

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Maja FOJKAR

**ODPORNOST BAKTERIJE *Pseudomonas aeruginosa*
PROTI IZBRANIM ANTIBIOTIKOM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Maja FOJKAR

**ODPORNOST BAKTERIJE *Pseudomonas aeruginosa* PROTI
IZBRANIM ANTIBIOTIKOM**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**RESISTANCE OF BACTERIA *Pseudomonas aeruginosa* TO
SELECTED ANTIBIOTICS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2014

“Norec, ki vztraja pri svoji norosti, bo postal moder.”

(William Blake)

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za respiratorno mikrobiologijo na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Katja Seme, za somentorico doc. dr. Viktorija Tomič in za recenzentko prof. dr. Eva Ružić-Sabljić.

Mentorica: prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Somentorica: doc. dr. Viktorija Tomič, dr. med.

Recenzentka: prof. dr. Eva Ružić-Sabljić, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Katja SEME, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: doc. dr. Viktorija TOMIČ, dr. med.

Klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Laboratorij za respiratorno mikrobiologijo

Članica: prof. dr. Eva RUŽIĆ-SABLJIĆ, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega diplomskega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Maja Fojkar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.24:615.33:579.841.1(043)=163.6
KG	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / antibiotiki / odpornost proti antibiotikom / občutljivost za antibiotike / Kirby-Bauerjeva difuzijska metoda / disk difuzija / difuzija koncentracijskega gradienta / Etest / določanje občutljivosti / primerjava metod / antibiogram / kolistin
AV	FOJKAR, Maja
SA	SEME, Katja (mentorica)/ TOMIČ, Viktorija (somentorica)/ RUŽIČ-SABLJIČ, Eva (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2014
IN	ODPORNOST BAKTERIJE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PROTI IZBRANIM ANTIBIOTIKOM
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 92 str., 11 pregl., 10 sl., 3 pril., 95 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	

Odpornost bakterije *Pseudomonas aeruginosa* proti antibiotikom predstavlja resen problem v sodobni medicini. Namen naše študije je bil določiti občutljivost izolatov bakterije *P. aeruginosa*, osamljenih iz kužnin bolnikov, hospitaliziranih na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik v obdobju od junija do septembra 2009, za antibiotike, ki so bolj ali manj del stalne klinične prakse – za piperacilin/tazobaktam (TZP), cefepim (CEF), meropenem (MEM), gentamicin (GM), ciprofloksacin (CIP) in za kolistin (CL), ki v Sloveniji velja za rezervni antibiotik. Občutljivost skupaj 50 izolatov je bila določena z uporabo Kirby-Bauerjeve difuzijske metode in metode difuzije koncentracijskega gradienta (Etest) v skladu s CLSI. Občutljivost izolatov za izbrane antibiotike je bila visoka in je bila, z izjemo občutljivosti za CIP (80 %), določene z Etesti, višja ali enaka 90 %. Kolistin je pokazal najboljšo aktivnost proti izolatom *P. aeruginosa* med izbranimi antibiotiki. Za kolistin je bilo občutljivih 96 % izolatov. Stopnje odpornosti proti antibiotikom variirajo in odražajo različno pogostnost uporabe posameznih učinkovin. Nadalje, ocenili smo natančnost določanja občutljivosti za izbrane antibiotike z disk difuzijsko metodo v primerjavi z Etesti. Primerjava rezultatov metod ni pokazala zelo velikih in velikih napak pri nobenem od testiranih antibiotikov. V primeru CEF, GM, CIP in CL smo zasledili majhne napake, ki nakazujejo na trend lažne občutljivosti disk difuzijske metode. Na splošno je bilo kategorično ujemanje med metodama dobro za vseh šest preučevanih antibiotikov, kar kaže na dobro primerljivost rezultatov omenjenih metod.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579.24:615.33:579.841.1(043)=163.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> / antibiotics / antibiotic resistance / antibiotic susceptibility / Kirby-Bauer disc diffusion method / disc diffusion / concentration gradient diffusion assay / Etest / susceptibility testing / comparison of methods / antibiogram / colistin
CX	
AU	FOJKAR, Maja
AA	SEME, Katja (supervisor)/ TOMIČ, Viktorija (co-advisor)/ RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2014
TI	RESISTANCE OF BACTERIA <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TO SELECTED ANTIBIOTICS
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XIV, 92 str., 11 pregl., 10 sl., 3 pril., 95 vir.
LA	sl
AL	sl/en
AB	

The antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* presents a serious problem in modern medicine. The aim of our study was to determine the susceptibility patterns of *P. aeruginosa* isolates obtained from patients hospitalized at the University Clinic of Pulmonary and Allergic Diseases Golnik between June and September 2009 to antibiotics used for the treatment of pseudomonas infections - piperacillin/tazobactam (TZP), cefepime (CEF), meropenem (MEM), gentamicin (GM), ciprofloxacin (CIP) and also to colistin (CL) which is used in Slovenia as reserve antibiotic. Susceptibility testing a total of 50 *P. aeruginosa* isolates was performed by the Kirby-Bauer disc diffusion method and by the concentration gradient diffusion assay (Etest) according to CLSI. The susceptibility of the isolates to selected antibiotics was high and was, with the exception of the susceptibility to CIP (80%) determined by Etests, higher than or equal to 90%. Colistin showed the highest activity against *P. aeruginosa* isolates among the selected antibiotics; 96 % of isolates were susceptible to colistin. In summary, rates of antibiotic resistance vary and reflect different frequencies of use of the individual components. Additionally, we assessed the accuracy of susceptibility determination for the selected antibiotics with disc diffusion method in comparison with Etest. Comparison of the results of these two methods didn't show very major or major errors in none of the tested antibiotics. Minor errors were detected in the case of CEF, GM, CIP in CL, indicating tendency toward false-susceptible results of disc diffusion method. Overall, a good categorical agreement between the methods was obtained for all six antibiotics studied, indicating a good comparability of the results obtained by these two methods.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	X
Kazalo prilog	XII
Okrajšave in simboli	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	3
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 BAKTERIJA <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
2.1.1 Značilnosti	4
2.1.2 Patogeneza in klinična slika	5
2.1.3 Epidemiologija	7
2.2 ANTIBIOTIKI ZA ZDRAVLJENJE OKUŽB, KI JIH POVZROČA BAKTERIJA <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
2.2.1 Betalaktami	9
2.2.1.1 Penicilini	9
2.2.1.2 Cefalosporini	10
2.2.1.3 Karbapenemi	12
2.2.1.4 Monobaktami	12
2.2.1.5 Zaviralci betalaktamaz	13
2.2.2 (Fluoro)kinoloni	13

2.2.3	Aminoglikozidi	14
2.2.4	Polimiksini	15
2.3	ODPORNOST BAKTERIJE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PROTI ANTIBIOTIKOM	18
2.3.1	Odpornost proti betalaktamom	21
2.3.1.1	β -laktamaze.....	21
2.3.1.2	Efluks.....	25
2.3.1.3	Zmanjšana prepustnost zunanje membrane	27
2.3.2	Odpornost proti fluorokinolonom	28
2.3.2.1	Sprememba tarčnih mest	29
2.3.2.2	Efluks.....	30
2.3.3	Odpornost proti aminoglikozidom	32
2.3.3.1	Aminoglikozid-modificirajoči encimi (AME).....	32
2.3.3.2	Efluks.....	34
2.3.3.3	Metilaze 16S rRNA	35
2.3.4	Odpornost proti polimiksinom	36
2.3.5	Biofilmi	39
2.4	DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI ZA ANTIBIOTIKE	40
2.4.1	Disk difuzijska metoda ali Kirby-Bauerjeva difuzijska metoda	43
2.4.2	Metoda difuzije koncentracijskega gradienta (Etest)	43
3	MATERIALI IN METODE	45
3.1	NAČRT POIZKUSA	45
3.2	BAKTERIJSKI IZOLATI	47
3.3	GOJIŠČA.....	47
3.4	PRIPRAVA BAKTERIJSKIH IZOLATOV IN BAKTERIJSKE SUSPENZIJE... 47	
3.4.1	Revitalizacija kultur	47
3.4.2	Priprava inokuluma	48

3.5	TESTIRANJE OBČUTLJIVOSTI BAKTERIJSKIH IZOLATOV ZA ANTIBIOTIKE	48
3.5.1	Disk difuzijska metoda ali Kirby-Bauerjeva difuzijska metoda	48
3.5.1.1	Materiali in oprema	48
3.5.1.2	Izvedba	49
3.5.2	Metoda difuzije koncentracijskega gradienta (Etest)	50
3.5.2.1	Materiali in oprema	50
3.5.2.2	Izvedba	50
3.5.3	Kontrola disk difuzijske metode in metode difuzije koncentracijskega gradienta	52
3.6	PRIMERJAVA REZULTATOV KIRBY-BAUERJEVE DIFUZIJSKE METODE IN METODE DIFUZIJE KONCENTRACIJSKEGA GRADIENTA (Etest)	53
4	REZULTATI	56
4.1	DISK DIFUZIJSKA METODA	56
4.2	METODA DIFUZIJE KONCENTRACIJSKEGA GRADIENTA (Etest)	57
4.3	PRIMERJAVA REZULTATOV KIRBY-BAUERJEVE DIFUZIJSKE METODE IN METODE DIFUZIJE KONCENTRACIJSKEGA GRADIENTA	61
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	69
5.1	RAZPRAVA	69
5.1.1	Občutljivost izolatov <i>Pseudomonas aeruginosa</i> za izbrane antibiotike	69
5.1.2	Primerjava rezultatov Kirby-Bauerjeve difuzijske metode in metode difuzije koncentracijskega gradienta	76
5.2	SKLEPI	80
6	POVZETEK	81
7	VIRI	83

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vrste in število kužnin, vključenih v testiranje občutljivosti bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> za izbrane antibiotike	47
Preglednica 2: Testni antibiotiki, njihove koncentracije (μg) in kriteriji CLSI za interpretacijo zaviralnih con (mm) pri testiranju občutljivosti za antibiotike bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> s Kirby-Bauerjevo disk difuzijsko metodo.....	50
Preglednica 3: Testni antibiotiki, njihove koncentracije ($\mu\text{g/ml}$) in kriteriji CLSI za interpretacijo zaviralnih con ($\mu\text{g/ml}$) pri testiranju občutljivosti za antibiotike bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> z metodo difuzije koncentracijskega gradienta	52
Preglednica 4: Disk difuzijska metoda; mejne vrednosti premerov con (mm) za testni organizem <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	53
Preglednica 5: Metoda difuzije koncentracijskega gradienta; mejne vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij ($\mu\text{g/ml}$) za testni organizem <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	53
Preglednica 6: Kriteriji za interpretacijo napak glede na kategorije občutljivosti, določene z dvema metodama.....	54
Preglednica 7: Sprejemljive stopnje napak po priporočilu dokumenta M23-A2, ki ga je oblikoval CLSI (NCCLS, 2001).....	55
Preglednica 8: Rezultati določanja občutljivosti 50 izolatov bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> za izbrane antibiotike, dobljeni s Kirby-Bauerjevo difuzijsko metodo	56
Preglednica 9: Rezultati določanja občutljivosti 50 izolatov bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> za izbrane antibiotike, dobljeni z metodo difuzije koncentracijskega gradienta	58
Preglednica 10: Minimalna inhibitorna koncentracija ($\mu\text{g/ml}$), ki inhibira rast 50 % izolatov, minimalna inhibitorna koncentracija ($\mu\text{g/ml}$), ki inhibira rast 90 % izolatov, in razpon minimalnih inhibitornih koncentracij ($\mu\text{g/ml}$) za posamezne antibiotike ter število/odstotek za antibiotike občutljivih od skupaj 50 izolatov <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , testiranih z metodo difuzije koncentracijskega gradienta.....	60
Preglednica 11: Število za piperacilin/tazobaktam občutljivih, za piperacilin/tazobaktam zmerno občutljivih ter proti piperacilin/tazobaktamu odpornih izolatov <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , določeno z metodo disk difuzije in metodo difuzije koncentracijskega gradienta (Etest).....	62
Preglednica 12: Število za cefepim občutljivih, za cefepim zmerno občutljivih ter proti cefepimu odpornih izolatov <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , določeno z metodo disk difuzije in metodo difuzije koncentracijskega gradienta (Etest).....	62

Preglednica 13: Število za meropenem občutljivih, za meropenem zmerno občutljivih ter proti meropenemu odpornih izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, določeno z metodo disk difuzije in metodo difuzije koncentracijskega gradienta (Etest) 62

Preglednica 14: Število za gentamicin občutljivih, za gentamicin zmerno občutljivih ter proti gentamicinu odpornih izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, določeno z metodo disk difuzije in metodo difuzije koncentracijskega gradienta (Etest) 63

Preglednica 15: Število za ciprofloksacin občutljivih, za ciprofloksacin zmerno občutljivih ter proti ciprofloksacinu odpornih izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, določeno z metodo disk difuzije in metodo difuzije koncentracijskega gradienta (Etest)..... 63

Preglednica 16: Število za kolistin občutljivih, za kolistin zmerno občutljivih ter proti kolistinu odpornih izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, določeno z metodo disk difuzije in metodo difuzije koncentracijskega gradienta (Etest)..... 63

Preglednica 17: Napake v kategorijah občutljivosti (število/%) in stopnje ujemanja (%) med Kirby-Bauerjevo difuzijsko metodo in metodo difuzije koncentracijskega gradienta 65

Preglednica 18: Skupna stopnja napak in kategorično ujemanje za vse antibiotike 65

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema poizkusa. (a) Določanje občutljivosti izolatov <i>Pseudomonas aeruginosa</i> s Kirby-Bauerjevo difuzijsko metodo in metodo difuzije koncentracijskega gradienta. (b) Primerjava rezultatov Kirby-Bauerjeve difuzijske metode in metode difuzije koncentracijskega gradienta	45
Slika 2: Shematičen prikaz postopka določanja občutljivosti izolatov <i>Pseudomonas aeruginosa</i> s Kirby-Bauerjevo difuzijsko metodo in metodo difuzije koncentracijskega gradienta	46
Slika 3: Deleži (%) odpornih, zmerno občutljivih in občutljivih izolatov bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> za antibiotike piperacilin/tazobaktam, cefepim, meropenem, gentamicin, ciprofloksacin in kloramfenikol, dobljeni z disk difuzijsko metodo	57
Slika 4: Deleži (%) odpornih, zmerno občutljivih in občutljivih izolatov bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> za antibiotike piperacilin/tazobaktam, cefepim, meropenem, gentamicin, ciprofloksacin in kloramfenikol, dobljeni z metodo difuzije koncentracijskega gradienta	59
Slika 5: Minimalna inhibitorna koncentracija, ki inhibira rast 50 % izolatov <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (v µg/ml), za piperacilin/tazobaktam, cefepim, meropenem, gentamicin, ciprofloksacin in kolistin	60
Slika 6: Minimalna inhibitorna koncentracija, ki inhibira rast 90 % izolatov <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (v µg/ml), za piperacilin/tazobaktam, cefepim, meropenem, gentamicin, ciprofloksacin in kolistin	61
Slika 7: Primerjava minimalnih inhibitornih koncentracij (µg/ml), določenih z Etesti, in premerov inhibicijskih con (mm) 100/10-mikrogramskih diskov za piperacilin/tazobaktam določenih za 50 kliničnih izolatov <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66
Slika 8: Primerjava minimalnih inhibitornih koncentracij (µg/ml), določenih z Etesti, in premerov inhibicijskih con (mm) 30-mikrogramskih diskov za cefepim, določenih za 50 kliničnih izolatov <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66
Slika 9: Primerjava minimalnih inhibitornih koncentracij, določenih z Etesti (µg/ml), in premerov inhibicijskih con (mm) 10-mikrogramskih diskov za meropenem, določenih za 50 kliničnih izolatov <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67
Slika 10: Primerjava minimalnih inhibitornih koncentracij (µg/ml), določenih z Etesti, in premerov inhibicijskih con (mm) 10-mikrogramskih diskov za gentamicin, določenih za 50 kliničnih izolatov <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67
Slika 11: Primerjava minimalnih inhibitornih koncentracij (µg/ml), določenih z Etesti, in premerov inhibicijskih con (mm) 5-mikrogramskih diskov za ciprofloksacin, določenih za 50 kliničnih izolatov <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68

Slika 12: Primerjava minimalnih inhibitornih koncentracij ($\mu\text{g/ml}$), določenih z Etesti, in premerov inhibicijskih con (mm) 10-mikrogramskih diskov za kolistin, določenih za 50 kliničnih izolatov <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68
--	----

KAZALO PRILOG

Priloga A: Vrste kužnin, iz katerih so bil osamljeni izolati.

Priloga B: Izmerjeni premeri inhibicijskih con (mm) in pripadajoče stopnje občutljivosti (občutljiv/zmerno občutljiv/odporen) za 50 izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, osamljenih iz različnih kužnin bolnikov, hospitaliziranih na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik v obdobju od junija do septembra 2009, določeni z disk difuzijsko metodo.

Priloga C: Minimalne inhibitorne koncentracije ($\mu\text{g/ml}$) in pripadajoče stopnje občutljivosti (občutljiv/zmerno občutljiv/odporen) za 50 izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, osamljenih iz različnih kužnin bolnikov, hospitaliziranih na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik v obdobju od junija do septembra 2009, določeni z Etesti.

Priloga D: Rezultati testiranja, izraženi kot stopnje občutljivosti (občutljiv/zmerno občutljiv/odporen) za 50 izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, osamljenih iz različnih kužnin bolnikov, hospitaliziranih na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik v obdobju od junija do septembra 2009, določeni z disk difuzijsko metodo in Etesti.

Priloga E: Vrsta kužnine, iz katere je bil osamljen izolat in rezultati testiranja, izraženi kot stopnje občutljivosti za 50 izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, osamljenih iz različnih kužnin bolnikov, hospitaliziranih na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik v obdobju od junija do septembra 2009, določeni z disk difuzijsko metodo in Etesti.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AAC	aminoglikozid acetiltransferaze (angl. aminoglycoside acetyltransferase)
AAD/ANT	aminoglikozid adeniltransferaze/nukleotidil transferaze (angl. aminoglycoside adenytransferase/nucleotidyl transferase)
AME	aminoglikozid-modificirajoči encimi
APH	aminoglikozid fosforiltransferaze (angl. aminoglycoside phosphotransferase)
ATCC	standardni kontrolni sev (angl. American Type Culture Collection)
CEF	cefepim
CFU	enote, ki tvorijo kolonije (angl. colony forming units)
CIP	ciprofloksacin
CL	kolistin (angl. colistin)
CLSI	Inštitut za klinične in laboratorijske standarde (angl. Clinical and Laboratory Standards Institute)
DDD	definirana dnevna doza
ECDC	Evropski center za preprečevanje in kontrolo bolezni (angl. European Centre for Disease Prevention and Control)
ESAC-Net	Interaktivna baza porabe antibiotikov (angl. antimicrobial consumption interactive database)
ESAC	AmpC betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja (angl. extended-spectrum AmpC)
ESBL	betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja (angl. extended-spectrum β -lactamases)
EUCAST	Evropski odbor za testiranje protimikrobne občutljivosti (angl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
GM	gentamicin
I	zmerno občutljiv ali intermediaren (angl. intermediate)
MBK	minimalna baktericidna koncentracija
MBL	metalo-betalaktamaze (angl. metallo β -lactamases)
McF	McFarland

MDR	večkratno odporni (angl. multidrug-resistant)
MEM	meropenem
MH	Mueller-Hinton agar
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MIK ₅₀	najnižja koncentracija antibiotika, ki inhibira rast 50 % izolatov
MIK ₉₀	najnižja koncentracija antibiotika, ki inhibira rast 90 % izolatov
PBP	penicilin vezoči proteini (angl. penicillin binding proteins)
PDR	pan-rezistenten (angl. pandrug-resistant)
TZP	piperacilin/tazobaktam
QC	kontrola kakovosti (angl. quality control)
QRDR	regija kinolonskih odpornostnih determinant (angl. quinolone resistance determining region)
R	neobčutljiv ali odporen (angl. resistant)
S	občutljiv (angl. sensitive)
TSI	agar trojni sladkor z železom (angl. triple sugar iron)

1 UVOD

Pseudomonas aeruginosa je ubikvitaren, aeroben, po Gramu negativen, nefermentativen bacil. Je pomemben humani oportunistični patogen, ki primarno povzroča infekcije pri imunokompromitiranih osebah, in je eden od pomembnih povzročiteljev bolnišničnih okužb (Breidenstein in sod., 2011). Bakterija *P. aeruginosa* povzroča širok razpon okužb, je ena od glavnih povzročiteljic bolnišničnih okužb dihal, pogosta povzročiteljica okužb urinarnega trakta, seps (Golle, 2006) ter okužb ran in opeklin (Müller-Premru, 2002). Pri osebah z neokrnjeno odpornostjo te bakterije redko povzročajo okužbe. Izvenbolnišnične okužbe, ki jih povzroča *P. aeruginosa*, so najpogostejše okužbe kože in okužbe povrhnjih struktur očesa (Golle in sod., 2006).

P. aeruginosa ima izjemno sposobnost prilagajanja okoljskim razmeram, ki je posledica velikih genetskih zmožnosti tega organizma (Sardelić in Bedenić, 2009). Te bakterije so nezahtevne glede pogojev rasti, kar jim skupaj z odpornostjo proti fizikalnim in kemičnim vplivom omogoča veliko sposobnost preživetja (Golle in sod., 2006). Velik problem pri zdravljenju okužb, ki jih povzroči bakterija *P. aeruginosa*, je njena odpornost proti protimikrobnim zdravilom različnih skupin, ki oteži, podaljša in podraži zdravljenje. *P. aeruginosa* ima visoko naravno odpornost, ki je posledica kombinacije nizke prepustnosti zunanje membrane in sekundarnih mehanizmov odpornosti, kot sta aktiven efluks in kromosomske AmpC betalaktamaze (Strateva in Yordanov, 2009). Naravna odpornost tega organizma proti velikemu številu antibiotikov je omejila izbor učinkovitih antibiotikov na protipseudomonasne peniciline, cefalosporine III. in IV. generacije, karbapeneme, fluorokinolone in aztreonam. Aminoglikozidi se ne priporočajo v monoterapiji, temveč kot del kombinirane terapije za zdravljenje resnih okužb (Gužvinec in sod., 2012). Vendar pa lahko *P. aeruginosa* zlahka pridobi nove lastnosti in razvije odpornost tudi proti antibiotikom, ki se uporabljajo za zdravljenje okužb, ki jih povzroča ta bakterija (Breidenstein sod., 2011). Odpornost je lahko trajna ali začasna, npr. posledica adaptacije na pogoje v gostitelju ali celo adaptacije na samo antibiotično zdravljenje. Pogosto se odpornost razvije med samim zdravljenjem, kar lahko resno ogrozi zdravljenje teh okužb (Poole, 2011). Pridobljena odpornost v tem mikrobu je lahko posledica mutacij (npr. mutacijskih sprememb, ki vodijo do povečane ekspresije črpalk s širokim spektrom

substratov, derepresije ali spremembe AmpC betalaktamaze, zmanjšane permeabilnosti zunanje membrane in spremembe antibiotičnih tarč) in/ali pridobitve rezistenčnih genov (npr. genov za sekundarne betalaktamaze, aminoglikozid-modificirajoče encime in 16S rRNA metilaze) preko horizontalnega genskega prenosa. Nadalje, nagnjenost bakterije *P. aeruginosa*, da *in vivo* raste v obliki proti antibiotikom izredno odpornih biofilmov in pojav hipermutatorskih sevov še dodatno ogrožata zdravljenje okužb, ki jih povzroča ta mikrob (Poole, 2011).

P. aeruginosa predstavlja fenomen bakterijske odpornosti, saj ima lahko skoraj vse znane mehanizme protimikrobne odpornosti. Nadalje, ti mehanizmi pogosto obstajajo in delujejo simultano, zato niti ne preseneča pojav večkratno odpornih sevov (Strateva in Yordanov, 2009). Zaradi vse večje razširjenosti izolatov *P. aeruginosa*, odpornih proti več antibiotikom iz različnih skupin, in pomanjkanja novih učinkovitih antibiotikov se vse bolj v uporabo vračajo starejši antibiotiki iz skupine polimiksinov, ki so jih v preteklosti opuščali zaradi poročil o toksičnosti. Tako se v zadnjih letih zaradi vse večjega pojava večkratno odpornih sevov *P. aeruginosa* v uporabo vrača kolistin kot zadnji izbor za zdravljenje okužb, ki jih povzročajo sevi, odporni proti vsem drugim antibiotikom (Poole, 2011).

Za zdravljenje okužb, ki jih povzroča *P. aeruginosa*, je ključno pravočasno in ustrezno protimikrobno zdravljenje. Zaradi vse pogostejšega pojavljanja vse bolj odpornih sevov sta izrednega pomena redno testiranje občutljivosti izolatov bakterije *P. aeruginosa* ter spremljanje pojava in širjenja odpornih sevov. Podatki o odpornosti so pomembni za izbor ustreznega protimikrobnega zdravila za izkustveno in usmerjeno zdravljenje okužb, kar je odločilno za izid zdravljenja, še posebej pri okužbah s težjim potekom. Poleg tega sta ustrezna in preudarna uporaba antibiotikov ter dober nadzor nad pojavljanjem odpornih sevov ključna za upočasnitev širjenja odpornosti in razvoja večkratno odpornih sevov.

1.1 NAMEN DELA

- Z uporabo disk difuzijske metode in metode difuzije koncentracijskega gradienta (Etest) smo želeli določiti občutljivost 50 izolatov bakterije *P. aeruginosa*, osamljenih iz kužnin bolnikov, hospitaliziranih na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik v obdobju od junija do septembra 2009, za izbrane antibiotike: kolistin, cefepim, gentamicin, meropenem, ciprofloksacin in piperacilin/tazobaktam.
- Želeli smo preveriti ujemanje rezultatov testiranja občutljivosti z disk difuzijsko metodo z rezultati difuzije koncentracijskega gradienta (Etest).

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakovali smo, da bo delež odpornosti proti kolistinu najnižji izmed vseh izbranih antibiotikov, saj se kolistin uporablja v Sloveniji le izjemoma (kot rezervni antibiotik), ker za naše tržišče ni registriran. Proti izbranim antibiotikom smo pričakovali različno stopnjo odpornosti kot odraz različne pogostnosti uporabe posameznih učinkovin. Obenem nismo pričakovali velikih odstopanj v rezultatih testiranja občutljivosti za posamezne antibiotike z dvema različnima metodama.

2 PREGLED OBJAV

V tem poglavju bomo povzeli glavne karakteristike bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, se seznanili z antibiotiki, ki se uporabljajo za zdravljenje okužb, ki jih povzroča bakterija, ter izpostavili problematiko odpornosti bakterije *P. aeruginosa* proti številnim antibiotikom.

2.1 BAKTERIJA *Pseudomonas aeruginosa*

V tej točki bomo navedli glavne značilnosti bakterije *P. aeruginosa*, vključno z epidemiologijo ter patogenezo in klinično sliko okužb, ki jih povzroča ta bakterija.

2.1.1 Značilnosti

Bakterija *Pseudomonas aeruginosa* je oportunistično patogena, po Gramu negativna, aerobna, paličasta bakterija, ki jo uvrščamo v rod *Pseudomonas*, družino *Pseudomonadaceae*, red *Pseudomonadales*, razred *Gamma-proteobacteria*, deblo *Proteobacteria* in domeno *Bacteria* (NCBI, 2011). *P. aeruginosa* so približno 1,5–3,0 µm dolgi in 0,5–0,8 µm široki nesporogeni bacili, ki se lahko pojavljajo posamezno, v parih ali v kratkih verigah. Večinoma so giblivi z enim polarnimi bičkom (Iglewski, 1996). Imajo katalazo in večinoma tudi oksidazo. So nefermentativni bacili, za katere je značilno, da so nezahtevni glede hranil. *P. aeruginosa* izdeluje in izloča številne v vodi topne pigmente (Müller-Premru, 2002), npr. pioverdin (rumenozeleni fluorescentni pigment), piocianin (modrozeleni pigment) in piorubin (rdeči pigment) (King in sod., 1954). Pri identifikaciji pomagata pioverdin in piocianin, ki dajeta kolonijam značilno svetlo zeleno barvo (Müller-Premru, 2002).

Bakterije iz rodu *Pseudomonas* dokazujemo v različnih kužninah: brisih ran in opeklin, izmečku, aspiratih in punktatih, seču, krvi, likvorju, tkivu itd. Zadostujejo običajni načini odvzema, prenosa in shranjevanja kužnin, ki jih zasejemo na običajna bakteriološka gojišča (npr. krvni in MacConkeyjev agar) in povzročitelja osamimo. Vendar bakterij z mikroskopskim pregledom ne moremo razlikovati od drugih po Gramu negativnih bacilov. Zato jih identificiramo po videzu kolonij in z biokemičnimi testi ter jim določimo občutljivost za antibiotike. Redko uporabljamo serološko diagnostiko (Müller-Premru, 2002). Značilne ploščate, neravne kolonije s kovinskim leskom na agarju – trojni sladkor z železom (TSI, angl. triple sugar iron) skupaj z modro-zelenim pigmentom na navadnem

hranilnem agarju, ter značilen vonj po medu zadostujejo za domnevno diagnozo, ki jo potrdimo z biokemičnimi testi (specifičen vzorec metaboličnih lastnosti) (Levinson, 2006).

2.1.2 Patogeneza in klinična slika

Patogeneza okužb, ki jih povzroča *P. aeruginosa*, je kompleksna in vključuje številne virulentne dejavnike (Kayser in sod., 2005). Za vzpostavitev okužbe je najprej potrebna vezava na epitelijske celice, ki je posredovana z bički, pili, lipopolisaharidom in alginatom (Murray in sod., 2009). *P. aeruginosa* tvori dva eksotoksina – eksotoksin S in eksotoksin A, ki preprečuje beljakovinsko sintezo (Murray in sod., 2009). *P. aeruginosa* ima v zunanji membrani celične stene lipopolisaharidni endotoksin, ki povzroča simptome sepse in septičnega šoka (Levinson, 2006). Med ostalimi toksini, ki jih biosintetizira *P. aeruginosa*, najdemo pirocinin in pioverdin, ki med drugim vežeta železo in regulirata izločanje ostalih virulentnih faktorjev. *P. aeruginosa* izloča tudi hidrolitične encime, ki poškodujejo epitelij. Tukaj imajo pomembno mesto elastazi LasA in LasB, ki katalizirata razgradnjo vezivnega tkiva, ter fosfolipaza C, ki katalizira hidrolizo lecitina, glavnega fosfolipida evkariontskih organizmov (Murray in sod., 2009). *P. aeruginosa* ima tudi več sekrecijskih sistemov, med katerimi je pomemben sekrecijski sistem tipa III (imajo nekateri sevi), ki omogoča neposreden prenos eksotoksinov iz bakterijske v evkariontsko celico. Sevi s tem sistemom so bistveno bolj virulentni, okužbe s takimi sevi pa so povezane s hujšimi oblikami bolezni (Driscoll in sod. 2007). Nekateri sevi *P. aeruginosa* izločajo velike količine ekstracelularnih polisaharidov, ki dajejo kolonijam sluzast videz. Viskozen, sluzen ekstracelularni sloj polisaharidov posreduje adherenco organizma na epitelijske celice, ovira fagocitozo in difuzijo antibiotikov ter s tem olajša kolonizacijo in perzistenco organizma (Kayser in sod., 2005; Levinson, 2006). Ekspresijo večine teh virulentnih faktorjev kontrolirata dvokomponentni transkripcijski regulatorni sistem in quorum sensing sistem, ki sta tako odgovorna za preživetje in širjenje teh bakterij v gostitelju (Ben Haj in sod., 2011).

Kljub številnim virulentnim dejavnikom so okužbe s *P. aeruginosa* pri imunokompetentnih posameznikih redke (Kayser in sod., 2005). *P. aeruginosa* je oportunistični patogen, ki primarno povzroča okužbe pri imunokompromitiranih osebah, npr. pri bolnikih z

obsežnimi opeklinami ali ranami, pri bolnikih s kroničnimi boleznimi dihal, pri imunosuprimiranih osebah, pri nevtropeničnih bolnikih in bolnikih s stalnimi katetri (Levinson, 2006; Murray in sod., 2009). *P. aeruginosa* povzroča različne vrste okužb in je ena od glavnih povzročiteljic bolnišničnih okužb, zlasti pri bolnikih, ki se zdravijo na enotah za intenzivno zdravljenje (Golle in sod., 2006). *P. aeruginosa* lahko povzroča okužbe skoraj povsod v telesu, prevladujejo pa okužbe ran in opeklin, okužbe sečil, okužbe dihal (predvsem pljučnica pri bolnikih s cistično fibrozo in bolnikih priključenih na respirator) (Driscoll in sod., 2007; Levinson, 2006) in bakteriemije (Sardelić in Bedenić, 2009). Ker je bakterija *P. aeruginosa* invazivna in toksigena, lahko povzroči lokalno okužbo, ki se nato razširi sistemsko. Slednja je pogosta pri bolnikih, ki imajo okvare kože in sluznic ali so imunsko oslabljeni, npr. bolniki z levkemijo in limfomi, s kroničnimi boleznimi, po transplantacijah, pri nevtropeničnih bolnikih ipd. Pri bolnikih s sepsa je pogost endotoksični šok. Na koži bolnikov s sepsa pogosto najdemo nekrotične spremembe, ki so posledica razmnoževanja bakterij v žilnih stenah (Müller-Premru, 2002). Pri osebah z neokrnjeno odpornostjo redko povzročajo okužbe (Golle in sod., 2006). Pri imunokompetentnih osebah povzroča večinoma lokalne okužbe kože, kot sta folikulitis in okužba v zunanjem sluhovodu, ki nastaneta po kopanju v kopališčih. Pri imunsko oslabljenih bolnikih, zlasti diabetikih in starejših, je lahko okužba v zunanjem sluhovodu huda in se razširi v globlja tkiva, možganske živce in kosti, tudi v meninge, ter povzroči osteomielitis in meningitis. Na očesu lahko *P. aeruginosa* po majhni poškodbi povzroči razjedo roženice, posebej pri uporabnikih leč (Müller-Premru, 2002). Povzroča tudi okužbe diabetičnega stopala pri sladkornih bolnikih (Bowler in sod., 2001) in endokarditis pri intravenskih uživalcih drog (Müller-Premru, 2002). *P. aeruginosa* je eden od povzročiteljev akutnih poslabšanj kronične obstruktivne pljučne bolezni (Škrgat-Kristan in sod., 2009) in pomemben patogen pri bolnikih s cistično fibrozo, pri katerih mukoidni sevi *P. aeruginosa* povzročajo kronično okužbo pljuč (Breidenstein in sod., 2011).

