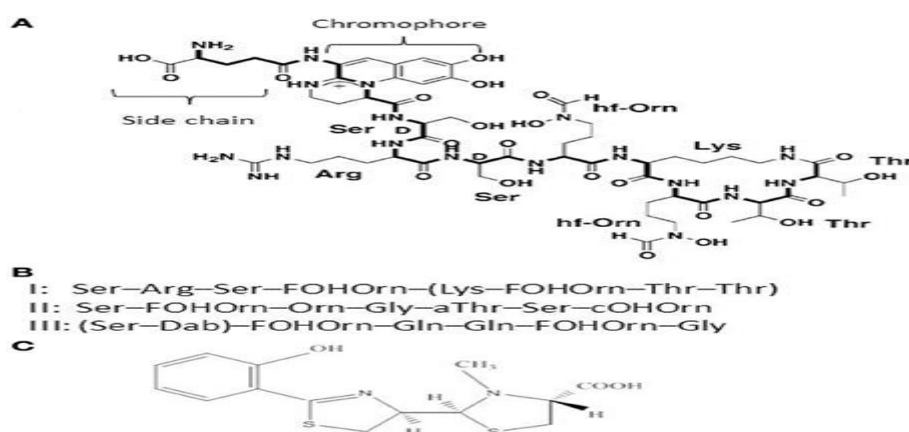
4. crni pionegrin.

Neki sojevi luče samo jedan pigment, a neki više vrsta pigmenata²⁰⁰.

2.12.1. PIOVERDIN

Karakteristična fluorescencija *P. aeruginosa* se javlja zbog žuto-zelenog fluorescentnog pigmenta, pioverdina. Postoje 3 tipa pioverdina, a označeni su kao I, II i III. Pioverdin se rastvara u vodi²⁰¹.

Strukturalno pioverdin se sastoji od tri dela: dihidroksiquinoline hromatofore, kratkih priključenih tip-specifičnih peptida (6 do 12 amino kiselina) i karboksilne kiseline ili amida²⁰¹ (Slika 28.).



Slika 28. Hemijski sastav pioverdina

(<http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fcimb.2013.00075/full>)

Amino kiseline u sastavu pioverdina su često neproteinske i obezbeđuju specifičnost vezivanja za poznate receptore. Peptidni deo molekula je isti kod svih sojeva, a postoji razlika u acil-grupi. Hromatofore omogućavaju vezivanje dva molekula gvožđa i daju karakterističnu fluorescenciju i pigmentaciju pioverdinima *Pseudomonada*. Fluorescencija se smanjuje helacijom gvožđa²⁰¹.

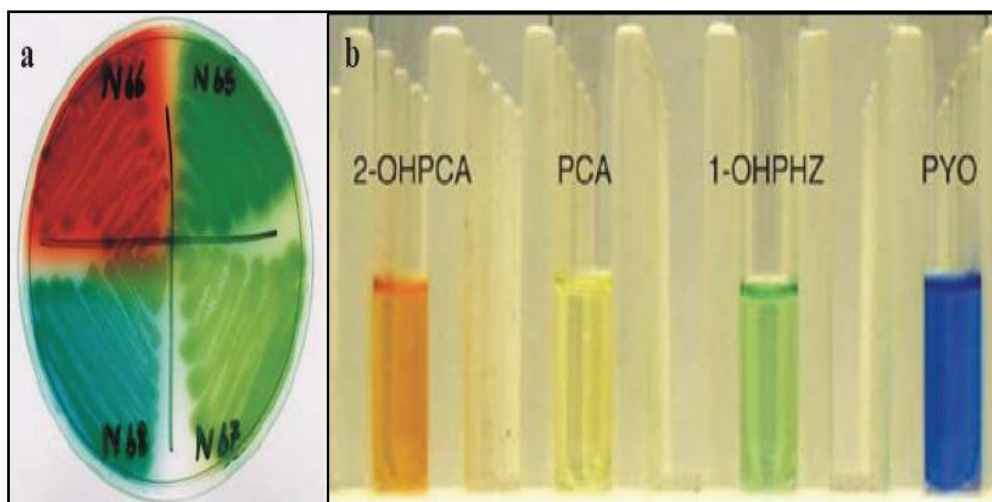
Pioverdin ostvaruje citotoksični efekat zbog svoje sposobnosti da stimuliše produkciju reaktivnog kiseonika i definisan je kao esencijalna komponenta u produkciji biofilma²⁰².

2.12.2. BIOSINTEZA I REGULACIJA FENAZINSKIH PRODUKATA *P. AERUGINOSA*

Piocijanin je fenazinski derivat. Fenazini su velika grupa nisko-molekularnih heterocikličnih jedinjenja koja sadrže azot. Rastvorljivi su u vodi. Razlikuju se po hemijskim i fizičkim karakteristikama, zavisno od tipa i položaja funkcionalne grupe²⁰³. U prirodi je identifikovano više od 100 različitih fenazinskih derivata, a sintetisano je preko 6000 jedinjenja koja sadrže fenazinsko jezgo. Imaju širok spektar bioloških aktivnosti. Fenazini se ubrajaju u takozvane sekundarne metabolite. Za razliku od kofaktora ili intermedijalnih jedinjenja, koji su esencijalni za sintezu ćelijskih struktura, sekundarni metaboliti nisu esencijalni za rast ili reproduktivni metabolizam. Fenazini su specifični produkti određene grupe organizama, ponekad čak pojedinog soja. Zahtevaju specifične uslove da bi inicirali svoju sintezu, određenu temperaturu i pH vrednost. Najviše se luče u stacionarnoj fazi razvoja bakterijske populacije²⁰³. Ne pokazuju očigledni uticaj na rast bakterijskih ćelija, ali je nedavno otkriveno da imaju važnu ulogu kao biokontrolni agensi, transkripcioni modulatori i u redukciji minerala. Neke od tih funkcija utiču na opstanak bacila. Zato se označavanje fenazina kao sekundarnih metabolita poslednjih godina ispituje. Fenazini se ispituju duže od bilo kojih sekundarnih metabolita.

Pseudomonas sp. proizvodi proste fenazine, a fenazine aldehide, estere i tioestere drugi produktori. Fenazini koje proizvodi *Pseudomonas sp.* su: fenazin-L-karboksilna kiselina (PCA), fenazin-L-karboksiamid (PCN), 2-hidroksifenazin-L-karboksilna kiselina (2-OH-PCA), 2-hidroksifenazin (2OH-PSZ), 1-hidroksifenazin (1OH-PHZ) i piocijanin, koji je 5-N-metil-L-hidroksifenazin^{204,205}.

Po hemijskom sastavu fenazini pripadaju alkalnoj klasi jedinjenja, jer sadrže bazičnu amino grupu u svojoj strukturi. Imaju karakterističan apsorpcioni spektar koji uključuje dva pika u UV spektru, između 250 nm i 290 nm i između 350 nm i 400 nm i jedan u vidljivoj oblasti, pa se uočavaju između 400 nm i 600 nm. Pik u vidljivoj oblasti varira. Zavisi od strukture fenazinskog jezgra i daje rast u rasponu boje, od svetlo plave koju daje piocijanin, limun žute koju daje PCA, do narandžaste koju daje 2-OHPCA. Pokazuju fenomen koji se označava i kao "kameleon", kod koga kultura menja boju, zavisno od pH vrednosti i aeracije i reflektuje promene u redoks statusu piocijanina²⁰⁶ (Slika 29.).



Slika 29. Prikaz pojedinih vrsta pigmenata *P. aeruginosa* (Britton, 1983.)

Sposobnost produkcije fenazina je dokazana kod 4 vrste *Pseudomonas* sp.: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. aureofaciens* i *P. chlororaphis*. Sve pseudomonade osim *P. fluorescens*, koji produkuje samo PCA, imaju sposobnost produkcije različitih fenazinskih derivata. *P. chlororaphis* produkuje PCN i 2OH-PCA. Većina sojeva *P. aeruginosa* produkuje piocijanin, PCA, PCN, 1OH-PHZ i aeroginuzine A i B. Produkcija fenazina kod svih sojeva *P. aeruginosa* se javlja u stacionarnoj fazi rasta i pod uticajem QS²⁰⁴.

P. aeruginosa reguliše produkciju piocijanina višestrukim regulatornim sistemima. LasR/LasI i RhIR/RhII QS sistemi učestvuju u aktivaciji produkcije piocijanina. 2-heptil-3-hidroksil-4-quinolin je deo regulatornog sistema^{207,153}. *P. aeruginosa* ima *mvfR* gen, koji je uključen u regulaciju MexGHI-opmD operona, za koga se veruje, da je odgovoran za sekreciju QS signala²⁰⁸. Nasuprot tome QS sistem i njegovi analozi nisu identifikovani kod *P. chlororaphis* i *P. fluorescens*. Kod *P. aeruginosa* ekspresija *phzM* ne zavisi od temperature, za razliku od nekih drugih vrsta. Dosta se zna o regulaciji gena za biosintezu fenazina, ali se malo zna o finoj regulaciji vremena ekspresije i relativne količine produkovanog fenazina. Fina regulacija kod *P. aeruginosa* je pod kontrolom QS signala^{209,210}. Gubitak QS signala dovodi od nemogućnosti produkcije piocijanina.

Fenazini imaju višestruki biološki efekat na ćeliju koja ih produkuje i njeno okruženje. Modifikuju ćelijski redoks sistem, funkcionišu kao ćelijski signali koji regulišu gensku ekspresiju. Fenazini učestvuju u izradnji biofilma. Imaju toksičan efekat na mnoga kohabitujuća živa bića ili domaćina bakterije. U uslovima kada je količina kiseonika ograničena, kod zrelog biofilma, fenazini pomažu bakterijama da generišu energiju kao

akceptori elektrona za reoksidaciju NADH. Sintetički fenazini se mogu koristiti kao izvori energije. Koristi se njihov ometajući efekat na DNK. Ispituje se antiproliferativni i antitumorozni efekat 5,4-fenazina i fenazin-5,10-dioksida²⁰³.

P. fluorescens, *P. chlororaphis* i *P. aerofaciens*, koji se često nalaze u korenu biljaka, proizvode PCA, PCN i OH-PCA. Ove supstance inhibiraju gljivice u korenu biljaka i bakterije koje izazivaju oboljenja korena biljke domaćina. *P. aeruginosa* 7NSK2 koji proizvodi piocijanin, izaziva kod pasulja, paradajza, duvana i pirinča sistemsku rezistenciju prema gljivama. U zemlji, fenazini *P. aeruginosa* stimulišu mineralnu redukciju i omogućavaju bakterijama korišćenje gvožđa i nekih hranljivih jedinjenja, fosfata i organskih jedinjenja²⁰³.

Fenazinska produkcija u nekoj sredini ukazuje na funkcionalnu raznovrsnost bakterijske zajednice. U produkciji *in situ* piocijanin omogućava *P. aeruginosa* opstanak sa *S. aureus*., *Candida albicans* i *Aspergillus fumigatus* za vreme kolonizacije pluća kod CF. Ako je prisutno ulje u njegovom okruženju, *P. aeruginosa* smanjuje bakterijsku raznovrsnost okruženja. Fenazini mogu negativno da utiču na biljke, konkretno na koren pšenice i neke korovske biljke. PCA i 2-OH-PCA se koriste kao herbicidi i u industriji prerade vode kao algicidne supstance. Fenazini su detektovani u količini od 10^{-4} M u sputumu bolesnika sa CF²¹¹. Piocijanin deficijentne mutante su manje virulentne i kompetitivne nego divlji sojevi kod modela pneumonije kod miša^{212,213}. Nasuprot tome, fenazini koje proizvodi *Streptomyces sp.* nemaju toksično dejstvo na ćelije eukariota i imaju antikancerogeno dejstvo.

Piocijanin je toksičan za respiratorni epitel, a deluje na strukturu ćelije i funkciju pila. Umanjuje funkciju nazalnih epitelnih ćelija i utiče na leukocyte. Služi kao ćelijski transmiter koji učestvuje u regulaciji ekspresije gena. Salicilna kiselina inhibiše stvaranje piocijanina.

Derivat piocijanina, piohelin je slabo rastvorljiv u vodi. Piohelin je siderofor koji se nalazi van bacila, a proizvode ga *P. aeruginosa* i *P. fluorescens*. Ima slabiji afinitet prema molekulima gvožđa, ali mu je afinitet viši u tečnoj sredini. Nevezan za gvožđe, pod ultravioletnim zracima pokazuje žuto-zelenu fluorescenciju. Nestabilan je kada je osvetljen. Kada se veže za molekul gvožđa postaje stabilniji, ali onda više nije fluorescentan. Piohelin ima nespecifičnu strukturu za siderofor. Ima dva izomerna oblika, ali samo jedan može vezivati gvožđe. Geni potrebni za sintezu piohelina su organizovani u dva operona: *pchDCBA* i *pchEFGHI*²⁰².

2.13. REAKCIJA *P. AERUGINOSA* NA OKSIDATIVNI STRES

P. aeruginosa deluje negativno na druge organizme, između ostalog, izazivanjem oksidativnog stresa²¹⁴. Fenazini mogu da primaju i otpuštaju elektrone u zavisnosti od svog redoks stanja²¹³. U *in vitro* ispitivanjima, *P. aeruginosa* pomoću NADH vrši redukciju supstrata i formira se nestabilni radikal. Radikal reaguje sa molekulom kiseonika i stvaraju se toksični vodonik peroksid i superoksid. Ove supstance oksidišu glutation i reaguju sa transferinom i piohelinom, pa se formira visoko specifični vodonični radikal. Ove reakcije se označavaju kao oksidativni stres. Reakcija aktivira proinflamatorne procese, što dovodi do oštećenja humanih epitelnih ćelija. Ovi procesi su tipični za inflamacije pluća, kod kojih su medijatori PML²¹⁵.

E. coli ima dva redoks sistema SoxR i OxyR koji kontrolišu odgovor na superoksid i vodonik peroksid²¹⁶ i štite se od oksidativnog stresa. *P. aeruginosa* poseduje oba regulatorna sistema¹⁵⁰. Generalno OxyR ima zaštitnu ulogu²¹⁷. Funkcija SoxR je redukovana na kontolu male grupe gena indukovane piocijaninom²¹⁸ ili redoks aktivne komponente²¹⁹. Piocijanin naj snažnije indukuje gene za putativne monooksigenaze i komponente za protonsku pumpu, mexGHI-OmpD, koji mogu biti uključeni u aktivan efluks piocijanina²¹⁸.

Promene redoks stanja su odrednica stvaranja biomase. Heterotrofni organizmi kataliziraju oksigenaciju izvora organskih kiselina u ćelijski gradivni materijal, pa formiraju prekursore za inkorporaciju u ćelijsku građu. Ovaj potencijal redukcije se može osloboditi u fermentujućim produktima ili transformacijom u eksterno transportovan oksidant preko respiratornog lanca. Razmena elektrona između intra i ekstracelularne sredine dozvoljava organizmu da sačuva intracelularni redoks sistem, uslov za stabilnost i funkcionisanje bioloških makromolekula. U klasičnim laboratorijskim uslovima donori i akceptori elektrona su često u višku, dozvoljavajući mikroorganizmima da kontrolišu ulogu intracelularnog redoks sistema. *P. aeruginosa*, kao i većina heterotrofnih bakterija, oksigenizuje izvore organskog ugljenika preko aktivnosti u Entner-Doudoroff ciklusu i ciklusu limunske kiseline. Nekoliko oksidativnih koraka su povezani sa redukcijom NAD^+ u NADH. NADH se reoksidira da bi se nastavio proces i generisali anaerobni prekursori²⁰³.

Kod *Pseudomonas sp.* proces se održava kroz redukciju jedne od NADPH dehidrogenaza na početku respiratornog lanca. Pseudomonade akumuliraju NADH, kad količine terminalnih akceptora elektrona postanu ograničene²²⁰. Redoks sistem NADH/ NAD^+

igra glavnu ulogu u metabolizmu, nivo redukcija iz oksidisanog oblika predstavlja intracelularno redoks stanje. Odnos NADH/NAD⁺ se razlikuje kod *P. aeruginosa* i bakterija koje se opisuju kao oportunistički patogeni mikroorganizmi u odnosu na *Clostridium welchii*, *Klebsiella aerogenes*, *E. coli* i *S. albus*, kao retkih vrsta kod kojih je odnos NADH/NAD⁺ stabilan i veći od 1²²¹.

Kod *P. aeruginosa* transfer elektrona do fenazina predstavlja adaptaciju koja bakteriji omogućava da menja intracelularno redoks stanje²²². Biosinteza fenazina, pa i piocijanina je regulisana tako, da se proizvode kada je veća ćelijska gustina i ograničena količina akceptora elektrona²²³. Fenazini oksidišu glavne reduktante i redukuju ekstracelularne oksidante, funkcionišući kao redoks medijatori²²⁴. Redoks potencijali piocijanina i fenazin-1-karboksilne kiseline, glavnih fenazina koje proizvodi *P. aeruginosa* P14 su -34 mV i -116 mV²²⁵. Ovi potencijali su dovoljno visoki da omoguće redukciju NADH ($E_0' = -320$ mV) i glutationa ($E_0' = -240$ mV). Potencijali su i dovoljno niski da omoguće prenos elektrona do važnih oksidanata, uključujući kiseonik, nitrata i gvožđe. Transport elektrona preko fenazina može biti mehanizam, kojim pseudomonade mogu koristiti akceptore elektrona koji u niskoj koncentraciji mogu biti nedostupni preko konvencionalnih biohemijskih i enzimskih puteva²²⁶. Uloga ovakvog prenosa elektrona kod metabolizma *P. aeruginosa* je dokazana kod *Shewanella oneidensis* MR-1, ukazujući da fenazini kao i slično struktuirani mali molekuli, ubrzavaju redukciju nerastvorljivog feri oksihidroksida i stimulišu rast²²⁷.

2.14. REZISTENCIJA *P. AERUGINOSA* NA ANTIBIOTIKE

Divlji fenotipovi *P. aeruginosa* su osetljivi na karboksipeniciline (karbenicilin, tikarcilin), ureidopeniciline (azlocilin, piperacilin), cefalosporine treće generacije (ceftazidim i cefoperazon), cefalosporine četvrte generacije (cefepim i cefpirom), monobaktame (aztreonam), karbapeneme (imipenem, meropenem i doripenem), fluorohinolone, aminoglikozide (gentamicin, tobramicin, netilmicin, amikacin) i polimiksine²²⁸. Međutim rezistencija izolata iz bolesničkih materijala, naročito bolničkog porekla, je uglavnom mnogo viša.

Da bi antibiotik bio efikasan, on mora da dođe do ciljnog mesta delovanja, stupi u interakciju s ciljnim mestom i uspešno mu inhibira funkciju.

β -laktamski antibiotici svoje dejstvo počinju odlaskom do transpeptidaze peptidoglikana. Osnovni mehanizam delovanja β -laktamaskih antibiotika (penicilina, cefalosporina, karbapenema i monobaktama) je inaktivacija penicilin vezujućih proteina (PBP) koji su neophodni u sintezi peptidoglikana bakterijskog ćelijskog zida. Inhibicija sinteze peptidoglikana dovodi do oslobađanja autolitičkih hidrolaza i lize bakterijske ćelije. Rezistencija na β -laktame *P. aeruginosa* posledica je nekoliko različitih mehanizama koji bakteriju mogu učiniti potpuno rezistentnom na sve β -laktame. Najčešći mehanizam nastanka rezistencije na β -laktamske antibiotike je produkcija β -laktamaza.

Aminoglikozidi i polimiksini se vežu za LPS spoljne membrane narušavajući njenu propustljivost i dolaze do citoplazmatske membrane, gde se aminoglikozidi aktivnim prenosom unose u citoplazmu²²⁸. Aminoglikozidi dalje odlaze do 30S podjedinica ribozoma, gde ostvaruju svoj efekat. Fluorohinoloni deluju na podjedinice giraze, a polipeptidi odlaze do fosfolipida citoplazmatske membrane. Molekuli β -laktamskih antibiotika i fluorohinolona prolaze spoljnu membranu kroz vodene kanale koje okružuju porinski proteini. Porini oblikuju trimere koji se protežu preko cele širine spoljne membrane. Iako je porin oprF najčešće prisutan, mutante bez ovog porina ne pokazuju rezistenciju na antibiotike. OprD predstavlja mesto prolaza imipenema, pa mutante bez oprD proteina pokazuju rezistenciju na imipenem²²⁸. Meropenem ne koristi ovaj put pri ulasku u bakterijsku ćeliju. Polimiksini takođe utiču na strukturu citoplazmatske membrane.

Mehanizmi nastanka rezistencije *P. aeruginosa* su raznovrsni. Neki mehanizmi sprečavaju prodor antibiotika u bakterijsku ćeliju ili inaktiviraju antibiotik ili omogućavaju izbacivanje antibiotika iz bacila efluksom i nastaju promene ciljnih mesta za antibiotike. Bacil može da produkuje β -laktamaze, ima sposobnost inaktivacije ili modifikacije enzimske produkcije, menja LPS i modifikuje DNK giraze i proteine. Mehanizmi rezistencije na antibiotike se mogu podeliti na urođene i stečene.

Promena ciljnih molekula i PBP nije mehanizam rezistencije tipičan za *Pseudomonas* sp. Može doći do promena 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 imipenem²²⁹.

2.14.1. PRIRODNA REZISTENCIJA *P. AERUGINOSA* NA ANTIBIOTIKE

P. aeruginosa je prirodno rezistentan na kristalni penicilin, ampicilin, amoksiklav, koamoksiklav, prvu i drugu generaciju cefalosporina, nalidiksnu kiselinu, makrolide, hloramfenikol, tetracikline i trimetoprim. Prirodnu otpornost omogućavaju hromozomske AmpC β -laktamaze, hromozomska OXA 10 β -laktamaza, nepropustljivost ćelijske membrane i efluks antibiotika²²⁸.

AmpC β -laktamaze imaju sposobnost hidrolize penicilina, cefalosporina druge i treće generacije, cefamicina, a kada dođe do pojačane produkcije i cefepima²³⁰. Bakterije koje produkuju β -laktamaze proširenog spektra dejstva (ESBL) i AmpC β -laktamaze predstavljaju veliki izazov i mikrobiolozima i kliničarima. U kombinaciji sa gubitkom porina, mikroorganizmi koji posjeduju AmpC β -laktamaze rezistentni su i na karbapeneme. Geni većine AmpC β -laktamaza nalaze se na hromozomima. Bez kontakta sa antibiotikom ekspresija hromozomskih AmpC β -laktamaza je niskog stepena. Dva mehanizma mogu dovesti do povećane produkcije hromozomskih AmpC β -laktamaza. Jedan način je indukcija u prisustvu određenih β -laktamskih antibiotika. Snažni induktori ovih β -laktamaza su ampicilin, cefalosporini uskog spektra. Svi cefalosporini, klavulanska kiselina i imipenem mogu indukovati do određenog stepena njegovu produkciju AmpC β -laktamaza. Iako je induktor, imipenem je stabilan u prisustvu povišene produkcije AmpC β -laktamaza, po čemu se razlikuje od ostalih β -laktamskih antibiotika. Meropenem ima manji induksijski potencijal za AmpC β -laktamaze nego imipenem. Ureidopenicilini i cefalosporini proširenog spektra su slabi induktori, aktivni su u odnosu na inducibilne enzime, ali inaktivni na dereprimirane²³¹.

Drugi mehanizam za ekspresiju konstitutivnih AmpC β -laktamaza je selekcija mutanti sa mutacijom *ampD* gena, koji kodira enzimski represor AmpC. Ove mutante imaju visoku produkciju AmpC β -laktamaza. Boronična kiselina deluje stvarajući kovalentnu vezu sa serinskim reziduama u β -laktamazama. Bolji je inhibitor AmpC β -laktamaza od kloksacilina²³².

U slučaju mutacije regulatornih gena i to najčešće *AmpD*, AmpC β -laktamaza postaje deprimirana parcijalno ili trajno, a posledica je rezistencija na oksiminopeniciline. Ova mutacija je ređa nego kod *Enterobacter sp.*, kod kojih dolazi do pojave potpuno dereprimiranih mutanti sa frekvencijom od 10^{-5} do 10^{-7} . Kod *Pseudomonas sp.* potpuno

dereprimirane mutante nastaju s učestalošću od oko 10^{-9} . Selekcija mutanti nastaje najčešće tokom primene slabih induktora (ureidopenicilina i cefalosporina proširenog spectra)²³¹.

Za razliku od hromosomski kodiranih, AmpC β -laktamaze kodirane plazmidima nisu inducibilne.

Osim *P. aeruginosa* AmpC produkuju i *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marscensens* i *Morganella morganii*. AmpC β -laktamaze prenosive plazmidima se označavaju obično kao AmpC-p. Mogućnost kodiranja AmpC β -laktamaza na mobilnim genetičkim elementima može dovesti do diseminacije rezistencije na antibiotike na različite sojeve mikroorganizama, što je potvrđeno njihovim pronalaskom u mikroorganizme, koji nemaju konstitutivni, hromozomski AmpC gen: *Salmonella sp.*, *Klebsiella sp.*, *E. coli* i *P. mirabilis*.

β -laktamski antibiotici i fluorohinoloni prolaze kroz spoljnu membranu *P. aeruginosa* kroz vodene kanale koje okružuju porinski proteini. Najčešći je porin OprF, ali mutante bez ovog porina ne pokazuju veliku rezistenciju na antibiotike. OprD predstavlja mesto prolaza imipenema, s povećanjem MIK za impenem za 8 μ g/ml do 32 μ g/ml. Merepenem ne koristi ovaj put pri prolasku kroz spoljnu membranu²³⁴.

Efluks pumpa za antibiotike, koja se naziva ABC pumpa, izbacuje antibiotike iz bakterijske ćelije pre nego što stignu da ispolje svoj patogeni efekat. Karakteristika genoma *P. aeruginosa* su osim veličine i veliki broj regulatornih gena i gena koji kodiraju sisteme efluksa¹⁵⁰. Aktivni efluks objašnjava otpornost na veliki broj antibiotika: ceftazidim, cefepin, piperacilin i aztreonam.

Do sada je opisao 12 efluksnih sistema od kojih su najpoznatiji: MexAB-oprM, MexXY-oprM, MehCD-oprJ, MehEF-oprN i MexJK-oprM^{231,233}. Efluksni sistem je transmembranski kompleks sa tri proteina. Jedan je lociran u citoplazmi i deluje na principu energetski zavisne pumpe. Porin se nalazi na spoljnoj membrani, dok ih treći protein povezuje. Mutacija gena koji kodiraju ove proteine dovodi do pojačane aktivnosti pumpe i rezistencije na antibiotike. Najpoznatija pumpa MexAB aktivno izbacuje β -laktamske antibiotike, β -laktamske inhibitore, tetracikline, hloramfenikol, makrolide, fluorohinolone i trimetoprim. Mutacije koje dovode do pojačanog rada pumpe se javljaju za vreme terapije cefalosporinima ili fluorohinolonom. MexCD izbacuje β -laktamske antibiotike, tetracikline, hloramfenikol, makrolide i fluorohinolone. Mex EF posreduje u izbacivanju iz bakterijske ćelije hloramfenikola, fluorohinolona i trimetoprima. Posledica mutacije je rezistencija i na

imipenem. MexXY aktivno izbacuje tetracikline, makrolide, aminoglikozide i fluorohinolone^{233,234}.

2.14.2. BETA-LAKTAMAZE

Postoji više klasifikacija β -laktamaza. Najčešće se koriste podele po Ambler (molekularna klasifikacija) i Bush-Jacoby-Medeiros (funkcionalna podela)²³⁵.

Po Ambler β -laktamaze se dele u 4 glavne klase : A, B, C i D (Tabela 5.). Ova klasifikacija se temelji na homologiji proteina (sličnosti aminokiselina). β -laktamaze klase A, C i D su serinske β -laktamaze, a u B klasi su metalo β -laktamaze (MBL)²³⁶.

Tabela 5.

Klasifikacija β -laktamaza po Ambler

Klasa	Grupa	Vrsta
Klasa A	Penicilinaze	TEM, SHV, PC1, CTX-M, SME-1, KPC-1
Klasa B	Metalo β -laktamaze	IMP-1, VIM-1, CcrA
Klasa C	Cefalosporinaze	AmpC, CMY-1, ACT-1
Klasa D	Oksacilinaze	OXA-1

Po Bush-Jacoby-Medeiros klasifikacionom sistemu, β -laktamaze su grupisane prema sličnosti supstrata na koje deluju. Ovaj klasifikacioni sistem se sastoji od 4 glavne grupe i više podgrupa (Tabela 6.) Opisano je oko 500 različitih tipova β -laktamaza iz kliničkih izolata²³⁶. S obzirom na genetsko poreklo, β -laktamaze se dele na hromozomske i plazmidske.

Tabela 6.

Klasifikacija β -laktamaza po Bush-Jacoby-Medeiros

Grupa 1.	β -laktamaze koje hidrolizuju cefalosporine proširenog spektra, rezistentne na klavulonsku kiselinu	
	Cefalosporinaze	AmpC, CMY-1, ACT-1
Grupa 2.	β -laktamaza osetljive na klavulonsku kiselinu	
2a	Penicilinaze	PC1 (<i>S.aureus</i>)

2b	Penicilinaze širokog spektra	TEM-1, TEM-2, SHV
2be	ESBL	SHV-2, TEM-10, CTX-M, OXA
2br	Rezistentne na inhibitor	TEM; TEM-30, TEM-31, IRT
2c	Hidrolizuju karbencilin	PSE-1
2d	Hidrolizuju oksacilin	OXA-1, OXA-10
2e	Cefalosporinaze inhibisane klav. kis.	FEC-1
2f	Karbapenemaze	KPC-1, SME-1
Grupa 3.	MBL	IMP-1, VIM-1, CcrA
Grupa 4.	Razne	

Grupa 2b β -laktamaza hidrolizuje penicilin i ampicilin, a u manjoj meri karbencilin i cefalotin²³⁵. Hemijski, većina penicilinaza su derivati TEM ili SHV²²⁷. TEM-1 je prvi put opisana 1965. godine u izolatu *E. coli* bolesnika iz Grčke, Temoneire, po kome je enzim dobio ime²³⁷. TEM-1 i TEM-2 su povezane s visokim stepenom rezistencije na peniciline, ali ne na izoksazoil peniciline i starije cefalosporine. SHV su hromozomske β -laktamaze koje se prenose i plazmidima. Većina *Klebsiella pneumoniae* proizvodi SHV-1²³⁷.

Oksacilinaze *P. aeruginosa* se dele u pet grupa označenih od I do V. U grupi I su OXA-5, OXA-7 i OXA-10 sa ESBL derivatima OXA-11, OXA-1, OXA-16, OXA-17, OXA-13 sa ESBL derivatima OXA-19 i OXA-28. U II grupi su OXA-2, OXA-3, OXA-15 i OXA-20. Treća grupa obuhvata OXA-1 derivate grupa -4, -30 i -31, četvrta OXA-9, a grupa V LCR-1²³⁸.

Većina ESBL su derivati oksacilinaze OXA-10. Kod multirezistentnih sojeva izolovane se još i oksacilinaze proširenog spektra OXA-18 i OXA-45 koje se inhibišu klavulonskom kiselinom i tazobaktamom.

OXA-10 slabo hidrolizuje cefotaksim, ceftriakson i aztreonam. OXA-11, -14, -16, -17, -19, -15, -18, -28, -31, -32, -35 i -45 omogućavaju rezistenciju na cefotaksim i ponekad na ceftazidim i aztreonam. Istovremena produkcija karbapenem-hidrolizirajućih MBL i aztreonam hidrolizirajućih OXA laktamaza dovodi do rezistencije na sve β -laktamske antibiotike. Evolucija ESBL OXA tipova β -laktamaza od početnih enzima sa užim spektrom ima sličnosti sa evolucijom SHV i TEM-tipa ESBL²³⁹.

Najčešće β -laktamaze koje proizvodi *P. aeruginosa* su PSE-1 (CARB-2) i PSE-4 (CARB-1), dok su ređe CARB-3 i CARB-4²⁴⁰.

Sekundarne β -laktamaze kod *P. aeruginosa* su ređe. U studiji u Velikoj Britaniji koja je obuhvatila oko dve hiljade izolata, učestalost sekundarnih β -laktamaza bila je 0,7 %²⁴¹.

2.14.2.1. ESBL β -LAKTAMAZE

ESBL su prema Bush-Jacoby-Medeiros klasifikaciji u grupi 2be²⁴². Kod Gram negativnih bacila ESBL β -laktamaze spadaju među najrasprostranjenije i klinički i epidemiološki najvažnije. *P. aeruginosa* proizvodi ESBL nešto ređe nego Gram negativni bacilli, ali su podaci o učestalosti dosta različiti na pojedinim kontinentima.

ESBL hidrolizuju peniciline, cefalosporine prve, druge i treće generacije i aztreonam. ESBL nisu aktivne protiv cefamicina. Neki sojevi koji proizvode ESBL su osetljivi na cefoxitin i cefotetan ili mogu postati rezistentni na cefamicine zbog gubitka porina spoljne membrane. Klavulonska kiselina ih inhibiše. Po tome se razlikuju od AmpC β -laktamaza. U rutinskom laboratorijskom radu, zbog istovremene produkcije AmpC β -laktamaze može biti problema pri detekciji ESBL.

β -laktamaze proširenog spektra se dele se u tri grupe: derivate SHV, derivate TEM i one koje ne vuku poreklo iz TEM ili SHV laktamaza. U ESBL se svrstavaju: TEM (4, 21, 24, 42), SHV (2a, 5, 12), PER-1, VEB (1, 1a, 1b) i BEL-1²⁴³⁻²⁴⁶. Mutacija SHV ili TEM enzima menja konfiguraciju aktivnog mesta, pa imaju širi spektar aktivnosti²⁴⁷⁻²⁴⁹. Mikroorganizmi koji nose gen za SHV-2 su nađeni u svim delovima sveta ukazujući da je nastanak ove β -laktamaze bio posledica selekcijskog pritiska primene treće generacije cefalosporina²⁵⁰. Prva TEM β -laktamaza s ESBL fenotipom opisana je kod *K. pneumoniae* 1988. godine u Francuskoj²⁵¹.

CTX laktamaze hidrolizuju cefotaksim. CTX-M uključuje više od 80 različitih laktamaza koje su podeljene u 6 grupa i uključuju CTX-M -1, -2, -8, -9, -25 i 45²⁵². CTX-M hidrolizuju i cefepim, a MIK za cefepim je viši od registrovanih kod bakterija koje proizvode druge tipove β -laktamaza²⁵¹. Tazobaktam gotovo 10 puta efikasnije inhibira CTX-M tip β -laktamaza u odnosu na klavulonsku kiselinu²⁵². Toho-1 i Toho-2 su strukturno slične CTX-M-tipu β -laktamaza. Ove laktamaze intenzivnije hidrolizuju cefotaksim u odnosu na ceftazidim²⁵³. PER-tip ESBL ima oko 25-27% homologije sa poznatim TEM i SHV tipovima

ESBL²⁵⁴. Najrasprostranjenije su u Turskoj²⁵⁵, a izolovane su i u Italiji, Francuskoj i Belgiji. U Italiji je izolovan *P. aeruginosa* koji produkuje PER-1 i karbapenemaze VIM. Ova kombinacija enzima donosi bakteriji rezistenciju na sve β -laktamske antibiotike. Do sada je nađen samo u Južnoj Americi kod bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae*²⁵⁴. VEB-1 nosi rezistenciju visokog stepena na ceftazidim, cefotaksim i aztreonam. BES, TLA, SFO i IBC su drugi primeri non-TEM, non-SHV ESBL, a otkriveni su širom sveta²⁵⁵.

Ceftazidim, cefepim, cefpirom i aztreonam su supstrati oksacilinaza proširenog spektra koje se nazivaju mešane 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}. Osim derivata OXA-2, većina ESBL OXA laktamaza su derivati oksacilinaze OXA-10. Izolovano se opisuju i oksacilinaze proširenog spektra OXA-18 i OXA-45. Problem je što je samo OXA-18 inhibisana klavulanskom kiselinom, dok ostale oksacilinaze nisu inhibisane klavulanatom ni tazobaktamom, što otežava njihovu identifikaciju u rutinskom laboratorijskom radu²⁴³.

Diseminacija ESBL gena i mutacije su posledica selekcijskog pritiska primene antibiotika²⁵⁶. Produkcija ESBL nije važna samo za bolničke nego i za ambulantne infekcije²⁵⁷.

2.14.2.2. KARBAPENEMAZE

Karbapenemaze su β -laktamaze koje imaju sposobnost da hidrolizuju peniciline, cefalosporine, monobaktame i karbapeneme. Prvobitno su bile opisane kao "karbapenem hidrolizirajući enzimi", pa je taj termin promenjen u karbapenemaze da bi se označilo da su karbapenemi samo jedan od njihovih supstrata. Karbapenemaze se dele u tri molekularne klase A, B i D²⁵⁸ (Tabela 7.).

Tabela 7.

Molekularna i funkcionalna podela karbapenemaza i njihovi supstrati

Molekularna klasa	Funkcionalna grupa	Enzim	Hidrolitički profil					Inhibicioni profil	
			Cefalosporini			Aztreonam	Karbapenemi	EDTA	Klavulanska kiselina
			Penicilini	Rani cefalosporini	proširenog-spektra				
A	2f	NMC	+	+	+	+	+	–	+
		IMI	+	+	+	+	+	–	+
		SME	+	+	±	+	+	–	+
		KPC	+	+	+	+	+	–	+
		GES	+	+	+	–	±	–	+
B1	3	IMP	+	+	+	–	+	+	–
		VIM	+	+	+	–	+	+	–
		GIM	+	+	+	–	+	+	–
		SPM	+	+	+	–	+	+	–
D	2d	OXA	+	+	±	–	±	–	±

Laktamaze iz klasa A i D imaju serin na aktivnom mestu, a iz klase B cink. Klasa A karbapenemaza obuhvata: SME, IMI, NMC, GES i KPC grupe. KPC su najrasprostranjenije. Klasa D karbapenemaza obuhvata OXA tip karbapenemaza. MBL obuhvataju veliku grupu: IMP, VIM, SPM, GIM i SIM. MBL su tipične za *P. aeruginosa*^{259,260}.

Klasi A pripadaju NMC/IMI, SME, KPC i GES. Omogućavaju rezistenciju na karbapenemaze, peniciline, cefalosporine prve generacije i aztreonam²⁶¹. *P. aeruginosa* koji produkuje karbapenemaze klase A može biti osetljiv na cefalosporine širokog spektra. SME-1 je prvo opisana u Engleskoj 1982. godine. SME-1, SME-2 i SME-3 se sporadično opisuju u USA, a razlikuju se od izolata iz ostatka sveta^{262,263}. IMI su retko prisutne u kliničkim izolatima u USA, Francuskoj i Argentini²⁶⁴. Ali nedavno su geni za IMI-2 nađeni na plazmidima *Enterobacter asburiae* u USA i *E. cloacae* u Kini²⁶⁵.

KPC i GES se razlikuju od drugih karbapenemaza. Njihova hidrolitička aktivnost obuhvata laktame svih klasa: nitrocefin, benzilpenicilin, ampicilin, piperacilin, cefalotin, cefaloridin i cefotaksim. KPC je najčešće nalaze kod *K. pneumoniae*, ali su nađene i kod *P. aeruginosa*, *Enterobacter* sp. i *Salmonella* sp.²⁶⁶. KPC su opisane prvi put 1996. godine u USA²⁶⁷. Terapija infekcija izazvanih sojevima koji produkuju ove enzime je veoma teška²⁶⁸.

GES/IBC familija se ređe sreće. IBC-1 je opisana prvi put 2000. godine iz izolata *E. cloacae* u Grčkoj²⁶⁹. GES-1 je opisana i kod *K. pneumoniae*, a izolovana je u Francuskoj Gvajani²⁷⁰. Opisano je 9 varijanti GES. GES-9 je opisana kod *P. aeruginosa* u Francuskoj. Ovi enzimi se razlikuju u samo dve amino kiseline. Po aminokiselinskom sastavu su identične 36% sa KPC-2, 35% sa SME-1 i 31% sa NMC-A²⁷¹. Brzina hidrolize koju vrši GES-4 je četiri puta veća nego GES-2²⁷².

OXA β -laktamaze su jedna od najrasprostranjenijih familija. Uglavnom su identifikovane kod *P. aeruginosa* i *Enterobacteriaceae*²⁷³. Opisano je da hidrolizuju oksacilin i kloksacilin. Uglavnom ih slabo inhibišu klavulonska kiselina i EDTA. ESBL varijante OXA-11, OXA-15, OXA-18 i OXA-45 imaju visok nivo hidrolize ceftazidima u poređenju sa hidrolizom penicilina, ali hidroliza impenema nije detektovana. Do sada su opisane 102 varijante, od kojih je 9 ESBL i najmanje 37 karbapenemaze²⁷⁴.

Prvu OXA laktamazu sa karbapenemaznom aktivnošću je opisao Paton 1993.godine kod izolata *A. baumannii* u Škotskoj²⁷⁵. Laktamaza je bila slabo inhibisana klavulonskom kiselinom i EDTA. OXA-23 predstavlja novu grupu OXA familije sa najvećom sličnošću amino kiselina sa OXA-5 i OXA-10 (36%)²⁷⁴. Najveća raznovrsnost OXA karbapenemaza je otkrivena kod *Acinetobacter baumannii*. Izolati *Acinetobacter* sp. koji produkuju OXA-23 su nađeni u Brazilu i Engleskoj²⁷⁶.

Danas postoji 9 podgrupa OXA karbapenemaza u zavisnosti od amino kiseline homologije (Tabela 8.).

Tabela 8.

Podgrupa karbapenemaza OXA familije β -laktamaza

Klaster	Podgrupa	
	enzima	Ostali članovi
1	OXA-23 (ARI-1)	OXA-27, OXA-49
2	OXA-24	OXA-25, OXA-26, OXA-40, OXA-72
3	OXA-51	OXA-64 to OXA-71, OXA-75 to OXA-78, OXA-83, OXA-84, OXA-86 to OXA-89, OXA-91, OXA-92, OXA-94, OXA-95
4	OXA-58	-
5	OXA-55	OXA-SHE

Podgrupa		
Klaster	enzima	Ostali članovi
6	OXA-48	OXA-54, OXA-SAR2
7	OXA-50	OXA-50a to OXA-50d, PoxB
8	OXA-60	OXA-60a to OXA-60d
9	OXA-62	-

Podgrupe 1, 2 i 3 su zasnovane na građi OXA-23, OXA-24 i OXA-51. Enzimi slični OXA-51 su bili prisutni kod svih testiranih *A. baumannii*²⁷⁷. OXA-58 je manje od 50% identičan sa ostalim članovima OXA familije i on je u podgrupi četiri. Nađen je u Francuskoj, Grčkoj, Italiji, Rumuniji, Turskoj, Argentini i Kuvajtu²⁷⁸. OXA-55 i OXA-SHE iz *Shewanella algae* čine petu grupu, a OXA-48 šestu²⁷⁹. OXA-50-like enzimi *P. aeruginosa* čine sedmu grupu i uključuju set enzima koji se opisuju kao *poxB* enzimi. PoxB oksacilinaze su često prisutne u hromozomima *P. aeruginosa*. Podgrupu devet čini OXA-62, identifikovana kao deo genoma *Pandoraea pnomenusa*²⁸⁰.

OXA laktamaze imaju veoma širok spektar amino kiselinskih sekvenci. Kod onih koje hidrolizuju karbapenem, postoji 40% do 70% sličnosti među grupama. Unutar jedne grupe postoji homologija od 92% naviše²⁸⁰.

2.14.2.2.1.METALO β-LAKTAMAZE

MBL su klinički najznačajnije β-laktamaze. Među Gram negativnim bakterijama *P. aeruginosa* najčešće produkuje MBL. Pripadaju klasi B po Ambleru, podklasi B1 i grupi 3 po šemi Bush²⁴². Osnovna razlika MBL u odnosu na serinske β-laktamaze je da imaju metalni kofaktor, za razliku od serinskih i osetljive su na EDTA. MBL nisu osetljive na inhibitore serinskih β-laktamaza¹⁹⁷ (Tabela 9.).

Tabela 9.

Karakteristike serinskih β-laktamaza i MBL		
Karakteristika	Serinske β-laktamaze	MBL
Grupa po Ambler	Klasa A, C, D	Klasa B

Grupa po Bush-Jacoby-Medeiros	1,2,4	3
Metalni kofaktor	NE	DA
Osetljivost na EDTA	NE	DA
Osetljivost na inhibitore serinskih β -laktamaza	NE	DA
Hidroliza karbapenema	NE*	DA

NE* (uglavnom), GES karbapenemaze mogu da razgrađuju karbapeneme, ali im je aktivnost niža nego MBL

MBL se kao i sve β -laktamaze dele u hromozomski kodirane i stečene²⁸¹. Opisano je više MBL: IMP, VIM, GIM, SPM i AIM-1. Danas je dokazano da MBL luče mnoge Gram negativne i nefermentativne bakterije na svim kontinentima uključujući i divlje sojeve.

Kod Gram negativnih bakterija preovladavaju dva tipa MBL: VIM i IMP sa brojnim alelskim varijantama (IMP 1-24, VIM 1-23). Enzimi IMP tipa prvi put su otkriveni u Japanu 1988. godine^{282,283}. Nakon inicijalnog otkrića *blaIMP* gena kod *P. aeruginosa*, usledili su podaci o proširenosti MBL ovog tipa među sojevima i nekih enterobakterija²⁸⁴. Postojeće i nove alelske IMP varijante kod *P. aeruginosa*, drugih nefermentativnih bakterija i enterobakterija su prisutne u celom svetu. Kod *P. aeruginosa* iz Europe opisane su varijante IMP-1 i IMP-16²⁸⁵. Poslednja opisana alelska varijanta, IMP-22, otkrivena je kod nozokomijalnog izolata *P. aeruginosa* u Italiji, ali i divljih izolata *P. fluorescens*²⁸⁶.

VIM tip prvi put je otkriven u Italiji 1997. godine. Gen *blaVIM-1* otkriven je inicijalno kod *P. aeruginosa*, a zatim kod *Achromobacter xylosoxidans*, *P. putida*^{283,285} i enterobakterija²⁸⁵. *P. aeruginosa* koji produkuje VIM-2 je identifikovan u Portugaliji, Španiji, Poljskoj, Belgiji, Nemačkoj, Švedskoj, Norveškoj, Hrvatskoj, Mađarskoj i Srbiji^{230,286-288}.

MBL imaju vrlo širok profil supstrata koji uključuje sve β -laktamske antibiotike i karbapeneme. VIM-1 i VIM-2 se razlikuju u 25 aminokiselina, ali im je kinetika potpuno različita. VIM-1 bolje hidrolizira većinu β -laktama (piperacilin, azlocilin, tikarcilin, cefotaksim, ceftazidim, cefpirom i meropenem) od VIM-2, s izuzetkom imipenema. SPM-1 dobro hidrolizira većinu terapijskih β -laktama i efikasniji je od IMP-1 i GIM-1. SPM-1 takođe dobro veže i cefalosporine, naročito cefoksitin, jače nego peniciline i karbapeneme. GIM-1 funkcioniše kao penicilinaza s umerenom aktivnošću prema cefalosporinima uskog

spektra i karbapenemima, pa osim imipenema i cefepima vrlo slabo veže većinu β -laktama^{289,290}. Ni jedan od ovih enzima ne hidrolizira aztreonam, pa se aztreonam može koristiti u terapiji kod infekcija uzrokovanim bakterijama koje luče MBL.

Identifikacija SPM-1 MBL je definisala novu familiju sa oko 35,5% sličnosti sa IMP-1. SPM-1 je prvo opisana u Sao Paulu. GIM-1 su opisane 2002. godine u Nemačkoj^{291,292}. GIM imaju oko 30% homologije sa VIM, 43% homologije sa IMP i 29% sa SMP. GIM-1 se nalazi u klasi 1 integrona na plazmidima. SIM-1 je poslednja opisana familija MBL. SIM-1 je najbliži po strukturi IMP familiji (64% do 69%)²⁹³.

Geni koji kodiraju IMP, VIM, GIM i SIM se nalaze na genskim kasetama klase 1 integrona na hromozomu ili na plazmidu²⁸⁴. U integronima koji kodiraju MBL su najčešće geni koji kodiraju rezistenciju na aminoglikozide (*aacA*, *aadA*, *aphA*), trimetoprim (*dfr* varijante), hloramfenikol (*catB*, *cmlA*) i druge β -laktame. Integroni se danas nazivaju i genskim kasetama²⁹⁴.

SPM, GIM i SIM se nisu proširili izvan zemalja u kojima su opisani. VIM i IMP su nastavile da se šire. Postoji tendencija da prelaze sa *P. aeruginosa* na *Enterobacteriaceae*.

3. CILJEVI RADA

Nakon sagledavanja mnogobrojnih problema vezanih za infekcije izazvane *P. aeruginosa* koji su posledica fleksibilne fiziologije bacila, rasprostranjenosti, brojnih faktora patogenosti i rezistencije na antibiotike i podataka iz stručne literature postavljeni su sledeći ciljevi:

- Analiza prisustva *P. aeruginosa* u bolesničkim materijalima hospitalizovanih i ambulantnih bolesnika;
- Serotipizacija kultivisanih izolata *P. aeruginosa* i analiza prisustva pojedinih serotipova kod bolesničkih materijala hospitalizovanih i ambulantnih ispitanika;
- Ispitivanje produkcije fluorescina i piocijanina kod pojedinih serotipova i bolesničkih materijala hospitalizovanih i ambulantnih ispitanika ;
- Ispitivanje adhezivnih sposobnosti kod pojedinih serotipova i bolesničkih materijala hospitalizovanih i ambulantnih ispitanika ;
- Ispitivanje sposobnosti produkcije biofilma kod pojedinih serotipova i bolesničkih materijala hospitalizovanih i ambulantnih ispitanika;
- Ispitivanje sposobnosti trzajućih pokreta kod pojedinih serotipova i bolesničkih materijala hospitalizovanih i ambulantnih ispitanika;
- Ispitivanje sposobnosti rojenja izolata kod pojedinih serotipova i bolesničkih materijala hospitalizovanih i ambulantnih ispitanika;
- Ispitivanje otpornosti na oksidativni stres kod pojedinih serotipova i bolesničkih materijala hospitalizovanih i ambulantnih ispitanika;
- Ispitivanje osetljivosti izolata *P. aeruginosa* iz bolesničkih materijala hospitalizovanih i ambulantnih ispitanika na antimikrobna sredstva (imipenem, meropenem, piperacilin-tazobaktam, kolistin, aztreonam, ceftazidim, cefepim, amikacin, gentamicin, netilmicin, tobramicin, ofloksacin i ciprofloksacin);
- Određivanje MIK za piperacilin-tazobaktam, amikacin i ciprofloksacin;
- Ispitivanje sposobnosti produkcije ESBL;
- Ispitivanje sposobnosti produkcije karbapenamaza;
- Ispitivanje produkcije MBL.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. KULTIVACIJA I IDENTIFIKACIJA *P. AERUGINOSA*

U ispitivanje je uključeno 100 izolata *P. aeruginosa*, 50 iz materijala hospitalizovanih bolesnika i 50 iz materijala ambulantnih bolesnika, kultivisanih u Odseku mikrobiološke dijagnostike ZC "Aleksinac" u Aleksincu, tokom 2011. godine i 2012. godine. Bolesnički materijali hospitalizovanih bolesnika su uzorkovani u Sektoru hirurgije, u okviru koga su Hirurška služba, Odsek ortopedije i Kabinet urologije, Službi internističkih disciplina, Ginekološko-akušerskoj službi i Pedijatrijskom odeljenju ZC "Aleksinac". Izolati su kultivisani iz sledećih bolesničkih materijala: urina, sputuma, vaginalnih sekreta i briseva: rana, ždrela, uva, noseva, očiju i desni. Od svih bolesnika od kojih su uzimani bolesnički materijali ambulantno uzimani su anamnestički podaci. U zavisnosti od bolesničkog materijala tražen je podatak da li je bilo kontakata sa bolničkom sredinom, terapijskog ili dijagnostičkog postupka pri kome bi bacil mogao biti prenešen na bolesnika. Podaci hospitalizovanih bolesnika su uzimani iz elektronske baze podataka.

Izolacija *P. aeruginosa* vršena je standardnim bakteriološkim metodama. Primarno, urini su zasejavani na krvne (Torlak, Srbija) i MacConkey agar ploče (Torlak, Srbija), a sputumi i vaginalni sekreti i cervikalni brisevi na krvne i čokoladne agar ploče. Brisevi rana i očiju zasejavani su na krvne i MacConkey agar ploče, glukozni bujon i tioglikolatni bujon (Torlak, Srbija). Brisevi uva kultivisani su na krvne, čokoladne i MacConkey agar ploče i u glukozni i tioglikolatni bujon sa dekstrozom. Glukozni i tioglikolatni bujon, presejavani su posle 24 časa na krvne agar ploče i MacConkey agar ploče. Brisevi ždrela i nosa zasejavani su na Columbia agar ploče sa 5% ovčje krvi²⁹⁶ (HiMedia, Indija).

U identifikaciji *P. aeruginosa* korišćene su standardne mikrobiološke metode. Identifikacija izolovanih sojeva obavljena je na osnovu njihovih mikroskopskih, kulturelnih i fiziološko-biohemijskih osobina. Izolati *P. aeruginosa* presejavani su na podloge specijalizovane za *P. aeruginosa*: *Pseudomonas* izolacioni agar (HiMedia, Indija), *Pseudomonas* agar bazu (HiMedia, Indija), Acetamidni agar (HiMedia, Indija), Asparagin prolin bujon (HiMedia, Indija), *Pseudomonas* asparagin bujon (HiMedia, Indija), Bushnell-Haasov agar (HiMedia, Indija), Cetrimid agar bazu (HiMedia, Indija), *Pseudomonas* podlogu

za produkciju piocijanina (HiMedia, Indija), *Pseudomonas* podlogu za produkciju fluorescina (HiMedia, Indija) i moždano-srčano infuzioni agar (HiMedia, Indija). Zasejane podloge su inkubisane 24 časa aerobno. U aglutinaciji su korišćeni izolati *P. aeruginosa* sa triptikaza soja agara (HiMedia, Indija).

