

# Rezistencija na antibiotike u bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

**Marija GUŽVINEC, dr. sc., dipl. ing. biologije**

**Iva BUTIĆ, dr. med., specijalist medicinske mikrobiologije s parazitologijom**

**Marko JELIĆ, dipl. ing. biologije**

**Suzana BUKOVSKI, doc. dr. sc., dr. med., specijalist medicinske mikrobiologije s parazitologijom**

**Sandra LUCIĆ, bacc. med. lab. dg.**

**Arjana TAMBIĆ ANDRAŠEVIĆ, prof. dr. sc., dr. med., specijalist medicinske mikrobiologije s parazitologijom**

Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", Zavod za kliničku mikrobiologiju, Odjel za bakteriologiju i bolničke infekcije, Zagreb

## Ključne riječi

*Pseudomonas aeruginosa*  
rezistencija  
 $\beta$ -laktamaze  
klonsko širenje

## Key words

*Pseudomonas aeruginosa*  
resistance  
 $\beta$ -lactamases  
clonal spread

**Primljeno:** 2012-04-25

**Received:** 2012-04-25

**Prihvaćeno:** 2012-06-19

**Accepted:** 2012-06-19

## *Pseudomonas aeruginosa* kao bolnički patogen

*Pseudomonas aeruginosa* je jedan od najčešće izoliranih bolničkih patogena koji uzrokuje brojne infekcije povezane s visokom stopom smrtnosti. Iznimna metabolička mnogostranost ovoj bakteriji omogućuje preživljavanje u različitim okruženjima, a posjeduje i sposobnost stvaranja biofilmova. Zbog navedenih svojstava u bolni-

Pregledni članak

*Pseudomonas aeruginosa* je jedan od najčešćih bolničkih patogena, a uzrokuje brojne infekcije povezane s visokom stopom smrtnosti. Posjeduje urođenu rezistenciju na mnoge antibiotike, a u bolničkim sredinama razvija i višestruku rezistenciju na antipseudomonasne antibiotike. Mehanizmi rezistencije u *P. aeruginosa* su brojni i uključuju smanjenu staničnu propusnost, aktivno izbacivanje antibiotika iz stanice (efluks), promjene ciljnog mjesta djelovanja te produkciju enzima koji razgrađuju antibiotik. U pojedinim se sojevima akumuliraju različiti mehanizmi rezistencije što dovodi do pojave multiplo- i panrezistentnih sojeva. Učestalost infekcija uzrokovanih takvim sojevima raste te ozbiljno kompromitira izbor učinkovite terapije. Malobrojna istraživanja pokazuju da je za razvoj multiple rezistencije kod kliničkih izolata *P. aeruginosa* uglavnom odgovorno nakupljanje mutacija koje zahvaćaju efluks, staničnu propusnost i ekspresiju kromosomske  $\beta$ -laktamaze AmpC, dok stečene  $\beta$ -laktamaze imaju tek sporednu ulogu. Također, novija epidemiološka istraživanja pokazuju da su za veliki udio multiple rezistencije unutar vrste *P. aeruginosa* odgovorni tek pojedini široko rasprostranjeni bolnički klonovi.

## Antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*

Review article

*Pseudomonas aeruginosa* is one of the leading causes of nosocomial infections, mostly in intensive care unit patients. In addition to being intrinsically resistant to many antibiotics, in hospital setting it often develops resistance also to antipseudomonal drugs. Mechanisms of resistance in *P. aeruginosa* include efflux, decreased permeability, target site alterations and production of antibiotic-hydrolyzing enzymes. Some strains accumulate different resistance mechanisms, thus becoming multiresistant or even panresistant, and growing prevalence of such strains is severely compromising the choice of effective therapy. Studies suggest that multiresistance most often results from accumulation of mutations affecting efflux, cell permeability and expression of chromosomally encoded  $\beta$ -lactamase AmpC, while acquired  $\beta$ -lactamases are only sporadically found. Recent epidemiological studies also show that most of multiresistant clinical strains belong to only a few widely spread nosocomial *P. aeruginosa* clones.

cama kontaminira tekućine za dijalizu, kapi za oči, sapune i neka dezinfekcijska sredstva te kolonizira površine medicinskih instrumenata kao što su bronhoskopi, respiratori i kateteri [1, 2].

Do kolonizacije kod hospitaliziranih pacijenata najčešće dolazi u respiratornom traktu te urinarnom traktu pacijenata s dugotrajnom kateterizacijom, a kod nekih pacijenata zabilježena je i kolonizacija gastrointestinalnog trakta. Osobe s normalnim imunološkim odgovo-

rom ne posjeduju rizik od razvijanja ozbiljnih infekcija s *P. aeruginosa*, dok su pacijenti s neutropenijom podložni određenim invazivnim infekcijama. Riziku su također izložene osobe s termalnim opeklinama te pacijenti na mehaničkoj ventilaciji [1, 3].

*P. aeruginosa* pretežno uzrokuje akutne infekcije u pacijenata smještenih u jedinicama intenzivne njege te je glavni uzročnik kroničnih infekcija pluća i dišnih puteva u oboljelih od cistične fibroze i drugih kroničnih respiratornih bolesti [1, 3–5]. Vodeći je uzročnik pneumonije povezane s mehaničkom ventilacijom (engl. *ventilator associated pneumonia*, VAP), glavnog uzroka morbiditeta i mortaliteta u jedinicama intenzivne njege: smrtnost povezana s ovom bolesti kreće se oko 40 %. Također je važan uzročnik pneumonije povezane s medicinskom njegom (engl. *healthcare-associated pneumonia*, HCAP). Pacijenti oboljeli od HCAP na neki su način povezani s medicinskom njegom (hospitalizacija unutar zadnjih 12 mjeseci, imunokompromitirano stanje, boravak u staračkom domu, ustanovi za rehabilitaciju i slično). *P. aeruginosa* uzrokuje i 3–7 % bakterijemija u jedinicama intenzivne njege. Visokom riziku za razvoj te vrste bakterijemije naročito su izloženi pacijenti s neutropenijom, a može se razviti i kod pacijenata s lokaliziranim infekcijama kirurških rana ili opekline, kod pacijenata s VAP-om te kolonizacijom gastrointestinalnog ili urinarnog trakta. *P. aeruginosa* rjeđe uzrokuje meningitis nakon lumbalne punkcije ili neurokirurškog zahvata te endokarditis nakon operacije na srcu, a klasičan je uzročnik invazivne upale vanjskog uha kod bolesnika s dijabetesom [1, 3, 6]. Visoka stopa smrtnosti (10–60 %) koja prati infekcije uzrokovane s *P. aeruginosa* posljedica je kombinacije oslabljenog imunološkog odgovora domaćina, činitelja virulencije bakterije te njezine urođene i stečene otpornosti na antibiotike [3, 7–9].