2.1.3 Epidemiologija

P. aeruginosa je ubikvitaren mikroorganizem, razširjen predvsem v vlažnih okoljih. Ta bakterija ima izjemno sposobnost prilagajanja na okoljske razmere, ki je posledica velikih genetskih zmožnosti tega organizma (Sardelić in Bedenić, 2009). Bakterija *P. aeruginosa* je nezahtevna glede pogojev rasti, kar ji skupaj z odpornostjo proti fizikalnim in kemičnim vplivom ter odpornostjo proti antibiotikom omogoča veliko sposobnost preživetja (Golle in sod., 2006). Najdemo jih skoraj povsod v naravi – v vodi, prsti, na rastlinah, razpadajočem organskem materialu pa tudi v kopelih, bazenih, na cvetličnih šopkih, razkužilih, tekočinah za izpiranje, kapljicah za oči, lijakih in straniščnih školjkah, na surovem sadju in zelenjavi ipd. (Müller-Premru, 2002; Murray in sod., 2009). Pogosto so s to bakterijo kontaminirane oprema za anestezijo, naprave za dializo, inhalatorji, respiratorji (Levinson, 2006). Potencialen vir infekcije so lahko tudi okuženi ali kolonizirani bolniki (Kayser in sod., 2005) in medicinsko osebje, ki prenaša organizem z rokami in kontaminiranimi napravami (Müller-Premru, 2002). Pri zdravih ljudeh je redko del normalne flore, pri hospitaliziranih bolnikih pa stopnja kolonizacije s *P. aeruginosa* pogosto presega 50 %, kolonizacija sama pa je pogosto predstopnja okužbe (Golle in sod., 2006).

2.2 ANTIBIOTIKI ZA ZDRAVLJENJE OKUŽB, KI JIH POVZROČA BAKTERIJA

Pseudomonas aeruginosa

Antibiotiki so snovi, ki s svojim delovanjem ovirajo razmnoževanje mikroorganizmov oziroma preprečujejo njihovo rast. V osnovi so antibiotiki naravne substance in so proizvod živih celic (Madigan in Martinko, 2006). Navadno jih izdelujejo glive in bakterije v tekmovanju za prostor in hranilne snovi, da z njimi preprečijo rast in razmnoževanje drugih gliv in bakterij. Antibiotiki so učinkoviti za zdravljenje bakterijskih in glivnih (antimikotiki) okužb, niso pa primerni za uničevanje parazitov in virusov. Naravni antibiotiki navadno ne ustrezajo vsem zahtevam »idealnega« antibiotika. Njihovo biološko uporabnost pogosto optimiziramo s farmacevtsko-kemijsko modifikacijo osnovne molekule ali s sintezo ustreznih farmacevtskih oblik s tehnološkimi postopki (Walsh, 2003). V novejšem času se zato vse bolj uveljavljajo sintetične in polysintetične različice naravnih antibiotikov, t. i. kemoterapevtiki, z izboljšanimi protimikrobnimi in

farmakološkimi lastnostmi (Kotnik, 2002). Čeprav ločimo med antibiotiki in kemoterapevtiki, bomo v diplomski nalogi zaradi boljše preglednosti za vse učinkovine uporabljali izraz antibiotiki.

Na uporabnost antibiotikov vplivajo njihove lastnosti. Značilnosti dobrega antibiotika so selektivna toksičnost, dolga razpolovna doba v plazmi, dobro prodiranje v medceličnino, celice in likvor, šibka vezava z beljakovinami v plazmi in v medceličnini, možnost peroralnega jemanja, malo stranskih učinkov pri zdravljenju in širok spekter delovanja. Te lastnosti povečajo uporabnost, lahko pa se npr. prav zaradi širokega spektra delovanja in pogostejše rabe antibiotika razvije odpornost proti antibiotiku (Kotnik, 2002).

Antibiotike razdelimo v skupine glede na mehanizme delovanja in kemično zgradbo. Po učinkih na bakterije so baktericidni in bakteriostatični. Baktericidni antibiotiki poškodujejo mikroorganizem tako, da se ni več zmožen razmnoževati oz. povzročijo smrt bakterijske celice, medtem ko bakteriostatični razmnoževanje samo zavrejo oz. preprečijo rast bakterij (Kotnik, 2002; Walsh, 2003).

Antibiotiki imajo v bakterijski celici različna tarčna mesta. Tarča delovanja antibiotikov so encimi in metabolni procesi, ki so ključni za normalno delovanje bakterijske celice. Za selektivno delovanje antibiotikov v človeškem gostitelju je pomembno, da antibiotiki delujejo na tarče, ki so prisotne v bakterijah, v gostitelju pa jih ne najdemo, oz. v primeru, da se tarče antibiotikov nahajajo tako v bakteriji kot tudi v gostitelju, morajo med njimi obstajati zadostne razlike, da je mogoča selektivna inhibicija (Walsh, 2003). Glede na tarče delovanja oziroma glede na mehanizem delovanja razlikujemo štiri vrste antibiotikov, in sicer takšne, ki preprečujejo sintezo celične stene, ki delujejo na sintezo znotrajceličnih beljakovin, ki vplivajo na sintezo jedrnih kislin in takšne, ki ovirajo dejavnosti, povezane s citoplazemsko membrano (Kotnik, 2002).

Za zdravljenje okužb, ki jih povzroča bakterija *P. aeruginosa*, se običajno uporabljajo betalaktami, aminoglikozidi, fluorokinoloni, zaradi vse večje prevalence večkratno odpornih izolatov in pomanjkanja novih učinkovitih antibiotikov pa se vse bolj v uporabo vračajo starejši antibiotiki iz skupine polimiksinov, predvsem kolistin, ki so jih v preteklosti opuščali zaradi poročil o toksičnosti (Poole, 2011).

2.2.1 Betalaktami

Betalaktamski antibiotiki so največja in najpogosteje uporabljena skupina protimikrobnih sredstev. K betalaktamom prištevamo antibiotike, ki imajo v molekuli betalaktamski obroč, potreben za antibakterijsko delovanje (Marolt-Gomišček, 1992), na katerega so pripete stranske verige, ki določajo protibakterijski spekter delovanja (Beović in Nadrah, 2010). V tej skupini so najpomembnejši penicilini, cefalosporini, karbapenemi, monobaktami in »zaviralci laktamaz beta« (Marolt-Gomišček, 1992). Po delovanju so betalaktamski antibiotiki baktericidni, ker zavirajo sintezo peptidoglikana oz. celične stene. Betalaktamski antibiotiki vstopajo skozi bakterijsko celično steno in se vežejo na encime transpeptidaze-penicilin vezoči proteini (PBP iz angl. penicillin binding proteins), ki so na citoplazemski membrani in so potrebni za zamreženje sestavin bakterijske stene. Z vezavo na proteine PBP preprečijo njihovo delovanje in tako je postopek zamreženja celične stene (transpeptidacije) prekinjen (Kotnik, 2002). Ker ne pride do transpeptidacije, ki zagotavlja rigidnost celične stene, bakterije postanejo zelo občutljive za lizo. Poleg tega pride do nakopičenja osnovnih sestavin, kar sproži avtolitični sistem, ki celico razkroji (Brooks in sod., 2010). Betalaktami imajo le zmeren učinek na evkariontske celice, saj te ne vsebujejo peptidoglikana v celični steni, zato peptidoglikan oz. njegova sinteza predstavlja idealno tarčo za delovanje antibiotikov (Madigan in Martinko, 2006). Antibakterijski spekter betalaktamov je različen. Delujejo predvsem na grampozitivne bakterije, s sintetičnimi načini pa jih lahko naredimo primerne tudi za ubijanje gramnegativnih bakterij. Učinek betalaktamskih antibiotikov lahko preprečijo bakterijski encimi betalaktamaze. Če betalaktamaze razgradijo betalaktamski obroč, antibiotik izgubi antibakterijsko aktivnost (Kotnik, 2002).

2.2.1.1 Penicilini

Penicilini so najbolj razširjena skupina antibiotikov. Zanje je značilen betalaktamski obroč, na katerega se veže petčlenski obroč, ki vsebuje žveplo, nanj pa so lahko pripeti različni radikali, ki določajo temeljne farmakološke lastnosti zdravil (Brooks in sod., 2010). V to skupino sodi tudi prvi antibiotik penicilin (penicilin G), ki ga je leta 1929 odkril Alexander Fleming pri plesni *Penicillium notatum*. Danes obstaja vrsta plosintetičnih in sintetičnih izpeljank, ki imajo ugodne farmakokinetične in antibakterijske lastnosti. Posebno

pomembno je, da so iz prej sorazmerno ozko delujočih penicilinov razvili mnoge širokospektralne derivate in da so izdelali peniciline, ki jih lahko bolniki prejemajo oralno (Kotnik, 2002). Danes imamo poleg naravnih in protistafilokoknih penicilinov na voljo še peniciline s širokim spektrom delovanja – aminopeniciline in peniciline z razširjenim spektrom delovanja, ki imajo najširši spekter delovanja med penicilini in jih zaradi njihove aktivnosti proti *P. aeruginosa* imenujemo tudi protipseudomonasni penicilini. Za zdravljenje okužb, ki jih povzroča *P. aeruginosa*, se uporabljajo penicilini z razširjenim spektrom delovanja, in sicer karboksipenicilini (npr. karbenicilin, tikarcilin) ter ureidopenicilini (npr. piperacilin, mezlocilin, azlocilin), proti drugim penicilinom je bakterija *P. aeruginosa* naravno odporna (Miller, 2010). Medtem ko karboksipenicilini v Sloveniji niso več registrirani, se ureidopenicilini zaradi širokega protimikrobnega delovanja (delujejo na večino grampozitivnih in gramnegativnih aerobnih in anaerobnih bakterij) pogosto uporabljajo. Za zdravljenje okužb, ki jih povzroča *P. aeruginosa*, se uporablja predvsem piperacilin v kombinaciji s tazobaktamom, zaviralcem betalaktamaz, ki zavre delovanje različnih betalaktamaz. Piperacilin s tazobaktamom je antibiotik, ki ima enega najširših spektrov delovanja in je zato primeren za izkustveno zdravljenje bolnišničnih okužb, še posebej tistih, pri katerih pričakujemo mešano bakterijsko floro (Beović in Nadrah, 2010), in bolnišničnih okužb, ki jih predvidoma povzročajo proti več antibiotikom odporne gramnegativne aerobne bakterije (Čižman in Beović, 2007). V klinični medicini se penicilini široko uporabljajo, saj imajo manj neposredne toksičnosti kot večina drugih protimikrobnih zdravil. Najresnejši stranski učinki nastanejo zaradi preobčutljivosti (Brooks in sod., 2010).

2.2.1.2 Cefalosporini

Cefalosporini so polsintetični antibiotiki, ki izhajajo iz cefalosporina C, naravnega antibiotika, izoliranega iz glive *Cephalosporium acremonium* (Marolt-Gomišček, 1992). Zanje je značilen betalaktamski obroč, na katerega se veže šestčlenski obroč, ki vsebuje žveplo. Naravni cefalosporini imajo nizko antibakterijsko aktivnost, vendar pripenjanje različnih stranskih skupin tvori ogromno količino zdravil z različnimi farmakološkimi lastnostmi in antimikrobnim spektrom ter aktivnostjo (Brooks in sod., 2010). Delujejo podobno kot penicilini, zaradi podobne zgradbe pa imajo tudi podobne lastnosti in slabosti

(Kotnik, 2002). Cefalosporine najpogosteje uporabljamo kot zamenjavo za penicilinske antibiotike (npr. pri bolnikih, ki so preobčutljivi na peniciline) (Beović in Nadrah, 2010).

Cefalosporinska skupina je v zadnjih letih doživela velik razvoj. Na trgu so številni polysintetični derivati s specifičnimi antibiotičnimi učinki ali s spremenjeno farmakokinetiko (Marolt-Gomišček, 1992). Cefalosporine lahko glede na protimikrobni spekter razdelimo v pet generacij (Beović in Nadrah, 2010). Prva generacija deluje predvsem na grampozitivne bakterije, medtem ko se spekter delovanja cefalosporinov višjih generacij širi proti gramnegativnim bakterijam, povečuje se aktivnost proti anaerobom in odpornim mikrobom, učinkovitost proti grampozitivnim mikroorganizmom pa se zmanjšuje (Murray in sod., 2009). Najvišje generacije (IV. in V.) imajo najširši spekter delovanja (Beović in Nadrah, 2010). Bakterija *P. aeruginosa* je proti cefalosporinom I. in II. generacije naravno odporna. Za zdravljenje okužb, ki jih povzroča *P. aeruginosa*, se uporabljajo nekateri širokospektralni cefalosporini III. in IV. generacije. Cefalosporini tretje generacije (npr. ceftazidim, cefoperazon, cefpiramid, cefotaksim, ceftriakson) so zelo odporni proti betalaktamazam gramnegativnih bakterij (Marolt-Gomišček, 1992) in imajo poudarjeno učinkovanje proti gramnegativnim bakterijam, učinkovitost proti grampozitivnim bakterijam pa je slabša, zlasti pri predstavnikih tretje generacije, ki so učinkoviti proti *P. aeruginosa*. Cefalosporine tretje generacije uporabljamo predvsem za zdravljenje hudih zunajbolnišničnih in bolnišničnih okužb. Proti *P. aeruginosa* delujejo ceftazidim (najboljše delovanje), cefoperazon in cefpiramid. Četrta generacija (cefepim, cefpirom) združuje učinkovitosti vseh generacij, učinkovitost proti grampozitivnim kokom pa dopolnjuje učinkovitost proti gramnegativnim bakterijam, vključno z bakterijo *P. aeruginosa*. Predstavnike četrte generacije cefalosporinov – predvsem cefepim – uporabljamo za zdravljenje najtežjih bolnišničnih okužb. Najširši protimikrobni spekter *in vitro* ima peta generacija cefalosporinov. Najpomembnejša predstavnika pete generacije cefalosporinov sta ceftobiprol, ki še ni v klinični rabi, in ceftarolin. Protimikrobni spekter je podoben tretji generaciji cefalosporinov, posebnost pa je učinkovitost proti MRSA (Beović in Nadrah, 2010). Medtem ko ceftarolin kaže omejeno aktivnost proti *P. aeruginosa*, ceftobiprol kaže dobro *in vitro* delovanje proti temu mikrobu in ga proučujejo kot možnost za zdravljenje febrilne nevtropenije (Leinum in Boaser,

2011), za zdravljenje bolnikov s pljučnico ter bolnikov z zapletenimi okužbami kože in mehkih tkiv (Fritsche in sod., 2008; Stein, 2007).

2.2.1.3 Karbapenemi

Karbapenemi (imipenem, meropenem, doripenem, ertapenem) so polsintetične biciklične betalaktamske spojine, ki izhajajo iz tienamicina, naravnega antibiotika, izoliranega iz *Streptomyces cattleya*. Imajo podobno zgradbo kot penicilini, le da je v petčlenskem obroču, ki je vezan na betalaktamski obroč, žveplov atom zamenjan z ogljikom (Khan in Shakil, 2009). So baktericidni in delujejo na enak način kot drugi betalaktami, njihov spekter delovanja pa je za zdaj najširši med znanimi zaviralci sinteze celične stene (Kotnik, 2002). Učinkoviti so proti večini grampozitivnih in gramnegativnih aerobnih in anaerobnih bakterij. Delujejo proti *P. aeruginosa* in večini pripadnikov družine *Enterobacteriaceae*, dobro pa učinkujejo tudi proti večkratno odpornim bakterijam (Khan in Shakil, 2009). Na *P. aeruginosa* delujejo imipenem, meropenem in doripenem (ima nekoliko nižje vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij), medtem ko ertapenem ni učinkovit. Omenjene antibiotike uporabljamo le za zdravljenje najhujših bolnišničnih okužb, predvsem tistih, ki jih povzroča mešana bakterijska flora (Beović in Nadrah, 2010). Karbapenemi so zaradi svoje strukture zelo odporni proti betalaktamazam, encimom, ki predstavljajo poglavitni mehanizem odpornosti bakterij proti betalaktamskim antibiotikom, vendar pa so že osamili nekatere bakterije (enterobakterije, *P. aeruginosa*), odporne proti karbapenemom. Pri teh bakterijah je prisoten gen za metalobetalamazo, ki hidrolizira karbapeneme (Khan in Shakil, 2009).

2.2.1.4 Monobaktami

Monobaktami so betalaktamski antibiotiki z enim obročem v kemični strukturi – monocikličnim betalaktamskim obročem (Brooks in sod., 2010). Sintetizirajo jih bakterije *Chromobacterium violaceum* (Kotnik, 2002). Po delovanju so baktericidni in zavirajo gradnjo bakterijske stene. Odporni so proti številnim betalaktamazam gramnegativnih bakterij. Antibakterijski spekter delovanja monobaktamov je podoben spektru aminoglikozidov (Marolt-Gomišček, 1992; Brooks in sod., 2010). Edini predstavnik skupine monobaktamov je aztreonam. Deluje le na aerobne, gramnegativne bacile,

vkjučno s *P. aeruginosa*. Primeren je za zdravljenje najrazličnejših okužb, ki jih povzročajo občutljivi mikroorganizmi, večinoma pa za zdravljenje zapletenih bolnišničnih okužb (Beović in Nadrah, 2010), vendar le tedaj, ko poznamo povzročitelja (Marolt-Gomišček, 1992; Brooks in sod., 2010). Aztreonam kot monoterapija zaradi ozkega protimikrobnega spektra navadno ni primeren za izkustveno zdravljenje. Verjetnost navzkrižnih alergijskih reakcij z betalaktami je zelo majhna, zato ga ob alergiji uporabljamo namesto betalaktamov (Beović in Nadrah, 2010).

2.2.1.5 Zaviralci betalaktamaz

Zaviralci betalaktamaz (klavulanska kislina, sulbaktam in tazobaktam) so betalaktamske spojine, ki imajo širok antibakterijski spekter delovanja, vendar šibak protibakterijski učinek (Marolt-Gomišček, 1992). Ker je njihova protibakterijska dejavnost majhna, jih uporabljamo v različnih kombinacijah s penicilini (npr. z amoksicilinom, ampicilinom, piperacilinom) (Beović in Nadrah, 2010). Zaviralci betalaktamaz so zelo dobri inhibitorji številnih betalaktamaz. Delujejo tako, da se ireverzibilno vežejo z mnogimi betalaktamazami in jim preprečijo, da bi hidrolizirale antibiotik. Antibiotik ostane prost in normalno deluje na bakterije (Brooks in sod., 2010).

2.2.2(Fluoro)kinoloni

Kinoloni so sintetične učinkovine s širokim spektrom delovanja, ki se pogosto uporabljajo v klinični in veterinarski medicini. Leta 1962 je bil odkrit prvi kinolon – nalidiksična kislina, ki je učinkovita le proti gramnegativnim bakterijam (Acar in Goldenstein, 1997) in jo uporabljamo kot uroantiseptik (Beović in Nadrah, 2010). Z modifikacijo osnovne strukture so se sčasoma pojavile nove generacije kinolonov z izboljšano sistemsko aktivnostjo, odlično aktivnostjo proti številnim gramnegativnim aerobom, izboljšano farmakokinetiko, izboljšano aktivnostjo proti grampozitivnim bakterijam in aktivnostjo proti anaerobom (Bearden in Danziger, 2001). Danes kinoloni predstavljajo eno najpomembnejših skupin antibiotikov, ki jih pridobivamo sintetično (Kotnik, 2002). Glede na njihov protibakterijski spekter jih delimo v štiri generacije. V splošnem imajo predstavniki zgodnejših generacij ožji spekter delovanja. Večina kinolonov, uporabljenih v klinične namene, spada v podskupino fluorokinolonov, za katere je značilna fluoro skupina, pritrjena na centralni obroč (Bearden in Danziger, 2001).

Kinoloni delujejo baktericidno tako, da zavirajo delovanje bakterijskih topoizomeraz. Topoizomeraze so prisotne pri vseh bakterijah, tako pri grampozitivnih kot tudi pri gramnegativnih bakterijah, zato so to protimikrobne spojine s širokim spektrom delovanja (Madigan in Martinko, 2006). Kinolonski antibiotiki zavirajo delovanje topoizomeraz tipa II, in sicer sta poglavitni tarči za antibakterijsko aktivnost kinolonov DNA-giraza, ki je pomembna za kontrolo DNA topologije v procesu replikacije, rekombinacije ter transkripcije, in topoizomeraza IV, ki je prav tako vpletena v DNA replikacijo, pomembna pa je predvsem za ločitev hčerinskih kromosomov na koncu DNA replikacije (Walsh, 2003). Pri gramnegativnih bakterijah, vključno s *P. aeruginosa*, je preferenčna tarča fluorokinolonov DNA-giraza, pri grampozitivnih bakterijah pa topoizomeraza IV (Yague in sod., 2002). Ker sta pri večini bakterij prisotni tako DNA-giraza kot topoizomeraza IV (Snyder in Champness, 2003), je pomemben razvoj kinolonov novejših generacij, ki so zasnovani tako, da delujejo podobno proti obema encimoma (Hooper, 2000).

Kinoloni so znani kot zelo učinkoviti antibiotiki proti gramnegativnim bakterijam, ki so odporne proti penicilinom, cefalosporinom in aminoglikozidom (Madigan in Martinko, 2006). Na *P. aeruginosa* učinkovito deluje ciprofloksacin, v visokih odmerkih pa je učinkovit tudi levofloksacin (Beović in Nadrah, 2010).

2.2.3 Aminoglikozidi

Aminoglikozidi so skupina antibiotikov, ki imajo v osnovni kemijski zgradbi aminosladkorje, povezane z glikozidnimi vezmi. So baktericidni antibiotiki s širokim spektrom delovanja (Marolt-Gomišček, 1992). Aminoglikozidi se vežejo na receptorje na 30S podenoti bakterijskega ribosoma in s tem preprečijo vezavo mRNA na ribosom in oblikovanje iniciacijskega kompleksa (Bedenić, 2009). S tem je preprečena začetna proteinska sinteza (Kotnik, 2002). Nadalje, zaradi vezave aminoglikozidov se sporočilo na mRNA ne prebere pravilno in posledično se v peptid vgradi napačna aminokislina, zato je protein nefunkcionalen in ne more vršiti svoje vloge kot encim ali strukturni element bakterijske celice. Poleg tega pripetju aminoglikozida sledita tudi razpad polisomov in njihova ločitev na monosome, nesposobne proteinske sinteze. Te aktivnosti se pojavljajo bolj ali manj hkrati, končni učinek je običajno smrt bakterijske celice (Bedenić, 2009; Brooks in sod., 2010). Hitrost in obseg baktericidnega delovanja aminoglikozidov sta

odvisna od koncentracije antibiotika; večja kot je koncentracija, hitreje in v večjem obsegu nastopi smrt bakterij (Walsh, 2003). Za aminoglikozide je značilen t. i. poantibiotični učinek – učinek aminoglikozidov je mogoče izmeriti tudi potem, ko koncentracija zdravila ni več zaznavna (Beović in Nadrah, 2010).

Aminoglikozide, npr. gentamicin, amikacin, tobramicin, netilmicin, uporabljamo za zdravljenje okužb, ki jih povzročajo aerobne gramnegativne bakterije, medtem ko pri zdravljenju okužb, ki jih povzročajo grampozitivne bakterije, niso najučinkovitejši (Walsh, 2003). Aminoglikozide uvrščamo med najbolj toksična protimikrobna zdravila (Beović in Nadrah, 2010). Ker aminoglikozidi povzročajo hude neželene stranske učinke (nefrotoksičnost, ototoksičnost), jih v terapiji čedalje bolj nadomeščajo fluorokinoloni in novi betalaktamski antibiotiki, čeprav se je v zadnjem času zaradi vse večje odpornosti bakterij na številna protimikrobna zdravila povečala predvsem poraba gentamicina (Mrhar in sod., 2005). Uporaba aminoglikozidov v monoterapiji se ne priporoča, temveč naj bi se ti uporabljali kot del kombinirane terapije za zdravljenje resnih okužb (Gužvinec in sod., 2012), npr. s širokospektralnimi betalaktamskimi antibiotiki pri izkustvenem zdravljenju hudih okužb, ki jih povzročajo občutljive gramnegativne bakterije, vključno s *P. aeruginosa*. S kombiniranjem razširimo protimikrobni spekter in morda dosežemo sinergistični učinek (Beović in Nadrah, 2010). Večinoma se uporablja gentamicin, medtem ko se amikacin in tobramicin uporabljata za usmerjeno zdravljenje bolnišničnih okužb, ki jih povzročajo proti gentamicinu odporne gramnegativne aerobne bakterije, oz. tobramicin za zdravljenje dokazanih okužb s *P. aeruginosa* (Čižman in Beović, 2007).

2.2.4 Polimiksini

Polimiksini so kationski ciklični polipeptidi, ki so jih odkrili leta 1947. Izolirali so jih iz sporogenih bacilov vrste *Bacillus polymyxa*. Poznamo več polimiksinskih antibiotikov, ki jih označujemo z A, B, C, D, E. V klinični uporabi sta polimiksin B in polimiksin E (kolistin) (Marolt-Gomišček, 1992). Za kolistin je značilna pozitivno nabita ciklična dekaeptidna molekula, vezana na maščobno kislino z α -amidno vezjo (Falagas in Kasiakou, 2005). Polimiksin B in kolistin se med seboj razlikujeta le v eni aminokislini (Michalopoulos in Falagas, 2008). Polimiksini so baktericidni antibiotiki. Delujejo

podobno kot kationski detergenti in razgrajujejo fosfolipidni dvosloj. Uporabni so za zdravljenje okužb, ki jih povzročajo gramnegativni mikroorganizmi (Kotnik, 2002).

Med polimiksini je najbolj znan kolistin. Kolistin je bil prvič izoliran iz bakterije *Bacillus polymyxa* subsp. *colistinus* na Japonskem leta 1949. V petdesetih letih prejšnjega stoletja je bil v klinični uporabi na Japonskem in v Evropi, od leta 1959 pa tudi v ZDA. V zgodnjih osemdesetih letih so ga v večini delov sveta začeli postopoma opuščati zaradi poročil o visoki incidenci nevro- in nefrotoksičnosti ter razvoja drugih, primernejših, manj toksičnih antibiotikov. Posledično se je njegova uporaba v preteklih dveh desetletjih (1980–2000) omejila na zdravljenje okužb dihal, ki jih povzročajo večkratno odporne gramnegativne bakterije pri bolnikih s cistično fibrozo (Falagas in Kasiakou, 2005; Somily 2010).

Tarča protimikrobne aktivnosti kolistina je bakterijska celična membrana. Kolistin se veže na lipopolisaharidne komponente zunanje membrane. Začetno združenje kolistina z bakterijsko membrano je posledica elektrostatičnih interakcij med kationsko polipeptidno (kolistin) in anionsko lipopolisaharidno molekulo v zunanji membrani gramnegativne bakterije in vodi do preureditve celične membrane. Kationske molekule kolistina kompetitivno izpodrinejo dvovalentne magnezijeve (Mg^{2+}) in kalcijeve (Ca^{2+}) katione, ki normalno stabilizirajo lipopolisaharidne molekule iz negativno nabitih fosfatnih skupin membranskih lipidov, kar vodi k lokalnim motnjam oz. poškodbam zunanje membrane. Rezultat tega procesa so povečana prepustnost celičnega ovoja, razlitje celične vsebine in posledično celična smrt (Falagas in Kasiakou, 2005; Yahav in sod., 2012). Poleg neposredne antibakterijske aktivnosti ima kolistin tudi močno antiendotoksinsko aktivnost. Endotoksini gramnegativnih bakterij so lipopolisaharidne molekule oziroma lipidni deli teh molekul, imenovani lipid A. Ko se kolistin veže na lipid A lipopolisaharidne molekule, jo hkrati nevtralizira in tako prepreči patofiziološke efekte. Mehanizem je pomemben za *in vivo* protimikrobno delovanje, saj prepreči endotoksinom, da bi inducirali endotoksični šok preko sprostitve citokinov (Falagas in Kasiakou, 2005).

Kolistin kaže dobro baktericidno aktivnost proti številnim gramnegativnim aerobnim bacilom, vključno proti večkratno odpornim sevom bakterij *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp. in *Enterobacter* spp., ni pa aktiven proti gramnegativnim in grampozitivnim aerobnim kokom, grampozitivnim aerobnim bacilom, vsem anaerobom,

glivam in parazitom. Poleg kolistina (polimiksin E) je v klinični uporabi le še polimiksin B. Polimiksin B ima enak mehanizem delovanja in odpornosti kot kolistin, vendar pa kaže slabšo učinkovitost proti nekaterim bakterijam, vključno s *P. aeruginosa*. Je tudi bolj toksičen od kolistina (Falagas in Kasiakou, 2005).

Do nedavnega je bila uporaba polimiksinov omejena predvsem zaradi nefrotoksičnosti in nevrotoksičnosti. Pojav večkratno odpornih sevov gramnegativnih bakterij, odpornih proti večini dostopnih antibiotikov (penicilinom, cefalosporinom, karbapenemom, aminoglikozidom in kinolonom), in pomanjkanje antibiotikov, učinkovitih proti tem bakterijam, pa sta pripeljala do ponovne uporabe polimiksinov, predvsem kolistina. V klinični praksi se večinoma uporabljajo kot rezervni antibiotik, primarno za zdravljenje hudih okužb, ki jih povzročajo večkratno odporne gramnegativne bakterije, občutljive le še za ta antibiotik (Michalopoulos in Falagas, 2008; Li in sod., 2006). V Sloveniji kolistin v zadnjem času uporabljamo klinično predvsem za zdravljenje okužb z večkratno odpornimi sevi *P. aeruginosa* in *Acinetobacter* spp. (Beović in Nadrah, 2010).

V zadnjem desetletju so bile opravljene številne raziskave o stranskih učinkih predvsem neuro- in nefrotoksičnosti kolistina, ki kažejo, da je incidenca toksičnosti oz. pojav hudih stranskih učinkov mnogo manjši, kot so poročali v preteklosti. Možno pojasnilo za opažene razlike med starejšimi in nedavnimi poročili so: izboljšano podporno zdravljenje, monitoring ledvične funkcije, izogibanje hkratnemu predpisovanju drugih nenefrotoksičnih agensov in nekateri drugi ukrepi (Falagas in Kasiakou, 2005; Li in sod., 2006). Številne študije poročajo tudi o sinergističnem delovanju kolistina z drugimi antibiotiki (npr. piperacilin, aztreonam, ceftazidim, imipenem, ciprofloksacin, amikacin) proti večkratno odpornim gramnegativnim bakterijam, zlasti večkratno odpornim sevom *P. aeruginosa*. Take kombinacije so učinkovitejše in/ali zmanjšujejo možnost nastanka odpornosti (Falagas in Kasiakou, 2005; Linden in sod., 2003).

2.3 ODPORNOST BAKTERIJE *Pseudomonas aeruginosa* PROTI ANTIBIOTIKOM

Odkritje antibiotikov pomeni enega od najpomembnejših mejnikov v razvoju in napredku medicine. Vendar njihova uporaba ni samo močno zmanjšala smrtnosti zaradi infekcijskih bolezni, ampak na žalost tudi postopno razvila vse več bakterijskih sevov, ki so odporni (rezistentni) proti posameznim ali celo več različnim antibiotikom (Seme, 2002). Antibiotiki so bili prisotni v naravi skozi celotno evolucijo mikrobov, zato ni presenetljiv razvoj mehanizmov odpornosti proti tem spojinam že pred uporabo antibiotikov v kliničnem kontekstu. Po uvedbi antibiotikov za zdravljenje infekcijskih bolezni pa so bakterije doživele pospešeno evolucijo (Fernández in sod., 2011). Selekcijo odpornih bakterijskih sevov namreč omogoča predvsem množična in mnogokrat nekritična uporaba antibiotikov (Seme, 2002).

P. aeruginosa ima izjemno sposobnost prilagajanja na okoljske razmere. Ta nenavadna sposobnost prilagajanja je deloma posledica velikih genetskih zmožnosti tega organizma. Genom pseudomonasa je izredno velik (vsebuje 6,3 milijona baznih parov in kodira več kot 5500 genov) in vsebuje veliko število regulatornih genov in genov, ki kodirajo sisteme efluksa (Sardelić in Bedenić, 2009). Velika genetska zmogljivost lahko pojasni njegovo izredno sposobnost prilagajanja različnim okoljskim pogojem, vključno s sposobnostjo razvoja odpornosti ob ekstenzivni uporabi antibiotikov (Lambert, 2002). Velik problem pri zdravljenju okužb, ki jih povzroča bakterija *P. aeruginosa*, je njena odpornost proti antibiotikom različnih skupin, ki oteži, podaljša in podraži zdravljenje. Odpornost bakterije *P. aeruginosa* proti antibiotikom je multifaktorialna (Poole, 2005) in je rezultat delovanja številnih mehanizmov odpornosti, najpogosteje: (1) neprepustnosti oz. zmanjšane prepustnosti celične membrane za antibiotik, (2) aktivnega izčrpavanja antibiotika iz bakterijske celice z aktivnim prenosom, (3) encimske inaktivacije antibiotika (4) in spremembe tarčnega mesta oz. prijemališča antibiotika (Sardelić in Bedenić, 2009).

P. aeruginosa ima visoko naravno (intrinzično) odpornost proti protimikrobnim sredstvom (Sardelić in Bedenić, 2009). O naravni odpornosti bakterij proti antibiotikom govorimo, kadar je vsa bakterijska vrsta (ali rod) odporna proti neki skupini antibiotikov (Seme, 2002). Naravno odpornost pogojujejo genetske, strukturne in fiziološke značilnosti mikroorganizmov. Razlog za visoko naravno odpornost bakterije *P. aeruginosa* je

sinergistično delovanje kombinacije nizke permeabilnosti zunanje membrane (posledica neučinkovitih porinskih proteinov v zunanji membrani) in učinkovitega izčrpavanja antibiotičnih molekul (konstitutivno izražanje različnih efluks sistemov s širokim spektrom substratov, npr. MexAB-OprM in MexXY-OprM), ki omejujeta akumulacijo antibiotikov v celici ter produkcije encimov (npr. endogena AmpC β -laktamaza), ki hidrolizirajo antibiotike. Ti intrinzični mehanizmi so del genotipa *P. aeruginosa* in vodijo do zelo visokih izhodiščnih minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK), zaradi česar je veliko antibiotikov neučinkovitih proti tej bakteriji (Breidenstein in sod., 2011). *P. aeruginosa* je naravno odporen proti številnim protimikrobnim zdravilom iz različnih antibiotičnih razredov, proti številnim betalaktamom (proti penicilinu G, antistafilokoknim penicilinom, aminopenicilinom (vključno v kombinaciji z zaviralci β -laktamaz), cefalosporinom prve in druge generacije), tetraciklinom, kloramfenikolu, trimetoprim/sulfametoksazolu, makrolidom (Sardelić in Bedenić, 2009) in večini kinolonov (Driscoll in sod., 2007).

Poleg tega, da ima *P. aeruginosa* visoko naravno odpornost, lahko pridobi nove lastnosti in tako postane še bolj odporen (Breidenstein in sod., 2011). Pridobljena odpornost bakterij proti antibiotikom je za razliko od naravne prisotna samo pri posameznih sevih določene bakterijske vrste ali rodu (Seme in Poljak, 2001). Taka odpornost je nepredvidljiva. Lahko je posledica mutacije kromosomskega ali plazmidnega gena posamezne bakterijske celice (mutacijska odpornost) ali pridobitve nove genetske informacije z genskim prenosom (horizontalen genski prenos). Geni z zapisom za odpornost proti antibiotikom se lahko nahajajo na različnih mobilnih DNA elementih – plazmidih, transpozonih, integronih, profagih in rezistenčnih otokih, ki jih lahko bakterije pridobijo s horizontalnim prenosom v procesu konjugacije, transformacije ali transdukcije. To lahko privede celo do večkratne odpornosti zaradi plazmidov, ki lahko vsebujejo multiple rezistenčne kasete. Pri *P. aeruginosa* horizontalen prenos v glavnem vpliva na aminoglikozidno in β -laktamsko odpornost, opažen pa je bil tudi pri nekaterih drugih razredih antibiotikov. Druga oblika pridobljene odpornosti je mutacijska odpornost. Intrinzični mehanizmi so lahko stabilizirani ali izboljšani z mutacijami. Frekvenca spontanah mutacij variira med antibiotiki s frekvencami odpornosti v razponu od 10^{-6} do 10^{-9} za posamezne antibiotike. Stopnja mutacij pa lahko še dodatno naraste pod določenimi pogoji, npr. v prisotnosti snovi, ki poškodujejo DNA, ali med rastjo v biofilmu. Mutacijske spremembe, ki vplivajo

na odpornost in onemogočajo zdravljenje okužb z dostopnimi antibiotiki, vključujejo mutacije, ki vodijo k povečani ekspresiji efluks črpalk, zmanjšanju privzema antibiotikov, hiperprodukciji β -laktamaz in spremembam tarčnih mest antibiotikov (Breidenstein in sod., 2011).