Sposobnost korišćenja citrata, kao jedinog izvora ugljenika, je ispitivana na kosoj Simons-citratnoj podlozi (Torlak, Srbija). Test razgradnje skroba je izvođen na podlozi koja je sadržala 10% skroba i hranljivi agar (Torlak, Srbija). Posle 48h inkubacije podloga je prelivana Lugolovim rastvorom. *P. aeruginosa* ne fermentuje skrob, pa se podloga prebojava u plavo zbog reakcije joda i skroba. Ispitivanje produkcije katalaze vršeno je tako što je na kolonije kultivisane na hranljivom agaru dodavan 3% H₂O₂. Kod pozitivne reakcije, na površini su se pojavljivali mehurići od nastalog kiseonika²⁹⁵.

Oksidaza test je vršen tako što je na traku sa impregiranim oksidaza reagensom (Torlak, Srbija) stavljana kultura *P. aeruginosa*. Kod pozitivne reakcije dolazilo je nakon 10 min do promene boje kulture i papira iz bele u crnu. Test produkcije želatina vršen je na podlozi sa 10% želatina (Torlak, Srbija) koja je zasejavana ubodnom ezom. Nakon 48 sati inkubacije podloga je stavljana 60 min u frižider. Ako je podloga ostajala tečna nakon hlađenja, test je smatran pozitivnim²⁹⁷.

4.2. SEROTIPIZACIJA

Serotipizacija *P. aeruginosa* vršena je reakcijom aglutinacije na pločici, po uputstvu proizvođača seruma. U aglutinaciji izolata *P. aeruginosa* su korišćeni polivalentni i monovalentni serumi (Bio-Rad, Francuska). Set za aglutinaciju sadrži 4 polivalentna i 16 monovalentna seruma. Polivalentni serumi su PMA, PMF, PME i PMC. PMA grupa obuhvata sledeće serotipove: P1, P3, P4 i P6, a PME P2, P5, P15 i P16. PMC grupa obuhvata P9, P10, P13 i P14 i PMF P11, P12, PO7 i P8.

Aglutinisani su izolati kultivisani na triptikaza soja agaru, nakon inkubacije od 24 časa³⁰. Na staklenu pločicu stavljana je jedna kap seruma, pa ispitivana kultura. Pločica je rukom rotirana do 2 minuta, a reakcija je zatim očitavana. Aglutinacija je opisivana kao pozitivna samo ako je došlo do jasne aglutinacije u roku od dva minuta. Neki izolati su bili poliaglutibilni, a drugi nisu aglutinimali ni jedan serum. Svi takvi izolati su označavani kao

netipibilni. Pojedini izolati su aglutinirali samo polivalentne serume, a ne pojedinačne. Takvi podaci su posebno notirani.

4.3. PRODUKCIJA PIGMENATA

Pigmenti *P. aeruginosa* su uočljivi na većini podloga, ali pošto neki sojevi luče više vrsta pigmenata, produkcija pigmenata je očitavana sa specijalizovanih podloga za produkciju pigmenata: *Pseudomonas* podloge za diferencijaciju fluorescina (HiMedia, Indija) i *Pseudomonas* podloge za diferencijaciju piocijanina (HiMedia, Indija). Produkcija fluorescina je očitavana kao pozitivna, ako je dolazilo do produkcije zelenih fluorescentnih kolonija na *Pseudomonas* podlozi za diferencijaciju fluorescina. Produkcija piocijanina je očitavana kao pozitivna, ako je dolazilo do produkcije plavog pigmenta na *Pseudomonas* podlozi za produkciju piocijanina. Na toj podlozi je očitavana i produkcija piorubina. Neki sojevi su produkovali piocijanin, neki fluorescin, a neki oba pigmenta.

4.4. ISPITIVANJE ADHEZIVNIH SPOSOBNOSTI

Ispitivanje adhezivnih sposobnosti vršeno je mikrotitar pločama u Lauril Bertoni bujonu (Liofilchem, Italija). U komore mikrotitar ploče sipano je po 100 µl 24 časa stare kulture *P. aeruginosa* u Lauril Bertoni bujonu. Ploče su inkubirane 60 min u vodenom kupatilu na 37°C. Zatim su otvori mikrotitar ploča ispirani PBS puferom tri puta (pH 7,4). Formirane kolonije su zatim osušene i fiksirane 10 min sa 100 µl metanola. Otvori su ispirani tri puta destilovanom vodom, a zatim su ploče osušene. Za bojenje kolonija korišćeno je 100 µl 0,4% kristal violeta. Boja je odlivana nakon 20 min i otvori su ispirani vodovodskom vodom do pojave bistre vode. Ploče su sušene 3 sata na 44°C. Zatim je u otvore mikrotitap ploča spirano 100 µl 33% glacijalne sirćetne kiselina⁷⁴. Nakon 20 min čitan je intenzitet boje na 610 nm (BioKit, Microwell EL 301, USA). Negativna kontrola je vrednost ekstincije sterilnog Lauril Bertoni bujona.

4.5. PRODUKCIJA BIOFILMA

Ispitivanje produkcije biofilma vršeno je modifikovanom metodom po Stepanoviću u Lauril Bertoni bujonu u mikrotitar pločama²⁹⁸. U komore mikrotitar ploča sipano je po 100 µl 24 časa stare kulture *P. aeruginosa* u Lauril Bertoni bujonu. Ploče su inkubirane 24 časa u vodenom kupatilu na 37°C. Nakon inkubacije otvori mikrotitar ploča su ispirani PBS puferom tri puta (pH 7,4). Formirane kolonije su zatim osušene i fiksirane 10 min sa 100 µl metanola. Potom su otvori ispirani destilovanom vodom tri puta, a zatim su ploče osušene. Za bojenje kolonija korišćeno je 100 µl 0,4% kristal violeta. Boja je odlivana nakon 20 min i otvori su ispirani vodovodskom vodom do pojave bistre vode. Ploče su sušene 3 sata na 44°C. Zatim je u otvore mikrotitap ploča sipano 100 µl 33% glacijalne sirćetne kiselina. Nakon 20 min. čitan je intenzitet boje na 610 nm (BioKit, Microwell EL 301, USA)^{74,297}. Negativna kontrola je vrednost ekstincije sterilnog Lauril Bertoni bujona.

Na osnovu izmerene ekstincije i negativne kontrole, izolati su klasifikovani u više kategorija. Ako je izmerena vrednost oko vrednosti negativne kontrole, izolat ne produkuje biofilm. Izolati slabo produkuju biofilma, ako je izmerena vrednost do dva puta viša od vrednosti negativne kontrole. Izolati koji umereno produkuju biofilm imaju vrednosti ekstincije od dva do četiri puta veće od negativne kontrole, a izolati snažno produkuju biofilm, ako je vrednost viša od četiri puta od negativne kontrole²⁹⁸⁻³⁰⁰.

4.6. ISPITIVANJE TRZAJUĆIH POKRETA

Ispitivanje trzajućih pokreta *P. aeruginosa* vršeno je na 1% Lauri Bertoni agaru (Liofilchem, Italija). Podloga je zasejavana ubodnom ezom do dna Petrijeve šolja. Posle inkubacije od 48 h na 37°C posmatrana je zamućena zona rasta između agara i polistirenske površine. Agar je pomeran i destilovanom vodom su ispirane nevezane ćelije. Vezane ćelije su bojene prelivanjem Petri šolje 5 min sa 1% rastvorom kristal violeta^{130,301}. Ploča je ispirana ponovo destilovanom vodom do pojave bistre vode. Nakon sušenja meren je prečnik kolonije. Ako je kolonija rasla u više pravaca, merena je dužina svakog kraka i izračunavana je srednja vrednost.

4.7. ISPITIVANJE ROJENJA

Ispitivanje rojenja *P. aeruginosa* vršeno je na 0,5% Lauril Bertoni agaru. Podloga je zasejavana ubodnom ezom do dna Petrijeve šolje. Posle inkubacije od 48h na 37°C meren je prečnik kolonija. Ako je kolonija rasla u više pravaca, merena je dužina svakog kraka i izračunavana je srednja vrednost^{130,301}.

4.8. REAKCIJA NA OKSIDATIVNI STRES

Test je izvođen sa kulturama *P. aeruginosa* nakon inkubacije od 24 časa u glukoznom bujonu. Kultura je presejavana na 2% triptikaza soja agar. Na svaku ploču su stavljeni sterilni diskovi filter papira prečnika 7 mm, na koje je nakapavano 10 µl 30% H₂O₂. Dijametar zone inhibicije rasta je meren nakon inkubacije od 24h na 37°C^{130,301}.

4.9. OSETLJIVOST NA ANTIBIOTIKE

Osetljivost *P. aeruginosa* na antibiotike proveravana je disk difuzionom metodom po CLSI standardu (2013. godina M-100-S-21)³⁰². Suspenzija bakterija u glukoznom bujonu, gustine 0.5 McFarlanda, je sipana na površinu Mueller-Hintonovog agara (Torlak, Srbija). Podloga je prosušena 30 min. Nakon toga su na površinu agara stavljeni komercijalni diskovi: piperacilin-tazobaktam (100/10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), kolistin (10 µg), ceftazidim (30 µg), cefepim (30 µg), aztreonam (10 µg), amikacin (30 µg), gentamicin (10 µg), netilmicin (30 µg), tobramicin (10 µg), ofloksacin (5 µg) i ciprofloksacin (5 µg) (Rosco, Danska). Osetljivost na antibiotike je očitavana nakon 24h, na osnovu zone inibicije porasta oko diska i označavana je kao senzitivna, intermedijarna i rezistentna.

Na osnovu rezistencije na aminoglikozide izolati su deljeni u četiri grupe. U prvoj grupi su izolati koji su osetljivi ili intermedijarno osetljivi na amikacin, a rezistentni na gentamicin, netilmicin i tobramicin. U drugoj grupi su izolati koji su osetljivi ili intermedijarno osetljivi na amikacin, netilmicin i tobramicin, a rezistentni na gentamicin. U trećoj grupi su izolati osetljivi ili intermedijarno osetljivi na amikacin i netilmicin, a rezistentni na gentamicin i tobramicin. U četvrtoj grupi su izolati, koji su rezistentni na

rezistentni na sve aminoglikozide, a u petoj osetljivi ili intermedijarno osetljivi na sve aminoglikozide.

4.9.1. ODREĐIVANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE ZA ANTIBIOTIKE

MIK za piperacilin-tazobaktam, amikacin i ciprofloksacin je određivan kod izolata koji su bili osetljivi ili intermedijarno osetljivi na antibiotike. E-test je izvođen po uputstvu proizvođača traka sa antibiotikom koje su korišćene (Liofilchem, Italija). Bakterijska suspenzija, optičke gustine 0,5 McFarland je sipana na površinu Mueller Hinton agara (Torlak, Srbija). Nakon 30 min na prosušene ploče stavljane su trake sa fabrički nanetim antibiotikom. Nakon 24h očitavana je vrednost MIK, po uputstvu proizvođača traka.

MIK vrednosti su tumačene po standardu CLSI sistema (2013. godina M-100-S-21)³⁰². Izolati koji su imali MIK za piperacilin-tazobaktam do 16 µg/ml su označavani kao senzitivni, od 16 µg/ml do 32 µg/ml kao intermedijarno osetljivi, a od 64 µg/ml, iako je disk difuzionom metodom utvrđeno drugačije, rezistentni. Izolati koji su imali MIK do 16 µg/ml za amikacin su označavani kao senzitivni, od 16 µg/ml do 32 µg/ml kao intermedijarni, a od 64 µg/ml naviše kao rezistenti. Izolati sa vrednostima MIK za ciprofloksacin do 1 µg/ml su označavani kao senzitivni, do 2 µg/ml intermedijarno osetljivi, a iznad 4 µg/ml kao rezistentni.

4.9.2. PRODUKCIJA ESBL

Produkcija ESBL *P. aeruginosa* je ispitivanja korišćenjem diskova cefotaksima (30µg), cefotaksima i klavulonske kiseline (30 µg + 10 µg), amoksicilina sa klavulonskom kiselinom (30 µg + 10 µg), ceftazidima (30 µg + 10 µg) i ceftazidima sa klavulonskom kiselinom (30 µg + 10 µg) (Rosco, Danska). Označavano je se da neki izolat produkuje ESBL u slučaju deformisanja zone inhibicije između ceftazidima i amoksicilina sa klavulonske kiseline ili cefotaksima i amoksicilina sa klavulonske kiseline ili ako je zona inhibicije porasta oko diska veća za 6 mm oko diska ceftazidima sa klavulonskom kiselinom nego oko diska ceftazidima. Ove metode nisu konfirmativni testovi za *P. aeruginosa*.

U rutinskom laboratorijskom radu ni disk difuziona metoda ni automatizirani sistemi ispitivanja osjetljivosti nisu potpuno pouzdani, kada je u pitanju izrada rezistencije *P. aeruginosa* na antibiotike. Još uvek ima suprotstavljenih mišljenja o načinima pouzdanog testiranja, posebno produkcije β -laktamskih antibiotika.

4.9.3. ISPITIVANJE PRODUKCIJE KARBAPENEMA

Na površinu Mueller-Hintovog agara je zasejavana kultura referentnog soja *E.coli* ATCC 2522³⁰¹. U sredinu ploče je stavljan disk meropenema (10 μ g). Zatim je povlačena crta ispitivane kulture *P. aeruginosa* do diska. Ako dođe do proširenja zone inhibicije porasta niz ispitivanu kulturu na mestu spajanja zone inhibicije porasta *E.coli* i zone inhibicije oko meropenema smatra se, da ispitivani soj produkuje karbapenemaze.

4.9.4. ISPITIVANJE PRODUKCIJE MBL

Produkcija MBL je određivana Hodge testom³⁰². Test se izvodio tako što je suspenzija bakterija u glukoznom bujonu, gustine 0,5 McFarland, sipana na površinu Mueller-Hinton agara (Torlak, Srbija). Zatim su podloge prosušene 30 min. Nakon toga su na površinu agara stavljeni komercijalni diskovi: imipenema (10 μ g) i imipenema (10 μ g) sa EDTA. Razlika u zoni inhibicije porasta oko diskova veća od 6 mm je potvrda da ispitivani izolat produkuje MBL.

4.10. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

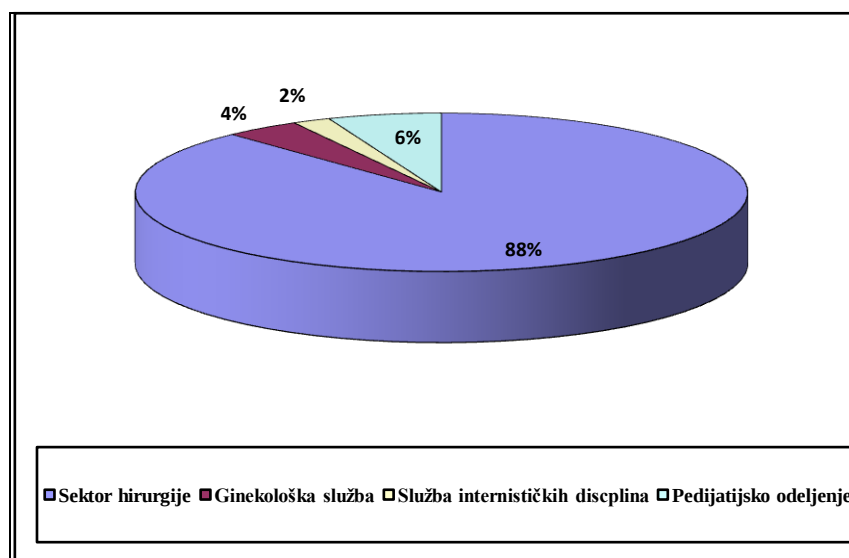
Datoteka je formirana u računaru PS 586 u programskom paketu SPSS 12,0 i pomoću njega je vršena analiza podataka. Za analizu dobijenih rezultata primenjeni su χ^2 kvadrat test i test parametrijskih i neparametrijskih velikih uzoraka³⁰³.

5.REZULTATI RADA

5.1.DEMOGRAFSKE KARAKTERISTIKE ISPITIVANE GRUPE

U ispitivanoj grupi je bilo 59 (59%) muškaraca i 41 (41%) žena. Ispitanici su starosti od 3 meseca do 89 godina. Prosečna starost ispitanika kod kojih je izolovan *P. aeruginosa* je 57,78 godina $\pm$ 16,04 godina, a medijana (Me) je 68 godina. Prosečna starost muškaraca je 61,27 godina $\pm$ 24,27 godina (Me 76 godina). Prosečna starost žena je 52,17 godina $\pm$ 24,22 godine (Me 61 godina).

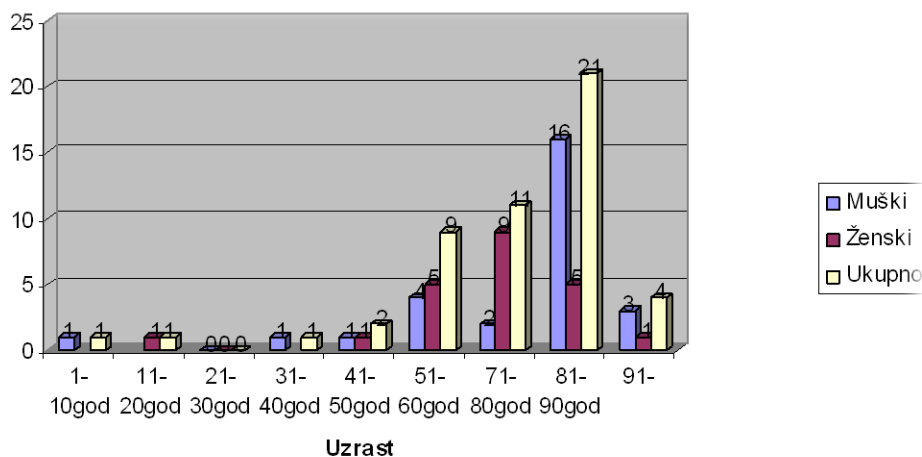
Najveći broj bolesničkih materijala bolničkog porekla iz kojih je kultivisan *P. aeruginosa* je uzorkovan u Sektoru hirurgije (88%), a značajno manji u Pedijatrijskom odeljenju (6%), Ginekološko-akušerskoj službi (4%) i Službi internističkih disciplina (2%) (Grafikon 1.).



Grafikon 1. Odeljenja ZC''Aleksinac'' u kojima su uzorkovani bolesnički materijali

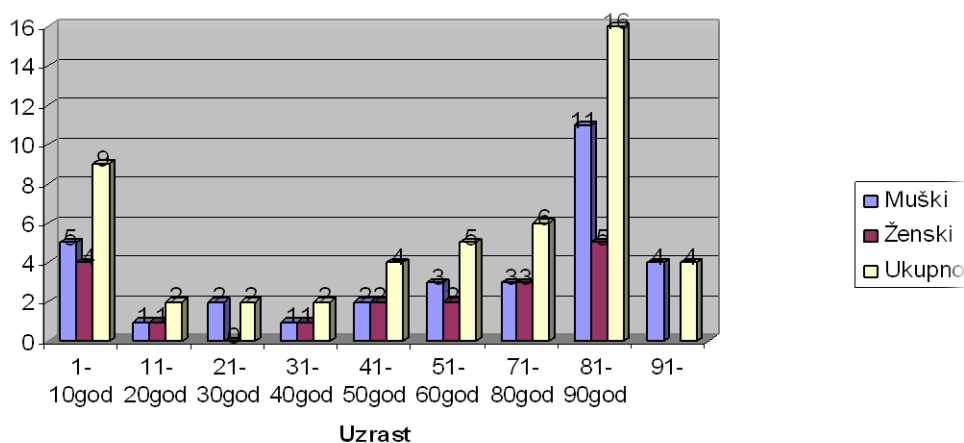
U grupi hospitalizovanih bolesnika kod kojih je izolovan *P. aeruginosa* prosečna starost je 65,08 godina $\pm$ 16,04 godina (Me 69 godina). U ovoj grupi je bilo 30 (60%) muškaraca i 20 (40%) žena. Prosečna starost muškaraca je 67,07 godina $\pm$ 16,13 godina (Me

71 godina), a žena 62,76 godina $\pm$ 16,04 godina (Me 61godina). Na grafikonu 2. prikazana je polna i starosna distribucija hospitalizovanih ispitanika, iz čijih uzoraka je kultivisan *P. aeruginosa*.



Grafikon 2. Demografske karakteristike hospitalizovanih bolesnika iz čijih bolesničkih materijala je kultivisan *P. aeruginosa*

Prosečna starost ambulantnih bolesnika iz čijih materijala je izolovan *P. aeruginosa* je 50,48 godina $\pm$ 28,62 godina (Me 61 godina). U grupi je bilo 29 (58%) muškaraca i 21 (42%) žena. Prosečna starost muškaraca je 55,27 godina $\pm$ 28,78 godina (Me 67 godina). Prosečna starost žena je 43,85 godina $\pm$ 28,55 godina, (Me 53 godine). Na grafikonu 3. je prikazna starosna i polna distribucija ambulantnih ispitanika.



Grafikon 3. Demografske karakteristike ambulantnih bolesnika iz čijih bolesničkih materijala je kultivisan *P. aeruginosa*

5.2.VRSTE BOLESNIČKIH MATERIJALA IZ KOJIH JE KULTIVISAN *P. AERUGINOSA*

P. aeruginosa je najčešće izolovan iz briseva rana (54%) i urina (21%), 75%. Znatno manje je kultivisan iz sputuma, briseva grla, uva, nosa, oka, desni i vaginalnih briseva (Tabela 10.). Prosečna starost ispitanika kod kojih je *P. aeruginosa* izolovan iz briseva rana je 67,32 godine $\pm$ 24,22 godine (Me 67 godina). Kod muškaraca, iz čijih briseva rana je izolovan *P. aeruginosa*, prosečna starost je 66,65 godina $\pm$ 24,22 godine (Me 70 godina). Kod žena prosečna starost je 67,95 godina $\pm$ 24,35 godina (Me 69 godina). Prosečna starost ispitanika kod kojih je *P. aeruginosa* izolovan iz urina je 65,19 godina $\pm$ 24,15 godina (Me 72 godine). Kod muškaraca prosečna starost ispitanika je 66,72 godine $\pm$ 24,15 godine (Me 72 godine). Kod žena prosečna starost je 56 godina $\pm$ 22,94 godine (Me 52 godine).

Tabela 10.

Vrste uzoraka i pol ispitanika iz čijih bolesničkih materijala je kultivisan *P. aeruginosa*

Vrsta uzorka	Muškarci		Žene		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%
Bris rane	31	31	23	23	54	54
Urin	18	18	3	3	21	21
Bris ždrela	4	4	3	3	7	7
Sputum	2	2	3	3	5	5
Vaginalni bris	-	-	5	5	5	5
Bris uva	2	2	1	1	3	3
Bris oka	1	1	1	1	2	2
Bris nosa	-	-	2	2	2	2
Bris desni	1	1	-	-	1	1
Ukupno	59	59	41	41	100	100

Kod ispitanika koji su hospitalizovani, *P. aeruginosa* je najčešće kultivisan iz briseva rana i urina (90%) (Tabela 11.). U manjem procentu bio je prisutan u sputumu, brisevima grla

i vaginalnim brisevima. Prosečna starost ispitanika iz čijih briseva rana je izolovan *P. aeruginosa* je 67,23 godine $\pm$ 16,11 godina (Me 69 godina). Prosečna starost muškaraca je 67,81 godina $\pm$ 5,85 godine (Me je 69 godina). Prosečna starost žena je 67,06 godina $\pm$ 16,04 godine (Me 70 godina). Sledeći materijal po učestalosti izolacije *P. aeruginosa* je urin. Prosečna starost muškaraca iz čijih urina je izolovan bacil je 71,33 godine $\pm$ 16,13 godine, Me 75 godina, a žena 30 godina $\pm$ 22,24 godine.

Tabela 11.

Bolesnički materijali i pol hospitalizovanih bolesnika iz čijih bolesničkih materijala je kultivisan *P. aeruginosa*

Vrsta uzorka	Muškarci		Žene		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%
Bris rane	19	38	15	30	34	68
Urin	9	18	2	4	11	22
Sputum	1	2	1	2	2	4
Vaginalni bris	-	-	2	4	2	4
Bris ždrela	1	2	-	-	1	2
Ukupno	30	60	20	40	50	100

Ako analiziramo bolesničke materijale ambulantnih bolesnika, *P. aeruginosa* je najčešće bio izolovan iz briseva rana i urina (60%) (Tabela 12.). U manjem procentu bio je kultivisan iz sputuma, briseva grla, uva, nosa, oka, desni i vaginalnih briseva. Prosečna starost ispitanika iz čijih briseva rana je izolovan *P. aeruginosa* je 66,7 godina $\pm$ 28,2 godine (Me 71 godina). Prosečna starost muškaraca je 64,58 godina $\pm$ 28,26 godina (Me 62 godine). Žene su prosečno starije. Prosečna starost je 71,3 godine $\pm$ 25,14 godina (Me je 71 godina). Urini su sledeći po učestalosti izolacije. Ispitanici iz čijih urina je kultivisan bacil su imali u proseku je 70,5 godina $\pm$ 28,4 godine, (Me 74 godine). Muškarci iz čijih urina je izolovan imali su u proseku 69,77 godina $\pm$ 28,4 godine (Me je 72 godine).

Tabela 12.

Vrste bolesničkih materijala i pol ambulantnih bolesnika kod kojih je izolovan *P.**aeruginosa*

Vrsta uzorka	Muškarci		Žene		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%
Bris rane	12	24	8	16	20	40
Urinokultura	9	18	1	2	10	20
Sputum	1	2	2	4	3	6
Vaginalni bris	-	-	3	6	3	6
Bris ždrela	3	6	3	6	6	12
Bris nosa	-	-	2	4	2	4
Bris oka	1	2	1	2	2	4
Bris uva	2	4	1	2	3	6
Bris desni	1	2	-	-	1	2
Ukupno	29	58	21	42	50	100

5.3. SEROTIPOVI *P. AERUGINOSA*

Identifikovani serotipovi *P. aeruginosa* su pripadali svim polivaletnim serogrupama: PMA, PME, PMF i PMC. Najveći broj izolata pripadao je PMA (31%) i PMF (21.%) polivalentnim serogrupama. Jedan broj izolata je aglutinisao samo sa polivalentnim serumima, ali ne i pojedinačnim (Tabela 13.).

Tabela 13.

Grupna serološka pripadnost izolata *P. aeruginosa*

Polivalentna serogrupa	Bolnički izolati		Ambulantni izolati		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%
PMA	15	30	18	36	33	33
PME	8	16	5	10	13	13
PMC	2	4	1	2	3	3
PMF	11	22	11	22	22	22
NT	14	28	15	30	29	29

UKUPNO	50	100	50	100	100	100
--------	----	-----	----	-----	-----	-----

Reakcijom aglutinacije identifikovani su sledeći serotipovi *P. aeruginosa*: P1, P3, P4, P5, P6, P10, P11 i P12. Najčešće su identifikovani serotipovi P11, P6 i P1, a ostali su bili prisutni u manjem procentu (Tabela 14.). U tabeli su prikazani i izolati koji su aglutinimali samo sa polivalentnim serumima i netipibilni izolati.

Tabela 14.

**Identifikovani serotipovi *P. aeruginosa* u izolatima bolničkog i ambulantnog
porekla**

Serotip	Bolnički izolati		Ambulantni izolati		Ukupno	
	N	%	N	%	N	%
NT	14	28	15	30	29	29
P11	10	20	10	20	20	20
P6	7	14	9	18	16	16
P1	5	10	7	14	12	12
P10	2	4	1	2	3	3
P4	1	2	2	4	3	3
P3	1	2	-	-	1	1
P5	1	2	-	-	1	1
PME	7	14	5	10	12	12
PMF	1	2	1	2	2	2
PMA	1	2	-	-	1	1
Ukupno	50	100	50	100	100	100

Prisustvo pojedinih serotipova kod različitih bolesničkih materijala prikazano je u tabeli 15. U tabeli su prikazani i izolati koji su aglutinimali samo sa polivalentnim serumima i netipibilni izolati.

Tabela 15.Identifikovani serotipovi *P. aeruginosa* kod pojedinih bolesničkih materijala

Vrsta uzorka	Serotipovi						Polivalentne serogrupe						Ukupno
	P1	P3	P4	P5	P6	P10	P11	PMA	PMF	PMC	PME	NT	
Bris rane	7	1	2	-	8	2	13	1	1	-	4	15	54
Urin	3	-	1	1	-	-	5	-	-	-	4	7	21
Sputum	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	2	1	5
Vaginalni bris	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	1	1	5
Bris ždrela	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	2	7
Bris uva	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	1	3
Bris oka	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	2
Bris nosa	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2
Bris desni	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
UKUPNO	12	1	3	1	16	3	20	1	2	-	12	29	100

Identifikovani serotipovi iz materijala hospitalizovanih bolesnika su u tabeli 16.

Tabela 16.Serotipovi *P. aeruginosa* i vrste bolesničkih materijala hospitalizovanih bolesnika kod kojih je izolovan *P. aeruginosa*

Vrsta uzorka	Serotipovi						Polivalentne serogrupe						Ukupno
	P 1	P 3	P 4	P 5	P 6	P1 0	P1 1	PMA	PMF	PMC	PME	NT	
Bris rane	4	1	-	-	5	2	6	1	1	-	3	11	34
Urin	-	-	1	1	-	-	4	-	-	-	3	2	11
Sputum	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	2
Vaginalni bris	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2
Bris ždrela	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
UKUPNO	5	1	1	1	7	2	10	1	1	-	7	14	50

Serotipovi koji su bili prisutni u bolesničkim materijalima ambulantnih bolesnika su prikazani u tabeli 17.

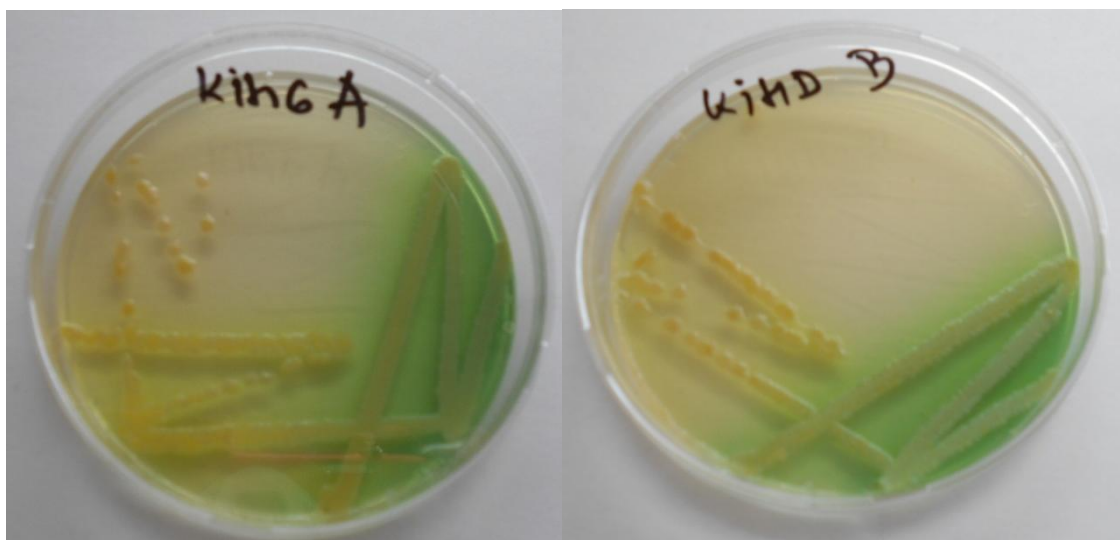
Tabela 17.

**Identifikovani serotipovi *P. aeruginosa* i vrste bolesničkih materijala
ambulantnih bolesnika**

Vrsta uzorka	Serotipovi							Polivalentne serogrupe					Ukupno
	P1	P3	P4	P5	P6	P10	P11	PMA	PMF	PMC	PME	NT	
Bris rane	3	-	2	-	3	-	7	-	-	-	1	4	20
Urin	3	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	5	10
Sputum	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2	-	3
Vaginaln i bris	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	1	3
Bris ždrela	-	-	-	-	3	1	-	-	-	-	-	2	6
Bris uva	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	1	3
Bris oka	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	2
Bris nosa	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2
Bris desni	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
UKUPNO	7		2	-	9	1	10	-	1	-	5	15	50

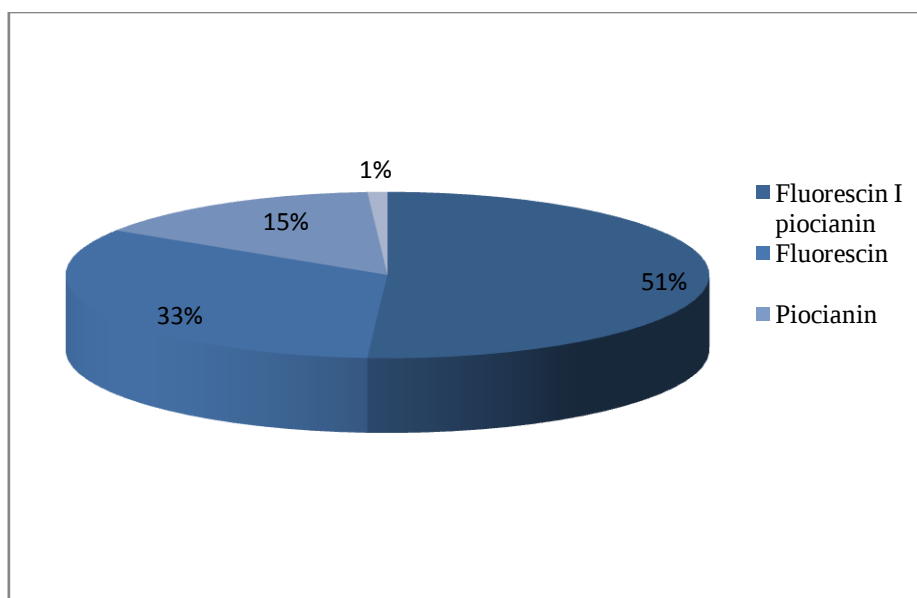
5.4. PRODUKCIJA PIGMENATA

Najveći broj izolata *P. aeruginosa* je proizvodio fluorescein 84%, piocijanin 67%, a 1% piorubin (χ^2 10,54, $p=0,001$, OD 3,04). Izgled pojedinih vrsta pigmenata je na slici 30.



Slika 30 . Kolonije *P.aeruginosa* na King A podlozi i King B podlozi (Stanković Nedeljković, 2015.)

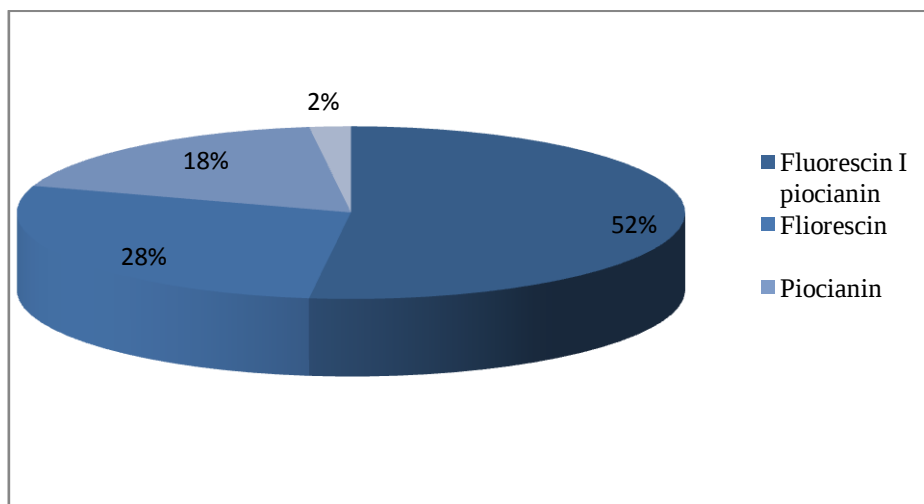
Oba pigmenta je proizvelo 51% izolata, samo fluorescin (33%), a samo piocijanin 15%. (Grafikon 4.).



Grafikon 4. Produkcija pigmenata izolata *P. aeruginosa*

Veći broj izolata *P. aeruginosa* iz bolesničkih materijala hospitalizovanih bolesnika je proizveo fluorescin (80%), a manji piocijanin (70%). Oba pigmenta je proizvelo 52%

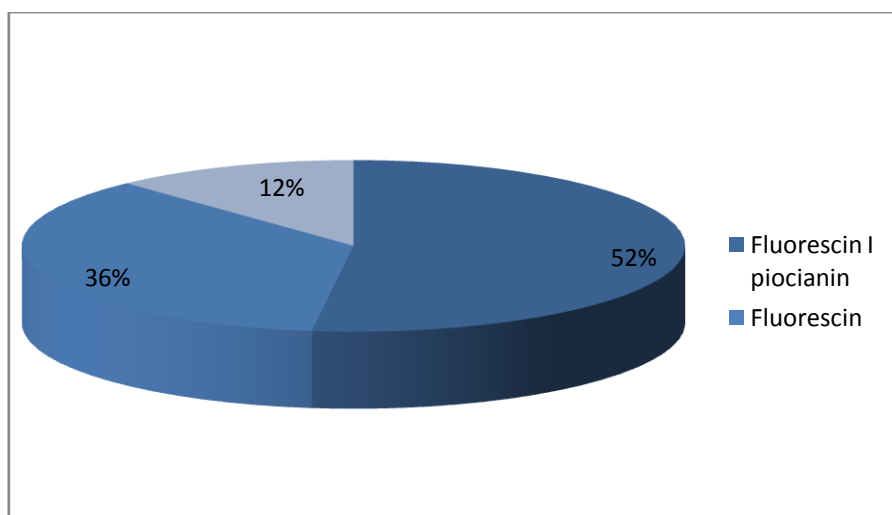
izolata, samo fluorescin 28%, a samo piocijanin 18%, dok je samo jedan izolat je produkovao piorubin (2%) (Grafikon5.).



Grafikon 5. Produkcija pigmenata izolata *P. aeruginosa* iz materijala hospitalizovanih bolesnika

P. aeruginosa kultivisan iz materijala ambulantnih bolesnika je produkovao fluorescin 88%, a piocijanin 64% (χ^2 7,89, $p=0,004$, OR 4,13). Fluorescin i piocijanin je produkovalo 52% izolata, samo fluorescin 36%, a samo piocijanin 12%.

Na grafikonu 6. je prikazana produkcija pigmenata izolata *P. aeruginosa* iz ambulantnih uzoraka.



Grafikon 6. Produkcija pigmenata izolata *P. aeruginosa* iz materijala hospitalizovanih bolesnika

Ako uporedimo produkciju fluorescina kod izolata ambulantnog i bolničkog porekla χ^2 je 1,19 ($p=0,183$), OR 1,83. Pri poređenju produkcije piocijanina kod izolata ambulantnog i bolničkog porekla χ^2 je 15,99, $p= 0.00006$, OR 2,18.

Vrsta pigmenata koju produkuju izolati *P. aeruginosa*, izolovani iz pojedinih vrsta bolesničkih materijala ambulantnih i hospitalizovanih bolesnika je prikazana u tabeli 18. Izolati iz briseva rana produkuju najčešće oba pigmenta (31), nešto manje fluorescin (15) i najmanje piocijanin (8). Izolati iz urina, sledećeg bolesničkog materijala po učestalosti, pak, najviše produkuju samo fluorescin (8), a sa sličnom učestalošću fluorescin (7) i piocijanin (6).

Tabela 18.

Produkcija pigmenata kod izolata *P. aeruginosa* iz različitih vrsta materijala hospitalizovanih i ambulantnih bolesnika

Bolesnički materijal	Vrsta pigmenta				
	Poreklo materijala	Fluorescin i piocijanin	Fluorescin	Piocijanin	Piorubin
Bris rane	Bolničko	19	10	5	-
	Ambulantno	12	5	3	-
	Ukupno	31	15	8	-
Urin	Bolničko	5	3	3	-
	Ambulantno	2	5	3	-
	Ukupno	7	8	6	-
Sputum	Bolničko	1	-	-	1
	Ambulantno	1	2	-	-
	Ukupno	2	2	-	1
Vaginalni bris	Bolničko	1	-	1	-
	Ambulantno	2	1	-	-
	Ukupno	3	1	1	-
Bris ždrela	Bolničko	-	1	-	-
	Ambulantno	3	3	-	-
	Ukupno	3	4	-	-
Bris uva	Bolničko	-	-	-	-

	Ambulantno	2	1	-	-
	Ukupno	2	1	-	-
Bris oka	Bolničko	-	-	-	-
	Ambulantno	2	-	-	-
	Ukupno	2	-	-	-
Bris nosa	Bolničko	-	-	-	-
	Ambulantno	2	-	-	-
	Ukupno	2	-	-	-
Bris desni	Bolničko	-	-	-	-
	Ambulantno	-	1	-	-
	Ukupno	-	1	-	-

Produkcija pigmenta kod pojedinih serotipova *P. aeruginosa* je u tabeli 19. Netipibilni izolati proizvode uglavnom fluorescein i piocijanin (15), nešto manje fluorescein (10) i najmanje piocijanin (3). Izolati najzastupljenijeg serotipa P11 proizvode najviše oba pigmenta, nešto manje fluorescein i najređe piocijanin.

Tabela 19.

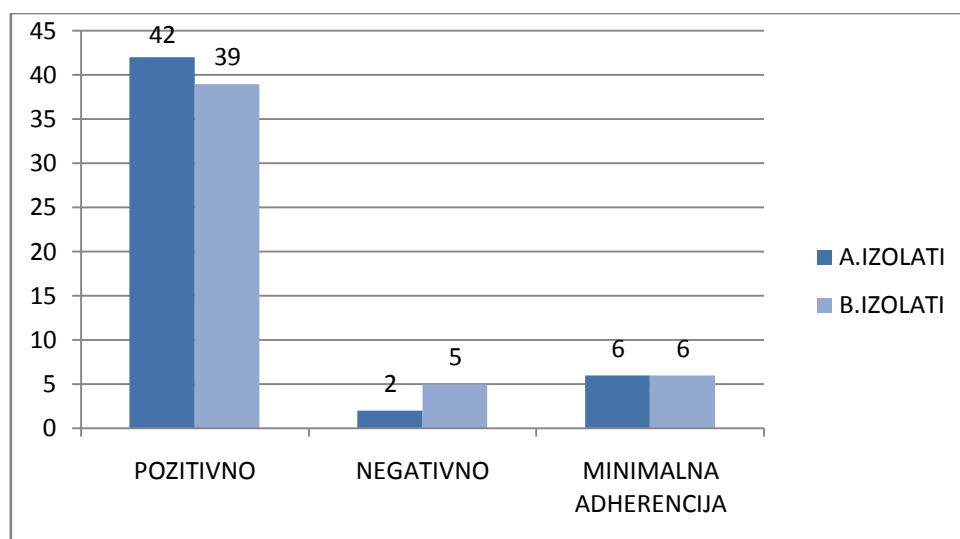
Produkcija pigmenta kod pojedinih serotipova *P. aeruginosa*

Serotip	Vrsta pigmenta				
	Poreklo materijala	Fluorescein i piocijanin	Fluorescein	Piocijanin	Piorubin
P1	Bolničko	3	1	1	-
	Ambulantno	4	2	1	-
	Ukupno	7	3	2	-
P3	Bolničko	-	1	-	-
	Ambulantno	-	-	-	-
	Ukupno	-	1	-	-
P4	Bolničko	-	1	-	-
	Ambulantno	-	1	1	-
	Ukupno	-	2	1	-
P5	Bolničko	1	-	-	-

	Ambulantno	-	-	-	-
	Ukupno	1	-	-	-
P6	Bolnički	4	2	1	-
	Ambulantno	6	2	1	-
	Ukupno	10	4	2	-
P11	Bolničko	3	4	3	-
	Ambulantno	7	3	1	-
	Ukupno	10	7	3	-
PME	Bolničko	4	1	2	-
	Ambulantno	2	3	-	-
	Ukupno	6	4	2	-
PMF	Bolničko	1	-	-	-
	Ambulantno	1	-	-	-
	Ukupno	2	-	-	-
PMA	Bolničko	1	-	-	-
	Ambulantno	-	-	-	-
	Ukupno	1	-	-	-
NT	Bolničko	7	4	2	1
	Ambulantno	8	6	1	-
	Ukupno	15	10	3	1

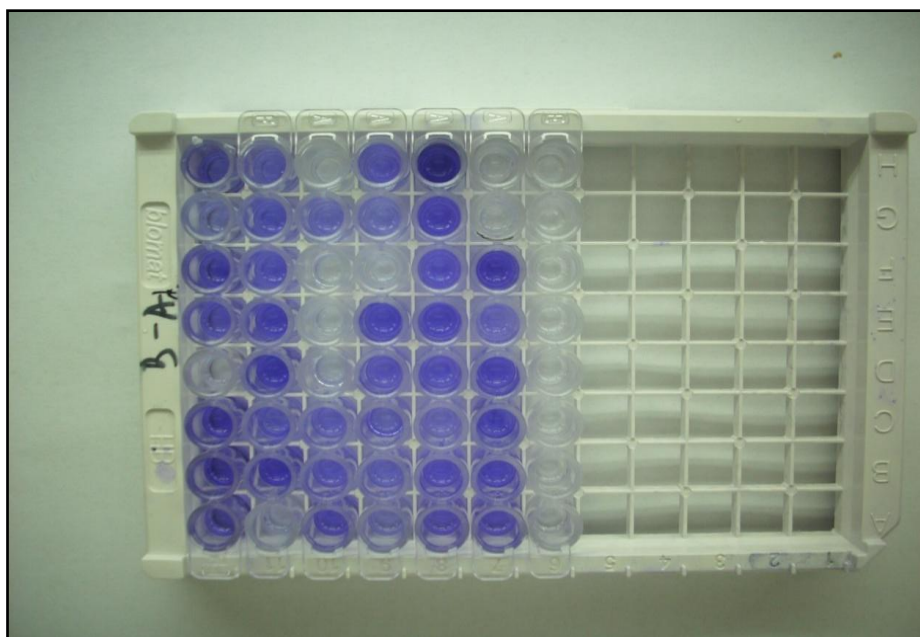
5.5. ADHEZIVNA SPOSOBNOST

Većina izolata (81%) je adherisala na polivinil-hlorid nakon inkubacije od 60 min. Dva izolata bolničkog porekla koja su kultivisana iz briseva rana nisu adherisala. Šest izolata (pet iz briseva rana i jedan iz urina) imalo je minimalno povećanu vrednost ekstincije, pa se ne može sa sigurnošću reći da li je minimalna adhezija ili je varijacija u čitanju ekstincije. Pet izolata ambulantnog porekla nisu adherisala, dok su vrednosti povećanja ekstincije minimalne bile još kod šest izolata minimalne (Grafikon 7.).



Grafikon 7. Adherencija izolata *P. aeruginosa* bolničkog i ambulantnog porekla

Vrednost ekstincije negativne kontrole nakon inkubacije *P. aeruginosa* u Lauril Bertoni bujonu u mikrotitar ploča u vodenom kupatilu na temperaturi od 37°C u trajanju od 60 min. je -0,188 (Slika 31.).



Slika 31. Mikrotitar ploče u kojima je određivana adhezivnost *P. aeruginosa* (Stanković Nedeljković, 2015.)

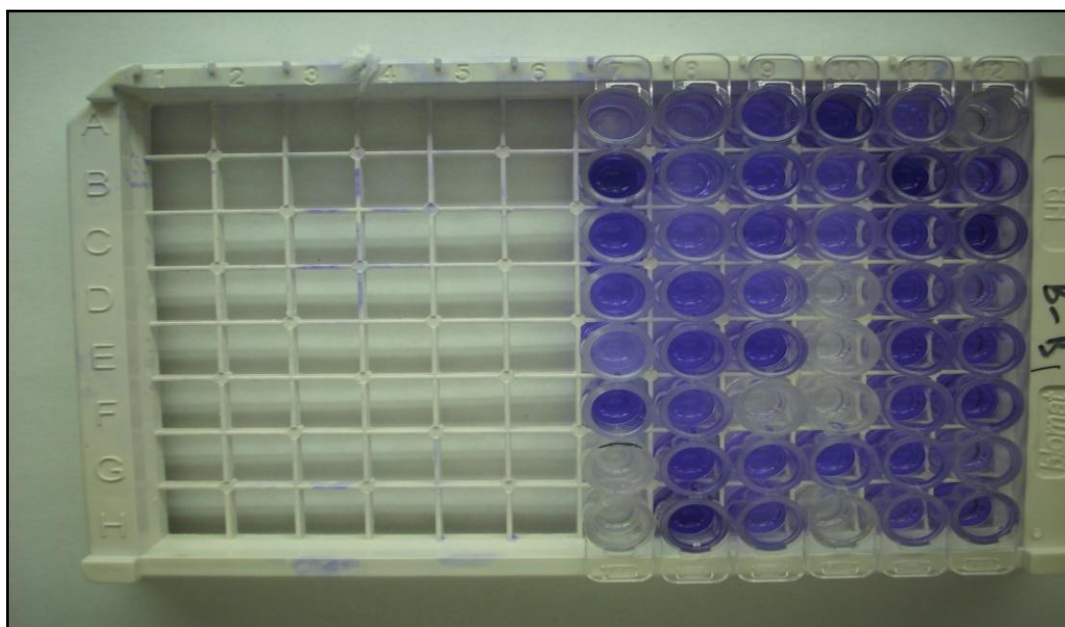
Prosečna ekstincija je $-0,015 \pm 0,129$, a Me $-0,03$. Prosečna ekstincija izolata iz bolesničkih materijala bolničkog porekla je $-0,033 \pm 0,107$, Me $-0,41$. Kod izolata ambulantnog porekla prosečna ekstincija je $0,002 \pm 0,116$ i Me $-0,003$.

Kod izolata iz briseva rana prosečna ekstincija je $0,030 \pm 0,111$, a Me $-0,05$. Kod izolata iz rana bolničkog porekla vrednost prosečne ekstincije je $0,033 \pm 0,097$, Me je $0,062$, a iz rana ambulantnog porekla $0,031 \pm 0,133$, dok je Me $-0,023$. Izolati iz urina su imali prosečnu ekstinciju $0,015 \pm 0,081$, a Me $0,081$. Prosečna ekstincija izolata iz urina bolničkog porekla je $0,038 \pm 0,065$ i Me $-0,143$. Izolati iz urina ambulantnog porekla su imali prosečnu ekstinciju $0,014 \pm 0,094$, dok je Me $0,009$.

Najveću sposobnost adherencije su imali izolati serotipa P1, sa prosečnom ekstincijom $0,039 \pm 0,106$, pa P11 ($0,013 \pm 0,165$) i P6 ($0,003 \pm 0,105$). Netipibilni izolati nisu imali sposobnost adherencije nakon 60min.

5.6. PRODUKCIJA BIOFILMA

Skoro svi izolati *P. aeruginosa* (99%) imali su sposobnost formiranja biofilma (Slika 32.). Samo izolat kultivisan iz vaginalnog brisa bolesnice koja je došla ambulantno nije imao sposobnost formiranja biofilma.



Slika 32. Mikrotitar ploče u kojima je određivana produkcija biofilma *P. aeruginosa* (Stanković Nedeljković, 2015)

Vrednost ekstincije negativne kontrole nakon inkubacije *P. aeruginosa* u Lauril Bertoni bujonu u mikrotitar pločama u vodenom kupatilu na temperaturi od 37°C u trajanju od 24 časa je -0,194. Prosečna ekstincija je $0,154 \text{ mm} \pm 0,154 \text{ mm}$, a Me 0,11mm. Kod izolata bolničkog porekla prosečna ekstincija je $0,092 \text{ mm} \pm 0,127 \text{ mm}$, Me 0,089mm. Prosečna ekstincija izolata iz materijala ambulantnog porekla je $0,216 \text{ mm} \pm 0,155 \text{ mm}$, Me 0,024 mm.

Izolati iz briseva rana su imali manju sposobnost produkcije biofilma nego ostali izolati ($0,129 \pm 0,193$). Pri tome su izolati iz rana ambulantnog porekla imali veću sposobnost produkcije biofilma ($0,203 \pm 0,127$), nego izolati iz rana ambulantnog porekla ($0,083 \pm 0,111$). Izolati iz urina su imali višu sposobnost produkcije biofilma nego ostali izolati ($0,156 \pm 0,155$). Oni koji su poticali iz urina ambulantnog porekla ($0,234 \pm 0,210$) su formirali biofilm veće biomase nego bolnički izolati ($0,114 \pm 0,152$). Ako analiziramo sposobnost pojedinih serotipova da produkuju biofilm, dolazi se do podatka da su netipibilni izolati formirali biofilm najveće biomase ($0,161 \pm 0,182$), pa serotip P1 ($0,146 \pm 0,141$), P11 ($0,145 \pm 0,164$) i P6 ($0,127 \pm 0,134$).

Analizom nivoa uvećanja ekstincije u odnosu na negativnu kontrolu, došlo se do zaključka, da je većina izolata imala umerenu sposobnost formiranja biofilma (87%). Izolati bolničkog porekla su takođe uglavnom imali umerenu sposobnost formiranja biofilma (78%), a manje slabu sposobnost formiranja biofilma (22%). Izolati ambulantnog porekla su imali više izraženu sposobnost formiranja biofilma, 96% je imalo sposobnost umerenog formiranja, a samo 4% slabiju sposobnost formiranja biofilma. Ako uporedimo sposobnost umerene produkcije biofilma kod izolata bolničkog i ambulantnog porekla χ^2 je 14,32, $p=0,001$, OD 0,15, a slabije produkcije χ^2 je 18,94, $p=0,001$, OD 13,82.