## Liječenje infekcija uzrokovanih s *P. aeruginosa*

U liječenju infekcija uzrokovanih vrstom *P. aeruginosa* ključna je pravovremena i odgovarajuća antimikrobna terapija. Međutim, prirodna rezistencija *P. aeruginosa* na veliki broj antibiotika ograničila je izbor učinkovitih lijekova na antipseudomonasne peniciline (piperacilin, karbenicilin), cefalosporine III. i IV. generacije (ceftazidim, cefoperazon, cefepim), karbapeneme imipenem, meropenem i doripenem, monobaktam aztreonam i florokinolone (ciprofloksacin, norfloksacin, levofloksacin) [1, 10, 11]. Korištenje aminoglikozida (amikacin, gentamicin, netilmicin, tobramicin) ne preporučuje se u monoterapiji već kao dio kombinirane terapije u liječenju ozbiljnih infekcija [12]. Posljednjih godina, zbog pojave sve većeg broja multiplo rezistentnih sojeva *P. aeruginosa*, vraćen je u upotrebu i kolistin (polimiksin E) kao zadnji izbor u liječenju teških infekcija [13]. Nažalost optimalni režim

doziranja kolistina nije sasvim definiran s obzirom da farmakokinetika ovog lijeka nije do kraja proučena [14].

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

*P. aeruginosa* posjeduje brojne mehanizme obrane od antibiotika, uključujući smanjenje koncentracije antibiotika u stanici (uslijed otežanog ulaska ili aktivnog izbacivanja antibiotika iz stanice), promjenu ciljnog mjesta djelovanja antibiotika te inaktivaciju antibiotika prirodnim ili stečenim bakterijskim enzimima. U pojedinim sojevima dolazi do nakupljanja različitih mehanizama rezistencije što dovodi do pojave multiplo rezistentnih sojeva *P. aeruginosa*.

### Smanjena propusnost vanjske membrane

Vanjska membrana gram-negativnih bakterija predstavlja polupropusnu prepreku koja usporava ulazak antibiotika u stanicu. Propusnost vanjske membrane *P. aeruginosa* vrlo je mala i primjerice iznosi samo 8 % propusnosti vanjske membrane *Escherichia coli* [15]. Male hidrofilne molekule antibiotika poput  $\beta$ -laktama i florokinolona ulaze u stanicu *P. aeruginosa* preko porinskih kanala [16]. U rezistenciji na antibiotike najvažniju ulogu ima porin OprD koji omogućuje ulazak karbapenema u stanicu *P. aeruginosa*. Gubitak proteina OprD iz vanjske membrane značajno smanjuje osjetljivost vrste *P. aeruginosa* na karbapeneme, pogotovo imipenem [17–19]. Sojevi *P. aeruginosa* sa smanjenom ekspresijom proteina OprD pokazuju umjerenu rezistenciju na imipenem, dok gubitak OprD u kombinaciji s pojačanom ekspresijom transportera za aktivno izbacivanje antibiotika (zvanih i efluks pumpe) dovodi do visoke rezistencije na imipenem, meropenem i doripenem [20, 21]. Gledano samo prema promjenama minimalnih inhibitornih koncentracija, gubitak OprD čini se više utječe na osjetljivost na meropenem nego na imipenem. Međutim, klinički učinak je značajniji za imipenem s obzirom da ovaj mehanizam rezistencije često uzrokuje povećanje MIK-a imipenema preko granične vrijednosti za rezistenciju. Meropenem je intrinzično četiri puta učinkovitiji od imipenema pa su često potrebni dodatni mehanizmi (pojačani rad efluks pumpi i/ili produkcija karbapenemaza) kako bi se razvila rezistencija na meropenem [19, 22].

### Efluks

Pojam "efluks" podrazumijeva aktivno izbacivanje tvari iz stanice [23]. Do danas je opisano pet obitelji bakterijskih efluks sustava, od kojih je obitelj RND (engl. *Resistance-Nodulation-Division*) kod *P. aeruginosa* najbolje opisana i od kliničkog je značaja [24]. Osim antibiotika, ove pumpe izbacuju biocide, boje, deterdžente, metaboličke inhibitore, organska otapala te molekule uklju-

čene u komunikaciju između bakterijskih stanica [25]. Pumpe iz obitelji RND su kompleksni transmembranski sustavi koji se sastoje od tri dijela: transportni protein smješten u staničnoj membrani, porin smješten u vanjskoj membrani i protein smješten u periplazmatskom prostoru koji povezuje porin i transportni protein. Ovakav trodjelni sustav tvori kanal koji se pruža kroz čitavu stijenku bakterijske stanice te omogućuje izbacivanje lipofilnih i amfipatskih lijekova iz periplazmatskog prostora i citoplazme u izvanstanični prostor. Uslijed pojačane aktivnosti efluks pumpi dolazi do smanjenja stanične koncentracije antibiotika ispod minimalnih inhibitornih razina, a rezultat je obično istovremena rezistencija na različite (nesrodne) grupe antibiotika i pojava multiplo rezistentnih sojeva [24].

Za četiri sustava RND pokazano je da značajno doprinose rezistenciji na antibiotike kod *P. aeruginosa*. Efluks pumpa MexAB-OprM zbog konstitutivne ekspresije u divljem tipu stanica sudjeluje u prirodnoj rezistenciji *P. aeruginosa* na veliki broj antibiotika [24]. Ova pumpa može izbacivati antibiotike iz više različitih skupina uključujući florokinolone, tetracikline, kloramfenikol,  $\beta$ -laktame i inhibitore  $\beta$ -laktamaza, makrolide, trimetoprim i sulfonamide. Od poznatih RND efluks sustava, MexAB-OprM ima najširi spektar  $\beta$ -laktamskih supstrata koji uključuje karboksipeniciline, aztreonam, cefalosporine proširenog spektra (npr. ceftazidim, cefotaksim) i karbapenem meropenem (ne i imipenem) [19]. Do promjena koje uzrokuju pojačanu aktivnost ove pumpe može doći tijekom terapije florokinolonima i cefalosporinima [26]. Efluks pumpa MexCD-OprJ također može izbacivati veliki broj antibiotika iz stanice, uključujući florokinolone,  $\beta$ -laktame, tetracikline, kloramfenikol, makrolide i trimetoprim [19]. Za razliku od MexAB-OprM, ova pumpa pokazuje najveći afinitet za  $\beta$ -laktamske supstrate iz grupe cefalosporina i to naročito cefalosporina četvrte generacije (npr. cefepim). Vrlo niska razina transkripcije operona *mexCD-oprJ* postoji u divljem tipu stanica, no smatra se da efluks pumpa MexCD-OprJ ne doprinosi prirodnoj rezistenciji na antibiotike [27, 28]. Supstrati efluks pumpe MexEF-OprN uključuju florokinolone, kloramfenikol i trimetoprim, dok za  $\beta$ -laktamske antibiotike ova pumpa ne pokazuje afinitet. MexEF-OprN ne sudjeluje u prirodnoj rezistenciji *P. aeruginosa* na antibiotike, a niska razina ekspresije postoji samo kod dijela sojeva divljeg tipa [19]. Supstrati za efluks pumpu MexXY-OprM su florokinoloni, određeni  $\beta$ -laktami (cefepim), aminoglikozidi, tetraciklin, kloramfenikol i eritromicin [25]. Kompleks MexXY sudjeluje u prirodnoj rezistenciji *P. aeruginosa* na tetraciklin, eritromicin i gentamicin, antibiotike koji ujedno i induciraju ekspresiju ove pumpe [29].