Poleg dokaj dobro proučenih mehanizmov naravne in pridobljene odpornosti, ki sta karakterizirani z ireverzibilnim fenotipom in sta neodvisni od okoljskih pogojev, se vse več govori o t. i. adaptivni odpornosti. Adaptivna odpornost je avtoregulatorni pojav, karakteriziran z indukcijo odpornosti proti enemu ali več protimikrobnim učinkovinam kot odziv na prisotnost specifičnega signala in preobrata nazaj v občutljivi tip v njegovi odsotnosti (Fernández in sod., 2011). Adaptivna odpornost je inducibilna in odvisna od prisotnosti induktorja. Čeprav je bila prvič opažena leta 1966, sprva niso opazili nobene pomembne povezave med adaptivno odpornostjo in kliničnim izidom, zato ji niso posvečali veliko pozornosti (Breidenstein in sod., 2011). Pozneje so odkrili, da po predhodni izpostavitvi subinhibitornim koncentracijam antibiotika bakterije postanejo odpornejše proti nadaljnjim izpostavitvam antibiotiku, v nekaterih primerih pa tudi proti drugim antibiotikom iz istega ali celo drugih razredov. Prihod genomske dobe je omogočil širše razumevanje kompleksnega pojava adaptivne odpornosti. Danes vemo, da lahko ta tip odpornosti poleg antibiotikov inducirajo tudi številni drugi sprožitveni dejavniki, vključno z biocidi, okoljskimi pogoji (npr. pH, anaerobioza, prisotnost kationov, vir ogljika) kot tudi socialne aktivnosti (npr. formacija biofilma in rojenje). Ti dejavniki uravnavajo ekspresijo številnih genov, ki vpliva na efluks črpalke, celični ovoj in encime (Fernández in sod., 2011). Sposobnost *P. aeruginosa*, da se prilagodi različnim pogojem v okolju, je skladna z velikim repertoarjem regulatornih genov (9,4 % vseh genov) v njegovem genomu (Breidenstein in sod., 2011). Prisotnost inducibilnega faktorja vodi do določenih sprememb v vzorcu genske ekspresije in omogoča bakterijam, da vzdržijo nadaljnjo izpostavitve letalnim koncentracijam antibiotikov. Čeprav je adaptivna odpornost v osnovi reverzibilen proces in se po odstranitvi inducirajočega sredstva občutljivost večinoma povrne v prvotno stanje, v nekaterih primerih prvotna stopnja občutljivosti ni dosežena. Domnevajo, da je zmanjšana občutljivost zaradi ene ali več adaptivnih sprememb lahko stabilizirana z mutacijo in da enake vrste genetskih dogodkov vodijo tako do adaptacije (preko disregulacije enega ali več rezistenčnih genov) kot tudi do postopnih (t. i. creeping

baseline) mutacij. Zaskrbljujoče je, da lahko adaptivno odpornost sprožijo okoljski pogoji v gostitelju in celo samo antibiotično zdravljenje. Indukcija adaptivne odpornosti je pomemben kliničen problem, saj se odporni izolati lahko pojavijo med antibiotičnim zdravljenjem, kar je posledično povezano z neuspehom zdravljenja. Vse to lahko pojasni opažanja, da *in vitro* učinkovitost ne napoveduje *in vivo* uspešnosti zdravljenja okužb, ki jih povzroča *P. aeruginosa*. Zaradi prehodne narave je ta tip odpornosti težko ugotoviti in v številnih primerih ostane neupoštevana (Fernández in sod., 2011). Tako kljub doseganju koncentracij antibiotikov med zdravljenjem, ki bi morale biti terapevtsko učinkovite, zdravljenje ni uspešno. To še zlasti drži, ker se koncentracija antibiotika med zdravljenjem spreminja in v določenih točkah zdravljenja pade v subinhibitorno območje. Pojav adaptivne odpornosti je še posebej zaskrbljujoč v kliničnih ustanovah, kjer *P. aeruginosa* raste v biofilmih, npr. pri pacientih s cistično fibrozo, pri okužbah povezanih s katetri ali pljučnico pri pacientih priključenih na respirator (Breidenstein in sod., 2011).

2.3.1 Odpornost proti betalaktamom

Odpornost proti β -laktamom je lahko posredovana z različnimi mehanizmi, najpogosteje encimsko razgradnjo antibiotikov z β -laktamazami, izčrpavanjem antibiotikov s kromosomsko kodiranimi efluks mehanizmi in zmanjšanim vnosom antibiotikov zaradi izgube porinov zunanje membrane (Poole, 2011).

2.3.1.1 β -laktamaze

Najpogostejši mehanizem odpornosti gramnegativnih bakterij, vključno z bakterijo *P. aeruginosa*, proti betalaktamskim antibiotikom je tvorba hidrolitičnih encimov, β -laktamaz (Poole, 2011). Ti encimi, ki so pri gramnegativnih bakterijah zelo številni in raznoliki, inaktivirajo betalaktamske antibiotike s hidrolizo betalaktamskega obroča (Seme in Poljak, 2001). Ločimo 4 (A-D) molekularne razrede β -laktamaz; v razredih A, C in D so serinske β -laktamaze, za katere je značilna aminokislina serin v aktivnem mestu encima, s pomočjo katere cepijo amidno vez v betalaktamskem obroču, v razredu B pa se nahajajo t. i. metalo-betalaktamaze (MBL; iz angl. metallo β -lactamases), ki za svoje delovanje potrebujejo kofaktor (večinoma cink) (Bush in Jacoby, 2010; Poole, 2011). *P. aeruginosa* lahko producira betalaktamaze iz vseh štirih glavnih molekularnih razredov (Basak in sod., 2009; Poole, 2011). Pri gramnegativnih bakterijah se β -laktamaze nahajajo v periplazemskem

prostoru. Tvorba betalaktamaz je večinoma majhna. Ker je v periplazemskem prostoru prisotna tudi majhna količina antibiotika, lahko že majhna količina encima zagotavlja zelo učinkovit mehanizem odpornosti proti tistim betalaktamskim antibiotikom, ki jih je mogoče zlahka in hitro hidrolizirati. Povečana tvorba encima ali oviran vstop antibiotika v bakterijsko celico zaradi sprememb porinov pa omogočata odpornost tudi proti tistim betalaktamskim antibiotikom, pri katerih je hidroliza počasnejša (Seme in Poljak, 2001).

P. aeruginosa ima kromosomske gene *ampC* za inducibilno AmpC β -laktamazo (cefalosporinaza) iz razreda C, ki je pogosto povezana z odpornostjo pri kliničnih izolatih, nedavno pa je bila odkrita še kromosomska β -laktamaza (oksacilinaza) iz razreda D, PoxB – njena klinična vloga je vprašljiva (Poole, 2011). AmpC je β -laktamaza s širokim spektrom delovanja, ki v visokih koncentracijah zlahka hidrolizira in tako zagotovi odpornost proti večini protipseudomonasnih betalaktamov. Stopnja in razpon odpornosti variirata z AmpC ekspresijo (Poole, 2005). Običajno je *ampC* gen, ki nosi zapis za AmpC β -laktamazo pod vplivom represorske regije gena (AmpR regulator in drugi dodatni proteini) in se skorajda ne izraža (Fernández in sod., 2011). Encim se tvori v nizkih koncentracijah in določa naravno odpornost proti aminopenicilinom in večini zgodnjih cefalosporinov (Strateva in Yordanov, 2009). Povečana, visoka stopnja izločanja tega encima pa lahko vodi do odpornosti proti vsem betalaktamom z izjemo karbapenemov. Do tvorbe večje količine teh encimov pri *P. aeruginosa* lahko pride na dva načina, in sicer z indukcijo gena *ampC* (adaptivna odpornost – reverzibilen proces) ali mutacijo v represorski regiji gena *ampC*, ki ima za posledico stalno derepresijo *ampC* (konstitutivna odpornost) (Lister in sod., 2009). Ekspresija kromosomsko kodirane AmpC betalaktamaze je lahko inducirana s številnimi betalaktamskimi antibiotiki (Fernández in sod., 2011). Hidrolizi z encimi AmpC so podvrženi aminopenicilini (tudi v kombinaciji z zaviralci betalaktamaz) in ozkospektralni cefalosporini, ki so dobri substrati tega encima in hkrati močno inducirajo encim ter tako prispevajo k naravni odpornosti, medtem ko so ureidopenicilini (npr. piperacilin), monobaktami (aztreonam) in številni novejši cefalosporini z razširjenim spektrom delovanja (npr. ceftriakson, ceftazidim, cefepim) sicer dobri substrati, vendar praviloma slabi induktorji, zato je odpornost proti tem antibiotikom odvisna od mutacijske derepresije *ampC*. Nekateri antibiotiki, kot so karbapenemi (npr. imipenem, meropenem), so zelo dobri induktorji tega encima, vendar jim njihova hitra

baktericidna aktivnost in stabilnost na AmpC hidrolizo omogočata učinkovito delovanje proti AmpC⁺ *P. aeruginosa*. V večini primerov je odpornost proti betalaktamom posredovana s kromosomsko AmpC betalaktamazo, pa tudi betalaktamska odpornost nasploh pri *P. aeruginosa* posledica mutacijske derepresije kromosomske betalaktamaze (Poole, 2011). Spontane mutacije v represorski regiji gena *ampC* prekinajo zaviralni učinek te regije, kar privede do konstitutivne povečane ekspresije AmpC encima in posledično do povečanja stopnje in razpona odpornosti proti betalaktamom (Strateva in Yordanov, 2009). Pri derepresiji gena *ampC* je stopnja ekspresije encima mnogo večja kot pri inducibilni različici in vodi v njegovo hiperprodukcijo (Lambert, 2002; Lister in sod., 2009). Ta predstavlja še posebej veliko grožnjo širokospektralnim cefalosporinom (npr. ceftazidimu) in penicilinom (npr. tikarcilinu) (Poole, 2005). Karbapenemi kljub derepresiji praviloma ostanejo učinkoviti, ker so za te encime slabi substrati, čeprav se zdi, da derepresirane AmpC prispevajo k odpornosti proti karbapenemom v povezavi z drugimi mehanizmi (npr. izgubo porinskega proteina OprD, povečano produkcijo efluks črpalk in/ali produkcijo karbapenemaz). Nedavno so pri kliničnih izolatih *P. aeruginosa* zasledili tudi produkcijo AmpC betalaktamaz z razširjenim spektrom delovanja (ESAC; angl. extended-spectrum AmpC), ki imajo izboljšano aktivnost proti cefepimu, oksimiinocefalosporinom (npr. ceftazidimu) in karbapenemom (vključno proti imipenemu). Te naj bi prav tako prispevale k odpornosti proti karbapenemom v povezavi z izgubo OprD (Poole, 2011).

Poleg endogene AmpC β -laktamaze nekateri sevi *P. aeruginosa* s horizontalnim prenosom pridobijo plazmide, ki nosijo zapis za nove t. i. sekundarne β -laktamaze (pridobljene β -laktamaze). Medtem ko so bile prvotne betalaktamaze plazmidno-kodirani encimi z omejenim spektrom aktivnosti iz razreda A (PSE/CARB), ki hidrolizirajo karboksi- in ureidopeniciline ter starejše, ozkospektralne cefalosporine, v zadnjem času obstaja vse več poročil o pridobljenih betalaktamazah z razširjenim spektrom delovanja (ESBL, iz angl. extended-spectrum β -lactamases) iz razredov A in D, ki lahko hidrolizirajo širok spekter betalaktamov, vključno s širokospektralnimi cefalosporini in monobaktami, ter o karbapenemazah iz razredov A, B in D, ki hidrolizirajo večino betalaktamov, vključno s karbapenemi, toda ne aztreonama. Sekundarne betalaktamaze so za zdaj pri *P. aeruginosa* redke, vendar pa horizontalen prenos genov za te encime omogoča hitro širjenje β -

laktamaz med bakterijami. ESBL in karbapenemaze so namreč običajno kodirani s plazmidnimi ali transpozonskimi geni, pogosto na integronih, genetičnih elementih, sposobnih zajemanja in združevanja rezistenčnih genov (Poole, 2011). Betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja iz razreda A običajno ugotovimo pri izolatih *P. aeruginosa*, odpornih proti ceftazidimu. Pri *P. aeruginosa* prevladuje VEB-tip ESBL (Poole, 2011), pogoste so variante PER in GES encimov, opisujejo pa tudi CTX-M, BEL (-1 in -2) in nazadnje identificirane ESBL encime, PME-1 (Gužvinec in sod., 2012). Hidrolitični profili teh encimov so zelo podobni; poleg penicilinov in ozkospektralnih cefalosporinov hidrolizirajo tudi cefalosporine z razširjenim spektrom delovanja (npr. ceftazidim, cefepim) in aztreonam, nekateri GES encimi (GES-2 in GES-5) pa kažejo tudi aktivnost proti karbapenemom (Lee in sod., 2012; Strateva in Yordanov, 2009). OXA encimi iz razreda D so večinoma betalaktamaze z ozkim spektrom delovanja, ki zagotavljajo odpornost proti penicilinom in ozkospektralnim cefalosporinom, obstajajo pa tudi številni encimi OXA tipa z razširjenim spektrom delovanja, ES-OXA (angl. expanded-spectrum class D β -lactamases) (Gužvinec in sod., 2012). Te so najpogostejše prav pri bakteriji *P. aeruginosa* (Bush and Jacoby, 2010; Lee in sod., 2012) in zagotavljajo odpornost proti ceftazidimu ali cefotaksimu, nekatere ES-OXA pa so povezane tudi z odpornostjo in/ali zmanjšano občutljivostjo za cefepim in/ali aztreonam (Poole, 2011).

Zelo pomembna skupina betalaktamaz so karbapenemaze. Karbapenemaze, ki poleg širokospektralnih cefalosporinov hidrolizirajo vsaj enega od karbapenemov, vključujejo serinske karbapenemaze iz razredov A in D ter metalo-betalaktamaze iz razreda B. Metalobetalaktamaze so daleč najpomembnejše determinante odpornosti proti karbapenemom, posredovane z betalaktamazami, in glavni razlog za visoko stopnjo odpornosti proti tem antibiotikom (Poole, 2011). Ti encimi hidrolizirajo karbapeneme (imipenem in meropenem), peniciline in cefalosporine, za razliko od serinskih betalaktamaz pa ne hidrolizirajo monobaktamov (aztreonam) in niso inhibirani z inhibitorji serinskih betalaktamaz. Te encime inhibirajo kelatorji kovinskih ionov, npr. EDTA, ki sicer nimajo terapevtske uporabnosti, pomagajo pa pri fenotipski detekciji v laboratoriju (Sardelić in Bedenić, 2009). Pri bakteriji *P. aeruginosa* je bilo do sedaj opisanih več tipov pridobljenih metalo-betalaktamaz, in sicer številne variante VIM in IMP encimov, SPM-1, GIM-1, AIM-1, NDM-1 in SIM-1 encimi. Prevlada VIM oz. IMP encimov pri bakteriji *P.*

aeruginosa se zdi geografsko pogojena; IMP-tip prevladuje v Aziji, VIM-tip encimov pa v Evropi, čeprav se oba encima zdaj širita po vsem svetu (Poole, 2011). Leta 2001 se je v Franciji pojavila nova alelska varianta VIM-2, ki je danes najpogostejše opisana in najbolj razširjena tako v Evropi kot v svetu. Geni za metalo-betalaktamaze se običajno nahajajo v integronih, ki pogosto nosijo dodatne rezistenčne gene, npr. gene za aminoglikozid-modificirajoče encime, zato so izolati, ki producirajo metalo-betalaktamaze, pogosto občutljivi le za aztreonam, fluorokinolone in polimiksine. V primeru, da je v izolatih zaradi mutacije dodatno še povečana ekspresija črpalke MexAB-OprM ali če ima izolat mutacije topoizomeraze ali AmpD (kar vodi do derepresije AmpC), ostajajo edina terapevtska možnost polimiksini (Sardelić in Bedenić, 2009). Betalaktamaze iz razreda A z aktivnostjo proti karbapenemom so redke – pri *P. aeruginosa* so do sedaj opisani samo GES in KPC encimi. Vsi GES encimi so betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja, nekateri od njih pa kažejo tudi aktivnost proti karbapenemom (večinoma proti imipenemu) (Poole, 2011), ki pa je še vedno veliko manjša od aktivnosti metalo-betalaktamaz (Strateva in Yordanov, 2009). Pri *P. aeruginosa* sta bila do sedaj opisana GES-2 in GES-5 (Poole, 2011). Encimi KPC kažejo aktivnost proti večini betalaktamov: proti oksiiminocefalosporinom, monobaktamom in karbapenemom. Ti encimi se za zdaj redko pojavljajo pri *P. aeruginosa*, do sedaj sta bila opisana samo KPC-2 in KPC-5, vendar število poročil o KPC-producirajočih *P. aeruginosa* narašča. Prisotnost encimov KPC pri proti karbapenemom odpornih izolatih se pogosto pojavlja skupaj z izgubo porina zunanje membrane OprD, ki je primarna pot vstopa teh antibiotikov (Poole, 2011). Karbapeneme lahko hidrolizirajo tudi nekatere variante OXA encimov, t. i. CHDL (angl. carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases), ki pa ne morejo hidrolizirati širokospektralnih cefalosporinov. Te so bile nedavno najdene tudi pri *P. aeruginosa* (OXA-40 in OXA-198) (Gužvinec in sod., 2012).

2.3.1.2 Efluks

Dolgo časa so odpornost bakterije *P. aeruginosa* proti številnim antibiotikom pripisovali neprepustnosti zunanje membrane, ki deluje kot bariera in omejuje vnos antibiotikov v celico. Danes vemo, da je ta v veliki meri posledica aktivnega izčrpavanja antibiotikov iz celice oz. sinergističnega delovanja obeh mehanizmov. Efluks sistemi so transmembranske

strukture, sestavljene iz treh proteinskih komponent: energetske-odvisne črpalke (RND antiporter) locirane v citoplazemski membrani, porina zunanje membrane in povezovalnega proteina, lociranega v periplazemskem prostoru, ki povezuje obe omenjeni membranski komponenti (Sardelić in Bedenić, 2009; Strateva in Yordanov, 2009). Te tripartitne strukture segajo skozi celotno bakterijsko celično steno in formirajo učinkovit izločevalni sistem za številne substrate (antibiotike, biocide, detergente, organska topila), prisotne v citoplazmi, citoplazemski membrani ali periplazmi (Skiada in sod., 2011). Pri *P. aeruginosa* so daleč najpomembnejši efluks sistemi iz družine RND (iz angl. Resistance-Nodulation-Division family). Analiza genomske sekvence je pokazala, da genom *P. aeruginosa* kodira 12 efluks sistemov iz družine RND, najbolj poznani so efluks sistemi MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ in MexEF-OprN (Poole, 2011).

Za tri tipe efluks črpalk – MexAB-OprM, MexCD-OprJ in MexXY-OprM – je bilo dokazano, da izločajo betalaktame in tako zagotavljajo odpornost proti tem antibiotikom. MexAB-OprM črpalka izloča najširši spekter betalaktamov med omenjenimi črpalkami in je najpogostejše povezana z odpornostjo proti betalaktamom pri kliničnih izolatih (Poole, 2011). MexAB-OprM aktivno izloča peniciline (karbenicilin, piperacilin, tikarcilin), cefalosporine tretje (cefotaksim, ceftazidim) in četrte (cefepim, cefpirom) generacije, monobaktame (aztreonam) in meropenem, izloča pa tudi zaviralce β -laktamaz (Sardelić in Bedenić, 2009; Strateva in Yordanov, 2009). Sistem MexXY-OprM je bil prav tako povezan z odpornostjo proti betalaktamom pri kliničnih izolatih *P. aeruginosa* kot eden od številnih kontributorjev. Ta efluks sistem je najpogostejše povezan s klinično odpornostjo proti cefalosporinu četrte generacije, cefepimu. Produkcija MexXY je bila opažena pri proti tikarcilinu odpornih izolatih *P. aeruginosa*, klinične študije pa so pokazale, da je črpalka MexXY-OprM odgovorna tudi za zmanjšano občutljivost za nov širokospektralni antibiotik ceftobiprol (Poole, 2011). K odpornosti proti β -laktamom prispeva tudi MexCD-OprJ, ki prav tako eksportira β -laktame, zlasti cefeme (cefepim in cefpirom) (Strateva in Yordanov, 2009), vendar pa je ta črpalka redko povezana z odpornostjo proti tem antibiotikom pri kliničnih izolatih (Poole, 2011). Vsi trije efluks sistemi, MexAB-OprM, MexCD-OprJ in MexXY-OprM, izločajo karbapeneme (z izjemo imipenema), vendar je MexAB-OprM daleč najboljši eksporter teh antibiotikov (Poole, 2011). MexAB-OprM dokazano prispeva k zmanjšani občutljivosti za meropenem pri kliničnih izolatih, medtem

ko imipenem ni izločen s tem efluks sistemom, verjetno zaradi drugačne molekularne strukture (Sardelić in Bedenić, 2009; Strateva in Yordanov, 2009). Še vedno pa se zdi, da efluks malo prispeva k odpornosti proti karbapenemom v tem organizmu, in običajno deluje v povezavi z drugimi mehanizmi (Poole, 2011).

2.3.1.3 Zmanjšana prepustnost zunanje membrane

Vsi glavni razredi antibiotikov (betalaktami, aminoglikozidi, fluorokinoloni in polipeptidi), uporabni za zdravljenje okužb z bakterijo *P. aeruginosa*, morajo prečkati celično steno, da bi prišli do tarčnega mesta njihovega delovanja (Lambert, 2002; Sardelić in Bedenić, 2009). Medtem ko polikationski antibiotiki inducirajo samospodbujevalni prevzem, lahko majhni hidrofilni antibiotiki, kakršni so betalaktami in fluorokinoloni, prečkajo zunanjo membrano le z difuzijo skozi vodne kanalčke, ki jih formirajo porinski proteini (Breidenstein in sod., 2011; Sardelić in Bedenić, 2009). Tako niti ne preseneča, da mutacije, ki majo za posledico spremembo ali zmanjšano ekspresijo porinskih proteinov, vodijo do zmanjšane občutljivosti za določene antibiotike. *P. aeruginosa* producira več različnih porinov. Glavni in najpogostejše prisoten je nespecifičen porin OprF, ki ga najdemo pri vseh sevih, vendar pa ta porin ni poglavitni vzrok antibiotične odpornosti, verjetno zaradi omejene sposobnosti prevzemanja hidrofilnih nutrientov (Lambert, 2002; Sardelić in Bedenić, 2009). Antibiotiki lahko prehajajo celično membrano tudi skozi specifične porine (npr. OprD, OprB, OprP), vendar le v primeru, da posnemajo naravne substrate teh kanalov. Na primer, porin OprD je specifičen porin, povezan s prevzemanjem bazičnih aminokislin, predstavlja pa tudi mesto prehoda strukturno analognih karbapenemov; drugi betalaktamski antibiotiki ne prehajajo skozi ta kanalček (Lambert, 2002; Strateva in Yordanov, 2009). Medtem ko ima zmanjšana ekspresija OprF majhen učinek na MIK-e betalaktamov in fluorokinolonov, je izguba nekaterih specifičnih porinov pomemben mutacijski mehanizem (Livermore, 2002). Daleč najpogostejši mehanizem odpornosti proti karbapenemom (predvsem imipenemu) pri *P. aeruginosa* je mutacijska inaktivacija OprD oz. izguba ali sprememba porinskega proteina zunanje membrane OprD, glavnega vstopnega mesta karbapenemov (Poole, 2011). Inaktivacija OprD je običajno posledica različnih mutacij v genu *oprD* (Ocampo-Sosa in sod., 2012; Riera in sod., 2011). Čeprav ta mehanizem ne zagotavlja visoke stopnje odpornosti proti karbapenemom,

kakršna je bila opažena pri sevih, ki producirajo metalo-betalaktamaze, je izguba OprD funkcije glavna determinanta ne-z metalo-betalaktamazami posredovane odpornosti proti tem antibiotikom (Poole, 2011). Mutacijska inaktivacija OprD porina je v odsotnosti pridobljenih karbapenemaz glavni mehanizem odpornosti proti imipenemu, ki vodi do visokih minimalnih inhibitornih koncentracij za ta antibiotik (Bretonnière in sod., 2012; Riera in sod., 2011). Medtem ko OprD mutante kažejo visoko stopnjo odpornosti (klinična odpornost) proti imipenemu, pa ima izguba OprD porinov manjši vpliv na odpornost proti meropenemu (Strateva in Yordanov, 2009) in doripenemu (Riera in sod., 2011). Inaktivacija *oprD* sicer poveča minimalno inhibitorno koncentracijo (intermediarna občutljivost) za omenjena antibiotika, vendar sama po sebi ne vodi do klinične odpornosti, pač pa so za njeno vzpostavitev potrebni dodatni mehanizmi. Ta tip mutacijske odpornosti pogosto deluje v povezavi z drugimi mehanizmi, npr. derepresijo/indukcijo *ampC* ali derepresijo efluks črpalk (zlasti MexAB-OprM) (Riera in sod., 2011), Hiperprodukcija AmpC in/ali MexAB povečata minimalno inhibitorno koncentracijo za meropenem in doripenem ter v kombinaciji z inaktivacijo OprD zagotavlja odpornost proti omenjenima antibiotikoma (Ocampo-Sosa in sod., 2012; Riera in sod., 2011). Manj pogosto je zmanjšana ekspresija OprD posledica mutacij v genu *mexT* ali *mexS* pri t. i. *nfxC* mutantah, ki imajo povečano ekspresijo efluks črpalke MexEF-OprN (Breidenstein, 2011; Ocampo-Sosa in sod., 2012). Ekspresija OprD je namreč koregulirana z MexEF-OprN, zato imajo *nfxC* mutante hkrati povečano izražanje MexEF-OprN efluks sistema in sočasno zmanjšano ekspresijo OprD (Breidenstein, 2011; Livermore, 2002), kar ima za posledico odpornost tako proti imipenemu kot tudi proti fluorokinolonom ter zmanjšano občutljivost za meropenem (navzkrižna odpornost). Ta fenotip je občasno selekcioniran s kinoloni in ne (oz. zelo redko) s karbapenemi (Livermore, 2002; Ocampo-Sosa in sod., 2012).

2.3.2 Odpornost proti fluorokinolonom

Odpornost pseudomonasa proti fluorokinolonom, zlasti pri visoko odpornih sevih, lahko v glavnem pripišemo mutacijam v genih, ki kodirajo encima topoizomerozo II (DNA-giraza) in/ali topoizomerozo IV, glavni tarči teh antibiotikov, čeprav ima pomemben prispevek k odpornosti tudi aktivni efluks, pogosto v kombinaciji z mutacijami tarčnih mest (Poole 2011).

2.3.2.1 Sprememba tarčnih mest

Fluorokinoloni delujejo na bakterijske topoizomeraze (DNA-girazo in topoizomerazo IV), ki so odgovorne za vnos in/ali odstranjevanje supernavojev, in tudi katenacijo/dekatenacijo DNA ter tako igrajo pomembno vlogo pri DNA replikaciji, transkripciji, rekombinaciji in popravilu (Poole, 2011). V primeru, da pride do točkovne mutacije v genih *gyrA/gyrE* oz. *parC/parE* za te encime in posledično do zamenjave aminokislin na mestih za vezavo kinolona, je zaradi spremembe afinitete zmanjšana oz. onemogočena vezava antibiotika in s tem preprečeno njegovo delovanje (Sardelić in Bedenić, 2009; Willmott in Maxwell, 1993). Sinteza modificiranih topoizomeraz z nizko vezavno afiniteto za kinolonske molekule tako vodi do klinične odpornosti proti fluorokinolonom (Sardelić in Bedenić, 2009; Strateva in Yordanov, 2009).

Tako DNA-giraza (GyrA/GyrB) kot tudi topoizomeraza IV (ParC/ParE) sta sestavljeni iz dveh podenot, ki tvorita heterodimer (A_2B_2 oz. C_2E_2) (Pool, 2011). Do mutacij, odgovornih za odpornost proti fluorokinolonom, običajno pride v t. i. QRDR (ang. quinolone resistance determining region) regijah, ki so na površini katalitičnih podenot GyrA in/ali ParC (Poole, 2011; Willmott in Maxwell, 1993) in predstavljajo aktivno mesto encima (Strateva in Yordanov, 2009). Ena ali več zamenjav nukleotidov v regiji QRDR tarčnega encima različno zmanjšajo afiniteto vezave kinolona na kompleks encim-DNA (Willmott in Maxwell, 1993). Minimalna inhibitorna koncentracija za kinolone pri različnih izolatih je odvisna od mesta, vrste in števila zamenjav nukleotidov v genih za topoizomeraze. Bolj ko je aminokislinsko mesto pomembno za interakcijo s kinolonom, večja je sprememba minimalne inhibitorne koncentracije ob zamenjavi (Vila in sod., 1999).

Pri gramnegativnih bakterijah, vključno s *P. aeruginosa*, je preferenčna tarča fluorokinolonov DNA-giraza (primarna tarča), zato se pri njih mutacije najprej pojavijo v tem encimu, medtem ko so bile pri visoko odpornih sevih opažene tudi dodatne mutacije v topoizomerazi IV (sekundarna tarča) (Poole, 2011; Sardelić in Bedenić, 2009). Ko začetna mutacija v regiji QRDR podenote GyrA pri gramnegativnih bakterijah povzroči odpornost proti kinolonom, se lahko pojavijo dodatne mutacije v ostalih regijah podenote GyrA ali pa v podenotah ParC, GyrB in ParE. Te mutacije odpornost proti kinolonom še povišajo, vendar pa same po sebi, ob prisotnosti GyrA divjega tipa, ne posredujejo nobene

odpornosti (Barnard in Maxwell, 2001). Visoko odporni izolati *P. aeruginosa* imajo pogosto multiple mutacije v *gyrA* in/ali *parC*, redkeje pa tudi mutacije v *gyrB* in *parE* (Poole, 2005; Poole 2011). Odpornost proti novjšim kinolonom, ki na oba encima vplivajo enako, se razvije težje, saj je ob pojavu ugodne mutacije v enem encimu drugi encim proti kinolonom še vedno občutljiv (Deguchi in sod., 1997; Yague in sod., 2002).

2.3.2.2 Efluks

Mutacijska hiperekspresija efluks sistemov s širokim spektrom substratov je pomemben mutacijski mehanizem pri *P. aeruginosa*, ki prispeva k zmanjšani občutljivosti ali pa zagotavlja odpornost proti številnim antibiotikom. Ta pojav predstavlja še posebej velik problem v primeru fluorokinolonov, ki so substrati za vse štiri glavne – MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN in MexXY-OprM – efluks sisteme iz družine RND (Strateva in Yordanov, 2009). Vse štiri črpalke so vpletene v klinično odpornost proti fluorokinolonom (Poole, 2011).

Pomemben mutacijski mehanizem, ki se pogosto pojavlja pri kliničnih izolatih *P. aeruginosa*, je derepresija operona *mexAmexBoprM*, ki vodi do povečane produkcije MexAB-OprM črpalke (Strateva in Yordanov, 2009). Ekspresija *mexAB-oprM* je kontrolirana direktno ali indirektno s tremi represorji MexR, NalD in NalC in mutacije v genih za te regulatorne proteine vodijo do konstitutivno povečane ekspresije MexAB-OprM. Povečana transkripcija *mexAmexBoprM* operona je običajno posledica mutacije v kromosomskem regulatornem genu *mexR* (*nalB* mutante), ki kodira MexR represorski protein. *nalB* mutante imajo povečane minimalne inhibitorne koncentracije in temu ustrezno klinično odpornost proti fluorokinolonom in ostalim substratom te črpalke. Hiperprodukcija MexAB-OprM je bila opažena tudi pri *nalC* mutantah, ki imajo mutacijo v genu *PA3721* (geni *mexR* so intaktni), katerega produkt je protein – represor operona, ki ima za zdaj še nepojasnjeno funkcijo, a se njegova povečana ekspresija v *nalC* mutantah odraža kot povečana ekspresija MexAB-OprM efluks sistema. Našli so tudi *nalD* mutante z mutacijo v *PA3574* genu, ki prav tako vodi v povečano ekspresijo MexAB-OprM (Strateva in Yordanov, 2009).

Tako kot pri MexAB-OprM lahko tudi pri MexXY proteinih pride do konstitutivno povečane produkcije (Strateva in Yordanov, 2009). Ekspresija *mexXY* operona je kontrolirana z enim znanim regulatorjem, MexZ represorjem. Laboratorijski izolati, ki hiperekspresirajo *mexXY*, imajo mutacije v genu *mexZ*. Opisani so bili tudi izolati, odporni proti fluorokinolonom, ki hiperekspresirajo *mexXY* in nimajo mutacij v *mexZ*, vendar pa mutacije, odgovorne za hiperekspresijo, še niso bile identificirane. Kljub sposobnosti te črpalke, da izloča fluorokinolone, je ta črpalka redko povezana z odpornostjo proti fluorokinolonom pri kliničnih izolatih (Poole, 2011).

Operon *mexC-mexD-oprJ* se ne more izražati konstitutivno, je pa njegova ekspresija povečana pri mutantih *P. aeruginosa*, ki imajo mutacije v genu *nfxB* (*nfxB* mutante), ki kodira transkripcijski represor NfxB, edini znani regulator te črpalke (Poole, 2011; Strateva in Yordanov, 2009). Izolati, ki imajo povečano ekspresijo MexCD-OprJ črpalke, se redko pojavljajo v kliničnih ustanovah (Poole, 2011).

Za razliko od ostalih efluks operonov je *mexE-mexF-oprN* pozitivno reguliran s produktom gena *mexT* – MexT proteinom, ki pripada LysR družini transkripcijskih aktivatorjev. Ekspresija operona je povečana pri t. i. *nfxC* *P. aeruginosa* mutantah, ki imajo mutacijo v *mexT* lokusu (Strateva in Yordanov, 2009). Številni »wild type« sevi imajo inaktivacijske mutacije v *mexT*, do ekspresije MexEF-OprN in odpornosti pa pride ob preobratu teh mutacij. *nfxC* mutante se pojavljajo tudi v kliniki in kažejo povečano odpornost proti fluorokinolonom in nekaterim karbapenemom. Odpornost proti karbapenemom ni posledica izločanja antibiotikov z MexEF-OprN, pač pa posledica koordinacije od MexT odvisne redukcije OprD (Poole, 2011). MexT je pozitivni regulator MexEF-OprN efluks sistema, hkrati pa negativno regulira *oprD* gen (Ocampo-Sosa in sod., 2012). Mutante *nfxC* imajo tako povečano ekspresijo MexEF-OprN in hkrati zmanjšano ekspresijo OprD. Posledično so te mutante odporne proti fluorokinolonom, kažejo pa tudi odpornost proti karbapenemom (predvsem imipenemu) (Strateva in Yordanov, 2011). Hiperekspresija tega efluks sistema (in redukcija produkcije OprD) je bila prav tako opažena v laboratorijskih izolatih z motnjami v genu *mexS* (blizu operona *mexXY-oprN*), ki kodira domnevno oksidoreduktazo z neznano funkcijo (Poole 2011).