5.7. SPOSOBNOST TRZAJUĆIH POKRETA

Svi naši izolati nakon kultivacije od 48h na 1% Lauril-Bertoni agaru su imali sposobnost trzajućih pokreta. (Slika 33.).



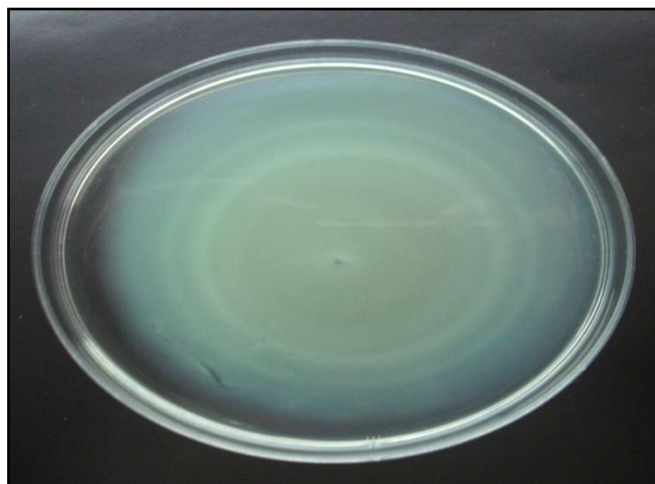
Slika 33. Trzajućipokreti *P. aeruginosa* na 1% Lauril-Betoni agaru (Stanković Nedeljković, 2015.)

Prosečna vrednost prečnika formiranih kolonija je $7,75 \text{ mm} \pm 2,36 \text{ mm}$, a Me 6 mm. Prosečna vrednost prečnika kolonija kod izolata kultivisanih iz materijala hospitalizovanih bolesnika je $7,31 \text{ mm} \pm 4,05 \text{ mm}$, a Me 6,2 mm. Prosečna vrednost prečnika kolonija kultivisanih iz materijala ambulantnih bolesnika je $8,19 \text{ mm} \pm 5,86 \text{ mm}$, Me 6 mm. Prosečni prečnik kolonija *P. aeruginosa* kultivisanih iz briseva rana je $8,33 \text{ mm} \pm 5,06 \text{ mm}$, a Me 6,5 mm. Izolati iz briseva rana hospitalizovanih bolesnika su formirali kolonije prosečnog prečnika $8,12 \text{ mm} \pm 4,09 \text{ mm}$. i Me 5mm. Prosečna vrednost kolonija izolata iz rana ambulantnih ispitanika je $8,67 \text{ mm} \pm 5,97 \text{ mm}$, Me 6mm. Prosečna vrednost prečnika kolonija *P. aeruginosa* izolovanih iz urina je $5,29 \text{ mm} \pm 5,06 \text{ mm}$, Me 4mm., kod hospitalizovanih bolesnika $5,95 \text{ mm} \pm 4,09 \text{ mm}$, a ambulantnih $4,63 \text{ mm} \pm 5,92 \text{ mm}$, Me 4mm.

Vrednost prosečnog prečnika kolonija kod netipibilnih izolata je $7,93 \text{ mm} \pm 5,1 \text{ mm}$, Me 7 mm, a kolonija serotipa P11 $8,22 \text{ mm} \pm 5,16 \text{ mm}$, Me 6mm. Kolonije serotipa P6 su prosečnog prečnika $8,18 \text{ mm} \pm 5,25 \text{ mm}$, Me 6 mm. Srednja vrednost prečnika kolonija izolata, koji su serotip P1 je $7,7 \text{ mm} \pm 5,29 \text{ mm}$, Me 5 mm.

5.8. SPOSOBNOST ROJENJA

Svi izolati *P. aeruginosa* nakon inkubacije od 48 h na 0,5% Lauril-Bertoni agaru su imali sposobnost rojenja. (Slika 34.)



Slika 34. Rojenje *P. aeruginosa* na 0,5% Lauril-Bertoni agaru (Stanković Nedeljković, 2015.)

Prosečna vrednost prečnika kolonija *P. aeruginosa* je $39,98 \text{ mm} \pm 19,25 \text{ mm}$, a Me 40 mm. Ako se analiziraju samo izolati iz materijala hospitalizovanih bolesnika prosečna vrednost prečnika kolonija je $41,92 \text{ mm} \pm 20,74 \text{ mm}$, Me 40 mm. Prosečna vrednost prečnika kolonija izolovanih iz materijala ambulantnih bolesnika je $38,05 \text{ mm} \pm 20,74 \text{ mm}$ i Me 39mm.

Prosečni prečnik kolonija *P. aeruginosa* kultivisanog iz briseva rana je $42,99 \text{ mm} \pm 19,08 \text{ mm}$, Me 35 mm. Izolati iz briseva rana hospitalizovanih bolesnika formirali su kolonije prosečnog prečnika $45,01 \text{ mm} \pm 20,34 \text{ mm}$, Me 45,18 mm. Prosečna vrednost prečnika kolonija iz briseva rana ambulantnih ispitanika je $39,65 \text{ mm} \pm 17,944 \text{ mm}$, Me 37 mm. Izolati iz urina formirali su kolonije prosečnog prečnika $34,63 \text{ mm} \pm 19,27 \text{ mm}$, a Me 34mm, a izolati iz urina hospitalizovanih bolesnika $22,91 \text{ mm} \pm 21,28 \text{ mm}$, Me 37mm. Izolati urina koji su uzorkovani ambulantno su imali prosečan prečnik $48,7 \text{ mm} \pm 17,11 \text{ mm}$, Me 20 mm.

Ako pratimo vrednost prosečnog prečnika kolonija kod najčešćih serotipova, najveće vrednosti prečnika kolonija su kod netipibilnih izolata $42,89 \text{ mm} \pm 19,29 \text{ mm}$, Me 15mm, pa kod serotipa P11 $40,55 \text{ mm} \pm 19,44 \text{ mm}$, Me 35mm. Izolati serotipa P6 su formirali kolonije

prosečnog prečnika $42,75 \text{ mm} \pm 19,37 \text{ mm}$, Me 40 mm. Srednja vrednost prečnika kolonija izolata serotipa P1 je najmanja $36,08 \text{ mm} \pm 18,09 \text{ mm}$, Me 33 mm.

5.9. OSETLJIVOST NA OKSIDATIVNI STRES

Nakon inkubacije od 24h na moždano srčano infuzionom agaru sa diskom od filter papira na koji je nakapan 30% H_2O_2 , 55% izolata (22 izolata bolničkog porekla i 33 ambulantnog) je raslo su uz sam disk filter papira, bez ikakve zone inhibicije (Slika 35.). To su izolati, koji su imali apsolutnu rezistenciju na toksično dejstvo H_2O_2 .



Slika 35. Ispitivanje reakcije *P. aeruginosa* na oksidativni stres na moždano-srčano infuzionom agaru (Stanković Nedeljković, 2015.)

Prosečna vrednost inhibicije porasta *P. aeruginosa* oko diska filter papira je $2,4 \text{ mm} \pm 3,78 \text{ mm}$. Kolonije izolovane iz materijala hospitalizovanih bolesnika imale su u proseku zonu inhibicije $3,88 \text{ mm} \pm 3,55 \text{ mm}$, a kolonije iz materijala ambulantnih bolesnika $0,92 \text{ mm} \pm 1,92 \text{ mm}$.

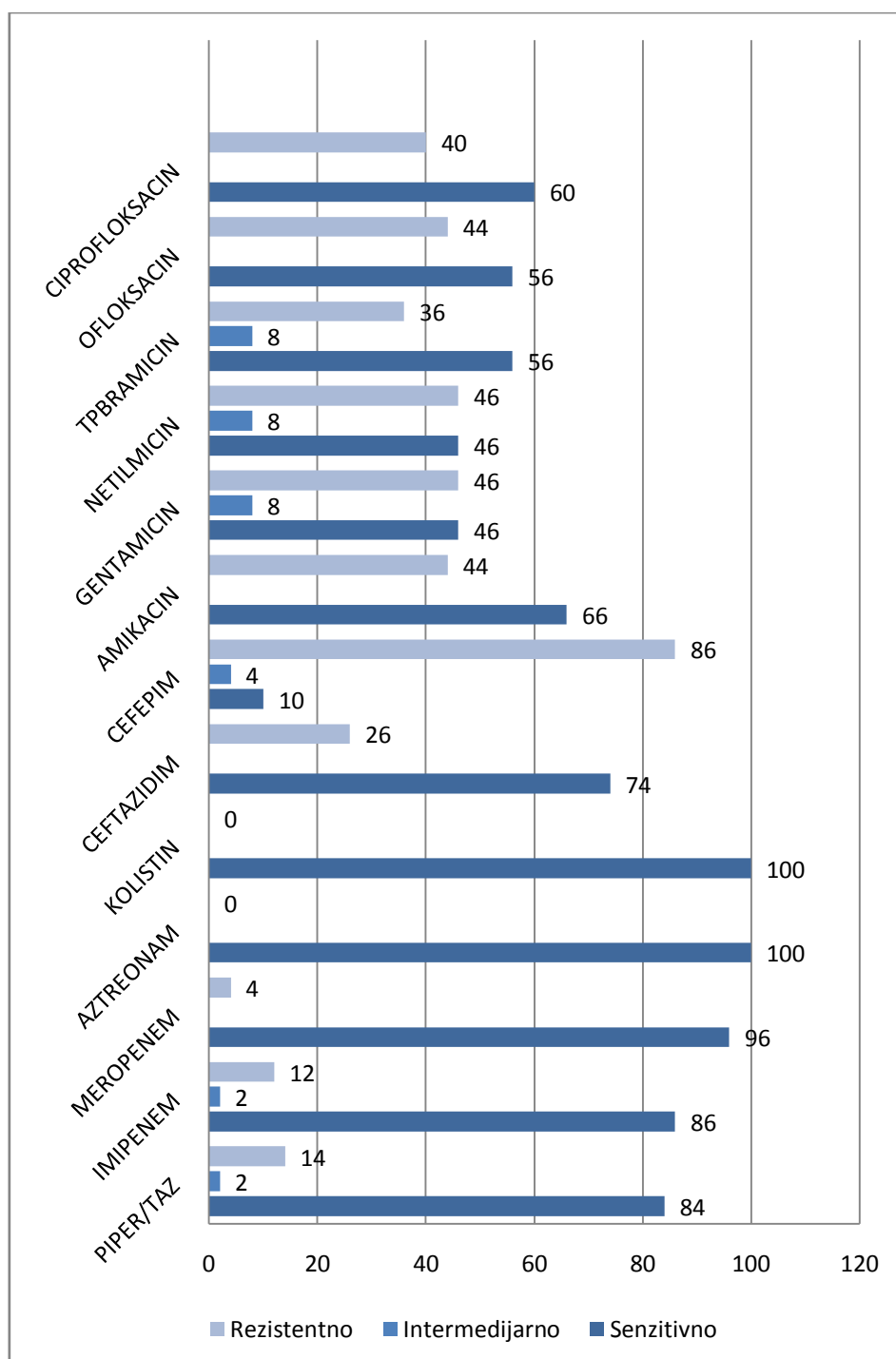
Prosečna zona inhibicije porasta izolata iz briseva rana je $3,25 \text{ mm} \pm 3,78 \text{ mm}$. Kod izolata koji potiču iz rana hospitalizovanih bolesnika prosečna zona inhibicije je $4,74 \text{ mm} \pm 4,55 \text{ mm}$, Me 3mm. Prosečna zona inhibicije porasta kod izolata iz rana ambulantnih bolesnika je $0,76 \text{ mm} \pm 3,78 \text{ mm}$. Prosečna inhibicija porasta izolata iz urina je $2,59 \text{ mm} \pm 3,79 \text{ mm}$. Izolati iz urina hospitalizovanih bolesnika imali su prosečnu zonu inhibicije porasta

4,25 mm $\pm$ 4,6mm, Me 2mm. Kolonije iz urina ambulantnih bolesnika su imale prosečnu zonu inhibicije 0,26 mm $\pm$ 1,94 mm.

Izolati serotipa P11 su imali prosečnu zonu inhibicije porasta oko diska filter papira 1,63 mm $\pm$ 3,87 mm, a serotip P1 2,84 mm $\pm$ 3,2 mm. Izolati serotipa P6 3,18 mm $\pm$ 3,91mm, a netipibilni 1,65 mm $\pm$ 3,82 mm.

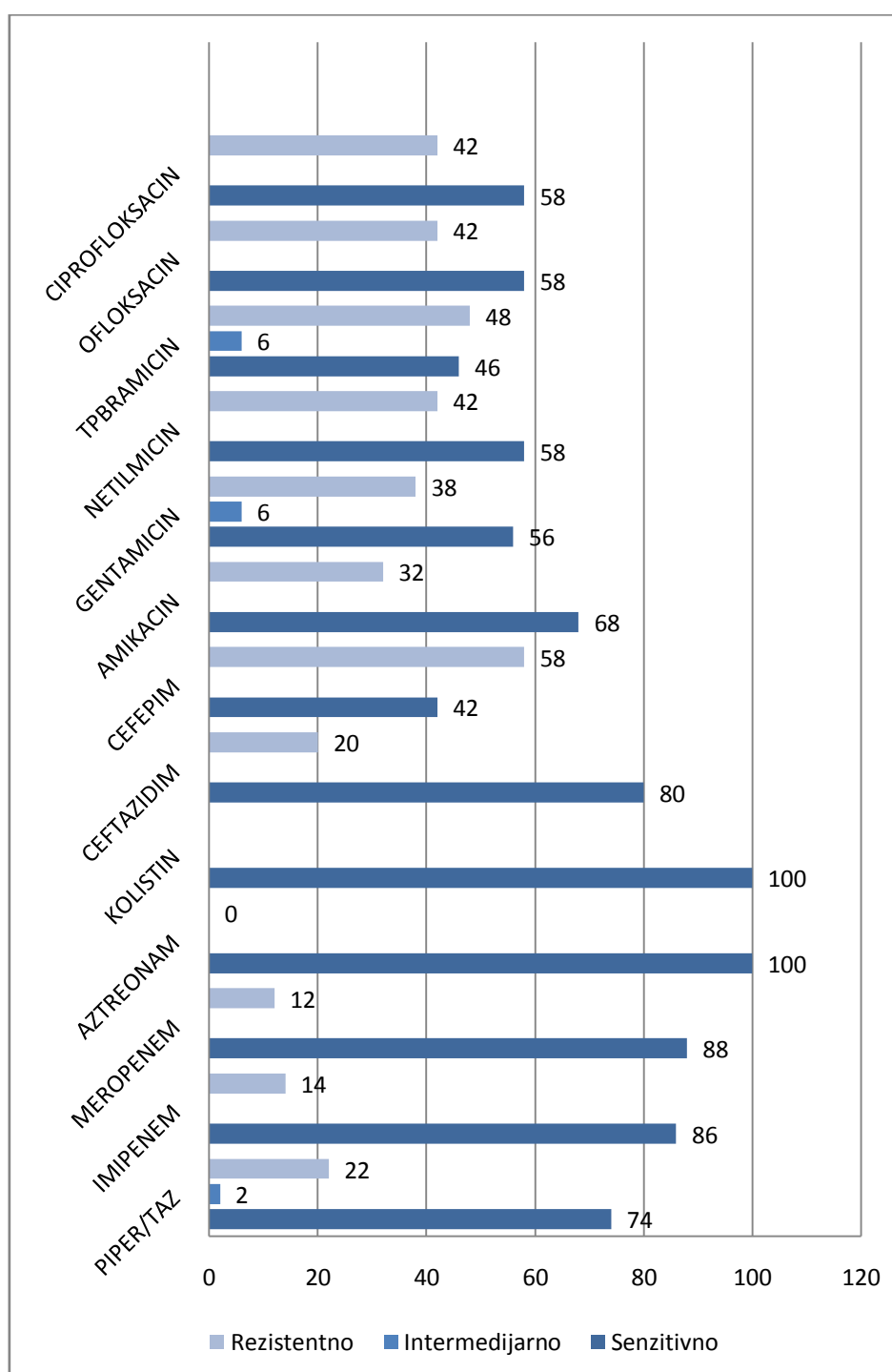
5.10. REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE

Svi izolati *P. aeruginosa* iz materijala hospitalizovanih bolesnika su osetljivi na kolistin i aztreonam. Po osetljivosti slede meropenem (88%) imipenem (86%) i piperacilin-tazobatom (84%). Osetljivost na ostale antibiotike varira (Grafikon 8.).



Grafikon 8. Osetljivost izolata *P. aeruginosa* iz materijala hospitalizovanih bolesnika na antibiotike određena disk-difuzionom metodom

Svi izolati ambulantnog porekla su osetljivi na aztreonam i kolistin. 88% izolata je osetljivo na meropenem, 86% na imipenem, na ceftazidim 80%, a na piperacilin-tazobaktam 74% (Grafikon 9.). Osetljivost na ostale antibiotike je bila niža.



Grafikon 9. Osetljivost izolata *P. aeruginosa* iz materijala ambulantnih bolesnika na antibiotike određena disk-difuzionom metodom

Statistički parametri odnosa osetljivosti na antibiotike, izolata iz materijala bolničkog i ambulantnog porekla su u tabeli 20.

Tabela 20.

Statistički parametri odnosa osetljivosti izolata bolničkog i ambulantnog porekla
na antibiotike

Antibiotik	χ^2	p	OR
Piperacilin-tazobaktam	1.51	0.219	1.84
Meropenem	0.44	0.504	1.57
Ceftazidim	0.51	0.475	1.71
Cefepim	13.31	0.0002	0.15
Gentamicin	0.05	0.831	0.91
Netilmicin	0.64	0.423	0.73
Tobramicin	1.0	0.317	1.49
Ciprofloksacin	1.49	0.839	1.6
Ofloksacin	0.04	0.839	0.92

U tabeli 21. je podela izolata u grupe na osnovu rezistencije na aminoglikozide.

Tabela 21.

Grupe izolata *P. aeruginosa* na osnovu rezistencije na aminoglikozide

Grupa	Izolati bolničkog porekla	Izolati ambulantnog porekla	χ^2	P	OR
I	2	6	-	-	-
II	4	0	-	-	-
III	0	1	-	-	-
IV	1	0	-	-	-
V	13	12	0.05	0.817	1.11
VI	21	26	1.00	0.316	0.67

Najveći broj izolata je bio osetljiv na sve aminoglikozide (47%), dok je na sve aminoglikozide je bilo rezistentno 25% izolata. Manji broj izolata je pripadao drugim grupama. Ali 18% izolata bolničkog porekla i 10% ambulantnog nije moglo da se svrsta ni u jednu grupu.

5.10.1. MINIMALNA INHIBITORNA KONCENTRACIJA

Distribucija pojedinih vrednosti MIK izolata *P. aeruginosa* bolničkog i ambulantnog porekla za piperacilin-tazobaktam je prikazana u tabeli 22.

Tabela 22.

Distribucija vrednosti MIK za piperacilin-tazobaktam izolata *P. aeruginosa* bolničkog i ambulantnog porekla

Redni broj	MIK (µgr/ml)	Izolati bolničkog porekla	Izolati ambulantnog porekla
		Broj izolata	Broj izolata
1.	64	1	2
2.	48	1	-
3.	32	-	2
4.	24	4	3
5.	16	7	7
6	12	16	14
7.	10	-	1
7.	8	7	5
9	6	1	1
10.	4	4	4
11.	3	1	-

U tabeli 23. je prikazana distribucija učestalosti pojedinih vrednosti MIK za piperacilin-tazobaktam izolata *P. aeruginosa* bolničkog i ambulantnog porekla.

Tabela 23.

Distribucija vrednosti MIK za amikacin izolata *P. aeruginosa* bolničkog i ambulantnog porekla

Redni broj	MIK (µgr/ml)	Izolati bolničkog porekla	Izolati ambulantnog porekla
		Broj izolata	Broj izolata
1.	48	-	1
2.	24	-	1
3.	16	3	4
4.	12	1	3
5.	8	9	6
6.	6	7	4
7.	4	4	8
8.	3	4	6
9	1	1	1

U tabeli 24. je distribucija prikazana učestalost pojedinih vrednosti MIK za ciprofloksacin.

Tabela 24.

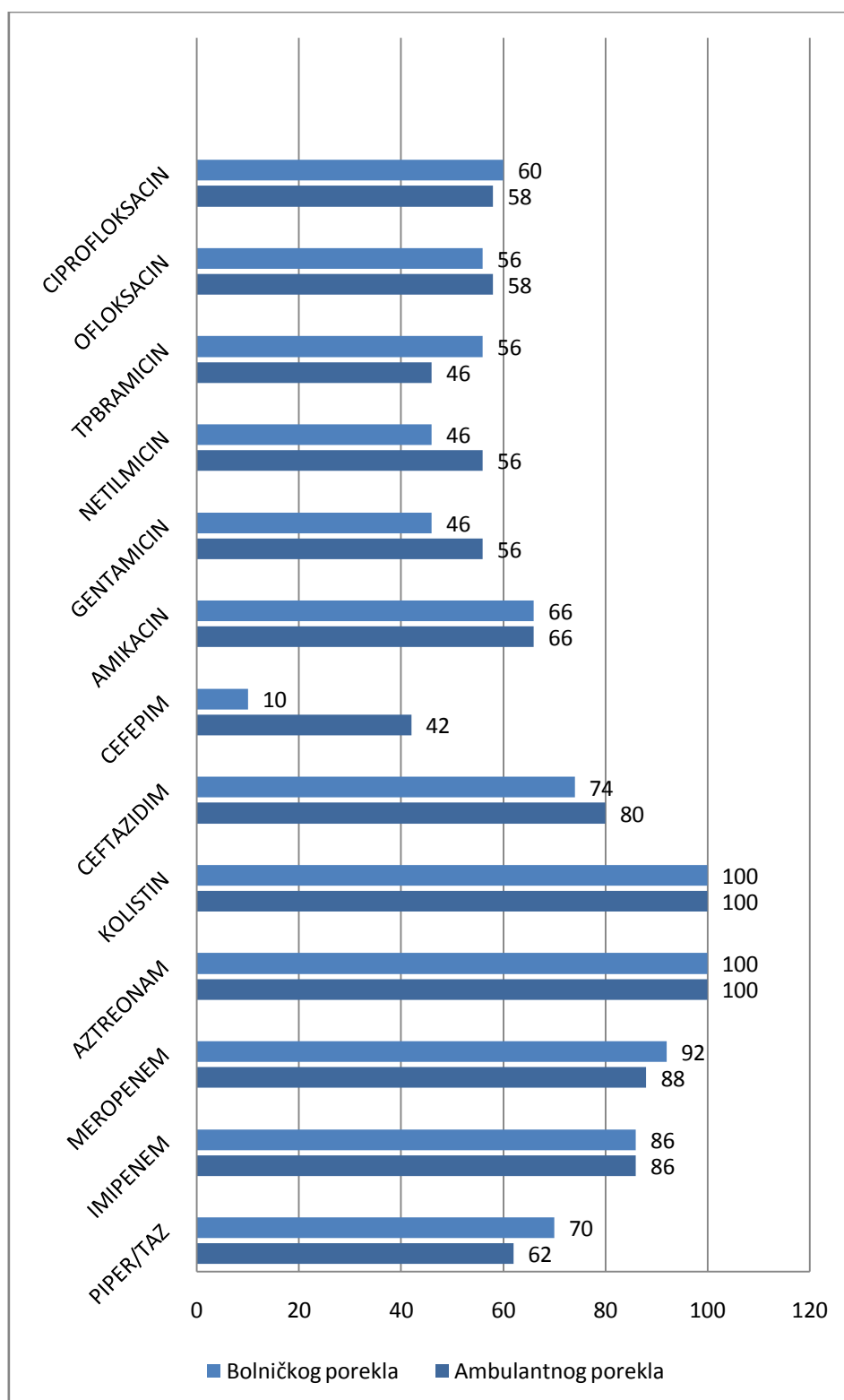
Distribucija vrednosti MIK za ciprofloksacin izolata *P. aeruginosa* bolničkog i ambulantnog porekla

Redni broj	MIK (µgr/ml)	Izolati bolničkog porekla	Izolati ambulantnog porekla
		Broj izolata	Broj izolata
1.	1.0	-	1
2.	0.38	-	3
3.	0.32	2	-
5.	0.25	-	5
7.	0.19	-	9

10.	0.125	13	8
11.	0.094	2	2
12.	0.032	2	-
13.	0.023	1	-
14.	0.05	1	-

Ako uporedimo rezultate ispitivanja osjetljivosti disk-difuzionom metodom i određivanja MIK, rezultati se donekle razlikuju. Sedam izolata bolničkog porekla i šest ambulantnog koja su disk-difuzionom metodom bila osjetljiva na piperacilin-tazobaktam su ispitivanjem E testom intermedijarno osjetljiva. Sasvim mala neslaganja su se javila u određivanju osjetljivosti na amikacin. Po jedan izolat ambulantnog porekla, koji su disk-difuzionom metodom bili osjetljivi, su određivanjem MIK vrednosti označeni kao intermedijarni i rezistentni.

Nakon sumiranja rezultata ispitivanja osjetljivosti, određene disk-difuzionm metodom i određivanja MIK vrednosti za piperacilin-tazobaktam, amikacin, ciprofloksacin, odnos osjetljivosti na anitbiotike kod izolata hospitalnog i ambulantnog porekla je prikazan na grafikonu 10.



Grafikon 10. Odnos osetljivosti na antibiotike izolata *P. aeruginosa* hospitalnog i ambulantnog porekla

5.10.2. PRODUKCIJA ESBL BETA LAKTAMAZA

Samo jedan izolat *P. aeruginosa* je produkovao ESBL.

5.10.3. PRODUKCIJA KABAPENEMAZA

U ispitivanoj grupi izolata bolničkog porekla kod 2 izolata je registrovana produkcija karbapenemaza, a u grupi izolata ambulantnog porekla 5 izolata je produkovalo karbapenemaze (Slika 36.).



Slika 36. Produkcija karbapenemaza (Stanković Nedeljković, 2015.)

Osnovni podaci o izolatima bolničkog porekla i ambulantnih bolesnika koji su produkovali karbapenemaze su u tabeli 25.

Tabela 25.

**Vrste bolesničkih materijala, serotip i osetljivost na antibiotike izolata bolničkog
porekla koji produkuju karbapenemaze**

RB	BM	SE	Antibiotici												
			PT	I	M	AZ	K	CEF	CP	A	G	NM	T	OF	CC
1.	B.R.	P6	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
2.	SP	NT	S	R	R	S	S	R	R	S	R	S	S	S	R

RB-redni broj, BM-bolesnički materijal, SE-serotip, PT-piperacilin-tazobaktam, I-imipenem, M-meropenem, AZ-aztreonam, K-kolistin, CEF-ceftazidim, CP-cefepim, A-amikacin, G-gentamicin, NM-netilmicin, T-tobramicin, OF-ofloksacin, CC-ciprofloksacin, S-senzitivno, R-rezistentno, B.R-rana, SP-sputum, NT-netipibilno

Poreklo, serotip i osetljivost na antibiotike ambulantnih izolata koji produkuju karbapenemaze su u tabeli 26.

Tabela 26.

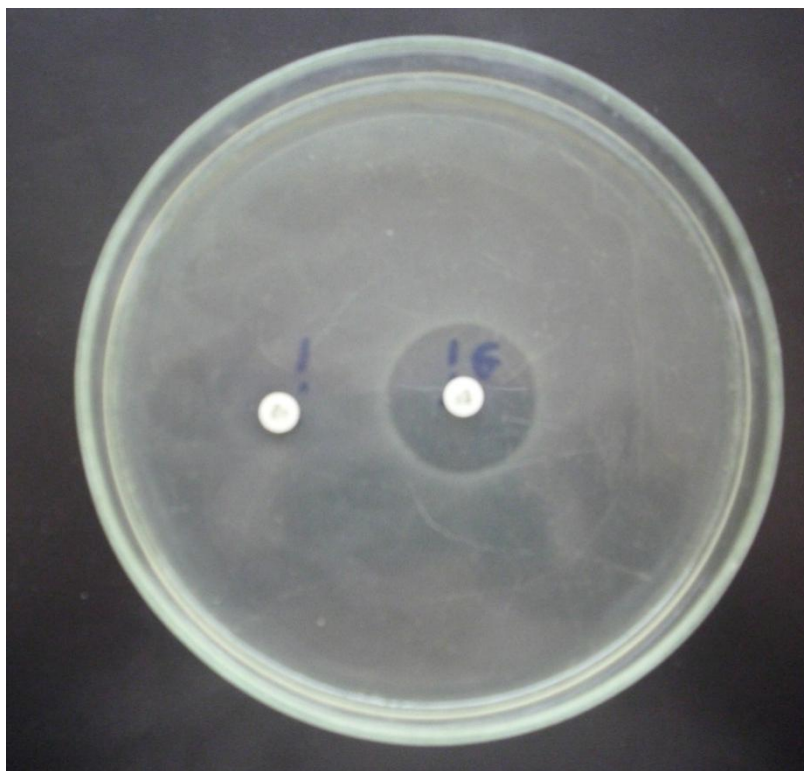
**Vrste bolesničkih materijala, serotip i osetljivost na antibiotike izolata ambulantnog
porekla koji produkuju karbapenemaze**

RB	BM	ST	Antibiotici												
			PT	I	M	AZ	K	CAZ	CP	A	G	NM	T	OF	CC
1.	UK	PME	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R
2.	B.G.	P10	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3.	UK	P1	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R
4.	V.S.	NT	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5.	B.R.	NT	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S

RB-redni broj, BM-bolesnički materijal, SE-serotip, PT-piperacilin-tazobaktam, I-imipenem, M-meropenem, AZ-aztreonam, K-kolistin, CEF-ceftazidim, CP-cefepim, A-amikacin, G-gentamicin, NM-netilmicin, T-tobramicin, OF-ofloksacin, CC-ciprofloksacin, S-senzitivno, R-rezistentno, UK-urinokultura, B.G.-bris grla, V.S.-vaginalni sekret, B.R-rana, SP-sputum, NT-netipibilno

5.10.4. PRODUKCIJA MBL

MBL je produkovalo po 5 izolata (10%) *P. aeruginosa* iz bolesničkih materijala hospitalizovanih i ambulantnih bolesnika (Slika 37.).



Slika 37. Pozitivan test produkcije MBL (Stanković Nedeljković 2015.)

U tabeli 27. su fenotipske karakteristike *P. aeruginosa* koji je izolovan iz uzoraka hospitalizovanih bolesnika. Izolati potiču uglavnom iz urina i briseva rana. Izolati koji su produkovali MBL su uglavnom serotip P11.

Tabela 27.

Fenotipske karaktersitike izolata iz materijala hospitalizovanih bolesnika koji produkuju MBL

Redni broj	Vrsta materijala	Serotip	Produk. pigment	Adheziv.	Biofilm	Zona inhibicije porasta oko diska sa H2O2	Prečnik kolonije na 1% agaru (mm.)	Prečnik kolonije na 0.5% agaru (mm.)
------------	------------------	---------	-----------------	----------	---------	---	------------------------------------	--------------------------------------

1.	UK	O11	P	0.025	-0.055	0	5	15
2.	UK	O11	F	-0.050	0.382	0	13	80
3.	UK	O11	F	0.054	-0.026	14	6.5	46
4.	B.R.	PME	P	-0.001	0.091	0	6	35
5.	B.R.	NT	P	0.120	-0.059	0	14	80

UK-urinokultura, NT-netipibilno, B.R.-rana, P-piocijanin, F-fluorescin

U tabeli 28. su fenotipske karakteristike izolata ambulantnog porekla koji produkuju MBL.

Tabela 28.

Fenotipske karakteristike izolata iz materijala ambulantnih bolesnika koji produkuju MBL

Redni broj	Vrsta materijala	Serotip	Produk. pigment	Adheziv.	Biofilm	Zona inhibicije porasta oko diska sa H ₂ O ₂ (mm)	Prečnik kolonije na 1% agaru (mm)	Prečnik kolonije na 0.5% agaru (mm)
1.	B.rane	NT	F	-0.177	0.046	0	10	60
2.	UK	P1	P	0.267	0.351	0	5	55
3.	UK	NT	F	0.069	0.449	0	4	20
4.	B.rane	P11	F+P	-0.182	0.233	1	5	7
5.	B.rane	P11	F+P	-0.244	0.240	1	3	15

UK-urinokultura, NT-netipibilno, BR-rana, P-piocijanin, F-fluorescin
S-senzitivno, R-rezistentno, UK-urinokultura, NT-netipibilno, BR-rana

Bolesnički materijali, serotipovi i osetljivost na antibiotike izolata bolničkog porekla koji produkuju MBL su prikazani u tabeli 29.

Tabela 29.

Osetljivost na antibiotike, serotipovi i vrste bolesničkih materijala iz kojih je kultivisan *P. aeruginosa* bolničkog porekla koji produkuje MBL

RB	BM	SE	PT	I	M	ANTIBIOTICI									
						A	K	CEF	CP	A	G	NM	T	OF	CC
						Z									
1.	UK	P11	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
2.	UK	011	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
3.	UK	P11	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
4.	BR	PME	S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R
5.	BR	NT	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S

RB-redni broj, BM- bolesnički materijal, SE-serotip, PT-piperacilin-tazobaktam, I-imipenem, M-meropenem, AZ-aztreonam, K-kolistin, CEF-ceftazidim, CP-cefepim, A-amikacin, G-gentamicin, NM-netilmicin, T-tobramicin, OF-ofloksacin, CC-ciprofloksacin
S-senzitivno, R-rezistentno, UK-urinokultura, NT-netipibilno, BR-rana

Bolesnički materijali iz kojih potiču izolati, serotipovi i osetljivost na antibiotike izolata ambulantnog porekla koji produkuju MBL su u tabeli 30.

Tabela 30.

Osetljivost izolata *P. aeruginosa* ambulatnog porekla koji produkuju MBL na antibiotike

RB	BM	SE	PT	I	M	ANTIBIOTICI									
						AZ	K	CEF	CP	A	G	NM	T	OF	CC
1.	BR	P11	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
2.	BR	P11	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
3.	UK	NT	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
4.	UK	P1	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
5.	BR	NT	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R

RB-redni broj, BM-bolesnički materijal, SE-serotip, PT-piperacilin-tazobaktam, I-imipenem, M-meropenem, AZ-aztreonam, K-kolistin, CEF-ceftazidim, CP-cefepim, A-amikacin, G-gentamicin, NM-netilmicin, T-tobramicin, OF-floksacin, CC-ciprofloksacin, S-senzitivno, R-rezistentno, UK-urinokultura, NT-netipibilno, BR-rane

6. DISKUSIJA

P. aeruginosa spada među najčešće uzročnike infekcija, naročito bolničkih. Infekcije nastaju kao posledica komplikovanih, dugotrajnih, obimnih, dijagnostičkih i terapijskih intervencija i operacija. Izolovan je iz briseva uzetih sa medicinske opreme: inhalatora, opreme za respiraciju, kateterizaciju, narkozu i dijalizu, pa se *P. aeruginosa* javlja nakon inhalacije, kateterizacije, hirurških intervencija i dijalize. U ispitivanjima njegovog prisustva u bolničkoj sredini, kultivisan je iz briseva sudopera, slavina, toaleta, kabina za tuširanje i metli. Prenosi se preko infuzionih rastvora, krvnih produkata i nekih dezinficijensa. Bolesnici ga mogu uneti ingestijom kontaminisane vode i hrane. Često bolničko osoblje prenosi bacil rukama. Bacil se prenosi među bolesnicima, a i posetioци učestvuju u njegovom prenosu.

P. aeruginosa i u najbogatijim zemljama, sa razvijenim zdravstvenim sistemima, izaziva bolničke infekcije. Od psudomonijaza uglavnom oboljevaju bolesnici kojima je iz bilo kog razloga oslabljen imunitet. Najugroženiji su oboleli od hroničnih bolesti, d.mellutus, agranulocitoze, alkoholičari, splenektomisane osobe, bolesnici koji primaju imunosupresivnu terapiju i citostatike, deca, stariji bolesnici i rekonvalescenti. Terapija infekcija izazvanih *P. aeruginosa* zahteva dužu primenu skupih antibiotika. Često i pored primenjenih mera protiv infekcije, one prelaze u hronične, pa i doživotne. Hronične infekcije drastično smanjuju kvalitet života obolelih.

Može se reći da su problemi koje *P. aeruginosa* izaziva u humanoј i veterinarskoј medicini, agronomiji i vodosnabdevanju globalni.

U Evropskoј studiji prevalence patogene u jedinicama intenzivne nege *P. aeruginosa* je najvažniji Gram negativni bacil. Izolovan je u 1417 jedinica intenzivne nege u 17 zemalja Zapadne Evrope³⁰⁴. Prevalencija infekcija krvi je oko 0,5%. U Velikoj Britanji broj infekcija izazvanih *Pseudomonas sp.* je između 3700 do 4000 godišnje, a najveći broj infekcija se javi u Londonu. Devet od deset infekcija izaziva *P. aeruginosa*³⁰⁵. Od decembra 2011. godine do januara 2012. godine, 4 bebe su umrle posle porođaja u Altnagelvin Hospital u Londonderry i Belfast's Royal Jubilee Maternity Hospital u Irskoj. *P. aeruginosa* je izolovan iz vode iz bolnica u Daisy Hill u Newry, Craigavon Area Hospital i Erne Hospital u Enniskillen. U oktobru 2012. godine mediji su izvestili o još jednoј smrti novorođenčeta u Southmead

Hospital u Bristolu. Nakon kontrole briseva ostalih beba u porodilištu, *P. aeruginosa* je izolovan iz briseva kože još 12 beba, od kojih je samo jedna imala lakšu infekciju. Ponovo je *P. aeruginosa* izolovan iz vode³⁰⁶.

U Srbiji, po podacima iz III nacionalne studije prevalencije bolničkih infekcija iz oktobra 2011. godine, *P. aeruginosa* je izaziva 13,3% bolničkih infekcija. Sledeći po učestalosti su *Klebsiella pneumoniae* i *Acinetobacter sp.* Infekcije mokraćnih puteva su imale prevalencu od 1,37% i činile su 29,5% svih infekcija. *P. aeruginosa* je dokazan kao uzročnik 8% infekcija, dok su najčešći uzročnici infekcija mokraćnih puteva *E. coli* i *Enterococcus sp.* (21%). Procenat bolesnika muškog i ženskog pola se ne razlikuje, a bolesnici imaju u proseku 54,3 godine. Naglašava se da su najvažniji faktori rizika plasiran kateter, kateter plasiran poslednjih 7 dana i boravak u jedinici intenzivne nege. Po podacima iz ove studije, prevalencija je manja nego u Italiji (4,5%), Kanadi (3,4%) i Turskoj (1,75%). Prevalencija hospitalnih pneumonija izazvanih *P. aeruginosa* je 0,55%, dok je u Norveškoj 1,7%, u Italiji 1,6% i u Holandiji 1,1%. Najčešći faktori rizika za nastanak pneumonija su mehanička ventilacija, nazogastrična sonda, boravak u jedinici intenzivne nege duže od 1 dana i imunosupresivna terapija. *P. aeruginosa* je bio uzročnik 29% pneumonija, dok je najčešći uzročnik pneumonija bio *Acinetobacter sp.* (36%)³⁰⁷.

Po podacima iz III nacionalne studije, prevalencija infekcija operativnog mesta je 4,5%. Učešće u 40% infekcija kod operisanih bolesnika u ukupnom broju registrovanih infekcija u studiji, upućuje na hirurgiju kao odeljenje sa povećanim rizikom za pojavu bolničkih infekcija i zahteva dalja ciljana istraživanja i sprovođenje odgovarajućih mera prevencije. Faktori rizika za nastanak infekcija operativnog polja su lošiji fizikalni status bolesnika, masivnija mikrobna kontaminacija operativnog polja i trajanje operacije duže od 2 sata³⁰⁷.

6.1. DEMOGRAFSKE KARAKTERISTIKE ISPITIVANE POPULACIJE

U našem ispitivanju nije uočena statistički značajna razlika u prisustvu *P. aeruginosa* u bolesničkim materijalima muškaraca (60%) i žena (40%). Prosečana starost bolesnika je 57,78 godina. Prosečna starost muškaraca (61,27 godina) je viša nego prosečna starost žena

(52,17 godina). Kod hospitalizovanih bolesnika prosečna starost je 65,08 godina. Muškarci su prosečno (67,07 godina) stariji nego žene (62,76 godina). Ambulantni bolesnici su bili prosečno stari 50,48 godina, muškarci 55,27 godina, a žene 43,85 godina. Hospitalizovani bolesnici su bili stariji nego ambulantni. Ovo se ne razlikuje mnogo od podataka iz Nacionalne studije gde je prosečna starost obolelih od hospitalnih infekcija izazvanih *P. aeruginosa* 54,3 godine³⁰⁷. Prosečna starost i starosna distribucija ispitanika se poklapaju sa literaturnim podacima iz sveta, da je *P. aeruginosa* bakterija koja najčešće izaziva oboljenja kod imunokompromitovanih, starijih osoba i dece, a da se ređe sreće kod osoba srednjeg životnog doba sa očuvanim imunskim sistemom.

Uočena je značajna razlika u kultivaciji *P. aeruginosa* kod različitih starosnih grupa. *P. aeruginosa* je mnogo češće izolovan kod starijih ispitanika od 50 godina, nego kod mlađih. Izolovan je iz 68% bolesničkih materijala kod ispitanika starosti 50 godina do 80 godina i 54% ispitanika starosti 60 godina do 80 godina. Muškarci u sedmoj deceniji života činili su 27% ispitanika.

U grupi bolesnika koji su bili hospitalizovani, ispitanici starosti od 50 godina do 80 godina činili su 82% populacije, a starosti od 60 godina do 80 godina 64%. Najčešće, bacil je izolovan kod ispitanika u osmoj deceniji (42%). Kod ambulantnih ispitanika, bolesnici starosti od 50 godina do 80 godina činili su 64% populacije. *P. aeruginosa* je bio najpristupljiviji kod bolesnika u osmoj deceniji života (32%). U ovoj grupi bilo je više dece (18%).

6.2. VRSTE BOLESNIČKIH MATERIJALA IZ KOJIH JE IZOLOVAN *P. AERUGINOSA*

P. aeruginosa je najčešće izolovan iz briseva rana (54%) i urina (21%), tako da te dve vrste bolesničkih materijala čine većinu bolničkih materijala iz kojih je bacil izolovan (75%). Bacil je manje kultivisan iz sputuma i vaginalnih briseva (5%), a još ređe iz drugih bolesničkih materijala. Kod najzastupljenijih bolesničkih materijala briseva rana, bacil je bio prisutniji kod muškaraca (32%) nego kod žena (22%). U uzorcima urina, *P. aeruginosa* je češće izolovan kod muškaraca (18%), nego kod žena (3%). Skoro da ne postoji razlika u uzrastu muškaraca i žena kod kojih je *P. aeruginosa* izolovan iz briseva rana. Muškarci iz čijih urina je izolovan bacil su stariji od žena. Prosečna starost bolesnika kod kojih je *P.*

aeruginosa izolovan iz briseva rana je viša od starosti bolesnika kod kojih je bio prisutan u urinima. U ostalim bolesničkim materijalima *P. aeruginosa* je sa sličnom učestalošću izolovan kod muškaraca i žena, sa naravno, izuzetkom vaginalnih briseva.

Kod ispitanika koji su hospitalizovani, *P. aeruginosa* je sa još većom učestalošću kultivisan iz briseva rana (68%) i urina (22%). Češće je izolovan iz briseva rana (38% i 30%) i urina (18% i 4%) muškaraca nego žena. Ostali uzorci su mnogo manje zastupljeni. Takođe, u grupi ambulantnih ispitanika *P. aeruginosa* je bio najčešće kultivisan iz briseva rana (24%) i urina (18%). Češće je izolovan iz briseva rana (24% i 16%) i urina (18% i 2%) muškaraca nego žena. U manjem procentu bio je prisutan u sputumu, vaginalnim brisevima i brisevima grla, uva, nosa, oka i desni. Svi muškarci kod kojih je *P. aeruginosa* izolovan iz urina su nosili kateter ili su imali neki operativni zahvat vezan za urinarni trakt.

Vrsta bolesničkih materijala iz kojih je *P. aeruginosa* izolovan, donekle je posledica specifične organizacije Zdravstvenog centra "Aleksinac". U okviru ustanove postoje Dečje, Interno, Ginekološko i Hirurško-ortopedsko odeljenje u okviru koga se leče urološki bolesnici. Materijali hospitalizovanih bolesnika potiču iz tih odeljenja. Većina bolesnika kojima su uzimani uzorci bolnički bila je hospitalizovana na Hirurško-ortopedskom odeljenju. Ispitanici su uglavnom imali dijagnoze vezane za infekcije hirurškog mesta, pa infekcije urinarnog i respiratornog trakta.

Anamnestički smo došli do podatka da su svi ispitanici, osim jedne devojčice, kod kojih je *P. aeruginosa* izolovan ambulatno u poslednja tri meseca imali kontakt sa bolničkom sredinom. Ispitanici kod kojih je izolovan iz briseva rana su odlazili na previjanje u hiruršku ambulantu. Ispitanici kod kojih je izolovan iz uzoraka respiratornog trakta su odlazili na inhalacije. Ovakvi podaci ukazuju na veliku važnost bolničke sredine kao izvora *P. aeruginosa* i odgovornost za širenje bakterije van bolnice prebacuju na zdravstvene ustanove.

Generalno, naši podaci se slažu sa literaturnim podacima. *P. aeruginosa* je vodeći uzročnik infekcija opekotina, rana i uopšte ledirane kože i urinarnog trakta. Po podacima američke studije o praćenju nozokomijalnih infekcija, *P. aeruginosa* je na četvrtom mestu među uzročnicima inflamacija hirurških rana³⁰⁸. Faktori patogenosti kojima učestvuje u izazivanju i održavanju inflamcije rana su brojni^{309,310}.

Zarastanje rana je dinamičan i kompleksan proces koji počinje odmah po oštećenju kože. Ako se zarastanje prolongira, nastaje hronična rana koja ne zarasta. Hronične rane se uglavnom sreću na podkolenicama kao dijabetične ulceracije i ulcus cruris. Hronične rane se

sreću u oko 1-2% svetske populacije. Oko 1% ljudi boluje od ulceracija zbog varikoziteta. Gjodsbol i saradnici³¹¹ su u Švedskoj 2006. godine došli do podatka, da je 52,2% ulceroznih rana, povezano sa varikozitetima, inficirano *P. aeruginosa*. Postoji tendencija povećanja ovog broja. U ispitivanjima indijskog autora Shivaswamy³¹², od 310 briseva rana bolesnika sa food diabeticum *P. aeruginosa* je izolovan iz 54 brisa. Muškarci su u njihovoj ispitivanoj grupi šest puta bili zastupljeniji nego žene. Ispitanici su imali u proseku 49 godina $\pm$ 16,8 godina, a najčešće su imali između 50 godina i 60 godina. Imali su d.mellitus 16 godina $\pm$ 10,2 godine unazad, a 63% je koristilo oralne antidijabetike.

Zbog brojnih faktora patogenosti *P. aeruginosa*, iako oportunistička bakterija, postaje važan uzrok inflamacija kod termički oštećenih tkiva³¹³. Opekotine inficirane *P. aeruginosa* se mnogo teže i duže leče. Na površini rana ili opekotina može se uočiti flouescentni pigment u kome se nalazi produkt hemoglobina, verdoglobin. Po podacima iz Irana *P. aeruginosa* izaziva infekcije 73,9% opekotina i glavni je uzročnik infekcija opekotina³¹⁴.

Adediran³¹⁵ je ispitivao promene u imunskom sistemu koje nastaju posle nastanka opekotina na modelu miša. Praćene su promene u broju i funkciji PML prvog i četvrtog dana od nastanka lezije. Miševima s opekotinama i zdravim životinjama je inokulisan *P. aeruginosa*. Pet sati nakon nastanka lezije nisu uočene promene u broju i funkciji PML, čak postoji i laka depresija njihove funkcije. Ali, već posle 24časa, mnoge komponente imunskog sistema se menjaju i takvo stanje se naziva "sindrom sistemskog inflamatornog odgovora". Već prvog dana nakon nastanka lezije zbog opekotine broj PML se udvostručio, a njihova funkcija promenila. Učestalija je apoptoza, a broj T-limfocita se smanjio. Lučila se veća količina citokina: TNF- α , IL-1 i IL-6. Oštećenja tkiva izazivaju promene vaskularnog endotela, intersticijalni edem, poremećaj koagulacije, produkciju kiseoničnih i slobodnih radikala. Kod bolesnika nastaje kombinacija poremećaja vezanih za oštećenje tkiva, inflamatorni odgovor i poremećaj imunskog sistema, što ga čini podložnim za infekciju. Kompletan proinflamatorni fenotip nastaje 7 dana od nastanka termičkog oštećenja.

P. aeruginosa je značajan uzročnik nozokomijalnih urinarnih infekcija, posebno povezanih s nošenjem katetera. Ove infekcije čine oko 40% svih nozokomijalnih infekcija i vrlo često su izvor Gram negativne bakterijemije kod hospitalizovanih bolesnika. U ispitivanju uzročnika infekcija urinarnog trakta sprovedenom u Federaciji Bosni i Hercegovini³¹⁶, *P. aeruginosa* je bio uzročnik 4% urinarnih infekcija. Registrovano je 87,5% izolata rezistentnih na ceftriakson, na ciprofloksacin i gentamicin 75%, na norfloksacin i

amikacin 62,5%, na piperacilin 25,9%, meropenem 12,5%, dok nije bilo rezistentnih izolata na imipenem.

Kod naših ispitanika *P. aeruginosa* je ređe izolovan iz uzoraka respiratorog trakta i to uglavnom dece koja su odlazila na inhalaciju. Samo jedan bolesnik je imao CF i kod njega je bacil izolovan iz sputuma, što se poklapa sa opšte poznatim podacima da je *P. aeruginosa* skoro obavezni pratioc CF. Sposobnost formiranja biofilma, preživljavanja u mikroaerofilnim i anaerobnim uslovima i uslovima oksidativnog stresa, čine bacil važnim uzročnikom infekcija respiratornog trakta.

U ispitivanju sprovedenom u Švajcarskoj³¹⁷ koje je obuhvatilo 6997 ispitanika, 386 bolesnika je bilo kolonizovano *P. aeruginosa*. 112 ispitanika je imalo sa hroničnu opstruktivnu bolest pluća i bilo kolonizovano *P. aeruginosa*, a većina je bila hospitalizovana. Znatan procenat bolesnika (41,1%) je bio hronično kolonizovan. Najveći broj ispitanika kod kojih je bio prisutan *P. aeruginosa* je imalo najteži stepen bolesti. Proveravana je osetljivost na sledeće grupe antibiotika: peniciline proširenog spektra, monobaktame i cefalosporine, karbapeneme, aminoglikozide i hinolone. Kod ispitanika sa hroničnom kolonizacijom 41,3% izolata je bilo osetljivo na sve testirane antibiotike, 26,1% je bilo rezistentno na jednu grupu antibiotika, 10,9% na dve grupe, 17,4% na tri grupe i 4,3% na četiri grupe. Rezistenti izolati su najčešće bili rezistenti na cefalosporine (37,4%), na aminoglikozide 21,6%, a najniža rezistencija je registrovana kod fluorohinolona. Ovo je mnogo niža rezistencija na antibiotike, nego što je to u našem ispitivanju.

U našem okruženju, u ispitivanju koje sprovedla Sardelić u Splitu, a obuhvatilo je 169 izolata, većina bolesnika (63,42%) je bila hospitalizirana u jedinicama intenzivne nege, opštim ili hirurškim. *P. aeruginosa* je najčešće izolovan iz uzoraka respiratornog trakta (56,2%). Sledeći po učestalosti bili su izolati briseva rana (16%), pa uzorci urina¹⁹⁶.

6.3.SEROTIPIZACIJA *P. AERUGINOSA*

Naučnici klasifikuju *P. aeruginosa* u različite serotipove skoro 100 godina unazad. Prvi je Aoki 1926. godine aglutinacionom metodom klasifikovao 50 klinička izolata u 18 serotipova. Kanzaki je 1934. godine izmenio prvobitnu klasifikaciju. Klasifikovao 102 soja u 34 serotipa. Tokom šesdesetih godina, autori u različitim zemljama su koristili svoje serotipizacije šeme. Koristile su se različite podele, koje su za osnovu imale klasifikaciju

Habsa iz 1957. godine, koja se zasniva na O antigenu. Wron je 1961. godine uspostavio podelu koja je imala 13 serotipa, koji su podeljeni u 3 grupe: A (tipovi 1, 3, 4, 6, 10), B (tipovi 2, 5, 7, 8) i C (tipovi 9, 11, 12, 13). U Japanu, Homma je 1976. godine slide aglutinacionom metodom klasifikovao 13 serotipa *P. aeruginosa*. Terada je 1977. godine predložio grupisanje 17 serotipova u 13 grupa, označenih od A do M. Kao dodatak tome, grupu N su predložili Terada i Sugiyama 1982. godine³⁰.

Liu³¹⁸ je 1983. godine postavio klasifikacionu šemu, označenu i prihvaćenu kao deo Internacionalnog antigen tipizirajućeg sistema (IATS). Na osnovnu podelu Hobsa, na osnovu termostabilnih antigena, uvedena su 3 nova serotipa. Tokom 1990. godine uvedena su još 3 serotipa: 18,19 i 20^{198,30}.