### Promjena cilnog mjesta djelovanja antibiotika

Glavnu ulogu u razvoju rezistencije na florokinolone kod kliničkih izolata *P. aeruginosa* imaju promjene u

DNA girazi i topoizomerazi IV uzrokovane mutacijama u tzv. regijama QRDR ovih enzima (engl. *quinolone-resistance-determining regions*). Pokazalo se da promjene triju aminokiselina unutar podjedinica GyrA i ParC najviše pridonose rezistenciji kod kliničkih izolata. Radi se o dvjema promjenama unutar podjedinice GyrA (Thr-83→Ile i Asp-87→Asn, Gly ili Tyr) i jednoj promjeni unutar podjedinice ParC (Ser87→Leu ili Trp). Prvi korak u nastanku rezistencije na florokinolone je promjena u podjedinici GyrA na poziciji 83, dok promjena u ParC nastaje nakon toga i dovodi do pojačane rezistencije [30].

### Metilaze 16S rRNA

Relativno nedavno otkriven mehanizam rezistencije na aminoglikozide uključuje metilaciju 16S rRNA na A-mjestu unutar ribosomske podjedinice 30S, čime se ometa vezanje aminoglikozida na njihovo ciljno mjesto. Rezultat je visoka rezistencija na klinički značajne aminoglikozide kao što su gentamicin, tobramicin i amikacin. Veliki broj metilaza 16S rRNA opisan je kod bakterije *P. aeruginosa*, uključujući proteine RmtA, RmtB, RmtD i ArmA. Enzim RmtD se često prenosi zajedno s metalo- $\beta$ -laktamazom SPM-1 koja je raširena kod sojeva *P. aeruginosa* u Brazilu, dok je enzim RmtA nađen zajedno s metalo- $\beta$ -laktamazom IMP-1 u izolatima iz Koreje [31].

### Inaktivacija antibiotika bakterijskim enzimima

#### $\beta$ -laktamaze

Najmanje 120 različitih  $\beta$ -laktamaza iz sve četiri molekularne klase dosad je opisano kod vrste *P. aeruginosa*. U početku su stečene  $\beta$ -laktamaze kod *P. aeruginosa* uključivale enzime klase A ograničenog spektra supstrata koji je uključivao samo peniciline i starije cefalosporine užeg spektra djelovanja, no s vremenom je opisan veliki broj novih enzima koji uključuju  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra (engl. *extended-spectrum  $\beta$ -lactamases*, ESBL; enzimi klase A i D) koje hidroliziraju veći broj  $\beta$ -laktama uključujući cefalosporine širokog spektra i monobaktame, te karbapenemaze (enzimi klase A, B i D) koje hidroliziraju većinu  $\beta$ -laktama uključujući i karbapeneme, no ne i monobaktame [32, 33].

#### Stečene $\beta$ -laktamaze molekularne klase A

Klasa A predstavlja najraznovrsniju i najrasprostranjeniju grupu  $\beta$ -laktamaza. Općenito ovi enzimi hidroliziraju peniciline i klasične cefalosporine, a većina se može učinkovito inhibirati klavulanskom kiselinom [34]. U klasi A spada međutim najveći dio enzima ESBL. Najčešće su to varijante enzima SHV i TEM, koje su u sojeva *P. aeruginosa* rijetke [35]. Mnogo češće kod *P. aeruginosa* nalazimo PER-1 i varijante enzima VEB (-1, -1a, -1b) i GES (-1, -2, -5, -8, -9), a opisani su i CTX-M, BEL (-1 i -2) te najnoviji identificirani enzim ESBL, PME-1. Ovi enzimi imaju sličan hidrolitički profil: osim penicilina uskog

spektra, supstrat su im i cefalosporini III. i IV. generacije te aztreonam, dok iznimno enzimi GES-2 i GES-5 pokazuju prošireni spektar djelovanja koji uključuje i karbapeneme [35–38]. KPC je  $\beta$ -laktamaza klase A koja hidrolizira karbapeneme i zadnjih godina predstavlja veliki problem u svijetu zbog brzog širenja među enterobakterijama, a varijante KPC-2 i KPC-5 opisane su i kod *P. aeruginosa* [39].

### Stečene $\beta$ -laktamaze molekularne klase B (metalo- $\beta$ -laktamaze)

Metalo- $\beta$ -laktamaze (MBL) predstavljaju jednu od klinički najvažnijih skupina  $\beta$ -laktamaza u gram-negativnih štapića, dijelom zbog smještaja na mobilnim genetičkim elementima koji često nose i druge gene rezistencije, ali i zbog činjenice da hidroliziraju sve  $\beta$ -laktame osim monobaktama i ne mogu se inaktivirati inhibitorima serinskih  $\beta$ -laktamaza. Za razliku od ostalih  $\beta$ -laktamaza, enzimi MBL u aktivnom mjestu sadrže cink te se *in vitro* mogu inhibirati metalnim kelatorima kao što je EDTA. Ovaj inhibitor nema terapijsku primjenu, ali se koristi u fenotipskoj detekciji metalo- $\beta$ -laktamaza u laboratorijskom radu [40]. Infekcije uzrokovane izolatima *P. aeruginosa* koji produciraju enzime MBL povezane su s višim stopama smrtnosti i s većom učestalošću invazivnih bolesti od infekcija uzrokovanih s MBL-negativnim sojevima *P. aeruginosa* [41, 42]. Opisane metalo- $\beta$ -laktamaze kod *P. aeruginosa* uključuju grupe VIM, IMP i NDM te enzime SPM-1, GIM-1 i AIM-1 [33, 40, 41].

