

PAWEŁ URBANOWICZ, MAREK GNIADKOWSKI

Zakład Mikrobiologii Molekularnej  
Narodowy Instytut Leków  
Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa  
E-mail: [purbanowicz@cls.edu.pl](mailto:purbanowicz@cls.edu.pl)  
[gniadkow@cls.edu.pl](mailto:gniadkow@cls.edu.pl)

## „CIEŻKOZBROJNY” *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*: MECHANIZMY LEKOOPORNOŚCI I ICH TŁO GENETYCZNE

### WSTĘP

Stosowanie każdej substancji terapeutycznej jest obarczone ryzykiem powstania tolerancji lub oporności na jej działanie i zjawisko to jest charakterystyczne także dla leków stosowanych w terapii zakażeń bakteryjnych, wirusowych czy pasożytniczych (DAVIES i DAVIES 2010). Powstała tolerancja lub oporność przyczynia się do wydłużenia czasu trwania leczenia, podniesienia jego kosztów i co najważniejsze, zwiększenia ryzyka niepowodzenia lub powikłań. Proces rozwijania oporności jest wieloaspektowy, zaś mechanizmy lub sposoby, dzięki którym komórka staje się niepodatna na działanie leku są bardzo zróżnicowane i mogą mieć podłoże genetyczne, biochemiczne lub fizjologiczne (COHEN 1992). Zjawisko lekooporności o wielkiej skali dotyczy zakażeń i chorób zakaźnych wywoływanych przez bakterie, będąc jednym z zasadniczych problemów, z jakimi boryka się współczesna medycyna. W ostatnim czasie jego znaczenie osiągnęło też wymiar społeczny, ekonomiczny i nawet polityczny.

### ANTYBIOTYKI I ANTYBIOTYKOOPORNOŚĆ – RYS HISTORYCZNY I PODSTAWY

Mianem pierwszego antybiotyku (zgodnie z terminem ukutym przez Selamana Waksmana, produkt metabolizmu wtórnego drobnoustrojów o działaniu bakteriostatycznym lub bakteriobójczym) określa się penicylinę. Protoplastę dzisiejszych leków

przeciwbakteryjnych może jednak stanowić środek z końca lat 90. XIX w. o nazwie Pilocyanaza (ang. Pyocyanase), za odkryciem którego stali Rudolf Emmerich i Oscar Löw. W skład owego leku wchodził ekstrakt z hodowli bakterii *Bacillus pyocyaneus* (*Pseudomonas aeruginosa*). Już w 1899 r. niemieccy badacze wykazali, że substancja ta posiada właściwości przeciwbakteryjne, skierowane wobec gatunków odpowiedzialnych za rozwój cholery, tyfusu, błonicy czy węgliką. Pilocyanazę wprowadzono do leczenia szpitalnego, ale jej zróżnicowana skuteczność w zależności od pacjenta, a także preparatyka, której poszczególne etapy były toksyczne, doprowadziły do porzucenia leku (AMINOV 2010). Za właściwe wejście rodzaju ludzkiego w „erę antybiotykową” odpowiedzialne są trzy nazwiska: Paul Ehrlich, Gerhard Domagk i przede wszystkim, Alexander Fleming.

Paul Ehrlich, wraz z bakteriologiem Sahachiro Hato i chemikiem Alfredem Bertheidem, wynaleźli w 1909 r. arsfenaminę, pierwszy chemioterapeutyk (lek przeciwdrobnoustrojowy syntetyzowany chemicznie, niemający odpowiednika w przyrodzie), znany szerzej jako Salvarsan. Ten arsenoorganiczny związek pozwolił na walkę z kiłą, chorobą uznawaną jeszcze do początku XX w. za nieuleczalną (stosowane wówczas sole rtęci odznaczały się wysoką toksycznością i niską efektywnością terapeutyczną) (AMINOV 2010). Z kolei Gerhard Domagk uważany jest za twórcę całej klasy chemioterapeutyków, sulfonamidów. Prowadził on badania nad aktywnością bakteriostatyczną i bakteriobójczą różnych barwników chemicznych. Jednym z

**Słowa kluczowe:** antybiotyki  $\beta$ -laktamowe, antybiotykooporność, metalo- $\beta$ -laktamazy, oporność nabyta, *Pseudomonas aeruginosa*

nich był odkryty w 1932 r. Prontosil. Związek ten nie wykazywał jednak aktywności bakteriobójczej *in vitro*; ujawniała się ona dopiero po podaniu domięśniowym zwierzętom. Okazało się, że Prontosil stanowi prekursor aktywnej formy leku – sulfanilamid. Był on tani i prosty w masowej produkcji, a dzięki wprowadzanym modyfikacjom chemicznym otrzymano wiele jego pochodnych. Dzięki temu sulfonamidy stały się w niedługim czasie najbardziej rozpowszechnionymi lekami wykorzystywanymi w medycynie zakażeń, zaś Domagk w 1939 r. został za to odkrycie uhonorowany Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny (AMINOV 2010).

