

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Marko S. Milojković

**GENOTIPIZACIJA, REZISTENCIJA NA
ANTIBIOTIKE I ISPITIVANJE FAKTORA
VIRULENCIJE KLINIČKIH IZOLATA
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

Doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Marko S. Milojković

**GENOTYPING, ANTIBIOTICS RESISTANCE
AND EXAMINATION OF VIRULENCE
FACTORS OF CLINICAL ISOLATES OF
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

MENTOR I ČLANOVI KOMISIJE

Mentori:

Dr Ivica Dimkić, viši naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Dr Dragana D. Božić, docent,
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Član komisije:

Dr Slaviša Stanković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u Opštoj bolnici Aleksinac-odsek mikrobiologija i Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Veliku zahvalnost dugujem mentorima dr Ivici Dimkiću i doc. dr Dragani Božić na utrošenom vremenu i poverenju, prenešenom znanju, savetima i diskusijama tokom izrade teze. Hvala Vam što ste mi posvetili vreme tokom izrade doktorske disertacije.

Hvala prof. dr Slaviši Stankoviću na nesebičnoj pomoći, poverenju, korisnim sugestijama i na kritičnoj oceni teze.

Posebno se zahvaljujem prim. dr. sci. med Nataši Stanković Nedeljković, koja je osmislila koncept ove doktorske disertacije i omogućila mi izradu eksperimenata. Hvala Vam što ste mi poverili znanje i sve što ste učinili za mene.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr. sci. med Ivani Ćirković koja mi je omogućila izradu dela eksperimenata na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Zahvaljujem se svim članovima Katedre za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a veliko hvala dugujem kolegici Željki Nenadović na pomoći tokom eksperimentalnog rada.

Zahvaljujem se svom najboljem prijatelju i kumu dr Hadiju Waisiju na neizmernoj podršci i poverenju tokom osnovnih, specijalističkih i doktorskih studija.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici: ocu Srboljubu, majci Vesni, sestri Katarini, supruzi Jasmni i kćerci Emi, koju volim najviše na svetu.

Genotipizacija, rezistencija na antibiotike i ispitivanje faktora virulencije kliničkih izolata *Pseudomonas aeruginosa*

Sažetak

Utvrđivanje potencijalnih korelacija, između fenotipskih karakteristika (osetljivost na različite klase antibiotika, ekspresija različitih klasa β -laktamaza, učestalost serotipova, proizvodnja pigmenata i stvaranje biofilma) i genotipskih obrazaca kliničkih izolata *Pseudomonas aeruginosa* različitog porekla, predstavljalo je glavni cilj ovog rada. Tokom dve faze istraživanja, ispitano je 147 kliničkih izolata, od kojih je najveći procenat dobijen iz briseva rana (66%) i urino-kultura (10,9%). Polivalentne serogrupe PMA i PMF, kao i monovalentni serotipovi P1, P6 i P11 bili su najzastupljeniji, dok je najveći procenat izolata bio očekivano netipabilan. Istovremena produkcija oba pigmenta karakterisala je najveći broj izolata, dok su oni sa serotipovima P1, P6 i P11 produkovali više pioverdina nego piocijanina. Sposobnost formiranja biofilma imalo je 77,66% kliničkih izolata, a najizraženija je utvrđena za izolate iz urinokultura i sputuma. Najveći stepen osetljivosti utvrđen je za kolistin, aztreonam, karbapeneme i piperacilin/tazobaktam, dok je izraženija otpornost prikazana prema aminoglikozidima i fluorohinolonima. Višestruku otpornost na tri ili više klasa antibiotika je pokazalo 30,9% izolata iz druge faze istraživanja, a skoro polovina je eksprimirala β -laktamaze proširenog spektra, karbapenemaze i metalo- β -laktamaze. RAPD₂₇₂ PCR analiza pokazala se kao najbolja tehnika koja je izdvojila najveći broj klastera sa ujednačenim obrascima, ističući izraženu heterogenost izolata iste vrste. Korelacija između genetičkih obrazaca i fenotipskih karakteristika nije ustanovljena, ukazujući na potrebu za novim molekularnim metodama u ovom delu Srbije u cilju otkrivanja potencijalnih veza među njima i na izraženu rezistenciju koja se poslednjih godina uvećava.

Ključne reči: *Pseudomonas aeruginosa*; osetljivost na antibiotike; serotipizacija; pigmentacija; formiranje biofilma; β -laktamaze; genotipski obrasci; RAPD PCR.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Mikrobiologija

Genotyping, antibiotics resistance and examination of virulence factors of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract

Determining potential correlations between phenotypic characteristics (sensitivity to different classes of antibiotics, expression of different β -lactamases classes, frequency of serotypes, pigment and biofilm production) and genotypic patterns of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from different origins was the main goal of this study. Study itself was splitted into two phases, a total of 147 clinical isolates were examined, out of which the largest percentage were from wound swabs (66%) and urine cultures (10.9%). Polyvalent serogroups PMA and PMF, as well as monovalent serotypes P1, P6 and P11 were the most represented, while the highest percentage of isolates was atypical. Simultaneous production of both pigments characterized the most of isolates, while those with serotypes P1, P6 and P11 produced more pyoverdine than pyocyanin. Even 77.66% of clinical isolates had the ability to form a biofilm, and the most pronounced was found for isolates from urine cultures and sputum. The highest susceptibility was found for colistin, aztreonam, carbapenems and piperacillin/tazobactam, while more pronounced resistance was shown onto aminoglycosides and fluoroquinolones. Multiple resistances, up to three or more antibiotics classes, were shown by 30.9% of isolates from the second study phase, and almost half of them expressed broad-spectrum β -lactamases, carbapenemases and metallo- β -lactamases. RAPD₂₇₂ PCR analysis proved to be the best technique that singled out the largest number of clusters with uniform patterns, emphasizing the pronounced heterogeneity of isolates of the same species. The correlation between genetic patterns and phenotypic characteristics has not been established, indicating the need for new molecular methods in this part of Serbia to discover potential links between them and on the pronounced resistance, which has increased in recent years.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; antibiotics susceptibility; serotyping; pigmentation; biofilm formation; β -lactamases; genetic patterns; RAPD PCR.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Microbiology

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1 OPŠTE KARAKTERISTIKE VRSTE..... | 2 |
| 1.1.1 TAKSONOMSKA KLASIFIKACIJA | 2 |
| 1.1.2 MORFOLOGIJA I ĆELIJSKA GRAĐA | 2 |
| 1.1.2.1 Proteini spoljašnje membrane | 4 |
| 1.1.2.2 Lipopolisaharidi (LPS)..... | 4 |
| 1.1.2.3 Flagele i pili | 6 |
| 1.1.3 KULTURELNE I BIOHEMIJSKE OSOBINE | 7 |
| 1.1.4 PRODUKCIJA BIOFILMA | 8 |
| 1.1.4.1 Faze formiranja biofilma..... | 9 |
| 1.1.4.2 Intracelularna komunikacija..... | 10 |
| 1.1.4.3 Povećana rezistencija bakterija u biofilmu | 11 |
| 1.1.5 FUNKCIONALNA I GENETIČKA RAZNOLIKOST LIPOPOLISAHARIDA <i>P. AERUGINOSA</i> | 12 |
| 1.1.6 FENOTIPSKA RAZNOLIKOST PIGMENATA | 15 |
| 1.1.7 MEHANIZMI ANTIBIOTSKE REZISTENCIJE..... | 16 |
| 1.1.7.1 Višestruka antibiotska rezistencija <i>P. aeruginosa</i> izolata..... | 17 |
| 1.1.7.1.1 Smanjena propustljivost spoljašnje membrane | 18 |
| 1.1.7.1.2 Efluks pumpe (transporteri za aktivno izbacivanje antibiotika)..... | 19 |
| 1.1.7.1.3 Promena ciljnog mesta delovanja antibiotika..... | 19 |
| 1.1.7.1.4 Degradacija antibiotika bakterijskim enzimima..... | 19 |
| 1.1.8 GENETIČKO PROFILISANJE <i>P. AERUGINOSA</i> KLINIČKIH IZOLATA | 23 |
| 1.1.9 MEDICINSKI ZNAČAJ <i>P. AERUGINOSA</i> IZOLATA | 23 |
| 1.1.9.1 Respiratorne infekcije i cistična fibroza..... | 24 |
| 1.1.9.2 Bakterijemija i infekcije urinarnog trakta | 25 |
| 1.1.9.3 Infekcije rana i kože..... | 26 |
| 1.1.9.4 Ostale infekcije | 26 |
| 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 27 |
| 3. MATERIJAL I METODE | 28 |
| 3.1 MATERIJAL..... | 28 |
| 3.1.1 BAKTERIJSKI IZOLATI | 28 |
| 3.1.1.1 Odobrenje etičke komisije | 28 |
| 3.1.2 MEDIJUMI ZA RAST I KARAKTERIZACIJU KLINIČKIH IZOLATA | 28 |
| 3.1.3 ANTIBIOTICI KORIŠĆENI U PROCENI OSETLJIVOSTI KLINIČKIH IZOLATA I OSTALI REAGENSI | 32 |
| 3.2 METODE | 33 |
| 3.2.1 KULTIVACIJA I BIOHEMIJSKA IDENTIFIKACIJA <i>P. AERUGINOSA</i> IZOLATA..... | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.2 SEROTIPIZACIJA | 34 |
| 3.2.3 PRODUKCIJA PIGMENATA | 34 |
| 3.2.4 PRODUKCIJA BIOFILMA | 34 |
| 3.2.5 ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI NA ANTIBIOTIKE | 35 |
| 3.2.5.1 Produkcija β -laktamaza proširenog spektra (ESBL)..... | 36 |
| 3.2.5.2 Produkcija karbapnemaza | 36 |
| 3.2.5.3 Produkcija metalo- β -laktamaza (MBL) | 37 |
| 3.2.5.4 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) | 37 |
| 3.2.6 MOLEKULARNE METODE | 38 |
| 3.2.6.1 Izolacija i prečišćavanje totalne DNK | 38 |
| 3.2.6.2 Umnožavanje fragmenata DNK RAPD PCR metodom | 39 |
| 3.2.6.3 Umnožavanje fragmenata DNK fingerprinting (rep-PCR) metodom..... | 39 |
| 3.2.6.4 Umnožavanje 16S rRNK amplifikona i sekvenciranje | 40 |
| 3.2.6.5 Horizontalna elektroforeza DNK i dobijenih amplifikona na agaroznom gelu i analiza gelova | 40 |
| 3.2.6.6 Softverska analiza gelova i filogenetska analiza..... | 40 |
| 3.2.7 STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA | 40 |
| 4. REZULTATI I DISKUSIJA | 41 |
| 4.1 POREKLO I BIOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA <i>P. AERUGINOSA</i> IZOLATA | 41 |
| 4.2 DISTRIBUCIJA SEROTIPOVA KOD KLINIČKIH <i>P. AERUGINOSA</i> IZOLATA..... | 43 |
| 4.3 DISTRIBUCIJA PIGMENATA KOD KLINIČKIH <i>P. AERUGINOSA</i> IZOLATA | 45 |
| 4.4 PRODUKCIJA BIOFILMA KOD KLINIČKIH <i>P. AERUGINOSA</i> IZOLATA | 47 |
| 4.5 ANTIBIOTSKA REZISTENCIJA | 49 |
| 4.5.1 ANTIBIOGRAM | 49 |
| 4.5.2 MINIMALNA INHIBITorna KONCENTRACIJA | 56 |
| 4.5.3 PRODUKCIJA ENZIMA | 59 |
| 4.5.4 VIŠESTRUKO OTPORNI IZOLATI (MDR)..... | 60 |
| 4.6 OTPORNOST/OSETLJIVOST NA ANTIBIOTIKE U ODNOSU NA MOLEKULARNO GENETIČKU KARAKTERIZACIJU | 62 |
| 5. ZAKLJUČCI | 67 |
| 6. LITERATURA | 69 |
| 7. PRILOZI | 84 |
| BIOGRAFIJA | 85 |
| Izjava o autorstvu | 86 |
| Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada | 87 |
| Izjava o korišćenju | 88 |

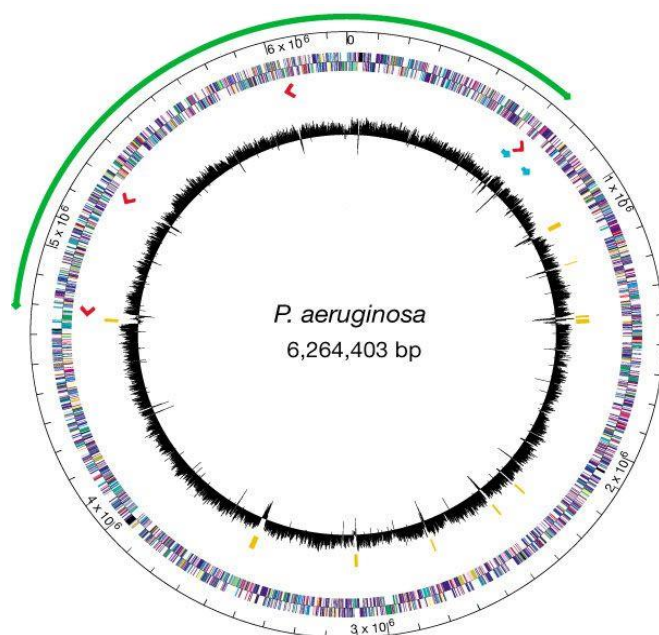
1. UVOD

Daleke 1872. godine Schroeter i Cohn u dva nezavisna istraživanja su prvi pomenuli za to vreme novu bakteriju, označivši je *Bacterium aeruginosum* (Selezska et al., 2012). Imena su se potom često menjala: *Micrococcus pyocyaneus* (Zopf 1884), *Bacillus aeruginosus* (Schroeter 1872, Trevisan 1885), *Bacillus pyocyaneus* (Zopf 1884, Flügge 1886), *Pseudomonas pyocyanea* (Zopf 1884, Migula 1895), *Bacterium pyocyaneum* (Zopf 1884, Lehmann and Neumann 1896), *Pseudomonas polycolor* (Clara 1930) i *Pseudomonas vendrelli* (nomen nudum 1938) (Stanković Nedeljković, 2015). Fordos je 1860 godine prvi izolovao plavi pigment, a Lucke je 1862 povezo ovaj pigment sa štapićastim bakterijama (Pitt, 1998). Do 1894. godine *P. aeruginosa* je opisivana kao bakterija koja dovodi do pojave plavo zelenog gnoja u ranama. Nemački botaničar, poljskog porekla, Migula je 1900. godine naziva punim imenom *Pseudomonas aeruginosa*, a tek 1916. godine Freeman je opisuje kao bakteriju koja dovodi do pojave hroničnih i akutnih infekcija (Trias, 1999).

P. aeruginosa, katalaza i oksidaza pozitivna bakterija, je široko raspostranjena kosmopolitka vrsta poreklom iz više ekoloških niša poput vode (uključujući i destilovanu vodu), zemlje, biljaka, životinja i ljudi (Vujović, 2016). Preživljava u vlažnim sredinama, kao što su kupatila, slavine, veš mašine itd. Veoma je važan klinički agens jer je patogena vrsta koja izaziva akutna i hronična stanja kod životinja i ljudi. Takođe, vrste iz roda *Pseudomonas* su jedan od najčešćih uzročnika infekcija u bolnicama (Sardelic et al., 2012). Zdravi ljudi obično nemaju rizik od infekcije. Infekcija se može javiti u bilo kom delu tela, a simptomi zavise od toga koji deo tela je zahvaćen infekcijom. *Pseudomonas* infekcije se smatraju oportunističkim infekcijama, tj. bolest se razvija samo u slučaju oslabljenog imunog sistema. Najčešće dovodi do infekcija na mestima rana i opekotina, kao i urinarnog trakta.

P. aeruginosa se retko nalazi kao deo normalne mikroflore čoveka i to na koži čoveka može se naći do 2%, na nazalnoj sluzokoži do 3,3%, u grlu do 6,6% i 2,6-24% u fecesu (Trias, 1999). U slučaju hospitalizacije procenat kolonizacije može preći 50%. Ovo je posebno karakteristično za pacijente sa narušenim integritetom kože i sluzokože, poremećaja respiratornog sistema i operacija povezanih sa upotrebom katetera. U SAD-u u periodu od 1986. do 1998. godine, *P. aeruginosa* je identifikovan kao peti nozokomijalni patogen. Kod bolničkih pneumonija učestvuje sa 14-16%, kod urinarnih infekcija 7-11%, infekcija hiruških rana 8% i infekcija krvotoka 2-6%. U novijim istraživanjima *P. aeruginosa* je na drugom mestu učestalosti kod infekcije pluća (Trias, 1999). Studije u Evropi pokazuju da je *P. aeruginosa* drugi po učestalosti izolovanih bakterija na jedinicama intenzivne nege, gde je odgovoran za 30% pneumonija, 19% infekcija urinarnog trakta i 10% infekcija krvotoka (Vitkauskienė et al., 2005). Takođe, multipna rezistencija je najčešće zastupljena kod *P. aeruginosa* izolata (Gierhart & Chukwuma, 2017). Pored urođene rezistencije na antibiotike, ova bakterija stiče rezistenciju i na one antibiotike na koje je prirodno osetljiva. Rezistencija se stvara brzo, često i u toku terapije (Vujović, 2016). Dodatno, *P. aeruginosa* izaziva oboljenja i kod biljaka uzrokujući meku trulež listova biljke *Arabidopsis thaliana*, zelene salate (*Lactuca sativa*) i krtole krompira (*Solanum tuberosum*), kao i do promena na duvanu, bananama i orhideji (Vujović, 2016).

Genom *P. aeruginosa* je veličine između 6 i 7 Mbp (Gierhart & Chukwuma, 2017) i poseduje jedan cirkularni hromozom sa G+C sastavom od oko 67%, kao i više plazmida koji su odgovorni za patogenost bakterije (Vujović, 2016). Tako je pokazano da *P. aeruginosa* soj PAO1 poseduje 6,3 miliona baznih parova i predstavlja jedan od najvećih bakterijskih genoma (Slika 1). S obzirom na svoju veličinu *P. aeruginosa* sadrži i najveći procenat regulatornih gena odgovornih za katabolizam i transport organskih jedinjenja (Schmidt et al., 1996).



Slika 1. Cirkularni genom *P. aeruginosa*.

Geni su prikazani obojenim kvadratićima u zavisnosti od funkcionalne kategorije i pravcem transkripcije (spoljašnji krug predstavlja pozitivan, a unutrašnji negativan lanac). Crvene strelice označavaju mesto i smer transkripcije ribozomalnih RNK gena. Zelena strelica predstavlja invertovani region koji je produkt homologih rekombinacionih procesa između *rrnA* i *rrnB* gena. Plava strelica predstavlja lokaciju sa mogućim insertovanim bakteriofagima. Crni krug u centru predstavlja prosečni G+C sastav genoma, a žute crte su regioni veći od 3,0 kilo baza (kb) sa G+C sastavom manjim od dve standardne devijacije (58,8%) u odnosu na srednju vrednost od 66,6% (preuzeto iz: Stover et al., 2000).

1.1 OPŠTE KARAKTERISTIKE VRSTE

1.1.1 TAKSONOMSKA KLASIFIKACIJA

Taksonomski položaj vrste *P. aeruginosa* je hijerarhisan na sledeći način (Brenner et al., 2005):

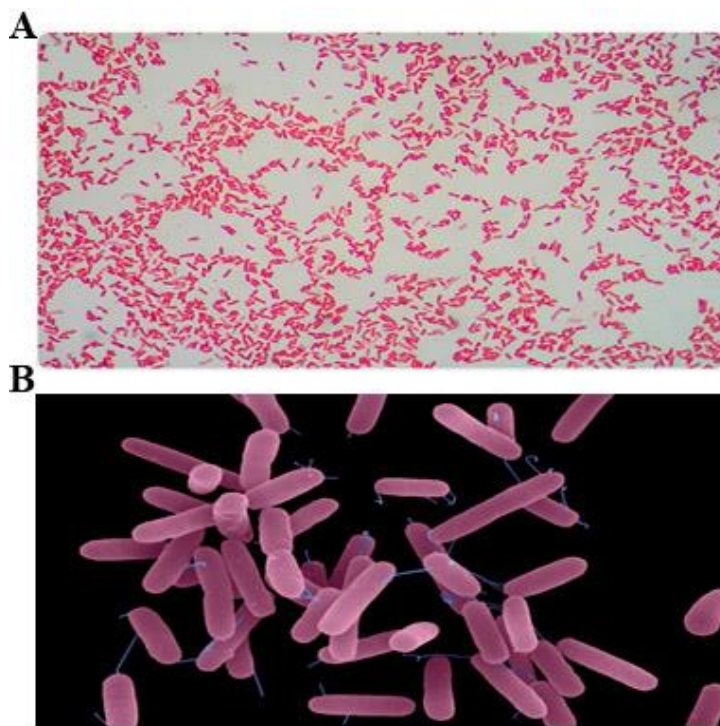
- Domen: Bacteria
- Razdeo: Proteobacteria
- Klasa: Gammaproteobacteria
- Red: Pseudomonadales
- Familija: Pseudomonadaceae
- Rod: *Pseudomonas*
- Vrsta: *P. aeruginosa* (Schroeter, 1872) Migula, 1900

Vrste koje pripadaju familiji *Pseudomonadaceae* dele se u tri grupe: fluorescentnu grupu, *Pseudomallei* grupu i ostale pseudomonade (Stanković Nedeljković, 2015). Svakako, fluorescentna grupa i vrsta *P. aeruginosa* imaju najveći medicinski značaj.

1.1.2 MORFOLOGIJA I ĆELIJSKA GRAĐA

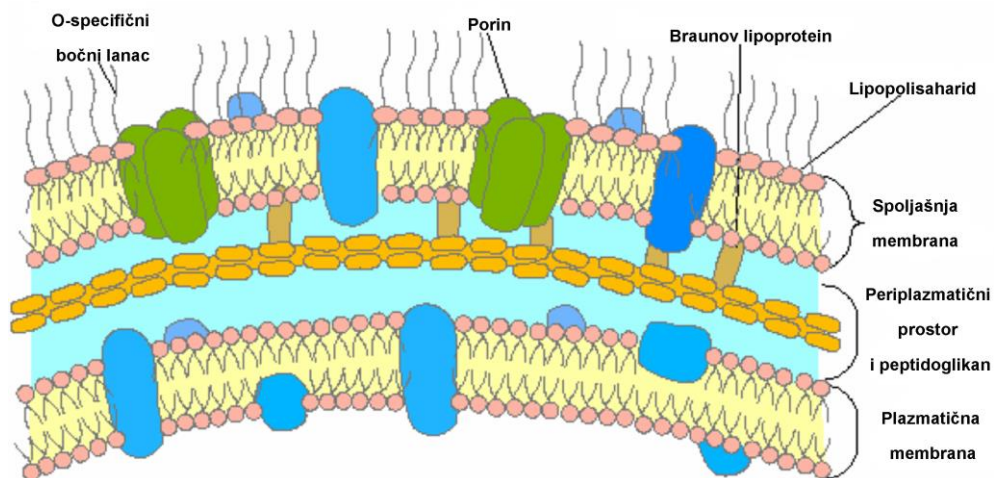
P. aeruginosa su Gram negativni, aerobni, oksidaza i katalaza pozitivni bacili - štapići, postavljeni pojedinačno ili u parovima (Gales et al., 2001). To je aerobna i fakultativno anaerobna bakterija. Ćelije su pokretne pomoću najčešće jedne, subpolarno postavljene flagele (Slika 2). U studiji iz 1964. godine Jessen i Lautrop su ustanovili da 97% ispitanih izolata *P. aeruginosa* poseduju jednu flagelu, dok ostalih 3% poseduju dve flagele (Paulsson, 2017). Na površini ćelije

nalaze se i fimbrije, a same ćelije su različitog dijametra od 0,5 μm do 1,0 μm , kao i 1,5 μm do 5,0 μm (Banerjee et al., 2017).



Slika 2. *Pseudomonas aeruginosa* po Gramu (A) i pod elektronskim mikroskopom (B) (preuzeto sa: <https://www.news-medical.net> i <https://www.sciencesetavenir.fr>).

Dva najvažnija faktora za ekološki uspeh *P. aeruginosa* su minimalni nutritivni zahtevi i propustljivost spoljašnje membrane (Haynes, 1951). Ćelijski omotač se sastoji od spoljašnje membrane, u sredini se nalazi sloj peptidoglikana, a sa unutrašnje strane citoplazmatična membrana (Garrity et al., 2005). U poređenju sa *E. coli* membrana je 15 puta tanja (Paulsson, 2017). Bez obzira što je spoljašnja membrana slabo propustljiva, ima mali broj velikih porina (kanali ispunjeni vodom), koji omogućavaju prolazak hranljivih materija. Takođe, postoji veliki broj specifičnih kanala kojima se unose hranjive materije i efluks pumpe kojima se izbacuju neželjeni molekuli (El-Roos et al., 2013) (Slika 3).



Slika 3. Ćelijski omotač *P. aeruginosa* (preuzeto i modifikovano prema Salmi et al., 2008).

Spoljašnja membrana je asimetrična sa unutrašnjim polisahridima, a spolja se nalazi sloj lipopolisaharida (LPS) (Ranjbar et al., 2011). Za spoljašnju membranu su vezani proteini flagela, pili i proteini spoljašnje membrane (OMP). Periplazmatični prostor, odnosno središnji sloj između spoljašnje i unutrašnje membrane sadrži peptidoglikan i solubilne periplazmatične proteine koji formiraju zaštitni prostor (Brener et al., 2005). Peptidoglikan se sastoji od *N*-acetilglukozamina i *N*-acetilmuraminske kiseline koji su ukršteni sa peptidnim bočnim lancima (Paulsson, 2017). Inače, β -laktamski antibiotici prekidaju ove veze i dovode do oštećenja same ćelije (Paulsson, 2017).

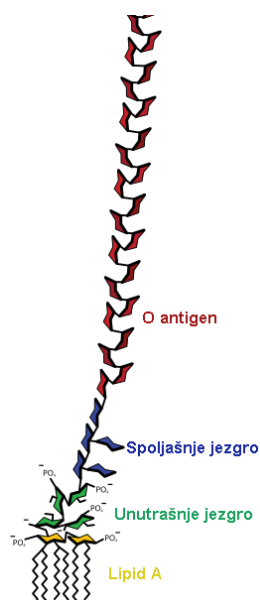
1.1.2.1 Proteini spoljašnje membrane

Dve vrste proteina su direktno povezani sa spoljašnjom membranom u obliku OMP i lipoproteina (Strateva et al., 2009). Obe vrste se sintetišu u citoplazmi. Lipoproteini su rastvorljivi, a pretežno su građeni od lipida koji su vezani za spoljašnju membranu. Postoji oko 175 lipoproteina u spoljašnjoj membrani, od kojih je 80% vezano za spoljašnju membranu, a 20% za unutrašnju (Paulsson, 2017). Do danas je poznato nekoliko stotina proteina na spoljašnjoj membrane *P. aeruginosa* i većina njih je sa nepoznatom funkcijom. Dodatno, OMP proteini imaju širok spektar funkcija poput transporta molekula preko membrane, enzimatske aktivnosti i adhezivnost ćelija.

1.1.2.2 Lipopolisaharidi (LPS)

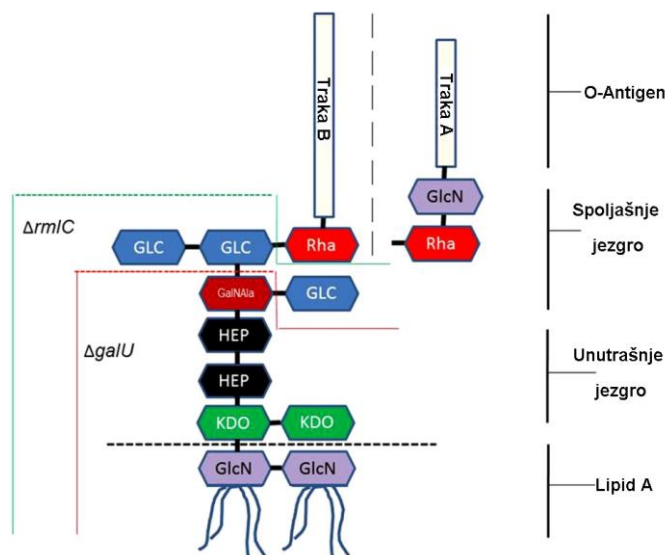
Ćeliju *P. aeruginosa* okružuju četiri vrste šećera: alginati, egzopolisaharid PSL i dve vrste LPS-a (Strateva et al., 2009). Polisaharidni alginati i PSL formiraju želatinoznu masu oko ćelije i važni su za formiranje biofilma, intracelularno preživljavanje i za mukoidni izgled nekih izolata (Paulsson, 2017). Lipopolisaharidi *P. aeruginosa* direktno učestvuju u virulentnosti i predstavljaju glikoprotein koji je osnovni deo spoljašnje membrane bakterije. Utiče na integritet spoljašnje membrane i štiti bakteriju od lipofilnih antibiotika. Vezuje se za egzopolisaharid polimorfonuklearnih leukocita (PML) što dovodi do njihove agregacije, adherencije i oslobađanja enzima iz bakterijske ćelije. LPS su odgovorni i za neke kliničke simptome kao što su povišena temperatura, trombocitopenija, leukocitoza, oštećenje kapilara sa unutrašnjim krvarenjem i endotoksični šok (Latino et al., 2017). LPS kod *P. aeruginosa* je strukturno sličan drugim Gram negativnim bakterijama i sastoji se iz tri subjedinice: hidrofobnog lipida A, hidrofилnog polisaharidnog lanca jezgra i hidrofилnog bočnog polisaharidnog lanca (Pukatzki et al., 2002), kako je i prikazano na Slici 4.

Lipid A je osnovni deo disaharida i za njega je vezano nekoliko lanaca masnih kiselina. Ovi lanci povezuju LPS u spoljašnjoj membrani (Maldonado et al., 2016). Somatski antigen *P. aeruginosa* je O-antigen, poznat kao O-lanac. Oni se sastoje iz različitih polisaharida različite dužine i sastava. Prostiru se oko 40 nm izvan lipidne ćelijske membrane (Bishop et al., 1987). Osnova za sintetisanje O-antigena su LPS, dok je antigenska specifičnost određena rasporedom monosaharida. Serološka O specifičnost soja je određena šećerima, njihovim sekvencama i načinom vezivanja (Iglewski et al., 1978). O-antigeni su snažno povezani sa bakterijskom virulencijom. Lipid A je deo bakterijskog LPS koja je glavna komponenta *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* često menja strukturu lipida A kao odgovor na uslove spoljašnje sredine pa tako i usled kolonizacije domaćina. Lipid A je građen od disaharidnih glukozamina esterifikovanim dugim lancima masnih kiselina koji su povezani pirofosfatnim vezama (Al-Dujaili & Harris, 1974). Usled mutacija, *P. aeruginosa* se brzo adaptira i dovodi do stvaranja biofilma i promene u lipopolisaharidima. Ove promene su uglavnom rezultat modifikacije lipida A (Ernst et al., 2003). Uočeno je da je lipid A kod *P. aeruginosa* izolata poreklom iz disajnih puteva dece sa cističnom fibrozom (CF) visoko acilovan, za razliku od izolata iz pacijenata koji nemaju CF, kod kojih je bio penta-acilovan, ukazujući na njegovu laku modifikaciju, inače karakterističnu za pacijente sa CF (Ernst et al., 1999).



Slika 4. Građa LPS kod *P. aeruginosa* (preuzeto i modificirano prema Stanković Nedeljković, 2015).

Enzimi koji učestvuju u modifikaciji LPS su karakteristični i za patogene i za saprofitne vrste. Svaka bakterijska vrsta ima svoj regulatorni mehanizam koji dovodi do modifikacije LPS. Regulatorni sistemi koji dovode do modifikacije lipida A su PhoP/PhoQ i PmrA/PmrB. PhoP/PhoQ je neophodan za dodavanje palmitata i aminoarabinoze u nepovoljnim uslovima kada nema dovoljno magnezijuma. Regulatorni sistem PrmA/PrmB takođe može učestvovati u dodavanju aminoarabinoze. Za sintezu lipida A kod pacijenata sa CF neophodna su 3 enzima: PagP - palmitoil transferaza spoljašnje membrane, LpkO - oksigenaza potrebna za sintezu 2-OH masnih kiselina i PagL- lipaza neophodna za deacilaciju 3-O-položaja masnih kiselina (Ernst et al., 2006). *P. aeruginosa* može u isto vreme da sintetiše dva tipa (A i B) O polisaharida (Slika 5).



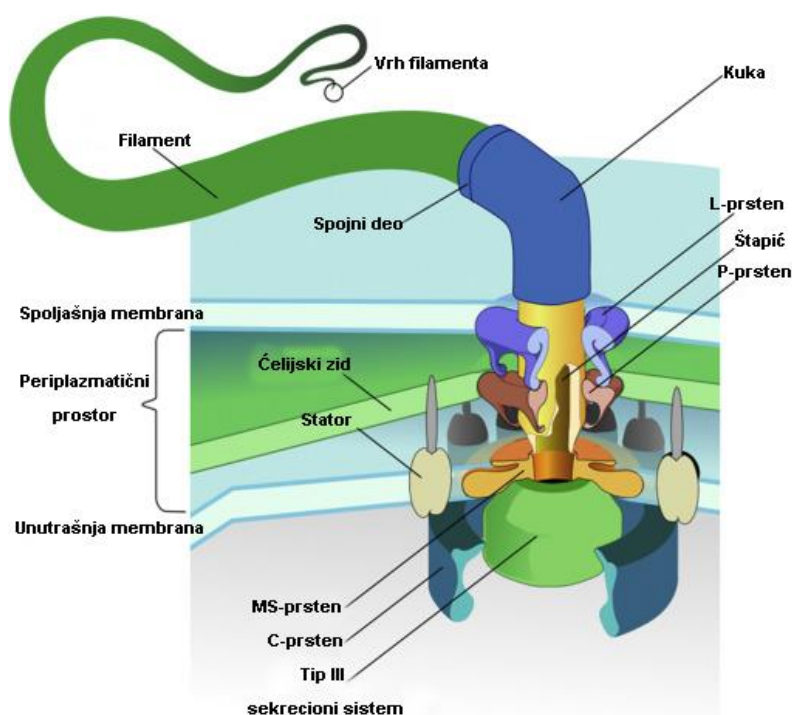
Slika 5. Šematski prikaz dve vrste lipopolisaharida A i B kod *P. aeruginosa* sa O-antigenom, spoljnim i unutrašnjim jezgrom.

Skraćivanje LPS za mutante bez O-antigena ($\Delta galU$ and $\Delta rmIC$) obeleženo je crvenim i zelenim linijama. Skraćenice šećera: GlcN = 3-(acetil amino)-3-deoksi-D-glukoza, KDO = 3-deoksi-D-mano-okt-2-ulonska kiselina, HEP = heptoza, GalNAc = 2-(2-L-alanil)-2 deoksi-D-galaktozamin, Rha = ramnoza GLC = glukoza (preuzeto i modificirano prema Ruhel et al., 2015).

Oni su strukturno različiti u sastavu šećera O-antigena. B-O-polisaharid je O-specifičan antigen. O-specifični antigeni izazivaju jak imunološki odgovor i stvaraju antitela. Bakterije koje nemaju O-antigen opisuju se kao hrapave kolonije, dok bakterije sa O-antigenom stvaraju glatke kolonije i njihov LPS je označen kao glatki LPS (King et al., 2009). Tip B LPS su slični LPS-u kod *E. coli* i formiraju strukturne osnove antigena. Međunarodna šema za antigensku tipizaciju (*engl.* International Antigenic Typing Scheme) klasifikuje *P. aeruginosa* u 20 serotipova označenih od O1 do O20 (Plotnikova et al., 2000).

1.1.2.3 Flagele i pili

P. aeruginosa obično poseduje jednu subpolarno postavljenu flagelu. Pored uloge u kretanju bakterijske ćelije, ima i važnu ulogu u stepenu virulencije (Drake & Montie, 1988). Na osnovu elektronske mikroskopije i strukture genoma, može se zaključiti da flagele *P. aeruginosa* se bitno ne razlikuju od flagela drugih entero bakterija (Gierhart & Chukwuma, 2017). Flagele su građene od tri dela: bazalnog tela, zakrivljenog dela ili kuke, kao i filameta (Klausen et al., 2003).

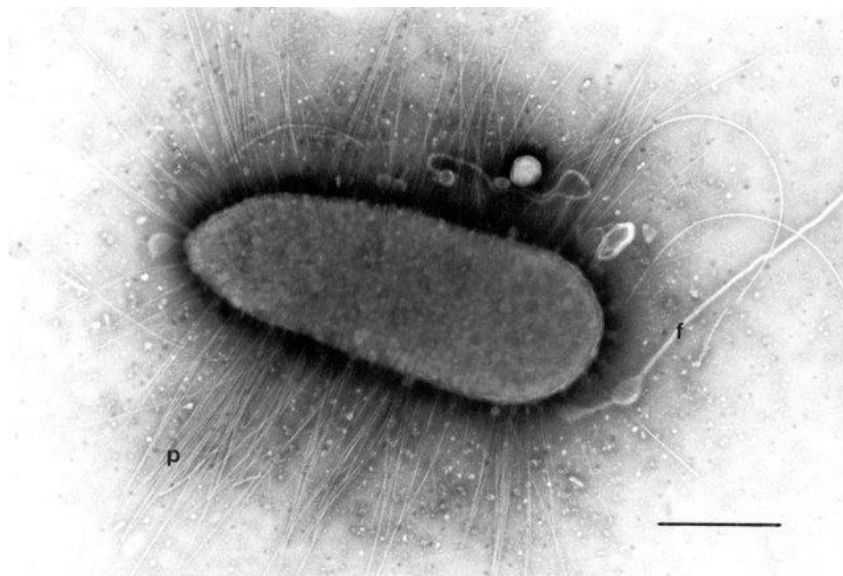


Slika 6. Građa flagele kod *P. aeruginosa* (preuzeto i modifikovano prema Nazir et al., 2019).

Više od 50 gena je uključeno u sintezu i funkciju flagela, što ukazuje na to da je njihovo očuvanje i uloga jako važna za preživljavanje ćelije (Conrad et al., 2011). Flagela omogućava uzimanje esencijalnih komponenata i visoko su imunogene (Weiss, 1971). Pokazano je u modelu kolonizacije sluzokože respiratornog trakta kod miševa ovom bakterijom, da su divlji sojevi izazvali pneumoniju i bakterijemiju, a mutantni samo lokalne promene, potvrđujući da mutacije značajno slabe virulenciju (Feldman et al., 1998). U istoj studiji divlji sojevi *P. aeruginosa* su direktno inokulisani u trahejama pacova. Pokazano je da se flagelin direktno vezuje za sluzokožu traheje što pokreće inflamatornu reakciju. Oslobođaju se citokini koji privlače polimorfonuklearne neutrofilne leukocite (PML) i dolazi do inflamacije. Mutantni sojevi nemaju ovu sposobnost usled nedostatka flagelina, ili ga imaju u maloj količini. Pokazano je da ako se pacovu sa pneumonijom, izazvanom divljim sojem, dodaju antitela flagelina klinička slika postaje dosta blaža, indikujući na njegovu važnu ulogu u virulenciji (Feldman et al., 1998). Pošto je flagelin kao antigen homogen i dovodi do stvaranja antitela, u budućnosti bi mogao da ima važnu ulogu u stvaranju vakcine. Sposobnost antiflagelina da smanji inflamaciju u plućima pacova, sugerise nam da flagela može biti korisna za

imunološku intervenciju. Međutim, važnost flagelina u najranijim fazama infekcije nije dokazana za genetički karakteristične sojeve. Svrha ovih studija je bila, ispitivanje virulencije divljih i mutantnih sojeva u razvoju infekcije pluća i učešće flagelina u kasnom imunološkom odgovoru (Feldman et al., 1998).

Pored flagele, na površini ćelije nalaze se i polarno postavljene fimbrije tj. pili (Slika 7). Pili kod *P. aeruginosa* su široki 6 nm i tanji su od ostalih enterobakterija (Brenner et al., 2005). Postoji pet grupa pilina, podeljenih na osnovu aminokiselinskih sekvenci od 1-5 (Ruer et al., 2005).



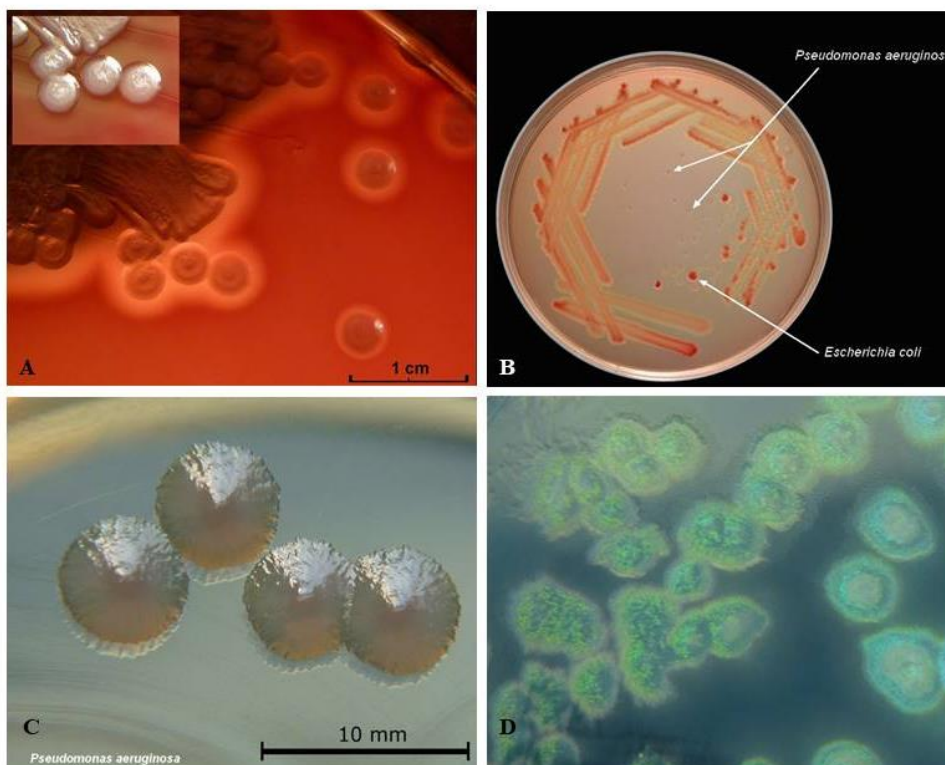
Slika 7. Negativ elektronske mikroskopije *P. aeruginosa* u prikazu flagele (f) i pila (p) (preuzeto iz: Baldwin, 2001).

Pili tipa IV se dele na dve podklase IVa i IVb. IVa su zastupljene kod većeg broja enterobakterija, pa tako i kod ne-enteričnog *P. aeruginosa* i učestvuju u adherenciji ćelija (Mikkelsen, 2009). Formacija pilusa je genetički vrlo kompleksna i zavisi od 30 gena koji su raspoređeni u šest regiona hromozoma (Bucior et al., 2012). Kolonije koje formira *P. aeruginosa* sa pilima su neravne i hrapave, zbog klizećih pokreta za razliku od mutantnih sojeva bez pila, čije su kolonije glatke (Stanković Nedeljković, 2015). *P. aeruginosa* često kolonizira respiratorni sistem hospitalizovanih pacijenata. Kolonizacija disajnih puteva može se objasniti prisustvom pila. Izolati koji su izgubili pile nemaju sposobnost kolonizacije i formiranja biofilma. Woods sa saradnicima je ispitivao ulogu pila u vezivanju za sluzokožu respiratornog trakta. Izolati koji su tretirani toplotom ili formalinom nisu mogli da koloniziraju tkivo. Razlog je gubitak pila usled izlaganja nekom od stresora, što je i ranije dokumentovano elektronskom mikroskopijom (Woods et al., 1980).