VIM i IMP su daleko najčešće metalo- $\beta$ -laktamaze nađene kod sojeva *P. aeruginosa* rezistentnih na karbapeneme, i obje su grupe široko globalno rasprostranjene. Do danas je opisano 37 varijanti enzima IMP i 34 varijante enzima VIM (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>). VIM-2 je najučestalija metalo- $\beta$ -laktamaza u Europi i svijetu i jedina dosad opisana u sojevima *P. aeruginosa* izoliranim u Hrvatskoj [40, 43–45]. Najrasprostranjeniji enzim grupe NDM, NDM-1, posljednjih se godina brzo širi među enterobakterijama, a prvi slučaj NDM-1 kod vrste *P. aeruginosa* opisan je 2011. u Srbiji [46].

### $\beta$ -laktamaza AmpC

AmpC je serinska  $\beta$ -laktamaza klase C kodirana na kromosomu bakterije *P. aeruginosa*. Sinteza ovog enzima u bazalnim uvjetima je niska, no pojačana ekspresija može se inducirati određenim  $\beta$ -laktamima i inhibitorima  $\beta$ -laktamaza (cefoksitin, imipenem, klavulanska kiselina). Značajno povećana produkcija proteina AmpC dovodi do rezistencije na sve  $\beta$ -laktame osim karbapenema [19, 47]. Penicilini i cefalosporini, iako supstrati za hidrolizu enzima AmpC, pokazuju antibakterijsku učinkovitost protiv *P. aeruginosa* zbog vrlo slabe indukcije ekspresije te  $\beta$ -laktamaze [48]. Upravo zbog navedenog, tijekom terapije  $\beta$ -laktamima često dolazi do probira mutanata koji konstitutivno proizvode vrlo visoke količine proteina AmpC, što rezultira klinički značajnom rezistencijom na  $\beta$ -laktame i

uzrokuje neuspjeh u terapiji [49]. Do razvoja rezistencije u tijeku terapije dolazi najčešće prilikom liječenja infekcija izvan urinarnog trakta i kod pacijenata s cističnom fibrozom ili neutropenijom kao osnovnom bolesti [19].

Nedavno su u kliničkim izolatima *P. aeruginosa* opisane varijante AmpC s pojačanom aktivnošću na cefotazidim, cefepim i karbapeneme, nazvane AmpC-proširenog spektra (engl. *extended-spectrum* AmpC, ESAC). Čini se da i ovi enzimi doprinose rezistenciji na karbapeneme kod vrste *P. aeruginosa*, zajedno s gubitkom porina OprD [50].

### $\beta$ -laktamaze molekularne klase D

Klasu D  $\beta$ -laktamaza čine oksacilinaze (enzimi OXA) koji uglavnom posreduju rezistenciju na karboksipeniciline, aminopeniciline i cefalosporine uskog spektra te nisu podložni inhibiciji klasičnim inhibitorima  $\beta$ -laktamaza (klavulanska kiselina i tazobaktam) [51].  $\beta$ -laktamaze OXA čine jako raznoliku grupu enzima, koja uključuje 243 do danas opisane varijante (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>). Iako većina ovih enzima ima uzak spektar djelovanja, neke varijante hidroliziraju cefotaksim, cefotazidim, cefepim i/ili aztreonam i ubrajamo ih u enzime ESBL (engl. *expanded-spectrum class D  $\beta$ -lactamases*, ES-OXA), a većina je opisana kod vrste *P. aeruginosa*. Postoje dvije skupine enzima ES-OXA: derivati enzima OXA uskog spektra nastali točkastim mutacijama najčešće iz proteina OXA-2 i OXA-10 (npr. OXA-11, -14, -15, -16, -17 i -32) te potpuno različiti enzimi koji nisu strukturno povezani s enzimima OXA uskog spektra (npr. OXA-18 i OXA-45) [51].

Neke varijante enzima OXA mogu hidrolizirati karbapeneme (engl. *carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamases*, CHDL), no ni jedan od ovih enzima ne hidrolizira značajno cefalosporine proširenog spektra. Većina enzima CHDL nađena je kod vrsta roda *Acinetobacter*, a nedavno su opisane i varijante nađene kod *P. aeruginosa* (OXA-40 i OXA-198) [51–53].

### Aminoglikozid-modificirajući enzimi

Aminoglikozid-modificirajući enzimi posreduju fosforilaciju, acetilaciju i adenilaciju aminoglikozidnih antibiotika što dovodi do njihove inaktivacije. Rezistencija na aminoglikozide kod bakterije *P. aeruginosa* često je posredovana ovim enzimima, a geni koji kodiraju aminoglikozid-modificirajuće enzime uglavnom se nalaze na integronima zajedno s drugim genima rezistencije, pa su takvi izolati često multiplo rezistentni na antibiotike [33, 54].

### Mehanizmi multiple rezistencije kod *P. aeruginosa*

Iako se u medicinskoj literaturi koristi veliki broj različitih definicija, multipla rezistencija na antibiotike (engl. *multidrug-resistance*, MDR) najčešće se definira kao

neosjetljivost na barem jedan antibiotik iz tri ili više grupa antipseudomonasnih antibiotika. Ova je definicija nedavno predložena kao privremena standardna definicija od strane međunarodne grupe stručnjaka [55].

Niti jedna pojedinačna mutacija ne dovodi do rezistencije na sve antipseudomonasne antibiotike. Međutim, nakupljanjem više različitih mutacija i/ili horizontalnim stjecanjem gena rezistencije može se razviti rezistencija na različite grupe antibiotika ili čak na sve antibiotike koji se koriste u liječenju infekcija uzrokovanih sa *P. aeruginosa* (tzv. panrezistentni sojevi, engl. *pandrug-resistant*, PDR). Različite kombinacije pojedinih mehanizama rezistencije mogu biti u podlozi jednakih fenotipova multiple rezistencije. Primjerice, pojačani efluks može istovremeno kompromitirati florokinolone i većinu  $\beta$ -laktama tako da kao izbor za učinkovito terapijsko liječenje ostaju samo aminoglikozidi i imipenem. Ako se mehanizmu efluksa pridoda gubitak porina OprD i smanjena propusnost stanične stijenke za aminoglikozide, kao jedini učinkoviti antibiotik protiv takvih sojeva ostaje kolistin. Prisutnost metalo- $\beta$ -laktamaza u teoriji sama po sebi može biti odgovorna za multiplo rezistentni fenotip, budući da ovi enzimi hidroliziraju sve  $\beta$ -laktame osim aztreonama. Zbog činjenice da su geni koji kodiraju enzime MBL, neke enzime ESBL te enzime koji modificiraju aminoglikozide pretežno smješteni na istim pokretnim genetičkim elementima, sojevi rezistentni na  $\beta$ -laktame su često istovremeno rezistentni i na aminoglikozide [40]. Ako u takvom soju dodatno dođe i do mutacije koja uzrokuje pojačani efluks, ili ako se razviju mutacije u genima *gyrA* i *parC*, ponovo od učinkovitih antibiotika ostaje samo kolistin.