Odkrili so, da so *P. aeruginosa* mutante, ki ne izražajo efluks črpalk, občutljive za večino klinično uporabnih antibiotikov (fluorokinolone, betalaktame, aminoglikozide), kar je spodbudilo raziskave inhibitorjev efluks črpalk (EPI, angl. Efflux pump inhibitor). Identificirani so bili številni inhibitorji, med katerimi nekateri inhibirajo širok spekter RND črpalk, drugi pa posamezne efluks črpalke. Inhibicija efluks črpalk znatno zmanjša stopnjo naravne in pridobljene odpornosti in se kaže kot zmanjšana frekvenca pojava odpornosti proti substratom efluks črpalk. Inhibicija efluks črpalk je torej pomemben pristop za izboljšanje učinkovitosti antibiotikov, ki so substrati teh črpalk (Kvist in sod., 2008; Schweizer, 2003).

2.3.3 Odpornost proti aminoglikozidom

Odpornost proti aminoglikozidom je običajno posledica pridobitve aminoglikozid-modificirajočih encimov, RNA-metilaz in delovanja endogenih efluks mehanizmov (Poole 2011).

2.3.3.1 Aminoglikozid-modificirajoči encimi (AME)

Odpornost gramnegativnih bakterij proti aminoglikozidom je najpogosteje posledica modifikacije in posledične inaktivacije antibiotika z aminoglikozid-modificirajočimi encimi (Sardelić in Bedenić, 2009), lociranimi na mobilnih genetičnih elementih, ki omogočajo prenos odpornosti med različnimi rodovi bakterij (Breidenstein in sod., 2011). Ti encimi prenašajo in pritrjujejo acetilne, fosfatne ali adenilne skupine na amino in hidroksi substituentne antibiotičnih molekul, kar vodi do zmanjšane vezavne afinitete modificiranega antibiotika za 30S ribosomsko podenoto, glavno tarčo aminoglikozidov. Glede na aktivnost oz. modifikacije, ki jih povzročajo, delimo aminoglikozid-modificirajoče encime v tri razrede: (1) encime, ki acetilirajo aminoglikozide (aminoglikozid acetiltransferaze [AAC]), (2) encime, ki fosforilirajo aminoglikozide (aminoglikozid fosforiltransferaze [APH]), in (3) encime, ki adenilirajo aminoglikozide (aminoglikozid adeniltransferaze [AAD] ali nukleotidiltransferaze [ANT]) (Strateva in Yordanov, 2009). Glede na to, katero hidroksilno ali amino skupino modificirajo, delimo encime v vsakem encimskem razredu v več družin (Poole, 2011), v katerih so različni encimi, ki jih razvrščamo v poddružine (označujemo z rimskimi številkami), od katerih vsak določa drugačen fenotip odpornosti. Substrati posameznih encimov so različni, tako da niti eden izmed njih ne more razgraditi

vseh aminoglikozidov (Seme in Poljak, 2001). Aminoglikozid-modificirajoči encimi so pogoste determinante aminoglikozidne odpornosti pri *pseudomonasu*, razen pri izolatih, osamljenih iz bolnikov s cistično fibrozo, pri katerih je ta mehanizem odpornosti redek (Poole, 2011).

Encimi AAC lahko acetilirajo amino skupine aminoglikozidov na mestih 3 [AAC(3)], 2' [AAC(2')], 6' [AAC(6')] ali 1 [AAC(1)]. Ti encimi lahko modificirajo vse klinično pomembne aminoglikozide, npr. gentamicin, tobramicin in amikacin. Pri bakteriji *P. aeruginosa* so najpogostejši AAC(3) in AAC(6'), ki skupaj z ANT(2') predstavljajo najpogostejše encime, ki zagotavljajo aminoglikozidno odpornost v tem organizmu. Iz družine AAC(3) je bilo pri *P. aeruginosa* opisanih pet poddružin (I, II, III, IV in VI), ki so pogosta determinanta gentamicinske odpornosti (zlasti AAC(3)-I) v tem organizmu in manj pogosto prispevajo k odpornosti proti tobramicinu (-II, -III in -VI) (Poole, 2011), lahko pa so vpleteni tudi v odpornost proti nekaterim drugim aminoglikozidom, npr. netilmicinu (-II) in kanamicinu (-III) (Poole, 2005). Iz družine AAC(6') sta bili pri *P. aeruginosa* opisani dve glavni poddružini (I in II ter številne variante poddružine I). Družina AAC(6') (zlasti AAC(6')-II), je najpomembnejša družina AAC, ki prispeva k aminoglikozidni odpornosti pri *P. aeruginosa*. Encimi AAC(6') so pomembne determinante odpornosti proti netilmicinu, kanamicinu, tobramicinu in bodisi amikacinu (I) ali gentamicinu (II) (Poole, 2011).

Encimi APH, najdeni pri bakteriji *P. aeruginosa*, so skoraj brez izjeme APH(3') encimi, ki fosforilirajo 3'OH skupino tarčnih aminoglikozidov in v splošnem zagotavljajo odpornost proti aminoglikozidom (kanamicin, neomicin in streptomycin), ki se običajno ne uporabljajo za zdravljenje okužb, ki jih povzroča ta bakterija. Pri bakteriji *P. aeruginosa* so bili opisani številni APH(3') encimi; v kliničnih izolatih, odpornih proti kanamicinu (in neomicinu), prevladujejo APH(3')-II in APH(3')-I, čeprav je verjetno za splošno neobčutljivost *P. aeruginosa* za kanamicin odgovoren kromosomsko *aphA*-kodiran APH(3')-II tip encima APH(3')-IIb. Pri *P. aeruginosa* pa so bili opisani tudi APH encimi, ki zagotavljajo odpornost proti drugim aminoglikozidom, npr. APH(3')-VI (proti amikacinu in isepamicinu), APH(3')-IIb-podobni (šibka odpornost proti amikacinu) in APH(2'') (proti gentamicinu in tobramicinu) (Poole, 2005; Poole 2011).

Inaktivacija aminoglikozidov je lahko tudi posledica delovanja nukleotidiltransferaz (adeniltransferaz). Najpogostejša adeniltransferaza pri *P. aeruginosa* je encim ANT(2')-I, ki skupaj z AAC(6') predstavlja najpogostejšo determinanto encimsko-odvisne aminoglikozidne odpornosti pri *P. aeruginosa*. Encim ANT(2')-I inaktivira gentamicin in tobramicin (toda ne amikacina) in je pogosto najden pri kliničnih izolatih, odpornih proti gentamicinu in tobramicinu. Druge, manj pogoste ACC, povezane z aminoglikozidno odpornostjo pri *P. aeruginosa*, so še encim ANT(4')-II, ki zagotavljajo odpornost proti amikacinu, tobramicinu in izepamicinu, ter ANT(3') encimi, ki ne zagotavljajo odpornosti proti nobenemu od klinično pomembnih protipseudomonasnih aminoglikozidov (Poole 2011).

Aminoglikozid-modificirajoči encimi so običajno kodirani s plazmidnimi ali transpozonskimi geni, navadno na integronih, sposobnih združevanja različnih genov. Na integronih se pogosto nahajajo geni za več različnih aminoglikozid-modificirajočih encimov oz. geni za aminoglikozid-modificirajoče encime skupaj z drugimi rezistenčnimi geni (npr. geni za metalo-betalaktamaze). To naj bi bil glavni razlog za pojav in širjenje gramnegativnih izolatov, odpornih proti več ali celo vsem aminoglikozidom (Seme in Poljak, 2001), in razlog, da so izolati, ki nosijo gene za aminoglikozid-modificirajoče encime, pogosto večkratno odporni (Poole, 2011).

2.3.3.2 Efluks

Aminoglikozidna odpornost, neodvisna od inaktivacijskih encimov, je pri *P. aeruginosa* poznana že nekaj časa. Ker jo označuje odpornost proti vsem aminoglikozidom in je pogosto povezana z zmanjšano aminoglikozidno akumulacijo, so jo sprva pripisovali zmanjšanemu privzemu antibiotikov zaradi zmanjšane permeabilnosti in so jo zato poimenovali »neprepustnostna odpornost« (angl. impermeability resistance). Danes vemo, da je ta odpornost posledica izčrpavanja antibiotikov s sistemom MexXY-OprM. Številne študije so potrdile vpletenost tega sistema v aminoglikozidno odpornost pri kliničnih izolatih, še posebej pri izolatih bolnikov s cistično fibrozo, pri katerih je ta mehanizem odpornosti zelo pogost (Poole, 2011).

Sistem MexXY-OprM je kodiran z *mexXY* operonom, ki je pod kontrolo MexZ represorja in *oprM* genom *mexAB-oprM* operona. Mutacije v *mexZ*, ki imajo za posledico povečano

ekspresijo *mexXY*, so pogoste v pan-aminoglikozid odpornih izolatih *P. aeruginosa*, zlasti pri izolatih bolnikov s cistično fibrozo, pri katerih je *mexZ* najpogostejše mutiran gen. Hiperekspresija *MexXY* je bila opažena tudi pri proti aminoglikozidom odpornih izolatih bolnikov s cistično fibrozo, ki nimajo mutacij v *mexZ* genu ali *mexXY* promotorski regiji (Poole, 2011). Subinhibitorne koncentracije aminoglikozidov lahko privedejo do adaptivne odpornosti prek indukcije povečane ekspresije *mexXY* operona - verjetno prek produkta *PA5471* gena, ki naj bi neposredno ali posredno preko inhibicije aktivnosti negativnega regulatornega proteina *MexZ* povečal produkcijo *MexXY*. Nedavno je bil identificiran tudi nov regulatorni sistem *ParRS*. Sistem je induciran (neodvisno od *mexZ* in *PA5471*) s polimiksini in drugimi kationskimi peptidi in vpliva na ekspresijo številnih protimikrobnih rezistenčnih determinant pri *Pseudomonas* (npr. *OprD*, modifikacija lipopolisaharida), vključno s povečano ekspresijo *mexXY*, kar ima za posledico indukcijo adaptivne odpornosti proti aminoglikozidom in drugim substratom te črpalke (npr. fluorokinolonom, cefepimu) (Skiada in sod., 2011). Nedavna študija *in vitro* selekcioniranih proti aminoglikozidom odpornih mutant, ki izražajo *mexXY*, vendar nimajo mutacij v *mexZ*, je kot mesto mutacij identificirala gen, *parR*. Mutacije v *parR* so prisotne tudi pri nekaterih kliničnih izolatih, ki izražajo *mexXY*, vendar nimajo mutacij v *mexZ* (Poole, 2011).

2.3.3.3 Metilaze 16S rRNA

Nedavno je bila opisana tudi odpornost proti aminoglikozidom, posredovana z metilazami 16S rRNA. Ta mehanizem odpornosti temelji na metilaciji ribosoma, ki ima za posledico zmanjšano afiniteto vezave antibiotika na vezavno mesto na ribosomu, s čimer je preprečen učinek antibiotikov, ki zavirajo sintezo beljakovin. V tem primeru običajno obstaja visoka stopnja odpornosti proti vsem klinično pomembnim aminoglikozidom, kot so npr. gentamicin, tobramicin in amikacin (Poole, 2011).

Metilaze 16S rRNA metilirajo mesto A ribosomske podenote 16S rRNA 30S (Poole, 2011), tarčno mesto aminoglikozidov, in predstavljajo učinkovit mehanizem odpornosti proti aminoglikozidom pri enterobakterijah in pri gramnegativnih nefermentativnih bacilih. Geni, odgovorni za te encime, so običajno locirani na transpozonih znotraj prenosljivih plazmidov, ki jim omogočajo možnost horizontalnega širjenja in lahko delno pojasnijo razširjenost tega novega mehanizma odpornosti po vsem svetu. O prvi metilazi 16S rRNA

pri pseudomonasu, imenovani RmtA, so prvič poročali pri kliničnih izolatih *P. aeruginosa*, odpornih proti aminoglikozidom, na Japonskem leta 2003 (Strateva in Yordanov, 2009). Od takrat so bile pri *P. aeruginosa* opisane številne metilaze 16S rRNA, vključno z RmtA, RmtB, RmtD in ArmA (Poole, 2011), katerih prisotnost zagotavlja visoko stopnjo odpornosti proti več ali celo vsem aminoglikozidom (Strateva in Yordanov, 2009). Čeprav se metilaze za zdaj še ne pojavljajo tako pogosto kot aminoglikozid-modificirajoči encimi, zaradi lokacije genov za te encime na mobilnih genetičnih elementih narašča zaskrbljenost glede njihovega širjenja med izolati *P. aeruginosa* in drugimi gramnegativnimi bacili (Lister in sod., 2009). Glede na to, da se za zdravljenja pogosto uporabljajo kombinacije aminoglikozidov in betalaktamov, je zaskrbljujoče tudi dejstvo, da je odpornost proti betalaktamom lahko zagotovljena s sočasno produkcijo metalo-betalaktamaz (Strateva in Yordanov, 2009). RmtD je pogosto koproducirana s SPM-1 metalo-betalaktamazami, poročali pa so tudi o koproduciranju ArmA in IMP-1 metalo-betalaktamaz (Poole, 2011).

2.3.4 Odpornost proti polimiksinom

Že desetletja je znano, da lahko v številnih organizmih prisotnost subinhibitornih koncentracij polimiksinov in drugih kationskih peptidov inducira adaptacije, ki vodijo do povečane odpornosti, vendar so bili mehanizmi, ki so podlaga za adaptivno odpornost bakterije *P. aeruginosa*, do nedavnega nejasni (Fernández in sod., 2011). Čeprav odpornost proti polimiksinom v klinični praksi ni pogosta, je bila odpornost proti tej skupini antibiotikov opisana in obsežno proučevana že od leta 1970. Podrobnejši pregled adaptivnih sevov je pokazal številne spremembe na celični površini. Te vključujejo spremembe v arhitekturi zunanje membrane, zmanjšane stopnje specifičnih porinov zunanje membrane, redukcijo lipopolisaharida, spremembe v lipidni kompoziciji in tudi redukcijo vsebnosti Mg^{2+} in Ca^{2+} . Zdi se, da spremembe zmanjšajo permeabilnost zunanje membrane in tako zaščitijo mesta delovanja polimiksinov na citoplazemski membrani (Skiada in sod., 2011).

Medtem ko v številnih primerih mehanizmi klinične odpornosti proti polimiksinom niso poznani, so številne študije v zadnjih letih dale pomemben vpogled v mehanizme, odgovorne za adaptivno odpornost proti tem antibiotikom. Najpomembnejši mehanizem odpornosti proti polimiksinom je modifikacija lipopolisaharida zunanje membrane, ki se je

verjetno razvila kot obramba proti naravno pojavljajočim se protimikrobnim peptidom – polimiksini so namreč kationski peptidi in so v tem pogledu podobni številnim človeškim protimikrobnim peptidom. Osrednjega pomena za ta mehanizem odpornosti je funkcija dvokomponentnih regulatornih sistemov, ki kontrolirajo ekspresijo lipopolisaharid modifikacijskega (*arnBCADTEF-pmrE*) operona. Regulatorni sistemi sestojijo iz membransko-vezanega senzorskega proteina s histidin kinazno aktivnostjo (histidin kinaza; PhoQ, PmrB, ParS), ki se odzove na številne okoljske stimulacije (npr. pH, nizke koncentracije Mg^{2+} ali prisotnost kationskih peptidov), in iz citoplazemskega efektorskega proteina (odzivni/transkripcijski regulator; PhoP, PmrA, ParR), ki regulira transkripcijo modifikacijskih genov kot odziv na senzorski protein (Skiada in sod., 2011). Ti sistemi omogočajo pridobitev adaptivne odpornosti preko indukcije povečane ekspresije *arnBCADTEF* in *pmrE* genov. Produkti teh genov sodelujejo pri inkorporaciji 4-aminoarabinoze v lipid A, ki vodi do redukcije negativnega naboja lipopolisaharida in posledično do zmanjšanja vezave kationskih antibiotikov, ki je predpogoj za penetracijo in delovanje teh antibiotikov. Posledica je adaptivna odpornost proti polimiksinom in drugim protimikrobnim peptidom (npr. gostiteljevim kationskim protimikrobnim peptidom) pa tudi proti aminoglikozidom (Fernández in sod., 2010; Skiada in sod., 2011).

Do sedaj so bili pri *P. aeruginosa* opisani trije dvokomponentni regulatorni sistemi, vključeni v proces adaptivne odpornosti. Ekspresija *arnBCADTEF* operona in posledična odpornost proti kationskim antibiotikom sta lahko inducirani z nizkimi koncentracijami Mg^{2+} prek aktivacije dveh neodvisnih dvokomponentnih sistemov PhoPQ in PmrAB. PhoPQ poleg *arn* operona inducira tudi ekspresijo OprH porinskih proteinov zunanje membrane, ki prav tako prispevajo k odpornosti prek okupacije Mg^{2+} vezavnih mest in posledične stabilizacije membrane. Mutacije v sistemu PmrAB so bile povezane s stabilno odpornostjo proti polimiksinom, verjetno preko konstitutivne aktivacije sistema, ki ima za posledico permanentno modifikacijo lipida A. Nedavno so pri *P. aeruginosa* identificirali nov dvokomponentni regulatorni sistem, imenovan ParRS. Ta sistem je aktiviran s subinhibitornimi koncentracijami kolistina in nekaterih drugih kationskih peptidov (npr. evkariontskimi kationskimi peptidi) in zdi se, da je ključna komponenta v kaskadi, ki vodi do modifikacije lipopolisaharida in indukcije adaptivne odpornosti. V nasprotju z drugima dvema regulatornima sistemoma, ki za svojo aktivacijo potrebujeta nizko koncentracijo

Mg²⁺ v okolju, je ParRS aktiviran s kationskimi peptidi neodvisno od koncentracije Mg²⁺. Sistem ParRS kot odgovor na subinhibitorne koncentracije kationskih peptidov poveča ekspresijo lipopolisaharid modifikacijskega (*arnBCADTEF*) operona neposredno ali posredno preko aktivacije *pmrAB* operona. Navajajo tudi, da morda obstaja interakcija med PhoPQ in ParRS preko PA1797 genskega produkta – proteina z zdaj še neznano funkcijo (Skiada in sod., 2011). Nedavne ugotovitve so pokazale, da bi lahko mutacije v ParR ali ParS prek povečane regulacije *arn* operona zagotovile konstitutivno odpornost proti polikationskim peptidom (Muller in sod., 2011). Mutacije v ParR pri laboratorijskih izolatih so bile povezane z ArnBCADTEF-posredovano odpornostjo proti polimiksinom. Mutacije *parR* (in *parS*) so bile opažene tudi pri kliničnih izolatih, čeprav ni bilo nobenega znaka o povečani regulaciji *arn* operona, odpornost teh izolatov proti polimiksinom pa je bila minimalna (Poole, 2011).

Odpornost, inducirana preko ParRS in indukcije *arn* operona, ne vodi samo do odpornosti proti polimiksinom in drugim kationskim peptidom, ampak tudi do odpornosti proti aminoglikozidom (npr. tobramicinu in gentamicinu), ki imajo prav tako kationske lastnosti. Ker se polimiksini in aminoglikozidi uporabljajo za zdravljenje, npr. pacientov s cistično fibrozo, je še posebej pomembno, da razumemo regulatorne poti, sprožene z različnimi peptidi, saj bi pojav adaptivne odpornosti proti kationskim antibiotikom lahko resno ogrozil zdravljenje bolnikov. Na primer, nekatere modifikacije, običajno povezane z adaptivno odpornost proti peptidom (npr. aminoarabinoza v lipidu A), so bile opažene pri kliničnih izolatih bolnikov s cistično fibrozo, kar nakazuje na prisotnost inducirajočega signala znotraj pljuč bolnikov s cistično fibrozo (npr. nizke koncentracije Mg²⁺) oz., kar je še bolj zaskrbljujoče, da so verjetno inducirajoči signali polimiksini in nekateri drugi antimikrobni peptidi, ki so sami prav tako lahko sposobni inducirati adaptivno odpornost preko modifikacije lipopolisaharida (Fernández in sod., 2011).

Sistem ParRS ne omogoča nastanka adaptivne odpornosti le preko indukcije *arn* modifikacijskega operona in posledične modifikacije lipopolisaharida, pač pa ima aktivacija tega sistema za posledico npr. tudi povečano ekspresijo MexXY-OprM in zmanjšano ekspresijo OprD. Vse to vodi do bakterijske adaptacije na vse štiri antibiotične razrede (polimiksini, aminoglikozidi, fluorokinoloni in betalaktami), trenutno dostopne za zdravljenje pseudomonasnih okužb. Tak multirezistenten fenotip je lahko inducirani z

izpostavitvijo bakterij polikationskim polipeptidom ali pridobljen in stabiliziran z mutacijo v ParS ali ParR (Muller in sod., 2011).

Rezultati nekaterih študij nakazujejo, da je v proces adaptivne odpornosti, inducirane s peptidi, morda vključenih še več regulatorjev, saj se zdi, da nekateri peptidi inducirajo odpornost neodvisno od ParRS in/ali indukcije lipopolisaharid modifikacijskega operona (Fernández in sod., 2011). *P. aeruginosa* ima številne dvokomponentne regulatorne sisteme (64 odzivnih regulatorjev, 63 klasičnih histidin kinaz in 16 atipičnih kinaz), vendar so jih do danes le nekaj povezali s pomembno antibiotično odpornostjo v kliničnih izolatih (npr. PmrAB, PhoPQ, ParRS) (Fernández in sod., 2010).

Ker patogene bakterije zlahka pridejo v kontakt s protimikrobnimi peptidi v gostitelju, bodisi z gostiteljevimi obrambnimi peptidi, ki jih producira imunski sistem, bodisi s polimiksini, ki so uporabljeni za zdravljenje okužb z bakterijo *P. aeruginosa*, in posledično razvijejo adaptivno odpornost (Fernández in sod., 2011) preko aktivacije sistema ParRS in posledične indukcije različnih rezistenčnih mehanizmov (npr. modifikacija lipopolisaharida, povečano izčrpavanje antibiotikov in zmanjšane ekspresije OprD porinov) proti vsem trenutno dostopnim razredom antibiotikov (Muller in sod., 2011), je izjemno pomembno, da razumemo regulatorne poti, ki vodijo do indukcije adaptivne odpornosti. Identifikacija signalnih molekul in poti, ki vodijo do aktivacije sistema ParRS in posledične adaptacije na antibiotični stres, je predpogoj za razvoj inovativnih molekul, ki bi lahko blokirale razvoj adaptivne odpornosti pri *P. aeruginosa* (Muller in sod., 2011).

2.3.5 Biofilmi

Biofilmi so agregati bakterij (iz ene ali multiplih vrst), pritrjeni na trdne biotične (npr. na epitelij) ali nebiotične (npr. medicinske naprave) površine (Breidenstein in sod., 2011) in obdani z zaščitnim matriksom, ki je sestavljen iz eksopolisaharidnega matriksa (alginatni polisaharid), DNA in proteinov (Poole, 2011). *P. aeruginosa* biofilmi so zlasti velik problem pri bolnikih s cistično fibrozo, pri katerih povzročajo kronično okužbo pljuč, pa tudi pri okužbah sečil, povezanih s katetri (Drenkard, 2003). Pomembna lastnost bakterijskih biofilmov je njihova visoka odpornost proti antibiotikom in komponentam gostiteljevega imunskega sistema, so pa izjemno odporni tudi proti številnim drugim biokemičnim in fizikalnim dejavnikom (Hoffman in sod., 2005; Høiby in sod., 2010).

Biofilmske celice kažejo opazne fenotipske in transkripcijske razlike v primerjavi s planktonskimi celicami. Občutljivi fenotip se lahko povrne, če so celice vzete iz biofilma, kar potrjuje adaptivno naravo tega tipa odpornosti (Fernández in sod., 2011). Nekateri mehanizmi biofilmske odpornosti so neposredna posledica strukture biofilma, medtem ko so drugi del koordinirane adaptacije, vključene v biofilmski način rasti (Fernández in sod., 2011), vsi skupaj pa prispevajo k visoki stopnji odpornosti, opažene v biofilmih (Drenkard, 2003). Osnovni mehanizmi, ki so podlaga za ta tip adaptivne odpornosti, so: omejena penetracija antibiotikov prek ekstracelularnega matriksa; encimi (npr. β -laktamaze), ki se akumulirajo v matriksu in inaktivirajo antibiotike; omejena metabolna aktivnost (manj aktivne bakterije oz. heterogenost biofilmske populacije prispevajo k zmanjšanju občutljivosti biofilmov za protimikrobne agense) ali anaerobna rast (veliko antibiotikov ni aktivnih oz. so manj aktivni pod anaerobnimi pogoji) v bazi biofilmov, specifični s quorum sensingom regulirani rezistenčni mehanizmi za posamezne razrede antibiotikov; prisotnost velikega deleža visoko odporne subpopulacije perzistentnih celic, ki zlahka vzdržijo stresne pogoje, npr. antibiotični pritisk; in splošni stresni odzivi. Zaradi teh lastnosti so biofilmski organizmi perzistentni in jih je zelo težko izkoreniniti. Posledično so bolezni, ki vključujejo biofilme, običajno kronične in jih je težko zdraviti. Na splošno biofilmi predstavljajo veliko grožnjo v kliničnem okolju, saj so nekakšni rezervoarji večkratno odpornih patogenih bakterij.

2.4 DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI ZA ANTIBIOTIKE

Pri izbiri ustreznega antibiotika za zdravljenje uporabljamo dve metodi: izkustveno in racionalno (Kotnik, 2002). Zdravljenje bakterijskih okužb je v prvi fazi večinoma izkustveno (empirično), tj. brez predhodne identifikacije organizma in izvedbe antibiograma. Specifičen antibiotik je izbran za pacienta glede na status imunskega sistema, mesto okužbe in lokalno opažanje protimikrobne občutljivosti (Kohler in sod., 1997). Občutljivost bakterije *P. aeruginosa* za antibiotike se razlikuje med regijami, bolnišnicami in posameznimi oddelki. Spremljanje občutljivosti te in drugih bakterij je pomembno za odkrivanje pojavov odpornosti ter za načrtovanje izkustvenega zdravljenja v bolnišnicah (Križan-Hergouth in sod., 2001). Ugotavljanje občutljivosti je ključnega

pomena za izbor najustreznejše protimikrobne terapije in usmerjeno zdravljenje okužb (Torres in sod., 2008). Namen testiranja občutljivosti je zanesljivo odkrivanje klinično pomembne odpornosti izolatov proti antibiotikom, kar večinoma lahko dosežemo le s pravilno uporabo standardizirane metode (Štorman in Čretnik, 2001). Pri racionalni metodi zdravljenja zdravnik pred uvedbo antibiotika odvzame z značilnega mesta vzorec kužnine in ga pošlje v mikrobiološki laboratorij za določitev povzročitelja in ugotovitev občutljivosti bakterij za antibiotike. Tak rezultat je dobra opora za nadaljnje zdravljenje, saj zdravniku pove, kateri antibiotik je najučinkovitejši *in vitro*. Čeprav je racionalna odločitev za dajanje določenega antibiotika dolgotrajnejša in dražja (Kotnik, 2002), se identifikacija povzročitelja in določanje občutljivosti mnogokrat izkažeta kot edina učinkovita in sta predpogoj za optimalno in uspešno zdravljenje. Spremljanje odpornosti in racionalno zdravljenje sta ključnega pomena za preprečevanje nastanka in širjenja odpornih sevov (Štorman in Čretnik, 2001), ki je v času vse pogostejšega pojavljanja odpornih sevov in pomanjkanja učinkovitih antibiotikov še kako pomembno.

Na razpolago imamo različne laboratorijske metode za določanje občutljivosti oz. odpornosti bakterij: (1) fenotipske – na nivoju lastnosti bakterije (npr. antibiogram, kromogene metode (npr. za določanje encimov laktamaz beta), serološke (npr. za določanje proteinov PBP) ali (2) genotipske – na nivoju genov (npr. molekularne metode - dokazovanje rezistenčnih genov s PCR) (Ribič in Čretnik, 2010). Občutljivost posameznega bakterijskega izolata za protimikrobno učinkovino *in vitro* se običajno določa z antibiogramom. Metoda je lahko kvalitativnega ali kvantitativnega tipa. S kvalitativnimi metodami (npr. Kirby-Bauerjeva difuzijska metoda, difuzijska metoda z luknjicami) lahko določimo le, za katere protimikrobne učinkovine je posamezen bakterijski izolat občutljiv, medtem ko lahko s kvantitativnimi metodami (npr. makro-, mikro- in agardilucijski antibiogram, Etest) določimo tudi, v kolikšni meri je bakterijski sev občutljiv za protimikrobno učinkovino oziroma v kakšnih koncentracijah protimikrobna učinkovina pokaže učinek (Jorgensen in Ferraro, 2009). S kvantitativnimi metodami določamo minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK), ki je najnižja koncentracija učinkovine, ki popolnoma ali skoraj popolnoma ustavi razmnoževanje in rast bakterij, z nekaterimi metodami (npr. makro- in mikrodilucijo) pa lahko določimo tudi minimalno baktericidno koncentracijo (MBK), ki je najnižja koncentracija učinkovine, ki

uniči vsaj 99,9 % standardiziranega bakterijskega inokuluma (Coates in sod., 2002). Vsaka od metod ima določene prednosti in pomanjkljivosti (Jorgensen in Ferraro, 2009). Medtem ko so dilucijske metode referenčne metode (zlati standard) za določanje občutljivosti bakterij (CLSI, 2012a; Schwalbe in sod., 2007), se te v rutini ne uporabljajo pogosto, saj so zamudne, izvedbeno zahtevnejše in drage (Black, 2012). V svetu se vse bolj uveljavljajo tudi različni avtomatizirani sistemi (npr. Vitek-2), ki omogočajo enostavno in hitro določanje občutljivosti, vendar ponujajo malo možnosti za izbor antibiotikov, predvsem pa so zelo dragi. Večina mikrobioloških laboratorijev v Sloveniji za rutinsko določanje občutljivosti bakterij za antibiotike uporablja metodo difuzije v agarju z diski (Kirby-Bauerjeva difuzijska metoda) po ameriških standardih, ki jih pripravlja CLSI (angl. Clinical and Laboratory Standards Institute) (Štorman in Čretnik, 2001). Disk difuzijska metoda je hitra, enostavna in učinkovita metoda za ugotavljanje občutljivosti bakterij za številne antibiotike. Ne zahteva posebne opreme in je tehnično enostavna, je prilagodljiva in standardizirana, ponovljiva, rezultate lahko enostavno odčitamo in jih interpretiramo (Jorgensen in Turnidge, 2007). Njena prednost je tudi nizka cena v primerjavi z drugimi metodami, slabosti pa, da določa le kvalitativen rezultat, da je odvisna od inokuluma, da ni primerna za vse organizme in da ni avtomatizirana (Jorgensen in Ferraro, 2009). Še ena dobro uveljavljena metoda za določanje občutljivosti bakterij za antibiotike je metoda difuzije koncentracijskega gradienta (Etest). Etest je kombinacija difuzijskega in dilucijskega antibiograma (Schwalbe in sod., 2007). Test se izvaja na enak način kot disk difuzija, vendar zaradi gradienta antibiotika na Etestu poleg kategorije občutljivosti na podlagi rezultatov omogoča tudi določitev minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika (bioMérieux, 2014). Kvantitativni podatki so pogoj za obvladovanje kritičnih okužb, poleg tega pa spodbujajo racionalno uporabo antibiotikov (bioMérieux, 2009). Prednosti te metode so še enostavna izvedba, natančnost, ponovljivost in toleranca za inokulum, slabost pa predvsem visoka cena. Do nedavnega so se antibiogrami v laboratorijih za klinično mikrobiologijo v Sloveniji izvajali v skladu z ameriškimi standardi, ki jih pripravlja CLSI, po sklepu Slovenske komisije za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila, SKUOPZ, pa so laboratoriji v začetku aprila 2014 prešli z ameriških standardov CLSI na evropske smernice EUCAST (angl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (Štrumbelj in sod., 2014).

Pri eksperimentalnem delu smo občutljivost za antibiotike oz. odpornost proti njim določali z dvema metodama, in sicer s Kirby-Bauerjevo difuzijsko metodo in metodo difuzije koncentracijskega gradienta (Etest), izvedenima v skladu z navodili CLSI.

2.4.1 Disk difuzijska metoda ali Kirby-Bauerjeva difuzijska metoda

Disk difuzijska metoda je preprosta in hitra kvalitativna metoda za določanje občutljivosti številnih bakterij za različne antibiotike. Primerno gosto suspenzijo čiste kulture zasejemo na površino trdnega gojišča v petrijevki (Cerar in sod., 2010). Na inokulirano ploščo položimo celulozne diske, impregnirane s standardnimi koncentracijami antibiotikov. Ploščo nato inkubiramo. Med inkubacijo se bakterije razmnožujejo (Struthers in sod., 2003), antibiotiki pa difundirajo v gojišče in zavirajo razmnoževanje občutljivih bakterij (Cerar in sod., 2010). Če je izolat občutljiv na testni antibiotik, zaradi difuzije antibiotika v agar nastane okrog diska zaviralna cona (Struthers in sod., 2003). Po inkubaciji izmerimo premer (mm) zaviralnega pasu okoli diska (Cerar in sod., 2010). Cona inhibicije je proporcionalna občutljivosti organizma za določen antibiotik in je merilo za občutljivost organizma za testni antibiotik (Struthers in sod., 2003). Izmerjene vrednosti primerjamo s standardi, ki so na voljo za posamezni antibiotik in vrsto bakterij. Stopnjo občutljivosti bakterijskega seva izrazimo kot občutljiv (S, angl. sensitive), zmerno občutljiv ali intermediaren (I, angl. intermediate) in neobčutljiv ali odporen (R, angl. resistant) proti protimikrobni učinkovini (Cerar in sod., 2010).

2.4.2 Metoda difuzije koncentracijskega gradienta (Etest)

Metoda difuzije koncentracijskega gradienta (Etest) je kvantitativna metoda za določanje občutljivosti mikroorganizmov, s katero lahko določimo minimalno inhibitorno koncentracijo (bioMérieux, 2009). Etesti so posebne, tanke membrane, impregnirane z rastočimi koncentracijami antibiotika (gradient antibiotika) (Müller-Premru in Seme, 2003). Koncentracije antibiotika v µg/ml so označene na skali testnega lističa. Eteste položimo na površino trdnega gojišča, inokuliranega s primerno gosto suspenzijo čiste kulture, in inkubiramo. Med inkubacijo antibiotik difundira iz lističa v agar okrog lističa, in sicer je stopnja difuzije antibiotika v agar proporcionalna koncentraciji antibiotika na določeni točki Etesta. Tako se v gojišču ustvari gradient antibiotika. Kadar je organizem občutljiv za antibiotik, je ob Etestu zaradi antibiotičnega gradienta vidna zaviralna

(inhibicijska) cona v obliki elipse. Po končani inkubaciji na skali Etesta na mestu, kjer zaviralna elipsa seka trak Etesta, odčitamo minimalno inhibitorno koncentracijo. Minimalna inhibitorna koncentracija antibiotika za posamezni izolat je najnižja koncentracija antibiotika, ki popolnoma ustavi razmnoževanje in rast bakterij (Struthers in sod., 2003). Določene vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij lahko primerjamo s standardi, ki so na voljo za posamezne antibiotike in vrsto bakterij, in določimo stopnjo občutljivosti bakterijskega izolata. Stopnjo občutljivosti bakterijskega izolata izrazimo kot občutljiv (S, angl. sensitive), zmerno občutljiv ali intermediaren (I, angl. intermediate) in neobčutljiv ali odporen (R, angl. resistant) proti protimikrobni učinkovini.