U Japanu mnogi autori koriste i dalje Homma tipizacionu šemu. Ovaj sistem se smatra pogodnim, jer tipizacioni setovi osim antiseruma sadrže i monoklona antitela. Postoji slaganje između dve tipizacione šeme, osim serotipa M po Homma šemi, koji se ne poklapa sa IATS. Poliaglutibilni i neaglutibilni sojevi u IATS koji daju hrapave kolonije i često se izoluju kod obolelih od CF, mogu da se klasifikuju kao M serotip. Daljim istaživanjima je pokazano da M serotip ima male količine ili nema uopšte O polisaharidni lanac. Zato se pretpostavlja da M antiserum reaguje direktno sa jezgrom LPS. M antitela specifično prepoznaju Opr G. Specifični zečiji antiserum M ima najviši titar za Opr F i H2, ali i za Opr G i I. Međutim anti M antiserum nema povišen titar protiv čestih epitopa LPS. Anti LPS titar je povišen za specifične strukture koje ima samo nekoliko *P. aeruginosa* sojeva. Rezultati sugerišu da ciljno mesto za M serotip nije specifičan pojedinačni molekul. Oprs F i H2 su često prisutni kod svih IATS sojeva. Serum bolesnika sa CF ima sličnosti sa anti-M antiserumom¹⁹⁸.

Autori iz Japana su koristeći različite serološke šeme upoređivali 196 izolata *P. aeruginosa*. Korišćeni su serum prozvođača Seika Kaicha i Denka Seiken¹⁹⁸. Sojevi su pripadali grupama A, C, E, F, G,H, I, J i K. Rezultati dobijeni primenom različitih seruma i tipizacionih šema su slični i koreliraju od 89,6 do 96,5%.

Naši izolati su najčešće pripadali PMA polivalentnoj serogrupi (31%), pa PMF (21%), PME (13%) i PMC (3%). Procenat zastupljenosti polivalentnih serogrupa je sličan kod izolata hospitalnog i ambulantnog porekla. Najčešće identifikovani serotipovi P11 (20%), P6 (16%) i P1 (11%) su činili 45% svih serotipova. Bili su najprisutniji u materijalima bolničkog

i ambulantnog porekla, s tim što je serotip P1 bio nešto prisutniji u materijalima ambulantnog porekla.

Ako analiziramo pojedinačno najčešće uzorke, u brisevima rana bio je najprisutniji serotip P11 (12%), P6 (8%), pa P1 (6%). Netipibilno je bilo 15% izolata. U brisevima rana bolničkog porekla najčešći je bio serotip P6 (12%), pa P4 (8%) i P1 (6%). Kod rana ambulantnog porekla bio je najprisutniji serotip P11 (16%), pa P1 (6%), a podjednako su bili prisutni serotipovi P4 i P6 (4%).

U urinima su najčešće kultivisani serotipovi P11 i P1. Netipibilno je bilo 6% izolata. P11 serotip je bio najzastupljeniji kod urina bolničkog porekla, dok su ostali serotipovi bili skoro podjednako zastupljeni. Netipibilno je bilo 11 izolata. U uzorcima ambulantnih bolesnika P1 je bio najprisutniji, a 50% izolata je bilo netipibilno.

Procenat netipibilnih izolata je visok (29%). Ovo ukazuje da su infekcije koje je izazvao *P. aeruginosa* hronične. Pri tome je procenat netipibilnih izolata bio nešto viši kod ambulantnih uzoraka. Izolati koji su aglutinimali samo sa polivalentnim, ali ne i sa monovalentnim serumima, činili su 15%. Činili su 9% izolata bolničkog porekla i 6% ambulantnog. Najveći broj izolata je aglutinisao PME polivalentni antiserum (12%), pa PMF (2%) i PMA (1%).

U skoro svim ispitivanjima *P. aeruginosa* koja obuhvataju serotipizaciju, izvestan procenat izolata je netipibilan. Procenat netipibilnih izolata se kreće od 10%¹⁹⁶ do čak 67%¹⁸⁵, ali je najčešće između 20% i 30%. Većina netipibilnih izolata ima hrapave kolonije. Neki netipibilni sojevi poseduju nove antigene koji nisu zastupljeni u klasičnim aglutinacionim setovima. Tipizacija netipibilnih sojeva se poboljšava, tako što se 24 časova stara kultura u glukoznom bujonu zagreva na temperaturi od 100°C 20 min ili autoklavira, pa centrifugira 10 min na 3000 obrtaja. Zatim se sediment resuspenduje u 1ml glukoznog bujona i ponovi se aglutinacija. Neki autori predlažu autoklaviranje kulture *P. aeruginosa* u glukoznom bujonu 30min, pa centrifugiranje i ponovljenu aglutinaciju¹⁹⁶.

Soler sa saradnicima se bavila serotipizacijom netipibilnih sojeva *P. aeruginosa*. Aglutinisano je 108 izolata iz 14 različitih bolnica. Među netipibilnim izolatima P1 i P13 su bili najzastupljeniji²⁰⁰.

Lam je analizirao LPS *P. aeruginosa* kod obolelih od CF. Antitela protiv A tipa LPS nisu aglutinisala ni jedan serotip po IATS. Western immunoblot analizama je otkriveno da je 11 od 17 analiziranih serotipova imalo A tip polisaharida. U grupi od 250 izolata obolelih od

CF, 68% je imalo A tip LPS. Dodatnim analizama je otkriveno da su količine B tipa polisaharida male. Za vreme infekcije jedan broj tipibilnih sojeva postaje netipibilan, a tip A LPS zamenjuje tip B. Ovo ukazuje da je kod netipibilnih sojeva tip A glavni tip LPS²⁰.

U različitim delovima sveta je različita distribucija pojedinih serotipova. Nije do kraja razjašnjeno zašto pojedini serotipovi dominiraju u pojedinim regionima. Pre 20 godina je bio predominantan serotip P12, koji je proizvodovao PSE-1 β -laktamazu, uz izvesne geografske varijacije³¹⁹. Danas se serotip P12 povezuje s multirezistentim i VIM pozitivnim izolatima. Smatra se da je distribucija serotipova verovatno povezana sa osetljivošću na antibiotike³²⁰.

Naši podaci su slični rezultatima ispitivanja koje je obavila Tomanović sa saradnicima 1991. godine. Ispitivana je i produkcija piocijanina i vršena je piocin tipizacija. Serotipizacijom izolata *P. aeruginosa* došlo se do novih saznanja o hospitalnim infekcijama. Analizirana su 235 izolata od 131 ispitanika. Najčešće su identifikovani P11 (21%), P6 (18%) i P12 (16%) serotipovi. Prisustvo serotipa P12 je u našem ispitivanju nešto niže³²¹.

U ispitivanju koje je Sardelić sprovedla u Hrvatskoj 2009. godine, serotip P12 bio je predominantan. Prisustvo serotipa P6, koji je ranije bio čest, je sada samo sporadično¹⁹⁷. Ispitivanje u Ljubljani je obuhvatilo 208 klinička izolata *P. aeruginosa*, kod kojih su vršena serotipizacija i ispitivana osetljivost na antibiotike. Kod 16 izolata vršena su i genetička ispitivanja. Najzastupljeniji je bio serotip P11 (36%), pa P6 (14,4%), dok je 20,2% izolata bilo poliaگلutibilno. 26% ispitivanih izolata je bilo rezistentno na piperacilin, 9,1% na ceftazidim, 9,6% na imipenem, 45,7% na ciprofloksacin, 39,9% na amikacin, 51 % na gentamicin, 48,6% na netilmicin i 45,2% na tobramicin. Rezistencija na antibiotike je bila najveća kod P11 serotipa¹⁹⁶.

U nacionalnoj studiji u Španiji najučestaliji su serotipovi P1, P4 i P11. U studiji koja je sprovedena u SAD i obuhvatila je 200 izolata *P. aeruginosa*, većina izolata su bili serotip P11. Serotip P12 nije bio prisutan, dok je 15% bilo netipibilno³²².

Kobayashi³²³ je pratio uticaj antibiotika in vitro i in vivo na promenu 42 serotipa *P. aeruginosa* po Homma klasifikaciji. Sojevi *P. aeruginosa* su inkubisani u Mueller-Hinton bujonu sa dodatkom antibiotka u vrednosti od ¼ do 2MIC vrednosti za pojedine antibiotike. U ispitivanje su uključeni piperacilin, cefsulodin, ceftazidim, gentamicin i norfloksacin. Analizirano je i vreme koje je potrebno da nastane promena serotipa. Prve promene serotipa registrovane su posle inkubacije od 6 h. U eksperimentu in vivo, javile su se takođe promene serotipa. Posle inkubacije sa antibioticima 33,3% izolata je promenilo serotip u neki drugi ili

je postalo netipibilno. Najveći broj promena serotipa (19%) je nastao u prisustvu norfloksacina, pa nešto manje u prisustvu gentamicina (14,3%). Predpostavlja se da je razlog promene serotipa infekcija bakteriofagom. Osim promene serotipa, inkubacija u prisustvu antibiotika sa različitim MIK vrednostima, osim kod gentamicina, dovela je do povišenja MIK vrednosti kod svih antibiotika. Najveća vrednost MIK je uočena kod ceftazidima. Dolazilo je i do promene modela izazivanja infekcije kod miševa kojima su ubrizgavani antibiotici, istovremeno sa različitim sojevima *P. aeruginosa*.

Ovo ispitivanje je ukazalo i na problem različitih morfoloških karakteristika kolonija istog serotipa ili postojanje koegzistencije dva serotipa kod istog bolesnika. Ovo je čest problem kod bolesnika sa CF, ali i drugih hroničnih infekcija. Kod infekcija koje izaziva više različitih sojeva *P. aeruginosa*, nije uvek lako utvrditi da li je došlo do infekcije sa više različitih serotipova ili se radi o heterogenoj populaciji jednog serotipa.

Faure sa saradnicima³²⁴ je ispitivao povezanost serotipova i produkcije egzoenzima kod 108 izolata *P. aeruginosa* iz uzoraka RT. Identifikovana su 4 egzoenzima: ExoS, ExoT, ExoU i Exo Y. Egzoenzim S i egzoenzim T imaju ADP ribozil-transferaznu aktivnost i utiču na pokretljivost makrofaga. Egzoenzim Y ima adenil-ciklaznu aktivnost i utiče na ćelijsku morfologiju. ExoU je citotoksin i utiče na oštećenje pluća i sepsu. Ispitivanje je pokazalo da skoro svi sojevi imaju gene za pojedine toksine, ali ne nose svi gene za sva 4 toksina. Serotip P1 je negativan za ExoU, a serotip P3 za ExoS. Kod sojeva izolovanih iz hroničnih procesa ne postoji ekspresija TTSS toksina. Sojevi koji imaju ekspresiju TTSS toksina izazivaju bakterijemiju i šest puta veću smrtnost. Fenotipske karakteristike u produkciji toksina omogućavaju bolju prognozu procesa kod bolesnika. Virulentnost sojeva se mnogo lakše određuje, ako se zna profil produkcije TTSS. Serološki je identifikovano 62,6% uzoraka, dok 37,4% sojeva nije bilo tipibilno. Serotip P6 je bio najprisutniji (14,1%), pa P1, P11 i P4. Serotipovi P12 i P17 nisu identifikovani. Svi identifikovani P11 serotipovi su bili prisutni kod akutnih inflamacija. Nasuprot tome, netipibilni sojevi su bili češće izolovani kod hroničnih infekcija. Sa mortalitetom bolesnika najčešće je povezan P4 serotip. Ni jedan serotip P1 nije sekretovao ExoU. Serotip P11 je najčešće sekretovao ExoU. Najveći broj netipibilnih izolata nije sekretovao ni jedan enzim. Serotip P11 je pokazao najvišu rezistenciju na antibiotike. Najveći broj sojeva izolovan kod CF nije tipibilan. Produkuje minimalne količine egzoprodukta, uključujući elastaze, proteaze i fosfolipaze.

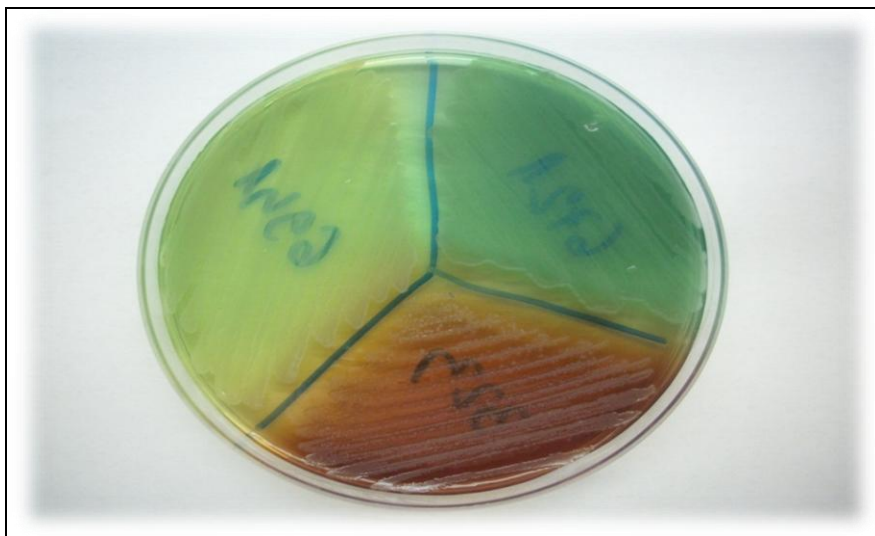
Osim u epidemiološkim ispitivanjima, rezultati serotipizacije se koriste u imunološkim, genetičkim i biohemijskim ispitivanjima *P. aeruginosa*. Decenijama unazad traži se zajednički antigen koji bi omogućio pravljenje efikasne vakcine za *P. aeruginosa*¹⁹.

6.4. PRODUKCIJA PIGMENATA

Naši izolati su više produkovali fluorescin (84%) nego piocijanin (66%), s tim što je veliki broj izolata produkovao oba pigmenta (Slika 38.). Najveći broj izolata je produkovao oba pigmenta (51%), manji broj samo fluorescin (33%) i samo piocijanin (15%). Takođe, izolati bolničkog porekla produkuju više fluorescin (80%) nego piocijanin (70%). Oba pigmenta produkuje najveći broj izolata (52%), a manji samo fluorescin (30%). Samo piocijanin produkuje 18% izolata. Sličan odnos postoji i kod izolata ambulantnog porekla (88% i 64%). Oba pigmenta je produkovalo 52%, samo fluorescin 36%, a 12% samo piocijanin. Jedan izolat bolničkog je produkovao piorubin uz fluorescin. Skoro da ne postoji razlika u produkciji pigmenata kod izolata hospitalnog i ambulantnog porekla.

Izolati kultivisani iz briseva rana bolničkog i ambulantnog porekla produkuju više fluorescin nego piocijanin. Najveći broj izolata produkuje oba pigmenta, manji samo fluorescin, a piocijanin najmanji broj. Produkcija pigmenata kod izolata iz urina se donekle razlikuje u odnosu na druge bolesničke materijale. Tu skoro podjednak broj izolata produkuje fluoresin i piocijanin, pre čemu su sa skoro identičnom učestalošću prisutni izolati, koji produkuju oba pigmenta, samo fluorescin i piocijanin.

Izolati najzastupljenijih serotipova P11, P6, P1 i netibilni izolati su uglavnom produkovali više fluorescin nego piocijanin. Najveći broj izolata je produkovao oba pigmenta, manji samo fluorescin, a najmanji samo piocijanin.



Slika 38. Pigmenti *P. aeruginosa* na hranljivom agaru (Stanković Nedeljković, 2015.)

Ovi rezultati se razlikuju od podataka koji su dobijeni u ZC "Aleksinac" 2009. godine. U ispitivanju koje je obuhvatilo 233 izolata *P. aeruginosae*, najveći broj izolata je proizveo samo fluorescein (58,54%), manji broj pioocianin (22,94%), a 21,21% izolata oba pigmenta³²⁵.

U ispitivanju koje je sprovedeno u Portugaliji, Fonseca sa saradnicima³²⁶ je analizirao produkciju piocijanina i fluorescina. Ispitivanje je obuhvatilo 88 klinička izolata. Produkcija pioverdina je očitavana sa King B podloge, a produkcija piocijanina sa King A podloge, nakon inkubacije od 18 do 24 h. Na osnovu produkcije pigmenata podelio je izolate *P. aeruginosa* u četiri biotipa. Biotip 1 su činili izolati koji su proizveli oba pigmenta, biotip 2 oni koji nisu proizveli ni jedan pigment. Biotipu 3 su pripadali izolati koji su proizveli piocijanin, a biotipu 4 izolati koji su proizveli fluorescein. Ispitivana je osetljivost na imipenem, tikarcilin- tazobaktam, ceftazidim, aztreonam, amikacin, gentamicin i ciprofloksacin.

Najveći broj izolata je bio iz bronhijalnog sekreta (58%), 18% sa katetera, 16% iz urina i 11% iz eksudata. Pigmente je proizvelo 95% epidemijskih izolata i 87% neepidemijskih. Najprisutniji su bili izolati koji su proizveli samo piocijanin (49%). Produkcija pioverdina (biotipovi 1 i 3) je registrovana kod 37 izolata, a piocijanina (biotipovi 1 i 4) kod 75. Inače 35% epidemijskih izolata je bilo rezistentno na sve antibiotike ili sa izuzetkom amikacina. Osim kod amikacina ili imipenema uočena je statistički značajna razlika u osetljivosti na antibiotike. Genetskim ispitivanjima se došlo do podatka da je 51%

bolesnika bilo kolonizovano izolatima sa istim genotipom. To se poklapalo sa podacima o prostornom prisustvu bolesnika i vremenu kolonizacije od 27 dana.

Autori sa Jamajke³²⁷ su ispitivali kolonizaciju povrća *P. aeruginosa* iz maloprodajnih objekata i megamarketa. Pratili su produkciju pigmenata i rezistenciju na antibiotike. Ispitano je 95 uzoraka povrća: po 15 zelene salate, belog kupusa, šargapere, paradajza i krastavca, 3 crvenog kupusa i 2 salate od mešanog povrća iz maloprodajnih objekata i megamarketa. Produkcija piocijanina i fluorescina je praćena na King A i King B podlogama.

Povrće iz maloprodajnih objekata je bilo češće kontaminisano nego ono iz megamarketa. U 88 uzoraka bio je prisutan *P. aeruginosa*. Šargarepa je bila najčešće kontaminisana, a paradajz najmanje. Izolati *P. aeruginosa* su produkovali fluorescin, piocijanin, piorubin i pionegrin. Fluorescin je produkovalo 42% izolata, a 68% pioverdin. 24 izolata nije produkovalo ni jedan pigment, davali su sluzave kolonije i uočeni su u svim regionima, kod svih vrsta povrća³²⁷.

Ispitivanja produkcije pigmenata *P. aeruginosa*, koji su i veoma važni faktori patogenosti bakterije, su uglavnom vezana za patogeni efekat koji piocijanin i pioverdin imaju u obolelim tkivima. Brojni su neposredni i posredni mehanizmi kojima pigmenti deluju na kohabitujuća živa bića.

Piocijanin je imunomodulator. Inhibira pokrete cilija, produkciju azot oksida makrofaga i epitelnih ćelija, produkciju prostaciklina epitelnih ćelija i oksidaciju leukotriena B4 PML. Piocijanin menja produkciju superoksida, povišava nivo apoptoze kod PML i inaktivaciju $\alpha 1$ inhibitora proteaze. Stimuliše oslobađanje IL-8 i inhibiše ekspresiju IL-2 i njegovih receptora. U animalnom modelu stimuliše efluks PML, bronhokonstrikciju i smanjenje brzine pokreta trahealnog mukusa^{328,329}. Produkcija piocijanina omogućava rast, opstanak i prednost u mešanim kulturama. Biosinteza piocijanina se povećava za vreme rasta *P. aeruginosa* u biofilmu *in vitro*, a regulisana je QS.

Caldwell¹⁸⁷ je dokazao da piocijanin u hroničnoj infekciji respiratornih puteva kod miša sinhronizuje adaptivni imunski odgovor koji izaziva oštećenje pluća. U *in vivo* eksperimentima posle ekspozicije ćelija piocijaninom dolazilo je do ćelijske hiperplazije i metaplazije, fibroze provodnih puteva i destrukcije alveola. Posle izloženosti od 12 nedelja ćelije pluća miša su imale smanjenu ekspresiju T helper (Th) leukocita tipa 1. Postojala je polarizacija u pravcu Th2 odgovora. Hronična izloženost piocijaninu povećava nagomilavanje makrofaga, CD4⁺ T ćelija i PML, odgovornih za sekreciju tih citokina.

Lau sa saradnicima³³⁰ je u eksperimentima *in vivo* na miševima ispitivao patogeni efekat piocijanina na tkiva pluća. Piocijanin deficijentne mutante *mvfR-phnAB* i *phzB* izazivaju sepsu sa manjom smrtnošću nego divlji izolati P14. U *in vitro* ispitivanjima piocijanin je pokazao višestruki štetni efekat na ćelije sisara: inhibiciju ćelijske respiracije i cilijarne funkcije, razvoj epidermalnih ćelija, oslobađanje prostaciklina, poremećaj homeostaze kalcijuma i inaktivaciju katalaze. Inaktivirane vakuolarne ATP-aze plućnih epitelnih ćelija. Lau je ispitivao patološke efekte koje u plućima izaziva direktno unet piocijanin *P. aeruginosa* PA14. Promene su merene nakon 3, 6, 12, 16 i 24 h. Praćene su u preparatima pluća obojenim hematoksilinom. Negativna kontrola su bile promene izazvane sterilnom destilovanom vodom.

Piocijanin je indukovaao bronhopneumoniju i priliiv PML već 3 časa posle prestanka ekspozicije, izazivajući kongestiju manjih provodnih bronhija. Efluks PML perzistira do 24 časa posle prestanka ekspozicije. Pluća u koja je aplikovana destilovana voda ili produkti piocijanina deficijentnih muntanti nisu imala promene u provodnom sistemu. U plućima obolelih od CF, izmerena je količina piocijanina od 27 µg/ml. Rezultati potvrđuju da je piocijanin proinflamatorna supstanca u nastanku pneumonije²¹².

Autori iz Indije su ispitivali 19 izolata *P. aeruginosa* koji su izazivali urinarne infekcije. Osim serotipizacije merili su nivo enzima koje luči bacil, a koji su važni faktori patogenosti: proteaze, elastaze, alginata, hemolizina, piohelina, pioverdina i fosfolipaze C. Model nastanka pijelonefritisa je praćen na modelu ženki miša. Serotipizacijom je najčešće identifikovan serotip P11. Svi sojevi su lučili ispitivane enzime i njihova produkcija je opisivana kao niska i visoka. Uočena je najveća podudarnost između produkcije hemolizina i patogenog efekta bakterije. To se objašnjava vezivanjem gvožđa iz eritrocita, toksičnim efektom na leukocyte i direktnim toksičnim dejstvom na epitel³³¹.

Winstanley sa saradnicima³³² je vršio fenotipska i genotipska ispitivanja sojeva koji su izazvali ulcerozni keratitis. Ispitivana su 63 soja *P. aeruginosa* izolovana iz 6 bolnica: Londona, Birminghama, Newcastla, Bristola, Manchestera i Liverpoola. PSR je korišćen da se odredi distribucija TTS gena za toksine: *exoT*, *exoY*, *exoS* i *exoU*, tip pioverdin receptora i tip flagelina (a ili b). Svi sojevi su izazivali beta hemolizu i produkovali siderofore na Azurol S agaru. U ispitivanje su uključeni i referentni *P. aeruginosa* P1 i *P. aeruginosa* P14 sojevi. Serotipizacija je obavljena komercijalnim Bio-Rad kitom. Serotipizacija je omogućila identifikaciju 59 od 63 sojeva. Preostala 4 soja su aglutinisala polivalentni PME serum, ali ne

monovalentne serume. Najveći broj sojeva (61%) je pripadalo serotipovima P1 i P11. PSR reakcijama se došlo do podataka da je 37 (59%) imalo gen *exoU*, 24 (38%) *exoS*, 51 (81%) *exoY* i 63 (100%) *exoT*. Uočena je signifikantna udruženost ($P < 0,001$) između serotipa P11 i prisustva *exoU*. Kod serotipa P1 *exoS* i *exoU* su ravnomernije zastupljeni. 63 soja *P. aeruginosa* su *fliC* tip (48 izolata, 76 %) ili *fliC* tip b (15 izolata, 24%). Uočena je povezanost između nekih serotipova i tipova flagelina. Dominantni serotipovi P1 i P11 su bili povezani sa tipom a flagelina.

U uslovima kada postoji kompeticija bakterija u istom mikroekosistemu, *P. aeruginosa* produkuje piocine, koji ubijaju bakterije iste vrste. Piocini se dele u dve grupe. Nerastvorljive su R i F vrste, a S vrsta je rastvorljiva. R i F vrsta ubijaju bakterije depolarizacijom citoplazmatske membrane. S piocin se razlikuje po načinu dejstva na ciljne ćelije. Može delovati preko DN-aze, tRN-aze³³³.

Kada je količina gvožđa ograničena, *P. aeruginosa* produkuje pioverdin. Jedna od najvažnijih uloga pioverdina i piohelina u fizilogiji *P. aeruginosa* je da služe kao siderofori sa snažnim afinitetom vezivanja gvožđa³³⁴. Svaki od tri tipa pioverdina se vezuje za različite receptore spoljašne membrane FpvA I, II ili III³³⁵. Sekvence sva tri gena za *fpvA* su poznate.

Piocini se vezuju za iste receptore kao i pioverдини. Ćelije koje imaju receptore za pioverdin su osetljive na dejstvo piocina. S3 piocini se vežu za FpvA II receptor i ubijaju osetljive sojeve *P. aeruginosa*. S2 piocini koriste tip I FpvA receptore za vezivanje. U genomu *P. aeruginosa* PA P1 postoje tri lokusa za piocine S-tipa: PA1150–1151 (piocin S2), piocin S4 (PA3866) i PA0984–0985 (piocin S5)⁴. Ćelije koje produkuju piocine moraju da se zaštite od dejstva sopstvenog piocina. Slobodni piocini u citoplazmi mogu da ubiju ćeliju koja ih produkuje. *P. aeruginosa* proizvodi specifični zaštitni protein koji prepoznaje toksine direktnom interakcijom. Geni za produkciju zaštitnih proteina su obično blizu gena za piocina. *P. aeruginosa* PA P1 ne produkuje zaštitni protein za piocin S4³³³.

Elfarash sa saradnicima³³⁶ je ispitivao 43 izolata iz reke Woluwe u Belgiji da bi ispitao koji receptor služi kao ulazna tačka za S4 i odredi koji gen za receptore feripioverdina (*fpvAI*, II ili III) je prisutan u njihovom genomu. Rezultati su pokazali da su svi S4 osetljivi izolati imali gene za receptor *fpvAI*. 19 izolata koja su imala druga dva tipa receptora bila su rezistentna na S4. Veliki broj izolata, (18 od 43) koji je bio rezistentan na S4, bio je pozitivan za *fpvAI* gen. Takvi izolati su ispitivani PSR-om i nađeno je da svi imaju S4 zaštitni gen, a osetljivi sojevi su bili negativni za S4 *imm* gen. Zaključci istraživanja su i da *P. aeruginosa*

P1 ima gen za zaštitne proteine za S4. Produkuje tri S-tipa piocina: S2, S4 i S5. Piocini S2 i S4 imaju najveću aktivnost, ako osetljiva ćelija nema dovoljno gvožđa. Tada koristi feripioverdin receptor FpvA, za koji se vezuju piocini S2 i S4, za ulazak u ćeliju.

6.5. ADHEZIVNA SPOSOBNOST

Adhezija je početna i osnovna faza u formiranju biofilma i zbog toga je važan činilac u patogenezi infekcija izazvanih *P. aeruginosa*. Većina naših izolata je imala sposobnost adherencije na polivinil-hlorid nakon inkubacije od 60 min (81%). Minimalno povećanje ekstincije je detekovano kod 11 izolata. Rezultati ispitivanja adhezivnih sposobnosti kod naših izolata su pokazali veliku disperziju dobijenih vrednosti ekstincije.

Prosečna ekstincija izolata iz ambulantnih izolata (0,002) i medijana su viši nego kod bolničkih izolata (-0,033). Ekstincija kod izolata iz briseva rana (0,032) je viša nego kod celokupne grupe (-0,015) i pri tome je viša kod izolata bolničkog porekla (0,033) nego kod ambulantnih izolata (0,031), ali je razlika minimalna. Izolati iz urina su imali višu ekstinciju (0,015) nego što je prosek u celoj grupi, ali nižu nego iz briseva rana. Prosek je bio viši kod urina bolničkog porekla (0,038), nego ambulantnog (0,014). Serotip P1 je imao najveću sposobnost adherencije (ekstincija 0,039), pa serotip P11 (0,013) i P6 (0,003).

Mnogi radovi se bave aderencijom *P. aeruginosa*, kao prvom fazom u formiranju biofilma. O'Toole¹⁰⁵ je koristio divlje sojeve i mutante bez sposobnosti formiranja flagela (*flgK*) i pila (*pilB*, *pilC* i *pilY1*) da ispita faze u formiranju biofilma. Smatra se je PilBCD operon kodira biogenezu pila tipa IV. Mali komadići od polivinilhlorida (PVC) dimenzija 3mm x 6 mm su inkubisani do 24 časa u mikrotitar pločama koje su inokulisane u koncentraciji od $<10^6$ cfu/ml u M63 podlozi i inkubisane. Posle svakih 30 min plastični umetak je posmatran fazno-kontrastnim mikroskopom. Već 30 min nakon početka inkubacije divlji sojevi su formirali jedan sloj ćelija koji se pričvrstio na površinu. Broj ćelija koje su se nalazile na površini biofilma je vremenom rastao.

Rezultati su potvrdili pretpostavku da su za formiranje zrelog i kompletno difenciranog biofilma neophodni i flagele i pili. Divlji soj je pokazao adheziju za PVC površinu i zatim povećanje broja adherisanih ćelija. Mutante koje nisu imale sposobnost formiranja pila su adherisale samo u jednom sloju i tu je prestalo formiranje biofilma. Prva tri časa razlika između mutanti i divljih sojeva skoro da nije postojala. Posle 8 časova formirale

su se prve mikrokolonije divljeg soja, ali se to nije desilo kod mutantni. Na kraju su ćelije divljeg soja skoro potpuno prekrile površinu PVC, tanjim slojem ćelija, što se nije desilo mutantama bez mogućnosti formiranja pila. Mutante bez formiranja flagela nisu imale mogućnost skoro nikakve adherencije, pa je skoro beznačajan broj bakterijskih ćelija koje su adherisale.

6.6. PRODUKCIJA BIOFILMA

Biofilm kao način organizacije opstanka bakterija je mnogo efikasniji u odnosu na planktonski način života^{190,337}. U biofilmu su bakterijske ćelije zaštićene od mehaničkih i hidromehaničkih sila, komponenti celularnog i humoralnog imuniteta i dejstva antibiotika i dezinficijensa. Bakterijske ćelije u sastavu biofilma čine rezervoar za perzistentnu infekciju. Kada nema dovoljno kiseonika i hranljivih materija bakterije lakše preživljavaju³³⁸. Bakterije u biofilmu lakše adherišu na epitel pluća. U RT bifilm je otporniji na pokrete cilija epitelnih ćelija.

Bakterije u sastavu biofilma su mnogo rezistentnije na dejstvo antibiotika u odnosu na planktonsku formu, pa je i eradikacija bakterija unutar biofilma komplikovanija. Jedan od pretpostavljenih mehanizama rezistencije je nemogućnost prodora antibiotika u biofilm. Antibiotici koriste različite mehanizme da prodiru u biofilm. Polimeri koji čine matriks biofilma otežavaju difuziju unutar biofilma. Neki antibiotici se inaktiviraju u spoljnim delovima biofilma. Postoji horizontalni transfer rezistencije unutar biofilma. Biofilm može sadržati više bakterijskih vrsta sa različitom rezistencijom na antibiotike. Jedno od objašnjenja je da neke bakterijske ćelije u okviru zajednice nemaju dovoljno hrane i ne razmnožavaju se sve podjednako brzinom. Bakterije koje se sporije razmnožavaju su manje osetljive na antibiotike. Sličan je mehanizam rezistencije biofilma na oksidante kao što su hipohlorit ili vodonik peroksid¹¹⁵.

Skoro svi naši izolati *P. aeruginosa* (99%) su imali sposobnost formiranja biofilma. Analizom nivoa uvećanja ekstincije u odnosu na negativnu kontrolu došlo se do zaključka da je većina izolata imala umerenu sposobnost formiranja biofilma (87%). Izolati bolničkog porekla su takođe uglavnom imali umerenu sposobnost formiranja biofilma (78%), a manje slabu sposobnost formiranja biofilma (22%). Izolati ambulatnog porekla su imali više izraženu sposobnost formiranja biofilma, nego izolati bolničkog porekla. Najveći broj izolata

(96%) je imao umerenu sposobnost formiranja, a samo 2% slabiju sposobnost formiranja biofilma.

Prosečna ekstincija pri određivanju sposobnosti produkcije biofilma je 0,154. Izolati iz briseva rana su imali slabiju sposobnost produkcije biofilma u odnosu celu grupu (0,129). Izolati iz briseva rana ambulantnog porekla (prosečna ekstincija 0,203) su imali izraženiju sposobnost produkcije biofilma u odnosu na bolničke (0,093). Izolati (prosečna ekstincija je 0,156) iz urina su imali višu sposobnost produkcije biofilma u odnosu na one iz briseva rana. Izolati iz urina ambulantnih bolesnika su formirali biofilm intenzivnijeg biovolumena (ekstincija 0,234) nego izolati bolničkog porekla (0,114). Netipibilni izolati su formirali biofilm najveće biomase (prosečna ekstincija je 0,161). Sledeći po vrednosti prosečne ekstincije su izolati serotipa P1 (0,146), pa P11 (0,145) i P6 (0,127).

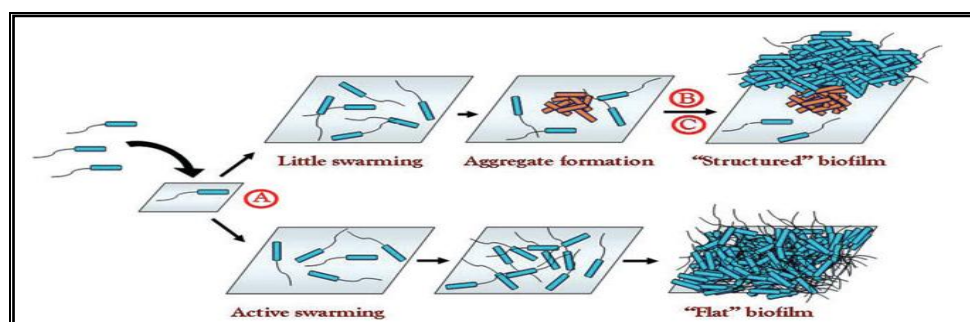
Woo sa saradnicima³³⁹ je potvrdio pretpostavku da se u biofilmu razvija više faktora patogenosti nego kod pojedinačnih ćelija. Upoređivani su adhezivnost, produkcija biofilma, proteaza i elastaza, QS i funkcionalna ispitivanja pluća dispergovanih izolata *P. aeruginosa* iz biofilma pluća obolelog od CF i referentni soj *P. aeruginosa* P1. Klinički izolati su pokazali veću heterogenost i značajno viši nivo elastazne aktivnosti i QS. Svi klinički izolati su imali 3-4 puta viši nivo frekvencija mutanti, što je važno u adaptaciji *P. aeruginosa*.

Seth sa autorima³⁴⁰ je pratio produkciju biofilma kod istovremenog prisustva *P. aeruginosa* P1 i *S. aureusa* na modelu miša *in vivo*. Pretpostavka je da su infekcije rana uglavnom izazvane sa više mikroorganizama. Vremenom je *P. aeruginosa* postao dominantan. Biofilm koji je formiran imao je više pokazatelja patogenosti nego biofilm koji su formirale bakterije pojedinačno. Parametri inflamacije su bili izraženiji i povišena ekspresija IL-1 β i TNF- α . Biofilm koji su formirali mutantni sojevi *P. aeruginosa* je izazivao nižu ekspresiju citokina.

Toyofuku⁷³ je ispitivao opstanak *P. aeruginosa* pod anaerobnim usloima, kakvi se često sreću u biofilmu. U nedostatku kiseonika energija se može dobijati iz azot oksida, denitrifikacijom. U plućima kod CF vladaju mikroaerofilni do anaerobni uslovi. U prisustvu azot oksida, dolazi do ekspresije gena koji učestvuju u procesu denitrifikacije. Ekspresija je regulisana sofisticiranom mrežom signalnih molekula. Glavni regulatorni protein koji prati koncentraciju kiseonika je ARN protein. Aktivna forma proteina sadrži [4Fe-4S]²⁺ klaster koji se razara u prisustvu kiseonika. ANR indukuje gene koji su uključeni u produkciju energije u mikroaerofilnim i anaerobnim uslovima.

Ispitivana je sposobnost *P. aeruginosa* P1 izolovanog kod CF da formira biofilm u aerobnim i anaerobnim uslovima pomoću laktoferina. Mogućnost bacila da produkuje biofilm je smanjena ako nema dovoljno gvožđa u aerobnim uslovima, dok je u anaerobnim uslovima formiranje biofilma veoma oskudno. Ako se soj preseje na podlogu sa dovoljno gvožđa ponovo ima sposobnost da formira biofilm. Ta osobina bacila se može upotrebiti za suprimiranje stvaranja biofilma u hipooksničnim sredinama, kao što su pluća kod CF³⁴¹. Slične rezultate dobio je i Borchering sa saradnicima³⁴³.

U ispitivanju koje je sproveo Shrout³⁴³ praćen je uticaj nutritivnih karakteristika sredine i pokretljivost *P. aeruginosa* na QS i razvoj biofilma. Korišćeni su mutanti sojevi *lasIrhll* i *lasRrhIR* i divlji sojevi u sredini sa nedovoljno ugljenika. Divlji sojevi i mutante kultivisani su u komorama u kojima su bili strogo dozirani sukcinati, glutamati i glukoza. Rojenje takođe utiče na rane faze formiranja biofilma. Intenzitet rojenja zavisi od količine ugljenika. Mutanti sojevi su imali izražen defekt u ranoj fazi produkcije biofilma (Slika 39.).

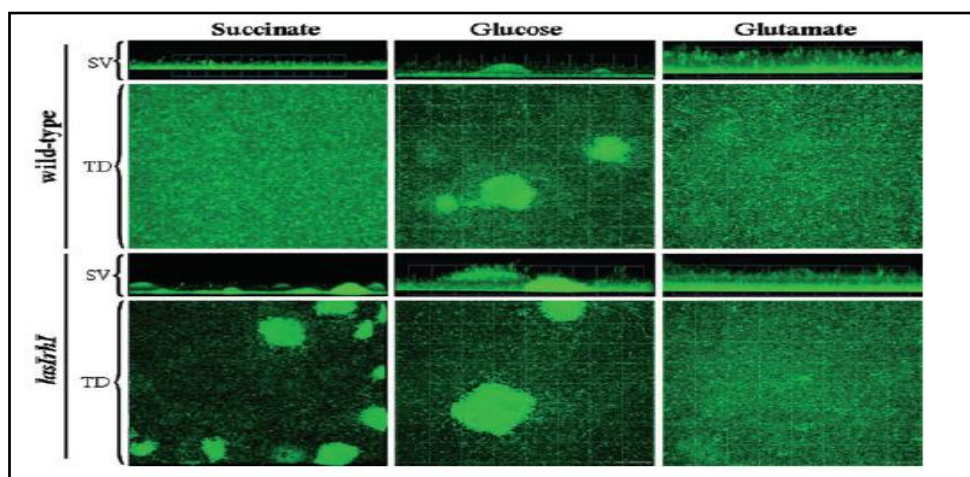


Slika 39. Model nutritivnog uticaja i pokretljivosti *P. aeruginosa* na ranu fazu u formiranju biofilma (Shrout , 2006.)

Posle 48h divlji soj je pokazao drugačiju strukturu biofilma u zavisnosti od izvora ugljenika. Biofilm koji je kultivisan u komorama sa glutamatima i sukcinatima je gladak i uniforman. Nasuprot tome, biofilm u sredini sa glukozom je bio sačinjen od krupnih ćelijskih agregata.

Rezultati ovog ispitivanja ukazuju na sledeći model formiranja biofilma. Sojevi koji imaju mogućnost rojenja pokazuju značajnu površinsku pokretljivost i formiraju glatki uniformni biofilm. U uslovima kada je ograničena pokretljivost formira se biofilm sa ćelijskim agregatima. Intenzitet trzajućih pokreta i rojenja se ne menjaju kada soj raste u okruženju različitih izvora ugljenika. Ako dođe do poremećaja rojenja, što se dešava divljim sojevima ako u njihovom okruženju ima glukoze, produkuje se biofilm sa ćelijskim agregatima (Slika 40.).

U okruženju sa sukcinatom mutanti sojevi su formirali različit biofilm u odnosu na divlje sojeve. Dodatak signalnih butiril homoserina je uticao na promenu strukture biofilma kod mutanti. Kod biofilma koji formiraju mutantni sojevi samo su površne bakterije u mogućnosti da koriste hranljive supstance iz svog okruženja i pokretne su. Samo površne ćelije imaju mogućnost deobe.



Slika 40. Prikaz biofilma divljeg soja *P. aeruginosa* i *las/rhl* mutanti u uslovima kada su im dostupni glutamati, sukcinati i glukoza kao izvori ugljenika (Shrout , 2006.)

Uočene su značajne razlike u prečniku rojenja između ispitivanih sojeva u zavisnosti od izvora ugljenika. Divlji sojevi roje intenzivnije kad rastu u okruženju sa sukcinatima i glutamatima, a siromašnije kad rastu u sredini sa glukozom³³⁸. Mutantni sojevi su takođe pokazali zavisnost rojenja od nutritivnih karakteristika sredine.

Kad rastu u okruženju sa sukcinatom mutante pokazuju defekt u rojenju. Dodatak signalnih molekula *las/rhl* poboljšava mogućnost rojenja mutanti, ali ne i dodatak *lasR/rhlR*. Mutante roje slično divljim sojevima u sredini sa glukozom i sukcinatima, a pokazuju oskudno rojenje sa glutatom. Merena je količina signalnih molekula kod divljih sojeva i mutanti. Divlji sojevi proizvode ramnolipid pod svim uslovima, a mutantni ne proizvode detektabilne vrednosti ramnolipida. Sojevi koji imaju mogućnost rojenja pokazuju značajnu površinsku pokretljivost i formiraju glatki uniformni biofilm, a u uslovima kada je ograničena pokretljivost formiraju biofilm sa ćelijskim agregatima. Intenzitet trzajućih pokreta i rojenja se ne menjaju kada soj raste sa različitim izvorima ugljenika.

Klausen³⁴⁴ je takođe ispitivao vrstu pokreta i biofilm divljeg soja *P. aeruginosa* P1 i mutanti bez mogućnosti formiranja pila *fliM*, *pilA* i *fliMpilA* u zavisnosti od vrste hranljivih materija u ulovima protoka tečnosti. Biofilm koji su formirao *P. aeruginosa* P1 u prisustvu minimalne koncentracije glukoze je pečurkastog izgleda. Razlikovao se od biofilma koji je formiran u prisustvu minimalnih količina citrata i amino kiselina. Taj biofilm je bio gladak i gust. Divlji tip i mutante su jednako adherisale na staklenu površinu u statičkim i protočnim komorama. Mutante *fliM* i *pilAfliM* su formirale biofilm sa većom biomasom nego *PilA* i divlji soj. Mutantni sojevi su bili deficijentni u formiranju biofilma u uslovima sa minimumom hranljivih materija. Ali u uslovima kada su bili prisutni citrati i divlji soj i mutante su formirale biofilm. Struktura biofilma se razlikovala. Divlji soj je formiralo biofilm kao prekrivač, a *fliM* mutante neravan biofilm. *PilA* i *pilAfliM* su formirali ispupčen i neravan biofilm. Različite vrste biofilma koji produkuje neki soj *P. aeruginosa* su bitne zbog različitih vrsta inflamacije koje izazivaju.

Predhodni radovi su ukazivali da su pili tipa IV možda ključni za trzajuće pokrete i formiranje biofilma¹²⁶. Formiranje pečurkaste formacije je proces u kome se mobilne subpopulacije u starijem biofilmu kreću preko površine i akumuliraju na nepokretnoj subpopulaciji bacila. Imobilna subpopulacija je agregat ćelija i označava se i kao stalak.

Haydorn³⁴⁵ je međutim došao do podataka da mutantni i divlji sojevi formiraju glatke kolonije i da se struktura biofilma ne razlikuje kod divljih sojeva i mutanti.

Uloga koju ima QS u nastanku biofilma je i predmet mnogih ispitivanja. QS regulišući ramnolipidi su potrebni za rojenje u okruženju sa suksinatima, ali ne sa glutamatima. Istraživanje Shrout³⁴⁴ je specifično jer ukazuje na ulogu QS u ranoj fazi razvoja biofilma, za razliku od drugih ispitivanja, koja ukazuju na značaj QS u kasnijim fazama.

Ispitivanja poslednjih godina ukazuju na alternativne metode terapije *P. aeruginosa* posredstvom uticaja na biofilm, jer se došlo do zaključka, da je to osnovni oblik organizacije života bakterije³³⁷. Korišćeni su bakteriofage, dezinficijensi, IL-1 β , TNF- γ ³⁴⁰, S-fenil-L-cistein sulfoksid, 4-nitropiridine-N-oksidi³⁴⁶, pa i ekstrakti belog luka¹¹¹, tobramicin, azitromicin^{347,55} i druge bakterije³⁴⁹.

Ispitivanje Piresa i saradnika³⁴⁹ je obuhvatilo biofilm koji je formiralo 35 soja *P. aeruginosa* i kontrolni soj *P. aeruginosa* ATCC 10145. Praćen je uticaj faga na formiranje biofilma. Nije bilo razlike u biomasu kontrolnog soja i *P. aeruginosa* P1, nakon 24h i 48h. Biofilm *P. aeruginosa* P1 nakon 24h je bio značajnije metabolički aktivniji nego nakon 48h.

Vrednosti biomase biofilma koji je produkovao kontrolni soj su slične nakon 24h i 48h. Nakon 24h broj bakterijskih ćelija u biofilmu je kod kontrolnog soja bio statistički značajnije viši, nego nakon 48h. Sposobnost bakterijskih ćelija *P. aeruginosa* P1 da prežive nakon 24h je bila viša, dok ta razlika nije uočena nakon 48h. Infekcija kultura bakteriofagom phiIBB-PAA2 već posle 2h je smanjila broj vitalnih bakterijskih ćelija, ali je *P. aeruginosa* P1 bio rezistentniji na dejstvo bakteriofaga.

Knežević⁷⁵ je u svom ispitivanju pratio uticaj bakteriofaga na formiranje biofilma kod 21 izolata *P. aeruginosa* iz kliničkih materijala i voda, pri različitoj koncentraciji bakterijskih ćelija. Ispitivani bakteriofagi P-1, P-2, P-3, 001A i δ su pokazali inhibitorni efekat na formiranje biofilma. Inhibicija porasta biofilma od 50% je dobijena primenom P-1, P-2 i P-3 faga kada je broj bakterija bio 1×10^2 – 1×10^6 CFU. Pri početnom broju bakterija od 1×10^8 uočena je inhibicija formiranja više od 50% kod P-2, a P-1 i P-3 su bili manje efikasni. Smanjenje biomase kod već formiranog biofilma je manje izraženo. Pri maloj brojnosti bakterija (1×10^2 i 1×10^4) smanjenja biomase je bilo najveće kod δ faga.

Slične rezultate, vezane za inhibitorni efekat faga na produkciju biofilma, dobili su i drugi autori. U studiji koju je sproveo Cerca³⁵⁰ prvi put je primenjena metoda inhibicije formiranja biofilma primenom bakteriofaga. Bakteriofagi δ i I se vezuju za egzopolisaharide, a ostali bakteriofagi za površinske proteine. Unutar formiranog biofilma zbog malih dimenzija fagi se lako kreću kroz vodene kanaliće. Utiču na smanjenje mase biofilma razlaganjem egzopolisaharida. Čak i kad ne mogu da se vezuju za receptore, mogu da razore egzopolisaharid i smanje masu biofilma. Neki fagi u sastavu viriona imaju polisaharid depolimerazu.

Zhang sa saradnicima³⁵¹ je ispitivao dejstvo RNK bakteriofaga i hlora na formirani biofilm. Bakteriofagi, u koncentraciji od 400 PFU/mL i 4×10^7 PFU/mL, inhibiraju formiranje biofilma $45 \pm 15\%$. U koncentraciji 6000 PFU/mL i 6×10^7 PFU/mL, bakteriofage redukuju biofilm $45 \pm 9\%$. Hlor u koncentraciji od 210 mg/L redukuje porast biofilma $86 \pm 3\%$. Kombinacija 3×10^7 PFU/mL i hlora smanjuje biomasu $94 \pm 2\%$ i ukloni $88 \pm 6\%$. U protočnim sistemima, gde postoji konstantno formiranje biofilma, kombinacija faga u koncentraciji od 1.9×10^8 PFU/mL sa hlorom smanji biomasu za $97 \pm 1\%$. Već formirani biofilm kombinacija faga nižih koncentracija i hlora smanjuje za $96 \pm 1\%$ za manje od 2 dana.

Seth³⁴⁰ je pokazao da je zarastanje rane lakše, ako se u terapiji primenjuju sredstva koja deluju inhibitorno na biofilm. Pratio je produkciju biofilma *in vivo* u rani inficiranoj *P. aeruginosa* i *S. aureus*. Produkcija biofilma je drastično menjala nivo IL-1 β i TNF- α .

6.7. TRZAJUĆI POKRETI

Trzajući pokreti *P. aeruginosa* su prototip ovakvog tipa kretanja bakterija. Trzajuće pokrete omogućavaju pili tipa IV. Pili tipa IV učestvuju u pokretima svih vrsta kod *P. aeruginosa*. Burrows⁶¹ je ispitivala detaljniju strukturu i podelila različite vrste pila tipa IV u različite vrste: IVa, IVb i Tad. Trzajući pokreti su identifikovani i kod drugih bakterija: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Moraxella bovis* i *Pasteurella multocida*^{352,353}. Enteropatogena *E. coli* može da se kreće trzajućim pokretima. Kod *E. coli* hemotaksični proteini su neophodni za kordinisane pokrete vezane za hemijske gradijente, ukazujući da su trzajući pokreti hemijski regulisani³⁵⁴.

Trzajući pokreti su neophodni u procesu formiranja bifilma. Kod trzajućih pokreta bakterije se kreću linerno duž duže osovine i kreću se u velikim grupama. Mutante bez pila ne mogu da se kreću ovom vrstom pokreta. Posmatrane mikroskopski ivice kolonija koje se kreću trzajućim pokretima su nepravilne. Mutante sa defektnim pilima tipa IV formiraju glatke kolonije¹⁰⁵.

Da bi se bolje definisala uloga trzajućih pokreta, koja vode do formiranja biofilma, korišćen je fazno-kontrasni mikroskop. Posmatrano je formiranje biofilma 56 min i pravljene su slike svakih 15 sekundi. Posle 360 min do 416 min, slike su pravljene svakih 7 min i praćeno je kretanje nekoliko kolonija preko PVC površine. Većina kolonija se vremenom povećavala, a neke su se delile. Formiranje mikrokolonija nastaje uglavnom agregacijom susednih ćelija na dispergovani prvi sloj ćelija, a ne samo rastom bakterijskih ćelija.

Konkretna uloga pila u trzajućim pokretima i formiranju biofilma je da stabilizuju interakciju između nežive površine (koja može biti inicirana i flagelama) i/ili međućelijski kontakt. Pili su važni u trzajućim pokretima koji su neophodni u kretanju preko površine i formiranju ćelijskih agregacija. Mutante bez pila se ne mogu kretati trzajućim pokretima. Kolonije koje formira divlji soj *P. aeruginosa* P14 podsećaju na aggregate koje daje *Myxococcus*, za koje je neophodno prisustvo pila³⁵⁵. Svi ovi procesi su u direktnoj ili indirektnoj vezi sa homoserin laktonom koji reguliše ekspresiju pila i trzajuće pokrete. S

obzirom da i mutante mogu da adherišu na nežive površine, to ukazuje da tu postoje i drugi mehanizmi adherencije i trzajućih pokreta. Osim pokreta na neživim površinama pili su važni i u *in vivo* reakcijama sa invadiranim tkivima.

Postoje i suprotni podaci. Neki autori tvrde da je ponekad moguće formiranje biofilma i bez pila tipa IV. Heydorn³⁴⁵ je ispitivao trzajuće pokrete i formiranje biofilma *P. aeruginosa* P1 u protočnim uslovima. Po podacima iz te studije divlji sojevi *P. aeruginosa* P1 su formirali uniforman glatki biofilm bez mikrokolonija. Mutantni izolati bez mogućnosti trzajućih pokreta su mogli da formiraju biofilm, ali bez mikrokolonija. Kontradiktorni podaci se objašnjavaju povezanošću formiranja biofilma sa pojedinim serotipovima, nutritivnim uslovima i primenjenom metodologijom.

P. aeruginosa P1 u genomu ima 4 kompletna signalna prenosna sistema za hemotaksu, što ukazuje na kompleksnost kretanja kod *P. aeruginosa*¹⁵⁰. Jedan od sistema kontroliše hemotaksu kod plivanja⁶⁴. *Pil* system je osnovni kod trzajućih pokreta³⁵⁶. Druga dva sistema su nedavno opisana i nije do kraja razjašnjena njihova uloga. Treći sistem je sličan sistemu koji je nađen kod *Rhodobacter sphaeroides*, a reaguje hemokinetički slično *P. aeruginosa*³⁵⁷. Četvrti sistem je sličan *frz* sistemu kod *Myxococcus xanthus* koji kontroliše specifične pokrete ove bakterije¹⁰⁵.