Istraživanja, iako malobrojna, pokazuju da je za razvoj multiple rezistencije kod kliničkih izolata *P. aeruginosa* uglavnom odgovorno nakupljanje mutacija koje zahvaćaju efluks, staničnu propusnost i ekspresiju kromosomske  $\beta$ -laktamaze AmpC, dok stečene  $\beta$ -laktamaze tek sporadično doprinose tom fenomenu [18, 56]. Međutim, jednom kad se pojavi rezistencija posredovana različitim stečenim genima rezistencije koji se svi nalaze na istom pokretnom genetičkom elementu, takva rezistencija se onda može širiti ne samo prijenosom bakterije domaćina među pacijentima već i horizontalnim prijenosom gena rezistencije među bakterijskim sojevima [18].

### Klinički značaj i učestalost multiple rezistencije kod *P. aeruginosa*

Iako je objavljen veliki broj istraživanja koja se bave osjetljivošću na različite antibiotike kod sojeva *P. aeruginosa*, vrlo se malo radova bavi učestalošću multiplo rezistentnih sojeva. Moguće je da razlog tome leži u već spomenutom nepostojanju međunarodnog dogovora oko definicije multiple rezistencije. U studiji koja je definirala multiplu rezistenciju kao neosjetljivost na tri ili više antibiotika analizirani su izolati pacijenata smještenih u je-

dinicama intenzivne njege iz 33 europske zemlje. Udio multiplo rezistentnih izolata značajno se razlikovao među zemljama, od 50 % u Turskoj do  $\leq 3$  % u Španjolskoj, UK, Njemačkoj, Bugarskoj i Malti [57]. Podaci o učestalosti multiple rezistencije kod kliničkih izolata *P. aeruginosa* u Hrvatskoj nažalost ne postoje.

Za infekcije uzrokovane multiplo rezistentnim sojevima *P. aeruginosa* izbor terapije je zabrinjavajuće ograničen, pogotovo jer se za ozbiljne infekcije uglavnom koristi kombinirana terapija. Niti jedan florokinolon ne može se koristiti za izolate rezistentne na ciprofloksacin. U slučaju efluksom posredovane rezistencije na peniciline, cefalosporine i meropenem često je moguće koristiti imipenem, dok izolati koji produciraju enzime ESBL zadržavaju osjetljivost na karbapeneme. U slučajevima kada su multiplom rezistencijom zahvaćeni svi  $\beta$ -laktami, florokinoloni i aminoglikozidi kao zadnji izbor za terapiju ostaje kolistin, no nažalost u kliničkih izolata *P. aeruginosa* polako se javlja rezistencija i na ovaj antibiotik [18].

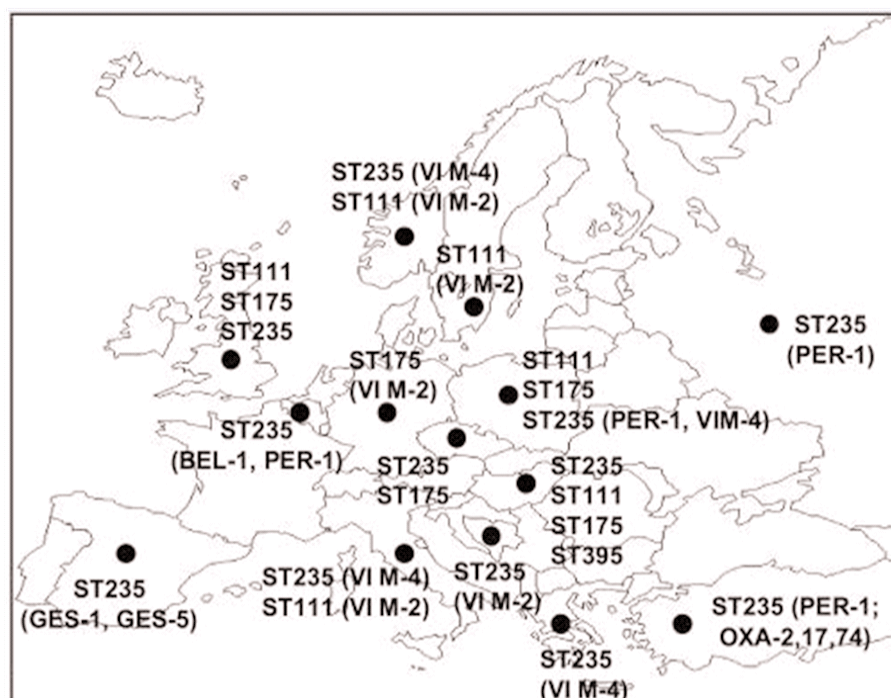
Zbog različitih definicija multiple rezistencije kod *P. aeruginosa* teško je uspoređivati podatke o kliničkom i ekonomskom utjecaju takvih izolata. U šest studija u kojima je multipla rezistencija definirana kao rezistencija na 4 ili više antibiotika pokazano je da su takve infekcije povezane s povećanim mortalitetom dok jedna studija povezuje multiplu rezistenciju s produljenom hospitalizacijom pacijenata. Spomenute tri studije koje pokazuju utjecaj multiplo rezistentnih sojeva *P. aeruginosa* na mortalitet uključivale su i izolate koji produciraju metalo- $\beta$ -laktamaze pa nije isključeno da su, osim multiplo rezistentnog fenotipa, i neke osobine tih izolata imale utjecaj na mortalitet [8, 9].

### Širenje multiplo rezistentnih sojeva

Kako najuspješniji bakterijski klonovi imaju najveću vjerojatnost stjecanja osobina MDR, samim time lakše dolazi i do njihove selekcije pod antibiotskim pritiskom te do njihovog širenja u zdravstvenim ustanovama. U skladu s time, studije pokazuju da su za veliki udio multiple rezistencije unutar vrste *P. aeruginosa* odgovorni tek pojedini široko rasprostranjeni bolnički klonovi [56, 58–60].