3 MATERIALI IN METODE

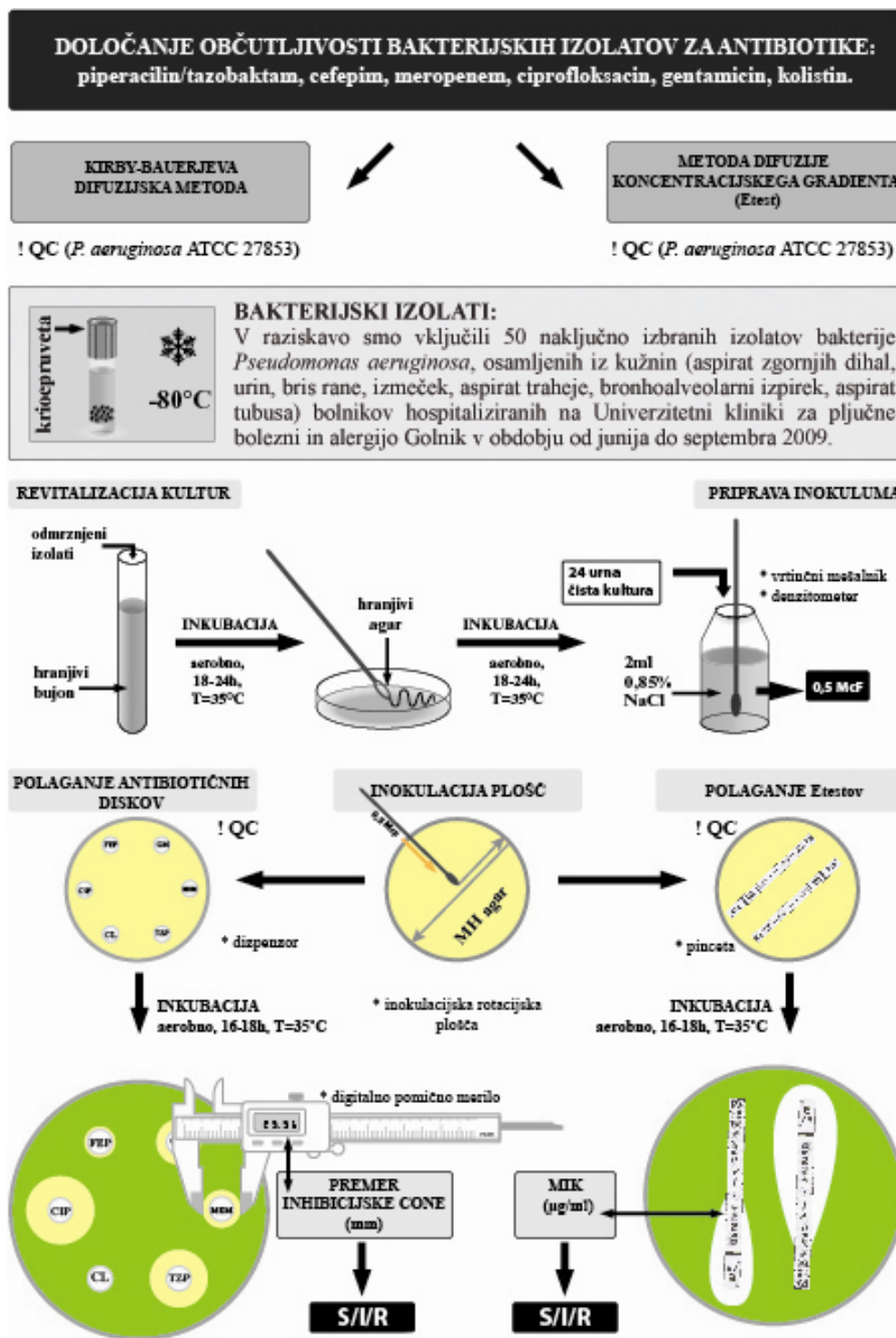
V poglavju Materiali in metode so navedeni materiali in instrumenti, uporabljeni v raziskavi, ter opisane raziskovalne metode.

3.1 NAČRT POIZKUSA

Na spodnjih slikah sta prikazani shema poizkusa (Slika 1) in shema postopka določanja občutljivosti izolatov *P. aeruginosa* s Kirby-Bauerjevo difuzijsko metodo in metodo difuzije koncentracijskega gradienta (Slika 2).



Slika 1: Shema poizkusa. (a) Določanje občutljivosti izolatov *Pseudomonas aeruginosa* s Kirby-Bauerjevo difuzijsko metodo in metodo difuzije koncentracijskega gradienta. (b) Primerjava rezultatov Kirby-Bauerjeve difuzijske metode in metode difuzije koncentracijskega gradienta



Legenda: QC – kontrola kakovosti (angl. quality control); MH agar – Mueller-Hinton agar; MIK – minimalna inhibitorna koncentracija; S – občutljiv (angl. sensitive); I – zmerno občutljiv (angl. intermediate); R – odporen (angl. resistant); McF – McFarland

Slika 2: Shematičen prikaz postopka določanja občutljivosti izolatov *Pseudomonas aeruginosa* s Kirby-Bauerjevo difuzijsko metodo in metodo difuzije koncentracijskega gradienta

3.2 BAKTERIJSKI IZOLATI

V raziskavo smo vključili 50 naključno izbranih izolatov bakterije *P. aeruginosa*, osamljenih iz kužnin bolnikov, hospitaliziranih na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik v obdobju od junija do septembra 2009. Bakterijski izolati so bili osamljeni iz različnih kužnin, in sicer iz urina, brisa rane, izmečka, aspirata zgornjih dihal, aspirata traheje, bronhoalveolarnega izpirka in aspirata tubusa. Vrste in število kužnin, ki smo jih vključili v raziskavo, so povzeti v preglednici 1, natančnejši podatki o kužninah, iz katerih so bili osamljeni izolati, pa so navedeni v prilogi A. Pri posameznem bolniku smo v raziskavi uporabili le en izolat. Vsi izolati so bili shranjeni pri -80°C .

Preglednica 1: Vrste in število kužnin, vključenih v testiranje občutljivosti bakterije *Pseudomonas aeruginosa* za izbrane antibiotike

	Vrsta kužnine							SKUPAJ
	aspirat zgornjih dihal	aspirat traheje	bronhoalveolarni izpirek	izmeček	aspirat tubusa	bris rane	urin	
n	3	2	1	21	1	9	13	50

Legenda n – število kužnin

3.3 GOJIŠČA

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili naslednja gojišča:

- HRANLJIVI BUJON (Becton Dickinson, Maryland, ZDA)
- HRANLJIVI AGAR (BHI agar) (Becton Dickinson, Maryland, ZDA)
- MUELLER HINTON AGAR (MH) (BBL-Becton Dickinson, Maryland, ZDA)

3.4 PRIPRAVA BAKTERIJSKIH IZOLATOV IN BAKTERIJSKE SUSPENZIJE

3.4.1 Revitalizacija kultur

Posamezne izolate bakterij, ki so bili shranjeni v krioepruvetah (Cryobank, MAST) pri -80°C , smo odmrznili, prenesli v hranljivi bujon in inkubirali aerobno 18–24 ur pri temperaturi 35°C . Po inkubaciji smo izolate s cepilno zanko aseptično prenesli na hranljivi agar. Petrijeve plošče smo inkubirali v aerobnih pogojih 18–24 ur pri temperaturi 35°C .

3.4.2 Priprava inokuluma

V 2 ml 0,85 % fiziološke raztopine (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) smo iz 24-urne čiste kulture posameznega testnega izolata pripravili bakterijsko suspenzijo gostote 0,5 McFarlanda (McF), kar pomeni, da je vsebovala približno $1-2 \times 10^8$ CFU/ml (angl. colony forming units). Za pripravo bakterijske suspenzije smo s sterilnim bombažnim brisom z gojišča v ampulo s fiziološko raztopino prenesli kolonije in suspenzijo po vsakem vnosu kolonij premešali z vrtničnim mešalnikom (vortex), da smo dobili homogeno zmes. Za merjenje gostote (motnosti) bakterijskih suspenzij smo uporabili denzitometer.

3.5 TESTIRANJE OBČUTLJIVOSTI BAKTERIJSKIH IZOLATOV ZA ANTIBIOTIKE

Občutljivost 50 izbranih izolatov bakterije *P. aeruginosa* za antibiotike cefepim, kolistin, gentamicin, meropenem, ciprofloksacin in piperacilin/tazobaktam smo določali z dvema metodama, in sicer s Kirby-Bauerjevo difuzijsko metodo in metodo difuzije koncentracijskega gradienta (Etest) v skladu z navodili ameriške laboratorijske zveze CLSI (CLSI, 2009).

3.5.1 Disk difuzijska metoda ali Kirby-Bauerjeva difuzijska metoda

Občutljivost vseh 50 izolatov *P. aeruginosa* za izbrane antibiotike smo določili s kvalitativno Kirby-Bauerjevo difuzijsko metodo po navodilih proizvajalca antibiotičnih diskov (Becton Dickinson, Maryland, ZDA) in v skladu z navodili ameriške laboratorijske zveze CLSI (CLSI, 2009).

3.5.1.1 Materiali in oprema

- Mueller Hinton agar v 90 mm petrijevih ploščah,
- bakterijska suspenzija gostote 0,5 McF,
- testni diski s standardnimi koncentracijami antibiotikov (Becton Dickinson, Maryland, ZDA),
- drugi materiali in oprema: sterilni bombažni brisi, inokulacijska rotacijska plošča, dispensor (aplikator), digitalno pomično (kljunasto) merilo.

3.5.1.2 Izvedba

Inokulacija plošč

Bakterijsko suspenzijo gostote 0,5 McF smo aseptično zasejali na plošče Mueller Hinton agarja. Suspenzijo smo na gojišče nanegli s sterilnim bombažnim brisom ob uporabi inokulacijske rotacijske plošče, ki omogoča enakomeren nanos. Pred polaganjem antibiotičnih diskov smo počakali nekaj minut (3–5 min), da se je suspenzija absorbirala v podlago.

Polaganje diskov

Na inokulirane plošče smo s pomočjo dispenzorja položili celulozne diske, impregnirane s standardnimi koncentracijami izbranih antibiotikov. Na vsako ploščo smo položili šest antibiotičnih diskov (premer 6 mm). Testni antibiotiki in njihove koncentracije so navedeni v preglednici 2.

Pri vsakem novo odprtem zavojčku antibiotičnih diskov smo izvedli tudi kontrolo kakovosti (QC, angl. quality control) antibiotičnih diskov. Kontrolo smo izvedli s pomočjo standardnih kontrolnih sevov ATCC (angl. American Type Culture Collection) po enakih postopkih kot za izolate. Če so rezultati občutljivosti kontrolnih sevov ustrezali priporočenim mejnim vrednostim, postavljenim s strani CLSI (CLSI, 2009), potem so bili antibiotični diski primerni za uporabo. V ta namen smo uporabili kontrolne seve (*P. aeruginosa* ATCC 27853/ *E. coli* ATCC 25922), ki so predpisani v priloženih navodilih za pravilno izvedbo disk difuzijskih testov in v standardu CLSI (CLSI, 2009).

Inkubacija

Plošče smo inkubirali aerobno 16–18 ur pri temperaturi 35 °C.

Pregled plošč in določanje občutljivosti

Po inkubaciji smo plošče pregledali in s pomočjo kljunastega merila izmerili premere con zavrti rasti bakterije (zaviralne cone). Glede na velikost zaviralne cone (mm) smo določili stopnjo občutljivosti bakterijskega izolata in jo izrazili kot občutljiv (S, angl. sensitive), zmerno občutljiv ali intermediaren (I, angl. intermediate) in neobčutljiv ali odporen (R, angl. resistant) proti protimikrobni učinkovini. Za interpretacijo izmerjenih velikosti

zaviralnih con smo uporabili standarde ameriške laboratorijske zveze CLSI (CLSI, 2009), ki so navedeni v preglednici 2.

Preglednica 2: Testni antibiotiki, njihove koncentracije (μg) in kriteriji CLSI za interpretacijo zaviralnih con (mm) pri testiranju občutljivosti za antibiotike bakterije *Pseudomonas aeruginosa* s Kirby-Bauerjevo disk difuzijsko metodo

Antibiotik	Koncentracija (μg)	Premer inhibicijske cone (mm)		
		R	I	S
Piperacilin/Tazobaktam	100/10	≤ 17	–	≥ 18
Cefepim	30	≤ 14	15–17	≥ 18
Meropenem	10	≤ 13	14–15	≥ 16
Gentamicin	10	≤ 12	13–14	≥ 15
Ciprofloksacin	5	≤ 15	16–20	≥ 21
Kolistin	10	≤ 8	9–10	≥ 11

Legenda: S – občutljiv (angl. sensitive); I – zmerno občutljiv (angl. intermediate); R – odporen (angl. resistant)

3.5.2 Metoda difuzije koncentracijskega gradienta (Etest)

Občutljivost vseh 50 izolatov za izbrane antibiotike smo določili še s kvantitativno metodo difuzije koncentracijskega gradienta po navodilih proizvajalca testnih lističev (bioMérieux, Lyon, France).

3.5.2.1 Materiali in oprema

- Mueller Hinton agar v 90 mm petrijevih ploščah,
- bakterijska suspenzija gostote 0,5 McF,
- testni lističi impregnirani z antibiotiki v rastočih koncentracijah (bioMérieux, Lyon, France),
- drugi materiali in oprema: sterilni bombažni brisi, inokulacijska rotacijska plošča, pinceta.

3.5.2.2 Izvedba

Inokulacija plošč

Bakterijsko suspenzijo gostote 0,5 McF smo s sterilnim bombažnim brisom ob uporabi inokulacijske rotacijske plošče enakomerno nanegli na plošče Mueller Hinton agarja. Pred polaganjem testnih lističev smo počakali nekaj minut (3–5 min), da se je suspenzija absorbirala v podlago.

Polaganje Etestov

Na inokulirane plošče Mueller Hinton agarja smo aseptično s sterilno pinceto položili tovarniško pripravljene testne lističe, impregnirane z naraščajočimi koncentracijami antibiotikov. Na vsako ploščo smo položili dva testna lističa, in sicer v nasprotni smeri, da ne bi prišlo do prekrivanja zaviralnih con. Testni antibiotiki in razponi njihovih koncentracij so navedeni v preglednici 3.

Pri vsakem novo odprtem zavoju Etestov smo izvedli tudi kontrolo kakovosti Etestov s pomočjo standardnih kontrolnih sevov ATTC po enakih postopkih kot za izolate. Če so rezultati občutljivosti kontrolnih sevov ustrezali priporočenim mejnim vrednostim, postavljenim s strani CLSI (CLSI, 2009), potem so bili Etesti primerni za uporabo. V ta namen smo uporabili kontrolne seve (*P. aeruginosa* ATCC 27853/*E. coli* ATCC 25922), ki so predpisani v priloženih navodilih za pravilno izvedbo Etestov in v standardu CLSI (CLSI, 2009).

Inkubacija

Plošče smo inkubirali aerobno 16–18 ur pri temperaturi 35 °C.

Pregled plošč in določanje občutljivosti

Po končani inkubaciji smo s prostim očesom odčitali vrednosti MIK ($\mu\text{g/ml}$) na mestu, kjer zaviralna elipsa seka trak Etesta. V primeru, da je minimalna inhibitorna koncentracija antibiotika večja od najvišje navedene koncentracije, navedene na testnem lističu, oz. da bakterijska kultura preraste ploščo, minimalno inhibitorno koncentracijo odčitamo kot minimalna inhibitorna koncentracija antibiotika > od »najvišje koncentracije, navedene na testnem lističu« (npr. $\text{MIK} > 256$, $\text{MIK} > 32$). Odčitane minimalne inhibitorne koncentracije za izbrane bakterijske izolate smo interpretirali s pomočjo standardov CLSI (CLSI, 2009), ki so navedeni v preglednici 3. Določili smo stopnjo občutljivosti izolata za testiran antibiotik in jo izrazili kot občutljiv (S, angl. sensitive), zmerno občutljiv ali intermediaren (I, angl. intermediate) in neobčutljiv ali odporen (R, angl. resistant) proti protimikrobni učinkovini. Za vse testirane antibiotike smo izračunali MIK_{50} in MIK_{90} ter določili razpon MIK-ov ($\mu\text{g/ml}$).

Preglednica 3: Testni antibiotiki, njihove koncentracije ($\mu\text{g/ml}$) in kriteriji CLSI za interpretacijo zaviralnih con ($\mu\text{g/ml}$) pri testiranju občutljivosti za antibiotike bakterije *Pseudomonas aeruginosa* z metodo difuzije koncentracijskega gradienta

Antibiotik	Koncentracija ($\mu\text{g/ml}$)	MIK ($\mu\text{g/ml}$)		
		R	I	S
Piperacilin*/Tazobaktam	0,016–256*/ 4	≥ 128	–	≤ 64
Cefepim	0,016–256	≥ 32	16	≤ 8
Meropenem	0,002–32	≥ 16	8	≤ 4
Gentamicin	0,016–256	≥ 16	8	≤ 4
Ciprofloksacin	0,002–32	≥ 4	2	≤ 1
Kolistin	0,016–256	≥ 8	4	≤ 2

Legenda: S – občutljiv (angl. sensitive); I – zmerno občutljiv (angl. intermediate); R – odporen (angl. resistant); MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

3.5.3 Kontrola disk difuzijske metode in metode difuzije koncentracijskega gradienta

Pred začetkom določanja občutljivosti izbranih bakterijskih izolatov za antibiotike smo izvedli kontrolo metod. V ta namen smo uporabili kontrolni sev *P. aeruginosa* ATCC 27853, ki je predpisan v priloženih navodilih za izvedbo disk difuzijske metode in metode difuzije koncentracijskega gradienta ter v standardu CLSI (CLSI, 2009). Kontrolo disk difuzijske metode in metode difuzije koncentracijskega gradienta s kontrolnim sevom *P. aeruginosa* ATCC 27853 smo izvedli po enakih postopkih kot za izolate. Mejne vrednosti za izbrane antibiotike pri disk difuzijski metodi so navedene v preglednici 4, mejne vrednosti za izbrane antibiotike pri metodi difuzije koncentracijskega gradienta pa v preglednici 5.

Preglednica 4: Disk difuzijska metoda; mejne vrednosti premerov con (mm) za testni organizem *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Antibiotik	Mejne vrednosti; premer cone (mm)
Piperacilin/Tazobaktam	25–33
Cefepim	24–30
Meropenem	27–33
Gentamicin	16–21
Ciprofloksacin	25–33
Kolistin	11–17

Preglednica 5: Metoda difuzije koncentracijskega gradienta; mejne vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij ($\mu\text{g/ml}$) za testni organizem *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Antibiotik	Mejne vrednosti; MIK ($\mu\text{g/ml}$)
Piperacilin/Tazobaktam	1 - 8
Cefepim	1 - 4
Meropenem	0,25 - 1
Gentamicin	0,5 - 2
Ciprofloksacin	0,25 - 1
Kolistin	0,5 - 4

Legenda: MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

3.6 PRIMERJAVA REZULTATOV KIRBY-BAUERJEVE DIFUZIJSKE METODE IN METODE DIFUZIJE KONCENTRACIJSKEGA GRADIENTA (Etest)

Primerjali smo rezultate občutljivosti vseh 50 izolatov bakterije *P. aeruginosa* za antibiotike cefepim, kolistin, gentamicin, meropenem, ciprofloksacin in piperacilin/tazobaktam, dobljene s kvalitativno disk difuzijsko metodo in kvantitativno metodo difuzije koncentracijskega gradienta. Metodi smo izvedli v skladu z navodili ameriške laboratorijske zveze CLSI (CLSI, 2009).

Izmerili smo premere con (mm) oz. odčitali MIK-e ($\mu\text{g/ml}$) in določili stopnje občutljivosti (S/I/R) v skladu z navodili CLSI (CLSI, 2009). Etest smo izbrali za »referenčno« metodo. Rezultate, dobljene z difuzijsko metodo, smo nato primerjali z rezultati, dobljenimi z Etesti.

Natančnost določanja občutljivosti z disk difuzijsko metodo za izbrane antibiotike je bila ocenjena v primerjavi z Etestom z uporabo razpoložljivih interpretativnih kriterijev CLSI.

Kategorično ujemanje med metodama smo definirali kot rezultati testov znotraj iste kategorije občutljivosti (NCCLS, 2001). Izračunali smo stopnjo oz. delež ujemanja med metodama za posamezne antibiotike in skupno stopnjo ujemanja po formuli:

$$\% \text{ UJEMANJA} = \frac{\text{ujemanje}}{\text{ujemanje} + \text{neujemanje}} \times 100 \quad \dots (1)$$

Napake smo definirali kot:

- ZELO VELIKA NAPAKA – lažno občutljiv test disk difuzije, tj., kadar je organizem z referenčno metodo definiran kot odporen, z alternativno metodo pa je definiran kot občutljiv.
- VELIKA NAPAKA – lažno odporen test disk difuzije, tj., kadar je organizem z referenčno metodo kategoriziran kot občutljiv, z alternativno metodo pa je karakteriziran kot odporen.
- MAJHNA NAPAKA – kadar je organizem z referenčno metodo kategoriziran kot občutljiv ali odporen, z alternativno metodo pa je kategoriziran kot intermediaren in/ali kadar je organizem z referenčno metodo kategoriziran kot intermediaren, z alternativno metodo pa je karakteriziran kot občutljiv ali odporen (NCCLS, 2001).

Definicije napak oz. kriteriji za interpretacijo napak so povzeti v preglednici 6.

Preglednica 6: Kriteriji za interpretacijo napak glede na kategorije občutljivosti, določene z dvema metodama

Napake	Etest	Disk difuzija
ZELO VELIKA NAPAKA	R	S
VELIKA NAPAKA	S	R
MAJHNA NAPAKA	S/R	I
	I	S/R

Legenda: S – občutljiv (angl. sensitive); I – zmerno občutljiv (angl. intermediate); R – odporen (angl. resistant)

Izračunali smo stopnjo oz. delež majhnih, velikih in zelo velikih napak za vsak posamezen antibiotik in skupno stopnjo majhnih, velikih in zelo velikih napak po formulah:

$$\% \text{ MAJHNE NAPAKE} = \frac{\text{št.majhnih napak}}{\text{skupno št.testiranih sevov}} \times 100 \quad \dots (2)$$

$$\% \text{ VELIKE NAPAKE} = \frac{\text{št.velikih napak}}{\text{skupno št.občutljivih sevov}} \times 100 \quad \dots (3)$$

$$\% \text{ ZELO VELIKE NAPAKE} = \frac{\text{št.zelo velikih napak}}{\text{skupno št.odpornih sevov}} \times 100 \quad \dots (4)$$

Po priporočilu dokumenta M23-A2, ki ga je oblikoval CLSI (prej NCCLS) so sprejemljive stopnje napak pri primerjavi dveh metod <1,5 % za zelo velike napake, <3 % za velike napake in <10 % za majhne napake. Ta kriterij naj bi omogočil natančnejšo oceno ujemanja med dvema standardnima metodologijama (NCCLS, 2001). Sprejemljive stopnje napak določene s strani CLSI, so povzete v preglednici 7.

Preglednica 7: Sprejemljive stopnje napak po priporočilu dokumenta M23-A2, ki ga je oblikoval CLSI (NCCLS, 2001)

Sprejemljive stopnje napak		
Zelo velike napake	Velike napake	Majhne napake
<1,5 %	<3 %	<10 %

4 REZULTATI

4.1 DISK DIFUZIJSKA METODA

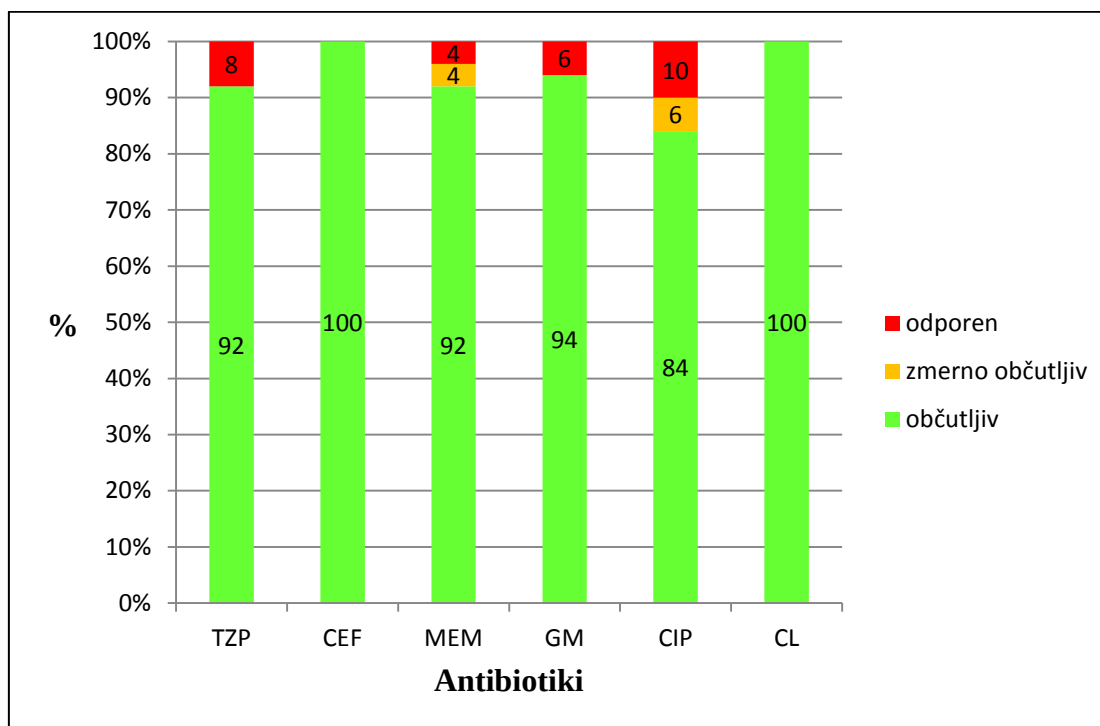
Vsem 50 izolatov smo določili občutljivost za izbrane antibiotike z disk difuzijsko metodo. Izmerili smo premere zaviralnih con (mm). Glede na velikost zaviralne cone smo na podlagi interpretacijskih kriterijev, ki jih je oblikoval CLSI (Preglednica 2), izolate opredelili kot občutljive (S), zmerno občutljive (I) ali odporne (R) proti antibiotiku. Rezultati določanja občutljivosti 50 izolatov bakterije *P. aeruginosa* za izbrane antibiotike z disk difuzijsko metodo so povzeti v preglednici 8 in prikazani na sliki 3.

Določanje občutljivosti z disk difuzijsko metodo je pokazalo, da je občutljivost izolatov *P. aeruginosa* za vse izbrane antibiotike visoka in je, z izjemo občutljivosti za ciprofloksacin (84 %), enaka ali višja od 92 %. Vseh 50 (100 %) izolatov *P. aeruginosa* je bilo glede na kriterije za opredelitev občutljivosti občutljivih za cefepim in kolistin. Največji delež odpornih 5/50 (10 %) in intermediarnih 3/50 (6 %) izolatov smo zasledili pri ciprofloksacinu.

Preglednica 8: Rezultati določanja občutljivosti 50 izolatov bakterije *Pseudomonas aeruginosa* za izbrane antibiotike, dobljeni s Kirby-Bauerjevo difuzijsko metodo

Antibiotiki	Število testiranih izolatov	S		I		R	
		Število izolatov	%	Število izolatov	%	Število izolatov	%
Piperacilin/Tazobaktam	50	46	92	0	0	4	8
Cefepim	50	50	100	0	0	0	0
Meropenem	50	46	92	2	4	2	4
Gentamicin	50	47	94	0	0	3	6
Ciprofloksacin	50	42	84	3	6	5	10
Kolistin	50	50	100	0	0	0	0

Legenda: S – občutljiv (angl. sensitive); I – zmerno občutljiv (angl. intermediate); R – odporen (angl. resistant)



Legenda: TZP – piperacilin/tazobaktam; CEF – cefepim; MEM – meropenem; GM – gentamicin;
CIP – ciprofloksacin; CL – kolistin

Slika 3: Deleži (%) odpornih, zmerno občutljivih in občutljivih izolatov bakterije *Pseudomonas aeruginosa* za antibiotike piperacilin/tazobaktam, cefepim, meropenem, gentamicin, ciprofloksacin in kloramfenikol, dobljeni z disk difuzijsko metodo

Izvedli smo kontrolo disk difuzijske metode. Rezultati občutljivosti kontrolnega seva *P. aeruginosa* ATCC 27853 so ustrezali priporočenim mejnim vrednostim, postavljenim s strani CLSI (Preglednica 4). Rezultati testiranja kontrolnih sevov so navedeni v prilogi B.

4.2 METODA DIFUZIJE KONCENTRACIJSKEGA GRADIENTA (Etest)

Vsem 50 izolatom smo določili občutljivost za izbrane antibiotike z metodo difuzije koncentracijskega gradienta. MIK ($\mu\text{g/ml}$) vrednosti smo odčitali na mestu, kjer zaviralna elipsa seka trak Etesta, in glede na vrednosti MIK na podlagi interpretacijskih kriterijev, ki jih je oblikoval CLSI (Preglednica 3), izolate opredelili kot občutljive (S), zmerno občutljive (I) ali odporne (R) proti protimikrobni učinkovini. Rezultati določanja občutljivosti 50 izolatov bakterije *P. aeruginosa* za izbrane antibiotike z metodo difuzije koncentracijskega gradienta so povzeti v preglednici 9 in prikazani na sliki 4.

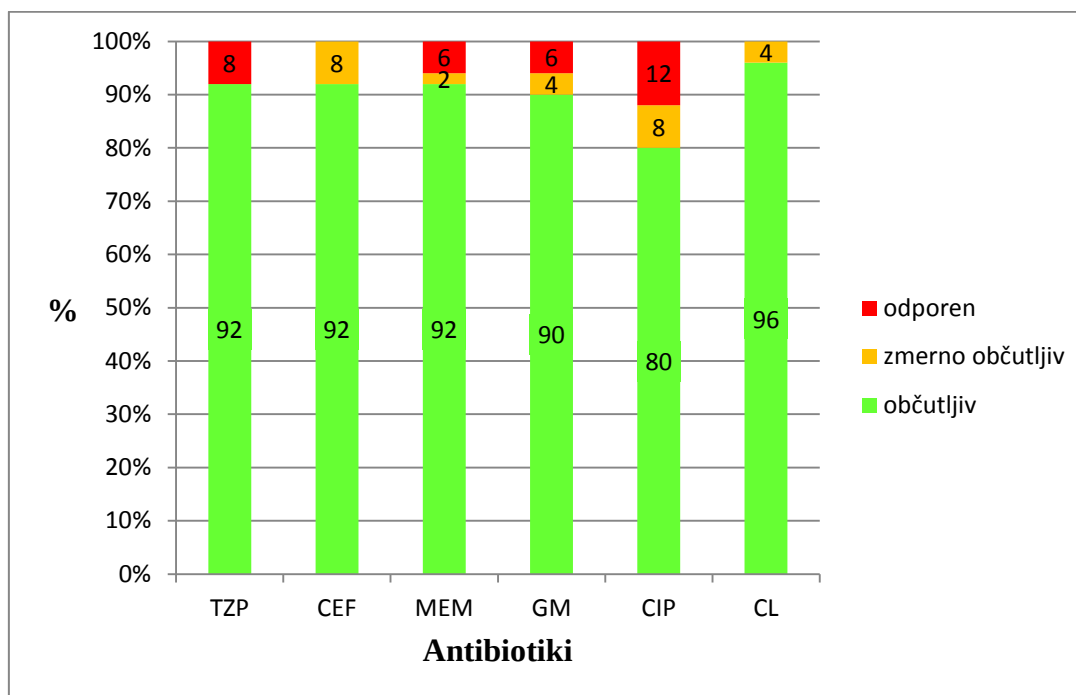
Pri vseh testiranih antibiotikih smo zasledili pojav intermediarnih in/ali odpornih izolatov, vendar je bila občutljivost za izbrane antibiotike na splošno dobra in je bila, z izjemo občutljivosti za ciprofloksacin (80 %), višja od 90 %. Največji delež odpornih 6/50 (12 %) in intermediarnih 4/50 (8 %) izolatov smo zasledili pri ciprofloksacinu. Intermediarne izolate smo zasledili tudi pri testiranju za cefepim 4/50 (8 %) in kolistin 2/50 (4 %).

Izvedli smo kontrolo metode difuzije koncentracijskega gradienta. Rezultati občutljivosti kontrolnega seva *P. aeruginosa* ATCC 27853 so ustrezali priporočenim mejnim vrednostim, postavljenim s strani CLSI (Preglednica 5). Rezultati testiranja kontrolnih sevov so navedeni v prilogi C.