1.1.3 KULTURELNE I BIOHEMIJSKE OSOBINE

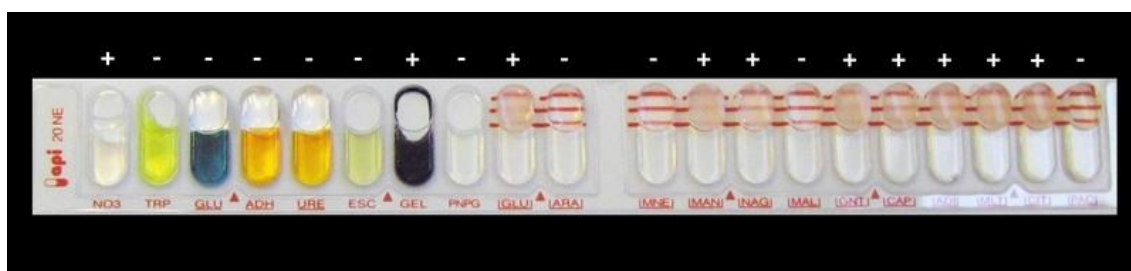
P. aeruginosa je aerobna bakterija, ali može da se razvija i pri niskoj koncentraciji kiseonika ili čak i bez njega. Zato je mnogi smatraju mikroaerofilnom bakterijom. Ako se razvija u anaerobnoj sredini kao krajnji akceptor umesto kiseonika koristi nitrate ili arginin. Zbog te sposobnosti preživljava u raznim tkivima ljudskog organizma sa malo ili bez kiseonika. Pokazan je rast na mnogim podlogama uključujući: hranljivi, krvni, čokoladni, endo, MacConcey, SS, TSA, glukozni i tioglikolatni medijum. Neke od specijalizovanih podloga za *Pseudomonas* su i cetrimidni agar, King A i B podloga, malahit zeleno i druge. Na krvnom agru uočava se β -hemoliza, dok se na ostalim podlogama može uočiti i produkcija pigmenata (Slika 8). Kolonije *P. aeruginosa*

su veličine od 3 do 5 mm, žuto zelene, orugle sa režnjevitim ivicama i mukoidne nakon 24h inkubacije na 37 °C.



Slika 8. Izgled kolonija *P. aeruginosa* na krvnom (A), MacConkey (B), TSA (C) i cetrimidnom agaru (D) (preuzeto sa: <https://www.microbiologyinpictures.com/pseudomonas-aeruginosa.html>).

P. aeruginosa ne fermentuje šećere, sposoban je za redukciju nitrata, ne stvara indol i vodonik-sulfid, može koristiti citrate kao jedini izvor ugljenika, razlaže želatin i produkuje lipazu (Slika 9). Učestvuje u asimilaciji glukoze, manoze i *N*-acetil-glukozamina. Oksidaza i katalaza je pozitivan.



Slika 9. Biohemijske osobine *P. aeruginosa* korišćenjem identifikacionog kita API 20 NE (preuzeto sa: <https://www.microbiologyinpictures.com/pseudomonas-aeruginosa.html>).

1.1.4 PRODUKCIJA BIOFILMA

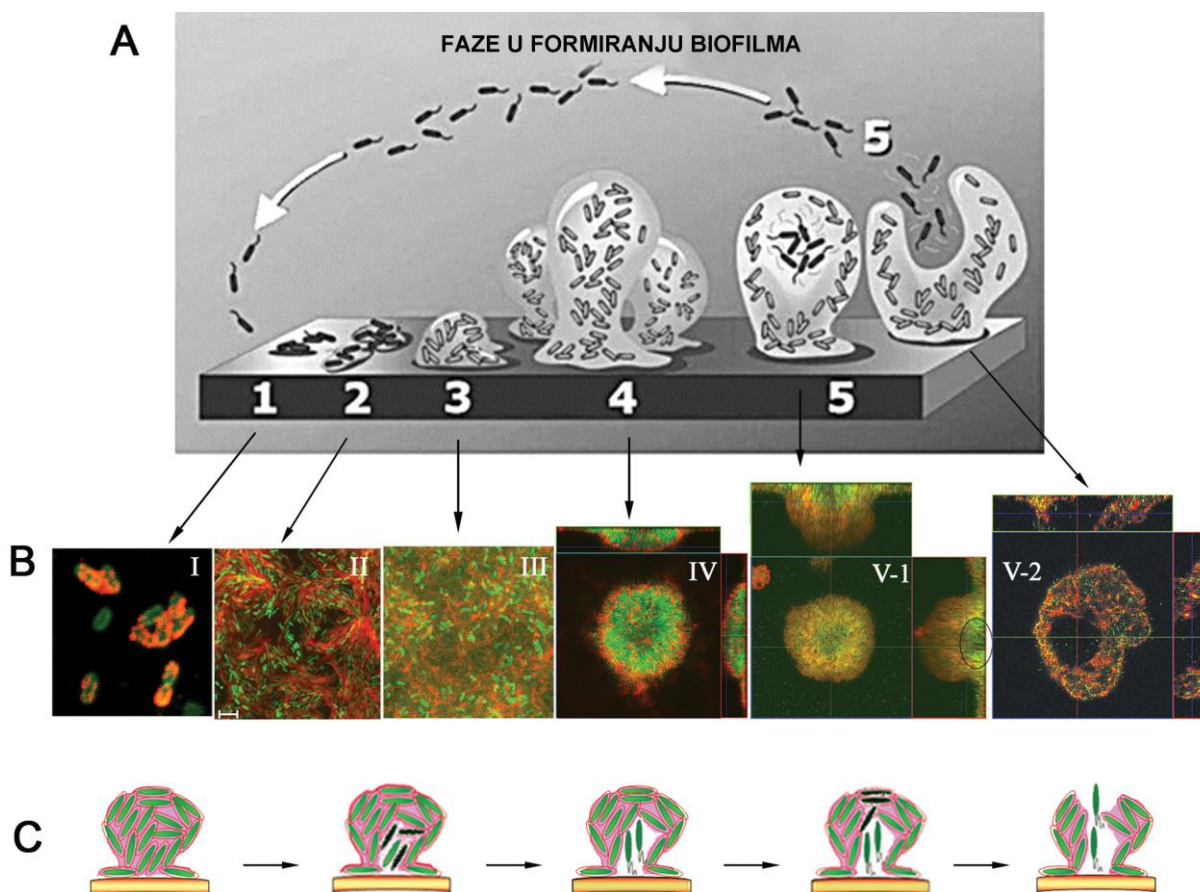
Biofilm je strukturna zajednica bakterijskih ćelija koje su vezane za neživu ili živu površinu, uklopljene u matriks koje same produkuju (Xu et al., 2013). Mikroorganizmi mogu živeti na dva načina: planktonski, kao samostalni jednoćelijski mikroorganizmi ili kao višećelijska nepokretna zajednica formirajući tzv. biofilm. Godina 1684. smatra se otkrićem biofilma, jer je tada Antonie van Leeuwenhoek zapazio mikroorganizme na površini zubne gleđi. Heukelekian i Heller su 1940.

godine ustanovili efekat flaše (*engl.* bottle effect) kod mikroorganizama u moru. Efekat flaše podrazumeva da se one vezuju za površine uronjene u vodu. Početkom 70-ih godina 20-og veka, počinju ozbiljnija istraživanja u vezi biofilma. Upotrebom elektronskog mikroskopa ustanovljena je velika razlika u ćelijskoj morfologiji, kao i da je međućelijski prostor ispunjen uglavnom polisaharidima (Costerton et al., 1978).

1.1.4.1 Faze formiranja biofilma

Formiranje biofilma je složen process koji se odvija u pet faza (Slika 10):

1. Reverzibilno vezivanje bakterija
2. Ireverzibilno vezivanje bakterija
3. Formiranje mikrokolonija
4. Sazrevanje i diferencijacija biofilma
5. Disperzija zrelog biofilma

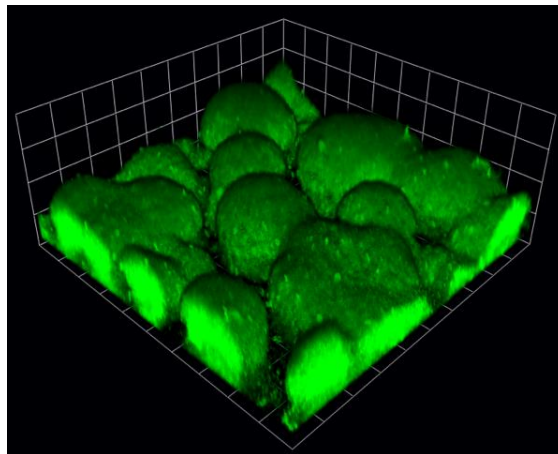


Slika 10. Šema koja prikazuje pet faza razvoja biofilma (A).

Slike bojenja Psl (crvena) tokom svake razvojne faze formiranja biofilma. Signal zelene fluorescencije dobijen je iz GFP-om obeleženog *P. aeruginosa* (B). Predloženi mehanizam koji pokazuje kako mikrokolonija *P. aeruginosa* žrtvuje deo ćelija u centru i remeti postojeću matricu da bi oslobodila ćelije za disperziju (C). Roze materijal predstavlja Psl matricu, svetlo zelene ćelije predstavljaju žive bakterije, a tamnozeleno predstavljaju mrtve bakterije koje su podvrgnute autolizi (preuzeto i modifikovano prema Ma et al., 2009).

U prvoj fazi bakterije se približavaju određenoj površini. Vezivanje bakterija za površinu odvija se prema dvostepenom modelu (Prunić, 2017). Prvo se odigrava jedna prolazna, reverzibilna adhezija bakterija za površinu. Vezivanje bakterija za površinu može biti aktivno i pasivno (Lima et

al., 2017). Pasivno vezivanje je uslovljeno dejstvom gravitacione sile, difuzijom i dinamikom tečnosti, a na aktivno utiču falagele, pili, adhezin, fimbrije. Vremenom, veza između bakterija i supstrata jača. Druga faza tj. faza ireverzibilnog vezivanja bakterija rezultat je produkcije ekstracelularne polimerne supstance (EPS), glikokaliksa ili matriksa biofilma (Müsken et al., 2010; Milojković et al., 2020). Matriks biofilma je visoko hidriran i od 85% do 95% čini ga voda (Prunić, 2017). Pored vode u sastav matriksa ulaze polisaharidi, proteinske komponente, fosfolipidi, teihoinjska kiselina i ekstracelularna DNK. Od šećera prisutna je glukoza, galaktoza, manosa, fruktoza, N-acetilglukozamin i drugi. U trećoj fazi bakterije rastu i dele se formirajući mikrokolonije. One mogu da sadrže jednu ili više vrsta bakterijskih ćelija. U mikrokolonijama bakterije su međusobno povezane ekstracelularnim vezama. Za vreme formiranja mikrokolonija povećava se gustina populacije bakterija i počinje komunikacija pomoću signalnih molekula koji omogućavaju sazrevanje biofilma (Olszewska et al., 2016). Sazrevanje biofilma rezultat je adherencije novih planktonskih ćelija u kombinaciji sa kontinuiranim rastom već vezanih ćelija (Prunić, 2017). Razvoj biofilma isključivo zavisi od prisustva hranljivih materija. Ako su okolnosti povoljne, biofilm se razvija u organizovanu strukturu i taj proces se zove sazrevanje biofilma (Milanov et al., 2008). U povoljnim uslovima biofilm može da se razvije za 24 sata. Zreli biofilm izgleda kao pečurkasta formacija povezana sitnim kanalčićima za dopremanje hranljivih materija (Slika 11).



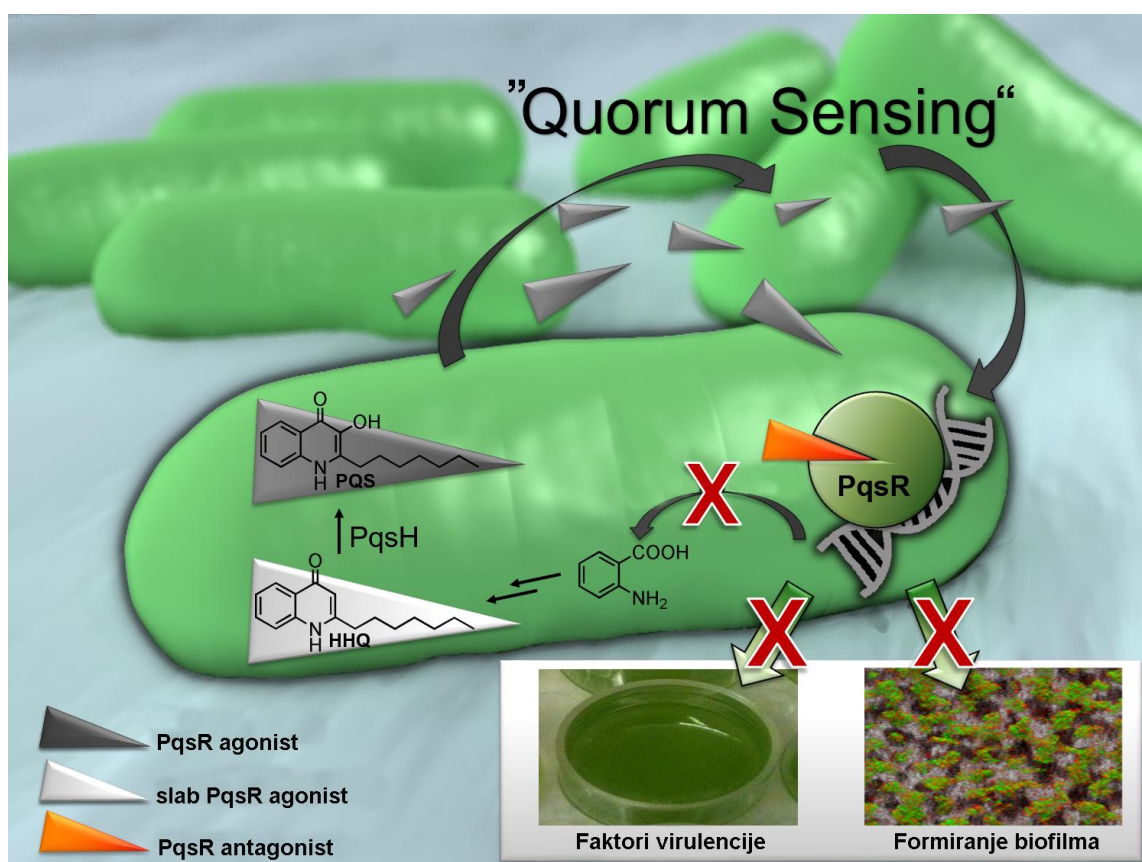
Slika 11. Pečurkasta formacija biofilma kod *P. aeruginosa* (preuzeto sa: <https://depts.washington.edu/cshlab/html/research/biofilms.html>)

Disperzija biofilma nastaje kao rezultat promena u okruženju, najčešće zbog promena u snadbevanju hranljivim materijama, pre svega gvoždem, kiseonikom i ugljenikom (Stanković Nedeljković, 2015). Usled nedostatka kiseonika stvara se mikroaerofilna ili anaerobna sredina. U tom slučaju kao krajni akceptori elektrona postaju nitriti, nitrati i azot oksid. U anaerobnim uslovima azot oksid inhibira gene odgovorne za adheziju i dovodi do disperzije biofilma (Stanković Nedeljković, 2015). Mehanizam disperzije može biti aktivno posredovan od strane samih ćelija ili pasivno posredovan silama trenja ili ljudskim faktorom (Milanov et al., 2008). Disperzija može da se odvija i putem erozije biofilma, kada se bakterije odvajaju kontinuirano ili čak manji delovi biofilma (Milanov et al., 2008). Što je biofilm deblji stopa erozije je veća, a obično je pokrenuta silama trenja.

1.1.4.2 Intracelularna komunikacija

Ćelije *P. aeruginosa* međusobno komuniciraju putem produkata koje difunduju iz jedne ćelije u drugu. Prelazak bakterijske ćelije iz planktonske forme u formu biofilma regulisan je ekspresijom gena i čvrsto je povezana sa koncentracijom signalnih molekula tzv. autoinducera (Leskovar & Vraneš, 2009). Mehanizam kojim bakterije utiču na ciljane gene naziva se *engl.* quorum

sensing (QS). Autoinduceri pri postignutom kvorumu tj. pri graničnoj koncentraciji autoinducera, regulišu i procese sinteze antibiotika, faktore virulence, kretanja, rasta, stvaranja toksina i biofilma (Schaber et al., 2007). Postoje dva tipa autoinducerskih molekula. Gram pozitivne bakterije koriste kratke peptidne lance, a Gram negativne bakterije koriste acetil-homoserin laktone i ista bakterija može da sintetiše više njih različitih. Takve bakterije mogu da osećaju sopstvenu gustinu, ali i gustinu drugih bakterija u okruženju. QS sistem čine signalni molekuli (autoinduceri), transkripcioni regulatorni protein (protein R) koji služi kao signalni receptor i transkripcioni regulator (Stanković Nedeljković, 2015). Pri niskoj gustini ćelija proizvode se autoinduceri i protein R, koji difunduju u okolinu ćelije gde se rastvaraju. Prilikom povećanja gustine ćelija dolazi do akumuliranja autoinducera. Kada se gustina ćelija utrostruči, autoinduceri formiraju kompleks sa R proteinom, koji je u stanju da reguliše ciljne gene, vezivanjem kompleksa za specifične sekvence DNK. Kod *P. aeruginosa* QS sistem je važan za bakterijsku virulenciju i stvaranje biofilma. Funkcija višestrukih faktora virulencije regulisanih QS i sinteza 4-hidroksi-2-alkilhinolina, uključujući *Pseudomonas* hinolonski signal, čine PqsR ključnim regulatorom patogenosti (Slika 12).



Slika 12. Mehanizam funkcionisanja QS sistema kod *P. aeruginosa*.

PqsR antagonista predstavlja signalni molekul čiji je ligand QS receptor potreban za punu virulenciju i biofilm formaciju *P. aeruginosa* (preuzeto sa: <https://www.ascenion.de/technologieangebote/innovative-inhibitors-of-pseudomonas-pathogenicity-6349>).

1.1.4.3 Povećana rezistencija bakterija u biofilmu

Bakterije u biofilmu imaju povećanu rezistenciju na antibiotike i dezinficijense. Bakterije u biofilmu pokazuju 10-1000 puta veću rezistenciju u odnosu na planktonski slobodno-živeće ćelije (Mah & O'toole, 2001). Perzistentne bakterije su u biofilmu zaštićene fizičkom barijerom matriksa od efekta imunološkog sistema, a ekstracelularna polimerna supstanca štiti bakterije od fagocitoze.

Povećana rezistencija biofilma na antibiotike nastaje zbog oslabljene difuzije antibiotika u džepove biofilma (Vujović et al., 2016). Oslabljena difuzija se objašnjava na dva načina. Prvo, ekstracelularni matriks biofilma deluje kao nepropusna barijera za velike molekule antibiotika, dok sa druge strane, biofilm se štiti od antibiotika i enzimskom razgradnjom. Kada se antibiotska terapija prekine pre vremena, preostale bakterije mogu ponovo formirati biofilm i vratiti simptome bolesti. Za obnovu biofilma potrebno je manje od 1% početne populacije bakterija. Sa porastom debljine biofilma menjaju se i uslovi u samom biofilmu kao što je dostupnost hranljivim materijama i kiseonku. Sve ovo utiče na brzinu razmnožavanja bakterija, koje prelaze u stacioniranu fazu u kojoj su manje osetljive na dejstvo antibiotika. Takođe, bakterije na površini biofilma pokazuju veću rezistenciju na antibiotike od bakterija unutar samog biofilma (Vujović et al., 2016).

1.1.5 FUNKCIONALNA I GENETIČKA RAZNOLIKOST LIPOPOLISAHARIDA *P. AERUGINOSA*

Kako bi se ustanovile razlike između sojeva *P. aeruginosa* izolovanih iz prirodnih ili kliničkih okruženja, primenjivane su serološke metode pri čemu su poliklonalna antitela ukrštana sa referentnim sojevima *P. aeruginosa* kako bi se dobila kolekcija soj-specifičnih antiseruma (Lam et al., 2011). Da bi se iskoristila specifičnost antitela, korišćene su brojne imunohemijske tehnike uključujući testove aglutinacije i reakcije taloženja u gel-difuzionim testovima. Prvi test predstavlja prilično jednostavan metod vizuelizacije nakupljanja bakterija na mikroskopskoj pločici za nekoliko sekundi nakon dodavanja malog alikvota specifičnog antiseruma, dok poslednji omogućava difuziju antitela i antigena (obično bakterijskih ćelijskih lizata) kroz poliakrilamidne gelove sve dok se ekvivalentne količine ovih reagenasa ne agregiraju i formiraju vidljivi precipitat (Mutharia & Lam, 2007). Zanimljivo je da reakcije u SDS-PAGE metodi (*engl.* Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) omogućavaju razlučivanje između unakrsnih reakcionih grupa, stvarajući tako podgrupu među specifičnim serotipovima, na primer, serogrupe 2a2b, 2a2c, itd. (Stanislavski & Lam, 1997). Iako zamorne, ove metode serotipizacije bile su zlatni standard pre otprilike 40 godina i još uvek ih koriste određene zdravstvene ustanove zbog niske cene i brzine u dobijanju rezultata. Pošto su razne laboratorije iz različitih delova sveta pripremale sopstvene antiserume, uspostavljene su mnoge šeme serotipizacije *P. aeruginosa* izolata do sada, poput Homma, Habs, Lanii & Bergan, i Fisher imunotipizacionih sistema (Stanislavski & Lam, 1997). Kako su LPS jedni od glavnih faktora virulencije, javila se potreba za standardizacijom serotipizacionih sistema. Liu et al. (1983) koordinirali su poseban sastanak između stručnjaka za serotipizaciju *P. aeruginosa*. Zahvaljujući njihovoj inicijativi došlo se do standardizovane klasifikacije serotipova poznatom pod imenom Međunarodna šema za antigensku tipizaciju (IATS), koja je posedovala 17 serotipova zasnovanih na Habs-ovom sistemu (1–12) i uključivala dodatnih 5 serotipa iz drugih serotipizacionih sistema (Stanislavski & Lam, 1997). Kasnije su pridodata još 3 serotipa da bi se IATS ukupno povećala na 20 serotipova (Tabela 1), koliko ih je prihvaćeno i danas (Liu & Vang, 1990).

LPS se sintetiše od pojedinačnih monosaharida u oligosaharide tzv. biološki ponovljeni O-antigen (Knirel et al., 2006). Strukturno, LPS *P. aeruginosa*, kao što je napomenuto se sastoji od tri domena, lipida A, oligosaharida jezgra (*engl.* core) i distalnog O-antigena. Većina sojeva *P. aeruginosa* proizvodi dva različita oblika O-antigena, jedan je homopolimer D-ramnoze koja je uobičajeni polisaharidni antigen (CPA, ranije nazvan A trakom), a drugi heteropolimer od tri do pet različitih (često jedinstvenih dideoksi) šećera u svojim ponavljanim jedinicama, a poznatiji kao O-specifični antigen (OSA, ranije nazvan B trakom). Kompozicione razlike u O jedinicama među OSA iz različitih sojeva čine osnovu Međunarodne antigenetske shememe za tipizaciju i klasifikaciju serotipova (Lam et al., 2011). Prisustvo O-antigena na LPS-u je neophodno za bakteriocidno dejstvo seruma na *P. aeruginosa* (Mutharia, L. M et al., 1982). Najčešća metoda određivanja serotipova i danas je aglutinacija monovalentnim i polivalentnim serumima. Nedostatak ove metode je veliki procenat (10% do 40%) netipibilnih izolata (Lam, et al., 1987). Poznato je

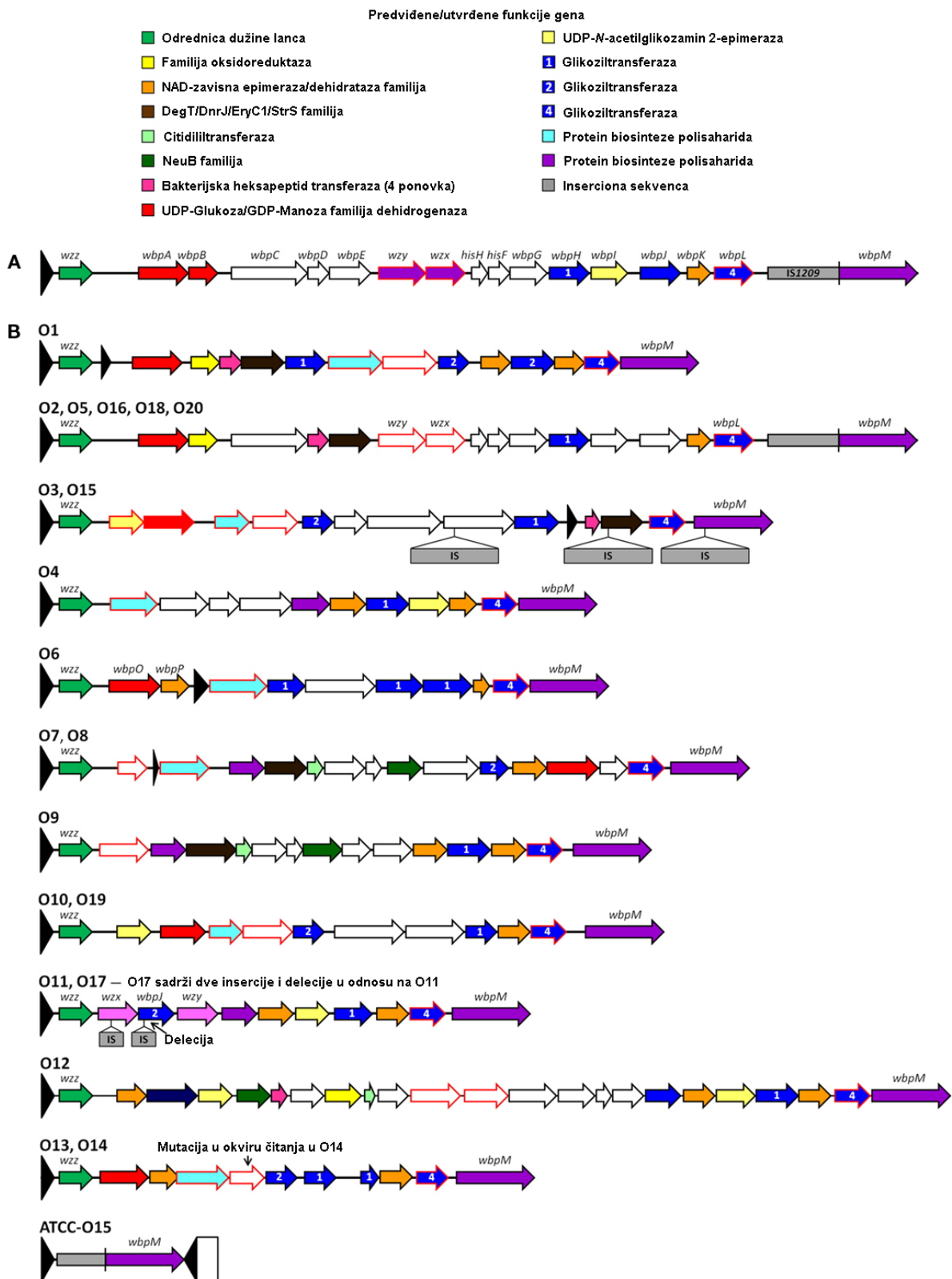
takođe da kod pacijenata sa CF, izolati imaju manjak glukoze i ramnoze pa se smatra da su zbog toga netipabilni (Stanković Nedeljković et al., 2015).

Tabela 1. Jedinice koje se ponavljaju kod O-specifičnih antigena sačinjavajući 20 IATS tipizacionu shemu

| IATS serotip | O-specifični antigenski ponovak |
|--------------|---|
| O1 | →4)-d-GalNAc-(1 → 4)-d-GlcNAc3NAcA-d-(β1→3)-d-FucNAc-(1→3)-d-QuiNAc-(1→ |
| O2 | →4)-d-ManNAc3NAmA-(β1→4)-l-GulNAc3NAcA-(1→3)-d-FucNAc-(β1→ |
| O5 | →4)-d-ManNAc3NAmA-(β1→4)-d-ManNAc3NAcA-(β1→3)-d-FucNAc-(1→ |
| O16 | →4)-d-ManNAc3NAmA-(β1→4)-d-ManNAc3NAcA-(β1→3)-d-FucNAc-(β1→ |
| O18 | →4)-l-GulNAc3NAmA-(1→4)-d-ManNAc3NAcA-(β1→3)-d-FucNAc-(1→ |
| O20 | →4)-l-GulNAc3NAmA-(1→4)-d-ManNAc3NAcA-(β1→3)-d-FucNAc4OAc-(1→ |
| O3 | →2)-l-Rha3OAc-(1→6)-d-GlcNAc-(1→4)-l-GalNAc4OAcA-(1à3)-d-QuiNAc4NSHb (β1→ |
| O4 | →2)-l-Rha-(1→3)-l-FucNAc-(1→3)-l-FucNAc-(1→3)-d-QuiNAc-(1→ |
| O6 | →3)-l-Rha-(1→4)-d-GalNAc3OAcAN-(1→4)-d-GalNFoA-(1→3)-d-QuiNAc-(1→ |
| O7 | →4)-Pse4OAc5NRHb7NFo-(2→4)-d-Xyl-(β1→3)-d-FucNAc-(1→ |
| O8 | →4)-Pse4OAc5NAc7NFo-(2→4)-d-Xyl-(β1→3)-d-FucNAc-(1→ |
| O9 | →3')-Pse4OAc5NAc7NRHb-(β2→4)-d-FucNAc-(1→3)-d-QuiNAc-(β1→ |
| O10 | →3)-l-Rha2OAc-(1→4)-l-GalNAcA-(1→3)-d-QuiNAc-(1→ |
| O19 | →3)-l-Rha-(1→4)-l-GalNAcA-(1→3)-d-QuiNAc-(1→ |
| O11 | →2)-d-Glc-(β1→3)-l-FucNAc-(1→3)-d-FucNAc-(β1→ |
| O12 | →8)-8eLeg5NAc7NAc-(2→3)-l-FucNAc-(1→3)-d-QuiNAc-(1→ |
| O13 | →)-l-Rha-(1→3)-l-Rha-(1→4)-d-GalNAc3OAcA-(1→3)-d-QuiNAc-(β1→ |
| O14 | →)[d-Glc-1→3]-l-Rha-(1→3)-l-Rha-(1→4)-d-GalNAc3OAcA-(1→3)-d-QuiNAc-(β1→ |
| O15 | →2)-d-Ribf-(β1→4)-d-GalNAc-(1→ |
| O17 | →4)-l-Rha-(1→3)-d-ManNAc-(β1→ |

Specifični O-antigeni su grupisani prema strukturnoj sličnosti. Anomerne konformacije su α , osim ako nisu označene kao β . Šećeri imaju piranoznu formu osim riboze kod O15. Skraćenice: Ac, acetil; 8eLeg, 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeoksi-l-glicero-D-galakto-non-2-ulozonska(8-epilegionaminska) kiselina; Fo, formil; FucN, 2-amino-2,6-dideoksi-galaktoza; GalN, 2-amino-2-deoksi-galaktoza; GlcNA, 2-amino-2-deoksi-glukuronska kiselina; GulNA, 2-amino-2-deoksi-guluronska kiselina; ManN, 2-amino-2-deoksi-manoza; ManNA, 2-amino-2-deoksi-manuronska kiselina; N, amino; NAc, acetamid; NA μ , acetamidin; OAc, O-acetil; Pse, 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeoksi-L-glicero-L-mano-non-2-ulozonska(pseudaminska) kiselina; QuiN, 2-amino-2,6-dideoksigluktoza; Rha, ramnoza; RHb, (R) -3-hidroksibutanoil; Rib, riboza; SHb, (S)-3-hidroksibutanoil. QuiNAc je povezan sa pseudaminskom kiselinom preko 3-hidroksibutanoilne grupe (preuzeto iz: Lam et al., 2011).

Burrows et al. (1996) su u svom istraživanju prvi dobili sekvencu čitavog OSA klastera. Da bi se okarakterisala funkcija gena kodiranih u ovom klasteru, dizajnirani su nokaut konstrukti mutanata za svaki od gena i mutantima je ispitivan njihov uticaj na proizvodnju LPS kod *P. aeruginosa*. Lista gena biosinteze OSA u ovom klasteru za serotip O5 i njihove funkcije određene su na osnovu genetičkih studija, kao i biohemijskih i hemijskih dokaza (Slika 13A). Nakon uspeha u karakterizaciji lokusa biosinteze O5 OSA, određene su i sekvence O6 (Belanger et al., 1999) i O11 (Dean et al., 1999) OSA lokusa. Poređenja sekvenci među novo sekvenciranim lokusima otkrila su da su sva tri OSA lokusa bila bočno ograničena sa *himD/ihfB* (*pa3161*) na 5' kraju i završavala su se *wbpM* (*pa3141*) genom na 3' kraju. Ova zapažanja su na kraju omogućile Raymond et al. (2002) kloniranje i sekvenciranje OSA lokusa iz svih 20 IATS serotipa. Na osnovu njihovih podataka o sekvenciranju, opšte genetske strukture OSA lokusa svih serotipa mogu se podeliti u 11 različitih grupa na osnovu proteinskih familija koje geni u tim lokusima kodiraju, kao i prisustva insercionih sekvenci i delecija (Slika 13B).



Slika 13. Organizacija gena u OSA biosintetskim klasterima.

(A) OSA biosintetski klaster serotipa O5. Genski klaster je smešten na komplementarnom lancu a geni koji odgovaraju određenoj proteinskoj familiji različito su obojeni. Geni koji nisu uključeni u biosintezu OSA su prikazani sivo, uključujući i veliku insercionu sekvencu (IS). (B) OSA biosintetski klasteri gena organizovani u 11 grupa na osnovu konzerviranih sekvenca. Geni su označeni pomoću baze podataka o proteinskim familijama; specifične porodice proteina koje se javljaju najmanje tri puta tokom svih 20 OSA klastera biosinteze predstavljene su određenom bojom. Crveni okvir oko strelica prikazuje otvorene okvire čitanja sa potencijalnim transmembranskim domenima. Insercione sekvence (IS) prisutne unutar gena prikazane su sekundarnom sivim umetkom (preuzeto i modifikovano prema Lam et al., 2011).

1.1.6 FENOTIPSKA RAZNOLIKOST PIGMENATA

Jedna od specifičnosti izolata *P. aeruginosa* jeste i produkcija više različitih vrsta pigmenata poput: piocijanina (plavo-zeleni), pioverdina (fluorescentni žuto-zeleni), piorubina (tamno crveni) i piomelanina (braon) (Slika 14).



Slika 14. Različiti pigmenti izolata *P. aeruginosa*.

Najkarakterističnija osobina *P. aeruginosa* je proizvodnja rastvorljivog pigmenta piocijanina: u vodi rastvorljivog plavo-zelenog fenazinskog jedinjenja. Piocijanin ima različita farmakološka dejstva na prokariotske ćelije; njegova biološka aktivnost povezana je sa sličnošću u hemijskoj strukturi izoaloksazina, flavoproteina, flavin mononukleotida i flavin adenin dinukleotidnih jedinjenja (El-Fouly et al., 2015). Za piocijanin postoji poseban interes zbog njegove sposobnosti stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika (ROS). Tumorske ćelije su podložne reaktivnim vrstama kiseonika koje proizvodi piocijanin, jer interferira sa aktivnostima topoizomerase I i II u eukariotskim ćelijama (Hassani et al., 2012). Dakle, taj plavo-zeleni metabolit sa sposobnošću oksidacije, može ubiti ostale bakterijske vrste koje pokušavaju stupiti u simbiozu sa *P. aeruginosa* kao što je i slučaj kod CF (Wilson et al., 1987). *P. aeruginosa* sintetise pored piocijanina i ostala redoks-aktivna jedinjenja poput fenazin-1-karboksilna kiseline i fenazin-1-karboksiamida (Budzikiewicz, 1993). Piocijanin igra važnu ulogu u oštećenju epitela disajnih puteva pacijenata sa CF. Dovodi do poremećaja u transportu jona i promena u koncentraciji kalcijuma, što doprinosi poremećaju u sekretu sluzi u epitelnim ćelijama disajnih puteva (Denning et al., 1998a). Takođe stimuliše makrofage na sintezu interleukina-8 koji privlači neutrofilne granulocite dovodeći do inflamatorne reakcije i oštećenja tkiva (Denning et al., 1998b). Fluorescentni pioverdin se sastoji od dihidroizohinolinske hromatofore, kratkih tip-specifičnih peptida i karboksilne kiseline (Meyer, 2000). Njegov ključni doprinos je snabdevanje gvoždem u deficitarnim uslovima, regulacija endotoksina A i formiranje biofilma (Cho & Tiedje, 2000). Međutim, u slučaju infekcije, gvožđe nije slobodno dostupno kod domaćina i većinom se nalazi u proteinima koji vezuju gvožđe, kao što su transferrin, laktoferrin i feritin. Zbog niske bioraspoloživosti slobodnog gvožđa, bakterije proizvode male molekule gvožđa koje se nazivaju siderofore koje se izlučuju u apo-obliku i uvoze kao ferični kompleksi. *P. aeruginosa* proizvodi dva siderofora, pioverdin i pihelin, važne agense za razvoj biofilma i bakterijsku virulenciju (Peek et al., 2012).

Iako tačna uloga fenazinskog piorubina u reakcijama na stres i virulenciju nije dobro određena, rezultati Machreki et al. (2019) su pokazali da se nivo piorubina povećava kod *P. aeruginosa* A81 izolata, poreklom iz sterilisane morske vode nakon osmomesecne inkubacije, sugerišući na njegovu verovatnu ulogu u reakcijama na stres. Za piomelanin je pokazano, kao i za druge melanin pigmete, da su veoma reaktivni u prisustvu ROS-a, a oksidativni stres izazvan peroksidom je smanjen kod *P. aeruginosa* produkcijom ovog pigmenta, što je važna osobina kliničkih izolata naročito kod pacijenata sa respiratornim infekcijama (Turick et al., 2010). Sa druge strane, Hocquet et al. (2016) ukazali su da piomelanin produkujući *P. aeruginosa* mutanti sa velikim hromozomskim delecijama, poseduju niži fitness u uslovima rasta u ljudskom tkivu, poput hiperosmolarnosti i prisustva aminoglikozidnih antibiotika, kao i na smanjenje metaboličke fleksibilnosti, ukazujući na interbakterijske interakcije posredovane piocinom, a koje su omogućene rastom biofilma.

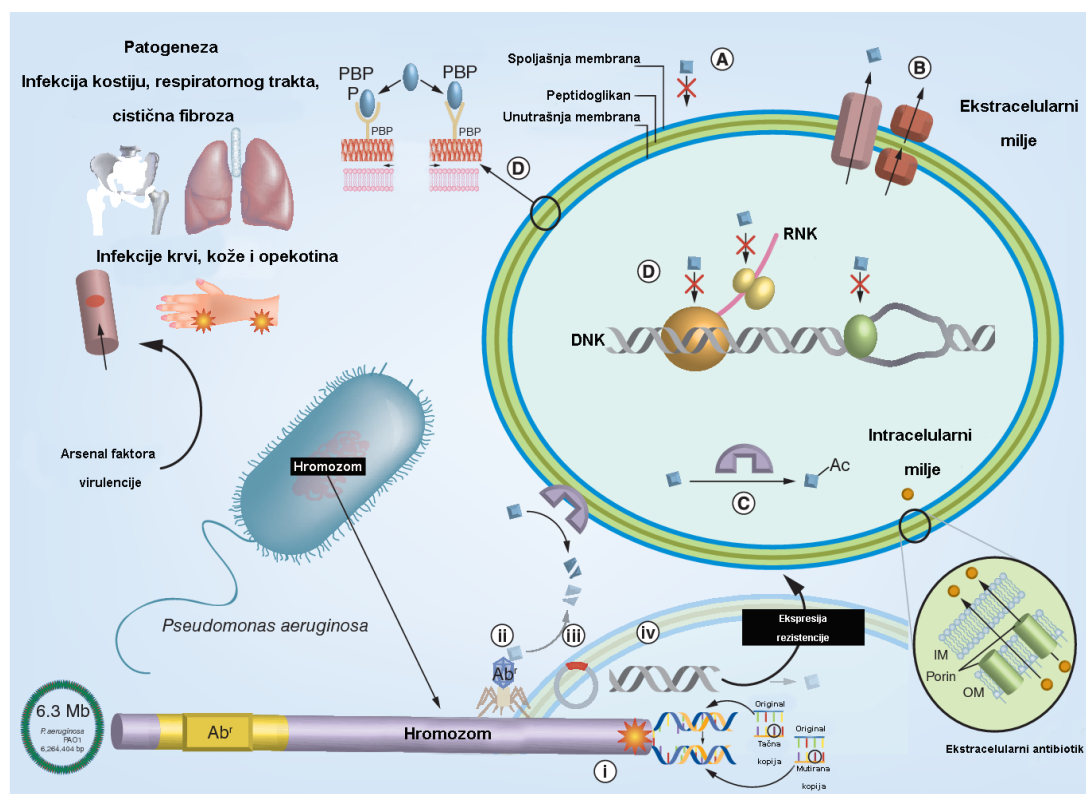
1.1.7 MEHANIZMI ANTIBIOTSKE REZISTENCIJE

Do danas je otkriveno više različitih mehanizama, kojim bakterije ostvaruju rezistenciju na antibiotike. Ovi mehanizmi podrazumevaju hemijsku modifikaciju antibiotika, mogu da redukuju ulazak antibiotika u ćeliju (hloramfenikol), da aktivno odstranjuju antibiotik iz ćelije (tetraciklin), enzimsku modifikaciju samog molekula antibiotika (β -laktamaze-penicilini, cefalosporini, karbapenemi i monobaktami ili modifikaciju ciljnog mesta na bakterijskoj ćeliji za koje se veže antibiotik (eritromicin i linkomicin), tako da ih oni nisu u stanju prepoznati (Unić-Stojanović et al., 2015). Najčešći način delovanja na antibiotike je njegova enzimaska inaktivacija, zahvaljujući kojoj gube aktivnost za mikroorganizme (Milojković et al., 2020). Druga najčešća alternativna strategija koju koriste mnoge bakterijske vrste je izmena ciljnog mesta na bakterijskoj ćeliji za delovanje antibiotika.

Rezistencija bakterija na antibiotike može biti urođena i stečena. Prirodna rezistencija je čest primer otpornosti bakterija na antibiotike, kada one poseduju sistem za unošenje antibiotika u ćeliju ili u slučaju Gram negativnih bakterija, kada je njihov ćelijski zid pokriven spoljašnjom membranom, koja predstavlja barijeru u propustljivosti za dati antibiotik. Stečena rezistencija se može razviti na više načina, ali svi se uglavnom odnose na modifikaciju postojećeg genetičkog materijala ili dobijanju novog genetičkog materijala iz drugog izvora (Lambert, 2002). Prenos genetičkog materijala između dve bakterijske ćelije može biti vertikalni ili horizontalni. Kako je frekvencija spontanijih mutacija u bakterijskoj ćeliji vrlo retka i dešava se u oko 10^{-8} do 10^{-9} bakterijskih ćelija, to znači da će se tokom neke infekcije zahvaljujući ovom procesu razviti rezistentni tipovi u svakoj 10^8 ili 10^9 bakterijskoj ćeliji. Mada su mutacije uglavnom retke, brz rast bakterijske populacije i apsolutni broj novonastalih ćelija znači, da ipak nije potrebno mnogo vremena, da bi se nakon izlaganja bakterijske ćelije u jednoj populaciji delovanju određenog antibiotika razvila rezistencija (Unić-Stojanović et al., 2015). Kada se jednom razviju geni rezistencije, oni se direktno prenose na celokupno potomstvo. Ovaj proces je poznat kao vertikalni prenos gena i odvija se po principu prirodne selekcije (Wright, 2005). Ukoliko se takva populacija bakterija nađe u selektivnom okruženju sa datim antibiotikom, tada će divlji tipovi koji nisu mutirali biti ubijeni, a rezistentni mutanti će nastaviti da se razmnožavaju i preuzeti kompletnu populaciju date bakterijske ćelije. Horizontalni prenos gena rezistencije je proces u kome genetički material može biti transportovan između pojedinih ćelija iste vrste ili čak i između bakterijskih ćelija različitih vrsta. Pored bakterijskih vrsta, koje su rezistentne na jednu klasu antibiotika, danas je sve veći broj tzv. multirezistentnih bakterija, koje su rezistentne na nekoliko antibiotika, koji su različiti i po mehanizmu delovanja i po hemijskom sastavu (Stanković Nedeljković, 2015). U bolničkoj i vanbolničkoj sredini zabeležene su brojne infekcije uzrokovane višestruko rezistentnim bakterijama poput: meticilin-rezistentnih *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomicin-rezistentnih *Enterococcus faecalis* (VRE), penicilin-rezistentnih *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) i multipno-rezistentnih *P. aeruginosa* (XDR) izolata.