U bakterijskoj populaciji klon se definira kao grupa genetički nerazlučivih izolata koji su potekli od zajedničkog pretka [61]. Metoda molekularne tipizacije MLST (engl. *multilocus sequence typing*) daje nam uvid u klonalnu povezanost sojeva određene vrste te se trenutno koristi kao standardna metoda za istraživanje bakterijske populacijske strukture. Klonovi utvrđeni metodom MLST imaju oznaku ST (engl. *sequence type*) [56, 62].

Nekoliko studija proteklih godina pokazalo je da bakterija *P. aeruginosa* ima ne-klonalnu populacijsku strukturu s izuzetkom nekoliko vrlo uspješnih multiplo rezistent-



**Slika 1.** Rasprostranjenost epidemijskih klonova *P. aeruginosa* u zemljama Europe. U zagradama su naznačene  $\beta$ -laktamaze pronađene kod pojedinih klonova [56]

**Figure 1.** Distribution of epidemic *P. aeruginosa* clones in Europe.  $\beta$ -lactamase production indicated in brackets [56]

nih bolničkih klonova (Slika 1) [62, 63]. Međutim, MLST podaci o MDR bolničkim izolatima *P. aeruginosa* još su uvijek oskudni i pretežno se odnose na izolate koji proizvode stečene  $\beta$ -laktamaze na koje je usmjerena velika većina istraživanja (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>). Istraživanje provedeno u Češkoj na izolatima *P. aeruginosa* iz krvi pokazalo je da veliku većinu izolata MDR (82 %) čine samo tri klon, ST235, ST175 i ST132, dok su osjetljivi izolati predstavljali genetički vrlo raznoliku populaciju [58]. Studija koja je provedena na izolatima MDR iz francuskih bolnica također pokazuje da većina tih izolata spada u nekoliko klonova: ST235, ST111 i ST175 [56].

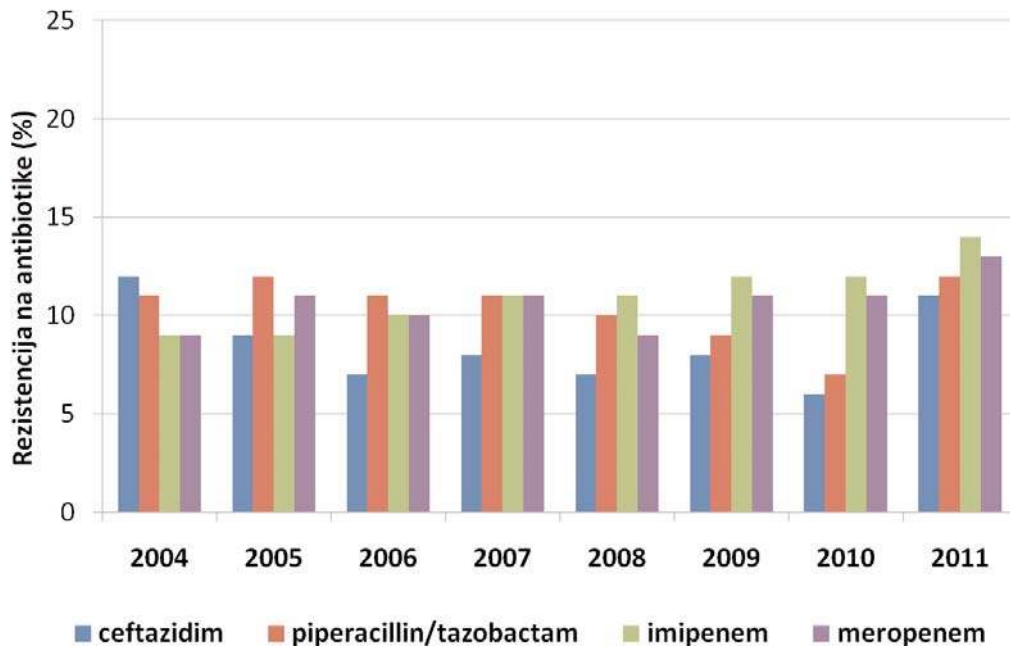
Najčešće detektirani klon među MDR izolatima *P. aeruginosa* je ST235, koji se smatra ishodišnim klonom međunarodnog klonalnog kompleksa CC235 (prethodno nazivan i CC11/BG11). CC235 je dosad opisan u Grčkoj, Italiji, Mađarskoj, Poljskoj, Češkoj, Švedskoj, Norveškoj, Belgiji, Turskoj, Španjolskoj, Francuskoj, Rusiji, Srbiji, Hrvatskoj, SAD-u, Brazilu, Japanu i Singapuru, a odgovoran je i za širenje enzima ESBL i MBL: PER, OXA, GES, VIM i IMP [37, 41, 45, 56, 60, 62]; (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>). Dokazana je i povezanost klona ST235 s različitim horizontalno stečenim genetičkim elementima (integroni, transpozoni i plazmidi) [37, 45, 62]. ST111 je također vrlo čest klon među MDR sojevima *P. aeruginosa*. Ishodišni je klon klonalnog kompleksa CC111 (prijašnji CC4/BG4) koji se pokazao odgovornim za širenje enzima

MBL, a opisan je u Mađarskoj, Italiji, Austriji, Poljskoj, Češkoj, Francuskoj, UK, Norveškoj, Švedskoj, Australiji i Hrvatskoj (nosilac enzima VIM-2) [41, 45, 56, 64]. Sa značajnom učestalošću opisan je i klon ST175, i to u Francuskoj, Češkoj, Mađarskoj, UK i Poljskoj [56, 58, 65]; (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>).

U Hrvatskoj, među MDR izolatima *P. aeruginosa* također prevladavaju dva najčešća epidemijska klon, ST235 i ST111, koji zajedno obuhvaćaju više od polovice MDR izolata iz naših zdravstvenih ustanova [45, 66]. Pojedini izolati, pripadnici ova dva klona, posjeduju i gene za enzime ESBL i MBL. Zanimljivo je također spomenuti da su među kliničkim izolatima iz Hrvatske dosad pronađena tri nova klonska tipa, ST966, ST1074 i ST1075 (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>) [45, 66].