Kwestia odkrycia penicyliny wydaje się rozstrzygnięta. Nastąpiło to w 1928 r. wskutek rzekomego niedbalstwa Alexandra Fleminga. Faktem mało znanym, a wartym zapamiętania jest praca eksperymentalna pochodząca z 1896 r., autorstwa Ernesta Duchesnego. Podczas badań prowadzonych *in vitro*, obserwował on powstające zjawisko antybiozy pomiędzy zmieszanyimi hodowlami bakterii *Escherichia coli* lub *Salmonella enterica* i grzyba *Penicillium glaucum*. Prowadził także badania na świnkach morskich, podając im kultury wymienionych bakterii chorobotwórczych i pleśni. Zebrane dane pozwoliły młodemu badaczowi sformułować hipotezę mówiącą, że za ograniczenie lub brak wzrostu bakterii odpowiada „toksyna” produkowana przez strzępki *P. glaucum*. Nie zidentyfikował jednak konkretnego związku, który mógł być za to zjawisko odpowiedzialny. Praca Duchesnego pozostała w świecie naukowym niezauważona, zaś sam badacz zmarł na gruźlicę w 1912 r. (SCHAEFER 2014). Epizod ten rzucić może nowe światło na odkrycie penicyliny przez Fleminga. Niemniej, droga dzieląca pierwsze obserwacje i uzyskanie tego antybiotyku w formie czystej chemicznie i efektywnej terapeutycznie, była długa. Fleming, w obliczu komplikacji związanych z oczyszczeniem i stabilnością penicyliny, zaniechał dalszych badań nad nią w 1940 r. Szczęśliwie jednak, zespół pod kierownictwem Howarda Floreya i Ernesta Chaina w tym samym czasie podjął się opracowania metody, dzięki której skutecznie pozyskiwano i oczyszczano penicylinę z hodowli pleśni. Szacuje się, że produkowana na większą skalę, obok sulfonamidów, okazała się bezcenna w uratowaniu życia i zdrowia ponad 100 milionów ludzi, przez co zapewniła Flemingowi, Chainowi i Floreyowi miejsce w gronie noblistów (SCHAEFER 2014). Co ciekawe, Alexander Fleming był jednym z pierwszych, którzy ostrzegali przed opornością bakterii na nowo odkryty

antybiotyk, wynikająca z jego nieprawidłowego dawkowania (FLEMING 1999).

Przedstawione prace nad trzema pierwszymi lekami przeciwbakteryjnymi (Salvarsanem, Prontosilem oraz penicyliną) są niejako wstępem do okresu opisywanego jako „złota era antybiotyków”. Przez ponad 20 lat, począwszy od lat 50. XX w., trwał szybki rozwój na tym polu; powstała wówczas większość głównych klas leków, z których duża część jest stosowana do dziś.

Wdrożenie antybiotyków, obejmujących swoim działaniem liczne, ówczesnie znane bakterie chorobotwórcze, było krokiem milowym w medycynie zakażeń. Wyrażano przekonanie, że trapiące ludzi i zwierzęta choroby bakteryjne wkrótce należąć będą do przeszłości (COHEN 2000). Niestety, wraz z intensywnym rozwojem antybiotykoterapii, dynamicznie rozwijało się również zjawisko antybiotykooporności, przed czym ostrzegał już Fleming wraz z nielicznym gronem bakteriologów. Pierwsze doniesienia na temat pojawiających się opornych szczepów bakterii patogennych traktowano z niedowierzaniem. Do problemu podchodzono raczej jak do ciekawostki z zakresu genetyki, wartej ewentualnego opisanie, a nie narastającego zagrożenia klinicznego. Co więcej, uważano, że problem antybiotykooporności ma małe prawdopodobieństwo zaistnienia podczas leczenia (DAVIES 1995). A jednak, już w 1942 r., niedługo po wprowadzeniu penicyliny do leczenia szpitalnego, wyizolowano pierwszy penicyliooporny szczep *Staphylococcus aureus*. Wraz z upływem czasu proporcja zakażeń tym opornym patogenem drastycznie rosła i zaczął odpowiadać on nie tylko za zakażenia w środowisku szpitalnym, ale również poza jego obrębem. Już na początku lat 50. ubiegłego wieku penicyliooporne szczepy *S. aureus* zyskały charakter pandemicznych, stanowiąc aż ok. 80% izolatów szpitalnych tego gatunku (MEDEIROS 1997, CHAMBERS i DELEO 2009). Co więcej, równolegle w czasie doszło do epidemii dysenterii wywołanej przez *Shigella dysenteriae* w Japonii, co dodatkowo podkreśliło realne zagrożenie antybiotykoopornością, bowiem w jej trakcie obserwowano spadek efektywności leczenia szeroko dostępnymi sulfonamidami. Pod koniec 1952 r. ponad 80% izolatów *S. dysenteriae* było opornych na działanie tych chemioterapeutyków. Podejmowane leczenie chloramfenikolem, tetracykliną czy streptomycyną było skuteczne tylko chwilowo, okazywało się bowiem, że bakterie stawały się odporne i na te leki (DAVIES 1995). Zaczęto zwracać uwagę, że cechy oporności na antybiotyki mogą być przekazywane między komórkami (NAKAYA i współaut. 1960, DATTS 1962, LEBEK 1963). Stała rosła liczba do-