1.1.7.1 Višestruka antibiotska rezistencija *P. aeruginosa* izolata

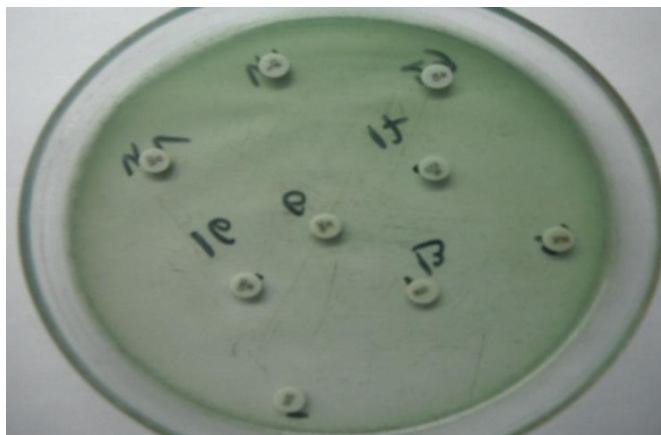
P. aeruginosa je intrinzično rezistentna bakterija na veliki broj antibiotika, uključujući benzilpenicilin, 1 i 2 generaciju cefalosporina, glikopeptidne i druge β -laktamske antibiotike, fusidinsku kiselinu, MLS grupu (makrolide, linkozamide i streptogramine), rifampicin, daptomicin, linezolid, rifampicin, tetracikline, hloramfenikol i trimetoprim (Rossolini & Mantengoli, 2005; EUCAST, 2020). *P. aeruginosa* poseduje mnogobrojne mehanizme odbrane od antibiotika, uključujući smanjenje koncentracije antibiotika u ćeliji (usred otežanog ulaska ili aktivnog izbacivanja antibiotika iz ćelije), promenu ciljnog mesta delovanja antibiotika, kao i inaktivaciju antibiotika prirodnim ili stečenim bakterijskim enzimima. Kod pojedinih izolata ponekad dolazi do nakupljanja različitih mehanizama rezistencije što dovodi do pojave višestruko rezistentnih sojeva *P. aeruginosa*, koji su definisani kao podložni samo jednoj ili na dve klase antipseudomonalnih antimikrobnih lekova (Palavutitotai et al., 2018). Proučavanje epidemiologije višestruko rezistentnih *P. aeruginosa* izolata je komplikovano usled nedostatka podataka o globalnom nadzoru i raznim mehanizmima pomoću kojih *P. aeruginosa* razvija otpornost. Kako bi antibiotik bio efikasan, on mora doći do ciljnog mesta delovanja, stupiti u interakciju sa ciljnim mestom i uspešno mu inhibirati funkciju (Slika 15).



Slika 15. Shematska ilustracija koja pokazuje složenost uzajamne interakcije faktora virulencije i antimikrobnih rezistentnih mehanizama *P. aeruginosa*.

Ovi događaji zajedno sa svojsvenom otpornošću bakterije dovode do izražaja različitih mehanizama otpornosti kao što su: (A) nepropustljivost spoljašnje membrane i smanjeni unos (smanjenje influksa lekova) kao u slučaju β -laktama (gubitak porininskih proteina u spoljašnjoj membrani); (B) aktivne pumpe za efluks lekova (smanjenje koncentracije intracelularnih lekova) kao u slučaju β -laktama, fluorohinolona, makrolida, tetraciklina i aminoglikozida; (C) inaktivacija leka pomoću bakterijskih inaktivišućih enzima, kao što su β -laktamaze i aminoaciltransferaze, nukleotidil transferaze, fosforil transferaze i proteinaze (unutarćelijske ili vanćelijske) kao u slučaju β -laktama, aminoglikozida i katjonskih antimikrobnih peptida; (D) promena ciljnog mesta (npr. penicillin-vezujući proteini, 30S ribozomalna podjedinica, RNK polimeraza, dodatak aminoarabinoze lipidu A, DNK žiraza i topoizomeraza IV) kao u slučaju β -laktama, aminoglikozida, makrolida, katjonskih antimikrobnih peptida i fluorohinolona (preuzeto i modifikovano prema El Zowalaty et al., 2015).

Antibiotik ulazi u bakterijsku ćeliju preko porina ili pasivnom difuzijom, inaktivirajući ciljano mesto. Rezistencija može nastati usled promena u spoljašnjoj membrani, gubitkom porinskih proteina (Slika 15A) ili pojačanim radom efluks pumpe (Slika 15B), inaktivacijom antibiotika stvaranjem inaktivirajućih enzima (Slika 15C), modifikacijom ciljnog mesta (Slika 15C) ili kombinacijom nabrojanih mehanizama (El Zowalaty et al., 2015). Pojedinačne mutacije ne dovode do rezistencije na sve antipseudomonalne antibiotike. Međutim, veći broj mutacija ili horizontalno prenošenje rezistentnih gena može razviti otpornost na različite grupe antibiotika ili čak na sve antibiotike, koji se koriste u lečenju infekcija uzrokovanim *P. aeruginosa* izolatima (Slika 16).



Slika 16. Višestruko rezistentni izolat *P. aeruginosa* bez vidljivih zona inhibicije u antibiogram testu.

Tako, pojačani efluks može izazvati rezistenciju na flurohinoline i većinu β -laktama, tako da kao izbor terapije ostaju samo aminoglikozidni antibiotici i imipenem. Ako se mehanizmu efluksa pridoda i gubitak porina OprD i smanjena propustljivost ćelijske membrane za aminoglikozide, kolistin postaje jedina antibiotska opcija, ukoliko nije došlo do modifikacije njegovog LPS-ciljnog mesta (Olaitan et al., 2014; Stanković Nedeljković, 2015; Palavutitotai et al., 2018). Prisutnost metalo- β -laktamaza u teoriji sama po sebi može biti odgovorna za višestruko rezistentni fenotip, budući da ovi enzimi hidrolizuju sve β -laktame osim aztreonama. Zbog činjenice da su geni, koji kodiraju za metalo- β -laktamaze, neke β -laktamaze proširenog spektra (ESBL), kao i enzime koji modifikuju aminoglikozide pretežno smešteni na istim genetičkim elementima, sojevi otporni na β -laktame su često rezistentni i na same aminoglikozide, te je kolistin ponovo jedina opcija u lečenju (Sardelic et al., 2012).

1.1.7.1.1 Smanjena propustljivost spoljašnje membrane

Spoljašnja membrane Gram negativnih bakterija je polupropustljiva prepreka, koja usporava ulazak antibiotika u ćeliju. Propustljivost spoljašnje membrane *P. aeruginosa* je mala i iznosi 8% propustljivosti spoljašnje membrane *Escherihia coli* (Wright, 2005). Molekuli antibiotika poput β -laktama ulaze u ćeliju *P. aeruginosa* preko porinskih kanala. U rezistenciji antibiotika najvažniju ulogu ima porin OprD. On omogućava ulazak karbapenema u ćeliju *P. aeruginosa* (Wright, 2005). Gubitak ovog proteina iz membrane smanjuje osetljivost *P. aeruginosa* na karbapeneme, pogotovo na imipenem i smanjenu ostljivost na meropenem (Livermore, 2001). Gubitak OprD u kombinaciji sa pojačanom ekspresijom transportera MexA-MexB-OprM dovodi do visoke rezistencije na meropenem, imipenem, ceftazidim, ureidopeniciline, karboksipeniciline, hinolone, tetraciklin i hloramfenikol (Eichenberger & Thaden, 2019). Ovaj mehanizam rezistencije uzrokuje povećanje minimalnih inhibitornih koncentracija imipenema preko granične vrednosti za rezistenciju.

1.1.7.1.2 Efluks pumpe (transporteri za aktivno izbacivanje antibiotika)

Pojam efluks podrazumeva aktivno izbacivanje antibiotika iz bakterijske ćelije, a pored njih mogu izbacivati boje i deterdžente. Pumpe koje pripadaju tzv. RND familiji (*engl.* resistance-nodulation-division family) su kompleksni transmembranski proteini sačinjeni od tri dela: transportnog proteina i porina smeštenih u citoplazmatskoj membrani, kao i od proteina smeštenog u periplazmatskom prostoru koji povezuje porin i transportni protein (Schweizer, 2003). Usled pojačane aktivnosti efluks pumpe dolazi do smanjene koncentracije antibiotika u ćeliji, a rezultat je istovremena rezistencija na različite grupe antibiotika i pojave višestruko rezistentnih sojeva. Iako je do sada opisano nekih dvanaest kodirajućih gena za efluks pumpe, samo pet tripartitnih sistema je uključeno u razvoj rezistencije kod kliničkih izolata: MexA^{MFP}-MexB^{RND}-OprM^{OMF}, MexX^{MFP}-MexY^{RND}-OprM^{OMF}, MexC^{MFP}-MexD^{RND}-OprJ^{OMF}, MexE^{MFP}-MexF^{RND}-OprN^{OMF}, and MexJ^{MFP}-MexK^{RND}-OprM^{OMF} (faktor spoljašnje membrane - OMF; membranski fuzioni protein - MFP) i obično su kodirane u operonu, ali neke od njih nemaju svoj *omf* gen, kao što su MexXY, MexJK, MexVW i MexMN i tada su obično asemblirani sa proteinom spoljašnje membrane OprM-om (Li et al., 2015; Monlezun et al., 2015).

MexAB-OprM je jedina pumpa koja se konstitutivno eksprimira i može da transportuje većinu antibiotskih familija, dok su ostale selektivnije i indukuju se pod specifičnim uslovima (Issa et al., 2018). Karakteristična je za divlje sojeve *P. aeruginosa* i odgovorna je za prirodnu rezistenciju. Ova pumpa može izbacivati tetracikline, hloramfenikol, β -laktame i inhibitore β -laktamaza, makrolidne antibiotike, trimetoprim i sulfanomide (Schweizer, 2003; Fruci & Poole, 2018). MexCD-OprJ takođe izbacuje veliki broj antibiotika iz ćelije uključujući β -laktamate, tetracikline, hloramfenikol, makrolide i trimetoprim. Za razliku od MexAB-OprM, ova pumpa pokazuje najveći afinitet za β -laktame iz grupe cefalosporina, a naročito za cefalosporine četvrte generacije (poput cefepima) (Schweizer, 2003). Pokazano je da MexEF-OprN pumpa pokazuje afinitet na hloramfenikol i trimetoprim, ali ne i na β -laktamske antibiotike, dok se za MexCD-OprJ smatra da ne igra preveliku ulogu u rezistenciji, jer izbacuje mali broj antibiotika (Schweizer, 2003).

1.1.7.1.3 Promena ciljnog mesta delovanja antibiotika

Dok je otpornost na fluorohinolone obično rezultat promene u ekspresiji efluks pumpe, mutacije fluorohinolonskih *parC* i *gyrA* gena identifikovane su u sojevima *P. aeruginosa* potvrđujući otpornost na fluorohinolone (Akasaka et al., 2001). Glavni razlog su promene u DNK žirazi i topoizomerazi IV uzrokovane mutacijama u regionima QRDR (*engl.* quinolone-resistance-determining regions) ovih enzima. Takođe, jedan od mehanizama rezistencije na aminoglikozide uključuje metilaze 16S rRNK gena (*RmtA*, *RmtD* i *ArmA*), koje metilacijom A-mesta unutar ribozomske podjedinice 30S, ometaju vezivanje aminoglikozidnih antibiotika na njihovo ciljno mesto (Gurung et al., 2010). Rezultat je visoka rezistencija na klinički značajne aminoglikozide kao što su gentamicin, tobramicin i amikacin (Lambert, 2002). Dodatno, rezistencija na kolistin kod *P. aeruginosa* može se pojaviti mutacijom na više gena, između ostalih *pmrAB* i *phoPQ*, dovodeći do finalne zajedničke modifikacije LPS-ciljnog mesta za kolistin (Olaitan et al., 2014).

1.1.7.1.4 Degradacija antibiotika bakterijskim enzimima

Uzvodna regulacija gena ili enzimi koji inaktiviraju antibiotike, stečeni horizontalnim transferom, značajno doprinose antimikrobnoj rezistenciji kod *Pseudomonas* izolata. Postoji više klasifikacija enzimskih β -laktamaza odgovornih za izraženu rezistenciju pomenutih izolata. Klasifikacija β -laktamaza po Ambleru podrazumeva podelu u 4 glavne klase i postavljena je na osnovu homologije proteina (sličnosti aminokiselina), ali ne i na fenotipskim karakteristikama (Tabela 2).

Tabela 2. Amblerova klasifikacija β -laktamaza (Eichenberger & Thaden, 2019)

| Klasa po Ambleru | β -laktamaze | Aktivno mesto agensa | Primeri | Supstrati |
|------------------|-----------------------------|----------------------|--------------------------------|---|
| | | | PSE | Penicilini |
| A | Penicilinaze | Serin | TEM, SHV, CTX-M, VEB, PER, GES | Penicilini treće generacije cefalosporina |
| | | | KPC, SME, IMI/NMC-A | Svi β -laktami |
| B | Metallo- β -laktamaze | Cink | IMP, VIM, NDM, SPM, GIM | Svi β -laktami, osim monobaktama |
| C | Cefalosporinaze | Serin | AmpC | Cefamicini treće generacije cefalosporina |
| D | Oksacilinaze | Serin | OXA | Svi β -laktami, kroz klasu D enzima imaju visoku varijabilnost spektra aktivnosti |

CTX-M - aktivna protiv cefotaksima (CTX) i izolovana u Minhenu (-M); TEM - Temoniera β -laktamaza iz Grčke; GES - Gvajana proširenog spektra; GIM - nemačka imipenemaza; IMP - metalo- β -laktamaza aktivna protiv imipenema; IMI - imipenem-hidrolizujuća β -laktamaze; KPC - *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaza; NDM - metalo- β -laktamaza iz Nju Delhija; NMC - nemetaloenzimska karbapenemaza; OXA - oksacilinaza; PER - *P. aeruginosa* RNL-1; PSE - *Pseudomonas* specifični enzim; SHV - varijabla reagensna sulfhidrila; SME - *Serratia marscescens* enzim; SPM - metalo- β -laktamaza iz Sao Paola; VEB - vijetnamska β -laktamaza proširenog spektra; VIM -Verona integron-kodirana metalo- β -laktamaza.

β -laktamaze klase A, C i D pripadaju serinskim β -laktamazama, dok su metalo- β -laktamaze svrstane u B klasu (Bush & Jacobi, 2010). Dodatno, horizontalna akvizicija širokog spektra β -laktamaza iz klasa A, B i D može rezultirati i širokim spektrom otpornosti. Neke od ovih β -laktamaza povezane su sa visokorizičnim klonovima *P. aeruginosa* sa globalnom distribucijom i predstavljaju ozbiljan problem u lečenju bolesti kod ljudi (Eichenberger & Thaden, 2019). Takođe, pored molekularne postoji najnovija i danas u upotrebi funkcionalna shema klasifikacije β -laktamaza, ažurirana prema predlogu Bush et al. (1995) godine (Bush & Jacobi, 2010). Ona uzima u obzir profile supstrata i inhibitora u pokušaju grupisanja enzima na načine koji se mogu povezati sa njihovim fenotipom kod kliničkih izolata (Tabela 3). Glavne grupe uglavnom su u korelaciji sa šire zasnovanom molekularnom klasifikacijom. Ažurirani sistem uključuje cefalosporinaze grupe 1 (klasa C); grupu 2 (klase A i D) širokog spektra, inhibitorno-rezistentnih, ESBL-a i serin karbapenemaza; kao i metalo- β -laktamaze iz treće grupe (Tabela 3). Na osnovu genetičkog porekla β -laktamaze se dele na hromozomske i plazmidne, a do danas je opisano preko 960 različitih tipova β -laktamaza glavnih familija sa kliničkim značajem (Bush & Jacobi, 2010). Stečene β -laktamaze molekularne klase A predstavljaju najraznovrsniju i najrasprostranjeniju grupu β -laktamaza. Svi enzimi hidrolizuju peniciline i klasične cefalosporine, a većina se može inhibirati klavulinskom kiselinom (Bush & Jacobi, 2010). U klasu A spada i najveći deo enzima ESBL, a najčešći varijeteti enzima SHV i TEM, su ređi kod *P. aeruginosa* izolata (Hancock, 1998).

Tabela 3. Bush-Jacoby klasifikacija β -laktamaza (Bush & Jacobi, 2010)

| Bush-Jacoby grupa (2009) | Bush-Jacoby-Medeiros grupa (1995) | Mol. klasa (podklasa) | Supstrat | Inhibicija od | | Definisane karakteristike | Reprezentativni enzimi |
|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------|--|-------------------------------------|------|--|--|
| | | | | Klavulanska kiselina ili tazobaktam | EDTA | | |
| 1 | 1 | C | Cefalosporini | Ne | Ne | Veća hidroliza cefalosporina u odnosu na benzilpenicilin; hidrolizuje cefamicine | <i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1 |
| 1e | - | C | Cefalosporini | Ne | Ne | Pojačana hidroliza ceftazidima i često drugih oksimino- β -laktama | GC1, CMY-37 |
| 2a | 2a | A | Penicilini | Da | Ne | Veća hidroliza benzilpenicilina nego cefalosporina | PC1 |
| 2b | 2b | A | Penicilini, cefalosporini | Da | Ne | Slična hidroliza benzilpenicilina i cefalosporina | TEM-1, TEM-2, SHV-1 |
| 2be | 2be | A | Penicilini, Cefalosporini proširenog spektra delovanja (III generacija), monobaktami | Da | Ne | Pojačana hidroliza oksimino- β -laktama (cefotaksim, ceftazidim, ceftriakson, cefepim, aztreonam) | ESBL: TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1 |
| 2br | 2br | A | Penicilini | Ne | Ne | Otpornost na klavulansku kiselinu, sulbaktam i tazobaktam | TEM-30, SHV-10 |
| 2ber | - | A | Cefalosporini proširenog spektra delovanja, monobaktami | Ne | Ne | Pojačana hidroliza oksimino- β -laktama u kombinaciji sa rezistencijom na klavulansku kiselinu, sulbaktam i tazobaktam | TEM-50 |
| 2c | 2c | A | Karbenicilin | Da | Ne | Pojačana hidroliza karbenicilina | PSE-1, CARB-3 |
| 2ce | - | A | Karbenicilin, cefepim | Da | Ne | Povećana hidroliza karbenicilina, cefepima i cefpiroma | RTG-4 |
| 2d | 2d | D | Kloksacilin | Varijabilno | Ne | Pojačana hidroliza kloksacilina ili oksacilina | OXA-1, OXA-10 |
| 2de | - | D | Cefalosporini proširenog spektra delovanja | Varijabilno | Ne | Hidrolizuje kloksacilin ili oksacilin i oksimino- β -laktame | OXA-11, OXA-15 |
| 2df | - | D | Karbapenemi | Varijabilno | Ne | Hidroliza kloksacilina ili oksacilina i karbapenema | OXA-23, OXA-48 |
| 2e | 2e | A | Cefalosporini proširenog spektra delovanja | Da | Ne | Hidrolizuje cefalosporine, ali ne i aztreonam. Inhibiran klavulanskom kiselinom | CepA |
| 2f | 2f | A | Karbapenemi | Varijabilno | Ne | Pojačana hidroliza karbapenema, oksimino- β -laktama, cefamicina | KPC-2, IMI-1, SME-1 |
| 3a | 3 | B (B1) | Karbapenemi | Ne | Da | Hidroliza širokog spektra, uključujući karbapeneme, ali ne i monobaktame | IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 |
| - | - | B (B3) | - | - | - | - | LI, CAU-1, GOB-1, FEZ-1 |
| 3b | 3 | B (B2) | Karbapenemi | Ne | Da | Preferencijalna hidroliza karbapenema | CphA, Sfh-1 |
| - | 4 | Nepoznata | - | - | - | - | - |

Kod *P. aeruginosa* su češći PER-1, kao i varijante enzima VEB i GES. ESBL su β -laktamaze koje mogu da prouzrokuju rezistenciju na peniciline, cefalosporine prve, druge i treće generacije i aztreonam (ali ne i na cefamicine ili karbapeneme) hidrolizom antibiotika, a mogu se inhibirati β -laktamazama kao što je klavulinska kiselina (Saredlić & Bedenić, 2012). Varijante *K.*

pneumoniae karbapenemaza (KPC), β -laktamaze iz klase A koje hidrolizuju karbapeneme, poslednjih godina predstavljaju veliki problem u svetu zbog brzog širenja među enterobakterijama, dok su KPC-2, KPC-4 i KPC-5 (KPC-4 i KPC-5 su osetljivije od KPC-2 na inhibiciju klavulanskom kiselinom) opisane i kod *P. aeruginosa* izolata (Wolter et al., 2009). Pored njih kod *P. aeruginosa* izolata dominiraju i varijeteti Gvajana proširenog spektra karbapenemaza poput GES-2, GES-5 i GES-18 (Poole, 2011).

Stečene β -laktamaze molekularne klase B tzv. metalo- β -laktamaze (MBL) predstavljaju jednu od klinički najvažnijih β -laktamaza kod Gram negativnih bacila. Hidrolizuju sve β -laktame osim monobaktama i ne mogu se inaktivirati inhibitorima serinskih β -laktamaza. Za razliku od ostalih β -laktamaza, MBL enzimi na aktivnom mestu sadrže cink, pa se *in vitro* mogu inhibirati i helatorima metalnih jona poput EDTA, dipikolinska kiselina ili 1,10-*O*-fenantrolin (Concha et al., 2000; Marchiaro et al., 2008). EDTA inhibitor nema terapijsku primenu, ali se često koristi u fenotipskoj detekciji MBL-a u laboratorijskom radu. Infekcije uzrokovane izolatima *P. aeruginosa* koji produkuje MBL enzime povezane su sa većom stopom smrtnosti. Hromozomske MBL posreduju intrinzičku rezistenciju na karbapeneme i nalaze se u svim podklasama (B1, B2 i B3), ali su sada i neke serin-laktamaze stekle sposobnost hidrolize karbapenema što ih je inicijalno funkcionalno razlikovalo (Rasmussen & Bush, 1997; Bush & Jacobi, 2010). Stečene MBL, odnosno prenosive uz pomoć plazmida, integrona ili transpozona, a koje se javljaju i kod *P. aeruginosa*, najčešće se nalaze u podklasi B1 zasnovanoj na konsenzusnim aminokiselinama koje služe kao ligandi dva cinkova atoma koja su potrebna za hidrolizu širokog spektra (Bush & Jacoby, 2010). VIM i IMP su najčešće MBL nađene kod sojeva *P. aeruginosa* rezistentnih na karbapeneme i obe grupe su široko rasprostranjene, a pored njih registovani su SPM, GIM, AIM i NDM (Poole, 2011). Do danas je opisano 48 varijanti enzima IMP i 39 varijanti enzima VIM (Zhao & Hu, 2015).

Za *P. aeruginosa* je svojstveno prisustvo AmpC enzima molekularne klase C, hromozomalno kodirane cefalosporinaze. Mutacije koje izazivaju pojačanu ekspresiju AmpC enzima ili mutacije koje omogućavaju hiper-inducibilnu proizvodnju AmpC rezultiraju rezistencijom na peniciline, monobaktame i cefamicine (Eichenberger & Thaden, 2019). Oni su aktivniji na cefalosporinima nego na benzilpenicilinu i obično su otporni na inhibiciju klavulanske kiseline, a poseduju i visok afinitet prema aztreonamu za razliku od cefalosporinaza klase A (Eichenberger & Thaden, 2019). U mnogim bakterijama, uključujući *P. aeruginosa*, ekspresija AmpC je slaba, ali je podložna izloženosti određenim β -laktamima, kao što su amoksicilin, ampicilin, imipenem i klavulanska kiselina (Jacoby et al., 2009). Enzimi nove podgrupe 1e su varijante grupe 1 sa većom aktivnošću protiv ceftazidima i drugih oksimino- β -laktama kao posledica aminokiselniskih supstitucija, insercija ili delecija (Nordmann & Mammeri, 2007). Nazvane su AmpC β -laktamaze proširenog spektra. U poslednje vreme u kliničkim izolatima *P. aeruginosa* opisane su varijante AmpC sa pojačanom aktivnošću na ceftazidim, cefepim i karbapeneme (Rodríguez-Martínez et al., 2009; Bush & Jacobi, 2010). Pretpostavlja se da i ovi enzimi doprinose rezistenciji karbapenema kod vrste *P. aeruginosa*, zajedno sa gubitkom porina OprD (Mammeri et al., 2008).

Podgrupa 2d molekularne klase D, uključuje β -laktamaze koje se odlikuju sposobnošću hidrolize kloksacilina ili oksacilina brzinom od 50% u odnosu na benzilpenicilin i otuda su poznate kao OXA enzimi (Bush & Jacobi, 2010). Karbenicilin se takođe može lako hidrolizovati. Međutim, većina članova OXA familije trenutno se identifikuje prema sačuvanim motivima aminokiselina, a ne prema funkciji. U novoj podgrupi 2de su enzimi kloksacilin ili oksacilin-hidrolizujući enzimi proširenog spektra koji uključuje oksimino- β -laktame, ali ne i karbapeneme. Većina enzima 2de izvedeni su iz OXA-10 i uključuju enzime poput OXA-11 i OXA-15. Pronađeni su u Turskoj i Francuskoj i najčešće su bili detektovani kod *P. aeruginosa* izolata, gde je nivo otpornosti koji proizvode veći nego kod nivoa *E. coli* (Bradford, 2001). Otpornost na ceftazidim je obično bila izraženija od rezistencije na cefotaksim ili aztreonam. Međutim, izolati *P. aeruginosa* koji

proizvode nekoliko oksacilinaza, poput OXA-1 ili OXA-31, mogu biti podložni ceftazidimu, ali otporni na cefepim (Aubert et al., 2001).

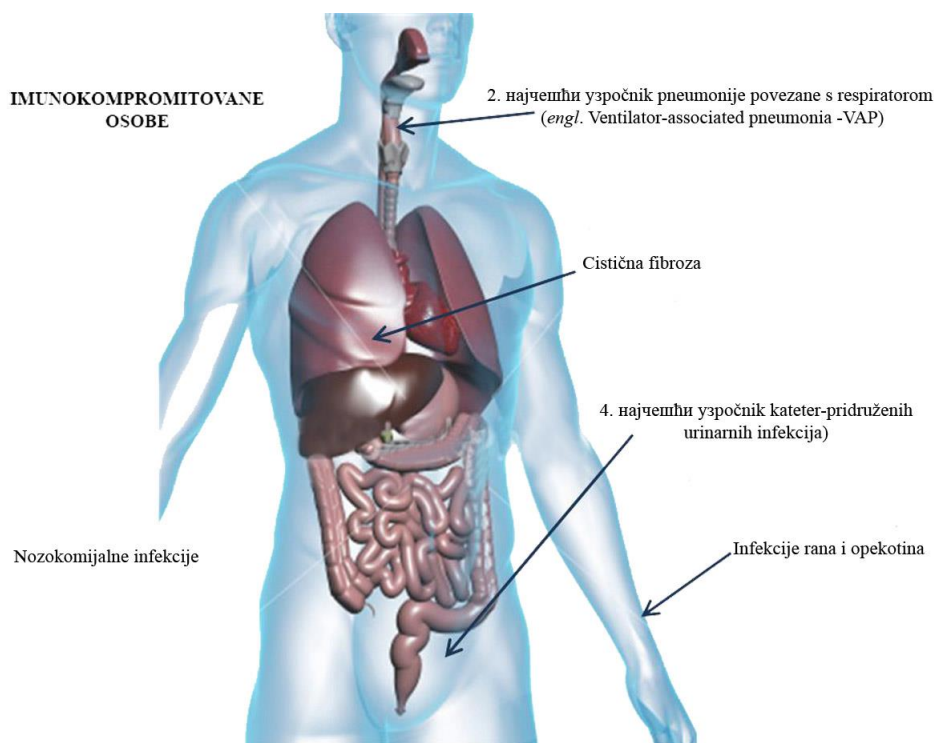
1.1.8 GENETIČKO PROFILISANJE *P. AERUGINOSA* KLINIČKIH IZOLATA

P. aeruginosa se može interno podeliti u podgrupe klasičnim metodama kao što su: biotipizacija, serotipizacija, tipizacija piocinom, fagna tipizacija i prema osetljivosti na antibiotike. Međutim, diskriminatorsna moć je mnogo manja od one dobijene metodama molekularnog tipiziranja. Genetička raznolikost *P. aeruginosa* izolata često je ispitivana molekularnim tipizacionim metodama, uključujući ribotipizaciju, PCR na osnovu ponavljajućih elemenata (*engl.* repetitive element based PCR, rep-PCR), arbitrarno-prajmovani PCR (*engl.* arbitrarily primed PCR, AP-PCR), DNK analize bazirane na polimorfizmu dužine amplifikovanog fragmenta (*engl.* amplified fragment length polymorphism, AFLP) i polimorfizmu dužine restrikcionog fragmenta (*engl.* restriction fragment length polymorphic, RFLP), zatim nasumična amplifikacija polimorfne DNK (*engl.* random amplified polymorphic DNA, RAPD), kao i elektroforeza u pulsirajućem polju (*engl.* pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) (Wolska et al., 2012). Proteinsko profilisanje i PFGE su metode koje su se obično koristile kao zlatni standard za diskriminaciju izolata *P. aeruginosa* (Spencer et al., 2000). Sa druge strane, često su limitirane u svojoj sposobnosti razdvajanja ili pak zahtevaju dodatnu species-specifičnu metodologiju. PFGE metod je ograničen zbog cene i dugotrajne pripreme uzoraka (Syrmis et al., 2004). Zbog pomenutih razloga sve više se primenjuju različite PCR tehnike za diskriminaciju bakterijskih sojeva. Najčešće RAPD PCR tehnike, kao i tehnike koje se baziraju na upotrebi oligonukleotida, dizajniranih tako da budu komplemetarni konsenzusnoj sekvenci određenog genomskog repetitivnog elementa izolovanog iz određene bakterije, rep-PCR. Ovako se postiže pouzdano grupisanje istih bakterijskih sojeva u odgovarajuće klastere, što na kraju omogućava lakši odabir izolata za dalju identifikaciju (Gevers et al., 2001). Generalno, ove metode manje troše vreme i veoma su korisne u određivanju filogenetske korelacije između mikroba kao specifičnih grupa (Jayamohan et al., 2015).

RAPD prajmeri nisu specifični za određeni genski lokus, pa dobijeni paterni pokazuju slabu sposobnost umnožavanja. Zbog toga RAPD zahteva upotrebu više od jednog prajmera za karakterizaciju sojeva (Mohammed et al., 2009). Sa druge strane, rep-PCR tehnika korišćenjem odgovarajućih prajmera, pokazala se kao jednostavna, a odlikuju je: a) povoljna cena; b) pogodna je za brzu diskriminaciju bakterijskih vrsta; c) smatra se i pouzdanim alatom za klasifikaciju i tipologiju širokog spektra Gram-negativnih, kao i nekih vrsta Gram-pozitivnih bakterija (Gevers, et al. 2001). Pristupi zasnovani na sekvenci DNK, poput rep-PCR-a, sve su popularniji u klasifikaciji mikroba. Tako je recimo pokazano da su i ERIC-PCR i BOX-PCR brzi, visoko diskriminatorsni i ponovljivi testovi koji su se pokazali kao moćni nadzorni skrining alati za tipizaciju izolata *P. aeruginosa* dobijenih od pacijenata sa cističnom fibrozom (Syrmis et al., 2004), izolata poreklom iz rana pacijenata (Sorkh et al., 2017), kao i kliničkih izolata različitog porekla uzorkovanja (Lim et al., 2009; Wolska et al., 2012).

1.1.9 MEDICINSKI ZNAČAJ *P. AERUGINOSA* IZOLATA

P. aeruginosa je uslovno patogena oportunistička bakterija, što znači da kod ljudi sa očuvanim imunitetom često ne dovodi do bolesti. Najugroženije su imunokompromitovane osobe i hospitalizovani pacijenti. Može se naći u malom broju kao deo mikroflore u crevima, a često je prisutan i na koži. U bolnicama se često može preneti preko medicinske opreme. Kada bakterija dospe do pacijenata koji su već slabi usled posledica bolesti, operacije ili terapije može dovesti do ozbiljnih infekcija i smrti. *P. aeruginosa* može izazvati infekciju svih organskih sistema i tkiva. Najčešće dovodi do infekcije rana, urinarnog trakta, respiratornog sistema, oka, uva i td. (Slika 17). *P. aeruginosa* je uzročnik 4% bakterijemija i treći vodeći uzročnik infekcija izazvanim Gram negativnim bakterijama (Wisplinghoff et al., 2004).



Slika 17. Najčešće lokacije infekcija izazvane *P. aeruginosa* (preuzeto i obrađeno sa: <https://slideplayer.com/slide/5851932/>).

Zahvaljujući svom velikom genomu izolati *P. aeruginosa* imaju širok spektar različitih faktora virulencije koji olakšavaju kolonizaciju i rast bakterija, uprkos imunitetu i upotrebi antibiotika (Alhazmi, 2015).

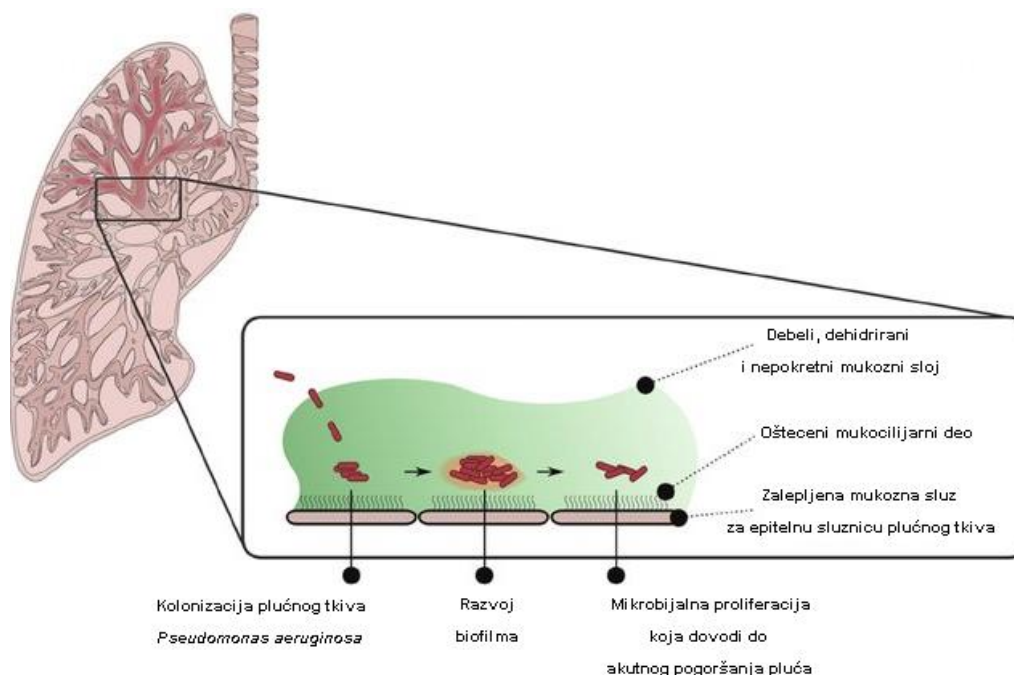
1.1.9.1 Respiratorne infekcije i cistična fibroza

P. aeruginosa je odgovoran za 7% pneumonija od kojih 28% završavaju letalno (Stanković Nedeljković, 2015). Infekcije respiratornog trakta izazvane *P. aeruginosa* mogu se podeliti na akutne i hronične. Tokom akutne infekcije dolaze faktori patogenosti ostvareni preko egzotoksina, flagele, pila i proteaza. Kod hronične infekcije, *Pseudomonas* se postepeno prilagođava životnoj sredini i gubi mnoge faktore patogenosti tako da postaje manje imunološki reaktivan (Paulsson, 2017). To omogućava bakteriji da ostane u respiratornom sistemu duže, formira biofilm i opstane godinama, pa čak i decenijama kao što je slučaj kod cistične fibroze.

Cistična fibroza (CF) je autoimuno recesivno oboljenje koje nastaje usled mutacije na *cfr* genu koji je lociran na VII hromozomu. Ova mutacija dovodi do smanjenja sekrecije Cl jona i povećanja apsorpcije natrijum hlorida tako da dolazi do povećanog gubitka vode sa sluzokože disajnih puteva. Mukus koji se nagomilava u donjim disajnim putevima formira gust pokrivač koji postaje idealan za kolonizaciju bakterijama (Slika 18). Bakterija koja najčešće kolonizuje pluća kod CF je *P. aeruginosa* i izoluje se u 80% pacijenata sa CF (Paulsson, 2017).

Bakterije koje prve kolonizuju pluća vezuju se za mucin i epitelne ćelije izazivajući inflamaciju. U ovoj fazi bolesti infekcija može da se kontroliše antibiotskom terapijom. Kasnije bakterije gube pile i fimbrije, formiraju mikrokolonije i biofilm, a antibiotici postaju neefikasni. Organizam se brani alveolarnim makrofagima i PML koji su postavljeni oko alveola i ne mogu da uđu u iste zbog alginata koji je osnovni sastojak biofilma (Stockmann et al., 2014). U pokušaju fagocitoze oslobađaju se kiseonični radikali koji oštećuju plućno tkivo. Ovakva infekcija se širi na

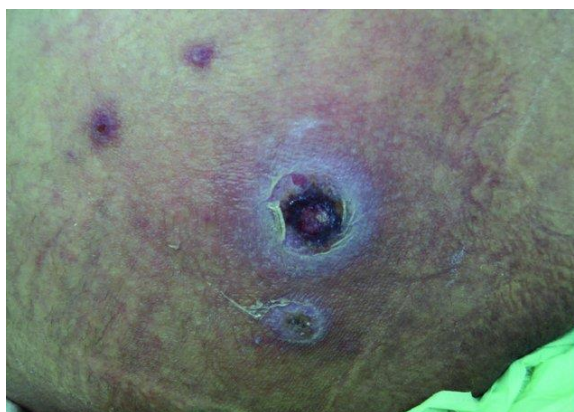
zdrava tkiva smanjujući kapacitet pluća. Takođe, pokazano je da je stopa mutacije do 100 puta veća kod izolata iz pacijenata sa CF u odnosu na izolate iz drugih izvora (Stanković Nedeljković, 2015).



Slika 18. Formiranje biofilma kod *P. aeruginosa* i rast u plućima pacijenata sa cističnom fibrozom (preuzeto i modifikovano prema Stockmann et al., 2014).

1.1.9.2 Bakterijemija i infekcije urinarnog trakta

Faktori rizika u nastanku bakterijemije su hematološke maligne bolesti, starosno doba pacijenta, pacijenti sa transplattiranim organima i HIV pozitivne osobe. Čak 78,4% bakterijemija je kod hospitalizovanih pacijenata (Lalošević et al., 2011). To je treća po učestalosti bakterijemija iza *E. coli* i *Klebsiella* sp. (Pukatzki et al., 2002). *P. aeruginosa* uzrokuje 7% svih bakterijemija izazvanih Gram negativnim bakterijama, ali je smrtnost između 21-60% (Paulsson, 2017). Glavna karakteristika bakterijemije kod *P. aeruginosa* je prisustvo gangrenoznog ekcema koji najčešće nastaje usled izazvane neutropenije (Slika 19).

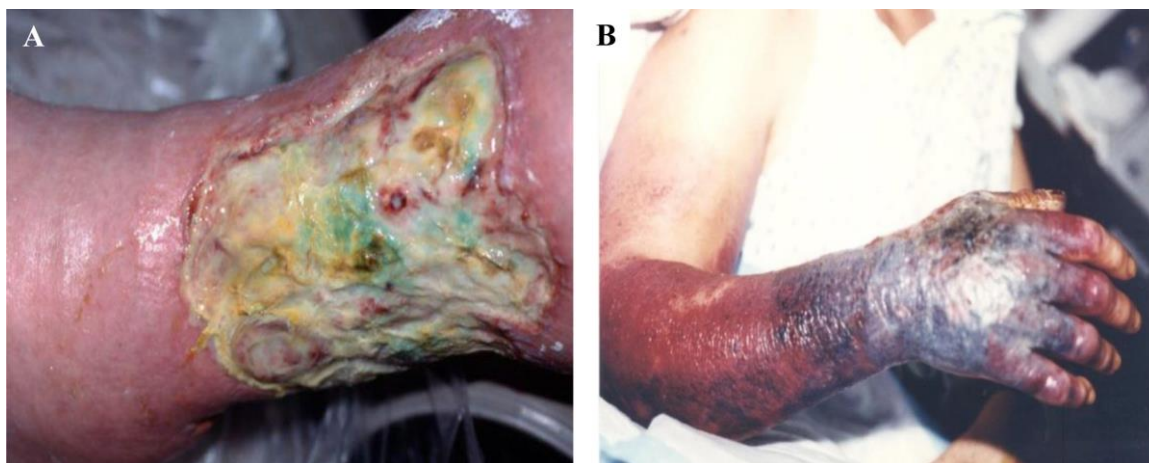


Slika 19. Gangrenozni ekcem povezan sa *P. aeruginosa* infekcijom (preuzeto iz: Uludokumacı et al., 2013).

Infekcije urinarnog trakta su uglavnom bolničkog porekla. Iako infekcije urinarnog trakta najčešće dovode do bakterijemije, sama infekcija prolazi blago. Urinarne infekcije su češće kod muškaraca i povezane su sa sistemom zdravstvene zaštite, posebno sa lečenjem na jedinicama za intenzivnu negu ili sa upotrebom katetera i predstavljaju četvrtog najčešćeg uzročnika kateter-pridruženim infekcijama urinarnog trakta sa učestalošću od 9% (Alhazmi, 2015).

1.1.9.3 Infekcije rana i kože

P. aeruginosa je vodeći uzročnik infekcija rana i opekotina (Slika 20). Čak 75% smrtnih slučajeva kod opekotina nastaje zbog bakterijemije (Barrow et al., 2004). Iako su Gram pozitivne *Staphylococcus aureus* i piogene streptokoke prve koje nasele rane, nakon toga sledi kolonizacija pre svega *P. aeruginosa*.



Slika 20. Infekcija rane i opekotina izazvane *P. aeruginosa* (preuzeto sa: <http://www.medetec.co.uk> i <http://www.antimicrobe.org>).

Istraživanja na životinjama kod kožnih opekotina, pokazala su da se zreli biofilm razvije između 48h do 72h (Trafny, 1998). Pored faktora virulencije koji nesumnjivo doprinose kolonizaciju rana izazvanih opekotinama, važnu ulogu igra i imuni status pacijenta. Usled prekida fizičke barijere kože toplotom, dolazi do gubitka β -defenzina koji je prisutan u koži (Kobayashi et al., 2008). Ovi imunomodulatorni peptidi igraju važnu ulogu u primarnoj odbrani od *P. aeruginosa*.

1.1.9.4 Ostale infekcije

P. aeruginosa je najčešći uzročnik infekcija spoljašnjeg ušnog kanala, koja se često može sresti kod plivača (Wang et al., 2005). Infekcije oka su retke i obično su destruktivnog karaktera i nastaju posle trauma. Tada nastaje zapaljenje rožnjače, a ako je imuni sistem imunokompromitovan može doći i do gubitka oka (Cope et al., 2018). Takođe, retko mogu izazvati infekciju noktiju, infekcije kostiju i CNS-a. Ove infekcije nastaju usled mehaničkih oštećenja ili hematogeno sa mesta primarne infekcije (Chuang et al., 1999). U digestivnom traktu izaziva infekcije bilo kog dela, od usne duplje do rektuma. Kod intravenskih narkomana *P. aeruginosa* preko krvi može dovesti do endokarditisa (Stanković Nedeljković, 2015).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Uzevši u obzir stalnu potrebu za utvrđivanjem potencijalnih korelacija između fenotipskih karakteristika (osetljivost na različite klase antibiotika, ekspresija različitih klasa β -laktamaza, učestalost serotipova, proizvodnja pigmenata i stvaranje biofilma) i genotipskih obrazaca kliničkih izolata *P. aeruginosa* različitog porekla, postavljeni su sledeći ciljevi rada:

1. Izolacija, biohemijska i molekularno-genetička identifikacija *Pseudomonas* izolata različitog porekla (urin, sputum, brisevi rana, grla, jezika, uva i cervikalno-vaginalnog kanala) od hospitalizovanih i ambulantnih pacijenata Kliničko-bolničkog centra Aleksinac i formiranje kolekcije kultura.
2. Serotipizacija *Pseudomonas* izolata i analiza rezistencije najčešćih serotipova.
3. Ispitivanje produkcije pigmenata kod *Pseudomonas* izolata i analiza rezistencije najčešćih pigmenata.
4. Ispitivanje sposobnosti produkcije biofilma *Pseudomonas* izolata i analiza rezistencije u odnosu na kategoriju biofilma.
5. Ispitivanje osetljivosti *Pseudomonas* izolata na antimikrobna sredstva iz različitih klasa antibiotika (aminoglikozidi, fluorohinoloni, polipeptidi, kombinacija penicilina, monobaktami, cefalosporini i karbapenemi).
6. Ispitivanje produkcije enzimskih β -laktamaza (β -laktamaza proširenog spektra, karbapenemaza i metalo- β -laktamaza) kod *Pseudomonas* izolata.
7. Analiza prisustva višestruko rezistentnih *Pseudomonas* izolata i korelacija sa fenotipskim karakteristikama.
8. Određivanje najbolje molekularno genetičke metode u genotipizaciji kliničkih izolata iz južne Srbije i korelacija sa fenotipskim karakteristikama i antibiotskom rezistencijom.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 MATERIJAL

3.1.1 BAKTERIJSKI IZOLATI

Za svrhu ove disertacije u periodu od 2012-2015. godine je izolovano i biohemijski okarakterisano ukupno 147 kliničkih *P. aeruginosa* izolata, prikupljenih u Kliničko-bolničkom centru Aleksinac sa odeljenja Hirurgije, Ginekologije i akušerstva i Interne medicine (bolnički izolati), kao i u Domu zdravlja Aleksinac sa odeljenja Mikrobiologije (ambulantni izolati). Tokom 2012 godine, za prvu fazu istraživanja, prikupljeno je 53 izolata iz briseva rana, od kojih je 33 izolata poticalo od bolničkih, odnosno 20 od ambulantskih pacijenata. U periodu od 2013-2015. godine, za drugu fazu istraživanja, prikupljeno je dodatno još 94 izolata *P. aeruginosa* različitog porekla (urin, sputum, brisevi rana, grla, jezika, uha i cervikalno-vaginalnog kanala), sa distribucijom od 50 i 44 izolata iz bolničkih i ambulantskih pacijenata, respektivno. Svi izolati su smrznuti u hranljivom bujonu sa 20% glicerolom na -80 °C do sledeće upotrebe.