## Rezistencija *P. aeruginosa* na antibiotike u Hrvatskoj

Praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u Hrvatskoj ima dugu tradiciju i započinje osnutkom Odbora za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike pri Akademiji medicinskih znanosti Hrvatske (AMZH) 1996.g. Odbor je tada prikupljao podatke iz 17 mikrobioloških laboratorija, a danas u radu Odbora sudjeluje više od 30 mikrobioloških laboratorija prateći rezistenciju 16 bakterija među kojima



Slika 2. Rezistencija na antibiotike *P. aeruginosa* u Hrvatskoj u razdoblju 2004.–2011. [67–74]

Figure 2. Antimicrobial resistance of *P. aeruginosa* in Croatia from 2004–2011 [67–74]

je i *P. aeruginosa*. U ovom radu smo izdvojili rezultate Odbora i Referentnog centra za rezistenciju *P. aeruginosa* na antipseudomonasne lijekove najčešće primjenjivane u kliničkoj praksi (ceftazidim, piperacilin/tazobaktam, imipenem i meropenem) u razdoblju od 2004. do 2011. g. (Slika 2). Primjećujemo postupni pad u rezistenciji *P. aeruginosa* na ceftazidim i piperacilin/tazobaktam od 2004. (12 % za ceftazidim, 11 % za piperacilin/tazobaktam) do 2010. g. (6 % za ceftazidim, 7 % za piperacilin/tazobaktam) [67–73]. U 2011. g. bilježimo porast rezistencije za oba antibiotika (11 % za ceftazidim, 12 % za piperacilin/tazobaktam) [74]. Povećanje rezistencije na piperacilin/tazobaktam se dijelom može objasniti prelaskom na nove standarde European Committee for Antibiotic Sensitivity Testing (EUCAST) koji imaju strože granične vrijednosti za piperacilin/tazobaktam. Ono što zabrinjava je postupni, ali kontinuirani porast rezistencije *P. aeruginosa* na karbapeneme, imipenem i meropenem. U 2004. g. bilježimo 9 % rezistencije na oba antibiotika, dok u 2011. g. bilježimo 14 % rezistentnih na imipenem i 13 % na meropenem (Slika 2).

## Zaključak

U novije doba liječenje infektivnih bolesti predstavlja sve veći izazov, a pogotovo je to slučaj s bolničkim infekcijama uzrokovanim bakterijom *Pseudomonas aeruginosa* koja, zahvaljujući svojoj nevjerojatnoj sposobnosti

prilagodbe, može vrlo brzo razviti istovremenu rezistenciju na više različitih grupa antibiotika. Multipla rezistencija na antibiotike kod *P. aeruginosa* diljem svijeta je u stalnom porastu i predstavlja veliku prijetnju jer u mnogim slučajevima ne ostavlja prostor za učinkovitu antimikrobnu terapiju [7]. Problem porasta multiple rezistencije još je izraženiji ako se uzme u obzir činjenica da farmaceutske tvrtke razvijaju vrlo mali broj novih antibiotika [55, 75].

Istraživanja klonalne povezanosti od velike su važnosti za razumijevanje i praćenje širenja rezistentnih izolata bakterijske vrste. Najučestaliji europski klonovi multiplorezistentnih *P. aeruginosa* prisutni su i u Hrvatskoj, no u okviru studije o klonalnoj rasprostranjenosti ovih sojeva u Hrvatskoj otkriven je i do sada neopisani klonski tip. Koliko će ovaj novi klon biti uspješan u daljnjem širenju vidjet će se u budućnosti. Istraživanja koja se bave učestalosti, karakteristikama i širenjem kliničkih multiplo rezistentnih izolata *P. aeruginosa* u hrvatskim zdravstvenim ustanovama u budućnosti bi mogla uvelike doprinijeti poboljšanju postojećih strategija epidemioloških prevencija i intervencija.

## Literatura

- [1] Paterson DL, Kim B-N. *Pseudomonas aeruginosa*. U: Mayers DL, Lerner SA, Ouellette M, Sobel JD, ur. Antimicrobial drug resistance. New York: Humana Press; 2009: 811–7.

- [2] Pier GB, Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa*. U: Mandell G, Bennett J, Dolin R, ur. Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005: 2587–615.
- [3] Blondel-Hill E, Henry DA, Speert DP. *Pseudomonas*. U: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, ur. Manual of clinical microbiology. Washington DC: American Society for Microbiology; 2007: 734–48.
- [4] Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol Rev 1996; 60: 539–74.
- [5] Spencer RC. Predominant pathogens found in the European Prevalence of Infection in Intensive Care Study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15: 281–5.
- [6] Edgeworth JD, Treacher DF, Eykyn SJ. A 25-year study of nosocomial bacteremia in an adult intensive care unit. Crit Care Med 1999; 27: 1421–8.
- [7] Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. Curr Opin Infect Dis 2005; 18: 306–13.
- [8] Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 43–8.
- [9] Kang CI, Kim SH, Park WB, i sur. Risk factors for antimicrobial resistance and influence of resistance on mortality in patients with bloodstream infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Microb Drug Resist 2005; 11: 68–74.
- [10] Bergogne-Berezin E. Current guidelines for the treatment and prevention of nosocomial infections. Drugs 1999; 58: 51–67.
- [11] Kang CI, Kim SH, Kim HB, i sur. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. Clin Infect Dis 2003; 37: 745–51.
- [12] Klibanov OM, Raasch RH, Rublein JC. Single versus combined antibiotic therapy for gram-negative infections. Ann Pharmacother 2004; 38: 332–7.
- [13] Linden PK, Kusne S, Coley K, Fontes P, Kramer DJ, Paterson D. Use of parenteral colistin for the treatment of serious infection due to antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis 2003; 37: e154–e160.
- [14] Balaji V, Jeremiah SS, Baliga PR. Polymyxins: Antimicrobial susceptibility concerns and therapeutic options. Indian J Med Microbiol 2011; 29: 230–42.
- [15] Hancock RE, Brinkman FS. Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. Annu Rev Microbiol 2002; 56: 17–38.
- [16] Nikaido H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 1831–6.
- [17] Trias J, Nikaido H. Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34: 52–7.
- [18] Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? Clin Infect Dis 2002; 34: 634–40.
- [19] Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin Microbiol Rev 2009; 22: 582–610.
- [20] Li H, Luo YF, Williams BJ, Blackwell TS, Xie CM. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. Int J Med Microbiol 2012; 302: 63–8.
- [21] Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 1633–41.
- [22] Tsuji M, Ishii Y, Ohno A, Miyazaki S, Yamaguchi K. In vitro and in vivo antibacterial activities of S-4661, a new carbapenem. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 94–9.
- [23] Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clin Microbiol Rev 2006; 19: 382–402.
- [24] Poole K, Srikumar R. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. Curr Top Med Chem 2001; 1: 59–71.
- [25] Schweizer HP. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. Genet Mol Res 2003; 2: 48–62.
- [26] Ziha-Zarifi I, Llanes C, Kohler T, Pechere JC, Plesiat P. In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 287–91.
- [27] Poole K, Gotoh N, Tsujimoto H, i sur. Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol 1996; 21: 713–24.
- [28] Morita Y, Komori Y, Mima T, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T. Construction of a series of mutants lacking all of the four major *mex* operons for multidrug efflux pumps or possessing each one of the operons from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: MexCD-OprJ is an inducible pump. FEMS Microbiol Lett 2001; 202: 139–43.
- [29] Morita Y, Kimura N, Mima T, Mizushima T, Tsuchiya T. Roles of MexXY- and MexAB-multidrug efflux pumps in intrinsic multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Gen Appl Microbiol 2001; 47: 27–32.
- [30] Jalal S, Wretling B. Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Microb Drug Resist 1998; 4: 257–61.
- [31] Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. Clin Infect Dis 2007; 45: 88–94.
- [32] Zhao WH, Hu ZQ. Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Crit Rev Microbiol 2010; 36: 245–58.
- [33] Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. Front Microbiol 2011; 2: 65.
- [34] Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Class A carbapenemases. J Antimicrob Chemother 2007; 60: 470–82.
- [35] Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2385–92.
- [36] Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1998; 42: 128–31.
- [37] Empel J, Fileczak K, Mrowka A, Hryniewicz W, Livermore DM, Gniadkowski M. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. J Clin Microbiol 2007; 45: 2829–34.
- [38] Tian GB, Adams-Haduch JM, Bogdanovich T, Wang HN, Doi Y. PME-1, an extended-spectrum beta-lactamase identified in



- Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55: 2710–3.
- [39] Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 1553–5.
- [40] Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev 2005; 18: 306–25.
- [41] Samuelson O, Toleman MA, Sundsfjord A, i sur. Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 346–52.
- [42] Zavascki AP, Barth AL, Goldani LZ. Nosocomial bloodstream infections due to metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 2008; 61: 1183–5.
- [43] Bosnjak Z, Bedenic B, Mazzariol A, Jarza-Davila N, Suto S, Kalenic S. VIM-2 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Zagreb, Croatia. Scand J Infect Dis 2010; 42: 193–7.
- [44] Sardelic S, Pallecchi L, Punda-Polic V, Rossolini GM. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying VIM-2 metallo-beta-lactamase determinants, Croatia. Emerg Infect Dis 2003; 9: 1022–3.
- [45] Sardelic S, Bedenic B, Colinson-Dupuich C, i sur. Infrequent finding of metallo-beta-lactamase VIM-2 in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Croatia. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56: 2746–9.
- [46] Jovcic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, i sur. Emergence of NDM-1 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55: 3929–31.
- [47] Sanders CC, Sanders WE, Jr. Type I beta-lactamases of gram-negative bacteria: interactions with beta-lactam antibiotics. J Infect Dis 1986; 154: 792–800.
- [48] Livermore DM, Brown DF. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. J Antimicrob Chemother 2001; 48 Suppl 1: 59–64.
- [49] Juan C, Gutierrez O, Oliver A, Ayestaran JI, Borrell N, Perez JL. Contribution of clonal dissemination and selection of mutants during therapy to *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance in an intensive care unit setting. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 887–92.
- [50] Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 1766–71.
- [51] Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 24–38.
- [52] Sevillano E, Gallego L, Garcia-Lobo JM. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. Pathol Biol (Paris) 2009; 57: 493–5.
- [53] El Garch F, Bogaerts P, Bebrone C, Galleni M, Glupczynski Y. OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55: 4828–33.
- [54] Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist Updat 2010; 13: 151–71.
- [55] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, i sur. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 2012; 18: 268–81.
- [56] Cholley P, Thouverez M, Hocquet D, Mee-Marquet N, Talon D, Bertrand X. Most multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in eastern France belong to a few clonal types. J Clin Microbiol 2011; 49: 2578–83.
- [57] Goossens H. Susceptibility of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units: results from the European MYSTIC study group. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 980–3.
- [58] Nemeč A, Krizova L, Maixnerova M, Musilek M. Multidrug-resistant epidemic clones among bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. Res Microbiol 2010; 161: 234–42.
- [59] Baquero F. From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. Nat Rev Microbiol 2004; 2: 510–18.
- [60] Giske CG, Libisch B, Colinson C, i sur. Establishing clonal relationships between VIM-1-like metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from four European countries by multilocus sequence typing. J Clin Microbiol 2006; 44: 4309–15.
- [61] Spratt BG. Exploring the concept of clonality in bacteria. Methods Mol Biol 2004; 266: 323–52.
- [62] Maatallah M, Cheriaa J, Backhrouf A, i sur. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. PLoS One 2011; 6: e25617.
- [63] Pirnay JP, Bilocq F, Pot B, i sur. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. PLoS One 2009; 4: e7740.
- [64] Edalucci E, Spinelli R, Dolzani L, i sur. Acquisition of different carbapenem resistance mechanisms by an epidemic clonal lineage of *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect 2008; 14: 88–90.
- [65] Libisch B, Balogh B, Fuzi M. Identification of two multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clonal lineages with a country-wide distribution in Hungary. Curr Microbiol 2009; 58: 111–6.
- [66] Guzvynec M, Izdebski R, Butic I, i sur. ST235, ST111 and ST132 predominate among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Croatia. Rad u postupku objavljivanja.
- [67] Tambić A, Tambić T. Rezistencija bakterijskih izolata u 2004. g. U: Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2004. g. izd. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2004.
- [68] Tambić A, Tambić T. Rezistencija bakterijskih izolata u 2005. g. U: Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2005. g. izd. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2005.
- [69] Tambić A, Tambić T. Rezistencija bakterijskih izolata u 2006. g. U: Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2006. g. izd. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2006.
- [70] Tambić A, Tambić T. Rezistencija bakterijskih izolata u 2007. g. U: Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2007. g. izd. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2007.
- [71] Tambić A, Tambić T. Rezistencija bakterijskih izolata u 2008. g. U: Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2008. g. izd. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2008.
- [72] Tambić A, Tambić T. Rezistencija bakterijskih izolata u 2009. g. U: Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2009. g. izd. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2009.

- [73] Tambić A, Tambić T. Rezistencija bakterijskih izolata u 2010. g. U: Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2010. g. izd. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2010.
- [74] Tambić A, Tambić T. Rezistencija bakterijskih izolata u 2011. g. U: Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2011. g. izd. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2011.
- [75] Livermore DM. Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1941–4.