Preglednica 9: Rezultati določanja občutljivosti 50 izolatov bakterije *Pseudomonas aeruginosa* za izbrane antibiotike, dobljeni z metodo difuzije koncentracijskega gradienta

Antibiotiki	Število testiranih izolatov	S		I		R	
		Število izolatov	%	Število izolatov	%	Število izolatov	%
Piperacilin/Tazobaktam	50	46	92	0	0	4	8
Cefepim	50	46	92	4	8	0	0
Meropenem	50	46	92	1	2	3	6
Gentamicin	50	45	90	2	4	3	6
Ciprofloksacin	50	40	80	4	8	6	12
Kolistin	50	48	96	2	4	0	0

Legenda: S – občutljiv (angl. sensitive); I – zmerno občutljiv (angl. intermediate); R – odporen (angl. resistant)



Legenda: TZP – piperacilin/tazobaktam; CEF – cefepim; MEM – meropenem; GM – gentamicin; CIP – ciprofloksacin; CL – kolistin

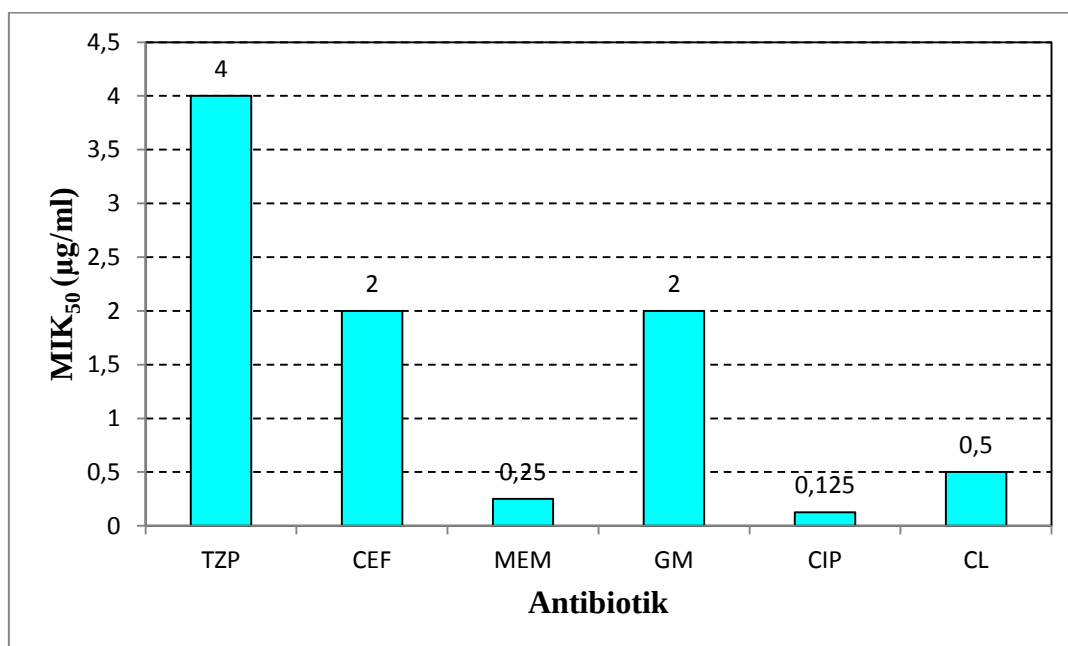
Slika 4: Deleži (%) odpornih, zmerno občutljivih in občutljivih izolatov bakterije *Pseudomonas aeruginosa* za antibiotike piperacilin/tazobaktam, cefepim, meropenem, gentamicin, ciprofloksacin in kloramfenikol, dobljeni z metodo difuzije koncentracijskega gradienta

Za vse testne antibiotike smo določili MIK_{50} , MIK_{90} in razpon MIK -ov ($\mu\text{g/ml}$). Vrednosti MIK_{50} , MIK_{90} in razponi MIK -ov ($\mu\text{g/ml}$) so navedeni v preglednici 10 in prikazani na slikah 5 in 6. MIK_{50} in MIK_{90} predstavljata najnižjo koncentracijo antibiotika, ki inhibira rast 50 % oz. 90 % izolatov. Medtem ko je bila občutljivost za vse testirane betalaktamske antibiotike (piperacilin/tazobaktam, cefepim in meropenem) visoka (92 %), so minimalne inhibitorne koncentracije med posameznimi betalaktamskimi antibiotiki variirale. Vrednosti MIK_{90} (16 $\mu\text{g/ml}$) in MIK_{50} (4 $\mu\text{g/ml}$) za piperacilin/tazobaktam sta bili najvišji med vsemi testiranimi antibiotiki, visoke so bile tudi vrednosti MIK_{90} (8 $\mu\text{g/ml}$) in MIK_{50} (2 $\mu\text{g/ml}$) za cefepim. Meropenem je pokazal najboljšo aktivnost (MIK_{90} = 2 $\mu\text{g/ml}$, MIK_{50} = 0,25 $\mu\text{g/ml}$) med betalaktamskimi antibiotiki, vendar so tudi pri meropenemu vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij močno variirale. Čeprav je bil delež občutljivih izolatov v primeru ciprofloksacina najmanjši med vsemi testiranimi antibiotiki (80 %), sta bili vrednosti MIK_{50} (0,125 $\mu\text{g/ml}$) in MIK_{90} (4 $\mu\text{g/ml}$) za ciprofloksacin relativno nizki. Kolistin je pokazal najboljšo aktivnost (MIK_{50} = 0,5 $\mu\text{g/ml}$ in MIK_{90} = 1 $\mu\text{g/ml}$) med vsemi testiranimi antibiotiki; zanj je bilo občutljivih 96 % izolatov.

Preglednica 10: Minimalna inhibitorna koncentracija ($\mu\text{g/ml}$), ki inhibira rast 50 % izolatov, minimalna inhibitorna koncentracija ($\mu\text{g/ml}$), ki inhibira rast 90 % izolatov, in razpon minimalnih inhibitornih koncentracij ($\mu\text{g/ml}$) za posamezne antibiotike ter število/odstotek za antibiotike občutljivih od skupaj 50 izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, testiranih z metodo difuzije koncentracijskega gradienta.

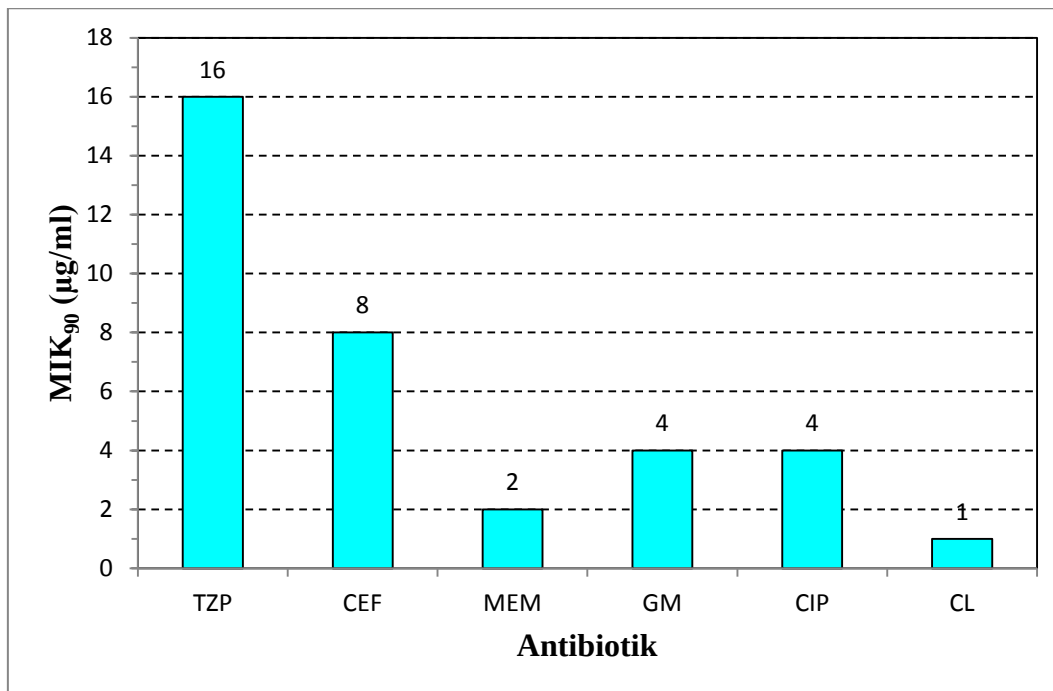
Antibiotiki	Razpon MIK-ov [$\mu\text{g/ml}$]	MIK ₅₀ [$\mu\text{g/ml}$]	MIK ₉₀ [$\mu\text{g/ml}$]	Število S / Delež S (%)
Piperacilin/Tazobaktam	0,125–(>256)	4	16	46 (92)
Cefepim	0,5–16	2	8	46 (92)
Meropenem	0,016–(>32)	0,25	2	46 (92)
Gentamicin	0,125–128	2	4	45 (90)
Ciprofloksacin	0,064–(>32)	0,125	4	40 (80)
Kolistin	0,125–4	0,5	1	48 (96)

Legenda: S – občutljiv (angl. sensitive); MIK – minimalna inhibitorna koncentracija; MIK₅₀ – vrednost minimalne inhibitorne koncentracije v $\mu\text{g/ml}$. Tako ali manjšo vrednost ima 50 % testiranih izolatov.; MIK₉₀ – vrednost minimalne inhibitorne koncentracije v $\mu\text{g/ml}$. Tako ali manjšo vrednost ima 90 % testiranih izolatov.; >256 – minimalna inhibitorna koncentracija antibiotika je večja od 256 $\mu\text{g/ml}$; >32 – minimalna inhibitorna koncentracija antibiotika je večja od 32 $\mu\text{g/ml}$



Legenda: TZP – piperacilin/tazobaktam; CEF – cefepim; MEM – meropenem; GM – gentamicin; CIP – ciprofloksacin; CL – kolistin; MIK₅₀ – minimalna inhibitorna koncentracija, ki inhibira rast 50 % izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, izražena v $\mu\text{g/ml}$

Slika 5: Minimalna inhibitorna koncentracija, ki inhibira rast 50 % izolatov *Pseudomonas aeruginosa* (v $\mu\text{g/ml}$), za piperacilin/tazobaktam, cefepim, meropenem, gentamicin, ciprofloksacin in kolistin



Legenda: TZP – piperacilin/tazobaktam; CEF – cefepim; MEM – meropenem; GM – gentamicin; CIP – ciprofloksacin; CL – kolistin; MIK₉₀ – minimalna inhibitorna koncentracija, ki inhibira rast 90 % izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, izražena v µg/ml

Slika 6: Minimalna inhibitorna koncentracija, ki inhibira rast 90 % izolatov *Pseudomonas aeruginosa* (v µg/ml), za piperacilin/tazobaktam, cefepim, meropenem, gentamicin, ciprofloksacin in kolistin

4.3 PRIMERJAVA REZULTATOV KIRBY-BAUERJEVE DIFUZIJSKE METODE IN METODE DIFUZIJE KONCENTRACIJSKEGA GRADIENTA

Odpornost 50 kliničnih izolatov *P. aeruginosa* za antibiotike piperacilin/tazobaktam (TZP), cefepim (CEF), kolistin (CL), gentamicin (GM), meropenem (MEM) in ciprofloksacin (CIP) smo določili s Kirby-Bauerjevo difuzijsko metodo in metodo difuzije koncentracijskega gradienta. Na podlagi izmerjenih con inhibicije (mm) oz. odčitanih minimalnih inhibitornih koncentracij (µg/ml) smo v skladu z interpretacijskimi kriteriji, ki jih je oblikoval CLSI, izolatoma določili stopnje občutljivosti (S/I/R). Rezultati določanja občutljivosti izolatov *P. aeruginosa* za izbrane antibiotike, dobljeni z disk difuzijsko metodo in metodo difuzije koncentracijskega gradienta, so navedeni v prilogi D in povzeti v preglednicah 11–16.

Preglednica 11: Število za piperacilin/tazobaktam občutljivih, za piperacilin/tazobaktam zmerno občutljivih ter proti piperacilin/tazobaktamu odpornih izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, določeno z metodo disk difuzije in metodo difuzije koncentracijskega gradienta (Etest)

Antibiotik		Piperacilin/tazobaktam Etest (št. izolatov)			SKUPAJ
		S	I	R	
Piperacilin/tazobaktam disk difuzija (št. izolatov)	S	46	0	0	46
	I	0	0	0	0
	R	0	0	4	4
SKUPAJ		46	0	4	50

Legenda: S – občutljiv (angl. sensitive); I – zmerno občutljiv (angl. intermediate); R – odporen (angl. resistant)

Preglednica 12: Število za cefepim občutljivih, za cefepim zmerno občutljivih ter proti cefepimu odpornih izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, določeno z metodo disk difuzije in metodo difuzije koncentracijskega gradienta (Etest)

Antibiotik		Cefepim Etest (št. izolatov)			SKUPAJ
		S	I	R	
Cefepim disk difuzija (št. izolatov)	S	46	4*	0	50
	I	0	0	0	0
	R	0	0	0	0
SKUPAJ		46	4	0	50

Legenda: S – občutljiv (angl. sensitive); I – zmerno občutljiv (angl. intermediate); R – odporen (angl. resistant); * stopnja občutljivosti, določena z disk difuzijsko metodo, se razlikuje od stopnje občutljivosti, določene z metodo difuzije koncentracijskega gradienta

Preglednica 13: Število za meropenem občutljivih, za meropenem zmerno občutljivih ter proti meropenemu odpornih izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, določeno z metodo disk difuzije in metodo difuzije koncentracijskega gradienta (Etest)

Antibiotik		Meropenem Etest (št. izolatov)			SKUPAJ
		S	I	R	
Meropenem disk difuzija (št. izolatov)	S	46	0	0	46
	I	0	1	1*	2
	R	0	0	2	2
SKUPAJ		46	0	3	50

Legenda: S – občutljiv (angl. sensitive); I – zmerno občutljiv (angl. intermediate); R – odporen (angl. resistant); * stopnja občutljivosti, določena z disk difuzijsko metodo, se razlikuje od stopnje občutljivosti, določene z metodo difuzije koncentracijskega gradienta

Preglednica 14: Število za gentamicin občutljivih, za gentamicin zmerno občutljivih ter proti gentamicinu odpornih izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, določeno z metodo disk difuzije in metodo difuzije koncentracijskega gradienta (Etest)

Antibiotik		Gentamicin Etest (št. izolatov)			SKUPAJ
		S	I	R	
Gentamicin disk difuzija (št. izolatov)	S	45	2*	0	47
	I	0	0	0	0
	R	0	0	3	3
SKUPAJ		45	2	3	50

Legenda: S – občutljiv (angl. sensitive); I – zmerno občutljiv (angl. intermediate); R – odporen (angl. resistant); * stopnja občutljivosti, določena z disk difuzijsko metodo, se razlikuje od stopnje občutljivosti, določene z metodo difuzije koncentracijskega gradienta

Preglednica 15: Število za ciprofloksacin občutljivih, za ciprofloksacin zmerno občutljivih ter proti ciprofloksacinu odpornih izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, določeno z metodo disk difuzije in metodo difuzije koncentracijskega gradienta (Etest)

Antibiotik		Ciprofloksacin Etest (št. izolatov)			SKUPAJ
		S	I	R	
Ciprofloksacin disk difuzija (št. izolatov)	S	40	2*	0	42
	I	0	2	1*	3
	R	0	0	5	5
SKUPAJ		40	4	6	50

Legenda: S – občutljiv (angl. sensitive); I – zmerno občutljiv (angl. intermediate); R – odporen (angl. resistant); * stopnja občutljivosti, določena z disk difuzijsko metodo, se razlikuje od stopnje občutljivosti, določene z metodo difuzije koncentracijskega gradienta

Preglednica 16: Število za kolistin občutljivih, za kolistin zmerno občutljivih ter proti kolistinu odpornih izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, določeno z metodo disk difuzije in metodo difuzije koncentracijskega gradienta (Etest)

Antibiotik		Kolistin Etest (št. izolatov)			SKUPAJ
		S	I	R	
Kolistin disk difuzija (št. izolatov)	S	48	2*	0	50
	I	0	0	0	0
	R	0	0	0	0
SKUPAJ		48	2	0	50

Legenda: S – občutljiv (angl. sensitive); I – zmerno občutljiv (angl. intermediate); R – odporen (angl. resistant); * stopnja občutljivosti, določena z disk difuzijsko metodo, se razlikuje od stopnje občutljivosti, določene z metodo difuzije koncentracijskega gradienta

Rezultate testiranja občutljivosti za izbrane antibiotike, dobljene z disk difuzijsko metodo, smo primerjali z rezultati Etestov. Primerjava rezultatov določanja občutljivosti med disk difuzijo in Etesti za izbrane antibiotike je prikazana na slikah 7–12. Primerjali smo kategorije občutljivosti, določene z omenjenima metodama, in ugotavljali prisotnost zelo velikih, velikih in majhnih napak. Izračunali smo stopnjo oz. delež napak za posamezne antibiotike in skupno stopnjo napak. Večjih odstopanj med rezultati, dobljenimi z Etesti in disk difuzijsko metodo, nismo zasledili. Primerjava rezultatov ni pokazala zelo velikih in velikih napak pri nobenem od testiranih antibiotikov, prišlo pa je do manjših diskrepanc v primeru cefepima, gentamicina, ciprofloksacina, gentamicina in kolistina. Pri primerjavi rezultatov metod za omenjene antibiotike smo zasledili pojav majhnih napak. Medtem ko so bili deleži občutljivih izolatov, določeni z disk difuzijsko metodo, 100 % za kolistin in cefepim, 94 % za gentamicin in 84 % za ciprofloksacin (Preglednica 8), so bili deleži občutljivih izolatov, določeni z Etesti, nekoliko nižji (predvsem na račun intermediarnih izolatov), in sicer 96 % za kolistin, 92 % za cefepim, 90 % za gentamicin in 80 % za ciprofloksacin (Preglednica 9). Rezultati nakazujejo na trend lažne občutljivosti disk difuzijske metode. Stopnje majhnih napak so bile 8 % v primeru cefepima, 6 % v primeru ciprofloksacina, 2 % v primeru meropenema, v primeru gentamicina in kolistina pa 4 % (Preglednica 17). Pri testiranju za piperacilin/tazobaktam napak med metodama nismo zasledili. Izračunali smo tudi skupno stopnjo napak. Frekvenca zelo velikih in velikih napak je bila 0 %, frekvenca majhnih napak pa 4 % (Preglednica 18). Stopnje napak niso presegale sprejemljivih stopenj napak (Preglednica 7), priporočenih v dokumentu M23-A2 oblikovanem s strani CLSI. Število in izračuni deležev zelo velikih, velikih in majhnih napak za izbrane antibiotike so podani v preglednici 17, skupne stopnje napak pa v preglednici 18.

Izračunali smo stopnjo ujemanja med disk difuzijsko metodo in metodo difuzije koncentracijskega gradienta za vsak posamezen antibiotik in skupno stopnjo ujemanja med metodama. Na splošno je bilo kategorično ujemanje med metodama dobro. Stopnja ujemanja med metodo difuzije koncentracijskega gradienta in disk difuzijsko metodo je bila za vseh šest izbranih antibiotikov višja od 90 %. Najnižja stopnja ujemanja med metodama je bila v primeru cefepima, in sicer 92 %. Stopnja ujemanja za piperacilin/tazobaktam je bila 100 %, za meropenem 98 %, za kolistin in gentamicin 96 %, za ciprofloksacin 94 % in za cefepim 92 %.

za ciprofloksacin pa 94 %. Visoka (96 %) je bila tudi skupna stopnja ujemanja med metodo difuzijskega gradienta in disk difuzijsko metodo. Stopnje ujemanja za posamezne antibiotike so navedene v preglednici 17, celokupna stopnja ujemanja pa v preglednici 18.

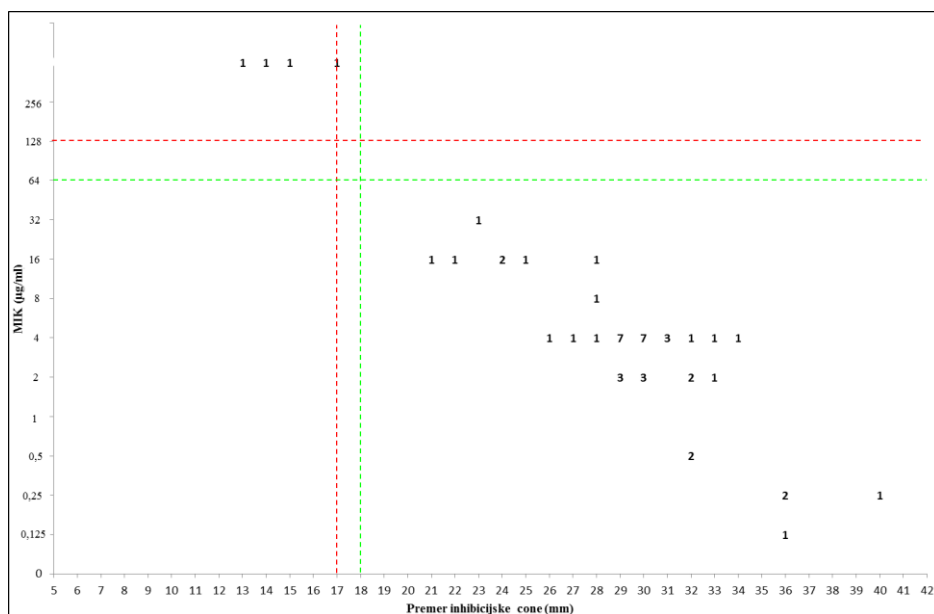
Preglednica 17: Napake v kategorijah občutljivosti (število/%) in stopnje ujemanja (%) med Kirby-Bauerjevo difuzijsko metodo in metodo difuzije koncentracijskega gradienta

ANTIBIOTIK	Napake (št./%)	Stopnja ujemanja (%)
PIPERACILIN/TAZOBAKTAM		100
Zelo velika napaka	0/0	
Velika napaka	0/0	
Manjša napaka	0/0	
CEFEPIM		92
Zelo velika napaka	0/0	
Velika napaka	0/0	
Manjša napaka	4/8	
MEROPENEM		98
Zelo velika napaka	0/0	
Velika napaka	0/0	
Manjša napaka	1/2	
GENTAMICIN		96
Zelo velika napaka	0/0	
Velika napaka	0/0	
Manjša napaka	2/4	
CIPROFLOKSACIN		94
Zelo velika napaka	0/0	
Velika napaka	0/0	
Manjša napaka	3/6	
KOLISTIN		96
Zelo velika napaka	0/0	
Velika napaka	0/0	
Manjša napaka	2/4	

Preglednica 18: Skupna stopnja napak in kategorično ujemanje za vse antibiotike

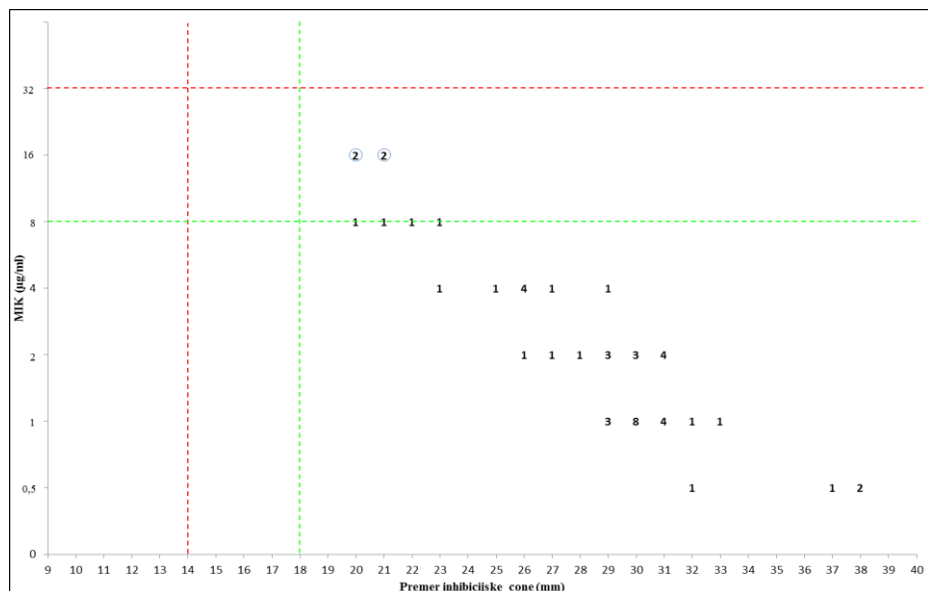
ANTIBIOTIK	Etest (št. izolatov)				Napake (št./%)				
	S	I	R	Σ	VM	M	m	CA	N
PIPERACILIN/TAZOBAKTAM	46	0	4	50	0/0	0/0	0/0	50	50
CEFEPIM	46	4	0	50	0/0	0/0	4/8	46	50
MEROPENEM	46	1	3	50	0/0	0/0	1/2	49	50
GENTAMICIN	45	2	3	50	0/0	0/0	2/4	48	50
CIPROFLOKSACIN	40	4	6	50	0/0	0/0	3/6	47	50
KOLISTIN	48	2	0	50	0/0	0/0	2/4	48	50
Skupaj	271	13	16	300	0	0	12	288	300
Frekvenca [%]	90,3	4,3	5,3		0	0	4	96	

Legenda: S – občutljiv (angl. sensitive); I – zmerno občutljiv (angl. intermediate); R – odporen (angl. resistant); VM – zelo velika napaka (angl. very major error); M – velika napaka (angl. major error); m – majhna napaka (angl. minor error); CA – kategorično ujemanje (angl. categorical agreement); N – število testiranih izolatov



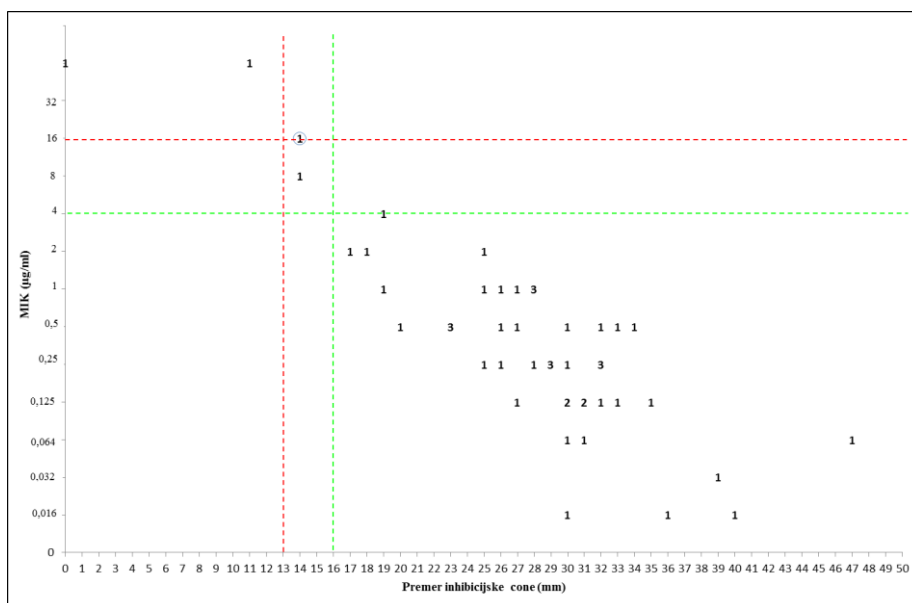
Legenda: MIK – minimalna inhibitorna koncentracija (µg/ml)

Slika 7: Primerjava minimalnih inhibitornih koncentracij (µg/ml), določenih z Etesti, in premerov inhibicijskih con (mm) 100/10-mikrogramskih diskov za piperacilin/tazobaktam določenih za 50 kliničnih izolatov *Pseudomonas aeruginosa*. Črtkane črte predstavljajo mejne vrednosti občutljivosti za piperacilin/tazobaktam. Številke predstavljajo število izolatov z določeno minimalno inhibitorno koncentracijo in premerom inhibicijske cone



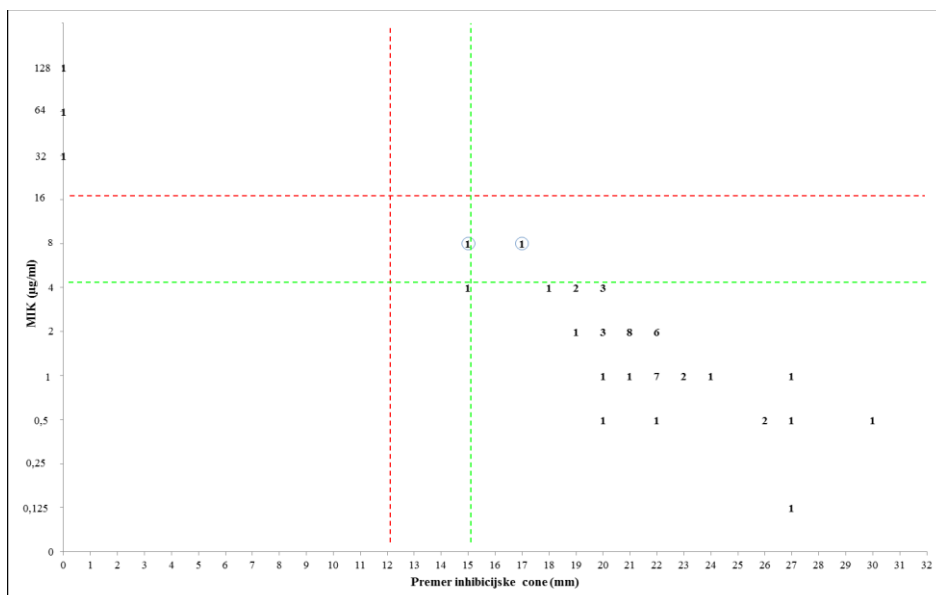
Legenda: MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

Slika 8: Primerjava minimalnih inhibitornih koncentracij (µg/ml), določenih z Etesti, in premerov inhibicijskih con (mm) 30-mikrogramskih diskov za cefepim, določenih za 50 kliničnih izolatov *Pseudomonas aeruginosa*. Črtkane črte predstavljajo mejne vrednosti občutljivosti za cefepim. Številke predstavljajo število izolatov z določeno minimalno inhibitorno koncentracijo in premerom inhibicijske cone. Obkrožene številke predstavljajo neskladne izolate



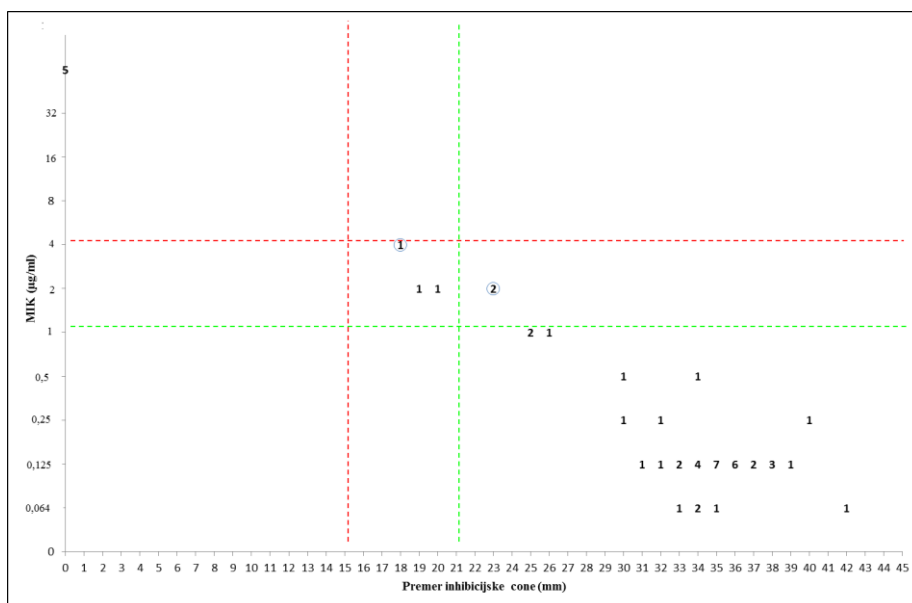
Legenda: MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

Slika 9: Primerjava minimalnih inhibitornih koncentracij, določenih z Etesti (µg/ml), in premerov inhibicijskih con (mm) 10-mikrogramskih diskov za meropenem, določenih za 50 kliničnih izolatov *Pseudomonas aeruginosa*. Črtkane črte predstavljajo mejne vrednosti občutljivosti za meropenem. Številke predstavljajo število izolatov z določeno minimalno inhibitorno koncentracijo in premerom inhibicijske cone. Obkrožene številke predstavljajo neskladne izolate



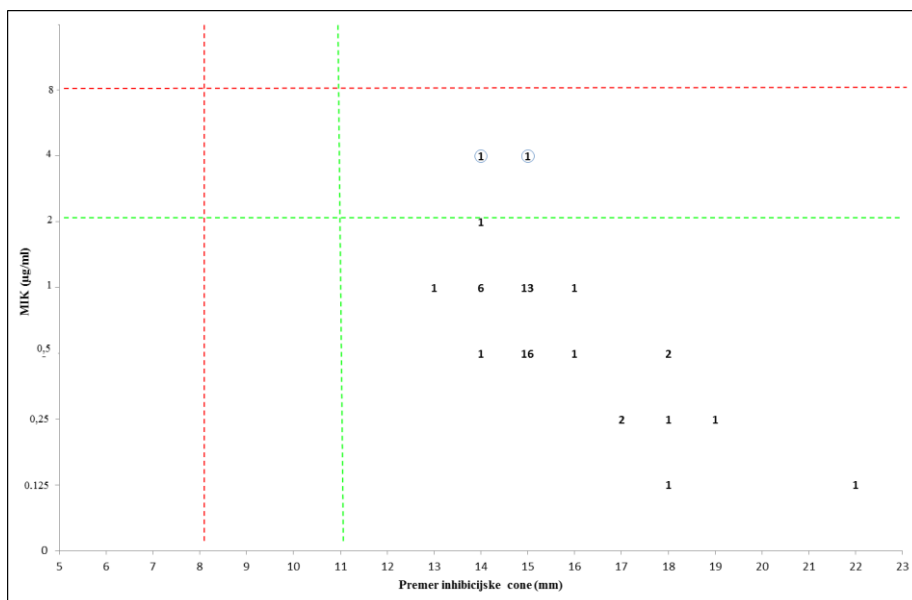
Legend: MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

Slika 10: Primerjava minimalnih inhibitornih koncentracij (µg/ml), določenih z Etesti, in premerov inhibicijskih con (mm) 10-mikrogramskih diskov za gentamicin, določenih za 50 kliničnih izolatov *Pseudomonas aeruginosa*. Črtkane črte predstavljajo mejne vrednosti občutljivosti za gentamicin. Številke predstavljajo število izolatov z določeno minimalno inhibitorno koncentracijo in premerom inhibicijske cone. Obkrožene številke predstavljajo neskladne izolate



Legenda: MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

Slika 11: Primerjava minimalnih inhibitornih koncentracij ($\mu\text{g/ml}$), določenih z Etesti, in premerov inhibicijskih con (mm) 5-mikrogramskih diskov za ciprofloksacin, določenih za 50 kliničnih izolatov *Pseudomonas aeruginosa*. Črtkane črte predstavljajo mejne vrednosti občutljivosti za ciprofloksacin. Številke predstavljajo število izolatov z določeno minimalno inhibitorno koncentracijo in premerom inhibicijske cone. Obkrožene številke predstavljajo neskladne izolate



Legenda: MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

Slika 12: Primerjava minimalnih inhibitornih koncentracij ($\mu\text{g/ml}$), določenih z Etesti, in premerov inhibicijskih con (mm) 10-mikrogramskih diskov za kolistin, določenih za 50 kliničnih izolatov *Pseudomonas aeruginosa*. Črtkane črte predstavljajo mejne vrednosti občutljivosti za kolistin. Številke predstavljajo število izolatov z določeno minimalno inhibitorno koncentracijo in premerom inhibicijske cone. Obkrožene številke predstavljajo neskladne izolate

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V razpravi bomo komentirali izsledke našega dela glede na obstoječo literaturo, hipoteze in cilje dela, v sklepih pa povzeli temeljne ugotovitve.

5.1 RAZPRAVA

V prvi točki razprave bomo govorili o občutljivosti izolatov *P. aeruginosa* za antibiotike, v drugi točki razprave pa bomo primerjali uporabo kvalitativne Kirby-Bauerjeve difuzijske metode in kvantitativne metode difuzije koncentracijskega gradienta (Etest) za testiranje občutljivosti bakterije *P. aeruginosa* za antibiotike.

5.1.1 Občutljivost izolatov *Pseudomonas aeruginosa* za izbrane antibiotike

Za zdravljenje okužb, ki jih povzroča *P. aeruginosa*, je ključna pravočasna in ustrezna antibiotična terapija. Naravna odpornost tega organizma proti velikemu številu antibiotikov je omejila izbor učinkovitih antibiotikov na protipseudomonasne peniciline (piperacilin, karbenicilin), cefalosporine III. in IV. generacije (ceftazidim, cefoperazon, cefepim), karbapeneme (imipenem, meropenem, doripenem), monobaktam aztreonam in fluorokinolone (ciprofloksacin, norfloksacin, levofloksacin). Aminoglikozidi (amikacin, gentamicin, netilmicin, tobramicin) se ne priporočajo v monoterapiji, temveč kot del kombinirane terapije za zdravljenje resnih okužb. Zaradi vse večje razširjenosti izolatov *P. aeruginosa*, odpornih proti več antibiotikom iz različnih skupin, in pomanjkanja novih učinkovitih antibiotikov pa se vse bolj v uporabo vračajo starejši antibiotiki iz skupine polimiksinov, ki so jih v preteklosti opuščali zaradi poročil o toksičnosti. Tako se v zadnjih letih zaradi vse večjega pojava večkratno odpornih izolatov *P. aeruginosa* v uporabo vrača kolistin kot zadnji izbor za zdravljenje težkih okužb (Gužvinec in sod., 2012).