3.1.1.1 Odobrenje etičke komisije

Etička komisija Kliničko-bolničkog centra Aleksinac odobrila je upotrebu kliničkih izolata (odluka br. 3242) (Prilog 1). Klinički izolati su nasumično odabrani iz različitih uzoraka rutinskim kliničkim radom tokom 2012-2015. Informacije o pacijentu su anonimizovane, tako da za ovu disertaciju nije bio potreban nikakav informisani pristanak pacijenata. Izvršena je anonimizacija demografije pacijenata i lični podaci su dvostruko kodirani. Autor nije imao kontakt ili interakciju sa pacijentima. Nijedan prethodno dobijen podatak kliničke slike pacijenata (osim pola i godina starosti u obe faze istraživanja) nije povezan sa izolatima ove studije.

3.1.2 MEDIJUMI ZA RAST I KARAKTERIZACIJU KLINIČKIH IZOLATA

Krvni agar (Columbia Blood Agar Base, Oxoid Ltd., UK):

| | |
|-------------------|---------|
| Pepton | 23 g |
| Skrob | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| Agar | 10 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Nakon autoklaviranja dodata je 5% sterilna defibrilisana ovčija krv.

Čokoladni agar (Biolab Diagnostics Laboratory Inc, Mađarska):

| | |
|-------------------|--------|
| Gotova podloga | 20 g |
| dH ₂ O | 500 mL |

Nakon autoklaviranja dodato je 35 mL sterilna defibrilisana ovčija krv i jedna bočica Mešavine faktora rasta.

MacConkey agar (Oxoid Ltd., UK i Hi-Media, Indija):

| | |
|------------|------|
| Pepton | 20 g |
| Laktoza | 10 g |
| Žučne soli | 5 g |

| | |
|--|---------|
| Neutralno crveno, C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄ | 0,075 g |
| Agar | 10 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Endo agar (Oxoid Ltd., UK):

| | |
|---------------------------------|---------|
| Pepton | 10 g |
| Laktoza | 10 g |
| K ₂ HPO ₄ | 3,5 g |
| Na ₂ SO ₃ | 2,5 g |
| Agar | 10 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Glukozni bujon (Oxoid Ltd., UK):

| | |
|-------------------|---------|
| Gotova podloga | 33,5 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Tioglikolatna podloga bez agara i indikatora (Oxoid Ltd., UK):

| | |
|-------------------|---------|
| Gotova podloga | 28,5 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Hranljivi bujon - NB (Hi-Media, Indija):

| | |
|-------------------------------|---------|
| Pepton | 5 g |
| HM pepton B (goveđi ekstrakt) | 1,5 g |
| NaCl | 5 g |
| Ekstrakt kvasca | 1,5 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Tripton soja agar - TSA (Oxoid Ltd., UK i Torlak, Srbija):

| | |
|-------------------|---------|
| Gotova podloga | 40 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Müeller-Hinton bujon - MHB (Oxoid Ltd., UK):

| | |
|-------------------|---------|
| Goveđi ekstrakt | 2 g |
| Kazein hidrolizat | 17,5 g |
| Skrob | 1,5 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Müeller-Hinton agar - MHA (Oxoid Ltd., UK):

MHB sa dodatkom 15 g agara na 1000 mL dH₂O.

Luria-Bertani bujon - LB (Lab M Limited, UK):

| | |
|-------------------|---------|
| Tripton | 10 g |
| Ekstrakt kvasca | 10 g |
| NaCl | 5 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Pseudomonas izolacioni agar (Hi-Media, Indija):

| | |
|-------------------|---------|
| Gotova podloga | 45,03 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Acetamidni agar, modifikovani (Hi-Media, Indija):

| | |
|-------------------|---------|
| Gotova podloga A | 3 g |
| Gotova podloga B | 21,73 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Asparagin prolin bujon (Hi-Media, Indija):

| | |
|-------------------|---------|
| Gotova podloga | 14,5 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Bushnell Haas-ov agar (Hi-Media, Indija):

| | |
|-------------------|---------|
| Gotova podloga | 23,27 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Cetrimidni agar (Lab M Limited, UK):

| | |
|--------------------------------|---------|
| Želatin pepton | 20 g |
| MgCl ₂ | 10 g |
| K ₂ SO ₄ | 5 g |
| Cetrimid | 0,3 g |
| Agar | 15 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Pariski manit (Torlak, Srbija):

| | |
|-------------------|---------|
| Gotova podloga | 35 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Hranljivi želatin (Torlak, Srbija):

| | |
|-------------------|---------|
| Hranljivi bujon | 20 g |
| Želatin | 120 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Trostruki šećer-gvožđe agar (Hi-Media, Indija):

| | |
|-------------------|---------|
| Gotova podloga | 64,42 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Nitratni bujon (Hi-Media, Indija):

| | |
|-------------------|---------|
| Gotova podloga | 39 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Andrade peptonska voda (Torlak, Srbija):

| | |
|-------------------|---------|
| Gotova podloga | 25 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Simons citratna podloga (Hi-Media, Indija):

| | |
|-------------------|---------|
| Gotova podloga | 24,28 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Urea bujon (Torlak, Srbija):

| | |
|-------------------|---------|
| Gotova podloga | 37,8 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

King's A agar (Hi-Media, Indija):

| | |
|--|---------|
| Pankreasni hidrolizat želatina | 20 g |
| Anhydrous K ₂ SO ₄ | 10 g |
| Anhydrous MgCl ₂ | 1,4 g |
| Agar | 15 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Pseudomonas fluorescein agar (Hi-Media, Indija):

| | |
|---------------------------------|---------|
| Trypton | 10 g |
| Proteazni pepton | 10 g |
| K ₂ HPO ₄ | 1,5 g |
| MgSO ₄ | 1,5 g |
| Agar | 15 g |
| dH ₂ O | 1000 mL |

Svi medijumi su sterilisani autoklaviranjem na 121 °C tokom 15 minuta i nakon sterilizacije čvrste podloge su razlivene u sterilne Petrijeve šolje ili u odgovarajuće laboratorijsko posuđe. U cilju ukljanjanja svih nečistoća stakleno posuđe je pre upotrebe očišćeno 6M HCL-om i isprano dejonizovanom vodom.

3.1.3 ANTIBIOTICI KORIŠĆENI U PROCENI OSETLJIVOSTI KLINIČKIH IZOLATA I OSTALI REAGENSI

U antibiogram testovima su korišćeni antibiotski diskovi (Hi-Media, Indija i Rosco Diagnostica, Danska) u sledećim koncentracijama ($\mu\text{g}/\text{disku}$): piperacilin/tazobaktam (100/10), imipenem (10), doripenem (10), meropenem (10), kolistin (10), ceftazidim (30), cefepim (30), aztreonam (10), amikacin (30), gentamicin (10), netilmicin (30), tobramicin (10), ofloksacin (5), ciprofloksacin (5) i levofloksacin (5).

Prilikom utvrđivanja minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) gradijent testom korišćene su E-test antibiotske trake piperacilin-tazobaktam, amikacin i ciprofloksacin (Liofilmchem, Italija), kao i antibiotici ceftazidim, cefepim i meropenem (Sigma-Aldrich, SAD) rastvoreni u sterilnoj vodi (*aqua purificata sterilis*) u koncentraciji stoka od 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ za izvođenje bujon-mikrodilucionog metoda.

Prilikom detekcije enzima odgovornih za degradaciju antibiotika korišćeni su antibiotski diskovi (Sigma-Aldrich, SAD) u sledećim koncentracijama ($\mu\text{g}/\text{disku}$): amoksisilin/klavulanska kiselina (20/10), cefaleksin (30), cefotaksim (30), ceftazidim/klavulanska kiselina (30/10), ceftazidim (30 μg), meropenem (10), imipenem/EDTA (10/ 0.5 M EDTA).

U ostalim testovima koristili su se sledeći reagensi i boje:

- 2% Kristal violet (Lach-Ner, Češka)
 - 0,5 McFarland standardi (Bio-Merieux, Francuska)
 - 2,3,5 trifenil tetrazolijum hlorid - TTC (Sigma-Aldrich, SAD)
 - EtOH i MeOH (Merck Darmstadt, Nemačka)
 - Fosfatni pufer, 1 \times PBS, pH 7.2 (Sigma-Aldrich, SAD)
 - Glicerol, 99+% (Fisher Chemical, UK)
 - Lugolov rastvor (Merck, Italija)
 - Skrob (Sigma-Aldrich, SAD)
 - Oksidaza reagens (BD BBL, Irska)
 - H_2O_2 (Galenika, Srbija)
 - Sulfanilna kiselina (Bio-Merieux, Francuska)
 - Alfa-naftilamin reagens (Bio-Merieux, Francuska)
 - Kovačev reagens (Bio-Merieux, Francuska)
 - Triptofan (Sigma-Aldrich, SAD)
- Reagensi i hemikalije korišćene u molekularnim analizama:
- TRIS BASE (Fisher Chemical, UK)
 - EDTA - Ethylenediaminetetraacetic (Fisher Chemical, UK)
 - SDS - Sodium dodecyl sulfate (Fisher Chemical, UK)
 - Proteinaza K (Serva GMBH, Heidelberg, Nemačka)
 - NaCl (Fisher Chemical, UK)
 - CTAB - Cetyltrimethylammonium-bromide (Serva GMBH, Heidelberg, Nemačka)
 - PVP - Polyvinyl pyrrolidone (Fisher Chemical, UK)
 - Hloroform (Macron Fine Chemicals™, SAD)
 - Na-acetat (Fisher Chemical, UK)
 - Izopropanol (Acros Organics, Fisher Chemical, UK)
 - Fenol (neutralna faza fenola u fenol hloroformu) (Fisher Chemical, UK)
 - RNaza (Blirt S.A., Poljska)
 - Agaroz (Serva GMBH, Heidelberg, Nemačka)

- 25 mg MgCl₂ (KAPA Biosystems, SAD)
- 10 × KAPA Taq pufera (KAPA Biosystems, SAD)
- 10 mM dNTP smeše (KAPA Biosystems, SAD)
- Ultra čista voda, oslobođena DNaza/RNaza (Gibco, UK)
- 5U/μl KAPA Taq polimeraza (KAPA Biosystems, SAD)
- Borna kiselina (Fisher Chemical, UK)
- Midori Green Advance (NIPPON Genetics Europe, Nemačka)
- Nalivajuća boja (Thermo Scientific 6x DNA Loading Dye, SAD)
- DNK marker (Serva DNA Standard 100 bp DNA Ladder 100-5000 bp).

3.2 METODE

3.2.1 KULTIVACIJA I BIOHEMIJSKA IDENTIFIKACIJA *P. AERUGINOSA* IZOLATA

Izolacija kliničkih *Pseudomonas* izolata urađena je na standardnim bakteriološkim podlogama (Karaklašević & Aleraj, 1967). Urino-kulture su zasejavane na krvne, endo i MacConkay agar ploče, a sputum, brisevi jezika i cervikalno-vaginalni brisevi na krvne i čokoladne agar ploče. Brisevi rana zasejavani su na krvnom i MacConkay agaru, kao i u hranljivom i tioglikolatnom bujonu. Brisevi uva i grla zasejavani su na krvnom, čokoladnom i MacConkay agaru, kao i u glukoznom i tioglikolatnom bujonu. Kulture su iz hranljivog, glukoznog i tioglikolatnog bujona, nakon 24h aerobne inkubacije na 37 °C presejane na krvni i MacConkay agar i ponovo inkubirane 24h. Preliminarna identifikacija akseničnih kultura izolata, prethodno gajenih i održavanih na TSA i LA agaru, rađena je na osnovu kulturnih karakteristika. Izolati su presejavani na podloge koje su specijalizovane za *P. aeruginosa*: *Pseudomonas* izolacioni agar, , acetamidni agar, asparagin prolin bujon, , Bushnell-Haas-ov agar, cetrimidni agar i pariski manit. Inkubacija je trajala 24h u aerobnim uslovima 37 °C.

Identifikacija selektovanih izolata je dalje vršena na osnovu njihovih fiziološko-biohemijskih osobina (CLSI, 2012; Maksimović & Rifatbegović, 2015) i obuhvatala je biohemijski niz od više vezanih reakcija. Dokazivanje fermentacije glukoze, saharoze i laktoze vršeno je na trostrukom šećer-gvožđe agaru, zasejavanjem ezom do dna epruvete. Reakcija je smatrana negativnom usled nepromenjene boje indikatora podloge (fenol crvena), odnosno pozitivna usled pojave žute boje i mehurića zbog nastalog gasa. Reakcija dokazivanja redukcije nitrata u nitrite vršena je u nitratom bujonu, kome je nakon prekonoćne inkubacije na 37 °C dodato po 0.2 mL sulfanilne kiseline i alfa-naftilamin reagensa. Pojava crvene boje dokazuje mogućnost redukcije nitrata. Simons citratni agar je korišćen u dokazivanju sposobnosti rasta izolata na podlozi gde je jedini izvor ugljenika citrat, a reakcija je ocenjena pozitivnom ukoliko je došlo do promene boje podloge iz zelene u plavu usled postojanja bromtimol plavog indikatora. Sposobnost razgradnje skroba ispitivana je na hranljivom agru sa dodatkom skroba (10%). Nakon 48h inkubacije podloga je prelivena Lugolovim rastvorom i reakcija je ocenjivana negativnom usled pojave plave, odnosno pozitivnom zbog diskoloracione zone izazvane hidrolizom skroba. Ispitivanje produkcije želatina ispitivana je u hranljivom želatinu (10%) ubodnim zasejavanjem. Nakon 48h inkubacije podloge su stavljene 1h na 4 °C. Ukoliko je podloga nakon hlađenja ostala tečna, zbog hidrolize želatina, test je smatran pozitivnim. Dokazivanje ureazne aktivnosti vršeno je u urea bujonu zasejavanjem izolata i inkubiranjem 24h na 37 °C. Pozitivnim testom se ocenjuje promena boje podloge iz crvene u ružičastu zbog fenol crvenog indikatora, dok se negativnim testom smatra zadržavanje žute boje. Prisustvo indola dokazivano je zasejavanjem izolata u andrade peptonsku vodu sa triptofanom (1%). U prekonoćnim kulturama vršena je detekcija pojave indola (usled hidrolize triptofana) u vidu ljubičastog prstena nakon dodavanja nekoliko kapi Kovačevog reagensa. Produkcija katalaze ispitivana je na kolonijima na hranljivom agaru, dodavanjem 3% H₂O₂. Reakcija je smatrana pozitivnom ukoliko su se na površini pojavljivali mehurići od izdvojenog kiseonika, dok je oksidaza

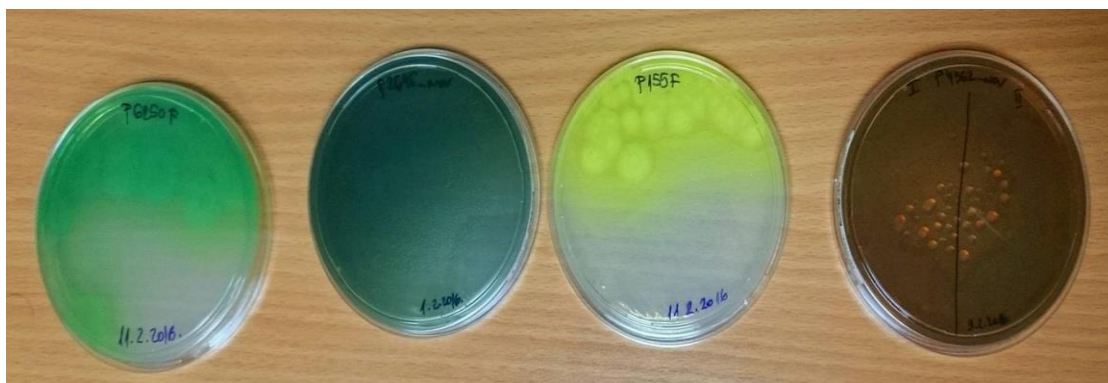
test ispitivan na filter-papir trakama sa impregiranim oksidaza reagensom. Test je smatran pozitivnim u periodu od 10 minuta u slučaju da dolazi do stvaranja ljubičaste boje (Lee, et al., 2002).

3.2.2 SEROTIPIZACIJA

Serotipizacija svih 147 kliničkih izolata rađena je reakcijom aglutinacije na pločici, prema uputstvu proizvođača seruma (Bio-Rad, Francuska). U aglutinaciji su korišćeni polivalentni i monovalentni serumi. Set za aglutinaciju sadržao je 4 polivalentna (PMA, PMF, PME i PMC grupa) i 16 monovalentna seruma (P1, P3, P4 i P6 iz PMA grupe; P7, P8, P11 i P12 iz PMF grupe; P2, P5, P15 i P16 iz PME grupe; P9, P10, P13 i P14 iz PMC grupe). Izolati su kultivisani na TSA i inkubirani 24h na 37 °C. Na staklenoj pločici stavljena je kap svakog od seruma i utrljavana je pojedinačna kolonija izolata u trajanju od 2 min. Ako je došlo do jasne aglutinacije reakcija se očitavala pozitivno. U zavisnosti od stepena aglutinacije, izolati su označavani poliaglutipibilnim, monoaglutipibilnim ili netipibilnim.

3.2.3 PRODUKCIJA PIGMENATA

Utvrđivanje produkcije različitih tipova pigmenata kod 94 klinička *P. aeruginosa* izolata vršeno je na King's A podlozi (detekcija piocijanina i/ili piomelanina) i na *Pseudomonas* fluorescin agaru (detekcija pioverdina tj. fluorescina). Reakcija je očitavana pozitivno nakon prekonocne inkubacije na 37 °C i pojave fluorescentno žuto-zelenih (pioverdin), plavo-zelenih (piocijanin) i/ili braon kolonija (piomelanin) (Slika 21).



Slika 21. Različiti tipovi pigmenata kod *P. aeruginosa* izolata.

3.2.4 PRODUKCIJA BIOFILMA

Sposobnost produkcije biofilma je ispitana u mikrotitracionim pločama sa 96 bunara prema modifikovanom protokolu opisanom u Stepanović et al. (2007). Svaki izolat je testiran u triplikatu i svaki eksperiment je ponovljen tri. Jedna kolonija prekonocne kulture kliničkih izolata *P. aeruginosa* iz druge faze istraživanja (94 izolata), je resuspendovana u fiziološkom rastvoru radi postizanja koncentracije od 0.5 McFarland standarda ($\sim 1 \times 10^8$ CFU/mL). U mikrotitracionu ploču je dodato po 180 μ L MHB bujona u triplikatima. Za svaki triplikat dodavano je po 20 μ L prethodno pripremljene bakterijske suspenzije odgovarajućeg izolata. Negativnu kontrolu predstavljali su bunari samo sa MHB medijumom, bez dodatih bakterija. Nakon 48h kultivacije na 37 °C u aerobnim uslovima, sadržaj iz ploče je odliven i iste su isprane tri puta sa 300 μ L temperiranog fosfatnog pufera (1 \times PBS, pH 7.2, 25 °C) i osušene na vazduhu. Preostale adherirane bakterije su zatim fiksirani tokom 20 min sa 150 μ L metanola po bunaru, osušene i obojene sa 150 μ L rastvora 2% kristal violeta u trajanju od 15 min. Višak nevezane boje je ispran tekućom vodom, a boja vezana za adherentne bakterije je rastvorena u 150 μ L 96% etanola tokom 20 min. Optička gustina

je pročitana na automatskom Multiskan FC čitaču (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific, SAD) na 570 nm. Da bi se odredila kategorija produkcije biofilma, za svaku mikrotitracionu ploču je definisana tzv. „cut off“ vrednost (ODc) kao srednja vrednost apsorbance negativnih kontrola uvećana za vrednost od 3 standardne devijacije (srednja vrednost OD negativne kontrole + 3SD).

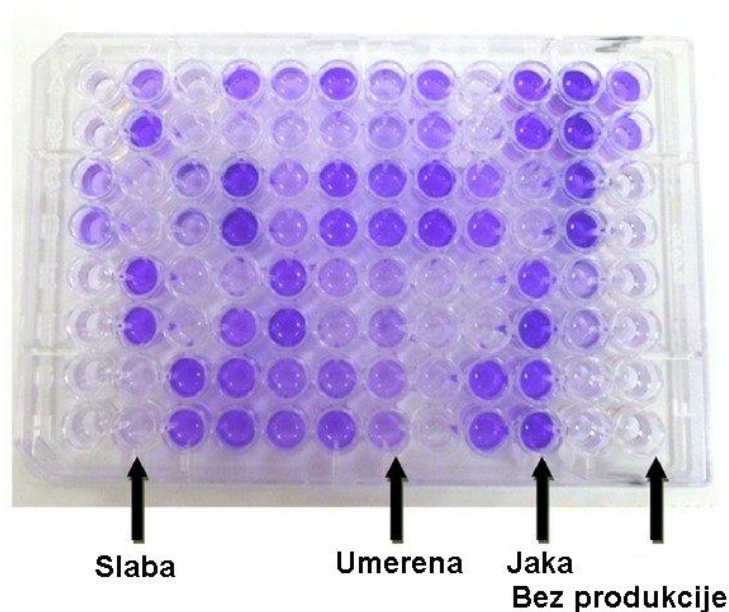
Prema dobijenoj vrednosti ODc su preračunati rezultati prema sledećoj šemi (Stepanović et al., 2000 i 2007):

$OD \leq ODc$ - nema produkcije biofilma (kategorija 0 ili -);

$OD \leq ODc \leq 2 \times ODc$ – slaba produkcija biofilma (kategorija 1 ili +);

$2 \times ODc \leq OD \leq 4 \times ODc$ – umerena produkcija biofilma (kategorija 2 ili ++);

$4 \times ODc \leq OD$ – izražena produkcija biofilma (kategorija 3 ili +++ (Slika 22).



Slika 22. Mikrotitraciona ploča sa karakterističnim kategorijama biofilma (preuzeto i modifikovano prema Darwish & Asfour, 2013).

3.2.5 ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI NA ANTIBIOTIKE

Osetljivost *P. aeruginosa* na antibiotike ispitivana je disk difuzionom metodom po CLSI standardu (*engl.* Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). Bakterijske kulture, gajene u glukoznom bujonu, gustine 0,5 McFarlanda standarda ($\sim 1 \times 10^8$ CFU/mL) utrljane su po površini Müeller-Hinton (MHA) agra. Nakon sušenja od 30 min postavljani su impregnirani antibiotskidiskovi. U prvoj fazi istraživanja na 53 izolata korišćeni su diskovi piperacilin/tazobaktama, imipenema, meropenema, kolistina, ceftazidima, cefepima, amikacina, gentamicina, netilmicina, oflokacina i ciprofloxacina. U drugoj fazi istraživanja na 94 izolata korišćeni su pomenuti antibiotski diskovi uz dodatak aztreonama, doripenema, tobramicina i levofloksacina. Nakon 24h inkubacije na 37 °C, očitavana je osetljivost na antibiotike merenjem dijametra zone inhibicije oko diska (mm) i označavana je kao senzitivna (S), intermedijarna (I) i rezistentna (R).

3.2.5.1 Produkcija β -laktamaza proširenog spektra (ESBL)

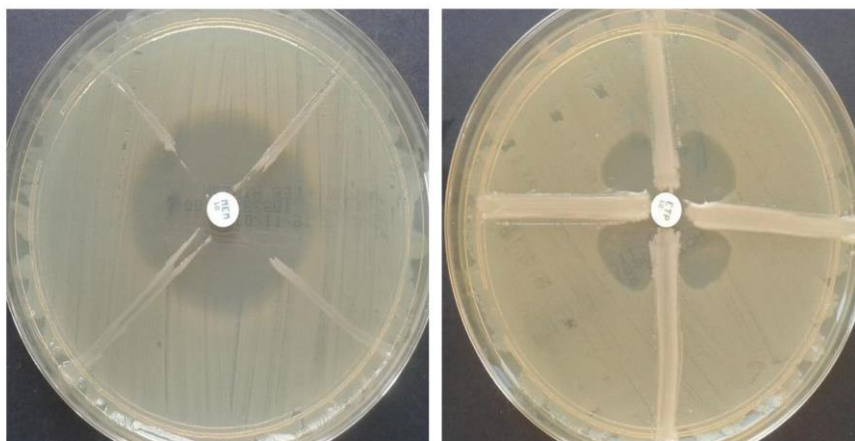
Detekcija ESBL-a, kod izolata iz druge faze istraživanja (94 izolata) se izvodila pod istim uslovima kao u antibiogram testu (EUCAST, 2017a), primenom fenotipskog testa sinergije dvostrukog diska (DDST) pomoću amoksisilin/klavulanska kiselina (AMC), cefaleksin (CL) i cefotaksim (CTX30) diskova na razdaljini od 17 mm od ivica diskova. Ako se na ploči posle inkubacije od 24h, uoče bilo kakve deformacije zona inhibicije u pravcu AMC diska kao β -laktamaza inhibitora ili druge dodatne zone inhibicije, onda se ispitivani izolat smatra ESBL pozitivnim. U slučaju da soj ne produkuje β -laktamaze, na ploči ne dolazi do navedenih karakterističnih promena. U slučaju pozitivnog testa, radi se i konfirmativni test. Ovaj test se izvodi postavljanjem diskova ceftazidim/klavulanska kiselina i ceftazidima. Ukoliko je razlika u zoni inhibicije ista ili veća od 5 mm, onda je to definitivni dokaz da izolat produkuje ESBL (Slika 23).



Slika 23. Negativan (gornja polovina šolje) i pozitivan (donja polovina šolje) konfirmativni ESBL test kod različitih izolata *P. aeruginosa*.

3.2.5.2 Produkcija karbapenemaza

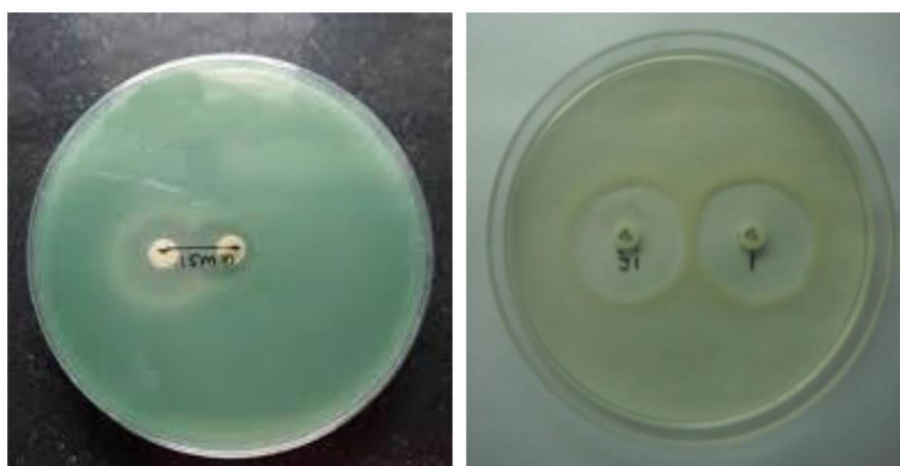
Produkcija karbapenemaza dokazivana je modifikovanim Hodge testom kod izolata iz druge faze istraživanja (Fonseca et al., 2004). Kultura referentnog soja *E. coli* ATCC 2522 (0,5 McFarland) je zasejana na površinu MHA. Disk meropenema postavlja se na sredinu Petrijeve šolje i prekonocne kulture *Pseudomonas* izolata se zasejavaju povlačenjem linije od ivice diska ka periferiji šolje. Ako na mestu spajanja diska i ispitivane kulture dođe do pojave udubljenja nalik listovima deteline smatra se da izolat produkuje karbapenemaze (Slika 24).



Slika 24. Negativan (levo) i pozitivan (desno) modificovani Hodge test (preuzeto iz: Mladenović-Antić, 2018).

3.2.5.3 Produkcija metalo- β -laktamaza (MBL)

Dokazivanje produkcije MBL rađena je tzv. EDTA testom sinergije kod svih 147 izolata iz obe faze istraživanja (Jesudason, et al., 2005). Na površinu MHA utrljana je suspenzija prekonocnih kultura (0,5 McFarland) i postavljani su diskovi imipenema, kao i imipenema dodatno impregniranog sa 10 μ L 0.5 M EDTA na razdaljini od 15 mm. Ako je došlo do formiranja proširene zone inhibicije između dva diska ili je došlo do povećanja zone za više od 6 mm oko imipenem/EDTA diska nakon prekonocne inkubacije na 37 °C smatra se da izolat produkuje MBL (Slika 25).

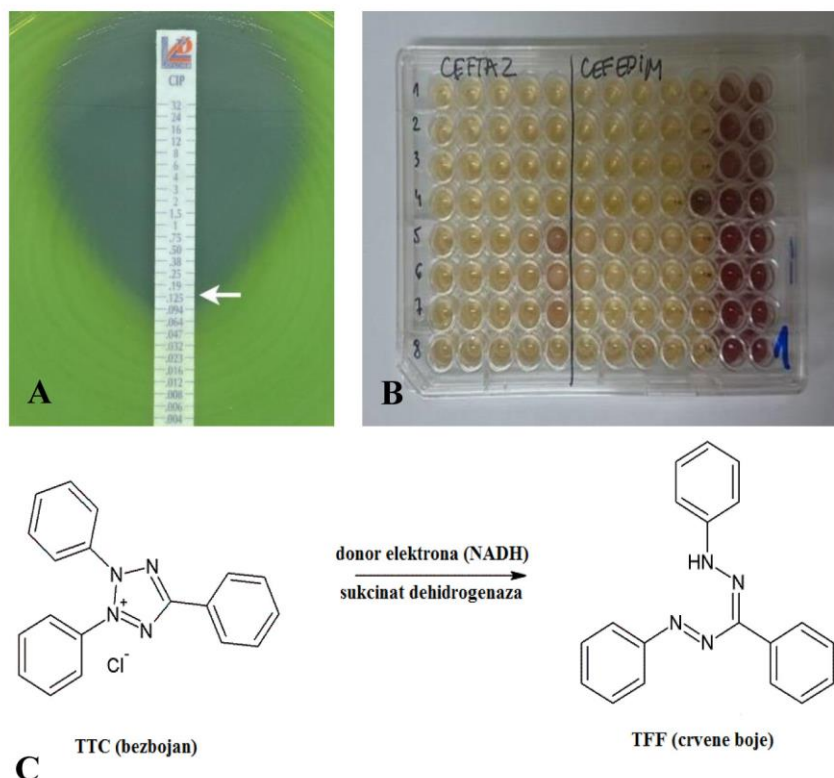


Slika 25. Pozitivan (levo) i negativan (desno) EDTA test sinergije.

3.2.5.4 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)

U prvoj fazi istraživanja na 53 klinička izolata iz rana, utvrđivanje MIC vrednosti određivano je korišćenjem piperacilin/tazobaktam, amikacin i ciprofloksacin antibiotičkih traka sa gradijentom prema uputstvu proizvođača (Slika 26A).

Osetljivost 94 klinička izolata iz druge faze istraživanja određivana je bujon-mikrodilucionim testom prema preporukama Evropskog komiteta za estiranje antimikrobne osetljivosti (EUCAST, 2017b) i ISO standarda 20776-1 (Slika 26B). Suspenzija kliničkih izolata *P. aeruginosa* pripremljena je u fiziološkom rastvoru prema 0.5 McFarland standardu ($\sim 1 \times 10^8$ CFU/mL). Antibiotici ceftazidim, cefepim, i meropenem rastvoreni su u vodenom rastvoru (koncentracije stoka 1000 $\mu\text{g/mL}$), nakon čega su napravljena serijska razblaženja MHB medijumom u sledećim koncentracijama: 1-32 $\mu\text{g/mL}$ (za ceftazidim i cefepim) i od 1-16 $\mu\text{g/mL}$ (za meropenem).



Slika 26. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije korišćenjem Liofilmchem antibiotičkih traka (A), mikrodilucionim metodom (B) i enzimska redukcija trifeniltetrazolijum hlorida pod uticajem ćelijskih dehidrogenaza (C).

Pored negativne kontrole, testirana je i kontrola sterilnosti. Sva razblaženja su izvršena u triplikatu i eksperiment je ponovljen dva puta. Svaki bunar, osim bunara za kontrolu sterilnosti, bio je inokulisan sa 20 μL bakterijske suspenzije (5×10^5 CFU/mL), dostižući konačni volumen od 200 mL. Dodatno, u svaki bunar je dodato i po 10 μL 2,3,5-trifeniltetrazolijum hlorida (TTC) i ploče su inkubirane aerobno tokom 20h na 37 °C. TTC je oksido-redukcioni indikator koji se koristi za procenu rasta ćelije (Slika 26C). To je bezbojni indikator, koji zahvaljujući aktivnosti ćelijske dehidrogenaze, postaje crveni metabolit 2,3,5-trifeniltetrazolijum formazan (TTF). Najniža koncentracija u bunaru, kog koga nije došlo do promene boje, definisana je kao MIC. Rezultati za obe faze istraživanja su izraženi u $\mu\text{g/mL}$.

3.2.6 MOLEKULARNE METODE

3.2.6.1 Izolacija i prečišćavanje totalne DNK

Izolati druge faze istraživanja, gajeni su na cetrimidnoj i LA podlozi i inkubirani preko noći na 37 °C, korišćeni su za ekstrakciju totalne DNK. Nakon inkubacije vršeno je zasejavanje po jedne aksenične kolonije u LB tečni medijum uz inkubaciju preko noći na 37 °C. Genomska DNK iz je

izolovana prema modifikovanoj metodi Le Marrec et al. (2000) i opisanoj kod Janakiev et al. (2019). Nakon centrifugiranja (5 min, 13000 rpm) bakterijskih prekonoćnih kultura, ćelije su resuspendovane u 500 µL TE pufera za lizu (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 7,6) koji je sadržao 100 µg/mL proteinaze K i 0,5% SDS. Nakon inkubacije u trajanju od 30 min na 37 °C, uzorcima je dodato 100 µL 5M NaCl i 300 µL 3% CTAB+PVP pufera (CTAB, 1M TRIS, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, PVP, pH 8) i vršena je dodatna inkubacija u trajanju od 10 min na 65 °C. Nakon dodavanja 800 µL fenol-hloroforma i centrifugiranja (10 min, 13000 rpm), gornja faza je prikupljena i prebačena u nove tube. Sledeći korak je uključivao dodavanje 1/10 volumena 3M Na-acetata (pH 5.0) i 1 volumena izopropanola. Nakon centrifugiranja (15 min, 13000 rpm) odlivana je tečna faza, a DNK je isprana 96% ledeno-hladnim etanolom. U cilju dodatnog prečišćavanja, izolovana DNK je rastvorena u 200 µL Dnaza i Rnaza oslobođene vode i 100 µL fenola (neutralna faza fenola u fenol-hloroformu). Nakon centrifugiranja (10 min, 13000 rpm) supernatant je prebačen u nove tube i dodata je 1/10 zapremine 3M Na-acetata i 2,5 volumena hladnog 100% etanola. Nakon inkubiranja (10 min, 25 °C) i centrifugiranja (10 min, 13000 rpm) dodato je 1 mL hladanog 70% etanola i uzorci su ponovo recentrifugirani (5 min, 13000 rpm). Nakon sušenja (30 min, 37 °C) uzorci su rastvarani u 50 µL TE pufera sa dodatkom smeše RNaza (1 µL stoka 10 mg/mL u 49 µL TE pufera). Nakon inkubacije (15 min, 37 °C) uzorci su proveravani na 1% agaroznom gelu.

3.2.6.2 Umnožavanje fragmenata DNK RAPD PCR metodom

Genomska DNK je amplifikovana RAPD PCR metodom korišćenjem proizvoljnih sekvenci prajmera 272 (5'-AGCGGGCCA-3') i 208 (5'-ACGGCCGACC -3') (Mahenthiralingam et al., 1996). PCR reakciona smeša (25 µL) sastojala se od: 1 µL totalne DNK; 1,5 µL 25 mg MgCl₂; 2,5 µL 10 × KAPA Taq pufera; 0,5 µL dNTP smeše (10 mM svaki); 1,9 µL svakog od prajmera (10 µM); 17,5 µL ultra čiste vode, oslobođene DNaza/RNaza i 0,1 µL (5U/µL) KAPA Taq polimeraze. PCR reakcija za prajmer 272 je rađena prema sledećem programu: inicijalna denaturacija na 94 °C u trajanju od 2 min, praćena sa 35 ciklusa koji su se sastojali od: denaturacije 30 sec na 94 °C, vezivanja prajmera 30 sec na 35 °C i polimerizacije od 2 min na 72 °C. PCR reakcija za prajmer 208 je rađena prema sledećem programu: program autoekstenzije (4 ciklusa inicijalne denaturacije na 94 °C u trajanju od 5 min, vezivanja prajmera 5 min na 36 °C i polimerizacija 5 min na 72 °C), praćen sa 30 ciklusa koji su se dodatno sastojali od: denaturacije od 1 min na 94 °C, vezivanja prajmera 1 min na 36 °C i polimerizacije od 2 min na 72 °C. Za oba korišćena prajmera poslednji ciklus polimerizacije iznosio je 10 min na temperaturi od 72 °C.

3.2.6.3 Umnožavanje fragmenata DNK fingerprinting (rep-PCR) metodom

BOX i ERIC PCR analiza, bazirana na konzerviranim repetitivnim ekstragenim palindromskim elementima testiranih izolata, je urađena korišćenjem oligonukleotidnih prajmera za BOX (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), ERIC-1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') i ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') (Dawson et al., 2002). PCR reakciona smeša (25 µL) sastojala se od: 1 µL totalne DNK; 1,5 µL 25 mg MgCl₂; 2,5 µL 10 × KAPA Taq pufera; 0,5 µL dNTP (10 mM svaki) smeše (KAPA Biosystems, SAD); svakog od prajmera po 1,9 µL (10 µM); 15,6 µL (ERIC PCR), odnosno 17,5 µL (BOX PCR) ultra čiste vode, oslobođene DNaza/RNaza i 0,1 µL (5U/µL) KAPA Taq polimeraze. PCR reakcija je rađena prema sledećem programu: inicijalna denaturacija na 95 °C u trajanju od 7 min, praćena sa 30 ciklusa koji su se sastojali od: denaturacije 1 min na 94 °C, vezivanja prajmera 1 min na 46 °C i polimerizacije 8 min na 65 °C, dok je poslednji ciklus polimerizacije iznosio 16 min na temperaturi od 65 °C.

3.2.6.4 Umnožavanje 16S rRNK amplifikona i sekvenciranje

Totalna, prethodno izolovana DNK izabranih izolata korišćena je za PCR amplifikaciju 16S rRNA, sa univerzalnim prajmerima UN116sF (5'-GAGAGTTTGATCCTGGC-3') i UN116sR (5'-AGGAGGTGATCCAGCCG-3') (Dimkić et al., 2013). PCR reakciona smeša je pripremljena na isti prethodno gore opisani način i PCR uslovi su izvedeni kao i obično s'tim što se vezivanje prajmera odvijalo na 50 °C u trajanju od 1 min. PCR amplikoni su prečišćeni korišćenjem kolone QIAquick Gel Extraction KIT/250 (QIAGEN GmbH, Nemačka) i komercijalno su sekvencirani (Macrogen, Holandija).

3.2.6.5 Horizontalna elektroforeza DNK i dobijenih amplifikona na agaroznom gelu i analiza gelova

Horizontalna elektroforeza totalne DNK i fragmenata umnoženih PCR metodom, rađena je na 1% agaroznim gelovima. Gelovi su pravljani otapanjem agaroze u 0,5 × TBE (5 × TBE ~ 1,1M TRIS, 900 mM Borna kiselina, 25mM EDTA, pH 8.3) puferu uz dodavanje Midori Green-a (0,5 µg/mL). Takođe, kao pufer za elektroforezu korišćen je 0,5 × TBE. Ispitivani uzorci (5 µL) su mešani sa 1,5 µL nalivajuće boje i nanošeni na gel. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 90 V i jačini struje od 300 mA u trajanju od 2h. Veličine linearnih DNK fragmenata dobijenih posle umnožavanja DNK, određivane su upoređivanjem dužine pređenog puta DNK analiziranih fragmenata u odnosu na dužinu puta fragmenta DNK markera.

3.2.6.6 Softverska analiza gelova i filogenetska analiza

Gelovi su fotografisani pod UV osvetljenjem na transiluminatoru (Biometre, Getingen, Nemačka) i dobijene fotografije su korišćene za pravljenje dendograma u programu PyElph 1.4 (Pavel & Vasile, 2012). Klasterisanje rezultata je vršeno pomoću UPGMA (*engl.* Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) algoritma sa „*bootstrap*” vrednošću 100, a pozicija traka na gelu je proveravana manuelno.

Dobijene sekvence su pretražene u bazi podataka i upoređivane sa najslučajnijim genomima, koristeći program za pretragu najslučajnijih sekvenci BLAST u Nacionalnom centru za biotehnoške informacije (NCBI). Sve sekvence su manuelno poravnate korišćenjem ClustalW programa za višestruko poravnanje sekvenci, implementiranog u programu BioEdit 7.1.3. Filogenetsko stablo konstruisano je u MEGA 7.0 softveru korišćenjem „*neighbour-joining*” metode zasnovanoj na matrici uparenih rastojanja koja je dobijena pomoću Kimura dvoparametarskog modela supstitucije nukleotida. Topologija stabala procenjena je na osnovu 1000 „*bootstrap*” replika.