P. aeruginosa ne može da koristi zasićene masne kiseline kao izvor energije. P1 serotip može da opstane u okruženju zasićenih kiselina dugih lanaca, iako ne postoje trzajući pokreti³⁵⁸. U metabolizmu dugolančanih masnih kiselina važan je njihov prelaz preko spoljne membrane posredovan transporterima. Kod *E. coli* transporter je FadL. Kod *P. aeruginosa* tri gena kodiraju homolog FadL. Delecija tri gena ne suptimira trzajuće pokrete prema fosfatidiletanolamin (PE) ili nezasićenim masnim kiselinama. Ovo ukazuje da postoji neki drugi put kojim ovi atraktanti prelaze spoljnu membranu.

Kearns sa saradnicima³⁵⁴ je ispitivao intenzitet trzajućih pokreta kod divljih sojeva *P. aeruginosa* i *pilJ* mutante na TPM agaru u prisustvu masnih kiselina fosfatidiletanolamin (PE), dilauroil PE i dioleoil PE (Slika 42.). Inače, lipidi su idealni signali za kretanje bakterija po površinama koje podrazumeva adherenciju i sporo kretanje. Smatra se da PE iz membrane *P. aeruginosa* funkcioniše kao endogeni autoatraktant i agregacioni signal. PE je prva opisana lipidna supstanca hemoatraktant za *P. aeruginosa*. Ranije se znalo da je hemoatraktant za neke ćelije (PML) i mrave. Pozitivan efekat na trzajuće pokrete ima i fosfatidilholin. Za ekspresiju fosfatidilholin i PC potrebna je ekspresija PlcB koji je jedan od

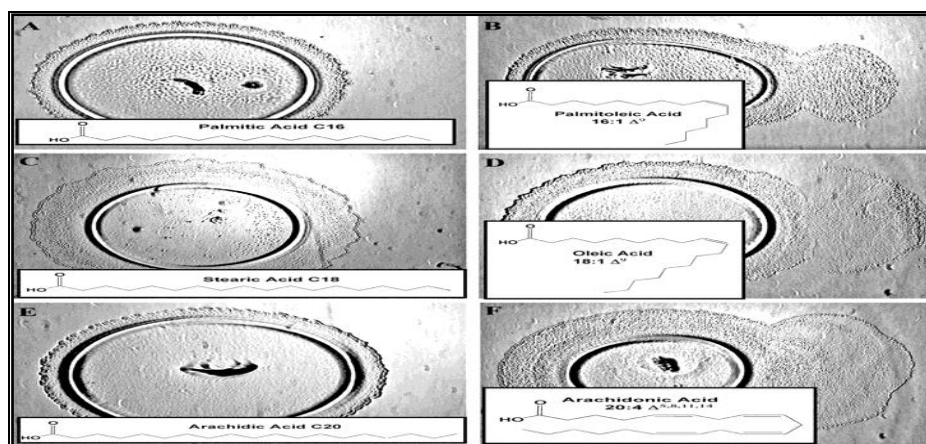
tri ekstracelularne fosfolipaze C. Moguće je da *P. aeruginosa* određuje pravac kretanja uz pomoć PE. *PilJ* mutante nemaju mogućnost trzajućih pokreta u prisustvu fosfatidiletanolamin (PE), ali mogu da se kreću plivanjem. PE deluje podsticajno na trzajuće pokrete *P. aeruginosa* P1 na više načina. EP je lubrikant i pasivno deluje podsticajno na pokretljivost. Drugo moguće objašnjenje je da je EP u vezi sa percepcionim sistemom koji reguliše motorne pokrete. Dilauroil PE i dioleoil PE indukuju pokretljivost.

Bakterije imaju mogućnost da promene pravac kretanja u grupi u zavisnosti od hemotaktičnih reakcija. U toku procesa hemotakse dešava se ekscitacija senzornog sistema koji suprimira kretanje unazad, pa je produženo kretanje prema hemoatraktantu. Kretanje se nastavlja, dok god je koncentracija hemoatraktanta viša, jer adaptivni odgovor konstantno desenzibilizuje senzorni sistem. PE povećava brzinu trzajućih pokreta i usmerava kretanje prema produktima hemokineze.

Kod nedostatka gvožđa (*pvdA*, *fpvA* i *tonB*) regulatorni geni i geni koji su uključeni u sintezu pioverdina imaju povišenu ekspresiju. Otkriveni su geni za četiri ekstracelularne fosfolipaze C koje mogu da hidrolizuju PC i PE. Ti geni nisu suprimirani pri trzajućim pokretima. Ekstracelularne lipaze *P. aeruginosa* doprinose njenoj migraciji prema PE. $\Delta lipA$ mutante se kreću bez određenog pravca. $\Delta estA$ se uopšte ne kreću. $\Delta lipC$ pokazuju kretanje bez određenog pravca, kreću se u obliku mehurića prema PE. Gen koji kodira lipazu EstA pokazuje značajno povišenu funkciju³⁵⁹.

Miller³⁶⁰ je ispitala transkripciju gena koji su udruženi sa metabolizmom masti i vezani su za trzajuće pokrete bez eksterno dodatih fosfolipida. Analizirano je da li su lipid modifikujući ili metabolički enzimi uključeni u trzajuće pokrete *P. aeruginosa* sa i bez fosfolipida. U jednom slučaju *P. aeruginosa* se kretao direktno ka PE (Slika 41.). U odsustvu PE ćelije su se kretale trzajućim pokretima, ali bez određenog pravca. Podaci potvrđuju hipotezu da se PE dalje razgrađuje i da se polovina dugih lanaca masnih kiselina kompletno metaboliše. *P. aeruginosa* ima pozitivnu hemotaksu prema dugim lancima nezasićenih masnih kiselina (oleinska kiselina), ali ne prema zasićenim (stearinska kiselina). Dokazano je da pri trzajućim pokretima dolazi do represije gena koji su uključeni u metabolizam glukoze i korišćenje glukonata i klastera gena koji je uključen u produkciju alkalne fosfataze. Geni uključeni u produkciju alginata su u stanju represije pri trzajućim pokretima ka PE. Nasuprot tome, postoji značajno povišenje ekspresije gena koji kodiraju razgradnju lipida, transportni sistem za masne kiseline dugih lanaca i enzima koji su uključeni u razgradnju

produkata PE. Ovakav raspored genske ekspresije ukazuje na važnost degradacije PE pri trzajućim pokretima, pri čemu je neophodna energija dobijena metabolizmom masnih kiselina dugih lanaca neophodna.



Slika 41. Prikaz trzajućih pokreta *P. aeruginosa* prema nezasićenim masnim kiselinama i odsustvo pokreta prema zasićenim kiselinama (Miller, 2008)

P. aeruginosa proizvodi enzime koji deluju na masne kiseline, nazvane lipohidrogenaze, aktivne prema oleinskoj, arahidonskoj i linolenskoj kiselini³⁶¹. Ovi enzimi sintetišu iste derivate iz arahidonske kiseline kao humani enzimi. Tako modifikovane nezasićene masne kiseline mogu delovati kao signalni molekuli ili hemoatraktanti. Derivati arahidonske kiseline, koje proizvode ćelije domaćina, uključujući prostagladine, tromboksane, leukotriene, hidroksi i epoksi masne kiseline, lipoksine i izoprostane mogu biti hemoatraktanti za *P. aeruginosa*. Lipohidrogenaze mogu proizvoditi proinflamatorne i antiinflamatorne derivate, od kojih su neki hemoatraktanti za PML i makrofage³⁶².

Prosečna vrednost prečnika našh kolonija *P. aeruginosa*, posle kultivacije od 24h na 0,5% Lauril-Betoni agaru, je 7,75 mm ± 2,36 mm, a Me je 6 mm. Izolati iz bolesničkih materijala hospitalizovanih bolesnika su imali manju sposobnost trzajućih pokreta (prosečna vrednost kolonija je 7,31 mm) nego izolati ambulantnog porekla (prosečan prečnik kolonija 8,19 mm). Izolati iz briseva rana su formirali u proseku veće kolonije nego izolati iz ostalih materijala (8,33 mm). Izolati iz briseva rana bolnikog porekla su imali manju sposobnost trzajućih pokreta (prosečna vrednost prečnika kolonije 8,12 mm.), nego izolati ambulantnog porekla (prosečan prečnik kolonija 8,67 mm.). Izolati iz urina su imali manju sposobnost trzajućih pokreta (5,29 mm.) nego preostali izolati. Najveću sposobnost trzajućih pokreta su

imali izolati serotipa P11 (8,22 mm.), pa P6 (8,18 mm.) i P1 (7,7 mm.). Netipibilni izolati su imali prosečni prečnik kolonija 7,93 mm.

O'Toole sa saradnicima¹⁰⁵ je ispitivao produkciju biofilma kod divljih sojeva *P. aeruginosa* i mutante, koje nemaju flagelarnu pokretljivost i/ili mutante, koje nemaju pile tipa IV. Praćen je razvoj biofilma korišćenjem fazno-kantrasnog mikroskopa na neživim površinama, tokom 8 časova. U poređenju sa divljim sojevima, sojevi sa mutantnim pilima su formirali samo jedan sloj na polivinilhlorid (PVC) komadićima dimenzija 3 mm X 6 mm, ali ne biofilm. Manji broj mutantnih sojeva sa izmenjenim flagelama se vezao nakon 8 časova za PVC površinu. Od 2400 mutanti *P. aeruginosa* P14, koje su nastale primenom transpozoma Tn5-B30 (Tcr), 15 (0,5%) nije moglo da formira biofilm. Od tih 15, 13 je imalo normalan rast, ali nije formiralo biofilm. Pokretljivost divljih sojeva i 13 mutanti je ispitivana na 0,3% agaru. Divlji sojevi i mutante sa nemogućnošću stvaranja pila (*pil B* i *pilC*) bile su pokretne. Tri mutantna izolata su bila nepokretna (*sad-36*, *sad-42* i *flgK*).

6.8. ROJENJE

Henrichsen je prvi opisao fenomen rojenja³⁵³. Rojenje je najbrži poznati način kretanja bakterija po čvrstoj površini. Omogućava brzu kolonizaciju sredine u kojoj se bakterija nalazi i tkiva domaćina. Rojenje je kompleksan proces koji zahteva integraciju hemijskih i fizičkih signala, pri kome nastaje fiziološka i morfološka diferencijacija bakterija. Genetski mehanizmi koji regulišu rojenje su komplikovani. Kod nekih vrsta za proces rojenja neophodan je surfaktant. Sinteza surfaktanta je pod kontrolom QS. Biosurfaktantni molekuli snižavaju površinski napon, što omogućava bakterijama da se kreću preko površine. QS kontoliše rojenje preko RhlR koji izaziva ekspresiju *rhlAB* gena. Sposobnost rojenja imaju sledeće bakterije: *P. aeruginosa*, *Proteus sp.*, *Serratia sp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi murium* i *S. dublin*³⁴³.

Na proces rojenja utiču heterogenost supstrata, površinski aktivne sile, karakteristike signalnih molekula, viskozitet, koncentracija bakterija i njihov efekat na hidrodinamiku filma. Kod velike koncentracije bakterija, može se pojaviti više vrsta pokreta bakterija. Iz inokulacione tačke bakterije migriraju koordinisano kao definisana grupa. QS reguliše većinu pokreta. *P. aeruginosa* produkuje ekstracelularne faktore koji moduliraju pokrete. Genetička ispitivanja su pokazala da modulacija pokreta zavisi od ramnolipida.

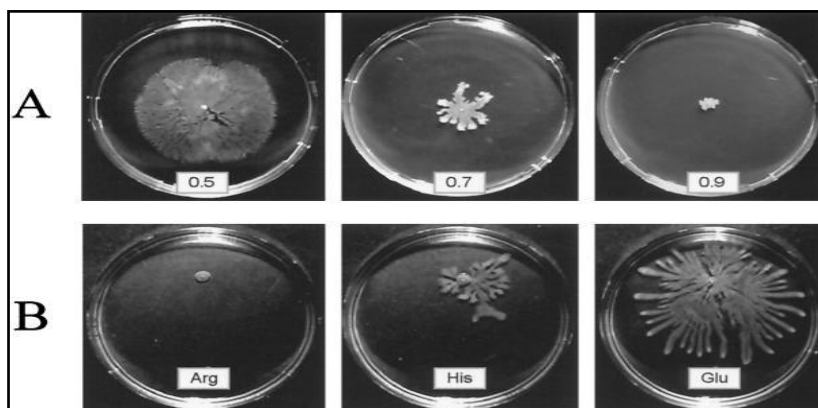
Polifosfat kinaza (PPK) koju kodira *ppk* gen je jedan od najosnovnijih enzima kod mnogih bakterija u sintezi organskih polifosfata iz ATP³⁶³. Nađen je kod Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija: *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi murium*, *S. dublin* i *Helicobacter pylori*. Ako dođe do inaktivacije *ppk* gena, dolazi do gubitka PPK aktivnosti i smanjenja količine polifosfata. Mutanta sa izmenjenim *ppk* genom *P. aeruginosa* P1 nema flagelarnu pokretljivost. Izmenjeni sojevi kod CF nemaju mogućnost formiranja obilnog i diferenciranog biofilma. Javlja se poremećaj funkcionisanja QS i produkcije ramnolipida i elastaze. Mutante imaju deficit pila tipa IV, pa imaju poremećaje trzajućih pokreta i rojenja. Kod kultura koje roje, bakterije sa polarnim monotrihama se diferenciraju u izdužene, polarne, multitrihe, udružene u multiselularne strukture koje upravljaju kretanjem preko površine čvrstih podloga. Pokazano je čak da su ćelije u roju rezistentnije na antibiotike. Prisustvo plazmida koji nosi *ppk* gen u potpunosti nadoknađuje defekt *ppk* gena.

Pošto je pokretljivost veoma značajna u opstanku bacila u prirodi i izazivanju inflamacija, zavisnost kretanja od *ppk* gena ukazuje na važan uticaj poli-fosfata u pocesima kao što su formiranje biofilma, simbioza i virulencija. Neorganski fosfat je linearni lanac od 10 ili više stotina fosfatnih ostataka spojenih za visoko energetske fosfoanhidridne veze. Poli-fosfati imaju različite i brojne biološke funkcije u zavisnosti od toga gde se nalaze i kad je to potrebno. Među tim funkcijama je supstitucija za ATP u reakcijama kinaze. Utiču na detoksikaciju dvovalentnih metala i služe kao rezervoar fosfata. Poli-fosfati su omotači bakterija, imaju regulatornu ulogu u rastu, razvoju i važni su kod stresnih stanja. Odusutvo PPK kod eukariota čini ovaj enzim eventualnim ciljnim mestom za dejstvo na *P. aeruginosa*³⁶³.

Rashids sa saradnicima je u svom ispitivanju sa divljim i *ppk* defektnim sojevima *P. aeruginosa* proveravo sposobnost plivajućih pokreta, rojenja i trzajućih pokreta. Rezultati su potvrdili pretpostavku da je *ppk* gen neophodan za pokretljivost i formiranje biofilma *P. aeruginosa*³⁶³.

Glutamat, aspartat, histidin ili prolin, kao izvori azota *P. aeruginosa*, indukuju rojenje⁶⁶ (Slika 42.). Arginin, asparagin i glutamin ne podstiču rojenje. Analiziran je uticaj tih amino kiselina, u različitim koncentracijama, na pokretljivost *P. aeruginosa*, na agaru različite koncentracije. Aspartati i glutamati u koncentraciji od 0,01% i 0,1%. su imali najpodsticajniji učinak na rojenje. Kada je amonijum hlorid korišćen kao izvor azota u

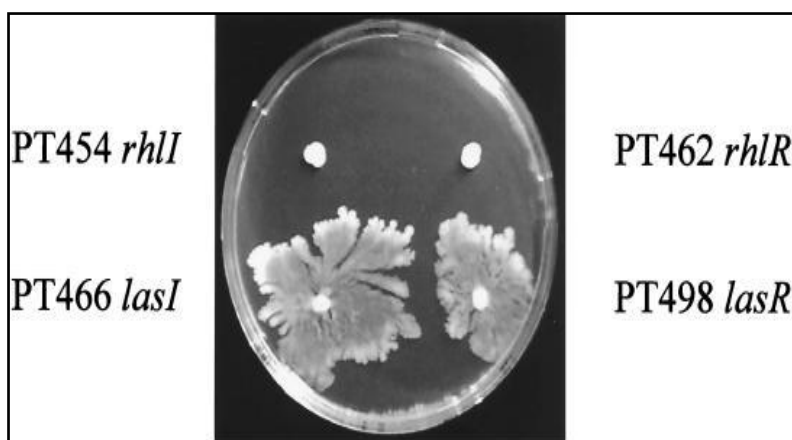
koncentraciji od ≥ 5 mM, rojenje nije uočeno. Pri koncentraciji od ≤ 1 mM posle produžene inkubacije uočeno je rojenje. Čelije sa ivice kolonija koje roje su dva puta duže od čelija iz centra⁶⁷.



Slika 42. Uticaj različitih amino kiselina kao izvora ugljenika i koncentracija agara na rojenje *P. aeruginosa* (Köhler, 2000.)

Proces rojenja zavisi i od izvora ugljenika. Dok je aspartat služio kao izvor ugljenika, glukoza je omogućavala optimalan rast. Glicerol nije bio dovoljan za proces rojenja, dok sukcinati nisu omogućavali rojenje. Kada su aspartati ili glutamati služili kao izvor ugljenika rojenje nije uočeno.

FliC mutanta *P. aeruginosa* pokazuje blago smanjenje rojenja, dok *pilR* i *pilA* mutante nemaju nikakvu mogućnost takvih pokreta. *las* mutante su imale blage promene u procesu rojenja. Bakterije sa defektom *rhl* sistema su kompletno nesposobne za proces rojenja (Slika 43.).



Slika 43. Rojenje *rhlI* i *lasI* mutanti *P. aeruginosa* (Köhler, 2000.)

Zbog značaja koju pokretljivost ima u patofiziologiji infekcija izazvanih *P. aeruginosa*, naučnici su pokušavali da je suprimiraju. Korišćeni su proanticianidini, tanini iz brusnice i drugih biljaka koje imaju tanine. Tanini kompletno blokiraju rojenje, ali ne blokiraju plivanje i trzajuće pokrete. Ekstrakt zelenog čaja blokira rojenje. Eksperimenti su pokazali da tanini nisu uticali na rast *P. aeruginosa*. Ako su u podloge stavljeni sufraktanti sposobnost rojenja se delimično obnavljala. Ovo sugerše da tanini delimično deluju sistemom, koji je povezan sa ramnolipidima. Agar postaje manje hidrofilan, ako je okružen tanin produkujućim bakterijama³⁴¹.

Svi naši izolati su imali sposobnost rojenja. Prosečna vrednost kolonija *P. aeruginosa* nakon inkubacije na 1% Lauril Bertoni bujonu je 39,98 mm. Izolati bolničkog porekla (prosečni prečnik kolonija je 41,92 mm) imali su veću sposobnost rojenja, nego izolati ambulantnog porekla (prosečna vrednost prečnika kolonija 38,05 mm). Izolati iz briseva rana su imali veću sposobnost rojenja (prosečni prečnik kolonija 42,99 mm) nego preostali izolati. Izolati bolničkog porekla (45,01 mm) imali su veću sposobnost rojenja nego ambulantnog (39,65 mm). Izolati iz urina su imali manju vrednost proseka kolonija u odnosu na ostale izolate (34,63 mm). Izolati bolničkog porekla su imali prosečni prečnik 22,91 mm. Izolati ambulantnog porekla su imali mnogo veću sposobnost rojenja (prosečni prečnik kolonije 48,7mm). Najveći prosečni prečnik kolonije imaju netipibilni izolati (42,89 mm). Sledeći po sposobnosti rojenja je serotip P6 (prosečni prečnik kolonije 42,75 mm), pa P11 40,55 mm i P1 36,08 mm.

Ogino sa saradnicima³⁶⁴ je ispitivao efekat makrolida (eritromicina i roksitromicina) na sposobnost rojenja i antistafilokoknu aktivnost kliničkih izolata *P. aeruginosa* i kontrolnog soja *P. aeruginosa* ATCC27854. Korišćena je agar diluciona metoda. Negativan uticaj nije uočen do koncentracije 12,5 µg/ml eritromicina i roksitromicina. Dokazano je da makrolidi deluju inhibitorno na faktore virulencije *P. aeruginosa*, kao što su produkcija proteaza, elastaze i pocijanina. Farmakološki inhibitorni efekat makrolida na *P. aeruginosa* nije do kraja razjašnjen, ali je predmet mnogih ispitivanja.

Tremblay⁶⁶ je ispitivao genetske karakteristike bakterijskih ćelija u centru i prstolikim nastavcima kolonija koje roje. Ćelije na vrhu prstolikih nastavaka su aktivnije, što je dokazano povišenom ekspresijom gena uključenih u respiratorni transport elektrona i produkciju ATP. Ekspresija gena vezanih za faktore patogenosti je snižena. Ćelije u centru

kolonije pokazuju intenzivan odgovor na oksidativni stres. One proizvode veće količine transkripta mnogih sekretornih faktora koji su udruženi sa virulencijom i vezivanjem gvožđa. Korišćenje gvožđa i hranljivih supstanci su centralni aspekt transkripcijskih analiza.

Fauvert³⁶⁵ je ispitivao i upoređivao tipove rojenja kod *P. aeruginosa* i *Rhizobium etl*. Uočena je povezanost produkcije biofilma od podloge. Nelinearno difuzioni model, kod koga rojenje liči na grananje, nastaje zbog senzitivnosti na lokalne neravnomernosti podloge. Ovaj pristup objašnjava model na podlozi, ali nije do kraja razjašnjena kinetika rasta. Paralelno kretanje se odvija širenjem viskozne kapi pod uticajem surfaktantnih sila, što vodi do formiranja sličnih šara. Ako se pođe od činjenice da su esencijalni molekuli u rojenju snažni surfaktanti, pretpostavlja se da postoji mogućnost kretanja pomoću uticaja površinske napetosti. Marangoni pokreti takođe mogu dovesti do formiranja prstolike šare. *P. aeruginosa* pokazuje prstoliki tip rojenja na polučvrstoj podlozi, dok se rojenje *Rhizobium etl* opisuje kao rojenje tipa latica cveta. Za *Rhizobium etl* formiranje roja i brzina širenja su povezani sa površinskim pritiskom, debljinom kolonije i viskozitetom.

6.9. OKSIDATIVNI STRES

Humane ćelije imaju više mehanizama kojima neutrališu toksično dejstvo kiseoničnih radikala u slučaju oksidativnog stresa (ROS). Povišenje nivoa kiseoničnih radikala dovodi do respiratornog oksidativnog stresa (ROS). Povišen nivo antioksidantnih enzima igra glavnu ulogu u zaštiti ćelija od oksidativnog stresa i održanju životnih funkcija ćelija i funkcionisanju pod stresom. Najvažniji enzimi koji ćelije luče u slučaju oksidativnog stresa su mangan superoksid dismutaze (MnSOD), bakar zink superoksid dismutaze (CuZnSOD) i katalaza. Na aktivnom mestu kod MnSOD je mangan i on se nalazi u mitohondrijama. Kod CuZnSOD mangan je zamenjen bakrom i cinkom i nalazi se u citozolu. Prisustvo CuZnSOD je detektovano i u peroksizomima i na mestima u ćeliji, gde je prisutna katalaza. Katalaze sisara vezuju 4 različita NADPH molekula pomažući održavanje enzimskog sistema³⁶⁶.

P. aeruginosa pri oksidativnom stresu deluje višestruko negativno na ćelije domaćina. Jedan od patogenih efekata kojima piocijanin deluje na humane ćelije je produkcija vodonik peroksida i superoksida, a istovremeno utiče na nivo antioksidativnih enzima. Piocijanin direktno oksidiše NADPH proizvodeći superoksid. Redoks ciklus piocijanina se odvija blizu

mitohondrija. Verovatno je da povišen nivo superoksid dismutaze prevenira oslobađanje superoksida iz mitohondrija i njegovu subsekventnu interakciju³⁶⁶.

ROS se dešava i kao posledica reakcija u redoks ciklusu piocijanina. Piocijanin se produkuje u provodnim putevima kod CF u količini od oko 100 $\mu\text{mol/L}$ ²¹¹. ROS koji izaziva piocijanin inhibira aktivnost katalaza, iscrpljuje rezerve glutaciona i povećava oksidaciju redukovanog glutaciona. Konstantna produkcija oksidativnih radikala i inhibicija antioksidantnih mehanizama prevazilaze antioksidativni kapacitet pluća i dolazi do oštećenja tkiva^{212,213}. Oštećenja pluća, tačnije provodnih puteva koja *P. aeruginosa* izaziva kod CF, nastaju zbog disbalansa između oksidantnih i antioksidantnih reakcija i između proteazne i antiproteazne aktivnosti. U zdravim provodnim putevima antioksidantni kapacitet prevazilazi oksidantni³⁶⁷. Antioksidantno dejstvo imaju enzimi, vitamini, helatori metala i tioli. Kod infekcija izazvanih *P. aeruginosa* postoji masivan inflamatorni odgovor posredovan PML koji stimulišu i domaćin i bakterija. Promene imunskog sistema izazivaju povišenje nivoa citotoksičnih reaktivnih derivata kiseonika koje produkuju leukociti.

O'Malley³⁶⁶ je u ispitivanjima oštećenja, koja piocijanin nanosi humanim alveolarnim ćelijama i bronhijalnim epitelnim ćelijama tipa A549 oksidativnim stresom, analizirao uticaj različitih koncentracija piocijanina na nivo CuZnSOD i katalaze. Negativnu kontrolu činile su ćelije koje su tretirane destilovanom vodom. Ćelije su izlagane dejstvu različitih koncentracija piocijanina u trajanju od 2 časa, 6 časa, 12 časa i 24 časa. Posle 24 časa piocijanin smanjuje ćelijsku katalaznu aktivnost, ekspresiju katalaza, ali ne superoksid dismutazu. U koncentraciji od $\geq 2,5 \mu\text{M}$ piocijanin je smanjio katalaznu aktivnost u odnosu na negativnu kontrolu ($P < 0,05$, $P < 0,001$). Ako je ćelijska linija tretirana piocijaninom u koncentraciji od 50 μM u trajanju od 2 časa, 6 časa, 12 časa i 24 časa, smanjivana je aktivnost katalaza samo za 24 časa. Kad su umesto ćelijske linije A549 u eksperimentu korišćene normalne humane bronhijalne epitelne ćelije (NHBE), takođe je dolazilo do sniženja aktivnosti katalaze u poređenju sa negativnom kontrolom. Ako su NHBE izlagane ekspoziciji 50 μM piocijanina iznad 12 časova, smanjivao se nivo katalaza. Smanjenje se javlja 2 časa od ekspozicije ćelija piocijaninom. U daljem ispitivanju A549 ćelijskoj liniji su dodavani MnSOD i CuZnSOD. Dodavanje MnSOD prevenira gubitak A549 katalaznog enzima, ali ne katalazne aktivnosti. Primena piocijanina u koncentraciji od 100 μM nema efekat na katalaznu aktivnost u hiperekspresiji A549 ćelija. Zaključak je da izlaganje piocijaninu dovodi do smanjenja katalazne aktivnosti.

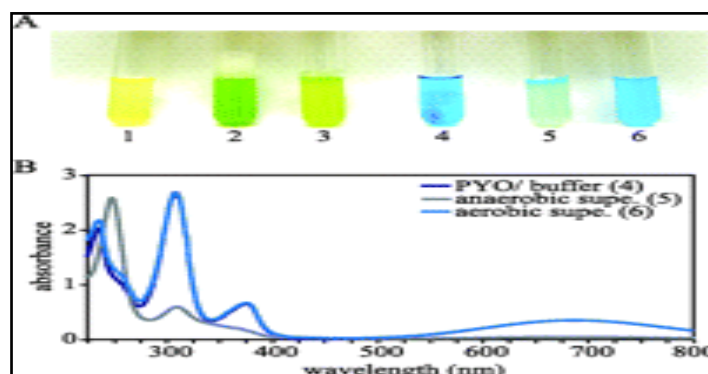
Provodne ćelije pluća, kod CF, su stalno izložene dejstvu piocijanina. Kod infekcije izazavane *P. aeruginosa* čak i odloženo izlaganje, posle inicijalne ekspozicije piocijaninu, je važno. Koncentracija katalaze je često regulisana na transkripcionom nivou. Northern blot analizom je dokazano da izlaganje piocijaninu dovodi do smanjenja nivoa mRNK katalaze. Tretiranje A549 ćelijske linije MnSOD, ali ne CuZnSOD, inhibira mogućnost piocijanina da smanji nivo ćelijske ekspresije katalaze. Povišena ekspresija MnSOD prevenira promene transkripcionih faktora koji regulišu ekspresiju ćelijske katalaze izazvano piocijaninom.

Regulacija gena humane katalaze nije do kraja razjašnjena. Piocijanin ima mogućnost da inhibira katalaznu aktivnost nezavisno od efekta na ekspresiju proteina katalaze. Povišena ekspresija MnSOD prevenira gubitak katalaznog proteina kod ćelija tipa A549 koje su izložene piocijaninu. Dokazano je da inkubacija pročišćene katalaze goveda sa piocijaninom vodi do značajnog smanjenja aktivnosti tog enzima. Ovakva promena nije uočena pri korišćenju katalaze *Aspergillus niger*, koja ne vezuje NADPH. S obzirom na činjenicu da je piocijanin sposoban da prihvati elektrone direktno od NADPH, smatra se da piocijanin inhibira katalaznu aktivnost delom kroz potrošnju katalaze udružene NADPH, što ima za posledicu produkciju superoksida i/ili H_2O_2 . Citotoksični efekat piocijanina se vezuje za njegovu sposobnost da indukuje formiranje ROS u ciljnim ćelijama.

Whelan sa saradnicima³⁶⁸ je ispitivao fiziološke posledice redukcije piocijanina, testiranjem intracelularne koncentracije NADH i NAD^+ kod divljih tipova i mutanti defektnih pri produkciji fenazina. Mutantni sojevi više akumuliraju NADH u stacionarnoj fazi nego divlji tipovi. Ova povišena akumulacija korelira sa smanjenom koncentracijom kiseonika. Dodavanje piocijanina fenazinskoj nultoj mutanti snižava nivo NADH ukazujući, da redukcija piocijanina ubrzava uspostavljanje balansa u odsustvu drugog akceptora elektrona.

Kultura *P. aeruginosa* PA14 u Lauril-Bertoni bujonu u stacionarnoj fazi menja plavo-zelenu boju zbog produkcije piocijanina, naročito za vreme faze rasta. *P. aeruginosa* katalizira redukciju piocijanina (Slika 44.). Proces se lako uočava, kad se kultura iz stacionarne faze nađe u uslovima niske koncentracije kiseonika. Piocijanin se menja iz plave forme (oksigenisana) u bezbojnu (redukovanu). Na mestu gde se sreću vazduh i bujon, piocijanin ostaje oksidisan ili postaje reoksidisan reakcijom sa kiseonikom. Respiracija bakterije formira bezbojan sloj nekoliko mm ispod mesta spajanja, zbog pada količine kiseonika. Ako se centrifugira kultura u stacionarnoj fazi, pa se ostavi u sobnoj temperature 5 min, posle mešanja na vorteksu unutrašnjost bujona povraća početnu plavu boju. Ako se

izmeri spektar apsorcije supernatanta iz ove suspenzije u uslovima kada je količina kiseonika stabilna, pa se kultura prebaci u anaerobne uslove i izmeri spektar apsorcije supernatanta, uzorak pokazuje smanjenje apsorcije, ukazujući da je piocijanin redukovan³⁶⁸.



Slika 44. Produkcija piocijanina *P. aeruginosa* P14 u stacionarnoj fazi u različitim uslovima i na različitoj temperaturi supernatanta (Whelan, 2007.)

Nivo redukcije piocijanina je viši u stacionarnoj fazi. Ispitivane su kulture *P. aeruginosa* u različitim fazama razvoja da bi se kvantifikovao nivo redukcije piocijanina. Uočen je pad apsorbance piocijanina u oksidisanom stanju i povišenje redukcije piocijanina, posle pojave piocijanina u stacionarnoj fazi. Kod divljih sojeva *P. aeruginosa* P14 pojava piocijanina korelira sa ulaskom u stacionarnu fazu, sa platoon u kasnoj stacionarnoj fazi, dostižući koncentracije od ~100 do 300 μM , zavisno od uslova rasta³⁶⁸.

Nivo intracelularnog nivoa NADH/NAD^+ zavisi od dostupnosti donora i akceptora elektrona. Nitrati smanjuju nivo NADH/NAD^+ što govori da je nivo kiseonika bio limitiran za vreme stacionarne faze. Ako se divljem tipu doda 50 mM glukoze i ispituje koncentracija piocijanina pri dodatku NAD(H) , dolazi do povećanja nivoa NADH/NAD^+ pri ulasku u stacionarnu fazu. Ovo potvrđuje da piocijanin može da funkcioniše kao alternativni oksidant, kada je količina terminalnih akceptora elektrona ograničena. *P. aeruginosa* PA14 produkuje, a u kasnoj stacionarnoj fazi koristi, piruvate. Za fermentativne organizme, kao što su *E. coli* i *Propionibacterium freudenreichii*, dodatak sintetičke redoks komponente, fericianida, povišava razmenu kroz centralni metabolički put^{369,370}. Fericianid funkcioniše kao prenosilac elektrona, od glavnih skladišta reduktanata u ćeliji, do mesta gde se smanjuje potreba za formiranjem redukovanih produkata³⁷¹. Ekskrecija piruvata je uočena u kulturama drugih bakterija, *Aerobacter aerogenes* i *Photobacterium fischeri*³⁷². Mehanizam regulacije nije do kraja razjašnjen.

P. aeruginosa fermentuje sukcinat u uslovima nedostatka energetskih supstanci. Transformiše ih u laktate, acetate i/ili sukcinat. Produkcija laktata ili piruvata zahteva NADH. Transformacija piruvata u acetate zahteva acetyl-CoA NAD⁺. Nivo NADH/NAD⁺ kod divljeg tipa favorizuje produkciju acetata. Kod mutanti, koje ne mogu da produkuju fenazine, favorizuje se produkcija laktata i sukcinata. Kod divljeg soja, u kasnijoj stacionarnoj fazi (oko 30h posle inokulacije), posle porasta u podlozi sa 50 mM glukoze, koncentracija piruvata je bila 6mM, ali nije detektovana u defektnih mutanti. Dodavanje piruvata mutantama pri ulasku u stacionarnu fazu izaziva kod njih pojavu fenotipova koji ekskretuju piruvat, ali produkuju samo oko polovine količine koju produkuju divlji serotipovi. Citrati, laktati i acetati su detektovani kod divljih i mutantnih sojeva. Tokom inkubacije od 42h, svaka 4h je određivan nivo piruvata da bi se detaljnije odredilo vreme produkcije piruvata.

Piruvat je bio detektovan 22h do 26h posle inokulacije, sa povećanjem do ~5 mM do 38h. Posle 42h količina piruvata se smanjivala kod divljeg i mutantnog soja do koncentracije ~0.05 mM. Fermentacija piruvata olakšava opstanak *P. aeruginosa* P14 u uslovima kada nema dovoljno energetskih izvora. Predpostavljalo se da je piruvat kompletno oksidisan korišćenjem malih količina kiseonika koji je bio dostupan ćelijama³⁷⁶.

U ovom ispitivanju došlo se do podataka da se reduktivne aktivnosti povećavaju u stacionarnoj fazi rasta. Ali, ne može se reći da do toga dolazi samo zbog povišenja koncentracije donora elektrona. Pilocin indukuje ekspresiju gena koji kodiraju efluks pumpe za više antibiotika i oksidoreduktaza, koje mogu biti uključene u redoks sistem³⁷³.

Redukcija pilocina NADH je termodinamički favorizovana reakcija. Postoji inverzan odnos između intracelularnog nivoa NADH i produkcije pilocina.

Razumevanje mehanizma oksigenacije piruvata kod pseudomonada omogućava razumevanje potencijalnog mehanizma kojim ova reakcija može biti inhibirana. Konverzija piruvata u koenzim A je katalizirana piruvat dehidrogenazom, velikim multienzimskim kompleksom, koji je prisutan za vreme aerobne kultivacije kod bakterija i eukariota³⁷⁴. Bez obzira što ekskrecija piruvata divljeg soja *P. aeruginosa* rezultira toksičnom reakcijom, ona može biti korisna u uslovima produkcije pilocina. Ekskrecija piruvata, koja preostaje, može potencijalno koristiti u uslovima ekstremnih energetskih nedostataka. Ovakva reakcija je malo verovatna u zemlji, ali je važna kod obolelih od CF. Oboleli sa hroničnom infekcijom obično imaju kolonizaciju sa koncentracijom oko 10⁷ CFU/g u sputumu³⁷⁵. Mogućnost da se

sačuvaju resursi akceptora elektrona i zalihe supstrata ili njegov transfer u energetska siromašna područja je povezana sa opstankom populacije *P. aeruginosa*³⁷⁶.

Prosečna vrednost inhibicije porasta *P. aeruginosa* oko diska filter papira sa 30% H₂O₂, nakon inkubacije od 24h na moždano srčano infuzionom agaru je 2,4 mm. Kolonije 56% izolata rastle su uz sami disk filter papira, bez ikakve zone inhibicije. Ti izolati su imali apsolutnu rezistenciju na toksično dejstvo H₂O₂. Prosečna zona inhibicije oko diska je šira kod izolata bolničkih izolata (3,88 mm.) u odnosu na ambulantne izolate (0,92 mm), što ukazuje na veću osetljivost na toksično dejstvo ROS.

Prosečna inhibicija porasta izolata iz briseva rana ukazuje da su oni otporniji na toksično dejstvo ROS (0,59 mm) u odnosu na ostale izolate. Izolati iz rana bolničkog porekla (0,37 mm) su otporniji na toksično dejstvo kiseoničnih radikala. Izolati iz urina su osetljiviji na dejstvo ROS (2,59mm). Pri tome su izolati bolničkog porekla osetljiviji na ROS (0,26mm).

Najotporniji na dejstvo kiseoničnih radikala su izolati koji su bili serotip P11. Oni su imali prosečnu zonu inhibicije porasta oko diska filter papira 1,63 mm, pa serotip P1 (2,84mm) i izolati serotipa P6 3,181 mm. Netipibilni izolati su imali prosečnu zonu inhibicije porasta 1,65 mm.

6.10.REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE

Rezistencija *P. aeruginosa* iz prirodnih sredina na antibiotike nije se drastično promenila poslednjih godina. Međutim, rezistencija sojeva iz bolesničkih materijala je mnogo viša. Ovo naročito važi za nerazvijene zemlje i zemlje u razvoju Južne Amerike, Afrike, Azije i područja Jugoistočne Evrope i Istočne Evrope. Brojni su činioci koji podstiču selekciju rezistentnih sojeva *P. aeruginosa*. Produžena primena antibiotika koji su dostupni bez obzira što njihova primena nije medicinska opravdana, smeštaj teških bolesnika u relativno malom prostoru, smanjenje broja medicinskih sestara i pomoćnog osoblja, nedostatak sredstava za odžavanje higijene i dezinficijensa i povećan broj bolesnika koji zahtevaju produženu hospitalizaciju, doprinose razvoju rezistencije.

Bogatije sredine opet, imaju svoje probleme i razloge za nastanak rezistencije. U USA se godišnje registruje preko 2 milona bolničkih infekcija, a 50-60% je izazvano bakterijama

rezistentnim na antibiotike^{377,378}. U bolnicama se oko 50% antibiotika propiše bez adekvatnih indikacija³⁷⁹.

Kod *P. aeruginosa* se retko sreće samo jedan mehanizam nastanka rezistencije na antibiotike. Najčešće se radi o produkciji cefalosporinaze AmpC, indukovanoj efuksa antibiotika i gubitka OprD³⁷⁵. Produkcija β -laktamaza je jedan od najčešćih mehanizama rezistencije kod Gram-negativnih bakterija.

U našem ispitivanju 2 izolata bolničkog porekla i 12 ambulantnog su bila osetljiva na sve testirane antibiotike. Iz grupe bolničkih izolata još 4, a iz grupe ambulantnih 6 je bilo osetljivo na sve antibiotike osim cefepima. Dva izolata iz ambulantno uzorkovanih materijala su bila rezistentna na sve testirane antibiotike, osim na kolistin i aztreonam. To su izolati koji su produkovali MBL.

Svi naši izolati hospitalnog i ambulantnog porekla su bili osetljivi na kolistin i aztreonam. Iako je kolistin antibiotik star oko 50 godina, sve opsežnija istraživanja farmakokinetike i farmakodinamike omogućila su optimalno korišćenje ovog antibiotika. Maksimalno je pojačana antibakterijska aktivnosti, a smanjena toksičnost i mogućnošću razvoja rezistencije. Disk difuziona metoda u agaru nije metoda izbora izrade antibiograma, jer su polipeptidi veliki molekuli koji slabo difunduju u agar i daju malu zonu inhibicije. Posledica je slaba diferencijacija osetljivih i rezistentnih sojeva. Za laboratorijsko testiranje kolistina se ne koristi kolistin metanesulfonat-kolistimetat koji se primenjuje intravenski nego kolistin sulfat. Kolistimetat se u toku inkubacije hidrolizira u niz intermedijarnih jedinjenja, pri čemu se karakteristike suspenzije s antibiotikom menjaju, što može da utiče na konačni rezultat. U svakom slučaju postoji preporuka da se za izolate sa zonom inhibicije od 12 mm - 13 mm odredi MIK E-testom ili dilucija u bujonu. Postoje i preporuke da se uvek pri korišćenju kolistina i polimiksina B odredi MIK³⁸⁰. Mada retko, postoje izveštaji i o rezistenciji na polimiksin B³⁸¹.

Ispitivanja osetljivosti na aztreonam potvrđuju teorijsku preporuku da se ovaj antibiotik koristi kao lek izbora kod infekcija najrezistentnijim izolatima koji produkuju MBL. Ovaj antibiotik nije korišćen u ovoj sredini i to je sigurno doprinelo apsolutnoj osetljivosti na ovaj antibiotik. Ovi rezultati su međutim drugačiji od rezultata ispitivanja koje je sprovedeno u zemljama u okruženju, gde je osetljivost na aztreonam niža¹⁹⁶.

Osetljivost naših izolata na piperacilin-tazobaktam je bila visoka, viša kod izolata bolničkog porekla (84%) nego kod izolata ambulantnog porekla (74%). Samo jedan izolat je bio rezistentan na imipenem-tazobaktam, a osetljiv na druge antibiotike.

Rezultati našeg ispitivanja ukazuju na karbapeneme kao važne antibiotike koji se mogu koristiti u terapiji infekcija izazvanim *P. aeruginosa*. Izolati hospitalnog porekla bili su 92% osetljivi na meropenem, a ambulantnog 88%. Na imipenem su izolati ambulantnog i bolničkog porekla bili su osetljivi 86%.

Karbapenemi *in vitro* imaju najstabilniju aktivnost prema mikroorganizama koji produkuju ESBL, pa se smatraju antibioticima izbora za ozbiljne infekcije izazvane mikroorganizmima koji produkuju ESBL. Karbapenemi uključujući imipenem, meropenem, doripenem i ertapenem su lekovi prvog izbora za ozbiljnije infekcije uzrokovane ESBL produkujućim enterobakterijama. Ovi lekovi su vrlo stabilni na hidrolizu ESBL, postižu dobre koncentracije u telesnim tkivima i ne pokazuju „učinak inokuluma”³⁸². Potencijalno negativni aspekti lečenja su visoka cena terapije, parenteralna primena i potencijalna selekcija rezistentnih sojeva. Postoje kontradiktorna mišljenja o tome da li je kombinacija karbapenema i antibiotika drugih grupa svrsishodnija od korištenja samo karbapenema. Studije ukazuju da sam gubitak proteina spoljne membrane nije dovoljan za rezistenciju na karbapeneme. Za rezistenciju na imipenem potreban je dodatni mehanizam, obično smanjena propustljivost spoljne membrane²²⁹. Imipenem rezistentni izolati četiri puta su češće rezistentni i na ceftazidim i dva puta češće rezistentni na piperacilin-tazobaktam³⁸³.

Naši izolati su pokazali dosta visok stepen osetljivosti na ceftazidim, 76% izolata hospitalnog porekla, a 80% ambulantnog porekla, iako se dosta koristi u terapiji. Suprotno očekivanjima, bila je viša osetljivost izolata hospitalnog porekla u odnosu na ambulantne, iako razlika nije statistički značajna. Visoka osetljivost na ceftazidim se objašnjava činjenicom, da osim MBL i delimično deprimiranoj AmpC β -laktamazi, ostalim β -laktamazama, cefalosporini III generacije i karbapenemi nisu zajednički supstrat³⁸⁴. Izuzetak je membranska MexAB-OprM pumpa, koja u stanju hiperaktivacije, može izbaciti iz ćelije sve β -laktame, uključujući meropenem³⁸⁵.

Cefepim, iako pripada četvrtoj generaciji cefalosporina, slabije deluje *in vitro* na *P. aeruginosa* od ceftazidima. Rezistencija izolata hospitalnog porekla je (86%) je viša od rezistencije izolata ambulantnog porekla (58%). Cefepim je supstrat MexXY-OprM efluksnog sistema, dok ceftazidim nije, što može biti razlog slabijeg efekta u odnosu na

ceftazidim, naročito ako se ovakvi sojevi klonski prošire. Podaci kažu da je sveukupni mortalitet, koji se pripisuje terapiji cefepimom u odnosu na ostale β -laktame nešto viši (odnos rizika-1,26)³⁸⁶.

Akhabue³⁸⁷ je u svojoj studiji dobio rezultate koji su pokazali višu osetljivost na cefepim. Studija je uključila 2529 hospitalizovanih bolesnika, a 213 (8,4%) bolesnika je imalo infekciju izazvanu *P. aeruginosa* koji je bio rezistentan na cefepim. Faktor rizika za infekciju je bila predhodna upotreba cefalosporina širokog spektra ($p < 0,001$), penicilina širokog spektra ($p < 0,005$) i hinolonskih preparata ($p < 0,001$). Smrtnost je bila veća kod onih bolesnika koji su bili inficirani *P. aeruginosa* rezistentnim na cefepim, nego kod onih koji su bili inficirani sojem koji je bio osetljiv za nivo $p = 0,007$.

U našem ispitivanju najefikasniji aminoglikozid je bio amikacin, 64% izolata hospitalnog porekla i 70% ambulantnog je bilo osetljivo na taj antibiotik. Zbog efekta na multirezistentne izolate, naglašava se uloga amikacina u empirijskoj terapiji imipenem rezistentnih izolata *P. aeruginosa*. Amikacin se često daje i u kombinovanoj terapiji infekcija uzrokovanih *P. aeruginosa*. Podaci govore uglavnom u prilog sinergizma amikacina, kao i pozitivnog efekta kombinovane terapije *in vivo*, bez obzira na umerenu osetljivost na β -laktame *in vitro*³⁸⁸. Gentamicin je međutim bio efikasniji u suzbijanju infekcija hospitalnog porekla (52% izolata je bilo rezistentno) nego ambulantnog porekla.

Postoji više mehanizama nastanka rezistencije na aminoglikozide. Nemogućnost postizanja dovoljne koncentracije aminoglikozida u citoplazmi može biti posledica nedovoljnog prodora aminoglikozida u bakterijsku ćeliju, što je opisano najčešće kod izolata bolesnika s CF, ali i pojačanog efluksa kao posledica hiperekspresije MexXY proteina i OprM. Rezistencija na aminoglikozide ipak je najčešće posledica delovanja inaktivirajućih enzima koji se dele u tri grupe: aminoglikozid fosforiltransferaze (APH), adeniltransferaze (AAD ili ANT) i acetiltransferaze (AAC). Najčešće se opisuju AAC(6')-II (rezistencija na gentamicin, netilmicin, tobramicin, osetljivost na amikacin), AAC(3)-I (rezistencija samo na gentamicin), AAC(6')-I (rezistencija na tobramicin, netilmicin, amikacin, osetljivost na gentamicin) i ANT(2')-I (rezistencija na gentamicin i tobramicin, osetljivost na amikacin i netilmicin). U novije vrijeme opisana je i rezistencija posredovana metilazama 16S rRNK. U tom slučaju obično postoji rezistencija na sve aminoglikozide³⁸⁹.

Oko polovine naših izolata 47%, 42% izolata bolničkog porekla i 52% ambulantnog je bilo osetljivo na sve aminoglikozide. 26% izolata je bilo rezistentno na sve

aminoglikozide, 9% je osetljivo samo na amikacin, a ne na druge aminoglikozide. Najveći broj rezistentnih izolata je bio rezistentan na sve aminoglikozide, a pretpostavlja se da ti izolati produkuju metilaze 16S rRNK. Manji broj produkuje AAC(6')-II, (16%), 8% AAC(3)-I, AAC(6')-I i ANT(2'')-I 2%.

Što se tiče rezistencije na fluorohinolone naši izolati bolničkog porekla su bili podjednako osetljivi na ciprofloksacin i ofloksacin (56%). Izolati iz materijala ambulantnog porekla su bili osetljiviji na ciprofloksacin (64%) nego na ofloksacin (60%). 38% izolata je bio rezistentno na oba preparata.

Aktivni efluks igra važnu ulogu u rezistenciji *P. aeruginosa* na fluorohinolone koji su supstrat svim opisanim efluks sistemima. S druge strane, modifikacija ciljnog enzima, bilo primarnog cilja (giraze ili topoizomerase II) ili sekundarnog (topoizomeraza IV) može mutacijom gena za ove enzime promeniti aminokiselinski sastav ciljnog enzima i smanjiti afinitet prema fluorohinolonu. Noviji hinoloni vrlo često selekcionišu mutante *nfxB* s pojačanom ekspresijom *mexCD-oprJ* operona i tripartitne pumpe koja izbacuje cefeme proširenog spektra (cefepim, cefpirom) i fluorohinolone¹⁹⁶.

Ciprofloksacin je dobar antipseudomonasni lek koji se može uzimati i oralno. Može se koristiti po modelu monoterapije. Mogućnost nastanka rezistencije je međutim u tom slučaju veća. Iako ima podataka o uspešnoj primeni ciprofloksacina u monoterapiji multiplerezistentnih izolata *P. aeruginosa*, većina studija je potvrdila efikasnost kombinacije ciprofloksacina i β -laktamskih antibiotika, ako je izolat bio osetljiv na β -laktamske antibiotike³⁹⁰.

Vršena je prospektivna studija o dejstvu ciprofloksacina na *P. aeruginosa* kod 20 bolesnika sa osteomijelitisom³⁹¹. Terapija osteomijelitisa je obično duža, pa omogućava razvoj rezistencije na korišćene antibiotike. Bolesnici su uzimali 750 mg ciprofloksacina oralno dva puta dnevno do četiri meseca, a praćeni su trinaest meseci. Prosečno su uzimali terapiju 2,87 meseci. Kod 19 bolesnika bolest je izlečena i 27 meseci posle terapije nije došlo do egzacerbacije. Bolesnici koji su izlečeni su imali akutni oblik bolesti, a jedino kod bolesnika sa hroničnim oblikom bolesti nije došlo do izlečenja. *P. aeruginosa* je izolovan kod svih bolesnika iz uzoraka kostiju i tri kod kojih je bacil bio prisutan u uzorcima kostiju i krvi.

U ispitivanju koje je sprovedla Sardelić¹⁹⁶ 26,8% izolata je osetljivo na hinolonske preparate i karbapenem, a u studiji Higgins i saradnika 31,4%³⁹². Rezistencija na

fluorohinolone i meropenem može biti posledica pojačanog rada efluksnih pumpi MexAB-OprM, MexCD-OprJ i MexXY-OprN.

Multirezistentni sojevi su oni koji su rezistentni na više od tri grupe antibiotika. Učestalost multirezistentnih izolata *P. aeruginosa* je različita u pojedinim regionima. Rezultati ispitivanja SENTRY studije ukazuju na učestalost³⁹³ multirezistentnih izolata u Europi od 4,7%, Latinskoj Americi 8,2%, SAD-u 1,2%³⁹³. U Grčkoj učestalost multirezistentnih izolata je još viša (24,3%), u Francuskoj (24%)³⁹⁴ i Italiji (17%)³⁹⁵. U Kini je 24% izolata multirezistentno³⁹⁶.

Ako kod naših izolata iz materijala bolničkog i ambulantnog porekla, uporedimo statističke parametre odnosa rezistencije na antibiotike nije uočena statistički značajna rezistencija kod izolata hospitalnog porekla. Neki izolati ambulantnog porekla su čak i rezistentniji na pojedine antibiotike.

Postoje podaci da terapija *P. aeruginosa* makrolidima, koji primarno nemaju antipseudomonasni efekat, ima pozitivan efekat. Mogu se koristiti u koncentraciji koja je pedeseti deo MIK. Predpostavlja se da suprimiraju sintezu elastaza, fosfolipaze i egzotoksina, pa se posredno smanjuje inflamacija pluća⁷⁴. U ispitivanju koje je sproveo Wozniak došlo se do podatka da korišćenje klaritromicina u količini subMIK inhibiše trzajuće pokrete⁵⁵. Inkubacija *P. aeruginosa* sa klaritromicinom menja strukturu i arhitekturu biofilma. Ispitivanja pokazuju, da korišćenje klaritromicina dovodi do efikasnije terapije plućnih infekcija kod bolesnika sa CF i difuznim panbronhitisom. Wozniak sa saradnicima je inkubirao *P. aeruginosa* u različitim vremenskim intervalima u prisustvu ili odsustvu sub-MIK količina klaritromicina. Zatim je kvantifikovan formirani biofilm. U tim koncentracijama klaritromicin je inhibisao formiranje biofilma. Ako se *P. aeruginosa* inkubira 24h u prisustvu ili odsustvu klaritromicina otkriveno je da 0,06 MIK vrednosti menja strukturu u kasnijim fazama. Bakterijske ćelije su izdužene i imaju redukovanu količinu matriksne materije koja okružuje biofilm. U ispitivanjima, koja su obuhvatala dejstvo ciprofloksacina na formiranje biofilma u prisustvu ili odsustvu klaritromicina, dokazano je bolje dejstvo ciprofloksacina na *P. aeruginosa* u prisustvu klaritromicina³⁹⁷.