Celotna raba antibiotikov v Sloveniji je bila v letu 2009 1,78 definirane dnevne doze (DDD) na 1.000 prebivalcev na dan, kar nas uvršča na deseto mesto med 22 državami (Čižman in Beović, 2011). O sami strukturi porabe antibiotikov v Sloveniji na splošno je težko govoriti, saj količina in struktura rabe antibiotikov močno variirata tako med primarnim in bolnišničnim sektorjem kot tudi med geografskimi območji (Čižman, 2010).

Obstaja povezava med porabo antibiotikov in odpornostjo bakterij. Čim višja je poraba, tem večja je odpornost bakterij (Čižman in sod., 2009). Čeprav je večina antibiotikov predpisana zunaj bolnišnic, ostajajo bolnišnice žarišče nastajanja odpornosti bakterij (Čižman, 2010). Poraba antibiotikov v bolnišnicah predstavlja le okrog 10 do 20 odstotkov celotne porabe antibiotikov (Čižman, 2010), vendar pa se ta usmeri na majhno število oseb. Zaradi visoke rabe antibiotikov in povečane možnosti prenosa odpornih bakterij so bolnišnice epicenter nastajanja odpornih bakterij. Na pogostnost izolacije odpornih bakterij bistveno vplivajo celotna raba antibiotikov, struktura rabe in prenos odpornih bakterij (Čižman in Beović, 2011). Obstajajo razlike v količini in strukturi rabe antibiotikov med različnimi bolnišnicami kot tudi med bolnišničnimi oddelki (Čižman in sod., 2009). Posledično se razlikujejo tudi profili odpornosti bakterij. Ker je zdravljenje bakterijskih okužb v prvi fazi večinoma izkustveno, je izrednega pomena lokalno spremljanje občutljivosti pomembnih bakterij za namen odkrivanja pojava odpornosti ter za načrtovanje izkustvenega zdravljenja v bolnišnicah. V končni fazi pa je ugotavljanje občutljivosti ključnega pomena za izbor najustreznejše protimikrobne terapije in usmerjeno zdravljenje okužb (Torres in sod., 2008). Prav identifikacija povzročitelja in racionalno zdravljenje po opravljenem antibiogramu se mnogokrat izkažeta kot edina učinkovita in sta predpogoj za optimalno in uspešno zdravljenje, hkrati pa racionalno predpisovanje antibiotikov prispeva k preprečevanju nastanka in širjenja odpornih bakterij.

Zaradi pojava vse večjega števila izolatov *P. aeruginosa* z zmanjšano občutljivostjo ali odpornostjo proti trenutno priporočenim antibiotikom za zdravljenje teh okužb je nujno določanje občutljivosti tega organizma za antibiotike. V standardni antibiogram Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik za določanje odpornosti bakterije *P. aeruginosa* (l. 2009) je vključenih šest antibiotikov: piperacilin/tazobaktam, ceftazidim, cefepim, imipenem, ciprofloksacin in amikacin. Antibiotiki so izbrani glede na trenutne trende lokalnega pojavljanja odpornosti. V diplomskem delu smo v antibiogram vključili nekoliko drugačen spekter antibiotikov. Testirali smo občutljivost izolatov bakterije *P. aeruginosa* za antibiotike, ki so bolj ali manj del stalne klinične prakse – piperacilin/tazobaktam (TZP), cefepim (CEF), meropenem (MEM), gentamicin (GM), ciprofloksacin (CIP) in kolistin (CL), ki v Sloveniji velja za rezervni antibiotik in se uporablja le v izjemnih primerih, izključno za usmerjeno bolnišnično zdravljenje okužb z

gramnegativnimi bakterijami, ki so odporne proti vsem drugim antibiotikom ali če je bilo zdravljenje z drugimi antibiotiki neučinkovito. Najpogosteje se uporablja za zdravljenje hudih okužb (pljučnica, sepsa, okužbe sečil) s *P. aeruginosa* in *Acinetobacter baumannii* kot zadnja možnost zdravljenja z antibiotiki (Čižman in Beović, 2007). Po podatkih, dostopnih v interaktivni bazi ESAC-Net (angl. Antimicrobial consumption interactive database) na strani Evropskega centra za preprečevanje in kontrolo bolezni (ECDC, angl. European Centre for Disease Prevention and Control), je bila raba polimiksinov v Sloveniji prvič zabeležena leta 2005, in sicer 0,0001 DDD na 1000 prebivalcev dnevno. Vse od leta 2005 do leta 2009 se je raba polimiksinov povečevala in v letu 2009 dosegla porabo 0,0010 DDD na 1000 prebivalcev dnevno (ECDC, 2005–2014). Ker je raba polimiksinov v Sloveniji nizka, je posledično pričakovati nizko stopnjo odpornosti proti temu agensu.

V diplomskem delu smo želeli določiti občutljivost 50 izolatov bakterije *P. aeruginosa*, osamljenih iz kužnin bolnikov, hospitaliziranih na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik v obdobju od junija do septembra 2009, za izbrane antibiotike. V ta namen smo vseh 50 izolatov *P. aeruginosa* testirali s Kirby-Bauerjevo disk difuzijsko metodo in metodo difuzije koncentracijskega gradienta (Etest) po navodilih proizvajalca antibiotičnih diskov (Becton Dickinson, Maryland, ZDA) oz. Etestov (bioMérieux, Lyon, France) in v skladu z navodili CLSI.

Določanje občutljivosti z disk difuzijsko metodo je pokazalo, da je občutljivost izolatov *P. aeruginosa* za izbrane antibiotike na splošno dobra (Preglednica 8). Občutljivost za vse izbrane antibiotike je bila visoka in je bila, z izjemo občutljivosti za ciprofloksacin (84 %), enaka ali višja od 92 %. Vseh 50 (100 %) izolatov *P. aeruginosa* je bilo glede na kriterije za opredelitev občutljivosti občutljivih za cefepim in kolistin. Največji delež odpornih (10 %) in intermediarnih (6 %) izolatov smo zasledili pri ciprofloksacinu. Proti kombinaciji piperacilin/tazobaktam je bilo odpornih 8 % izolatov, proti gentamicinu pa 6 % izolatov. Pri testiranju občutljivosti za meropenem smo zasledili 4 % odpornih in 4 % intermediarnih izolatov. Stopnje odpornosti proti izbranim antibiotikom variirajo in sovpadajo s pogostnostjo uporabe posameznih učinkovin. Zanimalo nas je tudi, kako je z občutljivostjo 50 izbranih izolatov za cefalosporinski antibiotik III. generacije, ceftazidim. V ta namen smo pregledali podatke standardnega antibiograma Univerzitetne klinike za

pljučne bolezni in alergijo Golnik, ki med drugim vključuje tudi rezultate določanja občutljivosti za ceftazidim z disk difuzijsko metodo (izvedena v skladu s standardi CLSI). Po bolnišničnih podatkih je proti ceftazidimu odpornih 6 % (3/50) izolatov, preostalih 94 % (47/50) izolatov pa občutljivih za ceftazidim (Tomič, 2014). Stopnja odpornosti proti ceftazidimu je višja v primerjavi s stopnjo odpornosti proti drugemu cefalosporinskemu antibiotiku – cefepimu, kar je pričakovano, saj se slednji za zdravljenje uporablja redkeje.

Vsem 50 izolatom *P. aeruginosa* smo občutljivost za izbrane antibiotike oz. odpornost proti njim določili še z metodo difuzije koncentracijskega gradienta, ki nam podaja kvantitativne rezultate. Pri testiranju z Etesti smo pri vseh testiranih antibiotikih zasledili pojav intermediarnih in/ali odpornih izolatov, vendar je bila občutljivost za izbrane antibiotike na splošno dobra in je bila, z izjemo občutljivosti za ciprofloksacin (80 %), višja ali enaka 90 % (Preglednica 9). Tako kot pri testiranju z disk difuzijo smo tudi pri določanju občutljivosti z Etesti največji delež (20 %) neobčutljivih (I+R) izolatov zasledili pri ciprofloksacinu. Delež proti ciprofloksacinu odpornih (12 %) izolatov in delež intermediarnih (8 %) izolatov sta bila nekoliko višja kot pri določanju z disk difuzijsko metodo. Čeprav je bil delež občutljivih izolatov v primeru ciprofloksacina najmanjši med vsemi testiranimi antibiotiki (80 %), sta bili minimalni inhibitorni vrednosti za 50 % ($MIK_{50} = 0,125 \mu\text{g/ml}$) in 90 % ($MIK_{90} = 4 \mu\text{g/ml}$) izolatov relativno nizki (Preglednica 10). Minimalne inhibitorne koncentracije za ciprofloksacin so sicer zavzemale vrednosti od 0,064 do $>32 \mu\text{g/ml}$. Večji delež odpornosti proti ciprofloksacinu je posledica visoke in zelo razširjene porabe tega in drugih antibiotikov iz skupine fluorokinolonov. Odpornost proti ciprofloksacinu je skrb vzbujajoča, saj v primeru odpornosti proti temu antibiotiku za zdravljenje ni primeren nobeden od antibiotikov iz skupine fluorokinolonov. Betalaktamski antibiotiki, zlasti penicilini, so najpogosteje uporabljeni antibiotiki tako v primarnem kot bolnišničnem sektorju. Vendar je to zelo posplošena slika, saj skupina betalaktamskih antibiotikov zajema zelo širok spekter različnih antibiotikov z zelo različno uporabnostjo. Količina in struktura porabe posameznih betalaktamskih antibiotikov močno variirata, posledično tudi stopnje odpornosti proti antibiotikom iz te skupine. V diplomskem delu smo preverili občutljivost kliničnih izolatov *P. aeruginosa* za piperacilin/tazobaktam, meropenem in cefepim. Pri testiranju občutljivosti izolatov z Etesti smo zasledili 8 % proti kombinaciji piperacilin/tazobaktam odpornih izolatov, preostalih 92 % izolatov je bilo

občutljivih za piperacilin/tazobaktam (Preglednica 9). Poudariti pa je treba, da sta bili v primeru kombinacije piperacilin/tazobaktam visoki tako minimalna inhibitorna koncentracija za 90 % organizmov ($MIK_{90} = 16 \mu\text{g/ml}$) kot tudi minimalna inhibitorna koncentracija za 50 % organizmov ($MIK_{50} = 4 \mu\text{g/ml}$) (Preglednica 10). Širok je bil tudi razpon MIK-ov, in sicer so vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij za piperacilin/tazobaktam obsegale koncentracije od 0,125 do $>256 \mu\text{g/ml}$. Testiranje z Etesti je razkrilo 6 % proti meropenemu odpornih izolatov in 2 % intermediarnih izolatov (Preglednica 9). Meropenem je pokazal dobro aktivnost ($MIK_{50} = 0,25 \mu\text{g/ml}$, $MIK_{90} = 2 \mu\text{g/ml}$) (Preglednica 10), vendar pa so tudi v primeru meropenema vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij močno variirale – minimalne inhibitorne koncentracije za meropenem so zavzemale vrednosti od 0,016 do $>32 \mu\text{g/ml}$ (Preglednica 10). Za meropenem je bilo občutljivih 92 % izolatov (Preglednica 9). Medtem ko je bilo pri testiranju z disk difuzijsko metodo vseh 50 (100 %) izolatov občutljivih za cefepim (Preglednica 8), smo pri testiranju z Etesti zasledili pojav intermediarnih izolatov (Preglednica 9). Za cefepim so bili zmerno občutljivi 4 (8 %) izolati (Preglednica 9) z določeno minimalno inhibitorno koncentracijo $16 \mu\text{g/ml}$ (Priloga C). Proti cefepimu odpornih izolatov tudi pri testiranju z Etesti nismo zasledili. Čeprav je bila občutljivost za cefepim dobra (92 %), pa sta bili vrednosti MIK_{50} in MIK_{90} relativno visoki, in sicer $2 \mu\text{g/ml}$ in $8 \mu\text{g/ml}$ (Preglednica 10). Minimalne inhibitorne vrednosti za cefepim so sicer variirale od 0,5 do $16 \mu\text{g/ml}$ (Preglednica 10). Preverili smo tudi občutljivost izolatov za aminoglikozidni antibiotik gentamicin. Aminoglikozidni antibiotiki se navadno ne uporabljajo samostojno, pač pa kot del kombinirane terapije, npr. v kombinaciji s širokospektralnimi betalaktamskimi antibiotiki za izkustveno zdravljenje hudih okužb, ki jih povzročajo gramnegativne bakterije. Pri testiranju z Etesti je bilo za gentamicin neobčutljivih (I+R) 10 % izolatov, in sicer je bilo 6 % izolatov proti gentamicinu odpornih, 4 % izolatov pa intermediarnih (Preglednica 9). Vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij za gentamicin so obsegale koncentracije od 0,125 do $128 \mu\text{g/ml}$, določeni vrednosti MIK_{50} in MIK_{90} pa sta bili 2 in $4 \mu\text{g/ml}$ (Preglednica 10). Za gentamicin je bilo občutljivih 90 % izolatov (Preglednica 10). Kolistin je med vsemi testiranimi antibiotiki pokazal najboljšo aktivnost proti izolatom *P. aeruginosa*. Minimalna inhibitorna koncentracija kolistina, ki inhibira rast 90 %, je bila nizka ($MIK_{90} = 1 \mu\text{g/ml}$), prav tako tudi minimalna inhibitorna koncentracija, ki inhibira 50 % izolatov ($MIK_{50} = 0,5 \mu\text{g/ml}$)

(Preglednica 10). Medtem ko je bilo pri testiranju z disk difuzijsko metodo vseh 50 (100 %) izolatov občutljivih za kolistin (Preglednica 8), smo pri testiranju z Etesti zasledili dva izolata (4 %), zmerno občutljiva za kolistin (Preglednica 9) s pripadajočima MIK-oma 4 µg/ml (Priloga C). Preostalih 96 % izolatov je bilo občutljivih za kolistin (Preglednica 9). Vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij za kolistin so bile nizke – obsegale so koncentracije od 0,125 µg/ml do 4 µg/ml (Preglednica 10). Proti kolistinu odpornih izolatov tudi pri testiranju z Etesti nismo zasledili (Preglednica 9), vendar pa se moramo zavedati, da intermediarni sevi lahko kaj hitro preidejo v odporne. Ker se kolistin uporablja le v izjemnih primerih, je aktivnost tega antibiotika v splošnem še vedno dobra, o čemer poročajo tudi nekatere podobne »nedavne« študije (Galani in sod., 2008; Somily, 2010). Zaskrbljujoče pa je dejstvo, da se v svetu že pojavljajo izolati, odporni tudi proti temu, zadnjemu antibiotiku, in zdi se, da so neozdravljive okužbe s *P. aeruginosa* v prihodnosti neizbežne.

Medtem ko obstajajo številne interpretacije pojma večkratno odpornih bakterij (MDR, angl. multidrug-resistant), je bakterija *P. aeruginosa* po standardni definiciji MDR, ki jo je nedavno predlagala mednarodna skupina znanstvenikov, definirana kot neobčutljiva (I ali R) za vsaj en antibiotik iz treh ali več kategorij protipseudomonasnih antibiotikov, pri čemer so definirane antibiotične kategorije: protipseudomonasni penicilini + inhibitorji β-laktamaz (tikarcilin/klavulanska kislina, piperacilin/tazobaktam), protipseudomonasni cefalosporini (ceftazidim, cefepim), protipseudomonasni karbapenemi (imipenem, meropenem, doripenem), aminoglikozidi (gentamicin, tobramicin, amikacin, netilmicin), protipseudomonasni fluorokinoloni (ciprofloksacin, levofloksacin), monobaktami (aztreonam), fosfonske kisline (fosfomicin) in polimiksini (kolistin, polimiksin B) (Magiorakos in sod., 2011). Da bi zagotovili pravilno uporabo te definicije, bi sicer morali izolate testirati na vse ali skoraj vse antibiotike znotraj kategorij antibiotikov, vseeno pa lahko iz priloge E že zdaj razberemo prisotnost MDR izolatov *P. aeruginosa*. Na primer, testiranje z difuzijsko metodo (Priloga B) je pokazalo večkratno odpornost izolata 4759 (odporen proti kombinaciji piperacilin/tazobaktam, gentamicinu in meropenemu ter zmerno občutljiv za ciprofloksacin), medtem ko je testiranje z Etesti (Priloga C) poleg omenjenega izolata razkrilo tudi večkratno odpornost izolata 4994 (odporen proti kombinaciji piperacilin/tazobaktam in ciprofloksacinu ter zmerno občutljiv za cefepim).

Rezultati Etestov (Priloga C) kažejo, da je izolat 4759, ki je bil osamljen iz aspirata traheje (Priloga E), odporen proti kombinaciji piperacilin/tazobaktam, gentamicinu in meropenemu, hkrati pa kaže le zmerno občutljivost za ciprofloksacin, cefepim in kolistin, kar nakazuje na potencialno možnost razvoja pan-rezistentnih (PDR, angl. pandrug-resistant) izolatov, neobčutljivih za vse antibiotike v vseh kategorijah protipseudomonasnih antibiotikov. Predvidevamo lahko, da bi bilo v primeru testiranja občutljivosti izolatov za vse antibiotike v vseh antibiotičnih kategorijah število MDR *P. aeruginosa* izolatov večje. Podatki o incidenci MDR *P. aeruginosa* so skopi. Razlog za to je verjetno prav pomanjkanje splošno sprejete definicije. Vsekakor pa je jasno, da se izolati *P. aeruginosa*, odporni proti antibiotikom iz več različnih skupin, pojavljajo vse pogosteje in da obstaja povezava med večkratno odpornimi izolati in podaljšano hospitalizacijo, povečano mortaliteto ter povečanimi stroški zdravljenja.

Lahko potrdimo na začetku postavljeni hipotezi. Stopnje odpornosti proti izbranim antibiotikom variirajo in odražajo različno pogostnost uporabe posameznih učinkovin. Kolistin se je izkazal za najučinkovitejši antibiotik. Proti kolistinu odpornih izolatov nismo zasledili, delež intermediarnih izolatov pa je bil majhen, kar sovпада z nizko porabo tega antibiotika. Čeprav naši rezultati kažejo razmeroma dobro občutljivost za izbrane antibiotike, se moramo zavedati, da Slovenija ni oaza. V Sloveniji vse pogosteje predpisujemo antibiotike zadnje izbire, kot je npr. kolistin, kar je znak, da se vse pogosteje srečujemo z večkratno odpornimi bakterijami, kjer ni možnosti zdravljenja z drugimi antibiotiki. Zato je pomembno, da te antibiotike prejemajo le bolniki, ki jih resnično potrebujejo (Čižman in Beović, 2011). Čižman (2013) v svojem poročilu ob dnevu antibiotikov 2013 poroča, da v zadnjem času raba cefalosporinov 3. generacije in fluorokinolonov kaže ugodne trende zmanjševanja porabe, vendar je ta še vedno previsoka, kar se kaže v odpornosti gramnegativnih bakterij proti omenjenim antibiotikom. Raba cefalosporinov 4. generacije se ne znižuje. Močno zaskrbljujoča je naraščajoča raba karbapenemov, saj bo ta nedvomno povzročila večjo odpornost gramnegativnih bakterij (Čižman, 2013). Raba antibiotikov v Sloveniji ni optimalna in še vedno odstopa v primerjavi z državami, v katerih je predpisovanje antibiotikov racionalnejše. Ker je odpornost bakterij v velikem delu posledica pretirane in nepravilne rabe antibiotikov, je za preprečevanje nastanka in širjenja odpornosti nujna optimizacija porabe.

5.1.2 Primerjava rezultatov Kirby-Bauerjeve difuzijske metode in metode difuzije koncentracijskega gradienta

Danes imamo za določanje občutljivosti bakterij na razpolago številne metode. Medtem ko so dilucijske metode referenčne metode (zlati standard) za določanje občutljivosti bakterij, se te v rutini ne uporabljajo pogosto, saj so zamudne, izvedbeno zahtevnejše in drage. Večina laboratorijev za rutinsko določanje občutljivosti bakterij za antibiotike uporablja Kirby-Bauerjevo difuzijsko metodo. Disk difuzijska metoda je standardizirana in zanesljiva alternativna metoda dilucijskih metod za določanje občutljivosti številnih bakterij za različne antibiotike (Hudzicki, 2009). Še ena dobro uveljavljena metoda za določanje občutljivosti bakterij za antibiotike je metoda difuzije koncentracijskega gradienta (Etest). Etest je kombinacija disk difuzije in agar dilucijskih metod (Schwalbe in sod., 2007). Test se izvaja na enak način kot disk difuzija, vendar zaradi gradienta antibiotika na Etestu poleg kategorije občutljivosti na podlagi rezultatov omogoča tudi določitev minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) antibiotika (bioMérieux, 2014).

V diplomskem delu smo primerjali uporabo kvalitativne Kirby-Bauerjeve difuzijske metode in kvantitativne metode difuzije koncentracijskega gradienta (Etest) za testiranje občutljivosti bakterije *P. aeruginosa* za antibiotike: piperacilin/tazobaktam, cefepim, meropenem, gentamicin, ciprofloksacin in kolistin. Metodo difuzije koncentracijskega gradienta smo izbrali za »referenčno« metodo v smislu, da smatramo, da metoda podaja natančnejše podatke o občutljivosti, čeprav je treba poudariti, da je dejansko referenčna metoda za določanje občutljivosti bakterije *P. aeruginosa* mikrodilucijska metoda. Natančnost določanja občutljivosti z disk difuzijsko metodo za izbrane antibiotike je bila ocenjena v primerjavi z Etestom z uporabo razpoložljivih interpretativnih kriterijev CLSI. Primerjali smo kategorije občutljivosti vseh 50 izolatov bakterije *P. aeruginosa* za izbrane antibiotike, določene z disk difuzijsko metodo in Etesti. Glede na ujemanje/neujemanje kategorij občutljivosti, določenih z omenjenima metodama, smo določili prisotnost zelo velikih, velikih in majhnih napak in nato izračunali stopnje oz. deleže napak ter stopnje ujemanja med metodama.

Večjih odstopanj med rezultati, dobljenimi z Etesti in disk difuzijsko metodo, nismo zasledili (Preglednica 17 in Preglednica 18). Primerjava rezultatov ni pokazala zelo velikih in velikih napak pri nobenem od testiranih antibiotikov, prišlo pa je do manjših diskrepanc v primeru cefepima, meropenema, gentamicina, ciprofloksacina in kolistina (Preglednica 17). Stopnje občutljivosti za omenjene antibiotike, določene z disk difuzijsko metodo, so bile 100 % za cefepim in kolistin, 92 % za meropenem, 94 % za gentamicin in 84 % za ciprofloksacin (Preglednica 8), medtem ko so bile stopnje občutljivosti, določene z Etesti (z izjemo stopnje občutljivosti za meropenem (92 %), nekoliko nižje na račun intermediarnih rezultatov, in sicer 96 % za kolistin, 92 % za cefepim, 90 % za gentamicin in 80 % za ciprofloksacin (Preglednica 9). Pri primerjavi rezultatov metod smo zasledili pojav majhnih napak, ki nakazujejo na trend lažne občutljivosti disk difuzijske metode. Stopnje majhnih napak so bile 8 % v primeru cefepima, 6 % v primeru ciprofloksacina, 4 % v primeru gentamicina in kolistina, v primeru meropenema pa 2 % (Preglednica 17). Stopnje napak niso presegale nesprejemljivih stopenj napak (Preglednica 7), priporočenih v dokumentu M23-A2 oblikovanem s strani CLSI. Kategorije občutljivosti za piperacilin/tazobaktam, določene z disk difuzijsko metodo, so se popolnoma ujemale s kategorijami občutljivosti, določenimi z Etesti (Preglednica 11). Stopnje ujemanja med rezultati disk difuzijske metode in Etesti so bile za vseh šest izbranih antibiotikov višje od 90 %, in sicer 100 % za piperacilin/tazobaktam, 98 % za meropenem, 96 % za kolistin in gentamicin, 94 % za ciprofloksacin in 92 % za cefepim (Preglednica 17), kar priča o dobri primerljivosti metod za določanje občutljivosti izolatov *P. aeruginosa* za izbrane antibiotike. To potrjujejo tudi visoka (96 %) skupna stopnja ujemanja med metodama in nizke skupne stopnje napak – frekvenca zelo velikih in velikih napak je bila 0 %, frekvenca majhnih napak pa 4 % (Preglednica 18). Glede na rezultate lahko zaključimo, da ni večjih odstopanj med rezultati testiranja obeh metod za izbrane antibiotike, s čimer potrjujemo na začetku postavljeno hipotezo.

Čeprav je disk difuzijska metoda standardizirana in dobro uveljavljena metoda za določanje občutljivosti številnih bakterij za številne antibiotike, je še vedno veliko dilem glede ustrezne metode in kriterijev za določanje občutljivosti bakterije *P. aeruginosa* in drugih gramnegativnih bacilov za kolistin. Trenutno obstajajo nasprotujoča si priporočila glede kriterijev za interpretacijo občutljivosti za kolistin na podlagi določenih minimalnih

inhibitornih koncentracij, kot tudi v zvezi z metodologijo in kriteriji za interpretacijo občutljivosti za kolistin disk difuzijske metode. Natančnost testiranja občutljivosti za polimiksine z disk difuzijsko metodo je bila desetletja vprašljiva zaradi slabe difuzije teh antibiotikov v agar. Številne nedavne in starejše študije so odkrile zelo velike napake (lažno občutljivi rezultati), ki nakazujejo na nezanesljivost disk difuzijske metode. Glede na rezultate predlagajo, da bi za določanje občutljivosti za kolistin morale biti uporabljene alternativne metode. Mikrodilucija v tekočem gojišču in agar dilucija sta standardni, sprejemljivi metodi za določanje občutljivosti za kolistin, vendar sta zahtevni, časovno zamudni in dragi. Zaradi netočnosti disk difuzijske metode na eni strani ter zahtevnosti in dolgotrajnosti dilucijskih metod na drugi strani atraktivno alternativo za rutinsko določanje občutljivosti v kliničnih laboratorijih predstavljajo Etesti (Landman in sod., 2008), ki glede na podatke nekaterih študij (Heijden in sod., 2007) dajejo rezultate, primerljive z rezultati referenčnih dilucijskih metod. V diplomskem delu smo ocenili natančnost določanja občutljivosti za kolistin z disk difuzijsko metodo v primerjavi z Etestom z uporabo razpoložljivih interpretativnih kriterijev CLSI. Kot že omenjeno, naši rezultati niso pokazali zelo velikih in velikih napak pri primerjavi kategorij občutljivosti za kolistin, določenih z omenjenima metodama, frekvenca majhnih napak pa je bila 4 % (Preglednica 17). Galani in sod. (2008) v svoji študiji prav tako poročajo o nizki frekvenci majhnih napak. Medtem pa nekatere druge študije (Goldstein in sod., 2007; Somily, 2010) poročajo o večji diskrepanci (incidenca velikih napak, večja frekvenca majhnih napak) med rezultati omenjenih metod. Avtorji slednjih študij so disk difuzijo označili kot nezanesljivo metodo za testiranje občutljivosti za kolistin in za določanje občutljivosti gramnegativnih bacilov za kolistin priporočajo uporabo Etestov. Študije, ki ocenjujejo natančnost različnih metod za določanje občutljivosti za kolistin gramnegativnih bakterij, so redke. Poleg tega so študije zaradi odstopanj v interpretaciji kriterijev za določanje občutljivosti in razlik v metodologiji med seboj težko primerljive. Glede na vse pogostejše pojavljanje večkratno odpornih gramnegativnih bakterij in posledično vse večje rabe polimiksinov antibiotikov je potrebno ovrednotiti in standardizirati metode za rutinsko *in vitro* določanje občutljivosti bakterij v kliničnih laboratorijih.

Ne glede na izbiro metode za določanje občutljivosti za antibiotike *in vitro* učinkovitost ne napoveduje vedno *in vivo* uspešnosti zdravljenja okužb, ki jih povzroča *P. aeruginosa*.

Velik problem pri določanju občutljivosti predstavlja razvoj adaptivne odpornosti, ki je lahko inducirana z določenimi okoljskimi pogoji v gostitelju ali s samim antibiotičnim zdravljenjem. *P. aeruginosa* je zmožen tekom zdravljenja razviti odpornost proti vsem antibiotikom. Tako lahko izolati, ki so prvotno občutljivi, pridobijo odpornost med antibiotično terapijo, kar lahko resno ogrozi zdravljenje okužb, ki jih povzročajo ti mikroorganizmi. Adaptivna odpornost kot odgovor na antibiotično zdravljenje se običajno pojavi v treh do štirih dneh po začetku terapije. Zato je priporočljivo izolate iste vrste iz podobnih mest telesa ponovno testirati za detekcijo odpornosti, ki bi se lahko razvila med zdravljenjem. Laboratorijske smernice o tem, kdaj izvajati testiranje občutljivosti ponovljenih izolatov, bi morale biti določene v okviru konzultacij z medicinskim osebjem (CLSI, 2012b).

Naši rezultati niso pokazali večjih odstopanj v rezultatih testiranja občutljivosti za izbrane antibiotike, dobljenih z disk difuzijsko metodo in Etesti (Preglednica 17 in Preglednica 18), kar potrjuje našo hipotezo. Opažene rezultate je mogoče razumeti kot poskus potrditve disk difuzijske metode kot zanesljive in ustrezne metode za določanje občutljivosti bakterije *P. aeruginosa* oz. za primerjavo natančnosti disk difuzijske metode in Etestov za določanje občutljivosti bakterije *P. aeruginosa* za izbrane antibiotike. Ena od omejitev naše študije je potrditev rezultatov glede na klinični izid zdravljenja. Poleg tega bi bilo potrebno za natančno oceno obeh metod rezultate, dobljene z Etesti in disk difuzijo, primerjati z rezultati referenčne mikrodilucijske metode (zlati standard). Odsotnost velikih napak oz. majhna diskrepanca med rezultati disk difuzijske metode in Etestov pri določanju občutljivosti izolatov *P. aeruginosa* za kolistin bi lahko bila posledica odsotnosti proti kolistinu odpornih izolatov. Da bi natančneje ocenili ujemanje med metodama, bi morali v študijo vključiti izolate, odporne proti kolistinu. Kakorkoli, po naših podatkih so rezultati disk difuzijske metode in Etestov primerljivi, vendar pa bi bilo glede na priporočila nekaterih študij vredno razmisliti o Etestih kot o enostavni in zanesljivi alternativni referenčnih metod za detekcijo odpornosti proti kolistinu pri gramnegativnih bacilih. Po podatkih nekaterih študij Etesti dajejo rezultate, primerljive z referenčno metodo, poleg tega pa podajajo kvantitativne rezultate (MIK). Kvantitativni podatki so pogoj za obvladovanje kritičnih okužb, hkrati pa spodbujajo racionalno uporabo antibiotikov (bioMérieux, 2009).

5.2 SKLEPI

- Kolistin je pokazal najboljšo aktivnost proti izolatom *P. aeruginosa* med vsemi izbranimi antibiotiki. Pri testiranju z disk difuzijsko metodo je bilo vseh 50 (100 %) izolatov *P. aeruginosa* opredeljenih kot občutljivih za kolistin. Pri testiranju z Etesti smo zasledili 2 (4 %) za kolistin intermediarna izolata, preostalih 96 % izolatov je bilo občutljivih za kolistin. Proti kolistinu odpornih izolatov nismo zasledili z nobeno od metod, delež intermediarnih izolatov, detektiran z Etesti, pa je bil majhen, kar sovпада z nizko porabo tega antibiotika. Glede na to, da se kolistin v Sloveniji uporablja le kot rezervni antibiotik, smo pričakovali in nato potrdili dobro občutljivost izolatov za omenjeni antibiotik.
- Občutljivost izolatov *P. aeruginosa* za antibiotike piperacilin/tazobaktam, cefepim, meropenem in gentamicin je bila visoka in je znašala vsaj 90 %. Občutljivost izolatov je bila najnižja v primeru ciprofloksacina (80 %).
- Deleži odpornosti proti izbranim antibiotikom so znašali od 0 % do 12 %, odvisno od antibiotika.
- Zasledili smo izolate zmerno občutljive oz. odporne proti antibiotikom iz treh ali več kategorij protipseudomonasnih antibiotikov.
- Rezultati testiranja občutljivosti za antibiotike, dobljeni z metodo difuzije koncentracijskega gradienta in disk difuzijsko metodo, so bili primerljivi, kar potrjuje na začetku postavljeno hipotezo.
- Primerjava rezultatov metod ni pokazala zelo velikih in velikih napak pri nobenem od testiranih antibiotikov, prišlo pa je do manjših odstopanj v primeru cefepima, gentamicina, ciprofloksacina, kolistina in meropenema. Pri primerjavi rezultatov določanja občutljivosti za omenjene antibiotike smo zasledili pojav majhnih napak, ki nakazujejo na trend lažne občutljivosti disk difuzijske metode.

6 POVZETEK

Zdravljenje okužb v zadnjem času predstavlja vse večji izziv. To še posebej drži v primeru večkratno odpornih gramnegativnih bakterij v kontekstu bolnišničnih okužb. Ena od resnih groženj je prav zagotovo tudi bakterija *P. aeruginosa*, ki lahko, zahvaljujoč neverjetni sposobnosti prilagajanja, zelo hitro razvije sočasno odpornost proti antibiotikom iz različnih skupin. Večkratno odporni izolati *P. aeruginosa* se v svetu pojavljajo vse pogostejše in predstavljajo veliko grožnjo, saj v mnogih primerih ne puščajo prostora za učinkovito protimikrobno terapijo. V uporabo se tako vse bolj vrača kolistin kot zadnji možni izbor za zdravljenje okužb, ki jih povzročajo gramnegativne bakterije, odporne proti vsem drugim antibiotikom. Zaskrbljujoče je dejstvo, da se v svetu pojavljajo izolati, odporni tudi proti temu, zadnjemu antibiotiku.

V diplomskem delu smo z uporabo Kirby-Bauerjeve difuzijske metode in metode difuzije koncentracijskega gradienta (Etest) določili občutljivost 50 izolatov bakterije *P. aeruginosa*, osamljenih iz kužnin bolnikov, hospitaliziranih na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik v obdobju od junija do septembra 2009, za antibiotike, ki so bolj ali manj del stalne klinične prakse – piperacilin/tazobaktam, cefepim, meropenem, gentamicin, ciprofloksacin in za kolistin, ki v Sloveniji velja za rezervni antibiotik.