niesień z całego świata o opornych (w tym wieloopornych) szczepach różnych gatunków bakterii (DAVIES 1995). Zaczęto się skupiać na wyjaśnieniu problemu, w jaki sposób geny warunkujące antybiotykooporność są „zorganizowane” w genomie bakteryjnym i dzięki jakim mechanizmom komórki są w stanie je nabywać. Opracowanie epidemii *S. dysenteriae* w Japonii pozwoliło określić, że to plazmidy (określane jako „czynniki R”) były odpowiedzialne za lekooporność bakterii (WATANABE i FUKUSAWA 1960). W dodatku, w 1973 r. Robert Hedges i Alan Jacob zidentyfikowali transpozon niosący w obrębie swojej sekwencji gen oporności na ampicylinę (HEDGES i JACOB 1974). Ponad dekadę później, w 1989 r., Harold Stokes i Ruth Hall wykryli integrony, struktury genetyczne zdolne do wymiany i ekspresji tzw. kaset genowych, którymi często są geny oporności na antybiotyki (STOKES i HALL 1989). Dzięki takim doniesieniom coraz lepiej rozumiano mechanizmy nabywania oporności i zaczęto się przekonywać, jak bardzo dynamiczne, a w efekcie niebezpieczne jest to zjawisko.

Jak wspomniano wyżej, zagadnienie lekooporności bakterii jest złożone. Mogą ją warunkować pojedyncze geny lub ich zespoły, które oprócz samej oporności kodują też funkcje regulacyjne i jako takie, mogą być niekiedy częścią skomplikowanych sieci regulacyjnych w komórce. Ekspresja genu oporności może zachodzić w sposób ciągły na tym samym poziomie (ekspresja konstytutywna) lub tymczasowo, wskutek indukcji specyficznym czynnikiem, np. samym antybiotykiem (ekspresja regulowana lub indukowana). Mechanizmy antybiotykooporności reprezentują kilka zasadniczych strategii, z których najbardziej rozpowszechniona jest enzymatyczna inaktywacja leku poprzez jego chemiczną modyfikację lub hydrolizę. Wyróżnia się także ochronę miejsca docelowego działania antybiotyku lub, częściej, jego zmianę strukturalną, wywołaną np. mutacją (zmiana sekwencji białka lub RNA) lub chemiczną modyfikacją. Jeżeli antybiotyk znajduje się wewnątrz komórki bakteryjnej, to wyspecjalizowane pompy mogą go aktywnie usunąć. Bakteria może też hamować proces wnikania leku do wnętrza komórki poprzez zmniejszanie przepuszczalności otaczających ją osłon. Wreszcie, blokowany przez antybiotyk szlak metaboliczny może być zmodyfikowany lub zastąpiony szlakiem alternatywnym (BLAIR i współaut. 2015).