U rutinskom laboratorijskom radu najčešće se uočava nekoliko fenotipova rezistencije na β -laktame, od koji su samo neki posredovani enzima. Prvi podrazumeva rezistenciju na većinu β -laktama (4–8 puta veći MIK) uz osetljivost na imipenem. Ovaj tip rezistencije najčešće uključuje i rezistenciju na fluorohinolone i posledica je slabe permeabilnosti i

pojačane ekspresije efluksnog sistema. Lako se detekuje porastom MIK-a na karbencilin i naziva se "intrinzička rezistencija na karbencilin". Drugi tip je rezistencija na većinu β -laktama izuzev cefepima i karbapenema. Ovaj tip rezistencije je najčešće posledica derepresije AmpC β -laktamaze. Treći tip je rezistencija na peniciline, odnosno piperacilin ili tikarcilin, dok cefalosporini i karbapenemi nisu obuhvaćeni. Obično se radi o OXA-enzimima (ali ne ESBL varijantama). Četvrti tip je izolovana rezistencija na karbapeneme. Obično je posledica smanjenog prisustva oprD porina. Ostali fenotipovi rezistencije posledica su najčešće delovanja stečenih ili sekundarnih β -laktamaza, poput onih proširenog spektra iz različitih molekularnih klasa³⁸⁸.

U ispitivanju koje je sproveo Knežević⁷⁴, a koje je obuhvatilo 33 izolata proveravana je osetljivost na ceftriakson, amikacin, gentamicin, ceftazidim, norfloksacin i piperacilin sa tazobaktamom. Ispitivani izolati su bili najosetljiviji na amikacin (9,4% rezistentnih) i imipenem, na koji su samo tri izolata pokazala umerenu osetljivost. Najniža je bila osetljivost na ceftriakson (56%), gentamicin (50%) i ciprofloksacin (40%). Nešto je bila niža rezistencija na piperacilin-tazobaktam (75%), ceftazidim (88,1%) i norfloksacin (87,5%)⁹¹.

Prema podacima Odbora za praćenje rezistencije na antibiotike pri Akademiji medicinskih znanosti Hrvatske, rezistencija za *P. aeruginosa*, od 1997. godine do danas, najviše je smanjena na gentamicin. Tokom 2008. godine 30% izolata je bilo otporno na ovaj antibiotik. Gotovo da je prati rezistencija na netilmicin koja je 2008. godine iznosila 26%, dok je iste godine samo 13% *P. aeruginosa* bilo rezistentno na amikacin. Poslednjih godina nije se značajno promenio procenat izolata rezistentnih na ciprofloksacin, a 2008. godine iznosio je 24%. Od ukupnog broja izolata 2008. godine 8% bilo je rezistentno na ceftazidim, a 10 % na piperacilin- tazobaktam. Rezistencija na karbapeneme (imipenem i meropenem) takođe se nije značajno promenila poslednjih 5 godina, kreće od 9–11 %, iako je u nekim kliničkim bolničkim centrima viša (npr. 2008. godine Rijeka i Zagreb 17 %, Split 12 %) ³⁹⁸. U ispitivanju rezistencije *P. aeruginosa* na antibiotike dilucionom i difuzionom metodom, sprovedenom u Splitu, koje je obuhvatilo 169 izolata rezistentna na imipenem, najefikasniji antibiotici su bili kolistin (95,7%), amikacin (62,1%) i aztreonam (57,4%). 46% izolata je bilo osetljivo na ceftazidim i cefepim.

Jamasbi sa saradnicima³⁹⁹ je vršio serotipizaciju 167 izolata *P. aeruginosa*, dobijenih iz Ohajo bolnice, zajedno sa ispitivanjem osetljivosti i genetskim ispitivanjima PSR. Serotipizacija je vršena slide aglutinacionom tehnikom. Od 167 sojeva 25 nije bilo tipibilno.

Serotip P11 je bio najzastupljeniji, dok serotipovi P8, P12, P13 i P17 nisu detektovani. Pedeset pet sojeva je bilo rezistentno na aztreonam, 35 na ciprofloksacin, 33 na gentamicin, 20 na tobramicin, 18 na ceftazidim, 14 na piperacilin, a 5 na amikacin. Multirezistentni sojevi su uočeni među P15, P4, P2 i P11 serotipovima.

U ispitivanju Allydice-Francis³²⁷, koje je obuhvatilo izolate sa povrća, ispitivana je osetljivost na ampicilin, aztreonam, ceftazidim, hloramfenikol, ciprofloksacin, gentamicin, imipenem, sulfametoksazol-trimetoprim i tetraciklin. Izolati su bili najosetljiviji na imipenem (100%), gentamicin (97%), ciprofloksacin (93%) i ceftazidim (79%). Svi izolati su bili rezistentni na ampicilin, a 84% i 83% je bilo rezistentno na hloramfenikol i sulfametoksazol-trimetoprim. Smanjena osetljivost je uočena i kod aztreonama (41%). Od 20 do 35% izolata iz različitih regiona je bilo multirezistentno na antibiotike.

Najnoviji podaci ispitivanja iz 2015. godine iz Pakisana⁴⁰⁰, koja su se bavila multirezistentnim izolatima, su potvrdili nažalost da je procenat multirezistentnih sve viši. Ispitivana su 204 izolata, od čega je 17,2% kultivisano iz uzoraka dece. Najveća rezistencija je uočena na ofloksacin 61,3%, pa cefepim 57,3%, ceftazidim 53,9% i amikacin 53%.

P. aeruginosa se često izoluje iz materijala koji primarno nisu sterilni: briseva ždrele, sputuma i kože, a da ne izaziva nikakvu inflamaciju i tada antibiotska terapija nije potrebna. Kada se izoluje iz uzoraka koji su primarno sterilni, potrebno je mnogo kritičnije ispitati njegovu izolaciju.

Kod ozbiljnih infekcija izazvanih *P. aeruginos*, adekvatan izbor antibiotika koji će se primeniti u terapiji je od velike važnosti. Nivo mortaliteta je značajno viši kod neadekvatne terapije. Empirijski izbor antibiotika koji će se koristiti u terapiji se komplikuje povećanim nivom rezistencije na antibiotike. Čak i kod primarno osetljivih sojeva, osetljivost na antibiotike se brzo razvija³⁸⁷.

Iako se klinički tok infekcija rezistentnim patogenima još proučava, u mnogim ispitivanjima rezistencija uzročnika je u direktnoj vezi sa nepovoljnim ishodima za bolesnika⁴⁰¹. Povezanost potrošnje antimikrobnih lekova sa selekcijom rezistentnih bakterija potvrđena je mnogim studijama. Međutim još uvek nedostaju direktni dokazi o stepenu te povezanosti i o različitom potencijalu pojedinih antimikrobnih lekova ili grupa za selekciju rezistentnih bakterija¹⁶⁸. Podaci o rezistenciji prate se u mnogim sredinama i potrebno ih je uporediti sa primenom antimikrobnih lijekova. Ovaka ispitivanja je lakše realizovati u

zatvorenim bolničkim sredinama, gde je potrošnja antimikrobnih lekova značajna i raznovrsna i lakše se prati nego izvan zdravstvenih ustanova.

Više je predloženih postupaka u svrhu prevencije selekcije rezistentnih sojeva. Mere obuhvataju praćenje kolonizacije bolesnika multirezistentnim izolatima izradom koprokultura i brisevima anusa hospitalizovanih bolesnika. Preporučuje se: izolacija nosioca, posebne mere pri previjanju bolesnika, medicinsku sestru koja bi se bavila samo tim bolesnicima, posebne mantile koji bi se nosili samo u izolacionim sobama, strogo poštovanje mera lične higijene i korišćenje dezinfekcionih sedstava.

Veoma su važne mere vezane uz propisivanje antimikrobnih lekova kao što su: racionalno propisivanje antimikrobnih lijekova, kontrola, izuzeće ili restrikcija propisivanja pojedinih antimikrobnih lekova, korišćenje antimikrobnih lekova u kombinaciji, rotacija i cikličko propisivanje pojedinih antimikrobnih lekova²³⁵. U te mere definitivno treba da se uključi celo društvo, edukacijom stanovništva o opasnosti koje za buduća pokoljenja nosi neopravdana upotreba antibiotika.

Paradoks siromašnih sredina, pa i naše, u korišćenju antibiotika je velika, neopravdana i neadekvatna primena antibiotika. Bolesnici imaju svest da ako ne dobiju antibiotik, nisu adekvatno zdravstveno zbrinuti. Lekari kliničari su pod velikim svakodnevnom pritiskom bolesnika da često neopravdano propisuju antibiotike.

Mnoge su studije pokazale da su promene u režimu propisivanja antibiotika, kao što su restrikcija pojedinih antibiotika ili ciklička promena empirijske antimikrobne terapije prvog izbora u određenoj dijagnozi, povezane sa smanjenjem rezistencije na antimikrobne lijekove. Do smanjenja rezistencije dolazi zbog smanjene selekcije rezistentnih sojeva uklanjanjem određenih antibiotika ili grupa antibiotika iz primene. Učinak primene pojedinih antimikrobnih lekova, tzv. prve linije, na selekciju patogenih uzročnika naročito je vidljiv u jedinicama intenzivne nege, u kojima upravo tako selekcionisane bakterije postaju značajan uzrok infekcija. U većini studija zabeležena je veća prevalencija antimikrobne rezistencije u odnosu na ostala bolnička odeljenja, što svaljuje veliku odgovornost na te zdravstvene ustanove. Distribucija antibiotika i prodaja u apotekama treba da budu najstrože kontrolisani, a nepravilnosti najstrože sankcionisane.

U terapiji treba koristiti antibiotike samo na osnovu rezultata ispitivanja osetljivosti bacila, najkraće moguće.

6.10.1. MINIMALNE INIBITORNE KONCENTRACIJE

MIK je određivan za piperacilin-tazobaktam, amikacin i ciprofloksacin, jer se ti antibiotici najčešće koriste u kliničkoj praksi u terapiji infekcija izazvanih *P. aeruginosa* u ZC''Aleksinac''.

Piperacilin-tazobaktam spada su antibiotike koji se primarno koriste u terapiji infekcija izazvanih *P. aeruginosa*. Vrednosti MIK za piperacilin-tazobaktam naših izolata su u rasponu od 3 µg/ml do 64 µg/ml. Najveći broj izolata je imao MIK vrednost od 12 µg/ml. (37,5%). Ako analiziramo pojedinačno samo grupu bolničkih izolata, MIK 12 µg/ml. je imalo 38,09%, a u grupi ambulantnih izolata 36,84%. MIK vrednosti u opsegu osetljivosti do 16µg/ml je imalo 83,57% izolata. Ako analiziramo samo grupu bolničkih izolata, 85,71% izolata je bilo u opsegu osetljivog. U grupi ambulantnih izolata MIK do 16 µg/ml je imalo 73,8% izolata, a 16,45% izolata je pokazalo intermedijarnu rezistenciju.

U ispitivanju Sardelić, koje je obuhvatilo šest izolata *P. aeruginosa*, koji produkuju MBL, četiri izolata je imalo MIK za piperacilin-tazobaktam 64 µg/ml i po jedan 32 µg/ml i 126 µg/ml¹⁹⁷.

Ispitivanje sprovedno u Hjustonu je analiziralo smrtnost bolesnika koji su imali bakterijemiju izazvanu *P. aeruginosa*, a koristili u terapiji piperacilin-tazobaktam⁴⁰². Prvu grupu ispitanika su činili bolesnici kod kojih su bili izolati sa vrednostima MIK za piperacilin-tazobaktam 32 µg/ml do 64 µg/ml. U drugoj grupi su ispitanici kod kojih je izolovan *P. aeruginosa* sa nižim vrednostima MIK od 32 µg/ml. Od 349 izolata 54 je imalo MIK 32 µg/ml do 64 µg/ml, a 49 niži MIK. Kod ispitanika koji su imali izolate sa vrednostima MIK 32 µg/ml do 64 µg/ml, smrtnost nakon 30 dana je bila 85,7%, a u drugoj grupi značajno niža 22,2%

Tamma⁴⁰³ je upoređujući smrtnost 170 dece sa bakterijemijom izazvanom *P. aeruginosa* i MIK vrednosti za piperacilin-tazobaktam u studiji, koja je trajala od 2001. godine do 2010. godine, dobila slične podatke. Prvu analiziranu grupu činila su 124 deteta, čiji su izolati imali MIK ≤ 16 µg/mL, a drugu 46 deteta sa vrednostima MIK 32–64 µg/mL. Smrtnost dece je bila u prvoj grupi bila 9%, a u drugoj 24%.

Mattoes sa saradnicima⁴⁰⁴ je ispitivao farmakokinetiku piperacilin-tazobaktama upoređujući dozu leka, kinetiku aplikacije i MIK. Kod 20 zdravih dobrovoljaca aplikovan je piperacilin-tazobaktam u dozi od 4,5 g na 6h umesto 3,375 g na 4h, koliko protokol nalaže.

Dokazano je da se isti efekat koncentracije leka u krvi postiže aplikacijom veće doze leka, koja se daje u većem vremenskom intervalu i pri višoj vrednosti MIK (16 i 32 µg/ml).

Burgess⁴⁰⁵ je ispitivao eventualni sinergistički efekat korišćenja piperacilin-tazobaktama, amikacina, ciprofloksacina ili trovafloksacina kod četiri klinička izolata *P. aeruginosa*. Svaki lek je korišćen sam i u kombinaciji u koncentracijama: 2 i 1/4, 1/4 i 2 i 1/4 i 1/4xMIK piperacilin-tazobaktam i amikacin, ciprofloksacin ili trovafloksacin. Efekat kombinacije je opisivan kao sinergistički, indiferentan ili antagonistički. Vrednosti MIK su rangirane od 4/4-512/4, 0.5-4, 0.125-4 i 0.5-8 µg/ml. Kod 58% kombinacija koncentracija 1/4 x MIK piperacilin-tazobaktama i 2 x MIC amikacina, ciprofloksacina i trovafloksacina ili 2 x MIK piperacilin-tazobaktama i 1/4 x MIK amikacina, ciprofloksacina i trovafloksacina je reagovala sinergistički. Sinergizam je uočen češće pri primeni piperacilin-tazobaktama i amikacina (42%), nego pri primeni kombinacije piperacilin-tazobaktama i trovafloksacina (33%) i piperacilin-tazobaktama i ciprofloksacin (8%). Antagonističko dejstvo među antibioticima nije uočeno.

Autori iz Grčke⁴⁰⁶ su analizirali heterorezistentni fenotip *P. aeruginosa* 7171 kultivisan iz urina. Kao kontrola korišćen je *P. aeruginosa* ATCC 27853. Osetljivost na antibiotike je proveravana primenom Vitek 2 sistema (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), disk-difuzionom, agar dilucionom metodom i E testom. Rezultati pri primeni Vitek 2 aparata su pokazali rezistenciju na amikacin, aztreonam, cefepim, ciprofloksacin i meropenem, a osetljivost na ceftazidim, piperacilin-tazobaktam, imipenem i kolistin. Primenom agar dilucione metode dobijeni su nešto drugačiji rezultati. Izolat je bio rezistentan na amikacin (MIC > 256 mg/L), cefepim (64 mg/L), ceftazidim (32 mg/L), ciprofloksacin (>256 mg/L), meropenem (32 mg/L) i aztreonam (16 mg/L), a osetljiv na imipenem (2 mg/L) i piperacilin-tazobaktam (16 mg/L). Unutar zone inhibicije oko diska piperacilin-tazobaktama formirale su se odvojene kolonije, što ukazuje na prisustvo heterorezistentnih subpopulacija. Izolat je zatim inkubisan sa koncentracijom od 1xMIK piperacilin-tazobaktama i praćena je kinetika uginuća. Isti izolat je zatim presejavan na podloge bez prisustva antibiotika. Nakon presejavanja imao je iste fenotipske karakteristike kao pre inkubacije sa piperacilin-tazobaktam. Na taj način se diferenciraju heterorezistentni izolati od mutantnih subpopulacija.

Vrednosti MIK za amikacin naših izolata su bile u rasponu od 1 µg/ml do 48 µg/ml. Najveći broj izolata (24,19%) je imao MIK vrednost 8 µg/ml. Vrednost MIK od 3µg/ml do 8

µg/ml je imalo 74% izolata. Ako uporedimo rezultate sa standardima CLSI sistema, 60 izolata je bilo osetljivo (96,77%), a po jedan izolat (1,61%) je bio intermedijarno osetljiv (MIK 24 µg/ml) i rezistentan (MIK 48 µg/ml). U grupi izolata bolničkog porekla najveći broj izolata je imao MIK 8µg/ml, a 88,88% izolata je imalo MIK od 3µg/ml do 8µg/ml. U grupi izolata ambulantnog porekla najveći broj izolata je imao MIK 4µg/ml (34,78%), a 78,26% izolata je imalo MIK od 3µg/ml do 8µg/ml.

Amikacin spada u antibiotike koji se najčešće koriste u terapiji infekcija izazvanih *P. aeruginosa*, samostalno ili u kombinaciji sa drugim antibioticima. Nakamura sa saradnicima⁴⁰⁷ je ispitivao efekat kombinovane terapije meropenema, amikacina, netilmicina i arbekacina kod infekcija izazvanih *P. aeruginosa*. MIK vrednosti su određivanje dilucionom metodom. MIK₉₀ za meropenem u svim kombinacijama sa aminoglikozidima je bio $\leq 1,56$ mg/L, dok je MIK₉₀ za aminglikozide $\leq 6,25$ mg/l. Pravljene su serije dvostruke koncentracije od 0,05 mg/l do 25 mg/L za meropenem i 0,1 mg/L do 100 mg/L za arbekacin, amikacin i netilmicin. Kombinacija meropenema i aminglikozida bila je efikasna protiv skoro svih izolata, što uključuje i meropenem rezistentne izolate. Sinergistički efekat je postignut u klinički prihvatljivim dozama. Ni jedna od kombinacija nije imala antagonistički efekat.

U ispitivanju Bozkurt-Guzel⁴⁰⁸ je analiziran efekat dejstva kolistin metansulfata i amikacina na kinetiku uginuća izolata *P. aeruginosa* i postantibiotski efekat u zavisnosti od vrednosti MIK. Efekat na kinetiku uginuća je ispitivan pri korišćenju koncentracija od $0,5 \times$, $1 \times$ i $5 \times$ MIK. U ispitivanju postantibakterijskog efekta kultura je bila izložena 1h dejstvu antibiotika u koncentraciji od $1 \times$ ili $20 \times$ MIK, pojedninačnih antibiotika i kombinacije. Kod nekih izolata sinergistički efekat je uočen pri koncentraciji $1 \times$ MIK već za 12h. Kolistin metansulfonat i amikacin su pokazali postantibakterijski efekat $1,16 \text{ h} \pm 0,10 \text{ h}$ do $2,25 \text{ h} \pm 0,16 \text{ h}$ i $0,96 \text{ h} \pm 0,15 \text{ h}$ do $2,69 \text{ h} \pm 0,32 \text{ h}$. Antagonizam nije uočen. Kolistin metansulfonat i amikacin su pokazali baktericidnu aktivnost zavisnu od koncentracije, $5 \times$ MIK baktericidna aktivnost se vidi već posle 2 h. Nakon 24 h kombinacija antibiotika je pokazala baktericidnu aktivnost prema svim izolatima.

Cardoso sa saradnicima⁴⁰⁹ je ispitivao osetljivost *P. aeruginosa* i *Acinetobacter baumani* na amikacin i tobramicin. Ispitivanje je obuhvatilo 237 izolata, 164 izolata iz hemokultura, 66 iz uzoraka RT, 8 iz urina i 1 iz peritonealne tečnosti. Osetljivost na antibiotike je ispitivana disk-difuzionom metodom. Izolati su bili 89% osetljivi na amikacin,

a 84% na tobramicin. Određivanjem MIK vrednosti osetljivost je snižena. Izolati sa MIK < 4 µg/ml za amikacin i MIK < 2 µg/ml za tobramicin su činili 57%, odnosno 76% izolata.

Layeux sa saradnicima⁴¹⁰ je opisao dva slučaja uspešne terapije teških infekcija izazvanim panrezistentim *P. aeruginosa* kod bolesnika sa sepsom, visokim dozama amikacina. Bolesnicima je aplikovan amikacin u dozi od 25 mg/kg do 50 mg/kg da bi se postigla MIK vrednost od 16 µg/ml. Preporučuje se korišćenje amikacina sa β-laktamskim antibioticima u višim dozama, kao efikasnije u odnosu na monoterapiju amikacinom. Aplikacija amikacina po modelu monoterapije, treba da bude u dozama koje su u skladu sa vrednošću MIK.

Vrednosti MIK za ciprofloksacin su od 0,05 µg/ml do 1,0 µg/ml i svi su u opsegu osetljivosti. Najveći broj izolata je imao MIK 0,125 µg/ml (43,75%). Ako analiziramo osetljivost samo u okviru grupe bolničkih izolata, najveći broj izolata je imao MIK 0,125 µg/ml (61,9%), vrednost od 0,032 µg/ml do 0,125 µg/ml je imalo 80,95% izolata. U okviru grupe izolata amulantnog porekla, vrednosti MIK su bile više. Najveći broj izolata je imao MIK 0,19 µg/ml. (33,33%). Vrednost MIK od 0,125 µg/ml do 0,25 µg/ml je imalo 81,48% izolata.

Ciprofloksacin se koristi u terapiji infekcija izazvanih *P. aeruginosa* sam ili u kombinaciji sa drugim antibioticima, kao alternativa kod rezistencije na antibiotike, koji se primarno koriste u terapiji ili alergije. Pankuch sa saradnicima⁴¹¹ je ispitivao sinergistički efekat meropenema i ciprofloksacina i meropenema i kolistina u subinhibitornim koncentracijama na 51 izolat *P. aeruginosa*. Korišćene su koncentracije MIK za meropenem od 0,12 µg/ml do 256 µg/ml, za ciprofloksacin od 0,06 µg/ml do 64 µg/ml, kolistin od 0,25 µg/ml do 4 µg/ml. Nakon 3h registrovan je sinergički efekat u odnosu na 7 izolata u subinhibitornim koncentracijama meropenema od 0,03 µg/ml do 4 µg/ml i ciprofloksacina od 0,03 µg/ml do 0,25 µg/ml. Nakon 6h uočen je sinergistički efekat na 15 izolata sa subinhibitornim koncentracijama za meropenem od 0,03 µg/ml do 8 µg/ml i ciprofloksacin od 0,03 µg/ml do 2 µg/ml. Nakon 12h postojao je sinergizam u dejstvu na 38 izolata u koncentracijama od 0,06 µg/ml do 128 µg/ml za meropenem i 0,03 µg/ml do 32 µg/ml za ciprofloksacin. Nakon 24h postojalo je sinergističko dejstvo u odnosu na 34 izolata, sa koncentracijama od 0,06 µg/ml do 128 µg/ml za meropenem i 0,03 µg/ml do 32 µg/ml za amikacin. Sinergističko dejstvo meropenema i kolistina je bilo još izraženije.

Su sa saradnicima⁴¹² je ispitivala faze u nastanku rezistencije na ciprofloksacin pri primeni količina od $0,5 \times$ do $8 \times$ MIK. U prvoj fazi osetljive ćelije masovno budu ubijene nakon ekspozicije antibiotikom. U drugoj fazi male populacije koje su preživele dejstvo antibiotika sporo se razmnožavaju ili se uopšte ne razmnožavaju, ne pokazuju više vrednosti MIK. U trećoj fazi izlaganje $0,5 \times$ do $4 \times$ MIK dovodi do rekonstrukcije populacije i te ćelije pokazuju povišenu rezistenciju na antibiotike i do 50 puta u odnosu na početnu populaciju. U toj fazi nastaju promene u regulatornim procesima, što dovodi do povišene fosforilacije dva proteina sukcinat-semialdehid dehidrogenaze i metilmalonat-semialdehid dehidrogenaze, kao i nekih proteina nepoznate funkcije.

U bakterijskoj ćeliji na fluorohinolone deluju enzimi DNK giraza i topizomeraza IV⁴¹³. Visoka primena fluorohinolona vodi u povećanu rezistenciju kod *P. aeruginosa*. Opisane su brojne mutacije koje dovode do pojačane osetljivosti ili pojačane rezistencije (mutacija gena za izomerase ili pojačana ekspresija efluks pumpe). Subinhibitorne koncentracije fluorohinolona igraju važnu ulogu u razvoju rezistencije. Pretpostavlja se da antibiotici retko imaju jednostavne mehanizme dejstva. Dovode do promene stotina gena, kada se koriste u subinhibitornim koncentracijama. Neki od tih gena deluju na ciljna mesta ili enzime, drugi na reakciju bakterijske ćelije na stres, a neki na odbrambene mehanizme bakterijske ćelije u odnosu na antibiotik. U ispitivanju Breidenstein i saradnika⁴¹³, praćeno je prisustvo mutanti koje pokazuju povišenu ili sniženu rezistenciju na ciprofloksacin, pri različitim koncentracijama ciprofloksacina. Korišćen je Mueller-Hinton agar sa $0,025 \mu\text{g/ml}$ (polovina MIK vrednosti), da bi se pratila povišena osetljivost na ciprofloksacin. Koncentracija od $0,2 \mu\text{g/ml}$ je korišćena, da bi se analizirala smanjena osetljivost. Pri koncentraciji od $0,025 \mu\text{g/ml}$ porast 62 izolata je inhibisan. Potvrđeno je da su od toga 28 mutante sa povećanom osetljivošću. Kod još 7 mutanti su nađene mutacije u istom operonu. Kod većine mutanti su uočene dva puta više promene u osetljivosti, dok promene *ftsK* dovode do osam puta više osetljivosti. Kod mutanti sa povišenom osetljivošću su uočene brojne mutacije vezane za DNK replikaciju. Uočene su velike promene efflux pumpe *mexAB-oprM* i gena, *tig*, *clpP* i *clpX* koji su u istom operonu. Ovi geni kodiraju ATP-zavisnu proteazu. *Sss*, *xerD*, *ftsK* i *ruvA* mutante sporije rastu nego divlji sojevi. Nakon 48 h sve mutante su pokazivale mnogo višu osetljivost, dok nekoliko nije više bilo osetljivo na ciprofloksacin, ukazujući da sporiji rast nije uzrok povišene osetljivosti.

Brazas sa saradnicima⁴¹⁴ je ispitivala reakciju *P. aeruginosa* na dejstvo ciprofloksacina. Oko 941 gena je pokazao statistički značajniju promenu ekspresije, kao odgovor na dejstvo ciprofloksacina u koncentraciji od 0,3 x MIK. 554 gena je funkcionisalo na višem nivou, a 387 na nižem. Najviše promena je uočeno između regiona PA0613 i PA0648 koji kodira bakteriofag-like R2/F2 pioocin. Mutacije u ovom regionu pokazuju osmostruko povišenje rezistencije na ciprofloksacin i druge fluorohinolone, što ga čini važnim regionom u regulisanju osetljivosti.

Zhanel⁴¹⁵ je ispitivao postantibiotiski efekat i kinetiku uginuća bakterije kod subinhibitornih ($1/8 \times$, $1/4 \times$ i $1/2 \times$ MIC) i inhibitronih doza ciprofloksacina protiv mukoidnih i nemukoidnih izolata *P. aeruginosa* iz urina. Subinhibitorne koncentracije su proizvodile postantibiotiski efekat, ali nije uočena razlika između mukoidnih i nemukoidnih kolonija. Nemukoidni izolati sa nižim MIK ($\leq 1,0$ mg/L) su imali duži postantibiotiski efekat nego oni sa višim MIK. Kriva uginuća pokazuje da subinhibitorne koncentracije izazivaju nakon nekoliko sati stazu porasta. Samo količina od 1 x MIK je bila baktericidna. Subinhibitorne koncentracije su pokazale izraženiji inhibitorni efekat na nemukoidne u odnosu na mukoidne kolonije.

Guillot sa saradnicima⁴¹⁶ je ispitivala efekat ciprofloksacina na infekciju kod 120 deteta sa CF, iako se on rutinski ne koristi kod dece. Zaključak ove studije je da se ciprofloksacin kod dece obolele od CF koristi u suboptimalnim dozama, da bi se objasnila smanjena osetljivost na ciprofloksacin.

Autori iz Japana⁴¹⁷ u najnovijim ispitivanjima su ispitivali *P. aeruginosa* P7 koji je rezistentan na fluorohinolone, aminoglikozide, većinu beta laktamskih antibiotika, ali ne na imipenem. Dokazano je da je rezistencija na fluorohinolone posredovana povišenom ekspresijom mexEF-oprN i mexXY-oprA. Ovakvi klinički izolati su retki, jer MexEF-OprN mutante imaju povišenu osetljivost na aminoglikozide. Mutantu P7 nedostaju tri operona za (mexAB-oprM, mexEF-oprN i mexXY-oprA) i bili su osetljivi na sve tesirane antibiotike. Ovo su prvi genetički dokazi da MexS varijanta izaziva poremećaj regulacije mexEF-oprN⁴¹⁶.

Buyck sa koautorima⁴¹⁸ je ispitivao efikasnost primene kombinovane antibiotske terapije (ciprofloksacin, meropenem, tobramicin i kolistin) na ekstra i intracelularne bakterijske ćelije. Korišćeni su referentni *P. aeruginosa* P1 i dva klinička izolata. Došlo se do zaključka da ekstracelularno dolazi do aditivnog dejstva, pri kombinovanoj primeni antibiotika.

Intracelularno, dolazilo je pojačanog dejstva antibiotika, ali ne do eradikacije bacila. Kombinacija koja je uključivala ciprofloksacin je bila najaktivnija.

Najnovija ispitivanja se bave rezistencijom na antibiotike i odnosom sa produkcijom faktora patogenosti. Sun sa saradnicima⁴¹⁹ je ispitivao uticaj ekspresije PrtR gena na produkciju piocijanina i bakteriocina i rezistencije na ciprofloksacin. PrtR je potreban za ekspresiju tipa III sekretornog sistema, značajnog faktora patogenosti. Dokazano je da mutacija PrtR ima za posledicu redukovanu bakterijsku kolonizaciju na modelu pneumonije miša. PML izaziva ROS. Primena vodonik peroksida ili ciprofloksacina, indukuju produkciju piocina, a posledica je povišen nivo PrtR mRNA l.

Zanimljivi su podaci do kojih su došli Hocquet i Bertrand⁴²⁰ da primena metronidazola povišava nivo rezistencije na ciprofloksacin i amikacin u uslovima oksidoredukovanog statusa. Rezultati Jensen⁴²¹ i saradnika ukazuju na uticaj oksidoredukovanog statusa na dejstvo ciprofloksacina na DNK mutacije bakterija u biofilmu i nastanak multirezistentnih izolata.

6.10.2.PRODUKCIJA ESBL

Samo jedan naš izolat je produkovao ESBL (serotip P1). To je izolat iz urina ambulantnog bolesnika, muškarca starog 52 godine. Produkovao je fluorescin i piocijanin. Kolonija ovog izolata je imala prečnik na 1% Lauril Bertoni bujonu 9 mm, a na 0,5% 33mm. Inhibicija zone porasta oko diska filter papira sa 30% H₂O₂ je 2 mm. Izolat nije imao sposobnost adhezije i produkcije biofilma. Bio je osetljiv na kolistin, aztreonam, imipenem, meropenem, netilmicin, piperacilin-tazobaktam, amkacin, gentamicin, rezistentan na ceftazidim, cefepim, tobramicin, ciprofloksacin i ofloksacin.

Fenotipska detekcija produkcije ESBL kod *P. aeruginosa* može biti kompleksna iz više razloga⁴²². I pored potvrdnog fenotipskog testa na ESBL, mogu se javiti lažno pozitivni i lažno negativni rezultati. Opisan je tzv. "učinak inokuluma" koji se sastoji u povećanju MIK, u zavisnosti od povećanja inokuluma. Zbog inokuluma u donjem rasponu standarda prema CLSI, kod *E.coli* i *K.pneumoniae* sa TEM, SHV i CTX-M zabeleženi su lažno negativni rezultati. Lažno negativni rezultati se mogu javiti zbog hromozomski kodiranih β-laktamaza, kao što je AmpC. Istovremena produkcija MBL i karbapenemaza, takođe, otežava detekciju. Kod tih sojeva, AmpC beta-laktamaze poništavaju inhibiciju ESBL klavulanskom

kiselinom i maskira se produkcija ESBL²³⁵. Kombinovani mehanizmi rezistencije kao što su nepropustljivost i efluks mogu komplikovati detekciju ESBL.

Nivo produkcije ESBL kod *P. aeruginosa* je različit u pojedinim delovima sveta, a razlika je ponekad drastična. U zemljama Zapadne Evrope ESBL produkujući serotipovi su veoma retki, učestalost je niža od 1%¹⁹⁷. Međutim u laboratorijama drugih kontinentata se registruje mnogo veće prisustvo takvih izolata.

Autori iz Irana⁴²³ su ispitivali rezistenciju 76 izolata *P. aeruginosa* na antibiotike. Najviši stepen rezistencije je postojao prema piperacilinu, imipenemu, cefotaksimu, ceftriaksonu, gentamicinu, ceftazidimu, aztreonamu i ciprofloksacinu. Više od 30% izolata je bilo rezistentno na najmanje tri klase antibiotika, 13% na sve ispitivane klase, a od toga 9,2% izolata je bilo rezistentno na svaki ispitivani antibiotik. Samo 6,6% izolata je bilo osetljivo na sve ispitivane antibiotike. Sedam izolata (9,2%) je proizvelo ESBL.

U istraživanju iz Turske⁴²⁴ opisan je izolat *P. aeruginosa*, kultivisan iz aspirata i krvi dvogodišnjeg deteta sa pneumonijom, koja u osnovi ima CF. *P. aeruginosa* je bio rezistentan na sve antibiotike osim na ciprofloksacin i kolistin. MIK za imipenem i meropenem je bio 128 mg/L a za ceftazidim, cefepim, aztreonam i piperacilin/tazobactam ≥ 256 mg/L. MIK vrednosti za hloramfenikol, tetracilin, gentamicin, amikacin, sulfonamide i rifampicin je bio ≥ 32 mg/L. Osim ESBL izolat je proizveo i MBL. Primenom PSR tehnike *bla*_{VIM-2} gen je identifikovan kao prva genska kasetna u In60 klasi 1 integrona, a lociran na *aacA4* kaseti koja kodira i AAC(6')-Ib aminoglikozid acetiltransferazu. Izolat je nosio i *bla*_{PER-1} ESBL-encoding gen unutar Tn1213 transpozona.

Rezultati ispitivanja iz Kine ukazuju na višu produkciju ESBL *P. aeruginosa*⁴²⁵. U detekciji ESBL, primanjivano je više testova: nitrocefinski test, konvencionalni kombinovani disk test, konvencionalni double-disk synergy test (DDST) i isti testovi sa dodatkom kloksacilina (200 µg/ml) i Fe-Arg β-naftilamid dihidrohlorida, što je povećalo senzitivnost testova. Produkcija ESBL je ispitivana kod 75 klinička izolata *P. aeruginosa*. Od 36 multirezistentna izolata, 34 je proizvelo ESBL.

Autori iz Saudijske Arabije⁴²⁶ su pratili učestalost produkcije ESBL *P. aeruginosa*, poreklo izolata i njihovu rezistenciju na antibiotike. Ispitivana su 187 izolata primenom testa duple disk sinergije. Od toga 25,13% izolata je proizvelo ESBL. Najveći broj izolata potiče iz sputuma (41,67%), pa iz gnoja (28,36%), cerebrospinalne tečnosti (21,74%), urina (20,45%) i hemokultura (13,79%). Ispitivani izolati su pokazali visok stepen rezistencije na

antibiotike. Nije postojala rezistencija na imipenem i meropenem, a izolati su pokazali najveći stepen osetljivosti na gentamicin (95,47%), ceftazidim (91,49%) i amikacin (85,11%). Najveći stepen rezistencije je uočen kod aztreonama (59,57%) i piperacilina (61,7%). Ovakav stepen rezistencije se drastično razlikuje od naših podataka. Autori preporučuju imipenem i meropenem kao lekove izbora.

Ispitivanje iz Indije⁴²⁷ u kojim su se analizirali produkcija ESBL *P. aeruginosa*, MBL i AmpC laktamaza kod Gram negativnih bacila iz opekotina je takođe pokazalo na višu produkciju ESBL, nego u našem ispitivanju. *P. aeruginosa* je predominantno produkovao ESBL i AmpC laktamaze, a *Acinetobacter sp.* MBL.

U Poljskoj⁴²⁸ je ispitivana osetljivost na antibiotike 132 izolata *P. aeruginosa* bolničkog porekla. Osetljivost je ispitivana disk-difuzionom i dilucionom metodom. Većina izolata je bila osetljiva na ceftazidim (91,7%), piperacilin-tazobaktam (85,6%), amikacin (80,3%), meropenem i imipenem (81,8%). Dosta izolata je bilo rezistentno na cefotaksim (73,5%), tikarcilin (53%) i ciprofloksacin (48,5%). Ni jedan od ispitivanih izolata nije produkovao ESBL.

U ispitivanju Sardelić¹⁹⁷ u Hrvatskoj nisu detektovani izolati koji produkuju ESBL.

U poslednje vreme je porastu prevalencija CTX-M. Do sada su otkriveni na svim kontinentima. Najprisutniji je u Južnoj Americi, na Dalekom Istoku i Istočnoj Europi. U Zapadnoj Europi, Severnoj Americi, CTX-M-tip β -laktamaza su do nedavno bile retke. Zbog visoke prevalencije CTX-M u Kini i Indiji, može se reći da se radi o najrasprostranjenijem tipu ESBL na svetu. Odnos između potrošnje antibiotika i pojave CTX-M-tipa β -laktamaza nije dovoljno proučen, iako se povećana prevalencija CTX-M u izolatima kod bolesnika sa dijarejom u opšoj populaciji, povezuje sa većom potrošnjom cefalosporina van bolnica. Identične β -laktamaze su otkrivene u udaljenim područjima, što ukazuje na nezavisnu evoluciju ovih enzima⁴²⁹. Trenutno najšire rasprostranjen enzim CTX-M u svetu je CTX-M 15, koji je otkriven kod *E. coli* u Indiji 2001. godine. Multirezistentna *E. coli* koja proizvodi CTX-M-15 javlja se širom sveta uzrokujući bolničke i vanbolničke infekcije u zemljama Europe, Azije, Afrike, Severne i Južne Amerike i Australije²³⁵. Prevalencija specifičnih tipova ili grupa CTX-M zadobila je endemijske razmere u mnogim zemljama, što uključuje CTX-M u Italiji, CTX-M-9 i CTX-M-14 u Španiji, CTX-M-3 u Poljskoj i CTX-M-15 u Velikoj Britaniji²⁵⁸. *E. coli* koja proizvodi CTX-M-15 je najčešći tip ESBL u Europi i sve je više opisa ovih izolata izvan bolnice.

U periodu od 1998. godine do 2004 godine, 8,9% *E. coli* i 20,3% *K. pneumoniae* iz SENTRY Asia-Pacific studije su bile ESBL pozitivne na inicijalnom testiranju, ali negativne pri kasnijem testiranju. U ovom istraživanju nađene su na plazmidima kodirane AmpC β -laktamaze kod 62% izolata *E. coli* i 75% *K. pneumoniae*. Lažno negativni rezultati mogu da dovedu do primene pogrešnog antibiotika u lečenju infekcije. Jedinice intenzivne nege često su rezervoar uzročnika koji produkuju ESBL. Opisano je da je više od 40% svih bolničkih mikroorganizama koji produkuju ESBL potiče od bolesnika iz jedinica intenzivne nege⁴²⁹.

Istraživanja koja su se bavila povezanošću primene antibiotika sa selekcijom ESBL sojeva često daju protivurečne rezultate. Odnos primene antibiotika i kolonizacije ili infekcije rezistentnim sojem ne mora biti linearan. Ekspozicija antibioticima ne donosi rizik samo za bolesnika, nego se povećava mogućnost kolonizacije ili infekcije drugih bolesnika²³⁵. Većina istraživanja su ukazala da su cefalosporini proširenog spektra najsnažnije povezani sa ESBL produkcijom⁴³⁰. Uvođenje treće generacije cefalosporina u kliničku praksu ranih 1980-tih smatrano je velikim uspehom u borbi protiv β -laktamaza uzrokovane rezistencije bakterija na antibiotike. Ti cefalosporini su razvijeni kao odgovor na povećanu prevalenciju mikroorganizama koji produkuju β -laktamaze i zbog širenja gena za β -laktamaze u nove domaćine. Zbog produkcije ESBL poslednjih godina sve više se u terapiji primenjuju fluorohinoloni. Problem dodatno pogoršava činjenica da su ESBL sojevi često nosioci gena rezistencije na druge antibiotike: fluorohinolone, trimetoprim/sulfametoksazol i aminoglikozide⁴³¹. Korišćenje karbapenema u lečenju infekcija ovim sojevima je u porastu, jer su jedina grupa antibiotika na koje su bakterija koje produkuju ESBL osetljive⁴³². Preširoko empirijsko lečenje kod sumnje na infekciju ESBL sojevima dovodi do porasta rezistencije na karbapeneme.

6.10.3.PRODUKCIJA KARBAPENEMAZA

Kod 7 naših izolata je detektovana produkcija karbapenemaza (2 bolničkog porekla i 5 ambulantnog porekla). Nije uočeno da su se takvi izolati sretali češće kod pojedinih bolničkih materijala i serotipova. Ne postoji određen rezistotip koji bi bio prisutan kod većine izolata.

Enterobacteriaceae su i do 98% osetljive na karbapeneme, a *Acinetobacter sp.* nešto manje. Osetljivost *P. aeruginosa* je još niža. Naši rezultati su pokazali višu osetljivost nego

što je to u literaturnim podacima. Produkcija karbapenemaza je važan faktor rezistencije *P. aeruginosa* na karbapeneme. Stalno se otkrivaju novi enzimi, klasifikacija se menja, pa je to veoma dinamičan proces. Osim produkcije laktamaza, čest mehanizam nastanka rezistencije na karbapeneme je gubitak OprD porina i aktivna efluks pumpa.

Iako su retke, prisutvo GES je detektovano širom sveta: u Grčkoj, Francuskoj, Portugaliji, Južnoj Africi, Francuskoj Gvajani, Brazilu, Argentini, Koreji i Japanu. Uglavnom izazivaju sporadične infekcije. Opisane su i male epidemije koje je izazvao *P. aeruginosa* koji produkuje GES-2.

Autori iz Južne Afrike⁴³³ su prikazali izolat *P. aeruginosa* koji je produkovao GES-2 iz krvi 38 godina starog muškarca sa nozokomijalnom pneumonijom. Izolat je bio intermedijarno osetljiv na imipenem. Izolat je bio rezistentan na cefalosporine širokog spektra, kanamicin, gentamicin, netilmicin, fluorohinolone, sulfonamide i tetracikline. Izolat je nosio 100-kb plasmid. *bla*_{GES-2} gen je izolovan iz genoma *P. aeruginosa* GW-1.

P. aeruginosa koji produkuje GES-1 je izolovan iz rektalnog brisa bolesnika hospitalizovanog u bolnici Bicêtr (Francuska). Nikad ranije nije hospitalizovan i nije putovao van zemlje. *P. aeruginosa* je bio rezistentan na sve β -laktame, osim na imipenem, piperacilin, kolistin i fosfomicin. PCR testovima je dokazano prisustvo *bla*_{GES-type} gena⁴³⁴.

U Brazilu⁴³⁵ je opisan izolat *P. aeruginosa* koji produkuje GES-1 iz hemokulture žene stare 63 godine nakon operacije. Izolat je bio rezistentan na imipenem (MIC > 8 μ g/ml), meropenem (MIC > 8 μ g/ml), ceftazidim (MIC > 16 μ g/ml), cefepim (MIC > 16 μ g/ml), piperacilin-tazobaktam (MIC > 64 μ g/ml), aminglikozide i fluorohinolone. Genetskim ispitivanjima je dokazano prisustvo *bla*_{GES-1}. Gen je deo genske kasete prenosive klasom 1 integrona, a koja sadrži i aminoglikozid acetiltransferazni gen.

U kasnijem ispitivanju⁴³⁶ u Brazilu analizirana je produkcija β laktamaza 56 izolata *P. aeruginosa*, rezistentnih na imipenem, i/ili meropenem, ceftazidim. Analizirano je nosilaštvo gena *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{GES-1}, *bla*_{GES-5}, *bla*_{IMP-1} i *bla*_{SPM-1}. *P. aeruginosa* je kultivisan iz uzoraka UT, RT, krvi i mekih tkiva. 80,3% (45/56) je bilo rezistentno na piperacilin/tazobaktam. 62,5% (35/56) na aztreonam, 78,6% (44/56) na ceftazidim, 96,4% (54/56) na cefepim, 96,4% (54/56) na imipenem, 75,0% (42/56) na meropenem, 51,8% (29/56) na amikacin, 82,1% (46/56) na gentamicin, 78,6% (44/56) na ciprofloksacin i 85,7% (48/56) na levofloksacin. Svi izolati su bili osetljivi na polimiksin. 30,3% izolata je nosilo gene za MBL je bila od čega je 17,8% nosilo *bla*_{SPM-1}, a *bla*_{IMP-1} 12,5%. Detektovani su i *bla*_{SPM-1} i *bla*_{IMP-1}. *bla*_{IMP-1} gen je

detektovan kod tri izolata koji nisu pokazali fenotipski MBL. Tri izolata su nosila *bla*_{CTX-M-2}, dok *bla*_{VIM} nije detektovan. 23,2% izolata je produkovalo ESBL od čega je *bla*_{CTX-M-2} bio prisutan kod 19,6%, a *bla*_{GES-5} kod jednog ispitanika. Istovremeno prisustvo *bla*_{CTX-M-2} sa *bla*_{IMP-1} je uočeno kod tri izolata, a *bla*_{GES-1} sa *bla*_{IMP-1} kod jednog ispitivanog izolata. *bla*_{TEM} i *bla*_{SH} nisu detektovani. U ovoj studiji produkcija MBL nije definisana kao glavni mehanizam rezistencije na karbapeneme ukazujući da prisustvo efluks pumpa, redukcija porinskih kanala i drugih beta laktamaza utiču na rezistenciju.

Autori iz Kine⁴³⁷ su 2005.god. opisali *P. aeruginosa* PK1278 izolovan u Peking, iz krvi 35 godina starog bolesnika, koji je imao opekotine i infekciju. Izolat je bio rezistentan na ceftazidim (MIC > 256 mg/L), ceftriakson (MIC > 256 mg/L), cefepim (MIC > 64 mg/L), cefoperazon/sulbaktam (MIC > 64mg/L), piperacilin/tazobaktam (MIC > 128mg/L), ciprofloksacin (MIC > 2mg/L) i amikacin (MIC 256 mg/L), a intermedijarno rezistentan na imipenem (MIC > 8 mg/L) i meropenem (MIC > 8 mg/L). PSR je utvrđeno prisustvo *bla*_{GES-5}. Ovo je prvi put opisan GES-5 u svetu.

U Turskoj⁴³⁸ je opisan izolat *P. aeruginosa*, koji produkuje OXA-11, kultivisan iz krvi bolesnika sa opekotinama. Izolat je bio rezistentan na cefalosporine, naročito ceftazidim (MIC 512 mg/L), peniciline, aztreonam i meropenem, ali ne i imipenem. Genetskim ispitivanjima je dokazano prisustvo OXA-1.

El Garch sa saradnicima⁴³⁹ je ispitivao produkciju OXA-198 kod karbapenem rezistentnih izolata koji su izazivali infekcije donjih delova RT, kod bolesnika na respiratorima. OXA-198 ima malo genetskih sličnosti sa ostalim D OXA β laktamazama, samo 45% genske homologije. Ekspresija kod *E.coli* i *Pseudomonasa* P1 ima za posledicu višu rezistenciju na tikarcilin, karbapeneme i cefepim. *bla*_{OXA-198} gen nosi integron klase 1, a u vezi je 46kb netipibilnim plazmidom.

KPC detekovane u USA, Francuskoj, Škotskoj, Izraelu, Kolumbiji i Kini⁴³⁵. U Indiji je dokazana produkcija OXA-1, OXA-2, OXA-10, OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-51 i OXA-54⁴⁴⁰.

6.10.4.PRODUKCIJA MBL

MBL su opisane prvi put 1988. godine u Japanu. Prve MBL su opisane kod bakterija iz prirode: *Bacillus cereus*, *Aeromonas* sp. i *Stenotrophomonas maltophilia*. MBL koji proizvodi *Bacillus cereus* je godinama bila prototip MBL.

Naši izolati proizvodili su 10% MBL, sa identičnom učestalošću u grupi ambulantnih i hospitalizovanih bolesnika. Izolati koji su proizvodili MBL su izolovani iz urina i briseva rane. U grupi bolničkih izolata, MBL su češće bile prisutne kod izolata iz urina, a u grupi ambulantnih iz briseva rana. Najčešće su bili serotip P11 (50%), tri izolata su bila netipibilna, jedan P1, a jedan izolat je reagovao samo sa grupnim PME serumom. Pet izolata su bila sa izuzetkom aztreonam i kolistina, rezistentna na sve antibiotike, a četiri izolata su osim na aztreonam i kolistin bila osetljiva na piperacilin–tazobaktam. Jedan izolat je bio rezistentan na imipenem, a osetljiv na meropenem.

U Srbiji nema ni približno dovoljno podataka o zastupljenosti *P. aeruginosa*, koji proizvode MBL. Jedno od opsežnijih ispitivanja u Institutu za majku i dete "Vukan Čupić" u Beogradu obuhvatilo je 526 izolata *P. aeruginosa*²⁸⁷. Kod 163 (31%) postojala je rezistencija na imipenem, a kod 148 (90,8%) smanjena osetljivost na meropenem. Izolati rezistentni na karbapeneme su najčešće izolovani u pedijatrijskim i hirurškim jedinicama intenzivne nege (51,5%) i pulmološkim jedinicama (23,9%, uglavnom oboleli od CF). Izolati su uglavnom iz uzoraka respiratornog (76,6%) i urinarnog trakta (6,1%), a ostali uzorci činili su samo 4%. Najveća osetljivost na antibiotike je registrovana na kolistin i polimiksin B (100%), levofloksacin (61,3%) i ciprofloksacin (49,7%). Skoro trećina izolata (29,4%) je bila panrezistentna, sa izuzetkom polimiksina i kolistina. PCR ispitivanjem kod 3,1% izolata je detektovano prisustvo *bla_{VIM}* gena. VIM-2 su spadali u tri različite genotip grupe, što je određeno PFGE ispitivanjem. Ovo ukazuje na mogućnost horizontalnog transfera gena i klonalne diseminacije.

U periodu od 2004. godine do 2007. godine u izolatima *P. aeruginosa* sa Vojnomedicinske akademije, samo kod jednog je registrovano prisustvo MBL tipa klase 1 integrona sa *bla_{VIM-2}*-like kasetama na prvoj poziciji. Izolat je bio serotip P11 i panrezistentan na sve antibiotike⁴⁴¹.

Tokom 2011. godine publikovani su prvi podaci o prisutvu New Delhi (NDM-1) MBL kod izolata na Vojnomedicinskoj akademiji u Beogradu⁴⁴¹. To su prvi identifikovani

izolati na Balkanu. Kultivisani su iz bolesničkih materijala 2 žene koje su imale opsežne hirurške intervencije. Epidemiološki nisu imale nikakve međusobne veze i nisu putovale van zemlje. Testom pulsed-field gel elektroforeze određeno je da pripadaju dvema različitim klonalnim grupama MMA83 ili MMA533. Do tada su *Enterobacteriaceae*, koje nose *bla*_{NDM-1} nađene u Indiji, Pakistanu, Bangladešu, Singapuru, USA, Kanadi, Australiji i 13 evropskih zemalja. Većina evropskih nosioca MBL daje anamnestički podatak o boravu u Indiji ili balkanskim zemljama. U Evropi su do tada opisana 55 izolata *P. aeruginosa*, od kojih je 6 imao veze sa Balkanom: užom Srbijom, Kosovom, Crnom Gorom i Bosnom i Hercegovinom. Pošto su izolati bili dva odvojena klona, pretpostavlja se da potiču iz različitih izvora. Sposobnost NDM-1 da se širi među *Enterobacteriaceae*, ali i duge bakterije, ukazuje na mogućnost novih slučajeva prisustva NDM-1. Restriksijskim analizama i hibridizacijom je dokazano da postoje dve kopije *bla*_{NDM-1} gena u genomu svih testiranih izolata. Povišena koncentracija imipenema nije imala uticaja na broj kopija gena u genomu *P. aeruginosa* MMA83⁴⁴².

U Hrvatskoj¹⁹⁷ prve MBL VIM-2 tipa su izolovane 2000. godine u Splitu. Sada se otpornost kreće u rasponu od 0-25%. U ispitivanju Sardelić¹⁹⁷ je pokazano da 3% izolata *P. aeruginosa* iz jedinice Intenzivne nege produkuje MBL i to VIM-2. MBL pozitivni izolati su bili serotip P11, s izuzetkom jednog izolata, koji bio serotip P12. Dva izolata nisu mogla da se tipiziraju komercijalno dostupnim serumima. Iako su svi sojevi koji su imali gen za MBL multiplerezistentni, postojale su razlike u osetljivosti, kako na β -laktame, tako i na antipseudomonasne antibiotike iz ostalih grupa. Svi MBL pozitivni izolati bili su otporni na ceftazidim, cefepim, imipenem, meropenem, gentamicin, tobramicin, netilmicin i amikacin.