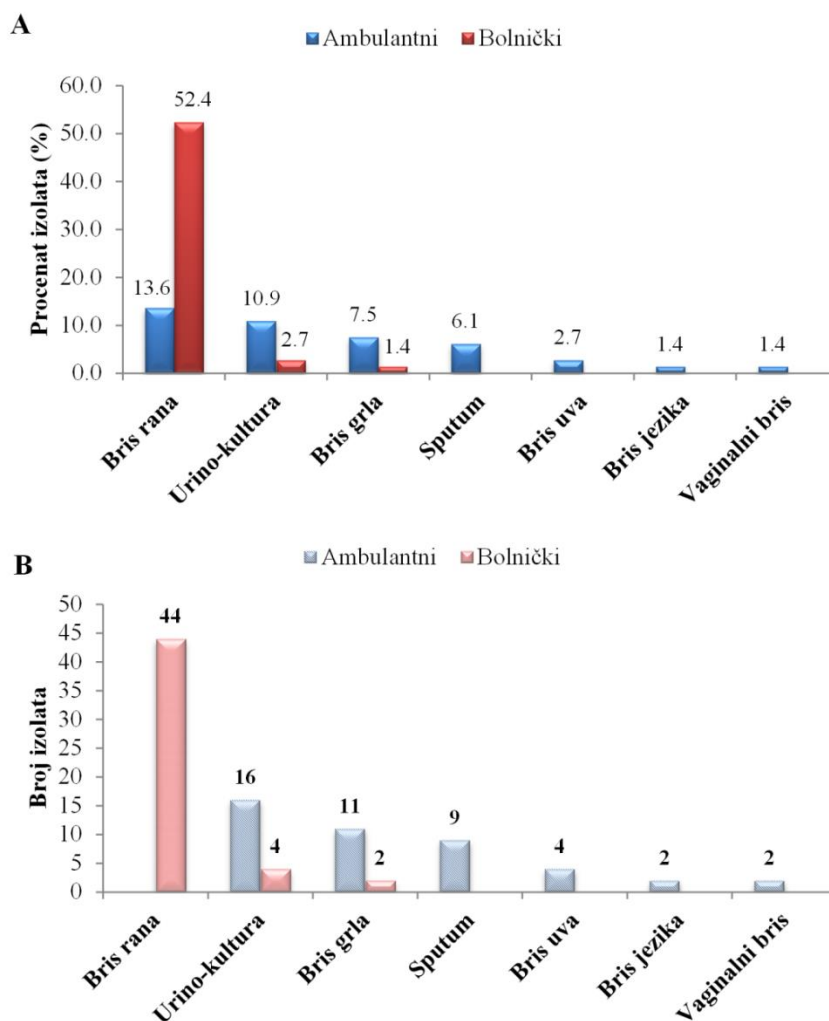
3.2.7 STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

Statističke analize sprovedene su opštim procedurama programa STATISTICA v.7 (StatSoft, Inc.) i IBM SPSS Statistics v.20 (SPSS, Inc.). Analiza varijanse je podržana Kolmogorov – Smirnov testom za normalnost rezidua, kao i Leveneovim testom za homogenost varijanse. Za analizu rezultata korišćeni su χ^2 -test, C slučajni test i koeficijent parametrijskih i neparametrijskih malih i velikih uzoraka.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 POREKLO I BIOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA *P. AERUGINOSA* IZOLATA

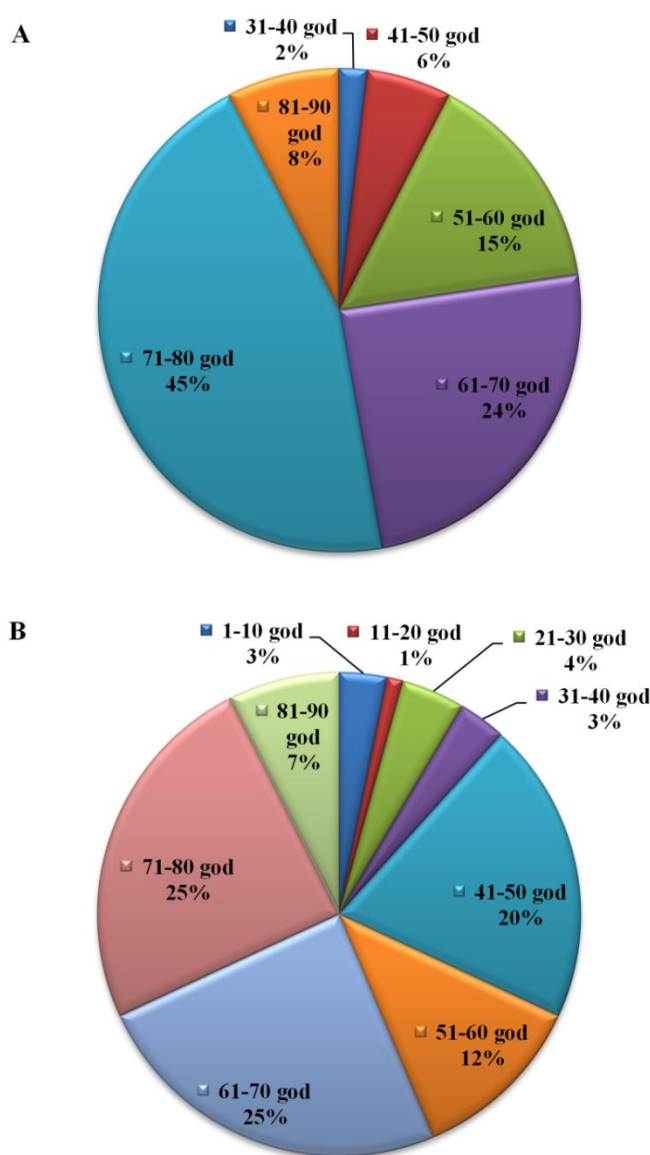
Tokom obe faze istraživanja u periodu od 2012-2015. godine, inicijalno je prikupljen 281 izolat različitog porekla (145 izolata iz prve i 136 izolata iz druge faze istraživanja). Izolacija i preliminarna identifikacija *Pseudomonas* izolata urađena je na standardnim i specijalnim podlogama za *Pseudomonas*, a potvrдна identifikacija *P. aeruginosa* izolata pomoću testova za ispitivanje fiziološko-biohemijskih karakteristika. Na taj način dobijeno je ukupno 147 kliničkih izolata *P. aeruginosa*, koji su bili dalji predmet ove disertacije. Svi izolati okarakterisani kao *P. aeruginosa* nisu fermentisali šećere i skrob, nisu stvarali indol i proizvodili ureazu, ali su koristili citrate kao jedini izvor ugljenika, razlagali želatin, redukovali nitrata do nitrita i bili su oksidaza i katalaza je pozitivni. Za prvu fazu istraživanja korišćeni su izolati sa rana (53 izolata), odnosno 33 bolnička i 20 ambulantna izolata. Druga faza istraživanja uključivala je 94 izolata različitog porekla (urino-kulture, sputum, brisevi rana, grla, jezika, uva i cervikalno-vaginalnog kanala), a odnos bolničkih i ambulantnih izolata je bio 50 i 44, respektivno. Najveći procenat izolata ukoliko se posmatraju obe faze istraživanja, poticao je iz briseva rana 52,4% (bolnički) i 13,6% (ambulantni), urino-kultura 10,9% (ambulantni), kao i iz briseva grla i sputuma ambulantnih pacijenata sa nižom procentualnom zastupljenošću (Slika 27A).



Slika 27. Procentualni prikaz svih ispitivanih kliničkih *P. aeruginosa* izolata iz obe faze istraživanja (A) i broj ambulantnih i bolničkih izolata iz druge faze istraživanja (B).

U toku druge faze istraživanja od 50 bolničkih izolata najveći procenat (88%) je bio iz briseva rana i urino-kultura (8%) takođe, dok je kod ambulantnih izolata najveći procenat bio iz urino-kultura (36,36%), iz briseva grla (25%) i iz iz sputuma (20,45%) (Slika 27B).

Takođe, tokom prve i druge faze istraživanja prikupljene su i demografske karakteristike pacijenata u vidu pola i starosne dobi. Prosečna starost pacijenta je iznosila 67 godina u prvoj odnosno 58 godina u drugoj fazi istraživanja, a izolati su sakupljeni od ukupno 53 pacijenta (29 muškaraca i 24 žene) u prvoj, odnosno 94 pacijenta (56 muškaraca i 38 žena) u drugoj fazi istraživanja. Bolnički izolati prve faze istraživanja su bili poreklom od 12 (60%) muškaraca i 8 (40%) žena ($\chi^2 = 0,67$, $p = 0,67$; $C = 0,089$), a ambulanti od 17 muškaraca (51,51%) i 16 (48,49%) žena ($\chi^2 = 1,46$, $p = 0,226$, $C = 0,152$). Bolnički izolati druge faze istraživanja su poticali od 36 muškaraca i 20 žena, dok su ambulanti dobijeni od 14 muškaraca i 24 žene ($\chi^2 = 2,86$, $p = 0,134$, $C = 0,123$). Najveći broj pacijenata bio je u šestoj do osme decenije starosti (85%) tokom prve faze, odnosno u petoj do osme decenije starosti (82%) u drugoj fazi istraživanja ($\chi^2 = 91$; $p < 0,001$; $C = 0,99$) (Slika 28).



Slika 28. Procentualni prikaz starosnih kategorija pacijenata u prvoj (A) i drugoj fazi istraživanja (B).

P. aeruginosa retko predstavlja deo fiziološke flore, ali najčešće izaziva infekcije kod hospitalizovanih pacijenata, kod kojih lako kolonizuje kožu i sluzokožu izazivajući infekcije bilo kog tkiva. Kod hospitalizovanih bolesnika *P. aeruginosa* je predominantno zastupljen u hirurškim ranama i opekotinama, dok se iz ostalih bolesničkih materijala izoluje dosta ređe. Pacijenti od kojih su uzeti brisevi u ovoj studiji, bili su na odeljenju hirurgije ili su dolazili na previjanja, što indikuje da bolnička sredina ima veliku važnost i odgovornost za širenje ove oportunističke bakterije. Važnu ulogu u intrahospitalnim infekcijama imaju tzv. bolnički sojevi bakterija, koji nastaju selekcijom, pod uticajem dugotrajne antibiotske terapije. Zahvaljujući rezistenciji na veliki broj antibiotika, kao i sposobnosti da preživljavaju u dezinficijensima i antisepticima, bolnički sojevi *P. aeruginosa* se održavaju na odeljenjima intenzivne nege uprkos svim higijenskim merama. U bolnicama je veoma značajno prenošenje *P. aeruginosa* prilikom sprovođenja dijagnostičkih i terapijskih postupaka (nesterilne brizgalice, kateteri, inhalatori i drugi instrumenti za pregled bolesnika). Infekcije izazvane sa *P. aeruginosa* se šire tiho i neprimetno i uglavnom predstavljaju subkliničke infekcije. Da bi se otkrilo postojanje i širenje ovakve infekcije, lekar mora da vrši konstantni epidemiološki, klinički i laboratorijski nadzor sumnjivih pacijenata (Stanković Nedeljković, 2015). Hospitalizovani bolesni, imunokompromitovane i starije osobe su najviše podložne riziku infekcije, pre svega zbog njihove osnovne bolesti ili usred podvrgavanja invazivnim metodama lečenja (Emori & Gaynes, 1993), što se poklapa i sa rezultatima ove studije u kojoj je najveći procenat izolata dobijen iz materijala pacijenata iz šeste, sedme i osme decenije života 60 godina.

Procenjuje se da 3-5% pacijenata koji napuste bolnicu nose infekciju sa sobom. Mikrobiološka etiologija ovih infekcija daje nam važne informacije o svakodnevnim postupcima u bolnicama u smislu novih izbijanja infekcija. U ispitivanju bolničkih infekcija na univerzitetu Mičigen *P. aeruginosa* zauzima drugo mesto sa 20% posleinfekcija izazvanih *E. coli* (Schaberg et al., 1991). Ispitivanje koje je sprovedeno u Hrvatskoj, pokazuje da je od 169 ispitanika, 63% pacijenata bilo hospitalizovano u Splitskoj bolnici, a da je *P. aeruginosa* najčešće bio izolovan iz respiratornog trakta i iz briseva rana (Sardelic et al., 2012). Slično istraživanje aleksinačkog okruga u periodu od 2010 do 2013 godine ukazalo je na povećanja broja bolničkih infekcija rana izazvanih sa ovom bakterijom kod hospitalizovanih pacijenata na 88% u odnosu na 68% u ranijim ispitivanjima (Stanković Nedeljković, 2015). Bez obzira na razvoj medicine i na sredstva kojima danas raspolažemo za njihovo suzbijanje, opšte je mišljenje da se 25% ovih infekcija može sprečiti. Međutim, tendencija porasta bolničkih infekcija izazvanih ovom bakterijom i dalje postoji, na šta ukazuju rezultati ove disertacije.

4.2 DISTRIBUCIJA SEROTIPOVA KOD KLINIČKIH *P. AERUGINOSA* IZOLATA

U prvoj fazi istraživanja najveći broj izolata pripadao je polivalentnim PMA (33,94%) i PMF (24,52%) serogrupama. Najveći broj bolničkih izolata (20,75%) je svrstan u PMA polivalentnu serogrupu, dok su ambulantni (15,09%) većinom svrstani u PMF serogrupu. Šest monovalentnih serotipova (P1, P3, P4, P6, P10 i P11) je bilo identifikovano u prvoj fazi istraživanja kod kliničkih izolata *P. aeruginosa* (Tabela 4). Najzastupljeniji serotipovi bili su P11 (22,64%), P6 (15,09%) i P1 (11,32%), dok je netipabilnih (atipičnih) bilo čak 28,3%. Ispitivani izolati druge faze istraživanja pripadali su svim polivalentnim grupama: PMA, PMF, PME i PMC. Najzastupljenije polivalentne serogrupe bile su PMA (39,36%) i PMF (15,95%), dok je slično visok procenat netipabilnih izolata (29,78%) ponovo zabeležen, ukazujući na hroničnost infekcija. Procenat zastupljenosti polivalentnih serogrupa je bio sličan kod bolničkih i ambulantičkih izolata, osim kod PMA (P1 + P6) serogrupe gde je procenat ambulantičkih izolata bio veći (48%), u odnosu na bolničke izolate (32%).

Tabela 4. Identifikovani serotipovi *P. aeruginosa* izolata tokom prve i druge faze istraživanja

| Izolati prve faze | | | |
|--------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------|
| Serotip | Bolnički izolati | Ambulantni izolati n (%) | Ukupno |
| P11 | 6 (11,32) | 6 (11,32) | 12 (22,64) |
| P6 | 4 (7,54) | 4 (7,54) | 8 (15,09) |
| P1 | 3 (5,66) | 3 (5,66) | 6 (11,32) |
| P10 | 2 (3,77) | - | 2 (3,77) |
| P4 | - | 2 (3,77) | 2 (5,66) |
| P3 | 1 (1,88) | - | 1 (1,88) |
| NT | 11 (20,75) | 4 (7,54) | 15 (28,29) |
| PMA | 1 (1,88) | - | 1 (1,88) |
| PMF | 1 (1,88) | - | 1 (1,88) |
| PME | 4 (7,54) | 1 (1,88) | 5 (9,43) |
| <i>Ukupno</i> | <i>33 (62,26)</i> | <i>20 (37,73)</i> | <i>53 (100)</i> |
| Izolati druge faze | | | |
| NT | 17 (34) | 11 (25) | 28 (30) |
| P1 | 8 (16) | 8 (18) | 16 (17) |
| P10 | - | 2 (4) | 2 (2) |
| P11 | 8 (16) | 7 (16) | 15 (16) |
| P5 | 3 (6) | - | 3 (3) |
| P6 | 8 (16) | 13 (30) | 21 (22) |
| P9 | 6 (12) | 3 (7) | 9 (10) |
| <i>Ukupno</i> | <i>50 (100)</i> | <i>44 (100)</i> | <i>94 (100)</i> |

*n -broj izolata

U reakciji aglutinacije, za razliku od prve faze istraživanja, identifikovani su osim P1, P6, P10 i P11, dodatni monovalentni serotipovi P5 i P9 (Tabela 5). Najprisutniji su ponovo bili izolati (čak njih 55%) sa P6 (22%), P1 (17%) i P11 (16%) serotipovima (Milojkovic et al., 2020). U razmatranju pojedinačnog učešća monovalentnih serotipova u odnosu na poreklo izolacionog materijala, primetno je da su u brisevima rana bili najzastupljeniji serotipovi P1 i P6 sa istom procentualnom distribucijom (15,9%), kao i P11 (18,1%), dok je najviše bilo netipabilnih (29,5%) (Tabela 5). Budući da su infekcije rana uglavnom hroničnog karaktera najveći procenat netipabilnih izolata je bio očekivan. Izolati iz urina najčešće su pripadali serogrupama P1 i P11 podjednake distribucije (20%), dok je procenat netipabilnih izolata bio 35%. Posmatrano procentualno najzastupljeniji serotipovi kod bolničkih izolata su svakako bili P1, P6 i P11 serotipovi sa podjednakom distribucijom od 16%, a isti su dominirali i kod ambulantnih izolata sa nešto različitim distribucijom P1 (18,2%), P6 (29,5%) i P11 (15,9%).

Slična zapažanja su primećena i u drugim studijama. Hafiane & Ravaoarino (2011) potvrdili su P3 i P6 serotipove kao najistaknutije kod pacijenata sa CF-om, dok su drugi identifikovali različite serotipove (P1, P2, P5, P6, P8, P9, P11, P12 i P16), uz dominaciju serotipa P6 i P11, naročito kod izolata poreklom iz opekotina pacijenata (Estahbanati et al., 2002; Loureiro et al., 2002). Robert et al. (1983) u ispitivanju izolata *P. aeruginosa* kod pacijenata sa cističnom fibrozom, detektovali su P6 serotip kao najdominantniji (40%), dok je 19,2% izolata bilo netipabilno. U studiji u Sloveniji koja je obuhvatila 208 kliničkih izolata *P. aeruginosa*, najčešći serotipovi su bili P11 (36%) i P6 (14,4%) (Müller-Premru & Gubina, 2000).

Tabela 5. Detektovani monovalentni serotipovi kod kliničkih *P. aeruginosa* iz druge faze istraživanja prema poreklu izolacije

| Vrsta uzoraka | Monovalentni serotipovi (bolnički izolati) | | | | | | | Ukupno |
|----------------|--|----|----|----|-----|-----|----|--------|
| | P1 | P5 | P6 | P9 | P10 | P11 | NT | |
| Bris rana | 7 | 3 | 7 | 6 | - | 8 | 13 | 44 |
| Urino-kultura | 1 | - | - | - | - | - | 3 | 4 |
| Bris grla | - | - | 1 | - | - | - | 1 | 2 |
| <i>Ukupno</i> | 8 | 3 | 8 | 6 | - | 8 | 17 | 50 |
| Vrsta uzoraka | Monovalentni serotipovi (ambulantni izolati) | | | | | | | Ukupno |
| Urino-kultura | 3 | - | 3 | 2 | - | 4 | 4 | |
| Bris grla | 4 | - | 3 | - | 1 | 1 | 2 | 11 |
| Bris uva | - | - | 2 | - | - | 1 | 1 | 4 |
| Sputum | 1 | - | 4 | 1 | - | 1 | 2 | 9 |
| Bris jezika | - | - | 1 | - | 1 | - | - | 2 |
| Vaginalni bris | - | - | - | - | - | - | 2 | 2 |
| <i>Ukupno</i> | 8 | - | 13 | 3 | 2 | 7 | 11 | 44 |
| Vrsta uzoraka | Monovalentni serotipovi (svi izolati druge faze) | | | | | | | Ukupno |
| Bris rana | 7 | 3 | 7 | 6 | - | 8 | 13 | |
| Urino-kultura | 4 | - | 3 | 2 | - | 4 | 7 | 20 |
| Bris grla | 4 | - | 4 | - | 1 | 1 | 3 | 13 |
| Bris uva | - | - | 2 | - | - | 1 | 1 | 4 |
| Sputum | 1 | - | 4 | 1 | - | 1 | 2 | 9 |
| Bris jezika | - | - | 1 | - | 1 | - | - | 2 |
| Vaginalni bris | - | - | - | - | - | - | 2 | 2 |
| <i>Ukupno</i> | 16 | 3 | 21 | 9 | 2 | 15 | 28 | 94 |

Dodatno, u Hrvatskoj su 2009. godine detektovani kao najčešći serotipovi P12 (58,6%) i P11 (17,1%) (Sardelic et al., 2012). U sličnoj studiji u Srbiji, kao najčešći serotipovi su ponovo bili P11 (20%) i P6 (16%), dok je procenat netipabilnih izolata bio sličan rezultatima ovog istraživanja (Stanković Nedeljković et al., 2011). Takođe, u drugom istraživanju u Srbiji pronađeno je da su P11 (21%), P6 (18%) i P12 (16%) serotipovi bili među najučestalijima (Tomanović et al., 1991). Međutim, u našem istraživanju nije otkriven ni jedan izolat sa serotipom P12. Do pre 30 godina serotip P12 je bio najčešći u Evropi i često je bio povezivan sa produkcijom β -laktamaza (Watine, 1999). I druge studije su prikazale dominaciju P11 serotipa, za razliku od izolata iz životne sredine kod kojih su serotipovi P2, P5, P6 i P12 bili najučestaliji (Orsi et al., 1994; Jamasbi, 1999). Varijacije u O-antigenskom bočnom lancu (LPS) određuju serotipizaciju *P. aeruginosa* izolata. Veliko interesovanje za izučavanje LPS-a, uključenog u virulenciju izolata, je značajno usled mogućnosti pravljenja vakcina za aktivnu imunizaciju. Značaj serotipizacije je pre svega epidemiološke prirode koja nam omogućava uvid o distribuciji pojedinih serotipova i praćenje rezistencije kliničkih izolata. Najveći problem kod aglutinacije izolata sa hroničnim infekcijama je visok procenat netipabilnih izolata (Fyfe et al., 1984). Tako je odavno pokazano da kod hroničnih infekcija rana i pacijenata sa CF-om, dolazi do gubitka O-antigena što dovodi do većeg procenta netipabilnih izolata (Thomassen & Demko, 1981). U oba naša istraživanja nazastupljeniji serotipovi svakako su bili P1, P6 i P11, iz čega se može zaključiti da u opštini Aleksinac godinama dominiraju ova tri serotipa.

4.3 DISTRIBUCIJA PIGMENATA KOD KLINIČKIH *P. AERUGINOSA* IZOLATA

Klinički izolati *P. aeruginosa* iz druge faze istraživanja produkovali su istovremeno u najvećem procentu pioverdin i piocijanin u 76,6% slučajeva, samo pioverdin u 18,1%, dok je sinteza piocijanina bila zabeležena kod svega 5,3% izolata (Tabela 6).

Tabela 6. Distribucija produkcije različitih pigmenata kod kliničkih izolata *P. aeruginosa* u odnosu na poreklo izolacije

| Uzorak | Poreklo materijala | Vrste pigmenata | | |
|----------------|--------------------------|------------------------|-----------|------------|
| | | Pioverdin + Piocijanin | Pioverdin | Piocijanin |
| Bris grla | B | 2 | - | - |
| | A | 9 | 2 | - |
| | Σ_{ukupno} | 11 | 2 | - |
| Bris jezika | B | - | - | - |
| | A | 1 | 1 | - |
| | Σ_{ukupno} | 1 | 1 | - |
| Bris rana | B | 33 | 9 | 2 |
| | A | - | - | - |
| | Σ_{ukupno} | 33 | 9 | 2 |
| Sputum | B | - | - | - |
| | A | 8 | - | 1 |
| | Σ_{ukupno} | 8 | - | 1 |
| Urino-kultura | B | 3 | 1 | - |
| | A | 13 | 2 | 1 |
| | Σ_{ukupno} | 16 | 3 | 1 |
| Bris uva | B | - | - | - |
| | A | 2 | 1 | 1 |
| | Σ_{ukupno} | 2 | 1 | 1 |
| Vaginalni bris | B | - | - | - |
| | A | 1 | 1 | - |
| | Σ_{ukupno} | 1 | 1 | - |

B- bolnički izolati; A - ambulantni izolati

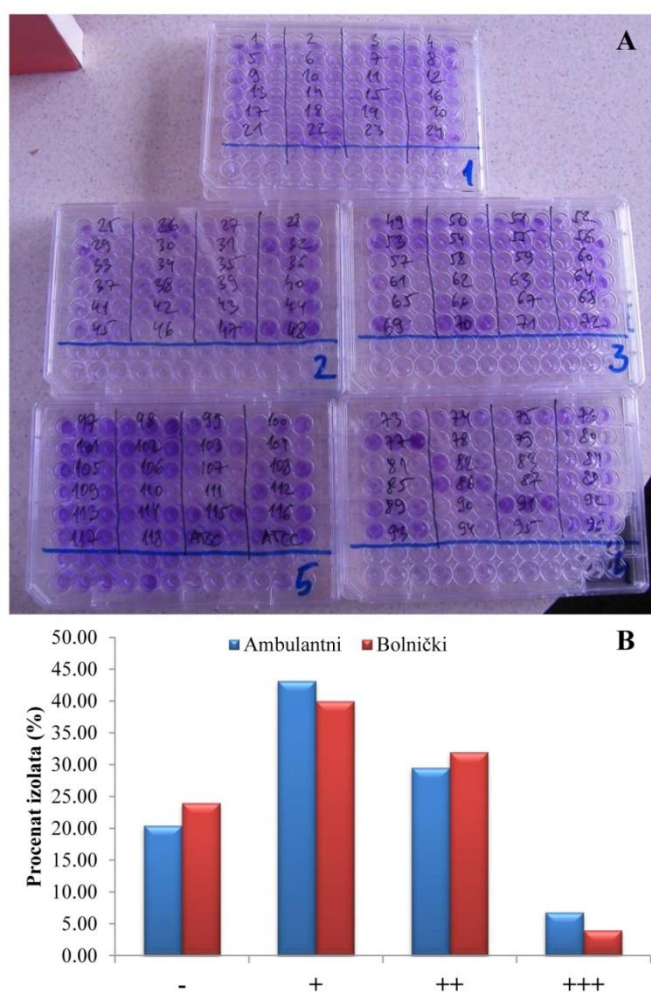
U slučaju bolničkih i ambulantnih izolata simultana produkcija pioverdina i piocijanina je zabeležena kod 76% odnosno 77,3% izolata, respektivno. Produkcija samo pioverdina je bila veća kod bolničkih izolata (20%), nego kod ambulantnih (15,9%) izolata. Najniži procenat sinteze piocijanina zabeležen je kod bolničkih izolata (4%) i nešto viši kod ambulantnih izolata (6,8%). Najveći broj izolata sa istovremenom produkcijom pioverdina i piocijanina vodio je poreklo iz briseva rana i urino-kultura (Tabela 6). Primećeno je takođe da su u najzastupljenijim serotipovima P1, P6 i P11, izolati više produkovali pioverdin nego piocijanin, pored produkcije oba pigmenata istovremeno kod najvećeg broja izolata.

Slični nalazi u vezi s pigmentacijom ranije su zabeleženi za izolate *P. aeruginosa* iz istog geografskog područja istraživanja, gde je sinteza pioverdina (79,75%) bila izraženija u poređenju sa sintezom piocijanina (44,14%) (Stanković Nedeljković et al., 2011). Poznato je da pigmenti kliničkih *Pseudomonas* izolata učestvuju u razvoju i održavanju lezija tkiva u procesu upale kroz različite načine. Pokazano je da su piocijanin i pioverdin toksični za respiratorni epitel, utičući na integritet membrane i mogu da posluže kao ćelijski prenosnici koji učestvuju u regulaciji ekspresije gena (piocijanin), kao i da poseduju baktericidno sredstvo (pioverdin) (Stanković Nedeljković et al., 2011). Takođe, pokazano je da piocijanin poseduje antimikotičko dejstvo protiv *Candida albicans* i protiv devet drugih kvasaca (Kerr et al., 1999). Piocijanin, kao važan faktor virulencije proučavan je

i u eksperimentima na nematodi *Caenorhabditis elegans* i miševima. Ubrizgavanje piocijanina miševima dovelo je do septikemije i brze smrti, a kod *C. elegans* smrt je nastupila već za 4h (Mahajan-Miklos et al., 1999). Stoga proizvodnja pigmenta nije samo fenotipska karakteristika, već je i pokazatelj nivoa patogenosti pojedinih sojeva. Mutanti koji nemaju sposobnost lučenja pioverdina, imaju smanjenu sposobnost da izazovu bolest (Meyer et al., 1996). Pioverdin kontroliše sopstvenu proizvodnju i još dva druga virulentna faktora, egzotoksin A i PrLP proteazu (Lamont et al., 2002). Piocijanin kao bitan faktor patogenosti *P. aeruginosa* ima veoma važnu ulogu u kolonizaciji tkiva. Kod pacijenata sa CF-om, čija su pluća kolonizovana *P. aeruginosa* izolatima, utvrđeno je da u sputumu imaju visoku koncentraciju piocijanina (Wilson et al., 1998). On u zavisnosti od koncentracije i vremena dovodi do apoptoze neutrofilnih granulocita, koji predstavljaju prvu liniju odbrane (Usher et al., 2002). Za razliku od brze apoptoze neutrofilnih granulocita, nema značajnijeg dejstva na tkivne makrofage. Razumevanje mehanizma apoptoze neutrofilnih granulocita moglo bi dovesti do razvoja terapije, koja bi bila usmerena na očuvanje imuniteta. Međutim, mehanizam kojim *P. aeruginosa* izbegava imuni sistem nije do kraja razjašnjen.

4.4 PRODUKCIJA BIOFILMA KOD KLINIČKIH *P. AERUGINOSA* IZOLATA

U ovoj studiji ispitivan je nivo produkcije biofilma kod kliničkih izolata *P. aeruginosa* iz druge faze istraživanja (Slika 29).



Slika 29. Produkcija biofilma kliničkih izolata *P. aeruginosa* u mikrotitracionim pločama (A) i prikaz produkcije prema poreklu izolata (B).

Sposobnost formiranja biofilma pokazalo je 77,66% ispitivanih izolata. U slučaju ambulantnih izolata 43,18% je imalo slabu odnosno 29,55% umerenu produkciju, a sličan odnos je primećen i kod bolničkih (40% i 32%) (Milojković et al., 2020). Od izolata koji su proizveli biofilm čak 53,42% imalo je sposobnost slabe produkcije biofilma (većina njih potiče iz briseva rana bolničkih pacijenata i urino-kultura ambulantnih pacijenata), 39,72% izolata pokazalo je umerenu sposobnost produkcije biofilma (većina njih poticala je iz briseva rana bolničkih pacijenata), dok je svega 6,84% izolata imalo izraženu sposobnost produkcije biofilma (Tabela 7).

Tabela 7. Komparativni prikaz kliničkih izolata *P. aeruginosa* sa sposobnošću produkcije biofilma u odnosu na serotipove i pigmentaciju

| Poreklo izolata | Polivalentni i monovalnti serotipovi | | | | | | | Pigmenti | | | Kategorije biofilma | | | |
|------------------|--------------------------------------|-----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|---------------------|------------|-------------|--------------|
| | PMA | | PME | PMC | | PMF | NT | Piov + | Piov | Pioc | Kat. 0 (-) | Kat. 1 (+) | Kat. 2 (++) | Kat. 3 (+++) |
| | P1 | P6 | P5 | P9 | P10 | P11 | | Pioc | | | | | | |
| Bris grla | 4 | 4 | - | - | 1 | 1 | 3 | 9 | 3 | 1 | 2 | 6 | 5 | - |
| Bris jezika | - | 1 | - | - | 1 | - | - | 1 | 1 | - | 1 | - | 1 | - |
| Bris rana | 7 | 7 | 3 | 6 | - | 8 | 13 | 30 | 12 | 2 | 12 | 17 | 14 | 1 |
| Vaginalni bris | - | - | - | - | - | - | 2 | 1 | 1 | - | 1 | - | 1 | - |
| Bris uva | - | 2 | - | - | - | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | - | - | 4 | - |
| Sputum | 1 | 4 | - | 1 | - | 1 | 2 | 7 | 1 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 |
| Urino-kultura | 4 | 3 | - | 2 | - | 4 | 7 | 16 | 2 | 2 | 3 | 12 | 3 | 2 |
| Σ_{total} | 16 | 21 | 3 | 9 | 2 | 15 | 28 | 66 | 21 | 7 | 21 | 39 | 29 | 5 |

Piov - pioverdin; Pioc - piocijanin

Većina izolata sa slabom produkcijom biofilma (kategorija 1) poticali su najviše iz briseva rana 43,5% i urina 30,7%, a 69,2% su proizvele oba pigmenta, dok su P1 (30,7%), P6 i P11 (oba sa 20,5%) bile najčešće serogrupe. Takođe, najčešći izolati koji su umereno proizvele biofilm (kategorija 2) bili su poreklom iz briseva rana (48,27%), od kojih je 72,41% imalo produkciju oba pigmenta, a najviše je bilo netipabilnih (44,82%) i P6 (20,68%) izolata. Svega pet izolata je imalo snažnu produkciju biofilma (kategorija 3), a većina je vodila poreklo iz urino-kultura i sputuma ambulantnih pacijenata, sa produkcijom oba pigmenta i netipabilnim serotipom.

Formiranje biofilma je složen proces koji počinje vezivanjem bakterija za površinu, nakon čega se one razmnožavaju, agregiraju i formiraju višeslojne naslage (Haley et al., 2012). Sposobnost vezivanja *P. aeruginosa* na žive i nežive površine i formiranje zajednice, kao i međusobna komunikacija između bakterijskih ćelija su od velike važnosti u formiranju biofilma i razvoju hroničnih infekcija. *P. aeruginosa* ima prirodnu sklonost da se vezuje za vlažnu površinu i gradi glikokaliks od egzopolisaharida (EPS), nukleinskih kiselina, lipida i slobodnih jona gradeći biofilm (Coenye & Nelis, 2010). Pokazano je da izolati *P. aeruginosa* imaju u 97% slučajeva sposobnost produkcije biofilma, a kod 40% izraženu sposobnost produkcije biofilma (Vasiljević et al., 2014). Bakterije u biofilmu sposobne su da prežive antibakterijsku terapiju zahvaljujući toleranciji prema hranljivim materijama što dovodi do sporog rasta bakterija (Brown et al., 1988). Efikasnost antibiotika je znatno smanjena kod bakterija u stacioniranoj fazi. Ovo je karakteristično za aerobne bakterije jer je smanjenje koncentracije kiseonika osnovna karakteristika biofilma (Borriello et al., 2004). Smanjena sposobnost difuzije antibiotika u biofilmu objašnjava se na dva načina. Prvi je da egzopolisaharidni matriks deluje kao nepropusna barijera za krupne molekule antibiotika, a drugi je enzimski razgradnja. *P. aeruginosa* može da raste u anaerobnim uslovima na dva načina. Prvi način je denitrifikacija koja kao zamenu zahteva nitrat ili nitrit kao akceptor elektrona, a drugi način je fermentacija arginina (Carlson et al., 1983).

Biofilm i *P. aeruginosa* kod ljudi se često vezuju sa osteomijelitisom, hroničnim infekcijama rana i CF. *P. aeruginosa* kao najdominantnija bakterija koja kod infekcija rana odlaže

ili sprečava njihovo zarastanje (Kirketerp-Møller et al., 2008). Stvaranje biofilma na ranama i razvoj hronične infekcije umanjuje antibiotsko delovanje. Oko 65% svih nozokomijalnih infekcija u SAD je povezano sa biofilmom (Xu et al., 2013). Produkcija biofilma *P. aeruginosa* je važan faktor kod pacijenata sa CF-om. CF dovodi do smanjene funkcije pluća i insuficijencije. Antibiotska terapija poboljšava stanje pacijenata, ali prisustvo biofilma kod pacijenata sa CF-om daje lošu prognozu. Međutim, sposobnost adherencije *P. aeruginosa* u biofilmu nije neophodna karakteristika za preživljavanje kod hroničnih infekcija pluća (Lee et al., 2005). Čelije *P. aeruginosa* u biofilmu razvijaju faktore patogenosti više nego kod pojedinačnih ćelija. Studija koju je sproveo Woo et al. (2012) je obuhvatila merenje adhezivnosti, produkcije biofilma, proteaze i elastaze *P. aeruginosa* izolata iz biofilma pluća pacijenata sa CF i referentnog soja *P. aeruginosa* O1. Veću produkciju elastaze značajno su pokazali klinički izolati koji su 3-4 puta imali viši nivo mutacija. Takođe, pokazano je da je u anaerobnim uslovima bez prisustva gvožđa značajno smanjena produkcija biofilma (Che et al., 2009). Poznato je da infekcije urinarnog trakta predstavljaju veliki zdravstveni problem koji je po učestalosti na drugom mestu infekcija u telu i odgovorne su za 40% bolničkih infekcija povezanih sa kateterom (Mittal et al., 2009). *P. aeruginosa* može da formira biofilm na površini urinarnog katetera i dovesti do infekcija mokraćne bešike kod pacijenata sa dugotrajnom kateterizacijom i treći je najčešći patogen urinarnih infekcija povezanim sa kateterima. U istraživanju sličnom našem, u Srbiji od 163 klinička izolata *P. aeruginosa*, 2,45% nije produkovalo biofilm, 23,93% je imalo slabu, odnosno 34,36% umerenu produkciju biofilma, a čak 39,26% jaku produkciju biofilma (Vasiljević et al., 2014). Studija na izolatima istog geografskog porekla, ukazala je da je 99% izolata imalo sposobnost produkcije biofilma od kojih je 87% izolata imalo umerenu produkciju. Kod izolata bolničkog porekla 78% je imalo umerenu sposobnost formiranja biofilma, a 22% slabu sposobnost, dok je kod izolata ambulatnog porekla 96% imalo umerenu sposobnost, a 2% slabu sposobnost formiranja biofilma (Stanković Nedeljković, 2015). Izolati koji produkuju biofilm predstavljaju veliki problem u medicini i sprečavanje formiranja biofilma kod infekcija je od ključnog značaja jer se rezistencija *P. aeruginosa* izolata u biofilmu povećava 10 do 1000 puta u odnosu na iste bakterije u slobodnoživećem planktonskom obliku (Woo et al., 2012). Poslednjih godina ulažu se velika sredstva u prevenciji stvaranja biofilma, a primene visokih doza antibiotika zarad uklanjanja biofilma su odbačene zbog toksičnog dejstva na pacijente. Najnovije strategije se zasnivaju na razumevanju vezivanja ćelija *P. aeruginosa* i njihovog odvajanja od supstrata.

4.5 ANTIBIOTSKA REZISTENCIJA

4.5.1 ANTIBIOGRAM

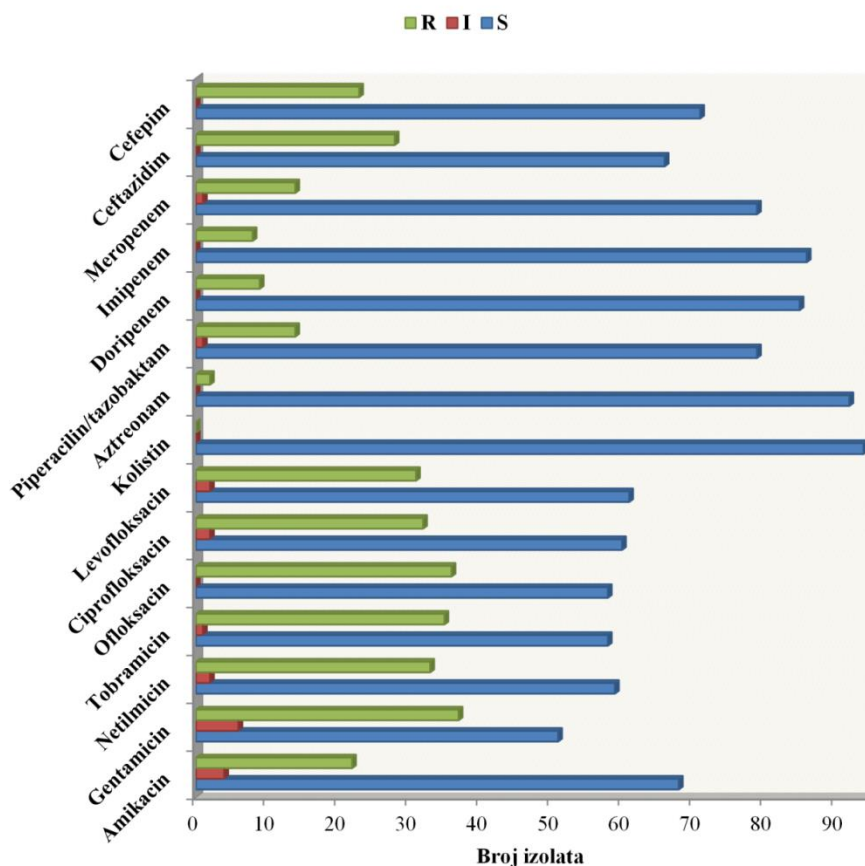
Testirana osetljivost na antibiotike *P. aeruginosa* izolata poreklom iz briseva rana iz prve faze istraživanja, ukazalo je da je najviši stepen osetljivosti potvrđen za kolistin (100%), meropenem (93,44%), imipenem (86,7%) i piperacilin/tazobaktam (79,24%). Takođe, viša otpornost izolata je utvrđena na ciprofloksacinu, ofloksacinu, netilmicinu i gentamicinu (Tabela 8). Kolistin se retko koristi u Srbiji, zbog pojačane neurotoksičnosti (Bert & Lambert-Zechovsky, 1997), što bi je ujedno moglo biti i objašnjenje totalne osetljivosti na ovaj antibiotik. Rezistencija na piperacilin/tazobaktam je neočekivano bila veća kod ambulatnih nego bolničkih izolata. Ovo se ne odnosi na imipenem i meropenem, što pokazuje da su karbapenemi važni antibiotici koji se koriste u lečenju infekcija izazvanim *P. aeruginosa* izolatima. Osetljivost na 15 antibiotika iz različitih klasa kao što su aminoglikozidi (amikacin, gentamicin, netilmicin i tobramicin), fluorohinoloni (ofloksacin, ciprofloksacin i levofloksacin), polipeptidi (kolistin), kombinacija penicilina (piperacilin/tazobaktam), monobaktam (aztreonam), cefalosporini (ceftazidim i cefepim) i karbapenemi (doripenem, imipenem i meropenem) ispitivana je na svim izolatima iz druge faze istraživanja.

Tabela 8. Antibiotička osetljivost bolničkih i ambulantičnih izolata *P. aeruginosa* iz prve faze istraživanja

| Antibiotici | Bolnički, n(%) | | | Ambulantični, n(%) | | |
|------------------------|----------------|---------|-----------|--------------------|-------|--------|
| | S | I | R | S | I | R |
| Piperacilin/tazobaktam | 28(84,9) | 1(3,03) | 4(12,1) | 14(70) | - | 6(30) |
| Imipenem | 30(90,09) | 1(3,03) | 2(6,06) | 16(80) | 1(5) | 3(15) |
| Meropenem | 31(93,93) | - | 2(6,06) | 19(95) | - | 1(5) |
| Ceftazidim | 25(75,75) | - | 8(24,24) | 14(70) | - | 6(30) |
| Cefepim | 3(9,09) | 1(3,03) | 29(87,87) | 6(30) | 2(10) | 12(60) |
| Gentamicin | 19(57,57) | 1(3,03) | 13(39,39) | 9(40) | 1(5) | 10(50) |
| Amikacin | 22(66,66) | 2(6,06) | 9(27,27) | 12(60) | 1(5) | 7(35) |
| Netilmicin | 16(48,48) | 3(9,09) | 14(42,42) | 13(65) | - | 7(35) |
| Ofloksacin | 20(60,6) | - | 13(39,39) | 7(35) | - | 13(65) |
| Ciprofloksacin | 22(66,66) | - | 11(33,33) | 6(30) | - | 4(70) |
| Kolistin | 22(100) | - | - | 20(100) | - | - |

*n - broj testiranih izolata

Slika 30 pokazuje da su svi izolati bili osetljivi na kolistin, kao i većina izolata na aztreonam (97,87%), imipenem i doripenem (91,49% i 90,43%, respektivno), dok je 85,1% izolata bilo osetljivo na meropenem i kombinaciju piperacilin/tazobaktam. (Milojković et al., 2020).



Slika 30. Osetljivost kliničkih *Pseudomonas* spp. izolata na antibiotike iz različitih klasa. Izolati su klasifikovani kao otporni (R), intermedijarno-osetljivi (I) ili osetljivi (S).

U slučaju osetljivosti na ceftazidim i cefepim, 70,21% i 75,53% izolata su bili osetljivi na cefalosporine 3. i 4. generacije, respektivno. Najveći broj rezistentnih izolata zabeležen je u ispitivanju aminoglikozida [gentamicin (39,36%), netilmicin (35,10%) i tobramicin (37,23%)] i fluorohinolona [ofloksacin (38,30%), ciprofloksacin (34,04%) i levofloksacin (32,98%)] (Milojković et al., 2020). Dvadeset i tri bolnička izolata bila su rezistentna na fluorohinolon ofloksacin (46%), a sedamnaest ambulantnih izolata na aminoglikozid gentamicin (38.64%). Cefepim je najbolje inhibirao bolničke, za razliku od ceftazidima koji je bio bolje sredstvo za ambulantne *Pseudomonas* izolate (Tabela 9).