Warto pamiętać, że niektóre gatunki bakterii mogą być naturalnie odporne na działanie określonych antybiotyków lub ich całych klas. Zjawisko to wynika najczęściej z braku obecności miejsca docelowego dla ich działania, słabej przepuszczalności lub aktywności

chromosomowo kodowanych mechanizmów oporności. Definiowana w ten sposób oporność naturalna podlega pozytywnej selekcji podczas ekspozycji na antybiotyki, przez co niektóre gatunki mogą zyskiwać sprzyjające warunki do rozwoju w środowisku szpitalnym (MARKIEWICZ i KWIATKOWSKI 2012). Głównym problemem pozostaje jednak oporność nabyta, mająca dwa główne źródła. Jednym z nich są mutacje lub zjawiska rekombinacji w obrębie chromosomowego DNA, które mogą odpowiadać np. za zmiany strukturalne miejsc docelowych antybiotyków, wzrost ekspresji naturalnie występujących enzymów inaktywujących leki lub pomp, wreszcie hamować ekspresję lub zmieniać strukturę (aż do całkowitej utraty) kanałów porynowych, przez które antybiotyki przedostają się do komórki (DAVIES i DAVIES 2010, BLAIR i współaut. 2015). Drugim źródłem o ogromnym znaczeniu jest zdolność nabywania obcego DNA przez komórkę bakterii poprzez horyzontalny transfer genów (ang. horizontal gene transfer, HGT). Otrzymane w ten sposób fragmenty DNA mogą zawierać sekwencje homologiczne do genów kodujących cele działania antybiotyków i ich rekombinacja w *locus* może powodować zmiany strukturalne tych celów. Mogą one też zawierać nowe geny antybiotykooporności, które są włączane do chromosomu lub pozostają na autonomicznie replikujących się plazmidach. Co ważne, tak nabyte geny oporności podlegają kolejnym mutacjom, prowadzącym np. do podwyższenia poziomu ich ekspresji lub modyfikacji struktury i funkcji ich produktów (FROST i współaut. 2005). Przenoszone geny oporności pochodzą z różnych gatunków bakterii, u których mogą warunkować oporność wrodzoną. Za początek „krażenia” tych genów w populacjach drobnoustrojów uznaje się proces ich mobilizacji, tzn. pojawienia się w ich pobliżu ruchomych elementów genetycznych (np. sekwencji insercyjnych, IS), zdolnych do przeniesienia sąsiednich regionów DNA w inne miejsce genomu, w tym na obecny w komórce plazmid (STOKES i GILLINGS 2011).

Pozyскиwanie cech lekooporności w drodze mutacji chromosomalnych lub HGT, jak również rozprzestrzenianie się klonalne szczepów z nowo nabytymi cechami są, podobnie jak oporność naturalna, silnie faworyzowane przez istniejącą presję antybiotykową (LEVY i MARSHALL 2004). Sprzyja ona również akumulacji w pojedynczych szczepach różnych determinant oporności, dotyczących tych samych lub różnych grup leków i w zależności od stopnia ich nagromadzenia wyróżnia się szczepy typu MDR (ang. multi-drug-resistance), XDR (ang. extensive-drug-resistance) oraz PDR (ang. pan-drug-

-resistance), z których te ostatnie wykazują oporność na wszystkie dostępne antybiotyki (MAGIORAKOS i współaut. 2012). Ze względu na znaczenie kliniczne gatunków oraz ich zdolność do akumulacji cech lekooporności, stworzono listę głównych patogenów szpitalnych, tzw. ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.). Wraz z *Clostridium difficile*, a także pozaszpitalnymi drobnoustrojami *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes* i *Mycobacterium tuberculosis*, ESKAPE stanowią problem kliniczny o niezwyklej wadze (BOUCHER i współaut. 2009, FAIR i YITZHAK 2014). Spośród Gram-ujemnych bakterii, szczególne znaczenie w grupie ESKAPE ma pałeczka ropy błękitnej, *P. aeruginosa*. Użyte w tytule niniejszego artykułu określenie „ciężkozbrojny”, trafnie odzwierciedla właściwości tego niezwyklego mikroorganizmu. Podobnie jak dobrze uzbrojona i opancerzona piechota pól bitewnych średniowiecza zdolna jest rozbić szeregi słabszego przeciwnika, tak *P. aeruginosa* jest w stanie dokonać spustoszenia w zakażonym organizmie. Rozmaitość kodowanych czynników zjadliwości, a także wiele skutecznych, naturalnych i nabytych mechanizmów oporności na antybiotyki i dezynfektanty, każą traktować ten oportunistyczny patogen jako jedno z poważniejszych zagrożeń klinicznych.