Ispitivanje Sardelić¹⁹⁷ je obuhvatilo i ispitivanja gena za MBL. Pretpostavljeno je da dolazi do prenosa integrona putem transposona, s obzirom da plazmidi unutar ispitivanih izolata *P. aeruginosa* nisu dokazani. Genske kasete mogu slobodno da se kreću iz jednog integrona u drugi, za prenos celog integrona potrebna je pomoć plazmida i transposona⁴⁴³. Većina opisanih MBL gena nalazi se na plazmidima veličine od 120 kb do 180 kb⁴⁴⁴. Kod izolata kod kojih nije dokazano prisustvo plazmida, MBL geni i njihovi integroni uglavnom su unutar Tn5051-tipa transposona koji je odgovoran za diseminaciju ovih gena među genetički različitim jedinkama²⁸⁵. Integroni koji se nalaze u ljudskim patogenima i komenzalima nazivaju se i klinički integroni, a vrlo slični nađeni su kod bakterija iz prirode reda *Betaproteobacteria*. Iako ovi integroni ne sadrže gene za rezistenciju na antibiotike

rezervoar su integrona, koji su endemični u prirodi. Po prirodi gena *intI* definisana je klasa integrona. Iako su do danas definisane četiri klase integrona, geni za MBL najčešće se nalaze u integronima klase I.

U Grčkoj⁴⁴⁵ ispitivana je učestalost izolata koji produkuju VIM. U ovoj zemlji VIM su identifikovane prvi put 2000. godine. Ispitivanje je obuhvatilo 584 hospitalizovana bolesnika. Rezistencija na karbapeneme je veoma visoka i iznosi 50%. Kod karbapenem rezistentnih izolata kod 28% su bili prisutni *bla_{VIM}* geni. Predpostavlja se da su kod drugih rezistentnih izolata bili prisutni drugi mehanizmi rezistencije. Inače, svi izolati koji su produkovali VIM su bili multirezistenti. Bili su rezistentni na ticarcilin/klavulanat (MIC $\geq$ 128 mg/L) i piperacilin/tazobaktam (MIC $\geq$ 128 mg/L), intermedijarni ili rezistentni na ceftazidim (MIC od 16 do $\geq$ 64 mg/L). Svi izolati koji su produkovali VIM su bili osetljivi na kolistin. Od pozitivnih 80 izolata, 48 je produkovalo VIM-2, 31 VIM-4, a 1 VIM-17. Najveći broj pozitivnih izolata potiče iz urina, pa krvi i bronhijalnih sekreta.

U studiji Giske i saradnika²⁴⁶, MLST metodom je upoređivana klonska srodnost evropskih VIM-pozitivnih izolata. Autori su potvrdili hipotezu da serotipovi P11 i P12 igraju ulogu u pojavi i diseminaciji VIM gena. Moguće je da VIM pozitivni evropski izolati potiču od jednog klona koji je potekao iz mediteranskih zemalja.

U većini evropskih zemalja su prisutne VIM-1 i VIM-2 MBL. *P. aeruginosa* koji produkuje VIM-2 je izolovan u Portugaliji, Španiji, Poljskoj, Belgiji, Nemačkoj, Švedskoj, Norveškoj, Hrvatskoj, Mađarskoj, Grčkoj i Srbiji^{288,289,406}. VIM produkuju izolati iz Azije i Južne Amerike, uz opise novih varijanti - VIM-3 u Tajvanu, VIM-5 u Turskoj, VIM-7 u SAD^{285,445,443}. Alelske varijante VIM-7 do 11-a i b opisane su kod *P. aeruginosa* izolovanih iz Engleske, Južne Amerike i Italije. VIM-12 je prisutan u Grčkoj. U Španiji je opisana varijanta VIM-13⁴⁴⁶, u Bugarskoj VIM-15, Nemačkoj VIM-16²⁸⁰, VIM-17 u Grčkoj⁴⁴⁵ i VIM-18 u Indiji⁴³⁵. U Europi i Aziji su geni VIM-2 do VIM-5 otkriveni i u enterobakterijama (*Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*) i nizu nefermentativnih bakterija (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri*)^{285,448,295}. Treći tip MBL, SPM-1 opisan je u Brazilu 1997. godine^{262,443} i Evropi⁴⁴⁹. GIM-1 je opisan 2002. godine u Nemačkoj i nije zabeleženo da se proširio izvan zemlje⁴³⁵. Poslednja opisana MBL je AIM-1 iz izolata *P. aeruginosa* iz Australije²³⁰. Do sada je opisano 14 enzima VIM grupe.

U velikoj studiji u Italiji⁴⁵⁰ koja je obuhvatila 14000 izolata, 1,3% izolata je proizvelo MBL. Publikovano je da u Španiji 0,1% sojeva proizvodi MBL⁴⁵¹. U Japanu 1,3% sojeva proizvodi MBL. Ispitivanje koje je sprovedeno u Kanadi²³⁶ je pokazalo da je 30% sojeva proizvelo enzim.

Rezultati ispitivanja indijskih autora koji su analizirali produkciju MBL kod 54 soja *P. aeruginosa* izolovana iz briseva rana i kod 310 bolesnika sa food diabetic pokazuju veću produkciju MBL, nego što je to kod nas⁴⁵². 20,3% izolata *P. aeruginosa* je bilo rezistentno na karbapenem, a od toga 81,8% rezistencija je bilo posredovano produkcijom MBL. Infekcije multirezistentnim sojevima *P. aeruginosa* su česte kod ulceracija na nogama dijabetične etiologije. Slično ispitivanje u Indiji je pokazalo da 8,3% *P. aeruginosa* proizvodi MBL i 22,22% proizvodi ESBL⁴⁵³. Međutim ima podataka iz Indije da je 84% izolata proizvelo MBL, od čega je 13% nosilo *bla_{VIM-2}* gen⁴⁵⁴.

Pirnay i saradnici⁴⁵⁵ su zaključili da *Pseudomonas* sp. najčešće ima superficijalnu klonsku strukturu koja je podložna čestim rekombinacijama među kojima ponekad izađe vrlo uspešan epidemijski klon. MBL pozitivni izolati imali su relativno različitu gensku strukturu.

Podaci SENTRY studije ukazuju da je procenat rezistencije na karbapeneme u porastu. U zemljama Južne Amerike je između 30% i 40%. U Južnoj Africi iznosi između 42% i 45%⁴⁵⁶.

Multirezistentni izolati *P. aeruginosa* imaju veliki klinički značaj. Što se epidemiološkog potencijala tiče, do sada su sojevi sa genima za proizvodnju MBL uglavnom opisivani kao sporadične pojave ili uzročnici manjih nozokomijalnih epidemija²⁸³. Opisane su veće epidemije u zemljama Južne Europe, Azije i Južne Amerike. Nozokomijalne epidemije opisane su u Italiji, Grčkoj i Francuskoj. U Koreji 11% imipenem rezistentnih izolata proizvodi MBL, dok 20% imipenem-rezistentnih izolata u Brazilu proizvodi SPM-1. Ako dođe do širenja gena koji kodiraju MBL među nozokomijalnim sojevima *P. aeruginosa* i drugih Gram-negativnih bakterija, uz činjenicu da ovi enzimi hidroliziraju svaki β-laktamski antibiotik i da smo godinama daleko od uvođenja terapijskog inhibitora, možemo očekivati velike probleme u terapiji infekcija.

Zanimljivo je ispitivanje koje je obuhvatilo izolate *P. aeruginosa* iz zemlje, provedeno 2014. godine u Indiji. Obuhvatilo je 30 izolata, kod kojih je proveravana osetljivost na antibiotike i produkcija MBL. 90% Izolata je bilo osetljivo na imipenem, 50% na piperacilin, 30% na amikcin i 20% na ceftazidim. 56,66% izolata je proizvelo MBL⁴

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata ispitivanja fenotipskih karakteristika izolata *P. aeruginosa*, iz bolesničkih materijala hospitalizovanih i ambulantnih ispitanika, a u skladu sa realizacijom postavljenih ciljeva rada, možemo zaključiti sledeće:

-*P. aeruginosa* je češće izolovan iz bolesničkih materijala muškaraca (59%), nego žena (41%). Prosečana starost bolesnika je 57,78 godina. Prosečna starost muškaraca (61,27 godina) je viša nego prosečna starost žena (52,17 godina). Sa većom statističkom značajnošću *P. aeruginosa* je izolovan kod ispitanika starijih od 50 godina, nego kod mlađih. Izolovan je iz 68% bolesničkih materijala kod ispitanika starosti 50 godina do 80 godina. Muškarci u sedmoj deceniji života činili su većinu ispitanika (27%). U grupi bolesnika koji su bili hospitalizovani, ispitanici starosti od 50 godina do 80 godina činili su 82% populacije, a bacil je najčešće izolovan kod ispitanika u osmoj deceniji (42%). Kod ambulantnih ispitanika, bolesnici starosti od 50 godina do 80 godina činili su 64% populacije. *P. aeruginosa* je bio najpristupljiviji kod bolesnika u osmoj deceniji života (32%).

-*P. aeruginosa* je najčešće kultivisan iz briseva rana i urina (75%), dok su sputum, brisevi grla, nosa, uva, oka i vaginalni brisevi bili manje zastupljeni. Kod muškaraca *P. aeruginosa* je češće izolovan iz briseva rana i urina, nego kod žena.

-Serološki su identifikovani sledeći serotipovi *P. aeruginosa*: P1, P3, P4, P5, P6, P10, P11 i P12. Najčešće identifikovani serotipovi su P11 (20%), P6 (16%) i P1 (12%). Najveći broj izolata, koji je je aglutinisao smo polivalentne serume je reagovao sa PME polivalentnim serumom (12%), pa PMF (2%) i PMA (1%). Procenat netipibilnih izolata je visok (29%). U brisevima rana, bili su najprisutniji serotipovi P11, P6 i P1. Netipibilno je bilo 15% izolata, pri čemu je procenat netipibilnih izolata bio nešto viši kod ambulantnih uzoraka. U brisevima rana bolničkog porekla najčešći je bio serotip P6 (12%), pa P4 (8%) i P1 (6%). U urinima su najčešće kultivisani serotipovi P11 i P1, dok su ostali serotipovi bili skoro jednako zastupljeni. U urinima hospitalnog porekla bio je najprisutniji P11, a ambulantnog P1.

-*P. aeruginosa* produkuje fluorescin (86%) statistički značajnije nego piocijanin (67%). Oba pigmenta produkovalo je 52% izolata. Samo fluorescin je produkovalo 33% izolata, a samo piocijanin 15%. Produkcija pigmenata se nije značajnije razlikovala kod izolata iz materijala hospitalizovanih i ambulantnih bolesnika.

-Većina naših izolata je imala sposobnost adherencije na polivinil-hlorid nakon inkubacije od 60 min (93%). Prosečna ekstincija izolata iz ambulantnih izolata (0,002) i medijana su viši nego kod bolničkih izolata (-0,033). Ekstincija kod izolata iz briseva rana i urina je viša nego kod ostalih uzolata. Serotip P1 je imao najveću sposobnost adherencije, pa serotipovi P11 i P6.

-Skoro svi izolati *P. aeruginosa* (99%) su imali sposobnost formiranja biofilma. Većina izolata je imala umerenu sposobnost formiranja biofilma (87%). Izolati ambulantnog porekla su imali više izraženu sposobnost formiranja biofilma, nego izolati bolničkog porekla. Izolati iz briseva rana su imali slabiju sposobnost produkcije biofilma u odnosu na ostale izolate, a oni iz urina su imali izraženiju sposobnost produkcije biofilma u odnosu na one iz briseva rana. Netipilni izolati su formirali biofilm najveće biomase (prosečna ekstincija je 0,161). Sledeći po vrednosti prosečne ekstincije su izolati serotipa P1 (0,146), pa P11 (0,145) i P6 (0,127).

-Svi izolati su imali sposobnost trzajućih pokreta. Izolati ambulantnog porekla su imali izraženiju sposobnost takvog kretanja (prosečni prečik kolonija 8,19 mm), nego izolati ambulantnog porekla (7.75 mm $\pm$ 2.36 mm). Izolati iz briseva rana su imali manju sposobnost trzajućih pokreta u odnosu na ostale izolate. Izolati iz urina su imali manju sposobnost trzajućih pokreta, nego preostali izolati. Najveću sposobnost trzajućih pokreta su imali izolati serotipa P11 (8,22 mm), pa P6 (8,18 mm) i P1 (7,7 mm). Netipibilni izolati su imali prosečni prečnik kolonija 7,93 mm.

-Svi naši izolati su imali sposobnost rojenja. Izolati bolničkog porekla (prosečni prečnik kolonija je 41,92 mm) imali su veću sposobnost rojenja, nego izolati ambulantnog porekla (prosečna vrednost prečnika kolonija 38,05 mm). Izolati iz briseva rana su imali veću sposobnost rojenja nego preostali izolati, a izolati iz urina su imali manju vrednost proseka kolonija u odnosu na druge. Najveći prosečni prečnik kolonije imaju netipibilni izolati (42,89 mm). Sledeći po sposobnosti rojenja je serotip P6 (prosečni prečnik kolonije 42,75 mm), pa P11 (40,55 mm) i P1 (36,08 mm).

-Znatan broj izolata je imao apsolutnu rezistenciju na toksično dejstvo 30% H₂O₂, nakon inkubacije od 24h. Prosečna zona inhibicije porasta oko diska je šira kod izolata bolničkih izolata (3,88 mm) u odnosu na ambulantne izolate (0,92 mm,) što ukazuje na veću osetljivost na toksično dejstvo ROS. Prosečna inhibicija porasta izolata iz briseva rana (0,59mm) i urina ukazuje da su oni otporniji na toksično dejstvo ROS u odnosu na ostale

izolate (0,37 mm). Najotporniji na dejstvo kiseoničnih radikala su izolati koji su bili serotip P11 (1,63 mm), pa serotip P1 (2,84 mm) i P6 (3,181 mm). Netipibilni izolati su imali prosečnu zonu inhibicije porasta 1,65 mm.

-Naši izolati pokazali su najveći stepen osetljivosti na kolistin i aztreonam (100% izolata hospitalnog i ambulantnog porekla), meropenem (92% izolata hospitalnog porekla i 88% ambulantnog), imipenem (86%), piperacilin-tazobaktam (84% izolata bolničkog porekla i 74% ambulantnog) i ceftazidim (76% izolata bolničkog porekla i 80% ambulantnog). Amikacin je bio najefikasniji aminoglikozid. 64% izolata iz bolnički uzorkovanih materijala je bilo osetljivo, a 70% ambulantnih. Rezistencija na ostale antibiotike je varirala. U grupi bolničkih 2 izolata, a iz grupe ambulantnih 12 su bila osetljiva na sve testirane antibiotike. Iz grupe bolničkih izolata još 4, a iz grupe ambulantnih 6 je bilo osetljivo na sve antibiotike osim cefepima. Izolati su bili najrezistentniji na cefepim. Dva izolata ambulantnog porekla su rezistentna na sve antibiotike, osim na kolistin i aztreonam. Nije uočena značajna razlika u osetljivosti između izolata hospitalnog i ambulantnog porekla. To se može objasniti specifičnom organizacijom rada hirurških službi u ZC''Aleksinac''.

-Vrednosti MİK za piperacilin-tazobaktam naših izolata su u rasponu od 3 µg/ml do 64 µg/ml. Najveći broj izolata je imao MİK vrednost od 12 µg/ml (37,5%). MİK vrednosti u opsegu osetljivosti do 16 µg/ml je imalo 83,57% izolata. Vrednosti MİK za amikacin naših izolata su bile u rasponu od 1 µg/ml do 48 µg/ml. Najveći broj izolata (24,19%) je imao MİK vrednost 8 µg/ml. Vrednost MİK od 3 µg/ml do 8 µg/ml je imalo 74% izolata. Ako uporedimo rezultate sa standardima CLSI sistema, 60 izolata je bilo osetljivo (96,77%), a po jedan izolat (1,61%) je bio intermedijarno osetljiv (MİK 24 µg/ml) i rezistentan (MİK 48µg/ml). Vrednosti MİK za ciprofloksacin su od 0,05 µg/ml do 1,0 µg/ml. Najveći broj izolata je imao MİK 0,125 µg/ml (43,75%). Ako analiziramo osetljivost samo u okviru grupe bolničkih izolata, najveći broj izolata je imao MİK 0,125 µg/ml (61,90%), vrednost od 0,032µg/ml do 0,125 µg/ml je imalo 80,95% izolata.

-Samo jedan izolat je produkovao ESBL.

-Sedam izolata ambulantnog porekla i dva bolničkog su produkovala karbapenemaze. Nije uočeno da ti izolati potiču iz određenih materijala, da su određenog serotipa niti da imaju specifički serotip.

-10% izolata je produkovalo MBL, sa identičnom učestalošću u grupi ambulantnih i hospitalizovanih bolesnika. Kod izolata iz bolničkih uzoraka, MBL su češće kultivisane iz

urina, a kod izolata iz ambulantnih materijala češće iz briseva rana. Najčešće su pripadali P11 serogrupi (50%), tri izolata su bila netipibilna, jedan P1 serogrupi, a jedan izolat je reagovao sa grupnim PME serumom. Pet izolata su bila sa izuzetkom aztreonama i kolistina, rezistentna na sve antibiotike, a četiri izolata su osim na aztreonam i kolistin bila osetljiva na piperacilin–tazobaktam.

8.LITERATURA

- 1.en.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosas
- 2.Palleroni NJ. The *Pseudomonas* Story. Environmental Microbiology 2010; 12(6); 1377–1383.
- 3.Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. Clinical Microbiology Reviews 2009; 22(4): 582-610.
- 4.<http://www.pseudomonas.com/>
- 5.Jeukens J, Boyle B, Kukavica Ibrulj I, Ouellet MM, Aaron SD, Charette SJ. Comparative Genomics of Isolates of a *Pseudomonas aeruginosa* Epidemic Strain Associated with Chronic Lung Infections of Cystic Fibrosis Patients. Plos one. DOI: 10.1371/journal.pone.008761
- 6.Amiel E, Lovewell RR, O'Toole GA, Hogan DA, Berwin B. *Pseudomonas aeruginosa* Evasion of Phagocytes Is Mediated by Loss of Swimming motility and Is Independent of Flagellum Expression. Infection and Immunity 2010; 78(7): 2937-2945.
- 7.Karakašević B. Mikrobiologija i parazitologija. Medicinska knjiga. Beograd-Zagreb. 1989.
- 8.Dasgupta N, Arora SK, Ramphal R. *flaN*, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2000; 182: 357–364.
- 9.Brener DJ, Kreig NR, Staley JT, Garrity G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology; Volume two: *Proteobacteria*; Part B: The Gammaproteobacteria. 2nd Ed, 2005.
10. Ramsey DM, Wozniak DJ. Understanding of the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infection in cystic fibrosis. Mol Microbiol 2005; 56: 309-322.
11. Hancock RE. The *pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability barrier and how to overcome it. Antibiot Chemother 1985; 36: 95-102.
12. Pollack M. The virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis 1984; 6(Suppl 3): S617-26.
13. <http://www.polyphor.com/products/pseudomonas-infections/infections-caused-by-pseudomonas-aeruginosa>

14. Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* 1998; 4(4): 551–560.
15. Mendelson MH, Gurtman A, Szabo S, Neibart E, Meyers BR, Policar M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with AIDS. *Clin Infect Dis*. 1994 Jun; 18(6): 886-95.
16. Blanc DS, Petignat C, Janin B, Bille J, Francioli P. Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalisation: a prospective epidemiologic study. *Clin Microbiol Infect* 1998; 4(5): 242-7.
17. Edgeworth JD, Treacher DF, Eykyn SJ. A 25-year study of nosocomial bacteremia in an adult intensive care unit. *Crit Care Med* 1999; 27(8): 1421-8.
18. Krivan HC, Roberts DD. Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc beta 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85 (16): 6157–6161.
19. Mutharia LM, Nicas TI, Hancock RE. Outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* serotype strains. *J Infect Dis*. 1982 Dec; 146(6): 770-9.
20. Lam MY, McGroarty EJ, Kropinski AMY, MacDonald LA, Pedersen SS, Høiby N, et al. Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol* 1989; 27: 962-967.
21. Rahim R, Burrows LL, Monteiro MA, Perry MB, Lam JS. Involvement of the *rml* locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2000; 146: 2803-2814.
22. Chester IR, Maedow PM, Pitt TL. The Relationship between the O-antigenic Lipopolysaccharides and Serological Specificity in Strains of *Pseudomonas aeruginosa* of different O-serotypes *Journal of General Microbiology* 1973; 78: 305-318.
23. Evora PRB, Ekin S, Pearson PJ, Schaff HV. Endothelium-dependent vasodilation in response to *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: an in vitro study on canine arteries. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1998; 31: 1329-1334.
24. Yuriy A, Knirel S. Polysaccharide Antigens of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Critical Reviews in Microbiology* 1990; 17 (4): 273-304.
25. Kharazmi A, Bibi Z, Nielsen H, Hoiby N, Doring G. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid on human neutrophil and monocyte function. *APMIS* 1999; 97 (7-12): 1068-1072.

-
26. Terashima M, Uezumi I, Tomio T, Kato M, Irie K, Okuda T, et al. A Protective Human Monoclonal Antibody Core Region of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide. *Infection and immunity* 1991; 59 (1): 1-6.
 27. Pennington J, Hickey WF, Blackwood LA, Arnaut MA. Active Immunisation with lipopolysaccharide *Pseudomonas aeruginosa* Antigen for Chronic *Pseudomonas* Bronchopneumonia in Guinea Pigs. *J. Clin. Inves* 1981; 68: 114011-48.
 28. Fletcher EL, Fleiszig SM, Brennan NA. Lipopolysaccharide in adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to the cornea and contact lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993; 34(6): 1930-6.
 29. Linker A, Johns RS. A new polysaccharide resembling alginic acid isolates from pseudomonds. *J. Biol. Chem* 1966; 241:3845-3851.
 30. Al-Dujaili HM, Harris D. Evaluation of commercially available antisera for serotyping of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Path* 1974; 27: 569-571.
 31. van Balkum A, Tassios PT, Dijkschoorn L, Haeggman S, Caksoon B, Fry NK, at all. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical microbiology and infectious disease. CMI* 2007; 13 (suppl. 3) 1-46.
 32. McLean DM, Almquist CK, Niu Y, Kimmel R, Lai Z, Schreiber JR, at al. A Human Anti-*Pseudomonas aeruginosa* Serotype O6 immunoglobulin G1 expressed in transgenic tobacco is capable of recruiting immune system effector function in vitro antimicrob agents. *Chemother* 2007; 51(9): 3322–3328.
 33. Curiae HL, Lightfoot J, Lam JS. Prevalence of gca, a Gene Involved in Synthesis of A-Band Common Antigen Polysaccharide in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 1995; 2 (5): 554–562.
 34. Bélanger M, Burrows LL, Lam JS. Functional analysis of genes responsible for the synthesis of the B-band O antigen of *Pseudomonas aeruginosa* serotype O6 lipopolysaccharide. *Microbiology* 1999; 145(12): 3505-21.
 35. McCabe WR, Jackson GG MD. Gram-Negative Bacteremia I. Etiology and Ecology. *Arch Intern Med.* 1962; 110(6): 847-855.
 36. Wilkinson SG, Galbraith L. Studies of Lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Biochemistry* 1975; 52 (2): 331–343.

-
37. Caroff M, Novikov A. Micromethods for lipid A isolation and structural characterization. *Methods Mol Biol* 2011; 739: 135-46.
 38. Arora SK, Ritchings BW, Almira EC, Lory S, Ramphal R. The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein FlidD is responsible for mucin adhesion. *Infect Immun* 1998; 66:1000-1007.
 39. Spaingenberg C, Heuer T, Burger C, Tummeler B. Genetic diversity of flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS* 1996; Lett, 396, 213-217.
 40. Arora SK, Dasgupta N, Lory S, Ramphal R. Identification of two distinct types of flagellar cap proteins FliD in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 2001; 68: 1474-1479.
 41. Arora SK; Bangera M, Lory S, Ramphal R. A genomic island in *Pseudomonas aeruginosa* carries the determinants of flagellin glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(16): 9342-9347.
 42. Drake D, Montie TC. Flagella, motility and invasive virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 1988; 134: 43-52.
 43. Montie TC, Doyle-Huntzinger D, Craven RC, Holder IA. Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of *Pseudomonas* in the burned mouse model. *Infect Immun* 1982; 38: 1296-1298.
 44. Feldman M, Bryan R, Rajan S, Scheffer L, Burnnet S, et al. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun* 1998; 66: 43-51.
 45. Feuillet V, Medjane S, Mondor I, Demaria O, Pagni PP, Galán JE, et al. Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc Natl Sci USA* 2006; 103, (103); 12487-12492.
 46. Ramphal R, Arora SK, Ritchings BW. Recognition of mucin by the adhesin-flagellar system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit care Med* 1996; 154: S170-S174.
 47. Wolfgang MC, Jyot J, Goodman AL, Ramphal R, Lory S. *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. *Proc natl Sci USA* 2004; 101: 6664-6668.
 48. Jyot J, Sonawane A, Wu W, Ramphal R. Genetic mechanisms involved in the repression of flagellar assembly by *Pseudomonas aeruginosa* in human mucus. *Mol Microbiol* 2007; 63, 1026-38.

-
49. Rosok MJ, Stebbins MR, Connelly K, Lostrom ME, Siadak AW. Generation and characterization of murine anti-flagellum monoclonal antibodies that are protective against lethal challenge with *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 1990; 58: 3819-3828.
 50. Ochi H, Ohtuka H, Yokota S, Uezumi I, Terasima M, Irie K, et al. Inhibitory activity on bacterial mobility and in vivo protective activity of human monoclonal antibodies against flagella of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 1991; 59: 550-554.
 51. Neville LF, Barnea Y, Hammer-Munz O, Gur E, Kuzmenko B, Kahel-Raifer H, et al. Antibodies raised against N'-terminal *Pseudomonas aeruginosa* flagellin prevent mortality in lethal murine models of infection 2005. *Int J mol Med*; 16: 165-171.
 52. Uezumi I, Terasima M, Kohzuki T, Irie K, Ochi H, Noguchi H, et al. Effects of a human anti-flagellar monoclonal antibody in combination with antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1290-1295.
 53. Beatson SA, Whitchurch CB, Sargent JL, Levesque RC, Mattick JS. Differential regulation of twitching motility and elastase production by *Wfr* in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2002; 184: 3605-3613.
 54. Hazes B, Sastry PA, Haykawa K, Read RJ, Irvin RT. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin suggests a main-chain-dominated mode of receptor binding. *J Mol Biol* 2000; 292: 1005-1017.
 55. Wozniak JD, Keyser R. Effects of Subinhibitory Concentrations of Macrolide Antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* February 2004; vol. 125 no. 2 suppl 62 S-69.
 56. Sheth HB, Lee KK, Wong WY, Srivastava G, Hindsgaul O, Hodges RS, et al. The pilli of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAK and PAO bind specifically to the carbohydrate sequence β GalNac(1 $\rightarrow$ 4) beta Gal analogs. *Can J Microb* 1994; 44: 307-311 u Foldvari M, Jaafari MR, Radhi J, Segal D. Efficacy of the Antiadhesin Octyl O-(2-Acetamido-2-Deoxy- β -d- Galactopyranosyl)-(1-4)-2-O-Propyl- β -d-Galactopyranoside (Fimbrigel-P) in a Rat Oral Candidiasis Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005; 49(7): 2887-2894.
 57. Craig L, Pique ME, Tainer JA. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2, 363-378 u Rehm BHA. *Pseudomonas*. Model Organism, Pathogen. Cell Factory. 2008. Wiley-VCH. Weinheim.

-
58. Folkhard W, Marvin DA, Watts TH, Parachych W. Structure of polar pili from *Pseudomonas aeruginosa* strains K and O. *J Mol Biol* 1981; 149: 79-93 u Rehm BHA. *Pseudomonas*. Model Organism, Pathogen. Cell Factory. 2008. Wiley-VCH. Weinheim.
59. Watts TH, Kay CM; Hodges RS, Paranchych W. Mapping of the antigenic determinants of *Pseudomonas aeruginosa* PAK polar pili. *Biochemistr* 1983; 22: 3640-3646. u Rehm BHA. *Pseudomonas*. Model Organism, Pathogen. Cell Factory. 2008. Wiley-VCH. Weinheim.
60. Forest KT, Tainer JA. Type-4 pilus-structure: Outside to inside and top to bottom—A minireview. *Gene* 1997; 192: 165-169.
61. Burrows LL. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annu Rev Microbiol* 2012; 66: 493-520.
62. Hahn HP. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* rev. *Gene* 1998 ; 192: 99-108.
63. Jyot J, Ramphal R. Pili of *Pseudomonas aeruginosa* u Rehm BHA. *Pseudomonas*. Model Organism, Pathogen. Cell Factory. 2008. Wiley-VCH. Weinheim.
64. Kato J, Sakai Y, Nikata T, Ohtake H. Cloning and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene involved in the negative regulation of phosphate taxis. *J Bacteriol* 1994; 176, 5874-5877.
65. Tremblay J, Déziel E. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC Genomics* 2010; 11:587.
66. Köhler T, Curty LK, Barja F, van Delden C, Pechère JC. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent on Cell-to-Cell Signaling and Requires Flagella and Pili. *J Bacteriol*. 2000 Nov; 182(21): 5990–5996.
67. Bradly DE. A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. *Can J Microbiol* 1980; 26: 146-153.
68. Poole K, Hancock R. Phosphate transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Biochem* 1984; 144: 607-612.
69. Craven R, Montie TC. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* chemotaxis by the nitrogen source. *J Bacteriol* 1985; 164, 544-549.
70. Kato J, Nakamura T, Kuroda A, Ohtake H. Cloning and characterization of chemotaxis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 1999; 63:155–161.

-
71. Matsuki A, Nakamura J, Ohga T, Umezaki R, Kato J, Ohtake H. Isolation and characterization of chemotaxis mutants and genes of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 1995; 177: 948-952.
72. Shitashiro M, Tanaka H, Hong CS, Kuroda A, Takiguchi N, Ohtake H, et al. Identification of chemosensory proteins for trichloroethylene in *Pseudomonas aeruginosa*. J Biosci Bioeng 2005 Apr; 99(4): 396-402.
73. Toyofuku M, Uchiyama H, Nomura N. Social Behaviours under Anaerobic Conditions in *Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Microbiology 2012; Vol 2012, Article ID 405191.
74. Knežević P. Primena *Pseudomonas aeruginosa* bakteriofaga kao antimikrobnih agenasa. 2009. Doktorska disertacija. Novi Sad.
75. <http://en.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas>
76. Bardoel WB, Hartsink D, Vughs MM, de Haas CJC, van Strijp JAG, van Kessel KP. Identification of an immunomodulating metalloprotease of *Pseudomonas aeruginosa* (IMPa). Cellular Microbiology 2012; 14(4): 902-913.
77. Wood DE, Straus DC, Johanson WG, Bass JA. Role of salivary protease activity in adherence of Gram negative bacilli to mammalian buccal cells. J Clin Invest 1981; 68 (6): 1435-1444.
78. Iglewski B, Sadoff J, Bjorn MJ, Maxwell ES. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S: An adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A (ADP-ribose/NAD⁺/bacterial exoenzymes/elongation factors 1 and 2/diphtheria toxin). Biochemistry Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1978; 75(7): 3211-3215.
79. Nicas TI, Iglewski BH. The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Can J Microbiol 1985 Apr; 31(4): 387-92.
80. Galloway DR. *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent development. Molecular Microbiology 1991; 5 (10): 2315–2321.
81. Heck LW, Alarcon PG, Kulhavy RM, Morihara K, Russell MW, Mestecky JF. Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. J Immunol. 1990 Mar 15; 144(6): 2253-7.
82. Kuang Z, Hao Y, Walling BE, Jeffries JL, Ohman DE, Lau GW. *Pseudomonas aeruginosa* Elastase Provides an Escape from Phagocytosis by Degrading the Pulmonary Surfactant Protein-A. Plos one. 2011, DOI: 10.1371/journal.pone.0027091

-
83. Liu PV. Extracellular Toxins of *pseudomonas aeruginosa*. The Journal of Infectious diseases 1974; 130: 94-99.
84. Barker AP, Vasil AI, Filloux A, Ball AG, Wilderman PJ, Vasil ML. A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. Mol. Microbiol 2004; 53: 1089-1098.
85. Hamish G, Cordwell USJ, Lamont IL. Immunoproteomics To Examine Cystic Fibrosis Host Interactions with Extracellular *Pseudomonas aeruginosa* Proteins Infection and Immunity, October 2008; Vol. 76, No. 10: 4624-4632.
86. Randall TI. Attachment and Colonization of *Pseudomonas aeruginosa*: Role of the Surface Structures *Pseudomonas aeruginosa* as an Opportunistic Pathogen Infectious Agents and Pathogenesis *Pseudomonas aeruginosa* as an Opportunistic Pathogen u Rehm BHA. *Pseudomonas*. Model Organism, Pathogen. Cell Factory. 2008. Wiley-VCH. Weinheim.
87. Doig P, Sastry PA, Hodges RS, Lee KK, Paranchych W, Irvin RT. Characterisation of the binding of *Pseudomoas aeruginosa* alginate to human epithelial cells. Infec Immun 1990; 55: 1517-1522.
88. Lilliehoj EP, Kim BT, Kim KC. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc 1 mucin. Am J Physiol Lung Cell Mol Phys 2002; 282: 1751-175 u Rehm BHA. *Pseudomonas*. Model Organism, Pathogen. Cell Factory. 2008. Wiley-VCH. Weinheim.
89. Farinha MA. Alteration of the pilin adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* PAO results in normal pilus biogenesis but a loss of adherence to human pneumocyte and decrease virulence in mice. Infec Immun 1994; 62: 4118-4123 u Rehm BHA. *Pseudomonas*. Model Organism, Pathogen. Cell Factory. 2008. Wiley-VCH. Weinheim.
90. Franklin AI, Todd T, Gurmman G, Black D, Mankinen-Irwin P, Irwin R. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to cilia of human tracheal epithelial cells. Infec Immun 1987; 55: 1523-1525 u Rehm BHA. *Pseudomonas*. Model Organism, Pathogen. Cell Factory. 2008. Wiley-VCH. Weinheim.
91. Campbell AP, Spyropoulos L, Wong WY, Irvin RT, Sykes BD. Interaction of a peptide from the receptor-binding domain of *pseudomonas aeruginosa* pili stain PAK with a cross-reactive antibody: changes in backbone dynamics induced by binding. Biochemistry 2003; 42: 11334-11346.

-
92. Schweizer F, Jiao H, Hindsgaul O. Interaction between the pilli of *Pseudomonas aeruginosa* PAK and its carbohydrate receptor β GalNac(1 $\rightarrow$ 4) beta Gal analogs. Can J Micbiol 2006; 44: 307-311 u Rehm BHA. *Pseudomonas*. Model Organism, Pathogen. Cell Factory. 2008. Wiley-VCH. Weinheim.
93. Doig P, Todd T, Sastry PA, Lee KK, Hodges RS, Paranchych W, et al. Role of pili in adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human respiratory epithelial cells. Infec Immun 1988; 56: 1641-1646 u Rehm BHA. *Pseudomonas*. Model Organism, Pathogen. Cell Factory. 2008. Wiley-VCH. Weinheim.
94. Mattick JS. Type IV pili and twitching motility. Annu Rev Microbiol 2002; 56: 289-314.
95. Tang HB, Kays M, Prince A. Role of *Pseudomonas aeruginosa* pili in acute pulomonyary infection. Infec Immun 1995; 63: 1278-1285.
96. Woods DE, Staus DC, Johanson WG, Berry VK, Bass JA. Role of pili in adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mamalian buccal epithelial cells. Infec Immun 1980; 29: 1146-115 u Saiman L, Cacalano G, Prince A. *Pseudomonas cepacia* adherence to respiratory epithelial cells is enhanced by *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun. Aug 1990; 58(8): 2578–2584.
97. Irvin RT, Cari H. Immunochemical examination of the *Pseudomoas aeruginosa* glycocalix: a monoclonal antibody witch recognizes L-guluronic acid residues of algiic acid. Can J Microbiol 1985; 31: 268-275.
98. Scharfman A, Arora SK, Delmotte P, Van Brussel E, J. Mazurieret J, Ramphal R, et al. Recognition of Lewis X derivates present on mucins by flagellar components of *Pseudmonas aeruginosa*. Infect Immun 2001; 69: 5243-5248.
99. McNamara N, Khong A, McKemy D, Caterina M, Basbaum, Julius D, et al. ATP transduces signals from ASGM1, a glycolipid that functions as a bacterial receptor. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 9086-9091.
100. Prince A. Flagellin activation of epithelial singaling. Am J Resp Cells Mol Biol 2006; 34: 548-551.
101. Kunzelmann K, Scheidt K, Scharf B. Flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* inhibitsa Na⁺ transport in airway epithelia. FASEB J 2006; 05-4454.
102. Spormann AM. Physiology of microbes in biofilms. Curr Top Microbiol Immunol. 2008;322:17-36.

-
103. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol* 2005; 13(1): 7-10.
 104. McDougald D, Klebensberger J, Tolker-Nielsen T, Webb JS, Conibear T. Chapter 9. *Pseudomonas aeruginosa*. A Model for Biofilm Formation u *Pseudomonas*. In: *Rehm BRHA*. Model Organism, Pathogen, Cell Factory. Wiley online library. 2008.
 105. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microb* 1998; 30: 295-304.
 106. Wimpenny J. Structural Determinations in Biofilm Formation. In: Evans LV. *Biofilms: Resent Advances in their Study and Control*. Harwood Academic Publisher, 2000.
 107. Davies DG, Parsek MP, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. *Pseudomonas aeruginosa* Cell-to-Cell Signaling Is Required for Virulence in a Model of Acute Pulmonary Infection. *Science* 1998; 280: 295-298.
 108. Barraud N, Schleheck D, Klebensberger J, Webb JS, Hassett DJ, Rice SA, et al. Nitric Oxide Signaling in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Mediates Phosphodiesterase Activity, Decreased Cyclic Di-GMP Levels, and Enhanced Dispersal. *J. Bacteriol* December 2009; 191(23): 7333-7342.
 109. Schleheck DR, Barraud N, Klebensberger J, Webb JS, McDougald D, Rice SA, et al. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 preferentially grows as aggregates in liquid batch cultures and disperses upon starvation. *PLoS One*. 2009; 4(5):e5513. Epub 2009 May 13.
 110. Gjermansen M, Ragas P, Sternberg C, Molin S, Tolker-Nielsen T. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ Microbiol*. 2005; 7(6): 894-90.
 111. Bjarnsholt T, Jensen PØ, Rasmussen TB, Christophersen L, Calum H, Hentzer M, at al. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology* 2005; 151(12): 3873-80.
 112. Rikalović M, Gojgić-Cvijović G, Vrvic M, Karadžić M. Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Serb. Chem Soc* 2012; 77(1): 27-42.
 113. Mann EE, Wozniak DJ. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiology Reviews* 2012; 36: 893-916.

-
114. Haley LC, Colmer-Hamood AJ, Hamood NA. Characterization of biofilm-like structures formed by *Pseudomonas aeruginosa* in a synthetic mucus medium. *BMC Microbiology* 2012; 12:181.
 115. Costerton JW, Stewart SP, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infection. *Science* 21 May 1999; 284 (5418): 1318-1322.
 116. Häußler S, Ziegler I, Löttel A, v. Götz F, Rohde M, Wehmhöner D, et al. Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *J Med Microbiol* 2003; 52(2): 295-301.
 117. Witchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Matick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 2002; 295; 1487.
 118. Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR, Worrall KE, Camara M, Williams P. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol Microbiol* 2003; 50: 29-43.
 119. Lepine F, Deziel E, Milot S, Rahme LG. A stable isotope dilution assay for the quantification of the *Pseudomonas* quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa* cultures *Biochem Biophys Acta* 2003; 1622: 36-41.
 120. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358: 135-138.
 121. Murakawa T. Chemical Analysis of Two Varieties of Slime Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Japanese Journal of Microbiology* 1973; 17(6): 513-520.
 122. Kelly SJ. Decreased pulmonary lactoferrin activity facilitates *Pseudomonas* biofilm formation in CF *Thorax* 2005; 60:54 doi:10.1136/thx.2004.la0130.
 123. Mayansky AN, Chebotar IV, Rudneva EI, Chistyakova VP. *Pseudomonas aeruginosa*: Characteristics of the biofilm process. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology* March 2012; 27(1): 1-6.
 124. Williams P, Winzer K, Chan WC, Camara M. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans Roy Soc B* 2007; 362: 1119-1134.
 125. Manos J, Arthur J, Rose B, Tingpej P, Fung C. Transcriptome analyses and biofilm-forming characteristics of a clonal *Pseudomonas aeruginosa* from the cystic fibrosis lung. *J Med Microbiol* 2008; 57: 1454-1465.

-
126. de Kievit RT, Gillis R, Marx S, Brown C, Iglewski B. Quorum-Sensing Genes of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Their Role and Expression Patterns. *Applied and Environmental Microbiology* Apr, 2001; 6(4): 1865-1873.
 127. Xu R. Spatial growth patterns of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Master of Science. 2004. Montana State University.
 128. Drenkard E, Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 2002 Apr; 18,416(6882):740-3.
 129. Stewart PS. Diffusion in Biofilms. *J. Bacteriol* March 2003; 185(5): 1485-1491.
 130. Déziel E, Comeau Y, Villemur CY. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol* 2001; 183(4): 1195-204.
 131. Lee JH, Kim YG, Cho MH, Kim JA, Lee J. 7-fluoroindole as an antivirulence compound against *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters* 2012; 329 (1): 36–44.
 132. Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 881-890.
 133. Winzer K, Falconer C, Garber NC, Diggle SP, Camara M, Williams P. The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J Bacteriol*. 2000 Nov; 182(22): 6401-11.
 134. Alhede M, Bjarnsholt T, Givskov M, Alhede M. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: mechanisms of immune evasion. *Adv Appl Microbiol* 2014; 86: 1-40.
 135. Bainton NJ, Stead P, Chhabra SR, Bycroft BW, Salmond GPC, et al. N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochem J* 1992; 288: 997-1004.
 136. Bainton NJ; Bycroft BW, Chhabra SR, Stead P, Gledhill L et al. A general role for the *lux* autoinducer in bacterial cell signaling: Control of antibiotic biosynthesis in *Erwinia*. *Gene* 1992; 116: 87-781.
 137. Eberhard A, Burglongame AL, Eberhard C, Kenyo GL; Nealson KH, Oppenheimer NJ. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* 1981; 20: 2444-2449.
 138. Schuster M, Greenberg EP. Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. *BMC Genomics* 2007; 8:287.

-
139. Gupta R, Gobble TR, Schuster M, Gid A. Posttranscriptionally regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2009 Sep;191(18):5785-92.
140. Müh U, Schuster M, Heim R, Singh A, Olson ER, Greenberg EP. Novel *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors identified in an ultra-high-throughput screen. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Nov;50(11):3674-9. Epub 2006 Sep 11.
141. Takaya A, Tabuchi F, Tsuchiya H, Isogai E, Yamamoto T. Negative regulation of quorum-sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* by ATP-dependent Lon protease. J Bacteriol Jun 2008; 190(12): 4181-8.
142. Engebrecht J, Silverman M. Regulation and expression of bacterial genes for bioluminescence. Genet Eng 1986; 8: 31-44 u Janiciewich WJ. Biocontrol of postharvest disease of temperate fruits. Challenges and opportunities u Boland GJ, Kuykendall LD. Plant-microbe interactions and biological control. Marcel Dekker Inc. 1998. New York.
143. Ochsner UA, Koch A, Fiechter A, Reiser J. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 1994; 176: 2044-2054.
144. Brint JM, Ohman DE. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. Bacteriol 1995; 177: 7155-7163.
145. Latifi A, Foglino M, Tanaka K, Williams P, Lazdunski A. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhlR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. Mol Microbiol 1996; 21: 1137-1146.
146. Latifi A, Winson MK, Foglino M, Bycroft BW, Stewart GSAB et al. Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Mol Microb 1995; 17: 333-343.
147. Gambello ML, Iglewski BH. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. J Bacteriol 1991; 173: 3000-3009.
148. Pearson JP, Feldman M, Iglewski BH, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. Infect Immun 2000; 68: 4331-4334.

-
149. Pearson JP, Van Delden C, Iglewski BH. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* 1999; 181: 1203-1210.
150. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000; 406: 959-964.
151. Chugani SA, Whiteley M, Lee KM, D'Argenio D, Manoil C, Greenberg EP. QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 2752-2757.
152. Juhas M, Wiehlmann L, Huber B, Jordan D, Lauber J, Salunkhe P, et al. Global regulation of quorum sensing and virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2004; 150: 831-841.
153. Pesci EC, Milbank JBJ, Pearson JP, McKnight S, Kende AS et al. Quinolone signalling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 11229-11234.
154. Wilder C, Allada G, Schuster M. Instantaneous Within-Patient Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Populations from Cystic Fibrosis Lung Infections. *Infect Immun* 2009; 77 (12): 5631-5639.
155. Storey DG, Ujack EE, Rabin HR, Mitchell I. *Pseudomonas aeruginosa* lasR transcription correlates with the transcription of lasA, lasB, and toxA in chronic lung infections associated with cystic fibrosis. *Infect Immun* 1998; 66: 2521-2528.
156. Lawrence RN, Dunn WR, Bycroft B, Camara M, Chhabra SR et al. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule, N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lacton, inhibits porcine arterial smooth muscle contraction. *Br J Pharmacol* 1999; 128, 845-848.
157. Hooi DSW, Bycroft BW, Chhabra SR, Williams P, Pritcard DI. Differential immune modulatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules *Infect Immun* 2004; 72: 6463-647.
158. Jensen PO, Bjarnsholt T, Phipps R, Rasmussen TB, Calum H et al. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum sensing controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2007; 153: 1329-1338.

-
159. Wu H, Song ZJ, Hentzer M, Adnersen JB, Heydorn A, Mathee K, et al. Detection of N-acylhomoserine lactones in lung tissues of mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 2000; 146: 2481-2493.
160. Worlitzsash D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. J Clin Invest 2002; 109: 317-325.
161. Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP, et al. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. Nature 2000; 407: 762-764.
162. Machan ZA, Taylor GW, Pitt TL, Cole PJ, Wilson R. 2-Heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide, an antistaphylococcal agent produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1992; 30: 615-623.
163. Collier DN, Anderson L, McKnight M, Noah TL, Knowles M, Boucher R, et al. A bacterial cell to cell signal in the lungs of cystic fibrosis patients. FEMS Microbiol Lett 2002; 215: 41-46.
164. Middleton B, Rodgers HC, Camara M, Khoj AJ, Williams, Hardman A. Direct detection of N-acylhomoserine lactones in cystic fibrosis. FEMS Microbiol Lett 2002; 207: 1-7.
165. Guina T, Purvine SO, Yi EC, Eng J, Goodlett DR, Aenersodt R, et al. Quantitative proteomic analysis indicates increased synthesis of a quinolone by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis airways. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 2771-2776.
166. Riedel K, Hentzer M, Geisenberger O, Huber B, Steidle A, Hoiby N, et al. N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms Microbiology 2001; 17: 3249-3262.
167. Heurlier K, Dénervaud V, Haas D. Impact of quorum sensing on fitness of *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Med Microbiol. 2006 Apr; 296(2-3): 93-102.
168. Davey P, Brown E, Fenelon L, Finch R, Gould I, Holmes A et al. Systematic Review of Antimicrobial Drug Prescribing in Hospitals 2006;(12):211-16.
169. Lequette Y, Greenberg EP. Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas Aeruginosa* biofilm. J Bacteriol 2005; 187: 37-44.

-
170. Sakuragi Y, Kolter R. Quorum-Sensing Regulation of the Biofilm Matrix Genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2007; 189: 5383-5386.
171. Glessner A, Smith RS, Iglewski BH, Robinson JB. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* Quorum-Sensing Systems in Control of Twitching Motility J Bacteriol 1999; 181: 1623-1629.
172. Schwarzer C, Fu Z, Patanwala M, Hum L, Lopez-Guzman M, Illek B, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-associated homoserine lactone C12 rapidly activates apoptosis in airway epithelia. Cellular Microbiology 2012; 14: 698-709.
173. Boşgelmez-Tinaz G, Ulusoy S. Characterization of N-butanoyl-L-homoserine lactone (C4-HSL) deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Microb Pathog 2008 Jan; 44(1): 13.
174. Dong YH, Wang LH; Zhang LH. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. Philos Trans R Soc Lond B Biol sci 2004; 362: 1201-1211.
175. Chun CK, Ozer EA, Welsh MJ, Zabner J, Greenberg EP. Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. Proc Natl Sci USA 2004; 101: 3587-3590.
176. Reimann C, Ginet N, Michel L, Keel C, Michaux P, Krishnapillai V, et al. Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Microbiology 2002; 148: 923-932.
177. Lin YH, Xu JL, Hu JY, Wang LH, Ong SI, Leadbetter JR, et al. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. Mol Microbiol 2003; 47: 849-860.
178. Givskov M, DeNys R, Manefield M, Gram L, Maximilien R et al. Eucaryotic interference with homoserine lactone-mediated procaryotic signalling. J. Bacteriol 1996; 178: 6618-6622.
179. Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. EMBO J 2003; 22(15): 3803-3815.
180. Le Berre R, Faure K, Nguyen S, Pierre M, Ader F, Guery B.[Quorum sensing: a new clinical target for *Pseudomonas aeruginosa*?] Med Mal Infect. 2006 Jul; 36(7): 349-57.
181. Favre-Bonté S, Chamot E, Köhler T, Romand JA, van Delden C. Autoinducer production and quorum-sensing dependent phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* vary

- according to isolation site during colonization of intubated patients. BMC Microbiol 2007; 18: 7: 33.
182. Skindersoe ME, Alhede M, Phipps R, Yang L, Jensen PO et al. Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2008 Oct; 52(10): 3648-63.
183. Nick JA, Moskowitz SM, Chmiel JF, Forssén AV, Kim SH, et al. Azithromycin May Antagonize Inhaled Tobramycin When Targeting *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. Annals of the American Thoracic Society 2014; 11(3): 342-350.
184. Milić DJ, Živić SS, Bogdanović DC, Golubović ZV. Risk factors related to the failure of venous leg ulcers to heal with compression treatment. Journal of vascular surgery 2009; 49: 1242-47.
185. Lam JS, Chan R, Lam K, Costerton W. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. Infect. Immun 1980; 28: 546-556.
186. jac.oxfordjournals
187. Caldwell CC, Chen Y, Goetzmann SH, Hao Y, Borchers MT, Hassett DJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin Pyocyanin Causes Cystic Fibrosis Airway Pathogenesis. Am J Pathol 2009; 175 (6): 2473–2488.
188. Sherrard LJ, Tunney MM, Elborn S. Antimicrobial resistance in the Antimicrobial resistance in the respiratory microbiota of people with cystic fibrosis. Lancet 2014; 384 (9944): 703-13.
189. McColley AS. Practice Guidelines, Clinical Trials, and Unexpected Results in Cystic Fibrosis, Annals of the American Thoracic Society 2014; 11 (3): 402-403.
190. Brüßow H. *Pseudomonas* Biofilms, Cystic Fibrosis, and Phage: a Silver Lining? mBio 2012; 3 (2): 00061-12.
191. Rehm BHA. *Pseudomonas*. Model Organism, Pathogen. Cell Factory. 2008. Wiley-VCH. Weinheim.
192. Jelsbak L, Johansen HK, Frost AL, Thøgersen R, Thomsen LE, et al. Molecular Epidemiology and Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* Populations in Lungs of Cystic Fibrosis Patients Infection and Immunity 2007; 75 (5): 2214-2224.

-
193. Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000 May 19; 288(5469): 1251-4.
194. <http://www.oxfordjournals.org/en/our-journals/index.html>
195. Persson AE. Study of *Pseudomonas aeruginosa* and different wound dressing products. Master of Science Thesis. Department of Science and Biological Engineering. Chalmers university of technology. 2010.
196. Poh CL, Yap EH, Tay L, Loh GK, Thong TW. Predominance of *Pseudomonas aeruginosa* serotype 11, pyocin types 1 and 10 in Singapore. *Singapore Med J*. 1986; 27(2): 135-9.
197. Sardelić S. Metallo- β -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonasa aeruginose* otpornih na karbapenemske antibiotike. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2010.
198. Goto S, Tsuji A, Oguri T, Kobayashi, Nishida M, Yabuuchi E. Present situation of serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* in Japan and correlation among three kinds of commercially available serotyping kits. *J Infec Chemother* 1999; 5: 201-205.
199. Zierdt CH, Schmidt PJ. Dissoaciation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. May 1964; 87(5): 1003–1010.
200. Soler CP, Gidenne S, Saint-blancard P, Kerlegu A, Gerome P. Recovery method of serotypable character in non serotypable *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Pathologie Biologie* 2004; Vol. 52, Issue 1: 33-38.
201. Lamont IL, Martin W. Identification and characterisation of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2003; Pt 4: 833-4.
202. Lomholt JA, Poulsen K, Kilian M. "Epidemic population structure of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a clone that is pathogenic to the eye and that has a distinct combination of virulence factors". *Infection and Immunity* 2001; 69, (10): 6284–6295.
203. Mavrodi DV, Peever TL, Mavrodi OV, Parejko JA, Raaijmakers JM, Lemanceau P, et al. Diversity and Evolution of the Phenazine Biosynthesis Pathway Applied and Environmental Microbiology 2010; 76 (3): 866-879.
204. Smirnov V, Kiprianova E. *Bacteria of Pseudomonas genus*. Naukova Dumka. Kijev. 1990.