Tabela 9. Antibiotiska osetljivost bolničkih i ambulantnih *Pseudomonas* spp. izolata

| Bolnički izolati | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|---------|----------------|------|-----|------|----------------|------|--------|--------|--------|------------------|-------------|------|-----|---------------|-----|
| Šifra izolata | Poreklo | Aminoglikozidi | | | | Fluorohinoloni | | | Polip. | Monob. | Penicillin komb. | Karbapenemi | | | Cefalosporini | |
| | | Amik | Gent | Net | Tobr | Ofloks | Cipr | Levofl | Kol | Aztr | Pip/taz | Dor | Imip | Mer | Ceft | Cef |
| 5660 | Grlo | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 5661 | Grlo | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 1183 | Urin | S | R | R | R | R | R | R | S | S | S | S | S | R | R | S |
| 2638 | Urin | R | R | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | R | R | R |
| 2844 | Urin | S | R | S | R | R | R | R | S | S | S | S | S | S | S | R |
| 3853 | Urin | S | R | R | R | R | R | R | S | S | S | S | S | S | R | S |
| 611 | Rana | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 821 | Rana | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S |
| 971 | Rana | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R |
| 1087 | Rana | R | R | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | R | R | R |
| 1416 | Rana | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 2064 | Rana | S | S | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S |
| 2073 | Rana | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | R | R | R | R | R |
| 2581 | Rana | R | R | R | R | R | R | R | S | S | R | S | S | S | R | S |
| 2645 | Rana | R | R | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | R | R | R |
| 2900 | Rana | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | R | R | R | R | R |
| 3122 | Rana | S | S | R | S | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 3322 | Rana | R | R | R | R | R | R | R | S | S | R | S | S | R | S | S |
| 3451 | Rana | S | R | R | R | R | R | R | S | S | R | S | S | S | R | S |
| 3563 | Rana | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 3595 | Rana | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 3658 | Rana | S | R | R | R | R | R | R | S | S | S | R | S | S | S | S |
| 3714 | Rana | S | S | S | R | S | S | S | S | R | S | S | R | R | R | R |
| 3883 | Rana | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 4071 | Rana | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 4082 | Rana | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 4211 | Rana | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S |
| 4212 | Rana | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 4312 | Rana | R | R | R | S | R | R | S | S | S | S | S | S | S | R | S |
| 4314 | Rana | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 4354 | Rana | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 4473 | Rana | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 4541 | Rana | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 5348 | Rana | R | R | R | R | R | R | R | S | S | R | S | S | S | S | S |
| 5774 | Rana | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | S | S | I | S | R |
| 5797 | Rana | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | S | S | S | R | S |
| 6412 | Rana | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 6982 | Rana | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 7543 | Rana | R | R | R | R | R | R | R | S | S | R | S | S | S | R | R |
| 7698 | Rana | R | R | I | R | S | I | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 7881 | Rana | S | S | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 8283 | Rana | I | I | R | R | R | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 8702 | Rana | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |

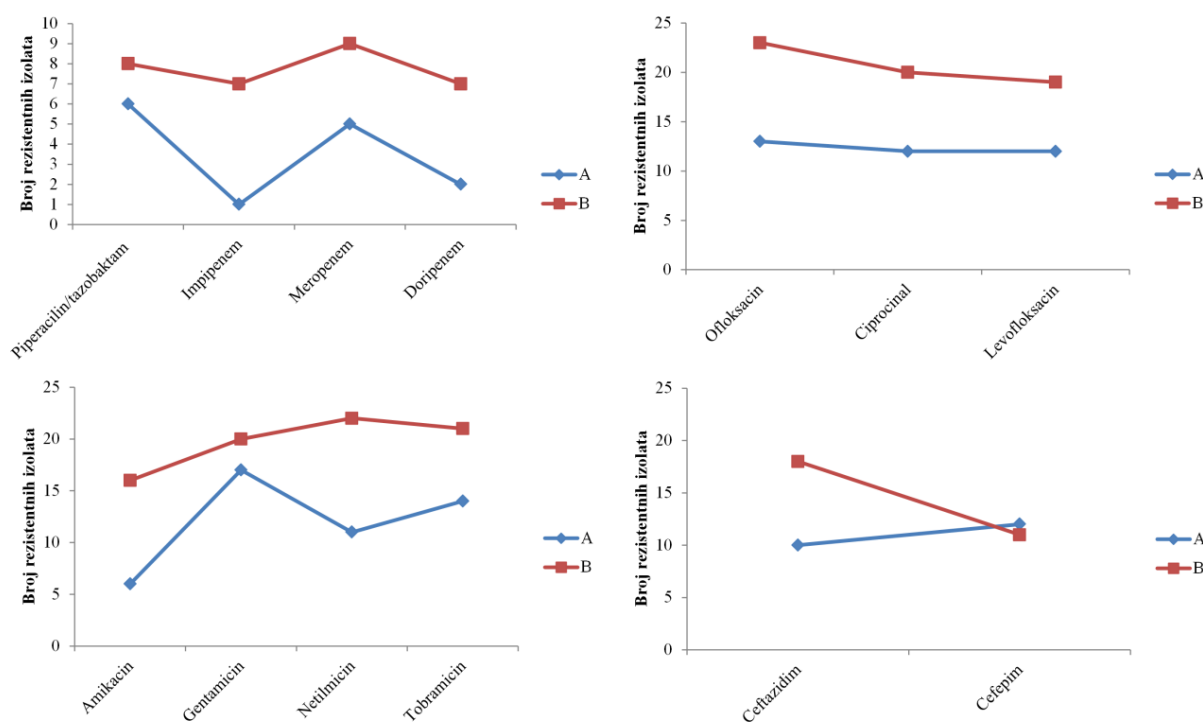
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---|---|---|----------|----------|---|----------|----------|
| 8913 | Rana | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 10195 | Rana | S | S | S | S | R | I | I | S | S | S | S | S | S | R | R |
| 10336 | Rana | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 10708 | Rana | R | I | I | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 10800 | Rana | S | I | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | S | R | S |
| 11947 | Rana | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 19677 | Rana | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |

Ambulantni izolati

| Šifra izolata | Poreklo | Aminoglikozidi | | | | Fluorohinoloni | | | Polip. | Monob. | Penicillin komb. | Karbapenemi | | | Cefalosporini | |
|---------------|-----------|----------------|----------|----------|----------|----------------|----------|----------|--------|----------|------------------|-------------|----------|----------|---------------|----------|
| | | Amik | Gent | Net | Tobr | Ofloks | Cipr | Levofl | Kol | Aztr | Pip/taz | Dor | Imip | Mer | Ceft | Cef |
| 2609 | Uvo | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S |
| 4278 | Uvo | S | I | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 5518 | Uvo | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | R |
| 7546 | Uvo | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 294 | Sputum | S | R | S | I | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 2124 | Sputum | S | S | S | R | R | R | R | S | S | R | S | S | S | R | R |
| 2941 | Sputum | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 2966 | Sputum | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 3496 | Sputum | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R |
| 3919 | Sputum | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 8142 | Sputum | S | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 9921 | Sputum | R | R | R | R | R | R | R | S | S | S | S | S | S | R | R |
| 11838 | Sputum | S | R | S | S | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 1863 | Grlo | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 2005 | Grlo | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 2047 | Grlo | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 3238 | Grlo | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 3477 | Grlo | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 3540 | Grlo | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 3864 | Grlo | S | I | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 4087 | Grlo | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 4646 | Grlo | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 9642 | Grlo | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 10412 | Grlo | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 2383 | Jezik | S | R | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S |
| 2967 | Jezik | I | R | R | R | S | S | S | S | S | R | S | S | S | R | R |
| 1408 | Urin | R | R | S | R | R | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 1790 | Urin | I | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 2285 | Urin | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 2588 | Urin | R | R | R | R | R | R | I | S | S | S | S | S | R | S | S |
| 2597 | Urin | S | R | R | R | R | R | R | S | R | S | S | S | S | S | R |
| 2711 | Urin | R | I | R | R | S | S | R | S | S | S | S | R | S | S | R |
| 2875 | Urin | R | R | S | R | R | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 3199 | Urin | S | R | R | R | R | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 3214 | Urin | S | R | R | R | R | R | R | S | S | R | S | S | S | R | R |
| 3777 | Urin | S | R | R | R | R | R | R | S | S | S | R | S | R | S | R |
| 4188 | Urin | I | R | R | R | R | R | R | S | S | S | R | S | R | S | R |
| 4362 | Urin | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R |
| 5586 | Urin | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 8599 | Urin | S | R | R | R | R | R | R | S | S | S | S | S | R | R | S |
| 10019 | Urin | R | R | R | R | R | R | R | S | S | I | S | S | S | S | R |
| 10600 | Urin | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | R | S |
| 2671 | Vag. bris | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 2689 | Vag. bris | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S |

Amik - amikacin; Gent - gentamicin; Net - netilmicin; Tobr - tobramicin; Ofloks - ofloksacin; Cipr - ciprofloksacin; Levofl - levofloksacin; Kol - kolistin; Aztr - aztreonam; Pip/taz - piperacilin / tazobaktam; Dor - doripenem; Imip - imipenem; Mer - meropenem; Ceft - ceftazidim; Cef - cefepim. Polip. - klasa polipeptida; Monob. - monobaktam. S - osetljivi; I - intermedijarno-osetljivi; R - otporni izolati. Zadebljana slova predstavljaju rezistentne izolate.

Na Slici 31. prikazano je poređenje osetljivosti na antibiotike različitih klasa u odnosu na poreklo izolata.



Slika 31. Poređenje rezistencije bolničkih i ambulantnih *Pseudomonas* spp. izolata u odnosu na ispitivanu antibiotsku klasu.

Uglavnom primećena je značajna razlika u povećanoj rezistenciji kod bolničkih izolata. Najveća razlika je uočena za imipenem, doripenem i amikacin verovatno zbog njihove učestalije upotrebe na odeljenju hirurgije u Aleksincu. Velika razlika u otpornosti bolničkih i ambulantnih izolata prema gentamicinu i cefepimu nije zabeležena. Svakako, visok stepen rezistencije izolata pogotovu na aminoglikozidne antibiotike bi se mogao objasniti njihovom nekontrolisanom primenom na našoj teritoriji u odnosu na Evropu.

P. aeruginosa je prirodno otporan na mnoge antibiotike, a može razviti rezistenciju tokom primene antipseudomonalne terapije (Poole, 2011). Često u bolničkim sredinama nastaju višestruko rezistentni sojevi koji se mogu tretirati jedino kolistinom, kao antibiotikom poslednje linije, ali samo kao krajnje sredstvo zbog njegove izražene neurotoksičnosti (Falagas & Kasiakou, 2006) i nefrotoksičnosti, kao velikog problema kolistina zbog čega nikada ne predstavlja prvi izbor u lečenju infekcija izazvanih Gram negativnim bakterijama (Levin et al., 1999). Kolistin je polimiksin koji deluje kao katjonski polipeptid koji reaguje sa anjonskim lipopolisaharidima bakterijskog zida i dovodi do njegovog razaranja, a kombinacija kolistina i karbapenema pokazala je dobar učinak do sada (Bilić, 2015). Slično našem, istraživanje na Tajlandu je takođe potvrdilo senzitivnost svih testiranih kliničkih izolata *P. aeruginosa* (Koomanachai et al., 2007). Aztreonam pripada grupi monobaktama i spada u β -laktamske antibiotike koga metalo- β -laktamaze (MBL) ne razlažu usled čega zadržava aktivnost protiv mnogih Gram negativnih patogena zbog svog moćnog i specifičnog afiniteta za protein koji veže penicilin vezujući protein 3 (PBP3) (Wenzler et al., 2017). Mehanizam delovanja je isti kao kod penicilina, što znači da sprečava sintezu peptidoglikana u bakterijskom zidu. Kada se veže za receptore na bakterijskom zidu blokira transpeptidacioni enzim koji povezuje peptidne lance. Međutim, aztreonam se lako hidrolizuje pomoću većine serinskih β -laktamaza što ga sve više čini neefikasnim u monoterapiji. Niska stopa rezistencije je

verovatno rezultat retkog korišćenja ovog antibiotika na odeljenju hirurgije i intezivne nege u Aleksincu.

Piperacilin/tazobaktam predstavlja kombinaciju antibiotika baziranu na penicilinu. Piperacilin je ureidopenicilin čija efikasnost je smanjena dejstvom β -laktamaza, dok tazobaktam je inhibitor β -laktamaza i proširuje spektar delovanja piperacilina. U sličnoj studiji iz Srbije bila je ustanovljena značajno viša rezistencija izolata iz Kliničko-bolničkog centra u Aleksincu na pomenutu kombinaciju antibiotika (22%), dok je u našem istraživanju ona gotovo prepolovljena (Stanković Nedeljković, 2015). Kontrolisanija upotreba antibiotika i strožija higijena na odeljenju intezivne nege su verovatno razlozi smanjene rezistencije. Razvoj rezistencije prema ovom antibiotiku uključuje nekoliko mehanizama kao što su β -laktamaze, efluks pumpe i teško propusni bakterijski zid (Lodise et al., 2007). Ovo često dovodi do povećanja MIC vrednosti za kombinaciju piperacilin/tazobaktam (ICAR Epidemiology, 1999). Tam et al. (2008) su u periodu od 2002-2006 ispitivali osetljivost na piperacilin/tazobaktam izolata *P. aeruginosa* koji je dobio do bakterijemije. Sumnjalo se da povećani mortalitet pacijenata sa bakterijemijom je povezan sa empirijskom terapijom piperacilin/tazobaktama. Bakterijemija izazvana *Pseudomonas* dovodi do stope smrtnosti od 18-62% (Vidal et al., 1996). Zbog visoke stope smrtnosti empirijska terapija igra važnu ulogu, a piperacilin/tazobaktam predstavlja prvi izbor u terapiji zbog širokog spektra delovanja i smanjenih neželjenih dejstava. Piperacilin/tazobaktam je i danas lek izbora za lečenje pseudomonalnih urinarnih infekcija, jer u mokraćnim putevima postiže najveću koncentraciju.

Visoki stepen senzitivnosti ispitivanih izolata je bio na antibiotike iz grupe karbapenema. Karbapenemi su jedni od najvažnijih antibiotika u lečenju višestruko rezistentnih sojeva *P. aeruginosa*, a razvoj rezistencije prema karbapenemima otežava izbor terapije. U istraživanju obavljenom u Kanadi na 1466 izolata *P. aeruginosa* rezistencija na imipenem je iznosila tek 5,2% (Blondeau et al., 1999). Mehanizam nastanka ove rezistencije nije poznat, ali smatra se da ovi izolati nisu imali OprD porin, koji inače služi kao receptor za vezivanje karbapenema. U istraživanju na kliničkim izolatima iz bolnice u Njujorku na svega 33 izolata utvrđeno je da su sedam izolata pokazala rezistenciju na karbapeneme, a čak 4 izolata na 3 testirana karbapenema: imipenem, meropenem i ertapenem, a svi izolati rezistentni na karbapeneme imali su smanjen broj OprD porina (Quale et al., 2006). Smanjen broj OprD porina nastao je zbog mutacija na genu koji je odgovoran za njegovu sintezu (Köhler et al., 1999). Karbapenem novije generacije, doripenem, ima trans-konfiguriranu 6-hidroksilnu grupu koja ga štiti od dejstva laktamaza (Mushtaq et al., 2004). Gubitkom porina OprD više je ugrožen imipenem od meropenema, dok aktivnost efluks pumpe više ugrožava meropenem (Livermore, 2001). Oba ova antibiotika bivaju hidrolizovana od strane IMP, SPM, i VIM metalo- β -laktamaza (Livermore, 2002). U našem ispitivanju 6 izolata (6,38%) pokazalo je istovremenu rezistenciju na imipenem i doripenem. Ovo se poklapa sa studijom izvedenom u Francuskoj, gde je 32 sličan procenat izolata (6,7%) je bilo rezistentno pomenute karbapeneme. Pomoću elektroforeze urađena je genotipizacija kojom je otkrivena velika klonska raznovrsnost, a daljim sekvenciranjem čak kod 24 izolata pronađene su mutacije na *oprD* genu (Rodríguez-Martínez et al., 2009). Razumevanje nastanka mehanizma rezistencije na karbapeneme je od velike važnosti za razvoj nove antipseudomonalne terapije.

Ceftazidim i cefepim su antibiotici širokog spektra delovanja, koji se široko koriste za antipseudomonalnu terapiju. Rezistencija na cefalosporine treće i četvrte generacije uglavnom nastaje iz tri razloga: delovanjem AmpC β -laktamaza, usled nepropustljivosti spoljašnje membrane i pojačanog efluksa (Hocquet et al., 2006). Enzimi iz klase A po Ambleru, TEM i SHV vezani ESBL-ovi, PER-1 i VEB-1 hidrolizuju ceftazidim i cefepim, a iz klase B, istu mogućnost poseduju IMP-1, VIM-1 i VIM-2 (Poirel et al., 2000). Grupa ESBL u kojoj spada OXA-10 pored ceftazidima i cefepima hidrolizuje i karbapeneme (Poirel et al., 2000). *P. aeruginosa* proizvodi AmpC β -laktamazu koja vrši hidrolizu cefalosporina uskog spektra delovanja. U molekularnoj klasi D nalaze se oksacilinaze, pre svega OXA-1 i 2, koje vrše hidrolizu ceftazidima, a ređe cefepima. Rezistencija

na cefepim uglavnom nastaje usled aktivnosti efluks pumpi, najčešće MexCD-PprJ, koja najveći afinitet upravo pokazuje prema cefepimu (Schweizer, 2003). U studiji u Francuskoj, ustanovljeno je da *P. aeruginosa* pokazuje veću rezistenciju na cefepim nego na ceftazidim, bez obzira što je cefepim, cefalosporin novije generacije (Hocquet et al., 2006). Pomenuta studija je obuhvatila 38 izolata *P. aeruginosa* i utvrđeno je da povećana rezistencija na cefepim proizašla iz činjenice da je visok procenat izolata (84%) sadržalo MexCD-PprJ efluks pumpe u bakterijskom zidu, koja je odgovorna za izbacivanje cefepima. Međutim, doprinos rezistenciji na cefalosporine može biti maskirana i sintezom laktamaza, pre svega AmpC (Nakae et al., 1999). Tako je u pomenutoj studiji Hocquet et al. (2006) čak 12 izolata je pored efluks pumpe proizvelo i AmpC laktamazu, i bili su 4 do 8 puta otporniji na cefepim nego na ceftazidim. Povećana zastupljenost efluks pumpi povezana je sa mutacijom regulatornog gena *mexZ* koji kontroliše ekspresiju *mexXY* operona (Llanes et al., 2004). Međutim, u istraživanju iz Severne Amerike na čak 2000 izolata *P. aeruginosa* pokazano je da je stopa senzitivnosti na ceftazidim (78,8%) i cefepim (80,9%) bila slična (Ramphal et al., 2000). Takođe, u ranijim studijama nešto niža rezistencija na ceftazidim je bila prijavljena u Italiji (13,4%) i Francuskoj (6,2%) (Bonfiglio et al., 1998; De Champs et al., 2002). Zanimljiva studija Dubois et al. (2001) u trajanju od tri godine ukazala je na visoko otporne izolate *P. aeruginosa* serotipa P12, poreklom iz plućnih infekcija, za koje je kao kombinovana terapija korišćena kombinacija ceftazidima i amikacina, ali bez uspeha. Utvrđeno da su izolati proizvodili velike količine cefalosporinaze i dodatni enzim penicilazu PSE-1, kao i da je na spoljašnjoj membrani utvrđen gubitak OprD porina (Dubois et al., 2001).

Aminoglikozidni antibiotici deluju na ribosome i tako remete sintezu proteina. Mutacijom gena koji dovodi do promena ciljnog mesta delovanja antibiotika postiže se visok stepen rezistencije na aminoglikozide. Aminoglikozidi često ne mogu postići dovoljnu koncentraciju u bakterijskoj ćeliji, što je karakteristično za bolesnike sa cističnom fibrozom, kao i pojačanog efluksa kao posledica hiperekspresije MexXY proteina i OprM porina (MacLeod et al., 2000). Najčešće se rezistencija na aminoglikozide razvija zbog aminoglikozid fosforiltransferaze (APM), adeniltransferaze (AAD) i acetiltransferaze (AAC) (Saredlić & Bedenić, 2009). AAC(6')-II dovodi do rezistencije na gentamicin, netilmicin i tobramicin, AAC(3)-I samo na gentamicin, dok je AAC(6')-1 na tobramicin, netilmicin i amikacin (Saredlić & Bedenić, 2009). Rezistencija na aminoglikozidne antibiotike u svetu je različita. Tako je zabeležena rezistencija u Evropi na amikacin iznosila 5,1%, gentamicina 18,35 i tobramicina 17,8 (Schmitz et al., 1999), u Severnoj Americi rezistencija na amikacin je bila oko 6,7%, gentamicina 13,3% i tobramicina 8,8% (Mathai et al., 2001), dok je taj procenat bio daleko viši u Latinskoj Americi sa zabeleženom rezistencijom na amikacin od 30,5%, odnosno na tobramicin od čak 35,8% (Gales et al., 2001).

Antibiotsku rezistenciju na fluorohinolone *P. aeruginosa* najčešće razvijaju preko efluks pumpi, a takođe i mutacijom gena za ciljna mesta enzima, DNK žiraze/topoizomeraze II ili topoizomeraze IV), čime dolazi do promene aminokiselinskog sastava enzima i smanjenog afiniteta prema fluorohinolonima (Hooper, 2001). Opisano je više vrsta efluks pumpi (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, MexJK-OprM, MexHI-OprM i MekVW-OprM) (Li et al., 2003) i svaka od njih ima afinitet prema određenoj grupi antibiotika, ali istovremeno sve imaju afinitet prema fluorohinolonima (Masuda et al., 2000). Rezultati studije u SAD-u pokazuju da kod 50% kliničkih izolata *P. aeruginosa* postoji izražen efekat efluks pumpi, dok je kod 32% izolata zabeležena kombinacija efluks pumpi i mutacija (Kriengkauykiat et al., 2005). U velikoj studiji u SAD-u koja je obuhvatila 45 država u periodu od 1993 do 2002 godine, praćena je osetljivost na različite antibiotike na veliki broj izolata *P. aeruginosa* (Obritsch et al., 2004). Većina izolata bila je bolničkog porekla i dominirali su izolati iz respiratornog sistema. Najveći porast rezistencije zabeležen je prema ciprofloksacinu za čak 17%, a zatim i na imipenemu (za 8%), tobramicinu (za 7%) i aztreonamu (za 6%) (Obritsch et al., 2004). Povećanje rezistencije direktno je povezano sa lošom empirijskom terapijom, odugovlačenjem terapije i produženim boravkom u bolnici (Ibrahim et al., 2000). U sličnom istraživanju našem, zabeležena je povišena

rezistencija na ofloksacin i ciprocinol (40 i 36%, respektivno) kod ambulantnih izolata, dok je kod bolničkih izolata rezistencija na ofloksacin i ciprofloksacin bila identična 42% (Stanković Nedeljković, 2015).

4.5.2 MINIMALNA INHIBITORNA KONCENTRACIJA

Utvrdjivanje minimalne inhibitorne aktivnosti piperacilin/tazobaktama, ciprofloksacina i amikacina na izolatima iz prve faze istraživanja prikazano je u Tabeli 10. Vrednosti MIC-a za piperacilin/tazobaktam je bila slična za bolničke i ambulantne isolate, a za najveći broj izolata MIC vrednosti su se kretale između 4 µg/mL i 16 µg/mL. U slučaju ciprofloksacina MIC vrednosti za najveći broj bolničkih izolata su se kretale između 0,19 i 0,25 µg/mL, dok su se vrednosti za amikacin razlikovale kod bolničkih i ambulantnih izolata. Najveći broj bolničkih izolata (40,9%) imalo je MIC vrednost od 6 µg/mL, a čak 81,8% bolničkih izolata pokazali su vrednost MIC između 4 i 8 µg/mL. Za većinu ambulantnih izolata utvrđene su MIC vrednosti od 3, 4 i 8 µg/mL.

Tabela 10. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za piperacilin/tazobaktam, ciprofloksacin i amikacin prema kliničkim izolatima iz prve faze istraživanja (n - broj izolata).

| MIC koncentracije (µg/mL) | Bolnički izolati n (%) | Ambulantni izolati n (%) |
|-------------------------------|------------------------|--------------------------|
| <i>Piperacilin/tazobaktam</i> | | |
| 64 | - | 1 (7,14) |
| 32 | 1 (3,57) | 1 (7,14) |
| 24 | 2 (7,14) | 1 (7,14) |
| 16 | 2 (7,14) | 4 (28,57) |
| 12 | 8 (28,57) | 2 (14,28) |
| 10 | - | 1 (7,14) |
| 8 | 3 (10,71) | 1 (7,14) |
| 4 | 7 (25) | 1 (7,14) |
| 3 | 3 (10,71) | 1 (7,14) |
| 2 | 2 (7,14) | 1 (7,14) |
| <i>Ciprofloksacin</i> | | |
| 0,75 | - | - |
| 0,50 | - | 1 (7,14) |
| 0,38 | 2 (9,09) | - |
| 0,25 | 5 (22,72) | 3 (28,57) |
| 0,125 | 6 (27,27) | 1 (12,5) |
| 0,19 | 7 (31,81) | 1 (12,5) |
| 0,094 | 1 (4,54) | - |
| 0,032 | - | - |
| 0,018 | - | - |
| 0,016 | 1 (4,54) | - |
| <i>Amikacin</i> | | |
| 16 | 2 (9,09) | 1 (8,33) |
| 12 | 1 (4,54) | - |
| 8 | 5 (22,72) | 3 (25) |
| 6 | 9 (40,9) | 1 (8,33) |
| 4 | 4 (18,18) | 4 (33,33) |
| 3 | 1 (4,54) | 3 (25) |

U drugoj fazi istraživanja određivane su MIC vrednosti za ceftazidim, cefepim i meropenem (Tabela 11).

Tabela 11. Minimalna inhibitorna koncentracija (izražena u $\mu\text{g/mL}$) kliničkih *Pseudomonas* spp. izolata i njihov potencijal za proizvodnju β -laktamaza

| Šifra izolata | Bolnički izolati | | | | | Ambulantni izolati | | | | | Prod. enzima |
|---------------|------------------|-----|------|-----|--------------|--------------------|-----------|-----|------|-----|--------------|
| | Poreklo | Mer | Ceft | Cef | Prod. enzima | Šifra izolata | Poreklo | Mer | Ceft | Cef | |
| 5660 | Grlo | <1 | 4 | 8 | - | 2609 | Uvo | <1 | <2 | <2 | - |
| 5661 | Grlo | <1 | <2 | <2 | - | 4278 | Uvo | <1 | <2 | <2 | - |
| 1183 | Urin | >16 | 16 | 4 | - | 5518 | Uvo | >16 | 16 | 32 | MBL |
| 2638 | Urin | >16 | >32 | >32 | CRP | 7546 | Uvo | <1 | <2 | <2 | - |
| 2844 | Urin | <1 | <2 | 16 | - | 294 | Sputum | <1 | <2 | <2 | - |
| 3853 | Urin | 4 | 16 | 4 | - | 2124 | Sputum | 2 | >32 | >32 | - |
| 611 | Rana | <1 | <2 | <2 | - | 2941 | Sputum | <1 | <2 | <2 | - |
| 821 | Rana | >16 | 4 | 2 | - | 2966 | Sputum | <1 | 2 | 4 | - |
| 971 | Rana | <1 | 32 | 16 | - | 3496 | Sputum | <1 | >32 | >32 | - |
| 1087 | Rana | >16 | >32 | >32 | CRP | 3919 | Sputum | <1 | 4 | 4 | - |
| 1416 | Rana | <1 | 4 | 4 | - | 8142 | Sputum | <1 | 4 | 4 | - |
| 2064 | Rana | <1 | 16 | <2 | - | 9921 | Sputum | 2 | 16 | 16 | - |
| 2073 | Rana | >16 | >32 | >32 | CRP | 11838 | Sputum | <1 | <2 | <2 | - |
| 2581 | Rana | <1 | 16 | 8 | MBL | 1863 | Grlo | <1 | <2 | <2 | - |
| 2645 | Rana | >16 | >32 | >32 | CRP | 2005 | Grlo | <1 | 2 | 2 | - |
| 2900 | Rana | >16 | >32 | >32 | CRP | 2047 | Grlo | <1 | <2 | <2 | - |
| 3122 | Rana | <1 | 8 | 8 | - | 3238 | Grlo | <1 | 4 | 4 | - |
| 3322 | Rana | 16 | 2 | 2 | MBL | 3477 | Grlo | <1 | 2 | 2 | - |
| 3451 | Rana | <1 | 16 | 8 | - | 3540 | Grlo | <1 | 4 | 2 | - |
| 3563 | Rana | <1 | 4 | 4 | - | 3864 | Grlo | <1 | 2 | 2 | - |
| 3595 | Rana | <1 | 4 | 4 | - | 4087 | Grlo | <1 | 4 | 4 | - |
| 3658 | Rana | <1 | 4 | 2 | - | 4646 | Grlo | <1 | 2 | 2 | - |
| 3714 | Rana | >16 | 32 | >32 | MBL | 9642 | Grlo | <1 | <2 | <2 | - |
| 3883 | Rana | 2 | <2 | <2 | - | 10412 | Grlo | <1 | 4 | 4 | - |
| 4071 | Rana | <1 | 4 | 4 | - | 2383 | Jezik | <1 | 4 | 4 | - |
| 4082 | Rana | <1 | 4 | 4 | - | 2967 | Jezik | <1 | 16 | 32 | - |
| 4211 | Rana | <1 | 16 | 8 | - | 1408 | Urin | <1 | <2 | <2 | - |
| 4212 | Rana | <1 | 4 | 4 | - | 1790 | Urin | <1 | 4 | 4 | - |
| 4312 | Rana | <1 | 16 | 2 | - | 2285 | Urin | <1 | 2 | 2 | - |
| 4314 | Rana | <1 | 2 | 2 | - | 2588 | Urin | 16 | 2 | 4 | - |
| 4354 | Rana | <1 | 2 | 2 | - | 2597 | Urin | <1 | 4 | 16 | ESBL |
| 4473 | Rana | <1 | 8 | 8 | - | 2711 | Urin | <1 | 4 | 16 | MBL |
| 4541 | Rana | <1 | <2 | <2 | - | 2875 | Urin | <1 | 2 | 2 | - |
| 5348 | Rana | <1 | 2 | 4 | - | 3199 | Urin | <1 | 4 | 4 | - |
| 5774 | Rana | 4 | 4 | 16 | - | 3214 | Urin | 1 | >32 | 16 | - |
| 5797 | Rana | 2 | >32 | 2 | - | 3777 | Urin | >16 | 4 | 16 | CRP |
| 6412 | Rana | <1 | 2 | 2 | - | 4188 | Urin | >16 | 4 | 32 | CRP |
| 6982 | Rana | <1 | <2 | <2 | - | 4362 | Urin | <1 | 16 | 16 | - |
| 7543 | Rana | 1 | 16 | 16 | ESBL | 5586 | Urin | <1 | <2 | <2 | - |
| 7698 | Rana | <1 | 4 | 4 | - | 8599 | Urin | >16 | 32 | 8 | - |
| 7881 | Rana | <1 | 2 | 2 | - | 10019 | Urin | <1 | 8 | 16 | - |
| 8283 | Rana | <1 | <2 | <2 | - | 10600 | Urin | <1 | 16 | 4 | - |
| 8702 | Rana | <1 | <2 | <2 | - | 2671 | Vag. bris | <1 | 2 | 2 | - |
| 8913 | Rana | <1 | <2 | <2 | - | 2689 | Vag. bris | <1 | 16 | 8 | - |
| 10195 | Rana | <1 | >32 | >32 | - | | | | | | |
| 10336 | Rana | <1 | <2 | <2 | - | | | | | | |
| 10708 | Rana | <1 | 4 | 2 | - | | | | | | |
| 10800 | Rana | <1 | 32 | 8 | CRP | | | | | | |
| 11947 | Rana | <1 | 2 | 2 | - | | | | | | |
| 19677 | Rana | <1 | 4 | 4 | - | | | | | | |

Mer - meropenem (S \leq 2, I 4-8, R $>$ 8); Ceft - ceftazidim (S \leq 8; R $>$ 8); Cef - cefepim (S \leq 8; R $>$ 8); CRP - izolati koji proizvode karbapenemaze; MBL - metalo- β -laktamaze; ESBL - β -laktamaze proširenog spektra. Zadebljani brojevi predstavljaju otporne isolate prema MIC vrednostima.

Svi izolati koji su imali MIC vrednost niže ili jednake 8 µg/mL smatrani su senzitivnim na ceftazidim i cefepim, odnosno niže ili jednake 2 µg/mL smatrani su senzitivnim na meropenem. Najveći broj izolata pokazao je rezistenciju na ceftazidim (20,21%), nešto manji broj na cefepim (14,89%), dok je daleko najmanji broj izolata bio otporan prema meropenemu (8,51%). Za najveći broj izolata MIC za ceftazidim je iznosio 4 µg/mL, sa sličnom procentualnom zastupljenošću kod bolničkih (30%) i ambulantnih izolata (27,27%). MIC vrednosti za cefepim za većinu izolata (51,1%) su bile 4 i niže od 2 µg/mL. U slučaju testiranja meropenema, za najveći broj izolata (85,1%) nije utvrđena MIC vrednost jer je bila niža od 1 µg/mL.

Amikacin slično kao i piperacilin/tazobaktam se često koristi samostalno ili u kombinaciji sa drugim antibioticima u lečenju infekcija izazvanim *P. aeruginosa*. Dobijeni rezultati ukazali su da je amikacin efikasan antibiotik u lečenju infekcija izazvanim *P. aeruginosa*, čak i kod onih višestruko otpornih izolata. MIC vrednosti dobijene na izolatima iz prve faze istraživanja su bile niže nego u ranije objavljenoj studiji u Hrvatskoj. Na studiji koja je obuhvatala 169 izolata, čak 90% izolata je imalo MIC vrednost od 32 µg/mL (Sardelic et al., 2012). U studiji, koja je obuhvatila izolate otporne na imipenem, 70% izolata je bilo osetljivo na amikacin (Higgins et al., 2002). Pronoza et al. (2015) u radu sa izolatima *P. aeruginosa* poreklom od pacijenata sa CF-om ukazali su na povećanu rezistenciju prema ofloksacinu (50%), cefepimu (47%) i amikacinu (38%), dok je 19% i 12% izolata bilo otporno prema piperacilin/tazobaktamu i ceftazidimu, respektivno.

Ceftazidim i cefepim su često antibiotici izbora u lečenju pseudomonalnih infekcija. Njihova česta primena dovela je do povezanosti rezistencije i ograničena je upotreba ovih antibiotika u poslednjim decenijama (Goossens, 2003). Razlika u rezistenciji na ceftazidim i cefepim nije bila značajna u mnogim studijama. Najčešće se to pripisivalo unutrašnjoj rezistenciji koju *Pseudomonas* izolati prirodno poseduju, obično koristeći enzime za uništavanje leka. Drugi razlog je MexCD-OprJ efluks pumpa, koja je selektivna za 4. generaciju cefalosporina (Van Eldere, 2003). Istraživanje koje je sproveo Voutsinas et al. daleke 1989. godine ukazalo je da je rezistencija na ceftazidim i cefepim bila gotovo identična (oko 25 %). Takođe, studija na 7452 izolata *P. aeruginosa* prikupljenih iz 79 Američke bolnice u periodu od 2012. do 2015. godine, ukazala je na podjednaku osetljivost izolata prema ceftazidimu i cefepimu (84,3%) (Sader et al., 2017). Ista studija je otkrila da dodatkom avibaktama ceftazidimu povećava se senzitivnost izolata na čak 97%, čineći je alternativnim vidom lečenja višestruko otpornih sojeva *P. aeruginosa*. Rezistencija na ceftazidim je različita u zemljama Evrope. U Litvaniji je porasla na 13,9%, za razliku od 2003. godine kada je bila svega 5,6%. U Italiji i Španiji je taj procenat između 13 i 15%, zabrinjavajući u Belgiji (28,5%) i Grčkoj (25,5%), dok je najniža zabeležena u Velikoj Britaniji i SAD 1,2% (Adukauskiene et al., 2011). U studiji Higgins et al. (2002) rezistenciju prema ceftazidimu pokazalo je čak 40% izolata (MIC₉₀>64 µg/mL), dok je prema cefepimu taj procenat bio niži (Higgins, P. G., et al 2002). Pokazano je da je cefepim je povezan sa većim rizikom smrtnosti od ostalih β-laktama kod pacijenata lečenih od ozbiljne sepse. Hipoteze za ovaj neuspeh uključuju moguće skrivene neželjene efekte ili neodgovarajuće farmakokinetičke/farmakodinamičke parametre za bakterije sa MIC vrednostima na najvišim graničnim vrednostima od 8 µg/mL (Chapuis et al., 2010). Za meropenem je još 1998. godine pokazano da su MIC vrednosti za 2 do 8 puta niže od drugih karbapenema za najsnažnijom bakteriocidnom aktivnošću od svih testiranih karbapenema (Nishizawa et al., 1998). U studiji Lutz et al. (2012) ispitivano je delovanje antibiotika u *in vitro* uslovima za izolate koji su bili snažni produktori biofilma. Utvrđena je slična rezistencija kao i u našoj studiji prema ceftazidimu (14,1%) i meropenemu (9,4%), što opravdava tvrdnju da je meropenem antibiotik sa najboljim dejstvom. Takođe, pokazano je da subminimalna inhibitorna koncentracija (sub-MIC) ceftazidima imala uticaj na produkciju biofilma, tj., biofilm koji je bio tretiran 1/4 MIC za ceftazidim, pokazao je heterogeniju strukturu, a smanjila se i pokretljivost bakterija koja ima važnu ulogu u formiranju biofilma (Otani et al., 2018).

4.5.3 PRODUKCIJA ENZIMA

Samo su dva izolata - jedan poreklom iz rane bolničkog i drugi iz urinokulture ambulantnog pacijenta - proizvela β -laktamaze proširenog spektra (ESBL), što je verovatno i razlog rezistencije ovih izolata na piperacilin/tazobaktam, cefalosporine i aztreonam (Tabele 9 i 11). Osmam izolata - pet iz rana i tri iz urina proizvelo je karbapenemaze (Milojković et al., 2020). Svi ovi bolnički izolati iz rana bili su otporni na karbapeneme, dok su svi izolati pokazali otpornost na više klasa antibiotika istovremeno, osim 10800 (Tabele 9 i 11). U našem istraživanju iz 2012. godine ukupno pet izolata (dva bolničkog i tri ambulantnog porekla) proizvelo je metalo- β -laktamaze (MBL), a takođe isti broj izolata i iz druge faze istraživanja je imalo sposobnost produkcije MBL (tri bolnička izolata poreklom iz rana i dva ambulantna izolata iz uzoraka uva i urina) (Tabela 11) (Milojković et al., 2020). Dva izolata poreklom iz rana bila su rezistentna na kombinaciju piperacilin/tazobaktam, tri izolata je bilo otporno na cefepim i meropenem, dok su svi izolati bili osetljivi na doripenem (Tabele 9 i 11).

Produkcija ESBL se razlikuje u pojedinim delovima sveta. U Zapadnoj Evropi produkcija ESBL ne prelazi 1%, dok je u Kini i u drugim delovima sveta ona mnogo zastupljenija. Rezistencija na cefalosporine se najčešće povezuje sa produkcijom ESBL-a. ESBL izolati često su nosioci gena rezistencije i na druge antibiotike (Stanković Nedeljković, 2015). Međutim, korišćenje karbapenema kao jedinog vida antibiotske terapije prema ESBL izolatima je u porastu, što može dovesti i do porasta rezistencije na karbapeneme. U studiji rađenoj u Poljskoj prikupljeno je 900 izolata *P. aeruginosa* iz 4 Varšavske bolnice od kojih je 720 bilo otporno na ceftazidim ili cefepim. Produkcija ESBL otkrivena je kod 110 odnosno kod 15% izolata, od kojih je čak 79 bilo otporno na cefepim, ceftazidim i aztreonam. Kod tih izolata otkriveno je 5 grupa gena koji kodiraju ESBL enzime (VEB, GES, OXA-2, OXA-10 i TEM) (Laudy et al., 2017). Istraživanje u Turskoj i Nigeriji pokazalo je nešto niži procenat ESBL producenata (11%) i većina njih su pokazala otpornost prema ceftazidimu (Vahabogluet al., 1997; Ejikeugwu et al., 2015). Takođe, veliki procenat produkcije ESBL zabeležen je u Kini, gde je dokazano da je za visok procenat ovih izolata odgovoran horizontalni genski transfer (Jiang et al., 2006). Slično istraživanje u Kini je kasnije potvrdilo povećanu incidencu ESBL izolata (91,25%) koji su pokazali otpornost na cefalosporine i aztreonam, kao i senzitivnost na imipenem (Chen et al., 2015).

Karbapenemi kao antibiotici koji su otporni na većinu β -laktamaza, su često jedino rešenje u terapiji pseudomonalnih infekcija. Međutim, određene β -laktamaze (karbapenemaze) mogu vršiti hidrolizu karbapenema. Oni vrše hidrolizu peptidoglikana u bakterijskom zidu u koraku transpeptidizacije. Jedna od prvih otkrivenih karbapenemaza bila je IMP u Japanu (Watanabe et al., 1991). Kasnije je u Italiji otkrivena IMP-1 kod izolata *Acinetobacter baumannii*, rezistentnih na imipenem i meropenem (Cornaglia et al., 1999). Karbapenemaza VIM-1 prvi put je otkrivena kod *P. aeruginosa* izolata u Đenovi 1994. godine (Giani et al., 2012), a nedugo zatim i enzim VIM-2 u Marseju 1996. godine (Poirel et al., 2000), koji se vrlo brzo proširio u mediteranskim zemljama Evrope, kao i u Severnoj Africi pre svega u Tunisu i Alžiru (Hammami et al., 2011; Touati et al., 2013). Visok procenat izolata koji proizvode karbapenemaze detektovan je u Belgiji. U istraživanju koje je uključivalo 221 izolat *P. aeruginosa*, od kojih su izolati bili rezistentni na bar jedan karbapenem (imipenem ili meropenem), ceftazidim ili cefepim i/ili jedan aminoglikozidni antibiotik (amikacin, tobramicin ili gentamicin), utvrđeno je da je kod 25% izolata zabeležena produkcija karbapenemazesa dominantnim OXA-48 tipom (Huang et al., 2014). U univerzitetskoj bolnici u Solunu rađena je studija na 1276 izolata *P. aeruginosa*, od kojih je 211 izolata (16,5%) proizvelo karbapenemaze tipa VIM-1. Izolati rezistentni na karbapeneme pripadali su serotipu P12 i najveći broj (81,2%) je bilo otporno na imipenem i meropenem (Tsakris et al., 2000). Otkrivanje karbapenemaza je od velikog značaja zbog pravilnog sprovođenja terapije i kontrole infekcija. Iako su relativno rano otkrivene, karbapenemaze predstavljaju veliki problem u svetu. Geni koji kodiraju karbapenemaze najčešće se nalaze na prenosivim genetičkim elementima koji su povezani sa

drugim genima rezistencije na antibiotike, što dovodi do nekontrolisanog širenja rezistencije. U ovakvoj situaciji često dolazi do porasta upotrebe kolistina, što za posledicu ima povećanje rezistencije na pomenuti (Biswas et al., 2012).

U zemljama balkanskog regiona prijavljena je mala prevalencija izolata *P. aeruginosa* koji proizvode MBL, ali ovi sojevi su pripadali epidemijskim klonovima raširenim širom mediteranske Evrope (Sardelic et al., 2012). U Domu zdravlja Aleksinac 2011. godine prvi put su otkriveni izolati koji proizvode MBL. Međutim, kasnije je pokazano da je u Srbiji procenat MBL proizvodećih izolata veoma visok (36,5%) i potvrđeno je prisustvo New Delhi MBL 1 (NDM-1) enzima po prvi put (Jovčić et al., 2011), za razliku od Hrvatske gde je taj procenat bio daleko niži (3,6%) (Bošnjak et al., 2010). Visok procenat *P. aeruginosa* MBL proizvedenata (45%) detektovan je i u Kanadi, od kojih je kod 43% dokazano prisustvo *blaVIM* gena i svega 2% *blaIMP* gena (Pitout et al., 2005). Nešto nižu MBL prevalenciju je potvrdila grupa naučnika iz Indije na *P. aeruginosa* izolatima (20,8%) iz različitog bolničkog materijala, gde je ustanovljena značajna rezistencija na karbapeneme (60 izolata od 240 ukupno testiranih) (Varaiya et al., 2008). Pojava MBL izolata u bolnicama i njihovo brzo širenje, predstavlja ozbiljan problem budućnosti u sprovođenju terapije. Identifikacija izolata koji proizvode MBL i izveštavanje o produkciji MBL svakako će pomoći u budućoj kontroli pseudomonalnih infekcija i sprečavanju širenja rezistencije.