Z gotovostjo lahko potrdimo na začetku postavljeni hipotezi. Stopnje odpornosti proti izbranim antibiotikom variirajo in odražajo različno pogostnost uporabe posameznih učinkovin. Občutljivost izolatov za izbrane antibiotike je bila visoka in je z izjemo občutljivosti za CIP (80 %) določene z Etesti, znašala vsaj 90 %. Deleži odpornosti proti izbranim antibiotikom so znašali od 0 % do 12 %, odvisno od antibiotika. Kolistin se je izkazal za najučinkovitejši antibiotik, zanj je bilo občutljivih 97 % izolatov. Proti kolistinu odpornih izolatov nismo zasledili, delež intermediarnih izolatov pa je bil majhen (4 %), kar sovпада z nizko porabo tega antibiotika. Ker se kolistin v Sloveniji uporablja le v izjemnih primerih, kot rezervni antibiotik, je aktivnost tega antibiotika v splošnem še vedno dobra, vendar pa se moramo zavedati, da lahko intermediarni sevi kaj hitro preidejo v odporne. Glede na rezultate lahko zaključimo, da so izolati bakterije *P. aeruginosa*, osamljeni iz kužnin bolnikov, hospitaliziranih na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik v obdobju od junija do septembra 2009, zadovoljivo občutljivi. Vsekakor pa je

treba poudariti, da je zaradi vse večjega pojava, vse bolj odpornih izolatov nujno spremljanje občutljivosti kliničnih izolatov, ki je predpogoj za optimalno predpisovanje antibiotikov in nadalje za uspešno zdravljenje okužb ter preprečevanje nastanka in širjenja odpornih bakterij.

Zaradi vse večjega pojava izolatov *P. aeruginosa* z zmanjšano občutljivostjo za priporočene antibiotike oz. odpornostjo proti njim je nujno, da imamo na voljo standardizirane, zanesljive, ekonomične, nezahtevne in ponovljive metode za določanje občutljivosti. V diplomskem delu smo ocenili natančnost določanja občutljivosti za izbrane antibiotike s Kirby-Bauerjevo difuzijsko metodo v primerjavi z metodo difuzije koncentracijskega gradienta (Etest). Naši rezultati kažejo na dobro primerljivost rezultatov omenjenih metod. V primeru cefepima, gentamicina, ciprofloksacina in kolistina smo sicer zasledili majhne napake, ki nakazujejo na trend lažne občutljivosti disk difuzijske metode, vendar je bilo na splošno kategorično ujemanje med metodama dobro, za vseh šest preučevanih antibiotikov. Večjih odstopanj v rezultatih testiranja občutljivosti za posamezne antibiotike med metodama nismo zasledili, kar potrjuje na začetku postavljeno hipotezo. Ker se v uporabo vrača kolistin in še vedno obstajajo nesoglasja glede določanje občutljivosti za skupino polimiksinskih antibiotikov, je v prihodnje potrebno ovrednotiti in standardizirati metode za rutinsko *in vitro* določanje občutljivosti bakterij v kliničnih laboratorijih.

7 VIRI

- Acar J.F., Goldstein F.W. 1997. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 24, 1: 67-73
- Basak S., Khodke M., Bose S., Mallick S. 2009. Inducible AmpC beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a rural hospital. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 3: 1921-1927
- Barnard F.M., Maxwell A. 2001. Interaction between DNA gyrase and quinolones: effects of alanine mutations at GyrA subunit residues Ser83 and Asp87. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 1994-2000
- Bearden D.T., Danziger L.H. 2001. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Pharmacotherapy*, 21, 10P2: 224-232
- Bedenić B. 2009. Antibakterijski lijekovi. V: *Medicinska mikrobiologija*. Kamberović Uzunović S. (ur.). Zenica, Štamparija Fojnica d.o.o.: 221-251
- Ben Haj K.A., Moissenet D., Vu T.H., Khedher M. 2011. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. *Annales de Biologie Clinique*, 69, 4: 393-403
- Beović B., Nadrah K. 2013. Protibakterijska zdravila. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 41 str.
<http://www.mf.uni-lj.si/dokumenti/4e9df909b9e8506f18bdb96bf307daf6.pdf>
(20. Nov. 2013)
- Black J.G. 2012. Antimicrobial therapy. V: *Microbiology: principles and explorations*. 8th ed. Witt K., Staat M., Morris L., Swain E. (eds.) Hoboken. John Wiley & Sons: 364-398
- bioMérieux. 2009. Etest[®]. Durham, bioMérieux, Inc.: 1 str.
http://www.biomerieuxusa.com/servlet/srt/bio/usa/dynPage?doc=USA_PRD_LST_G_PRD_USA_11 (9. Nov. 2013)
- bioMérieux. 2014. Etest[®]: Ready to use AST reagent strips to determine on-scale MICs. Marcy l'Etoile, bioMérieux, S.A.: 3 str.
<http://www.biomerieux-diagnostics.com/etest> (15. Apr. 2014)
- Bowler P.G., Duerden B.I., Armstrong D.G. 2001. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 244-269

- Breidenstein B.M.E., de la Fuente-Núñez C., Hancock E.W.R. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. Trends in Microbiology, 19, 8: 419-426
- Bretonnière C., Jacqueline C., Caillon J., Guitton C., Desessard C., Le Mabecque V., Mie'geville F.A., Villers D., Potel G., Boutoille D. 2012. Evaluation of doripenem in an experimental model of resistant *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67, 3: 780-781
- Brooks F.G., Carroll C.K., Butel S.J., Morse A.S. 2010. Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. 25th ed. New York, The McGraw-Hill Companies: 339-371
- Bush K., Jacoby A.G. 2010. Updated functional classification of β -lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 54, 3: 969-976
- Cerar T., Cvitković-Špik V., Furlan M., Ružić-Sabljić E., Steyer A., Strašek K., Šoba B. 2010. Določanje občutljivosti bakterij in gliv za antimikrobne učinkovine, I. del. V: Praktikum iz mikrobiologije za študente farmacije, univerzitetni program. Ružić-Sabljić (ur.). Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo: 73-79
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. M100-S19. Wayne, Pennsylvania, Clinical and Laboratory Standards Institute: 194 str.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012a. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-ninth edition. M07-A9. Wayne, Pennsylvania, Clinical and Laboratory Standards Institute: 68 str.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012b. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. M100-S22. Wayne, Pennsylvania, Clinical and Laboratory Standards Institute: 188 str.
- Coates A., Hu Y., Bax R., Page C. 2002. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. Nature Reviews Drug Discovery, 1: 895-910
- Čižman M. 2010. Dan ozaveščanja o antibiotikih. ISIS, 16, 12: 56-57
- Čižman M. 2013. Dan antibiotikov 2013. ISIS 22, 11: 61-64

- Čižman M., Bajec T., Čad Pečar S., Jenko S., Kopač Z., Bogovič M., Tratar F., Fatur Štrancar K., Kobal N., Najdenov Mavsar B., Drofenik P., Marušič Premuš A., Balkovec C., Remec T., Selemović D., Hanuš Ovnič A., Martinčič T., Stefančič M., Jošt M., Sons M., Križman L., Kraševac M., Pižent Armuš A., Fijevž E., Zorec M., Žvokelj J., Faganeli N., Lavra J., Skulj Sikošek T., Bečar C., Hriberšek D., Zorc M., Čeplak P., Veselinovič J. 2009. Poraba antibiotikov v slovenskih bolnišnicah v obdobju 2004-2008 na nacionalni ravni do ravni oddelkov. Zdravniški vestnik, 78: 717-725
- Čižman M., Beovič B. 2011. Raba antibiotikov v Sloveniji. ISIS, 20, 12: 46-48
- Čižman M., Beovič B. 2007. Kako predpisujemo protimikrobna zdravila v bolnišnicah. Ljubljana, Sekcija za kemoterapijo Slovenskega zdravniškega društva: 14-19
- Deguchi T., Fukuoka A., Yasuda M. 1997. Alteration in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 41: 699-701
- Drenkard E. 2003. Antimicrobial resistance of *P. aeruginosa* biofilms. Microbes and Infection, 5: 1213-1219
- Driscoll J.A., Brody S.L., Koller M.H. 2007. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infectious. Drugs, 67, 3: 351-368
- ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control. 2013. Trend of antimicrobial consumption of Polymyxins (ATC group J01XB) in the hospital sector in Slovenia from 1997 to 2011. Stockholm, ECDC: baza podatkov http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/esac-net-database/Pages/trend-consumption-by-country.aspx (14.2.2013)
- Falagas E.M., Kasiakou K.S. 2005. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. Clinical Infectious Diseases, 40: 1333-1341
- Fernández L., Gooderham J.W., Bains M., McPhee B.J., Wiegand I., Hancock W.E.R. 2010. Adaptive resistance to the "last hope" antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 54, 8: 3372-3382
- Fernández L., Breidenstein B.M.E., Hancock E.W.R. 2011. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. Drug Resistance Updates, 14: 1-21
- Fritsche R.T., Sader S.H., Jones N.R. 2008. Antimicrobial activity of ceftobiprole, a novel anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cephalosporin, tested against contemporary pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance

- Program (2005–2006). Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 61, 1: 86-95
- Galani I., Kontopidou F., Souli M., Rekatsina P.D., Koratzanis E., Deliolanis J., Giamarellou H. 2008. Colistin susceptibility testing by Etest and disk diffusion methods. International Journal of Antimicrobial Agents, 31, 5: 434-439
- Goldstein F.W., Ly A., Kitzis M.D. 2007. Comparison of Etest with agar dilution for testing the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and other multidrug-resistant bacteria to colistin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 59, 5: 1038-1040
- Golle A., Lorenčič Robnik S., Novak D., Roberšek Gorišek J. 2006. Odpornost bakterije *Pseudomonas aeruginosa* in bakterij iz rodu *Acinetobacter*, osamljenih iz kužnin bolnikov, zdravljenih v Splošni bolnišnici Maribor v obdobju 2001-2005. Medicinski razgledi, 45, Supplement: 39-48
- Gužvinec M., Butić I., Jelić M., Bukovski S., Lucić S., Adrašević Tambić A. 2012. Rezistencija na antibiotike u bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Infektološki glasnik, 32, 2: 71-80
- Heijden M.I., Levin S.A., De Pedri H.E., Fung L., Rossi F., Duboc G., Barone A.A., Costa F.S. 2007. Comparison of disk diffusion, Etest and broth microdilution for testing susceptibility of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* to polymyxins. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 6: 8, doi:10.1186/1476-0711-6-8: 7 str.
- Hoffman L.R., D'Argenio D.A., MacCoss M.J., Zhanq Z., Jones R.A., Miller S.I. 2005. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. Nature, 436, 7054: 1171-1175
- Høiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. International Journal of Antimicrobial Agents, 35: 322-332
- Hooper D.C. 2000. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. Clinical Infectious Diseases, 31: 24-28
- Hudzicki J. 2009. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. ASM MicrobeLibrary. Washington, American Society for Microbiology: 9 str.
<http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol> (3. mar. 2013)
- Iglewski B.H. 1996. *Pseudomonas*. V: Medical microbiology. 4th ed. Baron S. (ed.). Galveston, University of Texas Medical Branch at Galveston: 4 str.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8326/> (3. avg. 2012)

- Jorgensen J.H., Turnidge D.J. 2007. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. V: Manual of clinical microbiology. Baron E.J., Landry M.L., Jorgensen J.H., Pfaller M.A. (eds.). Washington, D.C., ASM Press: 1152-1172
- Jorgensen J.H., Ferraro J.M. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clinical Infectious Diseases, 48, 11: 1749-1755
- Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., Zinkernagel R.M. 2005. Medical microbiology. Stuttgart, Thieme: 308-310
- King E.O., Ward M.K., Raney D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 44, 2: 301-307
- Khan U.A., Shakil S. 2009. An overview of the carbapenems with a focus on doripenem—the latest member of the carbapenem class. V: Current trends in antibiotic resistance in infectious diseases. Khan U.A. (ed.). New Delhi, I.K. International Publishing House Pvt. Ltd.: 179-192
- Kohler T., Michea-Hamzehpour M., Henze U., Gotoh N., Curty L.K., Pechere J.C. 1997. Characterization of MexE–MexF–OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. Molecular Microbiology, 23: 345–354
- Kotnik V. 2002. Antibiotiki in kemoterapevtiki. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 427-438
- Križan-Hergouth V., Andlovic A., Seme K., Müller-Premru M., Gubina M., Kolman J. 2001. Rezultati spremljanja občutljivosti bakterije *Pseudomonas aeruginosa* v Ljubljani. V: Mikrobi in antibiotiki 2001. Müller-Premru M., Gubina M. (ur.). Ljubljana, Sekcija za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe SZD: 217-223
- Kvist M., Hancock V., Klemm P. 2008. Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. Applied and Environmental Microbiology, 74, 23: 7376-7382
- Lambert P.A. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *P. aeruginosa*. Journal of the Royal Society of Medicine, 95: 22-26
- Landman D., Georgescu C., Martin D.A., Quale J. 2008. Polymyxins revisited. Clinical Microbiology Reviews, 21: 449-465

- Lee J.H., Bae K.I., Lee H.S. 2012. New definitions of extended-spectrum β -lactamase conferring worldwide emerging antibiotic resistance. *Medicinal Research Reviews*, 32, 1: 216-232
- Leinum J.C., Boaser D.K. 2011. Ceftaroline fosamil: A new FDA-approved anti-MRSA cephalosporin antibiotic. *Infectious Disease News*, 24, 3: 2 str.
<http://www.healio.com/infectious-disease/vaccine-preventable-diseases/news/print/infectious-disease-news/%7B82e25871-ce14-43f9-8eab-d66aa4a85570%7D/ceftaroline-fosamil-a-new-fda-approved-anti-mrsa-cephalosporin-antibiotic> (9. nov. 2012)
- Levinson W. 2006. Review of medical microbiology and immunology. 9th ed. New York, Lange Medical Books, McGraw-Hill: 149-150
- Li J., Nation L.R., Turnidge D.J., Milne W.R., Coulthard K., Rayner C., Paterson L.D. 2006. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infectious Diseases*, 6: 589-601
- Linden K.P., Kusne S., Coley K., Fontes P., Kramer D.J., Paterson D. 2003. Use of parental colistin for the treatment of serious infection due to antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*, 37: 154-160
- Lister D.P., Wolter J.D., Hanson D.N. 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 4: 582-610
- Livermore M.D. 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?. *Clinical Infectious Diseases*, 34: 634-640
- Madigan T.M., Martinko M.J. 2006. Brock biology of microorganism. 11th ed. Upper Saddle River, New Jersey, Pearson Prentice Hall: 669-726
- Magiorakos P.A., Srinivasan A., Carey B.R., Carmeli Y., Falagas E.M., Giske G.C., Harbarth S., Hindler F.J., Kahlmeter G., Liljequist O.B., Paterson D.L., Rice B.L., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber T.J., Monnet L.D. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infections*, 18: 268-281
- Marolt-Gomišček M. 1992. Antibiotiki in kemoterapevtiki v vsakdanji praksi. Ljubljana, Tangram: 252 str.
- Michalopoulos A., Falagas M.E., 2008. Colistin and polymyxin B in critical care. *Critical Care Clinic*, 24: 377-391

- Miller L.E. 2010. The penicillins: a review and update. *Journal of Midwifery & Women's Health*, 47, 6: 426-434
- Mrhar A., Obradović M., Cesar T., Drnovšek T. 2005. Pomen farmakokinetike in farmakodinamike pri napovedovanju terapevtskih izidov protimikrobnih zdravil. V: *Zdravila za sistemsko zdravljenje infekcij. Zbornik prispevkov. Strokovno izpopolnjevanje magistrov farmacije v letu 2005.* Frankič D. (ur.). Ljubljana, Lekarniška zbornica Slovenije: 55-68
- Müller-Premru M. 2002. Nefermentativni po Gramu negativni bacili. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo.* Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 225-229
- Müller-Premru M., Seme K. 2003. Določanje občutljivosti bakterij za antibiotike-antibiogram. V: *Priročnik za vaje iz mikrobiologije in imunologije za študente medicine.* Gubina M., Müller-Premru M. (ur.). Ljubljana, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani: 99-106
- Muller C., Plésiat P., Jeannot K. 2011. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55, 3: 1211-1221
- Murray P.R., Rosenthal K.S., Tenover F.C. 2009. *Medical microbiology*. 6th ed. Philadelphia, Mosby Elsevier: 960 str.
- NCBI. 2011. Taxonomy browser: *Pseudomonas aeruginosa*. Bethesda, NCBI- National Center for Biotechnology Information: 2 str.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Udef&id=287&lvl=3&p=mapview&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&keep=1&rchmode=1&unlock&lin=f (julij 2011)
- NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters: approved standard M23-A2. NCCLS. Wayne, Pennsylvania, National Committee for Clinical Laboratory Standards: 52 str.
- Ocampo-Sosa A.A., Cabot G., Rodríguez C., Roman E., Tubau F., Macia D.M., Moya B., Zamorano L., Suárez C., Peña C., Domínguez A.M., Moncalián G., Oliver A., Martínez-Martínez L., Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). 2012. Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56, 4: 1703-1713

- Poole K. 2005. *Pseudomonas aeruginosa*. V: Frontiers in antimicrobial resistance: a tribute to Stuart B. Levy. White D.G., Alekshun M.N., McDermott P.F. (eds.). Washington D.C., ASM Press: 355-366
- Poole K. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. Frontiers in Microbiology, 2: 65, doi: 10.3389/fmicb.2011.0006: 13 str.
- Riera E., Cabot G., Mulet X., Garcí'a-Castillo M., del Campo R., Juan C., Canto'n R., Oliver A. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 66: 2022 -2027
- Ribič H., Čretnik Ž.T. 2010. Večkratno odporne bakterije z laboratorijskega stališča. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje RS: 22 str.
http://www.mz.gov.si/fileadmin/mz.gov.si/pageuploads/Posveti_konference_2010/_NK_antibiotiki_181110/Ribic_Zohar_Cretnik_Veckratno_odporne_bakterije_z_la_boratorijskega_stalisca.pdf (9. sept. 2012).
- Sardelić S., Bedenić B. 2009. Rezistencija na antibiotike u *Pseudomonas aeruginosa*. Infetološki glasnik, 29, 4: 177-183
- Schwalbe R., Steele-More L., Goodwin C.A. 2007. Antimicrobial susceptibility testing protocols. Broken Sound Parkway NW, CRC Press: 432 str.
- Schweizer P.H. 2003. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. Genetics and Molecular Research, 2: 48-62
- Seme K. 2002. Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 439-446
- Seme K., Poljak M. 2001. Mehanizmi odpornosti pri po Gramu negativnih bakterijah. V: Mikrobi in antibiotiki 2001. Müller-Premru M., Gubina M. (ur.). Ljubljana, Sekcija za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe SZD: 39-47
- Skiada A., Markogiannakis A., Plachouras D., Daikos L.G. 2011. Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Antimicrobial Agents, 37, 3: 187-193
- Snyder L., Champness W. 2003. Molecular genetics of bacteria. 3rd ed. Washington, American Society for Microbiology: 735 str.

- Somily M. 2010. Comparison of E-test and disc diffusion methods for the *in vitro* evaluation of the antimicrobial activity of colistin in multi-drug resistant Gram-negative bacilli. *Saudi Medical Journal*, 31, 5: 507-511
- Stein E.G. 2007. New drugs to treat skin and soft tissue infections. *Current Infectious Disease Reports*, 9: 408-414
- Strateva T., Yordanov D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58: 1133-1148
- Struthers K.J., Westran P.R. 2003. *Clinical bacteriology*. London, Manson Publishing: 49-65
- Škrbat-Kristan S., Šifrer F., Kopčavar Guček N., Osolnik K., Eržen R., Fležar M., Petek D., Šorli J.m., Tomič V., Mušič E., Beovič B., Šuškovič S., Košnik M. 2009. Stališče do obravnave akutnega poslabšanja kronične obstruktivne pljučne bolezni (apKOPB). *Zdravniški vestnik*, 78, 1: 19-32
- Štorman A., Čretnik Žohar T. 2001. Prispevek mikrobiološkega laboratorija k racionalni uporabi antibiotikov. V: *Mikrobi in antibiotiki 2001*. Müller-Premru M., Gubina M. (ur.). Ljubljana, Sekcija za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe SZD: 115-121
- Štrumbelj I., Ribič H., Pirš M. 2014. Kratka pojasnila ob prehodu na evropske smernice za antibiogram – EUCAST. Ljubljana, Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKOUPZ): 11 str.
<http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz> (16. Apr. 2014)
- Tomič V. 2014. »Občutljivost izolatov *Pseudomonas aeruginosa* za ceftazidim«. viktoria.tomic@klinika-golnik.si (osebni vir, 13. feb. 2014)
- Torres E., Villanueva R., Bou G. 2008. Comparison of different methods of determining β -lactam susceptibility in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 58, 5: 625-629
- Vila J., Ruiz J., Navia M.M. 1999. Molecular bases of quinolone resistance acquisition in gram-negative bacteria. *Recent Research Developments in Antimicrobials and Chemotherapy*, 3: 323–344
- Yahav D., Farbman L., Leibovici L., Paul M. 2012. Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 1: 18-29
- Yague G., Morris J.E., Pan X.S., Gould K.A., Fisher L.M. 2002. Cleavable complex formation by wild-type and quinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* type II

topoisomerases mediated by gemifloxacin and other fluoroquinolones.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46: 413-419

Walsh C. 2003. Antibiotics: actions, origins, resistance. Washington, ASM Press: 335 str.

Willmott C.J.R., Maxwell A. 1993. A single point mutation in the DNA gyrase. A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 37: 126-127

ZAHVALA

Iskrena hvala moji mentorici prof. dr. Katji Seme za strokovno vodenje in pomemben življenjski nauk »ne kompliciraj si življenja po nepotrebnem« - delam na tem.

Hvala moji somentorici doc. dr. Viktoriji Tomič, ki mi je omogočila opravljanje diplomske naloge v njenem laboratoriju in ki je kljub temu, da je vedno zasuta z delom, našla čas zame ter mi potrpežljivo odgovarjala na moja vprašanja.

Najlepša hvala tudi vsem zaposlenim v Laboratoriju za respiratorno mikrobiologijo, še posebej Judit Stokič, za trud in potrpežljivost pri mojih prvih korakih v laboratoriju.

Ta diplomska naloga nikoli ne bi bila v takšni obliki brez moje recenzentke prof. dr. Eve Ružič-Sabljič. Hvala za natančno in strokovno recenzijo diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi predsednici komisije za zagovor diplomskega dela prof. dr. Darji Žgur Bertok za posvečen čas in trud ter vsem profesoricom in profesorjem, ki so me tekom študija navduševali nad skrivnostnim svetom mikroorganizmov.

Hvala teti Lidiji za lektoriranje diplomske naloge in lekcije iz Word-a.

Hvala Alešu, sestrama Maruši in Žani ter vsem mojim prijateljem (boste že vedeli kateri ste) za pomoč in spodbudne besede, zaradi vas je vse v življenju lažje!

In navsezadnje hvala mojim staršem, najboljšim na svetu. Hvala vama za vse kar sta mi omogočila, kar sta naredila iz mene, za podporo in prijateljstvo.

HVALA.

PRILOGE

Priloga A: Vrste kužnin, iz katerih so bil osamljeni izolati.

Izolat	Kužnina	Izolat	Kužnina
3986	Urin	5406	Urin
3975	Urin	5519	Aspirat zornjih dihal
4111	Izmeček	5549	Urin
4114	Izmeček	5785	Rana
4156	Rana	5790	Rana
4269	Izmeček	5797	Izmeček
4615	Izmeček	5784	Rana
4628	Izmeček	5810	Izmeček
4664	Urin	5822	Urin
4657	Izmeček	5844	Izpirek bronha
4695	Izmeček	5979	Rana
4754	Urin	5995	Izmeček
4759	Aspirat traheje	6010	Izmeček
4775	Rana	6123	Izmeček
4784	Urin	6135	Rana
4835	Izmeček	6259	Urin
4877	Urin	6286	Izmeček
4902	Rana	6295	Izmeček
4994	Izmeček	6355	Aspirat tubusa
5024	Izmeček	6508	Urin
5074	Izmeček	6497	Izmeček
5114	Izmeček	6502	Rana
5256	Aspirat zornjih dihal	6515	Aspirat traheje
5256	Aspirat zornjih dihal	7353	Urin
5347	Urin	7410	Izmeček

izolat	ant.	pip/tazo		cefepim		kolistin		gentamicin		meropenem		ciprofloksacin	
ATCC <i>P. aeruginosa</i>		29	S	29	S	14	S	21	S	27	S	33	S
3986		27	S	29	S	15	S	21	S	30	S	31	S
3975		26	S	27	S	15	S	15	S	28	S	0	R
4111		29	S	23	S	15	S	22	S	25	S	23	S
4114		32	S	30	S	15	S	18	S	30	S	34	S
4156		30	S	29	S	15	S	22	S	32	S	34	S
4269		33	S	31	S	15	S	22	S	32	S	35	S
4615		15	R	20	S	15	S	21	S	28	S	36	S
4628		14	R	20	S	15	S	22	S	28	S	35	S
4664		34	S	26	S	18	S	20	S	33	S	0	R
4657		36	S	31	S	22	S	27	S	36	S	32	S
4695		36	S	37	S	19	S	24	S	39	S	40	S
4754		31	S	30	S	14	S	26	S	19	S	36	S
4759		13	R	21	S	15	S	0	R	11	R	20	I
4775		29	S	30	S	15	S	21	S	35	S	38	S
4784		28	S	22	S	15	S	0	R	28	S	0	R
4835		30	S	31	S	15	S	21	S	32	S	25	S
4877		32	S	32	S	15	S	22	S	29	S	39	S
4902		29	S	29	S	15	S	20	S	27	S	33	S
4994		17	R	21	S	18	S	20	S	34	S	18	I
5024		32	S	27	S	17	S	20	S	31	S	25	S
5074		40	S	38	S	18	S	30	S	47	S	34	S
5114		25	S	26	S	14	S	21	S	27	S	30	S
5256		31	S	31	S	15	S	22	S	26	S	36	S
5257		31	S	31	S	16	S	22	S	26	S	35	S
5347		29	S	30	S	15	S	19	S	25	S	34	S
5406		30	S	30	S	15	S	22	S	32	S	33	S
5519		28	S	29	S	15	S	15	S	29	S	34	S
5549		29	S	30	S	15	S	22	S	20	S	36	S
5785		29	S	26	S	15	S	17	S	25	S	30	S
5790		30	S	30	S	14	S	21	S	29	S	35	S
5797		30	S	31	S	15	S	22	S	30	S	37	S
5784		29	S	28	S	14	S	20	S	26	S	35	S
5810		30	S	30	S	14	S	20	S	30	S	38	S
5822		29	S	30	S	15	S	21	S	31	S	35	S
5844		30	S	30	S	15	S	22	S	23	S	36	S
5979		29	S	31	S	15	S	23	S	23	S	37	S
5995		36	S	38	S	17	S	19	S	40	S	42	S
6010		32	S	33	S	15	S	22	S	18	S	38	S
6123		30	S	31	S	15	S	23	S	33	S	35	S
6135		22	S	20	S	16	S	21	S	14	I	0	R
6259		23	S	21	S	13	S	0	R	17	S	0	R
6286		33	S	29	S	18	S	27	S	30	S	32	S
6295		32	S	29	S	15	S	21	S	32	S	36	S
6355		28	S	29									

Legenda: S – občutljiv (angl. sensitive); I – zmerno občutljiv (angl. intermediate); R – odporen (angl. resistant);
pip/tazo – piperacilin/tazobaktam; ant. – antibiotik

Priloga C: Minimalne inhibitorne koncentracije ($\mu\text{g/ml}$) in pripadajoče stopnje občutljivosti (občutljiv/zmerno občutljiv/odporen) za 50 izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, osamljenih iz različnih kužnin bolnikov, hospitaliziranih na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik v obdobju od junija do septembra 2009, določeni z Etesti.

izolat	ant.	ant.	ant.	ant.	ant.	ant.	ant.	ant.	ant.	ant.	ant.	ant.
	ant.	ant.	ant.	ant.	ant.	ant.	ant.	ant.	ant.	ant.	ant.	ant.
ATTC <i>P. aeruginosa</i>	4	S	1	S	1	S	2	S	0,5	S	0,25	S
3986	4	S	1	S	1	S	2	S	0,25	S	0,125	S
3975	4	S	2	S	0,50	S	8	I	0,25	S	(>32)	R
4111	4	S	8	S	0,50	S	1	S	1	S	2	I
4114	0,5	S	1	S	0,50	S	4	S	0,5	S	0,125	S
4156	2	S	1	S	1	S	1	S	0,25	S	0,064	S
4269	4	S	1	S	1	S	2	S	0,5	S	0,125	S
4615	(>256)	R	16	I	0,5	S	2	S	1	S	0,125	S
4628	(>256)	R	16	I	1	S	2	S	1	S	0,125	S
4664	4	S	4	S	0,5	S	4	S	0,5	S	(>32)	R
4657	0,25	S	2	S	0,125	S	1	S	0,016	S	0,125	S
4695	0,125	S	0,5	S	0,25	S	1	S	0,032	S	0,25	S
4754	4	S	2	S	4	I	0,5	S	4	S	0,125	S
4759	(>256)	R	16	I	4	I	128	R	(>32)	R	2	I
4775	4	S	1	S	0,5	S	2	S	0,125	S	0,125	S
4784	16	S	8	S	1	S	32	R	1	S	(>32)	R
4835	4	S	2	S	1	S	2	S	0,25	S	1	S
4877	4	S	1	S	0,5	S	2	S	0,25	S	0,125	S
4902	4	S	2	S	1	S	2	S	0,5	S	0,125	S
4994	(>256)	R	16	I	0,25	S	4	S	0,5	S	4	R
5024	0,5	S	4	S	0,25	S	4	S	0,125	S	1	S
5074	0,25	S	0,5	S	0,5	S	0,5	S	0,064	S	0,5	S
5114	16	S	4	S	1	S	2	S	1	S	0,5	S
5256	4	S	2	S	1	S	2	S	0,5	S	0,125	S
5257	4	S	2	S	1	S	2	S	1	S	0,125	S
5347	4	S	1	S	0,5	S	2	S	2	S	0,125	S
5406	4	S	2	S	1	S	2	S	0,25	S	0,125	S
5519	8	S	2	S	0,5	S	4	S	0,25	S	0,125	S
5549	2	S	1	S	0,5	S	1	S	0,5	S	0,125	S
5785	4	S	4	S	1	S	8	I	0,25	S	0,25	S
5790	4	S	2	S	1	S	2	S	0,25	S	0,125	S
5797	4	S	1	S	1	S	1	S	0,125	S	0,125	S
5784	4	S	2	S	1	S	1	S	0,25	S	0,125	S
5810	4	S	1	S	0,5	S	2	S	0,125	S	0,125	S
5822	2	S	1	S	0,5	S	1	S	0,125	S	0,125	S
5844	2	S	1	S	0,5	S	1	S	0,5	S	0,125	S
5979	4	S	1	S	0,5	S	1	S	0,5	S	0,125	S
5995	0,25	S	0,5	S	0,25	S	4	S	0,016	S	0,064	S
6010	2	S	1	S	0,5	S	1	S	2	S	0,125	S
6123	4	S	1	S	0,5	S	1	S	0,125	S	0,125	S
6135	16	S	8	S	0,5	S	2	S	16	R	(>32)	R
6259	32	S	8	S	1	S	64	R	2	S	(>32)	R
6286	2	S	4	S	0,125	S	0,5	S	0,016	S	0,25	S
6295	2	S	1	S	0,5	S	2	S	0,125	S	0,125	S
6355	4	S	2	S	2	S	2	S	0,125	S	0,064	S
6508	2	S	0,5	S	1	S	0,5	S	0,5	S	0,064	S
6497	16	S	4	S	1	S	1	S	1	S	0,125	S
6502	16	S	4	S	1	S	0,5	S	(>32)	R	2	I
6515	16	S	4	S	1	S	4	S	8	I	1	S
7353	2	S	2	S	1	S	0,125	S	0,064	S	2	I
7410	4	S	1	S	0,5	S	0,5	S	0,064	S	0,064	S

Legenda: S – občutljiv (angl. sensitive); I – zmerno občutljiv (angl. intermediate); R – odporen (angl. resistant);
 pip/tazo – piperacilin/tazobaktam; ant. - antibiotik

Priloga D: Rezultati testiranja, izraženi kot stopnje občutljivosti (občutljiv/zmerno občutljiv/odporen) za 50 izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, osamljenih iz različnih kužnin bolnikov, hospitaliziranih na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik v obdobju od junija do septembra 2009, določeni z disk difuzijsko metodo in Etesti.

ant. izolat	TZP		CEF		CL		GM		MEM		CIP	
	Etest	DD	Etest	DD	Etest	DD	Etest	DD	Etest	DD	Etest	DD
3986	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3975	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	R
4111	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
4114	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4156	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4269	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4615	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4628	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4664	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
4657	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4695	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4754	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
4759	R	R	I	S	I	S	R	R	R	R	I	I
4775	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4784	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R
4835	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4877	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4902	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4994	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	R	I
5024	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5074	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5114	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5256	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5257	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5347	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5406	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5519	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5549	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5785	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
5790	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5797	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5784	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5810	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5822	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5844	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5979	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5995	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6010	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6123	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6135	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	R	R
6259	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R
6286	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6295	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6355	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6508	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6497	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6502	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	I	I
6515	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S
7353	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
7410	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Legenda: S – občutljiv (angl. sensitive); I – zmerno občutljiv (angl. intermediate); R – odporen (angl. resistant); ant. – antibiotik; TZP – piperacilin/tazobaktam; CEF – cefepim; MEM – meropenem; GM – gentamicin; CIP – ciprofloksacin; CL – kolistin; DD – disk difuzijska metoda

Priloga E: Vrsta kužnine, iz katere je bil osamljen izolat in rezultati testiranja, izraženi kot stopnje občutljivosti za 50 izolatov *Pseudomonas aeruginosa*, osamljenih iz različnih kužnin bolnikov, hospitaliziranih na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik v obdobju od junija do septembra 2009, določeni z disk difuzijsko metodo in Etesti.

Izolat	Kužnina	TZP		CEF		CL		GM		MEM		CIP	
		Etest	DD	Etest	DD	Etest	DD	Etest	DD	Etest	DD	Etest	DD
4759	Aspirat traheje	R	R	I	S	I	S	R	R	R	R	I	I
6515	Aspirat traheje	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S
6355	Aspirat tubusa	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5256	Aspirat zgornjih dihal	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5257	Aspirat zgornjih dihal	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5519	Aspirat zgornjih dihal	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4111	Izmeček	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
4114	Izmeček	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4269	Izmeček	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4615	Izmeček	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4628	Izmeček	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4657	Izmeček	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4695	Izmeček	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4835	Izmeček	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4994	Izmeček	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	R	I
5024	Izmeček	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5074	Izmeček	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5114	Izmeček	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5797	Izmeček	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5810	Izmeček	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5995	Izmeček	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6010	Izmeček	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6123	Izmeček	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6286	Izmeček	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6295	Izmeček	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6497	Izmeček	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7410	Izmeček	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5844	Izpirek bronha	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4156	Rana	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4775	Rana	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4902	Rana	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5784	Rana	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
5785	Rana	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5790	Rana	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5979	Rana	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6135	Rana	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	R	R
6502	Rana	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	I	I
3986	Urin	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	R
3975	Urin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
4664	Urin	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
4754	Urin	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R
4784	Urin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4877	Urin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5347	Urin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5406	Urin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5549	Urin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5822	Urin	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R
6259	Urin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6508	Urin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
7353	Urin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Legenda: S – občutljiv (angl. sensitive); I – zmerno občutljiv (angl. intermediate); R – odporen (angl. resistant); TZP – piperacilin/tazobaktam; CEF – cefepim; MEM – meropenem; GM – gentamicin; CIP – ciprofloksacin; CL – kolistin; DD – disk difuzijska metoda