-
205. Turner JM, Messenger AJ. Occurance, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. *Adv Microb Physiol* 1986; 211-275.
206. Britton G. Biochemistry of natural pigments. Cambridge University Press. Cambridge, 1983.
207. Fucua C, Parek MR, Greenberg EP. Regulation of gene expresion by cell-to- cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* 2001; 35: 439-468.
208. Déziel E, Gopalan S, Tampakaki AP, Lépine F, Padfield KE et al. The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhlRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Mol Microbiol.* 2005; 55(4): 998-1014.
209. Laursen JB, Nielsen J. Phenazine natural products: Biosynthesis, synthetic analogus and biological activity. *Chem Rev* 2004; 104 (3): 1663-1686.
210. Price-Whelan A. Pyocyanin Alters Redox Homeostasis and Carbon Flux through Central Metabolic Pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* 2007; 189 (17): 6372-6381.
211. Wilson RD, Sykes A, Watson D, Rutman A, Taylor GW, Cole PJ. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium. *Infect Immun* 1988; 56: 2515–2517.
212. Lau GW, Hassett DJ, Ran HM, Kong HS. The role of pyocianin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trend Mol.Med* 2004; (10): 599-606 u Rehm BHA. *Pseudomonas*. Model Organism, Pathogen. Cell Factory. 2008. Wiley-VCH. Weinheim.
213. Lau GW, Ran H, Kong F, Hassett DJ, Mavrodi D. *Pseudomonas aeruginosa* Pyocyanin Is Critical for Lung Infection in Mice *Infect Immun.* 2004 July; 72(7): 4275–4278.
214. Parsons JF, Calbrese K, Eisenttein E Ladner JE. Structure of the phenazine biosynthesis enyzme. *Acta Crystallogy* 2004; 60: 2110-2113.
215. Hassan HM, Fridovich I. Mechanism of the antibiotic action of pyocianine. *J bacteriol* 1980; 141: 156-163.
216. Pomposiello PJ, Demple B. Redox-operated genetic switches: the Sor B and OxyB transcription factors. *Trends Biotechnol* 2001 ; 19:109-114.

-
217. Ochsner UA, Vasil MI, Alsabghagh E, Parvatiyar K, Hasset DJ. Role of the *Pseudomonas aeruginosa* *oxyR-recG* operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of *katB-ankB*, *ahpB* and *ahpC-ahpF*. J Bacteriol 2000; 182: 4533-4544.
218. Dietrich LE P; Price-Whelan A, Petersen A, Whiteley M, Newman DK. The phenazine pyoyianin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol 2006; 61: 1308-1321.
219. Palma M, Zurita J, Ferreras JA, Worgall S, Larone DH et al. *Pseudomonas aeruginosa* SoxR does not conform to the archetypial paradigm for SoxR-dependent regulation of the bacterial oxidative stress adaptive response. Infect Immun 2005; 73: 2958-2966.
220. de Graef MR, Alexeeva S, Snoep JL, de Mattos MJT. The steady-state internal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli*. J. Bacteriol 1999; 181: 2351-2357.
221. Wimpenny JWT, Firth A. Levels of nicotinamide adenine dinucleotide and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in facultative bacteria and the effect of oxygen. J. Bacteriol 1972; 111: 24-32.
222. Friedheim E. Pyocyanine, an accessory respiratory pigment. J. Exp. Med 1931; 54: 207-221.
223. Sweet WJ, Peterson JA. Changes in cytochrome content and electron transport patterns in *Pseudomonas putida* as a function of growth phase. J. Bacteriol 1978; 133: 217-224.
224. Fultz ML, Durst RA. Mediator compounds for the electrochemical study of biological redox systems: a compilation. Anal. Chim. Acta 1982; 140: 1-18.
225. Friedheim E, Michaelis L. Potentiometric study of pyocyanine. J. Biol. Chem 1931; 91: 355-368.
226. Cox CD. Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin. Infect. Immun 1986; 52: 263-270.
227. Hernandez ME, Kappler A, Newman DK. Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. Appl. Environ. Microbiol 2004; 70: 921-928.

-
228. *Sardelić S.* Rezistencija na antibiotike u *Pseudomonas aeruginosa*. Infektološki glasnik 2009; 29(4): 177–183.
229. *Livermore MD.* Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? Clin Infect Dis 2002;34(5):634-40 u *Sardelić S.* Metallo- β -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonasa aeruginose* otpornih na karbapenemske antibiotike. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2010.
230. *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.
231. *Livermore DM.* Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. Antimicrob Agents Chemother Antimicrob Chemother 2001; 47: 247–50.
232. *Beesley T, Gascoyne N, Knott-Hunziker V, Petursson S, Waley SG, Jaurin B, et al.* The inhibition of class C β -lactamases by boronic acids. Biochem J. 1983 Jan 1; 209(1): 229–233.
233. *Poole K.* Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *pseudomonas aeruginosa* and related organism. J Mol Microbial Biotechnol 2001; 3:255-64.
234. *Ziha-Zafiri I, Lanes C, Kohler 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 u *Sardelić S.* Metallo- β -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonasa aeruginose* otpornih na karbapenemske antibiotike. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2010.
235. *Erdeljić V.* Utjecaj primjene antimikrobne terapije na selekciju mikroorganizama koji produciraju beta-laktamaze proširenog spektra (AmpC i ESBL) i ishod liječenja bolesnika. [Doktorska disertacija]. Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2012.
236. *Pitout JD.* Infections with extended spectrum beta lactamase producing Enterobacteriaceae. Drugs 2010; 70: 313-33.
237. *Datta N, Kontomichalou P.* Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. Nature 1965; 208: 239-241.
238. *Naas T, Nordmann P.* OXA-type β -lactamases. Curr Pharm Des. 1999; 5: 865-79.

-
239. Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2859-2863.
240. Sanshagrín F, Bejaoui N, Levasque RC. Structure of CARB-4 and AER-I carbemcillin hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(8): 1966-72.
241. 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.
242. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-1233.
243. Phillipon A, Labia R, Jacoby G. Extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agent Chemother* 1989; 33: 1131-1136.
244. Casellas JM, Goldberg M. Incidence of strains producing extended spectrum β -lactamases. *Infection* 1989; 17(6): 88-90.
245. Bradford PA. Extended-Spectrum β -lactamases in 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4): 933-51.
246. Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, et al. Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(1): 1-4.
247. Petit A, Sirot DL, Chanal CM, Sirot JL, Labia R, Gerbaud G, et al. Novel plasmid mediated β -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* more resistant to ceftazidime than to other broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agent Chemother* 1988; 32(5): 626-630.
248. Petit A, Yaghlane-Bouslama HB, Sofer L, Labia R. Characterization of chromosomally encoded penicillinases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29: 629-638.
249. Sirot D, Recule C, Chaibi EB, Bret L, Croize J, Chanal-Clarís C, et al. A complex mutant of TEM-1 beta-lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-

- spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1997 Jun; 41(6): 1322-5.
250. *Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser H, Bonomo MD, Bonomo RA.* Extended-spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* blood stream isolates from seven countries: Dominance and wide spread prevalence of SHV and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3554-3560.
251. *Sougakoff W, Petit A, Goussard S, Sirot D, Bure A, Courvalin P.* Characterization of the plasmid genes blaT-4 and blaT-5 which encode the broad-spectrum beta-lactamases TEM-4 and TEM-5 in enterobacteriaceae. *Gene* 1989;78(2):339-48 u *Sardelić S.* Metallo- β -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonasa aeruginose* otpornih na karbapenemske antibiotike. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2010.
252. *Bonnet R.* Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1-14.
253. *Ma L, Ishii Y, Ishiguro M, Matsuzawa H, Yamaguchi K.* Cloning and sequencing of the gene encoding toho-2 a class A beta lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1181-1186.
254. *Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Mangold P, Amann S, Akalin O, et al.* Charaacterization of beta-lactamase gene blaPER-2, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Animicrob Agents Chemother* 1996; 40: 616-620.
255. *Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, Coskunkan F, Yaman A, Kaygusuz H. et all.* Widespread detection of PER-1-tipe extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2265-2269.
256. *Baquero F, Coque TM, Canton R.* Antibiotics, complexity and evolution. *ASM News* 2003; 69: 547–552.
257. *Pitout JD, Laupland KB.* Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public health concern. *Lancet Infect Dis* 2008;8:159-166.
258. *Livermore DM, Woodford N.* The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol* 2006; 14: 413-420.

-
259. Rasmussen B, Bush K, Keeney D, Yang YR, Hare R, O'Gara C, et al. Characterization of IMI-1 β -lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. Antimicrob. Agents Chemother 1996; 40: 2080-2086.
260. Frere JM, Galleni M, Bush K, Dideberg O. Is it necessary to change the classification of β -lactamases? J. Antimicrob. Chemother 2005; 55: 1051-1053.
261. Mariotte-Boyer S, Nicolas-Chanoine MH, Labia R. A kinetic study of NMC-A β -lactamase, an Ambler class A carbapenemase also hydrolyzing cephamycins. FEMS Microbiol. Lett; 1996; 143: 29-33.
262. Gales AC, Biedenbach DJ, Winokur P, Hacek DM, Pfaller MA, Jones RN. Carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates producing Bush group 2f β -lactamase (SME-1) in the United States: results from the MYSTIC Programme. Diagn. Microbiol. Infect. Dis 2001; 39: 125-127.
263. Gales AC, Menezes, LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. J Antimicrob Chemother 2003; 52(4): 699-702.
264. Nordmann P, Mariotte S, Naas T, Labia R, Nicolas MH. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase for *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother 1993; 37: 939-946.
265. Aubron C, Poirel L, Fortineau N, Nicolas P, Collet L, Nordmann P. Nosocomial spread of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the metallo-beta-lactamase VIM-2 in a hematology unit of a French hospital. Microb Drug Resist 2005; 11(3): 254-9.
266. Bratu S, Landman D, Alam M, Tolentino E, Quale J. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter sp.* from Brooklyn, New York. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 776-778.
267. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother 2001; 45:1151-1161.
268. Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York City. Clin. Infect. Dis 2004; 39: 55-60.

-
269. Giakkoupi P, Petrikos G, Tzouvelekis LS, Tsonas S, Legakis NJ, Vatopoulos AC. Spread of integron-associated VIM-type metallo- β -lactamase genes among imipenem nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* strains in Greek hospitals. J Clin Microbiol 2003; 41: 822-5.
270. Poirel L, Lambert T, Turkoglu S, Ronco E, Gaillard J, Nordmann P. Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the blaVIM-2 carbapenem hydrolyzing β -lactamase gene and two novel aminoglycosides resistance gene cassettes. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(2): 546-52.
271. Poirel L, Weldhagen GF, C. De Champs C, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum β -lactamase GES-2 in South Africa. J. Antimicrob. Chemother 2002; 49: 561-565.
272. Wachino JJ, Doi Y, Yamane K, Shibata N, Yagi N, Kubota T, et al. Molecular characterization of a cephamycin-hydrolyzing and inhibitor-resistant class A β -lactamase, GES-4, possessing a single G170S substitution in the omega-loop. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 2905-2910.
273. Bush K, Sykes RB. Characterization and epidemiology of β -lactamases. Elsevier Science Publishers BV. Philadelphia. PA. 1987.
274. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. J. Antimicrob. Chemother 2006; 57: 373-383.
275. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SGB. ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Int. J. Antimicrob. Agents 1993; 2: 81-87.
276. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HAPHM, Castro MES, Stier CJN, Bragagnolo KL, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. J. Clin. Microbiol 2003; 41:3403-3406.
277. Heritier C, Poirel L, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D, Nordmann P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother 2005; 49: 4174-4179.
278. Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore D. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* sp. collected over 10 years in three continents. Antimicrob. Agents Chemother 2006; 50:756-758.

-
279. Heritier C, Poirel L, Nordmann P. Genetic and biochemical characterization of a chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing Ambler class D β -lactamase from *Shewanella algae*. Antimicrob. Agents Chemother 2004; 48: 1670-1675.
280. Schneider I, Keuleyan E, Rasshofer R, Markovska R, Queenan AM, Bauernfeind A et al. VIM-15 and VIM-16, two new VIM-2-like metallo- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgaria and Germany. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(8): 2977-9.
281. Medeiros AA, Hedges RW, Jacoby GA. Spread of a "Pseudomonas-specific" beta-lactamase to plasmids of enterobacteria. J. Bacteriol 1982; 149(2): 700-707.
282. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemoter 1991; 35(1): 147-51 u Sardelić S. Metalo- β -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonasa aeruginosa* otpornih na karbapenemske antibiotike. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2010.
283. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of *bla*VIM a new integron borne metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(7): 1584-90 u Sardelić S. Metalo- β -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonasa aeruginosa* otpornih na karbapenemske antibiotike. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2010.
284. Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, Ito H, Ichiyama S, Shimokata K et al. Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -lactams, including carbapenems. Antimicrob Ag Chemother 1996; 40(2): 349-53 u Sardelić S. Metalo- β -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonasa aeruginosa* otpornih na karbapenemske antibiotike. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2010.
285. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm Clin Microbiol Rev 2005; 18(2): 306-25 u Sardelić S. Metalo- β -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonasa aeruginosa* otpornih na karbapenemske antibiotike. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2010.

286. *Pellegrini C, Mercuri PS, Celenza G, Galleni M, Segatore B, Sacchetti E, et al.* 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): 901-908.
287. *Lepšanović Z, Libisch B, Tomanović B, Nonković 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 u *Sardelić S.* Metallo- β -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonasa aeruginosa* otpornih na karbapenemske antibiotike. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2010.
288. *Strateva AT, Yordanov D.* *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol* 2009; 58: 1133-48 u *Sardelić S.* Metallo- β -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonasa aeruginosa* otpornih na karbapenemske antibiotike. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2010.
289. *Docquier JD, Lamotte-Brasseur J, Galleni M, Amicosante G, Frère JM, Rossolini GM.* On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo- β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 257-66 u *Sardelić S.* Metallo- β -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonasa aeruginosa* otpornih na karbapenemske antibiotike. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2010.
290. *Laraki N, Franceschini N, Rossolini GM, Santucci P, Meunier C, de Pauw, et al.* Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* metallo- β -lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob Agent. Chemother* 1999;43:902-6 u *Sardelić S.* Metallo- β -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonasa aeruginosa* otpornih na karbapenemske antibiotike. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2010.
291. *Castanheira M, Mendes RE, Walsh TR, Gales AC, Jones RN.* Emergence of the extended-spectrum β -lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004; 48:2344-2345.
292. *Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR.* Molecular characterization of a β -lactamase, *bla*GIM-1, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4654-61.

-
293. Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y. Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance Group. VIM- and IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* sp. and *Acinetobacter* sp. isolates disseminated in a Korean hospitals. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(7): 868-71.
294. Labbate M, Case RJ, Stokes HW. The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. *Methods in Molecular Biology* 2009; 532: 103-125.
295. Lee K, Lim JB, Yum JH, Yong D, Chong Y, Kim JM, Livermore DM. *bla*_{VIM-2} cassette-containing novel integrons in metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. *Antimicrob. Agents Chemother* 2002; 46: 1053-1058.
296. Karakasevic B. Rutinske metode u standardnom mikrobiološkom radu. Medicinska knjiga. Beograd-Zagreb. 1967.
297. Pitts B, Hamilton MA, Zelter N, Stewart PS. A microtitre-plate method for biofilm disinfection and removal. *J. Microbiol Methods* 2003; 54: 269-276.
298. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 2000; Vol 40, Issue 2: 175–179.
299. Stepanović S, Vuković D, Hala V, Di Bonaventura G, Djukić S et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007; 115 (8): 891–899.
300. Stepanović S, Vuković D, Jezek P, Pavlović M, Švabić-Vlahović M. Influence of Dynamic Conditions on Biofilm Formation by Staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 502-504.
301. Fonseca AP, Extremina C, Fonseca AF, Sousa JC. Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa* *J Med Microbiol* 2004; 53: 903-910; DOI: 10.1099/jmm.0.45637
302. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2013. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21st informational supplement. M 100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne. PA.
303. Stanisic V. Osnovne statističke metode za medicinare. Niš. 2001.
304. Vinsent JL, Bihari DL, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin M et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe: results of the

- European Prevalence of Infection in Intensive Care study. *Am J Med* 1995; 74: 639-44.
305. <http://www.bbc.co.uk/news/health-16645957>
306. <http://www.hpa.org.uk/hpr/archives/2011/news2511.htm#crbpmse>
307. <http://www.minzdravlja.info/downloads/2011/Oktobar/Oktobar2011NacionalnaStudijaPrevalencijeBolnickihInfekcijaProfdrLjiljanaMarkovicDenic.pdf>
308. Ranjan KP, Ranjan N, Bansal KS, Arora DR. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in Post-operative Wound Infection in a Referral Hospital in Haryana, India. *J Lab Physicians* 2011; 3(2): 129.
309. Kanno E, Kawakami K, Miyairi S, Tanno H, Keiko Ishii, Hayashi D. Skin wound healing and cytokine response promoted by a quorum-sensing molecule from *Pseudomonas aeruginosa* of *Immunology* 2012; 188: 55.16.
310. Jacobsen JN, Andersen AS, Krogfelt KA. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing on cellular wound healing responses in vitro. *Scand J Infect Dis*. 2012; 44(8): 615-9.
311. Gjødsbøl K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jørgensen T, Klein BM, Krogfelt KA. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *International Wound* 2006; 3(3): 225–231.
312. Sivanmaliappan S, Sevana M. Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa* from Diabetes Patients with Foot Ulcers. *International Journal of Microbiology* 2011; doi:10.1155/2011.
313. Pirnay JP, De Vos D, Duinslaeger L, Reper P, Vandenvelde C, Cornelis P. Quantitation of *Pseudomonas aeruginosa* in wound biopsy samples: from bacterial culture to rapid 'real-time' polymerase chain reaction. *Critical Care* 2000; 4: 255-262.
314. Salimi H, Yakhchali B, Owlia P, Lari A R. Molecular Epidemiology and Drug Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated From Burn Patients. *Lab Medicine* 2010; 41, 540-544.
315. Adediran SG, Dauplaise DJ, Kasten KR, Tschöp J, Dattilo J, Goetzman HS, et al. Early infection during burn-induced inflammatory response results in increased mortality and p38-mediated neutrophil dysfunction *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2010; 299(3), R918-R925 DOI.

-
316. Piljić D, Ahmetagić S, Piljić D, Stojić V, Petrović V. Antimikrobna rezistencija uzročnika izvanbolničkih infekcija mokraćnog sustava u odraslih bolesnika hospitaliziranih u Klinici za infektivne bolesti Tuzla. *Croatian Journal of Infection* 2009; 29(1): 25–28.
317. de Bentzmann S, Polette M, Zahm JM, Hinnrasky J, Kileztky C, Bajolet O, et al. *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence Factors Delay Airway Epithelial Wound Repair by Altering the Actin Cytoskeleton and Inducing Overactivation of Epithelial Matrix Metalloproteinase–2. *Lab Invest* 2000; 80: 209–219.
318. Liu VP, Matsumoto H., Kusama H, Bergan T. Survey of Heat-stable, Major Somatic Antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Systematic bacteriology*, Apr 1983; vol. 33, No2: 256-264.
319. Watine J. Is the European interhospital clonal spread of serotypes O12 *Pseudomonas aeruginosa* related to the patients related to the prolonged carriage duration? *Infect Control Hosp epidemiol* 1999; 20(7):460-1 u Sardelić S. Metalo- β -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonas aeruginosa* otpornih na karbapenemske antibiotike. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2010.
320. Vraneš J, Brkić I, Horowitz M. Differences in the antigenic structure and production of haemolysin of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a variety of isolation sites. *Acta Clin Croat* 2001; 40: 85-91.
321. Tomanović B, Joković B, Tatić M, Mirović V, Nanusević O. Serotyping and pyocin typing of *Pseudomonas aeruginosa* in a study of intrahospital infections. *Vojnosanitiski Pregled* 1991; 48 (1): 31-3.
322. Bouza E, Garsia-Garrote F, Cercenado E, Marin M, Diaz MS. *Pseudomonas aeruginosa*: a survey of resistance in 136 hospitals in Spain. The Spanish *Pseudomonas aeruginosa* study Group. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(4): 981-2 u Sardelić S. Metalo- β -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonas aeruginosa* otpornih na karbapenemske antibiotike. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2010.
323. Kobayashi I, Hasegawa M, Miyazaki S, Nishida M, Goto S. *In vitro* and *in vivo* changes of serotype in *Pseudomonas aeruginosa* by anti-*Pseudomonas* drugs. *J Antibiot (Tokyo)* 1994; 47: 72–79.

-
324. Faure K, Shimabukuro D, Temitayo AT, Allmond RL, Sawa T, et al. O-Antigen Serotypes and Type III Secretory Toxins in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Journal of Clinical Microbiology 2003; 41 (59): 2158-2160.
325. Stanković Nedeljković N, Kocić B, Todorović, Branković S, Mladenović Antić S. Serotyping and analysis of produced pigments kinds by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Vojnosanit Pregl 2011 Nov; 68(11): 923-9.
326. Fonseca AD, Correlia P, Extremina CI, Sousa JC, Tentreiro R, Barros U. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Portugues Central Hospital. Folia Microbiol 2008; 53 (6): 540-546.
327. Allydice-Francis K, Brown PD. Diversity of Antimicrobial Resistance and Virulence Determinants in *Pseudomonas aeruginosa* Associated with Fresh Vegetables. International Journal of Microbiology 2012; Article ID 426241, 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2012/426241>.
328. Look DC, Stoll LL, Romig SA, Humlicek A, Britigan BE, Denning GM. Pyocyanin and its precursor phenazine-1-carboxylic acid increase IL-8 and intercellular adhesion molecule-1 expression in human airway epithelial cells by oxidant-dependent mechanisms. J Immunol. 2005;175:4017–4023 u Caldwell CC, Chen Y, Goetzmann SH, Hao Y, Borchers MT, Hassett DJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin Pyocyanin Causes Cystic Fibrosis Airway Pathogenesis. Am J Pathol 2009; 175 (6): 2473–2488.
329. Munro N, Barker A, Rutman A, Taylor G, Watson D, McDonald-Gibson WJ, et al. Effect of pyocyanin and 1-hydroxyphenazine on in vivo tracheal mucus velocity. J Appl Physiol. 1989;67:316–323 u Caldwell CC, Chen Y, Goetzmann SH, Hao Y, Borchers MT, Hassett DJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin Pyocyanin Causes Cystic Fibrosis Airway Pathogenesis. Am J Pathol 2009; 175 (6): 2473–2488.
330. Lau GW, Hassett DJ, Britigan BE. Modulation of lung epithelial functions by *Pseudomonas aeruginosa*. Trends Microbiol. 2005;13:389–397 u Caldwell CC, Chen Y, Goetzmann SH, Hao Y, Borchers MT, Hassett DJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin Pyocyanin Causes Cystic Fibrosis Airway Pathogenesis. Am J Pathol 2009; 1.
331. Mittal R, Khandwaha KR, Gupta V, Mittal PK, Harjai K. Phenotypic characters of urinary isolates of *Pseudomonas aeruginosa* & their association with mouse renal colonization. Indian J Med Res 2006; 123: 67-72.

-
332. Winstanley C, Kaye BS, Neal JT, Chilton JH, Miksch S, et al. Genotypic and phenotypic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates associated with ulcerative keratitis. J Med Microbiol 2005; 54: 519-526.
333. Michel-Briand Y, Baysse C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. Biochimie. 2002 May-Jun; 84(5-6): 499-510.
334. Ravel J, Cornelis P. Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. Trends Microbiol 2003; 11: 195–200.
335. Bodilis J, Ghysels B, Osayande J, Matthijs S, Pirnay JP, Denayer S, et al. Distribution and evolution of ferripyoverdine receptors in *Pseudomonas aeruginosa*. Environ Microbiol 2009; 11: 2123–2135.
336. Elfarash A, Wei Q, Cornelis P. The soluble pyocins S2 and S4 from *Pseudomonas aeruginosa* bind to the same FpvAI receptor Microbiologyopen 2012; 1(3): 268–275.
337. Dötsch A, Eckweiler D, Schniederjans M, Zimmermann A, Jensen V, Scharfe M et al. The *Pseudomonas aeruginosa* Transcriptome in Planktonic Cultures and Static Biofilms Using RNA Sequencing. PLoS ONE 2012; 7(2): e31092. doi:10.1371/journal.pone.0031092
338. Huynh TT, McDougald D, Klebensberger J, Al Qarni B, Barraud N, Rice SA, et al. () Glucose Starvation-Induced Dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Is cAMP and Energy Dependent. PLoS ONE 2012; 7(8): e42874. doi:10.1371/journal.pone.004287
339. Woo JK, Webb JS, Kirov SM, Kjelleberg S, Rice SA. Biofilm dispersal cells of a cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolate exhibit variability in functional traits likely to contribute to persistent infection. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012 Nov; 66(2): 251-64.
340. Seth AK, Geringer MR, Gurjala AN, Hong SJ, Galiano RD, Leung KP, et al. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-infected wounds with clinical wound care strategies: a quantitative study using an in vivo rabbit ear model. Plast Reconstr Surg. 2012 Feb; 129(2): 262e-274e.
341. O'May CY, Sanderson K, Roddam LF, Kirov SM, David W. Iron-binding compounds impair *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, especially under anaerobic conditions. J Med Microbiol 2009; 58: 765-773.
342. Borchering J, Baltrusaitis J, Chen H, Stebounova L, Wu CM, Rubasinghege G, et al. Iron oxide nanoparticles induce *Pseudomonas aeruginosa* growth, induce biofilm

- formation, and inhibit antimicrobial peptide function. *Environ. Sci.: Nano*, 2014; 1:123-132.
343. *Shrout JD, Chopp DL, Just CL, Hentzer M, Givskov M, Parsek MR*. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol Microbiol*. 2006 Dec; 62(5): 1264-77. Epub 2006 Oct 24.
344. *Klausen M, Arne Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jørgensen A*. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology* 2003; 48 (6): 1511–1524.
345. *Heydorn A, Ersbøll B, Kato J, Hentzer M, Parsek MR, Tolker-Nielsen T, Givskov M, Molin S*. Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Apr; 68(4): 2008-17.
346. *Cady NC, McKean KA, Behnke J, Kubec R, Mosier AP*. Inhibition of Biofilm Formation, Quorum Sensing and Infection in *Pseudomonas aeruginosa* by Natural Products-Inspired Organosulfur Compounds. *PLoS ONE* 2012; 7(6): e38492. doi:10.1371/journal.pone.0038492
347. *Bala A, Kumar R, Harjai KJ*. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by azithromycin and its effectiveness in urinary tract infections. *J Med Microbiol*. 2011 Mar; 60(3): 300-6.
348. *Saeidi N, Wong KC, Lo TM, Nguyen HX, Ling H et al*. Engineering microbes to sense and eradicate *Pseudomonas aeruginosa*, a human pathogen. *Molecular Systems Biology* 7 Article number: 521doi:10.1038/msb.2011.55.
349. *Pires D, Sillankorva S, Faustino A, Azeredo J*. Use of newly isolated phages for control of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and ATCC 10145 biofilms. *Reserch in Microbiology* 2011; 162: 798-806.
350. *Cerca N, Oliveira R, Azeredo J*. Suscepibility of *Staphylococcus epidermidis* to the lytic action of staphylococcus bacteriophage K. *Lett. Appl. Microbiol* 2007; 45:313-317.
351. *Zhang Y, Hu Z*. Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with bacteriophages and chlorine. *Biotechnology and bioengineering*. Article first published online: *Biotechnol. Bioeng*. 2013; 110: 286-8.
352. *Henrichsen J*. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *J Bacteriol Rev* 1972; 36: 478-503.

-
353. *Henrichsen J.* The occurrence of twitching motility among Gram-negative bacteria. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect* 1975; 83:171–178.
354. *Kearns BD, Robinson J, Shimkets JL.* *Pseudomonas aeruginosa* Exhibits Directed Twitching Motility Up Phosphatidylethanolamine Gradients. *J. Bacteriol* 2001; 183 (2): 763-767.
355. *Wu SS, Kaiser D.* Genetic and functional evidence that Type IV pili are required for social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* 1995; 18: 547–558.
356. *Darzins A.* Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene cluster involved in pilus biosynthesis and twitching motility: sequence similarity to the chemotaxis proteins of enterics and the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol* 1994; 11:137–153.
357. *Packer HL, Gauden DE, Armitage JP.* The behavioral response of anaerobic *Rhodobacter sphaeroides* to temporal stimuli. *Microbiology* 1996; 142:593–599.
358. *Zhu K, Choi K H, Schweizer HP, Rock C O, Zhang Y M.* Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol* 2006; 60:260-273.
359. *Ochsner UA, Wilderman PJ, Vasil AI, Vasil ML.* Gene Chip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol. Microbiol.* 2002; 45:1277-1287.
360. *Miller MR, Tomaras PA, Barker PA, Voelker RD, Chan DE, et all.* *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility-Mediated Chemotaxis towards Phospholipids and Fatty Acids: Specificity and Metabolic Requirements. *J. Bacteriol.* June 2008; 190(11): 4038-4049.
361. *Vance RE, Hong K, Gronert C, Serhan N, Mekalanos JJ.* The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* carries a secretable arachidonate 15-lipoxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101:2135-2139.
362. *De Caterina, Zampolli RA.* From asthma to atherosclerosis-5-lipoxygenase, leukotrienes, and inflammation. *N. Engl. J. Med* 2004; 350:4-7.
363. *Rachid MH, Kornberg A.* Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 4885-4890.

-
364. Ogino J, Yamada T, Kikushima K, Fujimori I, Goto R, Kozeni T, et al. [Effect of 14-member lactone ring macrolides on anti staphylococcal activity and swarming ability of *Pseudomonas aeruginosa*]. *Biotechnol. Bioeng.* 2013; 110: 286–295.
365. Fauvart M, Sánchez-Rodríguez A, Marchal K, Michiels J. Genome sequence of *Rhizobium etli* CNPAF512, a nitrogen-fixing symbiont isolated from bean root nodules in Brazil. *Journal of bacteriology* 2011; 193(12): 3158-9.
366. O'Malley YQ, Reszka KJ, Rasmussen GT, Abdalla MY, Denning GM, Britigan B E. The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol* 2003; 285:L1077-L1086
367. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:194–222 u Caldwell CC, Chen Y, Goetzmann SH, Hao Y, Borchers MT, Hassett DJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin Pyocyanin Causes Cystic Fibrosis Airway Pathogenesis. *Am J Pathol* 2009; 175 (6): 2473–2488.
368. Whelan AP, Dietrich LEP, Newman D. Pyocyanin Alters Redox Homeostasis and Carbon Flux through Central Metabolic Pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology* 2007; 189 (17): 6372-6381.
369. Emde R, Schink B. Oxidation of glycerol, lactate, and propionate by *Propionibacterium freudenreichii* in a poised-potential amperometric culture system. *Arch. Microbiol* 1990; 153: 506-512.
370. Emde R, Swain A, Schink B. Anaerobic oxidation of glycerol by *Escherichia coli* in an amperometric poised-potential culture system. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 1989; 32: 170-175.
371. Eschbach M, Schreiber K, Trunkn K, Buer J, Jahn D, Schobert M. Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *J. Bacteriol* 2004; 186:4596-4604.
372. Ruby EG, Nealson KH. Pyruvate production and excretion by the luminous marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol* 1977; 34: 164-169 u Whelan AP, Dietrich LEP, Newman D. Pyocyanin Alters Redox Homeostasis and Carbon Flux through Central Metabolic Pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology* 2007; 189 (17): 6372-6381.

-
373. *Diedrich DL, Cota-Robles EH.* Heterogeneity in lipid composition of the outer membrane and cytoplasmic membrane and cytoplasmic membrane of *Pseudomonas* BAL-31. *J Bacteriol.* 1974 Sep;119(3):1006-18.
374. *Jolley KA, Maddocks DG, Gyles SL, Mullan Z, Tang SL.* 2-Oxoacid dehydrogenase multienzyme complexes in the halophilic Archaea? Gene sequences and protein structural predictions. *Microbiology* 2000; 146:1061-1069.
375. *San KY, Bennett GN, Berrios-Rivera SJ, Vadali RV, Yang YT et al.* Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. *Metab. Eng* 2002; 4: 182-192 u *Whelan AP, Dietrich LEP, Newman D.* Pyocyanin Alters Redox Homeostasis and Carbon Flux through Central Metabolic Pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology* 2007; 189 (17): 6372-6381.
376. *Schreiber K, Boes N, Eschbach M, Jaensch L, Wehland J et al.* Anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* by pyruvate fermentation requires an Usp-type stress protein. *J. Bacteriol* 2006; 188: 659-668.
377. *Weinstein RA.* Nosocomial infection update. *Emerg Infec Dis* 1998; 4:416-420.
378. *Behar P, Wagner MB, Freitas I, Auler A, Sellistre L, Fossati L et al.* Assessing the antimicrobial prescription request process in a teaching hospital in Brazil: regulations and training. *Braz J Infec Dis* 2000; 4: 76-85.
379. *Lawton RM, Fridkin SK, Gaynes RP, McGowan JE.* Practices to improve antimicrobial use at 47 US hospitals: the status of the 1997 SHEA-DSA position paper recommendations. *Infec Control Hosp Epidemiol.* 2000;21:256-9.
380. *Nation RL, Li J.* Colistin in 21st century. *Curr Op Infect Dis* 2009;22(6):535-43.
381. *Boyle B, Fernandez L, Laroche J, Kukavica I, Mendes CM.* Complete genome sequences of three *Pseudomonas aeruginosa* isolates with phenotypes of polymyxin B adaptation and inducible resistance. *J Bacteriol* 2012 Jan; 194(2): 529-30.
382. *Henwood JC, Livermore DM, James D, Warner M.* Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: results of a UK survey and evaluation of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy disc susceptibility test. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:789-99.
383. *Carmeli Y, Troillet N, Karchmer AW, Samore MH.* Health and economic outcomes of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Intern Med* 1999;159(10):1127-52

- u Whelan AP, Dietrich LEP, Newman D. Pyocyanin Alters Redox Homeostasis and Carbon Flux through Central Metabolic Pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology* 2007; 189 (17): 6372-6381.
384. Gupta V. Metallo β lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2008; 17 (2): 131-43.
385. 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.
386. Yahav D, Paul M, Fraser A, Sarid N, Leibovici L. Efficacy and safety of cefepime: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7(5): 338-48.
387. Akhabue E, Synnestvedt M, Weiner MG, Bilker WB, Lautenbach E. Cefepime-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Eid* 2011; 17(6) : 1037-1043.
388. Chen YH, Peng CF, Lu PL, Tsai JJ, Chen TP. In vito activities of antibiotic combinations against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Kaohsiung J Med Sci*. 2004; 20(6): 261-7.
389. Vakulenko SB, Mobashery S. Versality of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 430–50.
390. Drago L, DeVecchi E, Nicola L, Colombo A, Guerra A, Gismondo MR. Activity of levofloxacin and ciprofloxacin in combination with cefepime, ceftazidime, imipenem, piperacillin-tazobactam and amikacin against different *Pseudomonas aeruginosa* phenotypes and *Acinetobacter* sp. *Chemotherapy* 2004; 50: 202-10.
391. Dan M, Siegman-Igra Y, Pitlik S, Raz R. Oral ciprofloxacin treatment of *Pseudomonas aeruginosa* osteomyelitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34(5): 849–852.
392. Higgins PG, Fluit AC, Milatovic D, Verhoef J, Schmitz FJ. Mutations in GyrA, ParC, MexR and NfxB in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*. 2003 May; 21(5): 409-13.
393. Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R. Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacother*. 2005; 25(10): 1353-64.
394. Trouillet JL, Vuagnat A, Combes A, Kassis N, Chastre J, Gibert C. *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia: comparison of episodes due to piperacillin resistant versus piperacillin-susceptible organisms. *Clin Infect Dis* 2002; 34(8): 1047-54.

-
395. Tacconelli E, Tumbarello M, Bertagnolio S, Citton R, Spanu T, et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: analysis of trends in prevalence and epidemiology. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8(2): 220-1.
396. Dong F, Xu X, Song W, Lu P, Yu S, Yang Y, Shen X. Characterization of multidrug-resistant and metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. *Chin Med J* 2008; 121(17): 1611-6.
397. Kobayashi, H *Biofilm disease: its clinical manifestation and therapeutic possibilities of macrolides*. *Am J Med* 1995;99,26S-30S.
398. Tambić Andrašević A, Tambić T. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2008.god. Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske 2009: 9–98.
399. Jamasbi JR, Proudfoot ME. Phenotypic and genotypic characteristics of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: Rate of occurrence and distribution of different serotypes antimicrobial susceptibility profiles. *Lab Med*. 2008; 39(3): 155-161.
400. Ali Z, Mumtaz N, Naz SA, Jabeen N, Shafique M. Multi-Drug Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*: A threat of nosocomial infections in tertiary care hospitals. *Journal of Pacistan Medical Association* 2015; 65(1): 12-16.
401. Gleason TG, Crabtree TD, Pelletier SJ, Raymond DP, Karchmer TB, et al. Prediction of poorer prognosis by infection with antibiotic-resistant gram positive cocci than by infection with antibioticsensitive strains. *Arch Surg* 1999; 134: 1033-1040.
402. Tam VH, Gamez EA, Weston JS, Gerard LN, Larocco MT, Caeiro JP, et al. Outcomes of bacteremia due to *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to piperacillin-tazobactam: Implications on the appropriateness of the resistance breakpoint. *Clin Infect Dis*. 2008;46:862–7.
403. Tamma PD, Turnbull AE, Milstone AM, Hsu AJ, Carroll KC, Cosgrove SE. Does the piperacillin minimum inhibitory concentration for *Pseudomonas aeruginosa* influence clinical outcomes of children with pseudomonal bacteremia? *Clin Infect Dis*. 2012 Sep; 55(6): 799-806. doi: 10.1093/cid/cis545. Epub 2012 Jun 13.
404. Mattoes HM, Capitano B, Kim MK, Xuan D, Quintiliani R, Nightingale CH, Nicolau DP. Comparative pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of piperacillin/tazobactam 3.375G Q4H and 4.5G Q6H. *Chemotherapy*. 2002 May; 48(2): 59-63.

-
405. Burgess DS, Hastings RW. Activity of piperacillin/tazobactam in combination with amikacin, ciprofloxacin, and trovafloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* by time-kill. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 38(1): 37-41.
406. Pournaras S, Maniati M, Petinaki E, Tzouveleakis A, Tsakris A, Legakis NJ et al. Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa*, carrying the unrelated metallo- β -lactamase gene variants *bla*VIM-1 and *bla*VIM-2. *J Clin Microbiol* 2003; 51: 1409-14 u Sardelić S. Metalo- β -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonasa aeruginose* otpornih na karbapenemske antibiotike. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. (2010).
407. Nakamura A, Hosoda M, Kat T, Yamada Y, Itoh M, et al. Combined effects of meropenem and aminoglycosides on *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* 2000; 46(6): 901-904.
408. Bozkurt-Guzel C, Gerceker AA. In vitro pharmacodynamic properties of colistin methanesulfonate and amikacin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J Med Microbiol* 2012; 30: 34-8.
409. Cardoso F, Gomes S, Alves E, Cardoso C, Ferreira A. Amikacin and tobramycin for *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* complex according to PK/PD and microbiological breakpoints: is there a difference to revise antibiotic policies? 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Milan, Italy, 7 - 10 May 2011.
410. Layeux B, Taccone FS, Fagnoul D, Vincent JL, Jacobs F. Amikacin monotherapy for sepsis caused by panresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Nov; 54(11): 4939-41. doi: 10.1128/AAC.00441-10. Epub 2010 Sep 7.
411. Pankuch GA, Lin G, Seifert H, PC. Activity of Meropenem with and without Ciprofloxacin and Colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 January; 52(1): 333–336.
412. Su HC, Ramkissoon K, Doolittle J, Clark M, Khatun J. The Development of Ciprofloxacin Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Involves Multiple Response Stages and Multiple Proteins. *Antimicrob. Agents Chemother* Nov 2010; 54 (11): 4626-4635.
413. Breidenstein EBM, Khaira BK, Wiegand I, Overhage J, Hancock J. Complex Ciprofloxacin Resistome Revealed by Screening a *Pseudomonas aeruginosa* Mutant

- Library for Altered Susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother* Dec 2008; 52(12): 4486-4491.
414. Brazas MD, Hancock RE. Ciprofloxacin induction of a susceptibility determinant in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(8): 3222-7.
415. Zhanel GG, Crampton J, Kim S, Nicolle LE, Davidson RJ, Hoban DJ. Antimicrobial Activity of Subinhibitory Concentrations of Ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* as Determined by the Killing Curve Method and the Postantibiotic Effect Chemotherapy 1992; 38: 388–394.
416. Guillot E, Sermet I, Ferroni A, Chhun S, Pons G, Zahar JR, Jullien V. Suboptimal ciprofloxacin dosing as a potential cause of decreased *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility in children with cystic fibrosis. *Pharmacotherapy*. 2010; 30 (12): 1252-8.
417. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y (). Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate PA7: identification of a novel MexS variant involved in upregulation of the mexEF-oprN multidrug efflux operon. *Front. Microbiol*. 2015; 6:8. doi: 10.3389/fmicb.2015.00008
418. Buyck JM, Tulkens PM, Van Bambeke F. Activities of Antibiotic Combinations against Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa* in a Model of Infected THP-1 Monocytes *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* January 2015; 59(1): 258-268.
419. Sun Z, Shi J, Liu C, Jin Y, Li K, Chen R, Jin S, Wu W. PrtR homeostasis contributes to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and resistance against ciprofloxacin *Infect Immun*. 2014 Apr; 82(4): 1638-47. doi: 10.1128/IAI.01388-13. Epub 2014 Feb 3
420. Hocquet D, Bertrand X. Metronidazole increases the emergence of ciprofloxacin- and amikacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* by inducing the SOS response *J. Antimicrob. Chemother.* (2014)69 (3): 852-854. doi: 10.1093/jac/dkt43
421. Jensen PO, Briaies A, Brochmann RP, Wang H, Kragh KN, Kolpen M, et al. Formation of hydroxyl radicals contributes to the bactericidal activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Pathogens and Disease* 2014; 70 (3): 440–443.
422. al Naiemi N, Duim B, Bart A. A CTX-M extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Med Microbiol* November 2006; 55(11): 1607-1608 u Aldrige P, Hughes KT. *Curr Opin Microbiol* 2002; 5: 160-16.

-
423. Tavajjohi Z, Moniri R. Detection of ESBLs and MDR in *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary-care teaching hospital. *Iranian Journal of Clinical Infectious Disease* 2011; 6(1): 18-23.
424. Yakupogullari Y, Poirel L, Bernabeu S, Kizirgil A, Nordmann P. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate co-expressing extended-spectrum β -lactamase PER-1 and metallo- β -lactamase VIM-2 from Turkey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; 6(1): 221-222.
425. Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* *Antimicrob. Agents Chemother.* September 2006 vol. 50 no. 9 2990-2995.
426. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SMD, Danish SM, Kamal MA. Prevalence of multidrug resistant and extended spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. *Saudi Journal of Biological Sciences* January 2015; 22 (1): 62–64.
427. Bandekar N, Vinodkumar CS, Basavarajappa KG, Prabhakar PJ, Nagaraj P. Beta lactamases mediate resistance amongst gram neagive bacilli in burn infection. *Int J Biol Med Res* 2011; 2(3): 766-770.
428. Sacha PT, Jakoniuk P, Wieczorek P, Zalewska M, Leszczyńska K. [Antibiotic susceptibility and occurrence of ESBL in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different clinical specimens]. *Med Dosw Mikrobiol* 2004; 56(3): 263-73.
429. Gniadkowski M, Schneider I, Palucha A, Jungwirth R, Mikiewicz B, Bauernfeind A. Cefotaxime-resistance Enterobacteriaceae isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing beta lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob Agents. Chemother* 1998; 827-832.
430. Kim JY, Sohn JW, Park DW, Yoon YK, Kim YM, Kim MJ. Control of extended-spectrum beta-lactamase-producing *K. pneumoniae* using a computer-assisted management program to restrict third-generation cephalosporin use. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:416-21.
431. Tumbarello M, Sali M, Trecarichi EM, Leone F, Rossi M, Fiori B, et al. Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum-beta-lactamase Producing *Escherichia coli*: Risk Factors for Inadequate Initial Antimicrobial Therapy. *Antimicrob Agents Chemotherapy* 2008; 52: 3244-52 u Sardelić S. Metalo- β -laktamaze u kliničkih sojeva

- Pseudomonasa aeruginosa* otpornih na karbapenemske antibiotike. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2010.
432. Hyle EP, Lipworth AD, Zaoutis TE, Nachamkin I, Fishman NO, Bilker WB, et al. Risk factor for increasing multidrug resistance among extended spectrum B lactamase producing *E. coli* and *Klebsiella* sp. Clin Infect Dis 2005;40:1317-24 u Erdeljić V. Utjecaj primjene antimikrobne terapije na selekciju mikroorganizama koji produciraju beta-laktamaze proširenog spektra (AmpC i ESBL) i ishod liječenja bolesnika. [Doktorska disertacija]. Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2012.
433. Weldhagen GF, Prinsloo A. Molecular detection of GES-2 extended spectrum Beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in Pretoria, South Africa. Int J Antimicrob Agents. 2004 Jul; 24(1): 35-8.
434. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. Antimicrob. Agents Chemother 2001; 45: 2598-2603.
435. 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(3): 1225-7.
436. Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira MG, Rúbio FG, Nogueira ML, de Almeida MTG, Nogueira MCL. Detection of *P. aeruginosa* harboring *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{GES-1} and *bla*_{GES-5}, *bla*_{IMP-1} and *bla*_{SPM-1} causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. BMC Infectious Diseases 2012; 12:176.
437. Wang C, Cai P, Chang D, Mi YA. *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum Journal of Antimicrobial Chemotherapy. doi:10.1093/jac/dkl116.
438. Hall LM, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37 (8): 1637–1644.
439. El Garch F, Bogaerts P, Bebrone C, Galleni M, Glupczynski Y. OXA-198, an Acquired Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2011;55(10):4828-4833. doi:10.1128/AAC.00522-11.

-
440. Chaudhary M, Payasi A. Prevalence, Genotyping of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates for Oxacillinase Resistance and Mapping Susceptibility Behaviour. *J Microb Biochem Technol* 2014; 6: 063-067. doi:10.4172/1948-5948.1000123
441. Jovčić B, Lepšanović Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, Kojić M. Emergence of NDM-1 Metallo- β -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Serbia *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(8): 3929–3931.
442. Jovčić B, Lepšanović Z, Begović J, Filipić B, Kojić M. Two copies of blaNDM-1 gene are present in NDM-1 producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Serbia. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2014 Mar; 105(3):613-8.
443. Bennett PM. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria: *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 1-4.
444. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50(5): 673-9.
445. Liakopoulos A, Mavroidi A, Katsifas E, Theodosiou A, Karagouni AD, Miriagou V, et al. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from central Greece: molecular epidemiology and genetic analysis of class I integrons. *BMC Infectious Diseases* 2013; 13:505 doi:10.1186/1471-2334-13-505.
446. Juan C, Beceiro A, Gutiérrez O, Albertí S, Garau M, Pérez JL et al. Characterization of the new metallo- β -lactamase VIM-13 and its integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(10): 3589-96
- u Sardelić S. Metallo- β -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonasa aeruginose* otpornih na karbapenemske antibiotike. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2010.
447. Siarkou VI, Vitti D, Protonotariou E, Ikonmidis A, Sofianou D. Molecular epidemiology of outbreak-related *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant blaVIM-17 metallo- β -lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(4): 1325-30
- u Sardelić S. Metallo- β -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonasa aeruginose* otpornih na karbapenemske antibiotike. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2010.

448. Luzzaro F, Docquier JD, Colinson C, Endimiani A, Lombardi G, Amicosante G, et al. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo- β -lactamase encoded by a conjugative plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(2):648-50 u Sardelić S. Metalo- β -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonasa aeruginosa* otpornih na karbapenemske antibiotike. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2010.
449. El Salabi A, Weeks J, Bruderer T, Frei R, Walsh TR. First Report of the metallo- α -lactamases, SMP-1, in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(1): 5822 u Sardelić S. Metalo- β -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonasa aeruginosa* otpornih na karbapenemske antibiotike. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2010.
450. Bošnjak Z, Benedić B, Mazzariol A, Jarža-Davila N, Šuto S, Klaenić S. VIM-2 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Zagreb, Croatia. *Scand J Infect Dis* 2010; 42: 193-197.
451. Gutierrez O, Juan C, Cercenado E, Navarro F, Bouza E, Coll P, Perez JL, Oliver A. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:4329-35.
452. VinodKumar CS, Hiresave S, Kandagal GiriyaPal B, Bandekar N. Metallo Beta Lactamase Producing *Pseudomonas Aeruginosa* and its Association with Diabetic Foot. *The Indian Journal of Surgery* 2011;73(4):291-294. doi:10.1007/s12262-011-0287-5.
453. Peshattiwar PD, Peerapur BV. ESBL and MBL Mediated Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: An Emerging Threat to Clinical Therapeutics. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2011 December; Vol-5(8): 1552-1554
454. Ramakrishnan K, Rajagopalan S, Kenchappa P, Devi Chandrakesan S. Molecular characterization of metallo β -lactamase producing multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from various clinical samples. *Indian J Pathol Microbiol* [serial online] 2014 [cited 2015 Mar 26];57:579-82. Available from: <http://www.ijpmonline.org/text.asp?2014/57/4/579/142670>
455. Pirnay JP, De Vos D, Duinslaeger L, Reper P, Vandenvelde C, Cornelis P. Quantitation of *Pseudomonas aeruginosa* in wound biopsy samples: from bacterial culture to rapid 'real-time' polymerase chain reaction. *Critical Care* 2000; 4:255-262.

456. Soraya SA, Jones RN, Gales AC, Sader HS. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). J Antimicrob Chemother 2003;52(1):140-1 u Sardelić S. Metalo- β -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonasa aeruginose* otpornih na karbapenemske antibiotike. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Središnja medicinska knjižnica. 2010.
457. Das R, Sinha P, Pandey P, Kar D. Prevalence of MBL producing *Pseudomonas* sp. from soil- A case study in Assam University campus.. Global Advanced Research Journal of Microbiology 2014; 3(6): 098-101.

9. DODACI

9.1. KRATKA BIOGRAFIJA

Nataša Stanković Nedeljković je rođena 22.7.1962. godine u Aleksincu, gde je pohađala osnovnu i srednju školu. Osnovnu školu i ``Aleksinačku gimnaziju`` je završila odličnim uspehom i Vukovom diplomom i Alasovom diplomom.

Medicinski fakultet u Nišu je upisala školske 1981-82. Godine, a diplomirala je 18.3.1987. godine sa prosečnom ocenom 8,00.

Obavila je opšti lekarski staž i položila stručni ispit za doktora medicine 24.11.1988. godine.

Od 1.12.1989. godine radi Zdravstvenom centru ``Aleksinac`` u Aleksincu, na poslovima lekara opšte prakse u Službi opšte medicine, pa u Dispanzeru za decu.

Specijalistički staž iz predmeta Mikrobiologija sa parazitologijom počela je 24.10.1994. godine, a 26.6.1998. godine je položila specijalistički ispit odličnom ocenom. Od 28.6.1998. godine radi kao u Mikrobiološkoj službi Higijensko-epidemiološke službe kao lekar specijalista mikrobiologije i parazitologije.

Magistarske studije iz predmeta Mikrobiologija i imunologija upisala je školske 1995-96. godine i položila sve programom predviđene predmete. Magistarsku tezu pod nazivom ``Mikrobiološki agensi u etio-patogenezi akutnog i hroničnog parodontitisa`` odbranila je 16.6.2002. godine.

Na domaćim i međunarodnim kongresima mikrobiologa, stomatologa, lekara opšte medicine, inerte medicine i pedijataru je prezentovala 48 stručna rada, čiji apstrakti i celi radovi su objavljeni u zbornicima radova. U stručnim časopisima je objavila više radova, od kojih su 3 na sci listama i 2 na med-line. Posle niza objavljenih stručnih radova dobila je titulu primarijus 2004. godine.

Danas radi kao šef Mikrobiološke laboratorije u Sektoru za dijagnostiku Opšte bolnice u Aleksincu. Član je mikrobiološke sekcije SLD.



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом
Фенотипске карактеристике клиничких
изолата *Pseudomonas aeruginosa*

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни у целини, ни у деловима, није била предложена за добијање било које дипломе, према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, VI 2015.

Аутор дисертације: Наташа Станковић Недиљковић

Потпис докторанда:
Наташа Станковић



Прилог 2.

ИЗЈАВА О ИСЛОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСKE
ДИСЕРТАЦИЈЕ

Име и презиме аутора: Наташа Станковић Неделковић
Студијски програм: медицина - микробиологија
Наслов рада: Фенотипске карактеристике клиничких изолата *Pseudomonas aeruginosa*
Ментор: Проф. др. Бранислав Коцић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

у Нишу, VI 2015.

Аутор дисертације: Наташа Станковић Неделковић

Потпис докторанда:
Наташа Станковић



Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Фенотипске карактеристике клиничких изолата *Pseudomonas aeruginosa*
изолата *Pseudomonas aeruginosa*

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
- ☒ 2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делили под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делили под истим условима

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

у Нишу, 01 2015.

Аутор дисертације:

Наташа Станковић Недуљковић

Потпис докторанда:

Наташа Станковић