4.5.4 VIŠESTRUKO OTPORNI IZOLATI (MDR)

Tabela 12 pokazuje da je 29 (18 bolničkih i 11 ambulantnih) od naših 94 izolata bilo rezistentno na do tri ili više klasa antibiotika (Milojković et al., 2020). Četrnaest potiče iz rana (48,3%), a 12 izolata je bilo iz urina (41,4%), dok je samo nekoliko bilo poreklom iz sputuma i jezika. Dvadeset i četiri MDR izolata (82,8%) proizveli su istovremeno pioverdin i piocijanin (nisu primećeni drugi pigmenti), svi su bili netipabilni, dok su serotipovi P6 i P11 bili podjednako raspoređeni među svim MDR izolatima. Devet MDR izolata - uglavnom iz rana bolničkih izolata - bili su umereni proizvođači biofilma, dok je čak 12 njih pokazalo slabo produkciju biofilma. Samo je jedan izolat poreklom iz urina bolničkog pacijenta stvorio jak biofilm. Čak 13 MDR izolata (44,8%) proizvelo je enzime koji metaboliziraju antibiotike, dok su samo dva bila u grupi izolata otpornih na do dve klase antibiotika (Tabele 11 i 12). Među njima je samo pet (35,7%) imalo serotip P6, oba pigmenta uz umerenu ili slabu produkciju biofilma. Šest izolata iz iste grupe proizvodilo je samo pioverdin i slab biofilm ili ga uopšte nije proizveo. Suprotno tome, većina izolata otpornih na jednu klasu antibiotika je bila netipabilna (šest izolata, 42,9%) i imala je serotip P11 (četiri izolata, 28,6%). Većina su bili umereni ili jaki proizvođači biofilma i pigmenta (Tabela 12). Trideset sedam izolata (39,4%) bilo je potpuno osetljivo na sve ispitivane klase antibiotika. P1 i P6 bili su najčešći monovalentni serotipovi (27,7% i 24,3%, respektivno), sa slabom produkcijom biofilma i/ili bez nje, dok je proizvodnja oba pigmenta ponovo bila dominantna.

Tabela 12. Višestruko otporni ambulantni (A) i bolnički (B) *Pseudomonas* spp. izolati i njihov potencijal u produkciji pigmenata (F – Pioverdin; P – Piocijanin), serotipova i biofilma

| Šifra izolata | Poreklo | Izvor izolacije | Pigment | Serotip | Produk. biofilma | Šifra izolata | Poreklo | Izvor izolacije | Pigment | Serotip | Produk. biofilma |
|---------------|---------|-----------------|---------|---------|------------------|---------------|-----------|-----------------|---------|---------|------------------|
| 2711 | Urin | A | F, P | P1 | + | 2609 | Uvo | A | F | P11 | ++ |
| 2597 | Urin | A | F | P6 | + | 4362 | Uvo | A | F, P | P9 | ++ |
| 3777 | Urin | A | F, P | P6 | + | 1790 | Uvo | A | F, P | P11 | + |
| 2124 | Sputum | A | F, P | P6 | - | 3496 | Sputum | A | F, P | P6 | +++ |
| 4188 | Urin | A | F, P | NT | ++ | 8142 | Sputum | A | F, P | NT | +++ |
| 7543 | Rana | B | F, P | NT | ++ | 2689 | Vag. bris | A | F | NT | ++ |
| 2645 | Rana | B | F | P5 | ++ | 4211 | Rana | B | F, P | NT | ++ |
| 2900 | Rana | B | F, P | NT | ++ | 7881 | Rana | B | F, P | P11 | ++ |
| 3451 | Rana | B | P | P11 | ++ | 971 | Rana | B | F, P | NT | +++ |
| 3714 | Rana | B | F, P | NT | + | 821 | Rana | B | P | P5 | + |
| 3214 | Urin | A | F, P | NT | - | 294 | Sputum | A | F, P | NT | ++ |
| 8599 | Urin | A | F, P | P11 | + | 7698 | Rana | B | F, P | P9 | + |
| 3322 | Rana | B | F | P11 | + | 1416 | Rana | B | F | NT | ++ |
| 2073 | Rana | B | F, P | P6 | + | 10708 | Rana | B | F, P | P11 | + |
| 1087 | Rana | B | F, P | P1 | - | 3864 | Grlo | A | F, P | P11 | + |
| 2581 | Rana | B | F, P | NT | - | 2047 | Grlo | A | F, P | P1 | ++ |
| 1183 | Urin | B | F, P | NT | + | 3238 | Grlo | A | F, P | P6 | - |
| 2638 | Urin | B | F, P | NT | + | 11947 | Rana | B | F, P | P1 | + |
| 2588 | Urin | A | F, P | P11 | - | 6412 | Rana | B | F, P | P9 | ++ |
| 10019 | Urin | A | F, P | NT | ++ | 2966 | Sputum | A | F, P | P6 | + |
| 2967 | Jezik | A | F, P | P6 | ++ | 3540 | Grlo | A | F, P | NT | ++ |
| 9921 | Sputum | A | F, P | P11 | + | 2285 | Uvo | A | P | P1 | + |
| 5797 | Rana | B | F, P | NT | - | 2671 | Vag. bris | A | F, P | NT | - |
| 4312 | Rana | B | F, P | NT | ++ | 2941 | Sputum | A | F, P | P6 | - |
| 5348 | Rana | B | F, P | NT | ++ | 3477 | Grlo | A | F, P | P10 | + |
| 3658 | Rana | B | F, P | P11 | - | 3919 | Sputum | A | F, P | P1 | + |
| 2844 | Urin | B | F, P | NT | +++ | 4087 | Grlo | A | F, P | P1 | + |
| 3853 | Urin | B | F | P1 | + | 4278 | Uvo | A | P | NT | ++ |
| 5774 | Rana | B | F, P | NT | + | 4646 | Grlo | A | F, P | P6 | ++ |
| 5518 | Uvo | A | F, P | P6 | ++ | 5586 | Uvo | A | F, P | NT | + |
| 1408 | Urin | A | F, P | P9 | +++ | 7546 | Uvo | A | F, P | P6 | ++ |
| 11838 | Sputum | A | P | P9 | + | 9642 | Grlo | A | F, P | P1 | + |
| 2383 | Jezik | A | F | P10 | - | 10412 | Grlo | A | F | P6 | - |
| 8283 | Rana | B | F | P11 | + | 1863 | Grlo | A | F, P | NT | + |
| 10195 | Rana | B | F | P6 | + | 2005 | Grlo | A | F | P1 | + |
| 3563 | Rana | B | F, P | P6 | ++ | 3883 | Rana | B | F, P | NT | - |
| 3122 | Rana | B | F | NT | + | 4212 | Rana | B | F, P | NT | - |
| 10800 | Rana | B | F, P | P6 | + | 5661 | Grlo | B | F, P | P6 | ++ |
| 2064 | Rana | B | F, P | P1 | ++ | 611 | Rana | B | F, P | P9 | + |
| 3199 | Urin | A | F, P | P6 | + | 3595 | Rana | B | F, P | P6 | - |
| 10600 | Urin | A | F | P11 | - | 4071 | Rana | B | F, P | P1 | + |
| 2875 | Urin | A | F, P | P1 | + | 4082 | Rana | B | F | P11 | - |
| 8913 | Rana | B | F | P9 | - | 4314 | Rana | B | F, P | P1 | + |
| | | | | | | 4354 | Rana | B | F, P | P9 | ++ |
| | | | | | | 4541 | Rana | B | F, P | P9 | ++ |
| | | | | | | 5660 | Grlo | B | F, P | NT | ++ |
| | | | | | | 6982 | Rana | B | F, P | P1 | + |
| | | | | | | 8702 | Rana | B | F, P | P11 | + |
| | | | | | | 10336 | Rana | B | F, P | P6 | - |
| | | | | | | 19677 | Rana | B | F | P1 | - |
| | | | | | | 4473 | Rana | B | F, P | P5 | - |

■ Otporni izolati na četiri ili više antibiotskih klasa; ■ Otporni izolati na tri antibiotske klase; ■ Otporni izolati na dve antibiotske klase; ■ Otporni izolati na jednu antibiotsku klasu; ■ Osetljivi izolati na sve testirane antibiotike. Uokvireni izolati su izabrani za molekularno genetičku karakterizaciju.

Bolničke infekcije predstavljaju veliki problem sa mogućim posledicama, kako medicinskim tako i ekonomskim. Upotreba antibiotika širokog spektra čak i kada je opravdana, predstavlja veliki rizik za nastanak rezistencija. Razlog povećane rezistencije u bolnicama je visoka potrošnja antibiotika, kao i mogućnost prenosa višestruko otpornih sojeva među pacijentima. Prema podacima o potrošnji antibiotika Srbija zauzima visoko mesto u Evropi, dok je visok stepen rezistencije sličan kao u zemljama Latinske Amerike. Procenjuje se da je 25-68% antibiotika propisano neadekvatno (Charani et al., 2010). Primeri neracionalne primene antibiotika su: propisivanje kada nisu indukovani, primena niskih ili previsokih doza u odnosu na dozu koja je indukovana, predugo ili prekratko trajanje terapije (Dryden et al., 2011). Postoje velike razlike u rezistenciji u zavisnosti od geografskog područja, a razlog najverovatnije leži u različitoj antimikrobnoj terapiji i kontroli infekcija. Procenat MDR izolata u Indiji je bio 36,2%, u Aziji rezistencija na aminoglikozide dostiže više od 90%, dok je situacija u SAD bila nešto povoljnija sa 14,2% pomenutih izolata (Biswal et al., 2014; Nguyen et al., 2018).

Generalno, u našoj studiji nije primećena direktna korelacija između osetljivosti na antibiotike i fenotipskih karakteristika povezanih sa virulencijom, posebno sa distribucijom serotipova. U ranije opisanim studijama, P6 i P11 su bile najzastupljenije serogrupe u svim vrstama infekcija izazvanim *P. aeruginosa* (Tielen et al., 2011), dok su izolati P1 serotipa pokazali osetljivost na većinu testiranih antibiotika (Bubonja-Sonje et al., 2015), što je bilo u skladu sa našim rezultatima. Thrane et al. (2015) su pokazali da serotipovi nisu bili povezani sa rezistencijom na antibiotike, jer se olako menjaju putem rekombinacije i što lako može dovesti do zablude u njihovoj klasifikaciji. Sličan nedostatak korelacije između rezistencije na antibiotike i proizvodnje pigmenta utvrdili su Finlayson & Brown (2011). Međutim, određena korelacija između stvaranja biofilma i obrazaca rezistencije/osetljivosti na antibiotike se može naslutiti. Dokazi Corehtash et al. (2015) da otporni izolati proizvode umereni ili jaki biofilm izgleda da delimično potvrđuju naše sopstvene nalaze.

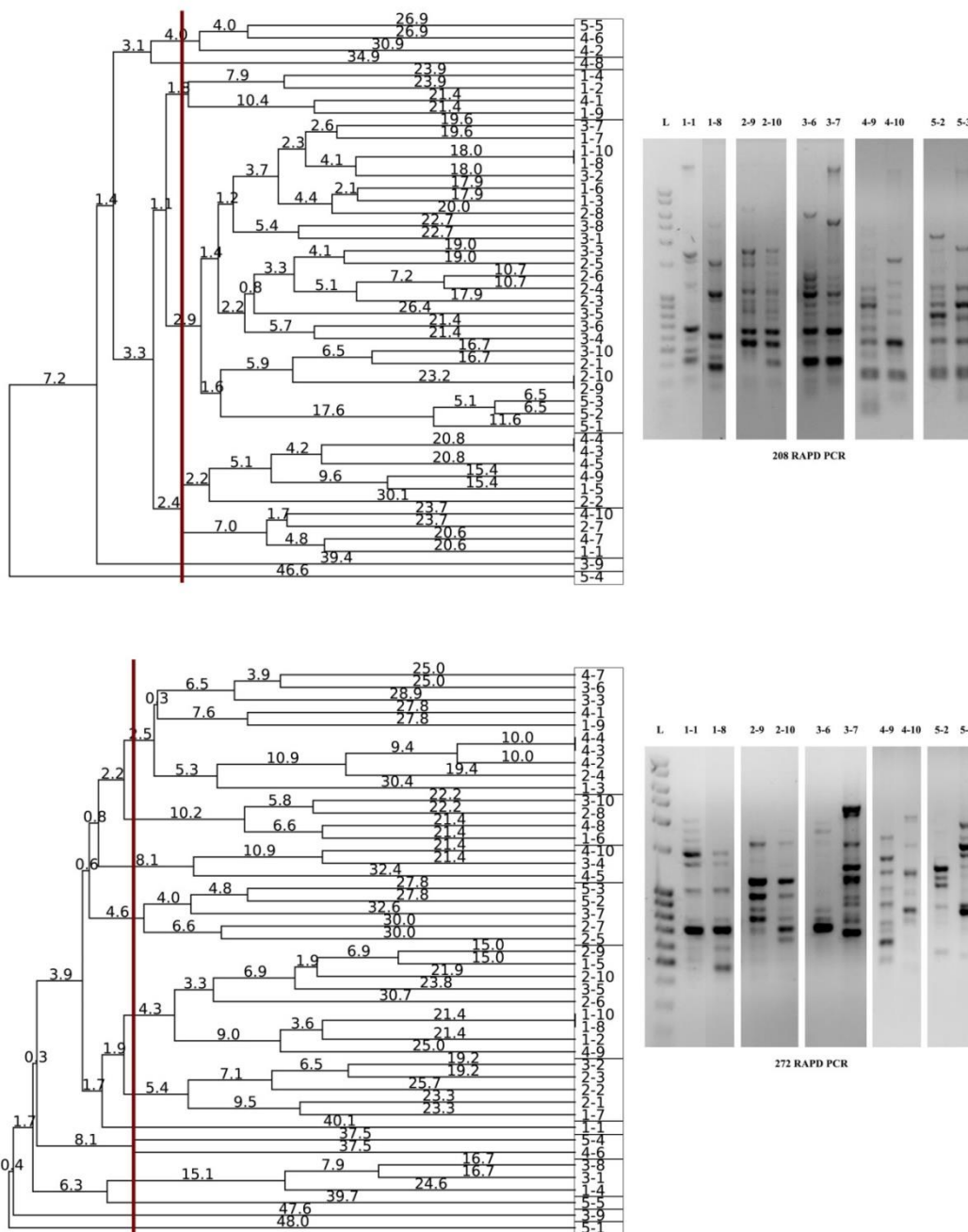
4.6 OTPORNOST/OSETLJIVOST NA ANTIBIOTIKE U ODNOSU NA MOLEKULARNO GENETIČKU KARAKTERIZACIJU

Za dalju rep-PCR i RAPD PCR molekularno-genetičku analizu odabrano je ukupno 45 izolata (Tabela 13).

Tabela 13. Odabrani izolati za dalju molekularno genetičku analizu

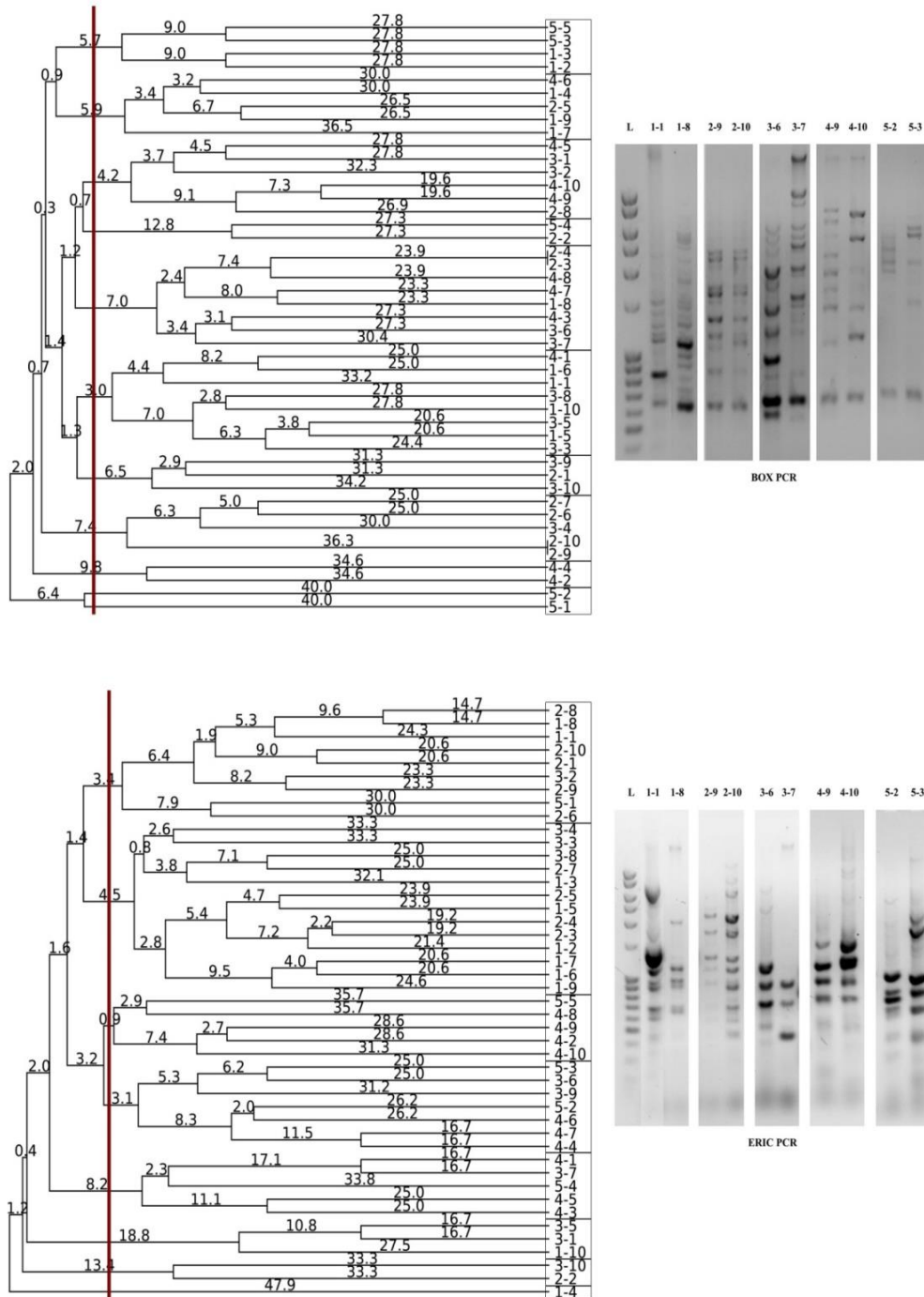
| Grupa I | | Grupa II | | Grupa III | | Grupa IV | | Grupa V | |
|---|-------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|-------------|----------------------------|-------------|
| Otporni na 4 klase antibiotika ili više | | Otporni na 3 klase antibiotika | | Otporni na 2 klase antibiotika | | Otporni na 1 klasu antibiotika | | Otporni na sve antibiotike | |
| Šifra izolata | Grupni broj | Šifra izolata | Grupni broj | Šifra izolata | Grupni broj | Šifra izolata | Grupni broj | Šifra izolata | Grupni broj |
| 2711 | 1-1 | 5797 | 2-1 | 8283 | 3-1 | 2609 | 4-1 | 3864 | 5-1 |
| 7543 | 1-2 | 4312 | 2-2 | 5518 | 3-2 | 821 | 4-2 | 2047 | 5-2 |
| 2597 | 1-3 | 5348 | 2-3 | 10195 | 3-3 | 4362 | 4-3 | 6412 | 5-3 |
| 3714 | 1-4 | 10019 | 2-4 | 3563 | 3-4 | 1790 | 4-4 | 3238 | 5-4 |
| 2645 | 1-5 | 3658 | 2-5 | 3122 | 3-5 | 7881 | 4-5 | 11947 | 5-5 |
| 3777 | 1-6 | 2967 | 2-6 | 10800 | 3-6 | 4211 | 4-6 | | |
| 2900 | 1-7 | 2844 | 2-7 | 2064 | 3-7 | 3496 | 4-7 | | |
| 3451 | 1-8 | 3853 | 2-8 | 11838 | 3-8 | 8142 | 4-8 | | |
| 2124 | 1-9 | 2588 | 2-9 | 1408 | 3-9 | 971 | 4-9 | | |
| 4188 | 1-10 | 9921 | 2-10 | 2383 | 3-10 | 2689 | 4-10 | | |

Selekcija izolata je izvršena na osnovu rezultata pigmentacije, serotipizacije, produkcije biofilma, proizvodnje enzima i otpornosti/osećljivosti na antibiotike [I grupa - otporni na četiri antibiotske klase ili više (grupa 1-1 do 1-10); II grupa - otporni na tri antibiotske klase (grupa 2-1 do 2-10); III grupa - otporni na dve antibiotske klase (grupa 3-1 do 3-10); IV grupa - otporni na jednu klasu antibiotika (grupa 4-1 do 4-10); i V grupa - osetljivi na sve testirane klase antibiotika (grupa 5-1 do 5-5)] za dalje PCR molekularno-genetičke analize da bi se potencijalno uvidela genetička klasterizacija različitih izolata u odnosu na fenotipske karakteristike. Za RAPD PCR metodu korišćeni su RAPD prajmeri 272 i 208, koji su stvarali 3 do 15 traka u paternu u rasponu veličine od 100 bp do 5000 bp. Na Slici 32 su prikazani dendrogrami dobijeni analizom RAPD profila ispitivanih *Pseudomonas* spp izolata.



Slika 32. Dendrogrami dobijeni UPGMA analizom odabranih izolata *Pseudomonas* spp. prajmerima 208 (gore) i 272 (dole), na osnovu RAPD profila (desno). Brojevima na dendrogramima su iskazane genetičke distance. Uokvireni brojevi predstavljaju grupisanje izolata prema dobijenim RAPD obrascima.

Dodatno, korišćeni prajmeri u rep-PCR analizi, BOX i ERIC, stvarali su od 5 do 17 traka u paternu u rasponu veličine od 100 bp do 5000 bp. BOX PCR je grupisao uspešno 10 različitih klastera, što ukazuje na dobru diskriminatornu snagu prajmera, dok je ERIC PCR grupisao ukupno osam klastera (Slika 33).

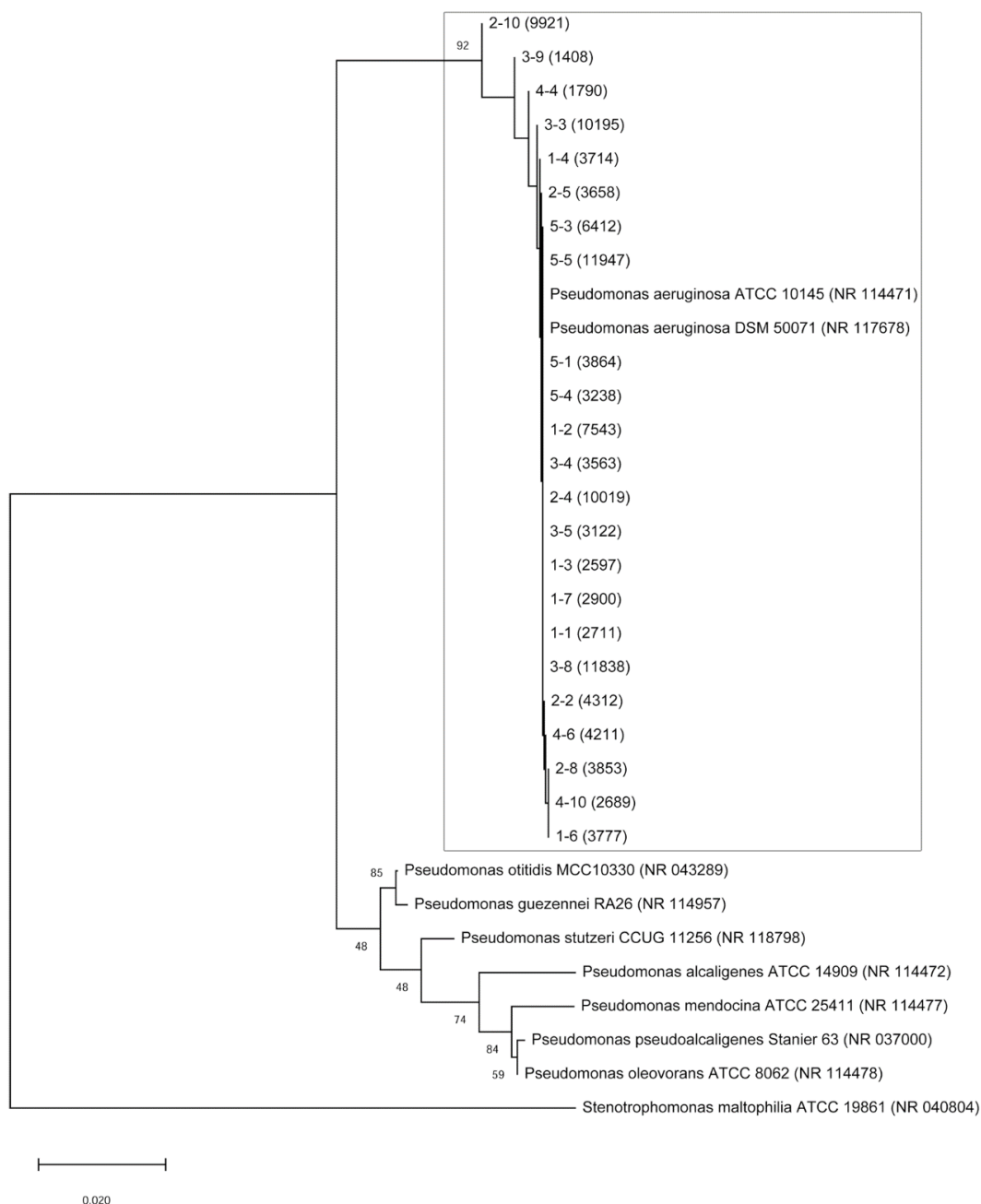


Slika 33. Dendrogrami dobijeni UPGMA analizom odabranih izolata *Pseudomonas* spp. prajmerima BOX (gore) i ERIC (dole), na osnovu rep-PCR profila (desno). Brojevima na dendrogramima su iskazane genetičke distance. Uokvireni brojevi predstavljaju grupisanje izolata prema dobijenim rep-PCR obrascima.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se uočiti da različiti prajmeri u okviru klastera sa najvećim brojem izolata dovode do sličnog grupisanja (Slika 32). Prajmer 272 izdvojio je 12 klastera, dok 208 izdvaja svega 8 klastera. Kod oba prajmera uočava se izuzetna heterogenost u okviru klastera. Poređenjem dendograma dobijenih RAPD PCR analizom, uočava se da najveći klaster koji se formira korišćenjem prajmera 208, izuzetno heterogen i obuhvata sve grupe izolata osim četvrte. Isti taj klaster je prajmerom 272 razdvojen u čak 7 različitih klastera. Kod oba RAPD prajmera, primetna je identičnost paterna različitih grupa antibiotske rezistencije. U pitanju je bila ujednačenost obrazaca prve, druge, četvrte i pete grupe. Slična ujednačenost primećena je za obrasce izolata treće, prve i druge grupe. Suprotno tome, uočena je različitost obrazaca (na osnovu genetske udaljenosti) između izolata iz četvrte i druge grupe, posebno korišćenjem prajmera 272. Genetički najudaljeniji i samim tim najrazličitiji paterni dobijeni su za izolate 5-1 (prajmerom 272) i 5-4 (prajmerom 208) iz najosetljivije antibiotske grupe.

Kao i kod prajmera korišćenih u RAPD analizi, klasteri dobijeni BOX PCR su izuzetno heterogeni, osim nekoliko homogenih klastera. Rezultati BOX PCR analize, slično kao i kod RAPD profilisanja, su ukazali na ujednačenost paterna određenih izolata iz različitih grupa antibiotske rezistencije, sa razlikom da su određeni klasteri heterogeniji. Najveći klaster korišćenjem prajmera 272, BOX PCR prajmer je uspešno razdvojio na 4 odvojena. Takođe utvrđena je i korelacija ujednačenosti paterna izolata istih grupa rezistencije. Uočene sličnosti rezultata BOX PCR sa RAPD profilisanjem korišćenjem 272 prajmera, odnosile su se na ujednačenost paterna prve najotpornije grupe sa paternima određenih izolata druge i četvrte grupe, kao i paterna izolata četvrte i pete grupe. Još jedna takva korelacija je primećena u neujednačenosti obrazaca između izolata iz četvrte i druge grupe, dok je izolat 5-1 bio genetički najudaljeniji kao i u BOX PCR analizi. Na osnovu dobijenih rezultata primenom ERIC PCR, uočava se homogenija klasterizacija izolata različitih antibiotskih grupa (uglavnom druge i treće grupe), i od ukupno testiranih izdvojeno je 8 klastera. Takođe, za razliku od ostalih rezultata, ERIC PCR je prikazao genetičku ujednačenost paterna određenih izolata najosetljivije grupe sa izolatima druge, treće i četvrte grupe, što ranije nije bio slučaj. S obzirom da je RAPD₂₇₂ PCR analiza pružila najbolju karakterizaciju izolata izdvajajući ih u 12 različitih klastera, odabrani su reprezentativni izolati iz svakog klastera za identifikaciju vrsta na nivou 16S rRNA gena i svi su identifikovani kao *P. aeruginosa* sojevi, što je samo potvrdilo njihovu genetičku heterogenost (Slika 34).

RAPD PCR analiza je brza, relativno jeftina i pouzdana metoda diskriminacije različitih sojeva roda *Pseudomonas*, pa je i zato odabrana kao korisno oruđe. Rezultati ranijih radova pokazuju da je RAPD PCR analiza korišćenjem 272 i 208 prajmera bila veoma uspešna u razdvajanju *Pseudomonas* izolata (Lanotte et al., 2004; Hafiane et al., 2011). Analiza izolata korišćenjem rep-PCR prajmera se pokazala daleko jednostavnijom za razliku od PFGE analize (Syrmis et al., 2004), a BOX i ERIC prajmeri su se pokazali veoma uspešnim (Dawson et al., 2002; Syrmis et al., 2004; Jones & Bell, 2006), pre svega zbog njihove niske cene, dobre reproduktivnosti i dovoljnog stepena diskriminacije kliničkih izolata *Pseudomonas* sp. Iako je studija Nagaveni et al. (2011), pokazala da se korišćenje ERIC PCR pokazalo izuzetno dobrim kvalitativno-diskriminatornim metodom, rezultati ovog i sličnih istraživanja (Wolska et al., 2011; Kareem & Hassan., 2014) međutim, dali su prednost BOX PCR, koji je uveliko potvrdio rezultate RAPD₂₇₂ analize.



Slika 34. Filogenetski odnosi kliničkih izolata *Pseudomonas aeruginosa* iz svih 12 RAPD₂₇₂ klastera na osnovu sekvence 16S rRNA gena. Filogenetsko stablo je konstruisano “neighbor-joining” metodom i rastojanja su izračunata pomoću Kimura dvoparametarskog modela. “Bootstrap” vrednosti su date za svaki čvor, sa 1000 replikata. *Stenotrophomonas maltophilia* je korišćen kao “outgroup”. Horizontalna traka označava genetičku udaljenost od 0,02.

Svakako, ova studija predstavlja prvu sveobuhvatnu studiju o genetičkim i fenotipskim karakteristikama *P. aeruginosa* izolata iz južne Srbije. Međutim, korelacija između genetičkih obrazaca i antibiotske otpornosti/osetljivosti odnosno drugih fenotipskih karakteristika (proizvodnja pigmenata, distribucija serotipova i stvaranje biofilma) ipak nije pronađena tokom ove studije. Ujednačenost genetičkih obrazaca *P. aeruginosa* izolata u različitim antibiotskim grupama sugerise da bi i druge molekularne metode, poput sekvenciranja celog genoma, trebalo da se koriste u budućim istraživanjima kako bi se eventualno pronašla određena korelacija sa ostalim fenotipskim karakteristikama.

5. ZAKLJUČCI

1. Ukupno 147 kliničkih (bolničko-ambulantnih) *Pseudomonas aeruginosa* izolata, različitog porekla (urino-kulture, sputum, brisevi rana, grla, jezika, uva i cervikalno-vaginalnog kanala) je bilo predmet ove disertacije u dve faze istraživanja. Najveći procenat izolata poticao je iz briseva rana 52,4% (bolnički) i 13,6% (ambulantni), kao i iz urino-kultura 10,9% (ambulantni). Polovina svih testiranih izolata je poticala od pacijenata starosne kategorije od 61 do 80 godina.
2. Iz obe faze istraživanja se može zaključiti da je najveći broj izolata pripadao polivalentnim PMA (33,94% i 39,36%) i PMF (24,52% i 15,95%) serogrupama. Najzastupljeniji serotipovi bili su P11 (22,64% i 16%), P6 (15,09% i 22%) i P1 (11,32% i 17%), dok je netipabilnih (atipičnih) bilo čak 28,3% i 29,78%. Takođe, monovalentni serotipi P3 i P4 su bili jedinstveni za prvu fazu odnosno P5 i P9 za drugu fazu istraživanja. Najveći procenat netipabilnih izolata je bio očekivan budući da su infekcije rana uglavnom hroničnog karaktera. Dodatno, izolati iz urina najčešće su pripadali serogrupama P1 i P11 sa podjednakom distribucijom.
3. Klinički izolati *P. aeruginosa* iz druge faze istraživanja su istovremeno produkovali u najvećem procentu (76,6%) oba pigmenta (većinom iz briseva rana i urino-kultura), dok je sinteza samo pioverdina bila zabeležena u većem broju slučajeva (18,1%) u odnosu na piocijanin (5,3%), pre svega kod bolničkih izolata. Takođe, može se zaključiti da su izolati sa najzastupljenijim serotipovima P1, P6 i P11 više produkovali pioverdin nego piocijanin.
4. Ukupno 77,66% ispitivanih izolata imalo je određenu sposobnost formiranja biofilma. Uočen je sličan odnos slabe (43,18% i 40%) do umerene produkcije biofilma (29,55% i 32%) kod ambulantnih i bolničkih izolata, respektivno. Većina tih izolata bilo je iz briseva rana i urina sa produkcijom oba pigmenta, dok su P1, P6 i P11 bile najčešće serogrupe kod izolata sa slabom, odnosno P6 i netipabilnim serotipom kod umerenih biofilm producenata. Svega 6,84% izolata imalo je izraženu sposobnost produkcije biofilma, većinom iz urino-kultura i sputuma ambulantnih pacijenata, sa produkcijom oba pigmenta i netipabilnim serotipom.
5. Antibiotička osetljivost *P. aeruginosa* izolata iz obe faze istraživanja, ukazala je da su svi izolati bili osetljivi na kolistin u svim testiranjima, kao i na povišeni stepen senzitivnosti na imipenem i piperacilin/tazobaktam, a naročito za meropenem kod koga, za najveći broj izolata druge faze (85,1%), nije bilo moguće utvrditi MIC vrednost (<1 µg/mL). Takođe, većina izolata iz druge faze je bilo osetljivo na aztreonam (97,87%) i doripenem (90,43%). Međutim, najveći broj izolata je bilo rezistentno na aminoglikozide [gentamicin (39,36%), netilmicin (35,10%) i tobramicin (37,23%), ali ne i na amikacin ukazujući na njegovu zadržanu efikasnost] i fluorohinolone [ofloksacin (38,30%), ciprofloksacin (34,04%) i levofloksacin (32,98%)]. Bolnički izolati su bili u većoj meri rezistentni na ofloksacin, a ambulantni na gentamicin, s'tim da je rezistencija bolničkih bila nešto veća prema imipenemu, doripenemu i amikacinu verovatno zbog njihove učestalije upotrebe na odeljenju hirurgije u Aleksincu. Sa druge strane, cefepim je bolje inhibirao bolničke, za razliku od ceftazidima kao opcionog sredstva za ambulantne izolate uz primetno povećanje rezistencije kod većeg broja izolata (20,21%).
6. Zabeležena je manja prevalencija izolata *P. aeruginosa* koji proizvode β-laktamaze proširenog spektra (dva izolata otporna na piperacilin/tazobaktam, cefalosporine i aztreonam), karbapenemaze (pet iz rana i tri iz urina uz višestruku otpornost na više klasa antibiotika istovremeno) i metalo-β-laktamaze (deset izolata iz obe faze istraživanja osetljivih na doripenem). Od svih ispitivanih izolata druge faze istraživanja čak 30,9%, uglavnom iz

rana i urina, bilo je višestruko rezistentno (MDR) na do tri ili više klasa antibiotika, a skoro polovina MDR izolata je proizvodilo enzime koji metaboliziraju antibiotike. U većinskom procentu (82,8%) su istovremeno proizvodili pioverdin i piocijanin, bili netipabilni i umereni do slabi proizvođači biofilma.

7. RAPD PCR analiza korišćenjem prajmera 272 pokazala se kao najbolja diskriminatorska "fingerprinting" tehnika izdvojivši najveći broj klastera sa ujednačenim obrascima. BOX PCR rezultati su prikazali sličnosti sa RAPD profilisanjem korišćenjem 272 prajmera, odnoseći se na ujednačenost paterna prve najotpornije grupe sa paternima određenih izolata druge i četvrte grupe. Svakako korišćenjem pomenutih prajmera uočila se izuzetna heterogenost izolata iste vrste. Iako nije pronađena konkretna korelacija između genetičkih obrazaca i fenotipskih karakteristika (rezistencija na antibiotike, pigmentacija, serotipizacija i stvaranje biofilma), naša otkrića zahtevaju uključivanje drugih molekularnih tehnika i većeg broja izolata kako bi se u budućnosti otkrile potencijalne veze između njih.

6. LITERATURA

- Adukauskienė, D., Vitkauskaitė, A., Skrodenienė, E., Dambrauskienė, A., & Vitkauskienė, A. (2011). Changes in antibiotic resistance level of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolates in the largest university hospital of Lithuania. *Medicina*, 47(5), 39.
- Akasaka, T., Tanaka, M., Yamaguchi, A., & Sato, K. (2001). Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(8), 2263-2268.
- Al-Dujaili, A. H., & Harris, D. M. (1974). Evaluation of commercially available antisera for serotyping of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Pathology*, 27(7), 569-571.
- Alhazmi, A. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*–pathogenesis and pathogenic mechanisms. *International Journal of Biology*, 7(2), 44.
- Aubert, D., Poirel, L., Chevalier, J., Leotard, S., Pages, J. M., & Nordmann, P., (2001). Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(6), 1615-1620.
- Baldwin, D. S. (2001). Depression and sexual dysfunction. *British Medical Bulletin*, 57(1), 81-99.
- Banerjee, S., Batabyal, K., Joardar, S. N., Isore, D. P., Dey, S., Samanta, I., Samanta, T. K., & Murmu, S. (2017). Detection and characterization of pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* from bovine subclinical mastitis in West Bengal, India. *Veterinary World*, 10(7), 738.
- Barrow, R. E., Spies, M., Barrow, L. N., & Herndon, D. N. (2004). Influence of demographics and inhalation injury on burn mortality in children. *Burns*, 30(1), 72-77.
- Belanger, M., Burrows, L. L., & Lam, J. S. (1999). Functional analysis of genes responsible for the synthesis of the B-band O-antigen of *Pseudomonas aeruginosa* serotype O6 lipopolysaccharide. *Microbiology* 145, 3505–3521.
- Bert, F., & Lambert-Zechovsky, N. (1997). Antibiotic resistance patterns in *Pseudomonas aeruginosa*: an 8-year surveillance study in a French hospital. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 9(2), 107-112.
- Bilić, B. (2015). Kolistin: stari lijek za liječenje novih multiplerezistentnih bakterija. *Infektološki Glasnik*, 35(4), 117-127.
- Bishop, M. B., Baltch, A. L., Hill, L. A., Smith, R. P., Lutz, F., & Pollack, M. (1987). The effect of *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin and toxin A on human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Medical Microbiology*, 24(4), 315-324.
- Biswal, I., Arora, B. S., & Dimple Kasana, N. (2014). Incidence of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients and environment of teaching institution. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 8(5), DC26.
- Biswas, S., Brunel, J. M., Dubus, J. C., Reynaud-Gaubert, M., & Rolain, J. M. (2012). Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10(8), 917-934.
- Blondeau, J. M., Laskowski, R., & Borsos, S. (1999). In-vitro activity of cefepime and seven other antimicrobial agents against 1518 non-fermentative Gram-negative bacilli collected from 48 Canadian health care facilities. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44(4), 545-548.
- Bonfiglio, G., Carciotto, V., Russo, G., Stefani, S., Schito, G. C., Debbia, E., & Nicoletti, G. (1998). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an Italian survey. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41(2), 307-310.
- Bonfiglio, G., Laksai, Y., Franchino, L., Amicosante, G., & Nicoletti, G. (1998). Mechanisms of beta-lactam resistance amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolated in an Italian survey. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42(6), 697-702.
- Borriello, G., Werner, E., Roe, F., Kim, A. M., Ehrlich, G. D., & Stewart, P. S. (2004). Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2659-2664.

- Bošnjak, Z., Bedenić, B., Mazzariol, A., Jarža-Davila, N., Šuto, S., & Kalenić, S. (2010). VIM-2 β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Zagreb, Croatia. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 42(3), 193-197.
- Bradford, P.A., (2001). Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 933-951.
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., & Staley, J. R. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume Two: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria.*
- Brown, M. R., Allison, D. G., & Gilbert, P. (1988). Resistance of bacterial biofilms to antibiotics a growth-rate related effect? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 22(6), 777-780.
- Bubonja-Sonje, M., Matovina, M., Skrobonja, I., Bedenic, B. & Abram, M., (2015). Mechanisms of carbapenem resistance in multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Croatian hospital. *Microbial Drug Resistance*, 21(3), 261-269.
- Bucior, I., Pielage, J. F., & Engel, J. N. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. *PLOS Pathogens*, 8(4), 1002616.
- Budzikiewicz, H. (1993). Secondary metabolites from fluorescent *Pseudomonads*. *FEMS Microbiology Letters*, 104(3-4), 209-228.
- Burrows, L. L., Charter, D. F., & Lam, J. S. (1996). Molecular characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5 (PAO1) B-band lipopolysaccharide gene cluster. *Molecular Microbiology*, 22(3), 481-495.
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969-976.
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A., (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6), 1211-1233.
- Chapuis, T. M., Giannoni, E., Majcherczyk, P. A., Chioléro, R., Schaller, M. D., Berger, M. M., Bolay, S., Décosterd, L. A., Bugnon, D., & Moreillon, P. (2010). Prospective monitoring of cefepime in intensive care unit adult patients. *Critical Care*, 14(2), R51.
- Charani, E., Cooke, J., & Holmes, A. (2010). Antibiotic stewardship programmes—what's missing?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(11), 2275-2277.
- Che, Y. O., Sanderson, K., Roddam, L. F., Kirov, S. M., & Reid, D. W. (2009). Iron-binding compounds impair *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, especially under anaerobic conditions. *Journal of Medical Microbiology*, 58(6), 765-773.
- Chen, Z., Niu, H., Chen, G., Li, M., Li, M., & Zhou, Y. (2015). Prevalence of ESBLs-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from different wards in a Chinese teaching hospital. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(10), 19400.
- Cho, J. C., & Tiedje, J. M. (2000). Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5448-5456.
- Chuang, Y. C., Chang, W. N., Lu, C. H., Wu, H. S., & Chang, H. W. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* central nervous system infections: analysis of clinical features of 16 adult patients. *Zhonghua yi xue za zhi= Chinese Medical Journal*, 62(5), 300-307.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.* Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- Coenye, T., & Nelis, H. J. (2010). *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 83(2), 89-105.
- Concha, N. O., Janson, C. A., Rowling, P., Pearson, S., Cheever, C. A., Clarke, B. P., Lewis, C., Galleni, M., Frère, J., Payne, D. J., Bateson, J. H., & Abdel-Meguid, S. S. (2000). Crystal structure of the IMP-1 metallo β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its complex with a mercaptocarboxylate inhibitor: binding determinants of a potent, broad-spectrum inhibitor. *Biochemistry*, 39(15), 4288-4298.

- Conrad, J. C., Gibiansky, M. L., Jin, F., Gordon, V. D., Motto, D. A., Mathewson, M. A., Stopka, W. G., Zelasko D. C., Shrout, J. D., & Wong, G. C. (2011). Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in *P. aeruginosa*. *Biophysical Journal*, *100*(7), 1608-1616.
- Cope, J. R., Konne, N. M., Jacobs, D. S., Dhaliwal, D. K., Rhee, M. K., Yin, J., & Steinemann, T. L. (2018). Corneal infections associated with sleeping in contact lenses—six cases, United States, 2016–2018. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, *67*(32), 877.
- Corehtash, Z.G., Ahmad Khorshidi, F.F., Akbari, H., & Aznavah, A.M. (2015). Biofilm formation and virulence factors among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Jundishapur Journal of Microbiology*, *8*(10), 22345.
- Cornaglia, G., Riccio, M. L., Mazzariol, A., Lauretti, L., Fontana, R., & Rossolini, G. M. (1999). Appearance of IMP-1 metallo- β -lactamase in Europe. *The Lancet*, *353*(9156), 899-900.
- Costerton, J. W., Geesey, G. G., & Cheng, K. J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, *238*(1), 86-95.
- Darwish, S.F. & Asfour, H.A., 2013. Investigation of biofilm forming ability in *Staphylococci* causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Dawson, S. L., Fry, J. C., & Dancer, B. N. (2002). A comparative evaluation of five typing techniques for determining the diversity of fluorescent pseudomonads. *Journal of Microbiological Methods*, *50*(1), 9-22.
- De Champs, C., Poirel, L., Bonnet, R., Sirot, D., Chanal, C., Sirot, J., & Nordmann, P. (2002). Prospective survey of β -lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a French hospital in 2000. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(9), 3031-3034.
- Dean, C. R., Franklund, C. V., Retief, J. D., Coyne, M. J., Hatano, K., Evans, D. J., Pier, G. B., & Goldberg, J. B. (1999). Characterization of the serogroup O11 O-antigen locus of *Pseudomonas aeruginosa* PA103. *Journal of Bacteriology*, *181*(14), 4275-4284.
- Denning, G. M., Railsback, M. A., Rasmussen, G. T., Cox, C. D., & Britigan, B. E. (1998a). *Pseudomonas* pyocyanine alters calcium signaling in human airway epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *274*(6), L893-L900.
- Denning, G. M., Wollenweber, L. A., Railsback, M. A., Cox, C. D., Stoll, L. L., & Britigan, B. E. (1998b). *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infection and Immunity*, *66*(12), 5777-5784.
- Dimkić, I., Živković, S., Berić, T., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Stanković, S., & Fira, D. (2013). Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biological Control*, *65*(3), 312-321.
- Drake, D., & Montie, T. C. (1988). Flagella, motility and invasive virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, *134*(1), 43-52.
- Dryden, M., Johnson, A. P., Ashiru-Oredope, D., & Sharland, M. (2011). Using antibiotics responsibly: right drug, right time, right dose, right duration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *66*(11), 2441-2443.
- Dubois, V., Arpin, C., Melon, M., Melon, B., Andre, C., Frigo, C., & Quentin, C. (2001). Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of β -lactam resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(6), 2072-2078.
- Eichenberger, E. M., & Thaden, J. T. (2019). Epidemiology and mechanisms of resistance of extensively drug resistant Gram-negative bacteria. *Antibiotics*, *8*(2), 37.
- Ejikegwu, C., Iroha, I., Orji, J., Ugwu, M., Okonkwo, E., Ikegbunam, M., Ugbo, E., Moses, I., & Nwakaeze, E. (2015). Antibigram of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates of nosocomial origin. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, *2*(4), 92-99.

- El Zowalaty, M. E., Al Thani, A. A., Webster, T. J., El Zowalaty, A. E., Schweizer, H. P., Nasrallah, G. K., Marei, H. E., & Ashour, H. M. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiology*, *10*(10), 1683-1706.
- El-Fouly, M.Z., Sharaf, A.M., Shahin, A.A.M., El-Bialy, H.A., & Omara, A.M.A. (2015). Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, *8*(1), 36-48.
- El-Roos, N. A. A., Mazid, E. M., Zakarz, E. M., & El Yayid, K. F. A., (2013). Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from milk. *Assiut Veterinary Medical Journal* *59*(139), 14-22.
- Emori, T. G., & Gaynes, R. P. (1993). An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*, *6*(4), 428-442.
- Ernst, R. K., Adams, K. N., Moskowitz, S. M., Kraig, G. M., Kawasaki, K., Stead, C. M., Trent, M. S., & Miller, S. I. (2006). The *Pseudomonas aeruginosa* lipid A deacylase: selection for expression and loss within the cystic fibrosis airway. *Journal of Bacteriology*, *188*(1), 191-201.
- Ernst, R. K., Eugene, C. Y., Guo, L., Lim, K. B., Burns, J. L., Hackett, M., & Miller, S. I. (1999). Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science*, *286*(5444), 1561-1565.
- Ernst, R. K., Hajjar, A. M., Tsai, J. H., Moskowitz, S. M., Wilson, C. B., & Miller, S. I. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* lipid A diversity and its recognition by Toll-like receptor 4. *Journal of Endotoxin Research*, *9*(6), 395-400.
- Estahbanati, H. K., Kashani, P. P., & Ghanaatpisheh, F. (2002). Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. *Burns*, *28*(4), 340-348.
- Falagas, M. E., & Kasiakou, S. K. (2006). Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Critical Care*, *10*(1), R27.
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H., & Prince, A. (1998). Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infection and Immunity*, *66*(1), 43-51.
- Finlayson, E. A., & Brown, P. D. (2011). Comparison of antibiotic resistance and virulence factors in pigmented and non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. *West Indian Medical Journal*, *60*(1), 24-32.
- Fonseca, A. P., Extremina, C., Fonseca, A. F., & Sousa, J. C. (2004). Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, *53*(9), 903-910.
- Fruci, M., & Poole, K. (2018). Aminoglycoside-inducible expression of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of the envelope stress-responsive AmgRS two-component system. *PLoS One*, *13*(10), 0205036.
- Fyfe, J. A., Harris, G., & Govan, J. R. (1984). Revised pyocin typing method for *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, *20*(1), 47-50.
- Gales, A. C., Jones, R. N., Turnidge, J., Rennie, R., & Ramphal, R. (2001). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clinical Infectious Diseases*, *32*(Supplement_2), S146-S155.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. (2005). *Pseudomonadales* Orla-Jensen 1921, 270 AL. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (323-442). Springer, Boston, MA.
- Gevers, D., Huys, G., & Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of Lactobacillus species. *FEMS Microbiology Letters*, *205*(1), 31-36.
- Giani, T., Marchese, A., Coppo, E., Kroumova, V., & Rossolini, G. M. (2012). VIM-1-producing *Pseudomonas mosselii* isolates in Italy, predating known VIM-producing index strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(4), 2216-2217.

- Gierhart, S., & Chukwuma, U. (2017). *Annual Surveillance Summary: Pseudomonas aeruginosa Infections in the Military Health System (MHS), 2015* (No. NMCPHC-EDC-TR-195-2017). *Naval and Marine Corps Public Health Center Portsmouth va Portsmouth United States.*
- Goossens, H. (2003). Susceptibility of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units: results from the European mystic study group. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(9), 980-983.
- Gurung, M., Moon, D. C., Tamang, M. D., Kim, J., Lee, Y. C., Seol, S. Y., Cho, D. T., & Lee, J. C. (2010). Emergence of 16S rRNA methylase gene *armA* and cocarriage of *bla*IMP-1 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 68(4), 468-470.
- Agarwal, G., Kapil, A., Kabra, S. K., Das, B. K., & Dwivedi, S. N. (2005). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from chronically infected children with cystic fibrosis in India. *BMC Microbiology*, 5(1), 43.
- Haley, C. L., Colmer-Hamood, J. A., & Hamood, A. N. (2012). Characterization of biofilm-like structures formed by *Pseudomonas aeruginosa* in a synthetic mucus medium. *BMC Microbiology*, 12(1), 181.
- Hammami, S., Boubaker, I. B. B., Ghozzi, R., Saidani, M., Amine, S., & Redjeb, S. B. (2011). Nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo- β -lactamase in a kidney transplantation unit. *Diagnostic Pathology*, 6(1), 106.
- Hancock, R. E. (1998). Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 27(Supplement_1), S93-S99.
- Hassani, H. H., Hasan, H. M., Al-Saadi, A., Ali, A. M., & Muhammad, M. H. (2012). A comparative study on cytotoxicity and apoptotic activity of pyocyanin produced by wild type and mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Experimental Biology*, 2, 1389-1394.
- Haynes, W. C. (1951). *Pseudomonas aeruginosa* its characterization and identification. *Microbiology*, 5(5), 939-950.
- Higgins, P. G., Fluit, A. C., Milatovic, D., Verhoef, J., & Schmitz, F. J. (2002). Antimicrobial susceptibility of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(2), 299-301.
- Hocquet, D., Nordmann, P., El Garch, F., Cabanne, L., & Plésiat, P. (2006). Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1347-1351.
- Hocquet, D., Petitjean, M., Rohmer, L., Valot, B., Kulasekara, H. D., Bedel, E., Bertrand, X., Plésiat, P., Köhler, T., Pantel, A., & Jacobs, M. A. (2016). Pyomelanin producing *Pseudomonas aeruginosa* selected during chronic infections have a large chromosomal deletion which confers resistance to pyocins. *Environmental Microbiology*, 18(10), 3482-3493.
- Hooper, D. C. (2001). Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 7(2), 337.
- Huang, T. D., Berhin, C., Bogaerts, P., & Glupczynski, Y. (2014). Comparative evaluation of two chromogenic tests for rapid detection of carbapenemase in *Enterobacteriaceae* and in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(8), 3060-3063.
- Ibrahim, E. H., Sherman, G., Ward, S., Fraser, V. J., & Kollef, M. H. (2000). The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest*, 118(1), 146-155.
- ICAR Epidemiology (1999). Surveillance report, data summary from January 1996 through December 1997: a report from the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. *American Journal of Infection Control*, 27(3), 279-84.

- Iglewski, B. H., Sadoff, J., Bjorn, M. J., & Maxwell, E. S. (1978). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S: an adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(7), 3211-3215.
- Issa, H. B., Phan, G., & Broutin, I. (2018). Functional mechanism of the efflux pumps transcription regulators from *Pseudomonas aeruginosa* based on 3D structures. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5, 57.
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 161-182.
- Jamasbi, R. J. (1999). Frequency and distribution of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes 03, 06, 011 in three northwestern Ohio hospitals as determined by ELISA using specific monoclonal antibodies. *Ohio Journal of Science*, 99(2), 10-15.
- Janakiev, T., Dimkić, I., Bojić, S., Fira, D., Stanković, S., & Berić, T. (2020). Bacterial communities of plum phyllosphere and characterization of indigenous antagonistic *Bacillus thuringiensis* R3/3 isolate. *Journal of Applied Microbiology*, 128(2), 528-543.
- Jayamohan, N. S., Manohar, S. H., & Kumudini, B. S. (2015). Genomic and outer membrane protein diversity fingerprints of siderophore producing fluorescent *Pseudomonas spp.* using RAPD, Rep-PCR and SDS-PAGE profiling. *Biologia*, 70(9), 1150-1158.
- Jesudason, M. V., Kandathil, A. J., & Balaji, V. (2005). Comparison of two methods to detect carbapenemase & metallo-beta-lactamase production in clinical isolates. *Indian Journal of Medical Research*, 121(6), 780.
- Jiang, X., Zhang, Z., Li, M., Zhou, D., Ruan, F., & Lu, Y. (2006). Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9), 2990-2995.
- Jones, A. M., & Bell, S. C., (2006). Cystic fibrosis infection with clonal strains of *Pseudomonas aeruginosa*: current knowledge and future management. *European Respiratory Monograph*, 35, 105-126.
- Jovcic, B., Vasiljevic, Z., Djukic, S., Topisirovic, L., & Kojic, M. (2011). Emergence of VIM-2 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a paediatric hospital in Serbia. *Journal of Medical Microbiology*, 60(6), 868-869.
- Karakašević, B., & Aleraj, D. (1967). *Priručnik Standardnih Metoda za Mikrobiološki Rutinski Rad*. Medicinska knjiga.
- Kareem, A. A., & Hassan, S. S. (2014). Determination the genotyping diversity between biofilm forming and collagenase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Journal of Natural Sciences Research*, 4(23), 178-185.
- Kerr, J. R., Taylor, G. W., Rutman, A., Høiby, N., Cole, P. J., & Wilson, R. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *Journal of Clinical Athology*, 52(5), 385-387.
- King, J. D., Kocincova, D., Westman, E. L., & Lam, J. S. (2009). Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immunity*, 15(5), 261-312.
- Kirketerp-Møller, K., Jensen, P. Ø., Fazli, M., Madsen, K. G., Pedersen, J., Moser, C., Tolker-Nielsen, T., Høiby, N., Givskov, M., & Bjarnsholt, T. (2008). Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(8), 2717-2722.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 48(6), 1511-1524.
- Knirel, Y. A., Bystrova, O. V., Kocharova, N. A., Zähringer, U., & Pier, G. B. (2006). Conserved and variable structural features in the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Endotoxin Research*, 12(6), 324-336.
- Kobayashi, M., Yoshida, T., Takeuchi, D., Jones, V. C., Shigematsu, K., Herndon, D. N., & Suzuki, F. (2008). Gr-1+ CD11b+ cells as an accelerator of sepsis stemming from *Pseudomonas aeruginosa* wound infection in thermally injured mice. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(6), 1354.

- Köhler, T., Epp, S. F., Curty, L. K., & Pechère, J. C. (1999). Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *181*(20), 6300-6305.
- Koomanachai, P., Tiengrim, S., Kiratisin, P., & Thamlikitkul, V. (2007). Efficacy and safety of colistin (colistimethate sodium) for therapy of infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in Siriraj Hospital, Bangkok, Thailand. *International Journal of Infectious Diseases*, *11*(5), 402-406.
- Kriengkauykiat, J., Porter, E., Lomovskaya, O., & Wong-Beringer, A. (2005). Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(2), 565-570.
- Lalošević, V., Jarak, M., Vidić, B., Pašić, Š., Mihajlović Ukropina, M., Jelesić, Z., Kulauzov, M., & Boboš, S. (2011). Mikrobiologija za studente veterinarske medicine. *Izdavač: Popoprivredni fakultet u Novom Sadu, Departman za Veterinarsku medicinu. Štampa: Mala knjiga Novi Sad.*
- Lam, J. S., Macdonald, L. A., Lam, M. Y., Duchesne, L. G., & Southam, G. G. (1987). Production and characterization of monoclonal antibodies against serotype strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, *55*(5), 1051-1057.
- Lam, J. S., Taylor, V. L., Islam, S. T., Hao, Y., & Kocíncová, D. (2011). Genetic and functional diversity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Frontiers in Microbiology*, *2*, 118.
- Lambert, P. A. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, *95*(Suppl 41), 22.
- Lamont, I. L., Beare, P. A., Ochsner, U., Vasil, A. I., & Vasil, M. L. (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(10), 7072-7077.
- Lanotte, P., Watt, S., Mereghetti, L., Dartiguelongue, N., Rastegar-Lari, A., Goudeau, A., & Quentin, R. (2004). Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. *Journal of Medical Microbiology*, *53*(1), 73-81.
- Latino, L., Caroff, M., & Pourcel, C. (2017). Fine structure analysis of lipopolysaccharides in bacteriophage-resistant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mutants. *Microbiology*, *163*(6), 848-855.
- Laudy, A. E., Róg, P., Smolińska-Król, K., Ćmiel, M., Słoczyńska, A., Patzer, J., Dzierżanowska, D., Wolinowska, R., Starościak, B., & Tyski, S. (2017). Prevalence of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Warsaw, Poland, detected by various phenotypic and genotypic methods. *PloS One*, *12*(6), e0180121.
- Lee, B., Haagenen, J. A., Ciofu, O., Andersen, J. B., Høiby, N., & Molin, S. (2005). Heterogeneity of biofilms formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(10), 5247-5255.
- Lee, K., Lim, J. B., Yum, J. H., Yong, D., Chong, Y., Kim, J. M., & Livermore, D. M. (2002). blaVIM-2 cassette-containing novel integrons in metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(4), 1053-1058.
- Leskovar, V., & Vraneš, J. (2009). Značenje nastanka mikrobnog biofilma u patogenezi i liječenju kroničnih infekcija. *Medicinski Glasnik*, *6*(2), 147-165.
- Levin, A. S., Barone, A. A., Penço, J., Santos, M. V., Marinho, I. S., Arruda, E. A. G., Manrique, E. I., & Costa, S. F. (1999). Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Infectious Diseases*, *28*(5), 1008-1011.
- Li, X.Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(2), 337-418.

- Li, Y., Mima, T., Komori, Y., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., & Tsuchiya, T. (2003). A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW–OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(4), 572-575.
- Lim, K. T., Yasin, R. M., Yeo, C. C., Puthuchery, S. D., Balan, G., Maning, N., Wahab, Z. A., Ismail, N., Tan, E. A., Mustaffa, A., & Thong, K. L. (2009). Genetic fingerprinting and antimicrobial susceptibility profiles of *Pseudomonas aeruginosa* hospital isolates in Malaysia. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, 42(3), 197-209.
- Lima, J. L. D. C., Alves, L. R., Paz, J. N. P. D., Rabelo, M. A., Maciel, M. A. V., & Morais, M. M. C. D. (2017). Analysis of biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with ventilator-associated pneumonia. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 29(3), 310-316.
- Liu, P. V., & Wang, S. (1990). Three new major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(5), 922-925.
- Liu, P. V., Matsumoto, H., Kusama, H., & Bergan, T. O. M. (1983). Survey of heat-stable, major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 33(2), 256-264.
- Livermore, D. M. (2001). Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(3), 247-250.
- Livermore, D. M. (2002). The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. *Current opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000)*, 3(2), 218-224.
- Llanes, C., Hocquet, D., Vogne, C., Benali-Baitich, D., Neuwirth, C., & Plésiat, P. (2004). Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(5), 1797-1802.
- Lodise Jr, T. P., Lomaestro, B., & Drusano, G. L. (2007). Piperacillin-tazobactam for *Pseudomonas aeruginosa* infection: clinical implications of an extended-infusion dosing strategy. *Clinical Infectious Diseases*, 44(3), 357-363.
- Loureiro, M. M., De Moraes, B. A., Mendonça, V. L. F., Quadra, M. R. R., Pinheiro, G. S., & Asensi, M. D. (2002). *Pseudomonas aeruginosa*: study of antibiotic resistance and molecular typing in hospital infection cases in a neonatal intensive care unit from Rio de Janeiro City, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(3), 387-394.
- Lutz, L., Pereira, D. C., Paiva, R. M., Zavascki, A. P., & Barth, A. L. (2012). Macrolides decrease the minimal inhibitory concentration of anti-pseudomonal agents against *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients in biofilm. *BMC Microbiology*, 12(1), 196.
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M. R., Bayles, K., & Wozniak, D. J. (2009). Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PloS Pathogens*, 5(3).
- Machreki, Y., Kouidhi, B., Machreki, S., Chaieb, K., & Sáenz, Y. (2019). Analysis of a long term starved *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 in seawater microcosms. *Microbial Pathogenesis*, 134, 103595.
- MacLeod, D. L., Nelson, L. E., Shawar, R. M., Lin, B. B., Lockwood, L. G., Dirks, J. E., Miller, G. H., Burns, J. L., & Garber, R. L. (2000). Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(3), 1180-1184.
- Mah, T. F. C., & O'toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9(1), 34-39.
- Mahajan-Miklos, S., Tan, M. W., Rahme, L. G., & Ausubel, F. M. (1999). Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*–*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell*, 96(1), 47-56.
- Mahenthalingam, E., Campbell, M. E., Foster, J., Lam, J. S., & Speert, D. P. (1996). Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(5), 1129-1135.
- Maksimović, Z., & Rifatbegović, M. (2015). Osnovni principi kliničke bakteriologije. Veterinarski fakultet Sarajevo.

- Maldonado, R. F., Sa-Correia, I., & Valvano, M. A. (2016). Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiology Reviews*, *40*(4), 480-493.
- Mammeri, H., Nordmann, P., Berkani, A., & Eb, F. (2008). Contribution of extended-spectrum AmpC (ESAC) β -lactamases to carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, *282*(2), 238-240.
- Marchiaro, P., Ballerini, V., Spalding, T., Cera, G., Mussi, M.A., Moran-Barrio, J., Vila, A. J., Viale, A. M., & Limansky, A. S. (2008). A convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *62*(2), 336-344.
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., & Nishino, T. (2000). Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *44*(12), 3322-3327.
- Mathai, D., Jones, R. N., Pfaller, M. A., & Archer, T. (2001). Epidemiology and frequency of resistance among pathogens causing urinary tract infections in 1,510 hospitalized patients: a report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *40*(3), 129-136.
- Meyer, J. M. (2000). Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Archives of Microbiology*, *174*(3), 135-142.
- Meyer, J. M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C., & Holder, I. A. (1996). Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, *64*(2), 518-523.
- Mikkelsen, H., Ball, G., Giraud, C., & Filloux, A. (2009). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* CupD fimbrial genes is antagonistically controlled by RcsB and the EAL-containing PvrR response regulators. *PloS One*, *4*(6), 6018.
- Milanov, D., Ašanin, R., Vidić, B., Krnjajić, D., & Petrović, J. (2008). Biofilm—organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima. *Arhiv Veterinarske Medicine*, *1*(2), 5-15.
- Milojković, M., Nenadović, Ž., Stanković, S., Božić, D. D., Stanković Nedeljković, N., Ćirković, I., Petrović, M., & Dimkić, I. (2020). Phenotypic and genetic properties of susceptible and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Southern Serbia. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, *71*(3), 231-250.
- Mittal, R., Aggarwal, S., Sharma, S., Chhibber, S., & Harjai, K. (2009). Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *Journal of Infection and Public Health*, *2*(3), 101-111.
- Mladenović-Antić, S. B. (2018). Detekcija mehanizama rezistencije na karbapeneme kod enterobakterija i vrste *Pseudomonas aeruginosa* (Doktorska disertacija, Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet).
- Mohammed, M., Abd El-Aziz, H., Omran, N., Anwar, S., Awad, S., & El-Soda, M. (2009). Rep-PCR characterization and biochemical selection of lactic acid bacteria isolated from the Delta area of Egypt. *International Journal of Food Microbiology*, *128*(3), 417-423.
- Monlezun, L., Phan, G., Benabdelhak, H., Lascombe, M. B., Ntsogo Enguene, V. Y., Picard, M., & Broutin, I. (2015). New OprM structure highlighting the nature of the N-terminal anchor. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 667.
- Müller-Premru, M., & Gubina, M. (2000). Serotype, antimicrobial susceptibility and clone distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a university hospital. *Zentralblatt für Bakteriologie*, *289*(8), 857-867.
- Mushtaq, S., Ge, Y., & Livermore, D. M. (2004). Doripenem versus *Pseudomonas aeruginosa* in vitro: activity against characterized isolates, mutants, and transconjugants and resistance selection potential. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(8), 3086-3092.
- Müsken, M., Di Fiore, S., Dötsch, A., Fischer, R., & Häussler, S. (2010). Genetic determinants of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm establishment. *Microbiology*, *156*(2), 431-441.

- Mutharia, L. M., & Lam, J. S. (2007). *Antigen-antibody reactions*. In *Methods for General and Molecular Microbiology*, 3rd Edn, eds C. A. Reddy, T. J. Beveridge, J. A. Breznak, G. A. Marzluf, T. M. Schmidt., & L. R. Snyder. Washington, DC: ASM Press, 138-167.
- Mutharia, L. M., Nicas, T. I., & Hancock, R. E. (1982). Outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* serotype strains. *The Journal of Infectious Diseases*, 146(6), 770-779.
- Nagaveni, S., Rajeshwari, H., Kumar Oli, A., Patil, S. A., & Kelmani Chandrakanth, R. (2011). Widespread emergence of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from CSF samples. *Indian Journal of Microbiology*, 51(1), 2-7.
- Nakae, T., Nakajima, A., Ono, T., Saito, K., & Yoneyama, H. (1999). Resistance to β -Lactam Antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the MexAB-OprM efflux pump and β -Lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(5), 1301-1303.
- Nazir, R., Rehman, S., Nisa, M. & Ali Baba, U., (2019). *Freshwater Microbiology. Perspectives of Bacterial Dynamics in Lake Ecosystems*. In *Exploring bacterial diversity: from cell to sequence*, eds Bandh, S. A., Shafi, S., Shameem, N. Academic Press, 263-306.
- Nguyen, L., Garcia, J., Gruenberg, K., & MacDougall, C. (2018). Multidrug-Resistant *Pseudomonas* Infections: Hard to Treat, but hope on the Horizon?. *Current Infectious Disease Reports*, 20(8), 23.
- Nishizawa, K., Hirano, M., Kimura, A., Mochizuki, T., Yamamoto, Y., Yamamura, S., & Momose, Y. (1998). Evaluation of the antimicrobial activity of carbapenem and cephem antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized patients. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 4(4), 174.
- Nordmann, P., & Mammeri, H. (2007). Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. *Future Medicine*, 2(3), 207-307.
- Obritsch, M. D., Fish, D. N., MacLaren, R., & Jung, R. (2004). National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(12), 4606-4610.
- Olaitan, A. O., Morand, S., & Rolain, J. M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 5, 643.
- Olszewska, M. A., Kocot, A. M., Stanowicka, A., & Łaniewska-Trokenheim, Ł. (2016). Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* and disinfectant susceptibility of planktonic and biofilm cells. *Czech Journal of Food Science*, 34(3).
- Orsi, G. B., Mansi, A., Tomao, P., Chiarini, F., & Visca, P. (1994). Lack of association between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in hospital wards. *Journal of Hospital Infection*, 27(1), 49-60.
- Otani, S., Hiramatsu, K., Hashinaga, K., Komiya, K., Umeki, K., Kishi, K., & Kadota, J. I. (2018). Sub-minimum inhibitory concentrations of ceftazidime inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 24(6), 428-433.
- Palavutitotai, N., Jitmuang, A., Tongchai, S., Kiratisin, P., & Angkasekwinai, N. (2018). Epidemiology and risk factors of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *PloS One*, 13(2).
- Paulsson, M. (2017). Host-pathogen interactions in *Pseudomonas aeruginosa* invasive and respiratory tract infection (Doctoral dissertation, Lund University).
- Pavel, A. B., & Vasile, C. I. (2012). PyElph-a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 1-6.
- Peek, M. E., Bhatnagar, A., McCarty, N. A., & Zughaier, S. M. (2012). Pyoverdine, the major siderophore in *Pseudomonas aeruginosa*, evades NGAL recognition. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2012.
- Pitout, J. D., Gregson, D. B., Poirel, L., McClure, J. A., Le, P., & Church, D. L. (2005). Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamases in a large centralized laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(7), 3129-3135.

- Pitt, T. L. (1998). *Pseudomonas*, *Burkholderia* and related genera. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 3, 1109-1138.
- Plotnikova, J. M., Rahme, L. G., & Ausubel, F. M. (2000). Pathogenesis of the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124(4), 1766-1774.
- Poirel, L., Naas, T., Nicolas, D., Collet, L., Bellais, S., Cavallo, J. D., & Nordmann, P. (2000). Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(4), 891-897.
- Poole, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Frontiers in Microbiology*, 2, 65.
- Pronoza, M., Sciuca, S., Ceban, A., & Balanetchi, L. (2015). 103 Minimum inhibition concentration characteristic of antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 14, S83.
- Prunić, B. Z. (2017). Ispitivanje mogućnosti formiranja biofilma u uslovima *in vitro* kod različitih serovarijeta *Salmonella* vrsta izolovanih iz uzoraka hrane za životinje (Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu-Fakultet veterinarske medicine).
- Pukatzki, S., Kessin, R. H., & Mekalanos, J. J. (2002). The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(5), 3159-3164.
- Quale, J., Bratu, S., Gupta, J., & Landman, D. (2006). Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(5), 1633-1641.
- Ramphal, R., Hoban, D. J., Pfaller, M. A., & Jones, R. N. (2000). Comparison of the activity of two broad-spectrum cephalosporins tested against 2,299 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated at 38 North American medical centers participating in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1998. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 36(2), 125-129.
- Ranjbar, R., Owlia, P., Sadari, H., Mansouri, S., Jonaidi, J. N., Izadi, M., Farshad, A., & Arjomandzadegan, M. (2011). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burned patients hospitalized in a major burn center in Tehran, Iran. *Acta Medicina Iranica*, 49(10), 675.
- Rasmussen, B. A., & Bush, K. (1997). Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(2), 223-232.
- Raymond, C. K., Sims, E. H., Kas, A., Spencer, D. H., Kuttyavin, T. V., Ivey, R. G., Zhou, I. Y., Kaul, R., Clendenning, B. J., & Olson, M. V. (2002). Genetic variation at the O-antigen biosynthetic locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 184(13), 3614-3622.
- Rodríguez-Martínez, J. M., Poirel, L., & Nordmann, P. (2009). Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5), 1766-1771.
- Rossolini, G. M., & Mantengoli, E. (2005). Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection*, 11, 17-32.
- Ruer, S., Stender, S., Filloux, A., & de Bentzmann, S. (2007). Assembly of fimbrial structures in *Pseudomonas aeruginosa*: functionality and specificity of chaperone-usher machineries. *Journal of Bacteriology*, 189(9), 3547-3555.
- Ruhal, R., Antti, H., Rzhepishevskaya, O., Boulanger, N., Barbero, D. R., Wai, S. N., Uhlin, B. E., & Ramstedt, M. (2015). A multivariate approach to correlate bacterial surface properties to biofilm formation by lipopolysaccharide mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 127, 182-191.
- Sader, H. S., Huband, M. D., Castanheira, M., & Flamm, R. K. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial susceptibility results from four years (2012 to 2015) of the international network for optimal resistance monitoring program in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(3), 02252-16.

- Salmi, C., Loncle, C., Vidal, N., Letourneux, Y., Fantini, J., Maresca, M., Taïeb, N., Pagès, J. M., & Brunel, J. M. (2008). Squalamine: an appropriate strategy against the emergence of multidrug resistant gram-negative bacteria? *PLoS One*, *3*(7).
- Sardelic, S., Bedenic, B., Colinin-Dupuich, C., Orhanovic, S., Bosnjak, Z., Plecko, V., Cournoyer, B., & Rossolini, G. M. (2012). Infrequent finding of metallo- β -lactamase VIM-2 in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Croatia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(5), 2746-2749.
- Saredlić, S., & Bedenić, B. (2009). Rezistencija na antibiotike u *Pseudomonas aeruginosa*. *Infektološki Glasnik*, *29*(4), 177-183.
- Schaber, J. A., Hammond, A., Carty, N. L., Williams, S. C., Colmer-Hamood, J. A., Burrowes, B. H., Dhevan, V., Griswold, J. A., & Hamood, A. N. (2007). Diversity of biofilms produced by quorum-sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, *56*(6), 738-748.
- Schaberg, D. R., Culver, D. H., & Gaynes, R. P. (1991). Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *The American Journal of Medicine*, *91*(3), S72-S75.
- Schmidt, K. D., Tümmler, B., & Römling, U. (1996). Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats. *Journal of Bacteriology*, *178*(1), 85-93.
- Schmitz, F. J., Verhoef, J., Fluit, A. C., & SENTRY Participants Group. (1999). Prevalence of aminoglycoside resistance in 20 European university hospitals participating in the European SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *18*(6), 414-421.
- Schweizer, H. P. (2003). Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genetic and Molecular Research*, *2*(1), 48-62.
- Selezska, K., Kazmierczak, M., Müsken, M., Garbe, J., Schobert, M., Häussler, S., Wiehlmann, L., Rohde, C., & Sikorski, J. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited under environmental focus: impact of water quality and phage pressure. *Environmental Microbiology*, *14*(8), 1952-1967.
- Sorkh, M.A.G., Shokoohzadeh, L., Rashidi, N., & Tajbakhsh, E. (2017). Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients by repetitive extragenic palindromic-PCR (rep-PCR). *Iranian Red Crescent Medical Journal*, *19*(4).
- Spencer, F.B., Haupt, S., Claros, M. C., Walter, S., Lietz, T., Schille, R., & Rodloff, A. C. (2000). Epidemiologic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology and Infection*, *6*(11), 600-607.
- Stanislavsky, E. S., & Lam, J. S. (1997). *Pseudomonas aeruginosa* antigens as potential vaccines. *FEMS Microbiology Reviews*, *21*, 243-277.
- Stanković-Nedeljković, N., Kocić, B., Todorović, B., Branković, S., & Mladenović-Antić, S. (2011). Serotyping and analysis of produced pigments kinds by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Vojnosanitetski Pregled*, *68*(11), 923-929.
- Stanković Nedeljković, N. S. (2015). *Fenotipske karakteristike kliničkih izolata Pseudomonas aeruginosa* (Doktorska disertacija, Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet).
- Stanković Nedeljković, N., Todorović, B., Kocić, B., Ćirić, V., Milojković, M., & Waisi, H. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* serotypes and resistance to antibiotics from wound swabs. *Vojnosanitetski Pregled*, *72*(11), 996-1003.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, *40*(2), 175-179.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, *115*(8), 891-899.

- Stockmann, C., Sherwin, C. M., Ampofo, K., & Spigarelli, M. G. (2014). Development of levofloxacin inhalation solution to treat *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *Therapeutic Advances In Respiratory Disease*, 8(1), 13-21.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagron, M., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K. S., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E. W., Lory, S. & Olson, M. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959.
- Strateva, T., & Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58(9), 1133-1148.
- Syrmis, M. W., O'Carroll, M. R., Sloots, T. P., Coulter, C., Wainwright, C. E., Bell, S. C., & Nissen, M. D. (2004). Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. *Journal of Medical Microbiology*, 53(11), 1089-1096.
- Tam, V. H., Gamez, E. A., Weston, J. S., Gerard, L. N., LaRocco, M. T., Caeiro, J. P., Geatry, L. O., & Garey, K. W. (2008). Outcomes of bacteremia due to *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to piperacillin-tazobactam: implications on the appropriateness of the resistance breakpoint. *Clinical Infectious Diseases*, 46(6), 862-867.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST guideline for the detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Vers. 2.0; 2017a. Available at: www.eucast.org/resistance_mechanisms/.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Intrinsic resistance and unusual phenotypes Version 3.2, February 2020.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017b. Available at: <http://www.eucast.org>.
- Thomassen, M. J., & Demko, C. A. (1981). Serum bactericidal effect on *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Infection and Immunity*, 33(2), 512-518.
- Thrane, S. W., Taylor, V. L., Freschi, L., Kukavica-Ibrulj, I., Boyle, B., Laroche, J., Pirnay, J. P., Lévesque, R. C., Lam, J. S., & Jelsbak, L. (2015). The widespread multidrug-resistant serotype O12 *Pseudomonas aeruginosa* clone emerged through concomitant horizontal transfer of serotype antigen and antibiotic resistance gene clusters. *Journal of Clinical Microbiology*, 6(5), e01396-15.
- Tielen, P., Narten, M., Rosin, N., Biegler, I., Haddad, I., Hogardt, M., Neubauer, R., Schobert, M., Wiehlmann, L., & Jahn, D. (2011). Genotypic and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary tract infections. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(4), 282-292.
- Tomanović, B., Joković, B., Tatić, M., Mirović, V., & Nanusević, O. (1991). Serotyping and pyocin typing of *Pseudomonas aeruginosa* in a study of intrahospital infections. *Vojnosanitetski Pregled*, 48(1), 31-33.
- Touati, M., Diene, S. M., Dekhil, M., Djahoudi, A., Racherache, A., & Rolain, J. M. (2013). Dissemination of class I integron carrying VIM-2 carbapenemase gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from intensive care unit of university hospital of Annaba, Algeria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, AAC-00032.
- Trafny, E. A. (1998). Susceptibility of adherent organisms from *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains isolated from burn wounds to antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 10(3), 223-228.
- Trias, J., Chamberland, S., Hecker, S. J., & Lee, V. J. (1999). U.S. Patent No. 5,989,832. Washington, DC: United.States. Patent and Trademark Office.

- Tsakris, A., Pournaras, S., Woodford, N., Palepou, M. F. I., Babini, G. S., Douboyas, J., & Livermore, D. M. (2000). Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1290-1292.
- Turick, C. E., Knox, A. S., Becnel, J. M., Ekechukwu, A. A., & Milliken, C. E. (2010). Properties and function of pyomelanin. *Biopolymers*, 449, p.72.
- Uludokumacı, S., Balkan, İ.İ., Mete, B., Özaras, R., Saltoğlu, N., & Soysal, T. (2013). Ecthyma gangrenosum-like lesions in a febrile neutropenic patient with simultaneous *Pseudomonas* sepsis and disseminated fusariosis. *Turkish Journal of Hematology*, 30(3), p.321.
- Unić-Stojanović, D., Palibrk, I., Lađević, N., Marković, D., Stefanović, B., & Kalezić, N. (2015). Antimicrobial resistance and initiatives to reduce this problem. *Serbian Journal of Anesthesia and Intensive Therapy*, 37(3-4), 167-170.
- Usher, L. R., Lawson, R. A., Geary, I., Taylor, C. J., Bingle, C. D., Taylor, G. W., & Whyte, M. K. (2002). Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *The Journal of Immunology*, 168(4), 1861-1868.
- Vahaboglu, H., Oztürk, R., Aygün, G., Coşkun, F., Yaman, A., Kaygusuz, A., Leblebicoglu, H., Balik, I., & Otkun, M. (1997). Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(10), 2265-2269.
- Van Eldere, J. (2003). Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(2), 347-352.
- Varaiya, A., Kulkarni, N., Kulkarni, M., Bhalekar, P., & Dogra, J. (2008). Incidence of metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in ICU patients. *Indian Journal of Medical Research*, 127(4).
- Vasiljević, Z., Jovčić, B., Ćirković, I., & Đukić, S. (2014). An examination of potential differences in biofilm production among different genotypes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Biological Sciences*, 66(1), 117-121.
- Vidal, F., Mensa, J., Almela, M., Martínez, J. A., Marco, F., Casals, C., Gatell, J. M., Soriano, E., & de Anta, M. T. J. (1996). Epidemiology and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia, with special emphasis on the influence of antibiotic treatment: analysis of 189 episodes. *Archives of Internal Medicine*, 156(18), 2121-2126.
- Vitkauskienė, A., Scheuss, S., Sakalauskas, R., Dudzevicius, V., & Sahly, H. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* strains from nosocomial pneumonia are more serum resistant than *P. aeruginosa* strains from noninfectious respiratory colonization processes. *Infection*, 33(5-6), 356-361.
- Voutsinas, D., Mavroudis, T., Avlami, A., & Giamarellou, H. (1989). Comparative *in vitro* activity of cefepime (BMY 28142) against multiresistant nosocomial isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 8(10), 917-919.
- Vujović, B. A. (2016). Bakteriofagi kao agensi u kontroli formiranja biofilmova *Pseudomonas aeruginosa* (Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet).
- Vujović, B., Rudić, Ž., Kljujev, I., Rajković, D., Božić, M., & Raičević, V. (2016). Potential of *Pseudomonas aeruginosa* environmental isolates for biofilm formation. *Zaštita Materijala*, 57(3), 449-454.
- Wang, M. C., Liu, C. Y., Shiao, A. S., & Wang, T. (2005). Ear problems in swimmers. *Journal of the Chinese Medical Association*, 68(8), 347-352.
- Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., & Mitsuhashi, S. (1991). Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(1), 147-151.
- Watine, J. (1999). Is the European interhospital clonal spread of serotype O12 *Pseudomonas aeruginosa* related to the patients' prolonged carriage duration?. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 20(7), 460-461.

- Weiss, R. L. (1971). The structure and occurrence of pili (fimbriae) on *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 67(2), 135-144.
- Wenzler, E., Deraedt, M. F., Harrington, A. T., & Danizger, L. H. (2017). Synergistic activity of ceftazidime-avibactam and aztreonam against serine and metallo- β -lactamase-producing gram-negative pathogens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 88(4), 352-354.
- Wilson, R., Pitt, T., Taylor, G., Watson, D., MacDermot, J., Sykes, D., Roberts, D., & Cole, P. (1987). Pyocyanin and 1-hydroxyphenazine produced by *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the beating of human respiratory cilia *in vitro*. *The Journal of Clinical Investigation*, 79(1), 221-229.
- Wilson, R., Sykes, D. A., Watson, D., Rutman, A., Taylor, G. W., & Cole, P. J. (1988). Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium. *Infection and Immunity*, 56(9), 2515-2517.
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P., & Edmond, M. B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases*, 39(3), 309-317.
- Wolska, K., Kot, B., & Jakubczak, A. (2012). Phenotypic and genotypic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitals in Siedlce (Poland). *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(1), 274-282.
- Wolter, D. J., Kurpiel, P. M., Woodford, N., Palepou, M.F.I., Goering, R. V., & Hanson, N. D. (2009). Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(2), 557-562.
- Woo, J. K., Webb, J. S., Kirov, S. M., Kjelleberg, S., & Rice, S. A. (2012). Biofilm dispersal cells of a cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolate exhibit variability in functional traits likely to contribute to persistent infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 66(2), 251-264.
- Woods, D. E., Straus, D. C., Johanson, W. G., Berry, V. K., & Bass, J. A. (1980). Role of pili in adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mammalian buccal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 29(3), 1146-1151.
- Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1451-1470.
- Xu, Z., Fang, X., Wood, T. K., & Huang, Z. J. (2013). A systems-level approach for investigating *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *PloS One*, 8(2), 57050.
- Zhao, W. H., & Hu, Z. Q. (2015). Acquired metallo- β -lactamases and their genetic association with class 1 integrons and IS CR elements in Gram-negative bacteria. *Future Microbiology*, 10(5), 873-887.

7. PRILOZI

Prilog 1. Odobrenje etičke komisije Kliničko-bolničkog centra Aleksinac (odluka br. 3242)



ЕТИЧКИ ОДБОР ОПШТЕ БОЛНИЦЕ АЛЕКСИНАЦ

Етички одбор Опште болнице Алексинац је одржао седницу дана 11. 10. 2019. године и разматрао молбу бр. 3242 од 08. 10. 2019. године спец. вет. мед. Марка Милојковића за одобрење спровођења некомерцијалног клиничког испитивања.

На седници су били присутни чланови Етичког одбора:

- др Јелена Стојановић спец. офталмологије
- др Катарина Стојковић спец. пнеумофтизиологије
- Данијела Стоилковић дипл. правник

Чланови Етичког одбора на основу члана 131 ст. 1 тачка 3 дају

САГЛАСНОСТ за спровођење некомерцијалног клиничког испитивања односно сагласност за израду докторске тезе под називом „Молекуларно генетичка карактеризација, резистенција на антибиотике и испитивање фактора вируленције клиничких изолата *Pseudomonas aeruginosa*“.



Председник Етичког одбора

др Јелена Стојановић спец. офталмологије

BIOGRAFIJA

Marko S. Milojković je rođen 24. 05. 1982. u Aleksincu gde je završio osnovnu i srednju poljoprivrednu školu „Šumatovac“, smer veterinarski tehničar. Fakultet veterinarske medicine u Beogradu upisao je školske 2001/2002 godine, a diplomirao je 2009/2010 godine. Specijalističke akademske studije Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, modul „Biologija mikroorganizama“ upisuje školske 2011/2012 godine. Specijalistički rad pod nazivom „Rezistencija na antibiotike kliničkih izolata *Pseudomonas aeruginosa*” urađen je u mikrobiološkoj laboratoriji Opšte bolnice u Aleksincu i uspešno je odbranjen 2013. godine na Katedri za mikrobiologiju. Školske 2013/2014 godine upisao je doktorske akademske studije, modul Mikrobiologija. Od 2012. do 2019. godine radio je u poljoprivrednoj školi „Šumatovac“, kao nastavnik veterinarske grupe predmeta. U periodu od 2012. do 2016. godine specijalistički i doktorski rad obavio je u mikrobiološkoj laboratoriji Opšte bolnice u Aleksincu i na Katedri za mikrobiologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. U školskoj 2018/2019 godine radio je kao saradnik u nastavi na fakultetu „Zaštita životne sredine“, Univerziteta Nikola Tesla u Beogradu, na predmetima: Osnove biologije, Biodiverzitet i prirodne vrednosti i resursi. Od 2019. godine radi u JKP Veterina Beograd. Do sada je objavio 9 bibliografskih jedinica, od čega tri naučna rada (po jedan) u kategorijama M22, M23 i M24, kao i šest saopštenja sa međunarodnih skupova u kategoriji M34.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Марко С. Милојковић**

Број индекса **Б3035/2013**

Изјављујем

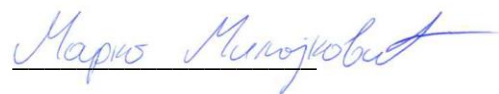
да је докторска дисертација под насловом

Генотипизација, резистенција на антибиотике и испитивање фактора вируленције клиничких изолата *Pseudomonas aeruginosa*

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 02.10.2020. godine



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Марко С. Милојковић**

Број индекса **Б3035/2013**

Студијски програм **Биологија**

Наслов рада **Генотипизација, резистенција на антибиотике и испитивање фактора вируленције клиничких изолата *Pseudomonas aeruginosa***

Ментори **Др Ивица Димкић и Доц. др Драгана Божић**

Потписани **Марко С. Милојковић**

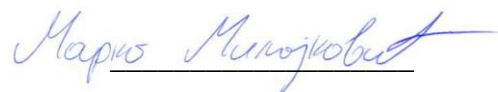
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 02.10.2020. godine



Марко Милојковић

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Генотипизација, резистенција на антибиотике и испитивање фактора вируленције клиничких изолата *Pseudomonas aeruginosa*

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

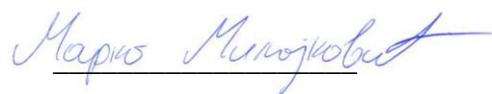
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 02.10.2020. godine



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.