#### HISTORIA ODKRYCIA PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Zakażenia bakterią *P. aeruginosa* po raz pierwszy były odnotowywane w XIX w., kiedy opisywano charakterystyczne, niebiesko-zielone zabarwienie i osobliwy zapach bandaży, którymi opatrywano niektórych rannych i chorych. W 1850 r. francuski badacz Charles Sédillot zwrócił uwagę, że zabarwienie to jest w stanie przenosić się pomiędzy pacjentami. Był to na tyle ciekawy temat, że dekadę później Fordos wyekstrahował ów barwnik, piocyjaninę, wciąż jednak nie znano czynnika, który go wytwarzał. W 1862 r. Lucke zaobserwował mikroorganizmy o podłużnym kształcie w preparacie z charakterystycznie zabarwionej ropy, pochodzącej z zakażonej rany. Dopiero w 1882 r. drobnoustrój ten został wyizolowany przez Carla Gessarda i nazwany początkowo *Bacillus pyocyaneus* (zmiana na *Pseudomonas aeruginosa* nastąpiła w 1894 r.) (VILLAVICENCIO 1998, D'AGATA 2015). Początkowo nie traktowano jednak *B. pyocyaneus* jako organizmu patogennego, dopiero rosnąca liczba doniesień o „zielono-niebieskich zakażeniach”, a także publikacja Williamsa z 1894 r., która

pierwsza zawierała szczegółowe opisy infekcji *B. pyocyaneus*, pozwoliła zidentyfikować tę bakterię jako czynnik etiologiczny zakażeń. W latach 40. XX w., William Haynes nakreślił dokładną charakterystykę mikrobiologiczną gatunku *P. aeruginosa* i zaproponował sposób odróżnienia go od pokrewnego *P. fluorescens* (D'AGATA 2015). Przez następne 50 lat pałeczka ropy błękitnej stała się jednym z najintensywniej badanych drobnoustrojów.

#### MIKROBIOLOGIA

*Pseudomonas aeruginosa* jest bakterią wszechobecną; występuje powszechnie w glebie, zbiornikach wodnych, rzekach, stanowi część mikroflory roślin i zwierząt. Co ciekawe jednak, jest rzadkim składnikiem mikrobiomu człowieka. Bakteria ta jest ruchliwa, oksydazo-dodatnia, tlenową pałeczką niefermentującą laktozy. Ze względu na niewielkie wymagania pokarmowe jest w stanie rosnać na wielu podłożach laboratoryjnych. Optymalna temperatura dla tej bakterii to 37°C, choć jest też w stanie rosnać w 42°C, co wyróżnia ją na tle reszty gatunków swojego rodzaju. Dzięki różnorodnym pigmentom hodowle *P. aeruginosa* charakteryzuje się specyficznym kolorem, poczynając od zielono-niebieskiego (piocyjanina), zielonego, zdolnego do fluorescencji (piowerdyna), przez czerwony (piorubina) po brązowo-czarny (piomelanina). Ponadto, kultury pałeczki ropy błękitnej mają charakterystyczny zapach przypominający jaśmin. Niektóre szczepy *P. aeruginosa* są w stanie wytwarzać pozakomórkowy polisacharyd, alginian. Nadprodukcja tej substancji powoduje, że tworzone kolonie stają się śluzowate i lejące. Tego typu forma kolonii jest właściwa dla izolatów otrzymywanych od chorych na mukowiscydozę lub inne choroby, którym towarzyszą przewlekłe zakażenia *P. aeruginosa* (D'AGATA 2015).

#### ZNACZENIE KLINICZNE

*Pseudomonas aeruginosa* jest szczególnie niebezpieczny w środowisku szpitalnym, gdzie jego rezerwuarem może być skażony sprzęt diagnostyczny, elementy aparatury do sztucznego oddychania lub resuscytacji, urządzenia i instalacje sanitarne, sprzęt czyszczący, a nawet wazony na kwiaty czy kostkarki do lodu (D'AGATA 2015). Zakażenia pałeczką ropy błękitnej są groźne zwłaszcza dla pacjentów z osłabioną odpornością, np. po przeszczepach i poddawanych chemioterapii. Ryzyko dotyczy również osób starszych, szczególnie wielokrotnie lub długo hospitalizowanych, pacjentów po zabiegach in-

wazyjnych, z ranami oparzeniowymi i przebywających na oddziałach intensywnej terapii (OIT). Charakterystyczną grupę stanowią chorzy na mukowiscydozę, zasadniczo przebywający poza szpitalami, jednak często do nich trafiający z powodu choroby podstawowej i zakażeń (ALHAZMI 2015). *Pseudomonas aeruginosa* jest czynnikiem etiologicznym wielu typów zakażeń, zarówno ostrych, jak i przewlekłych, do których należą zakażenia dróg oddechowych (ang. respiratory tract infection, RTI), skóry i tkanek miękkich (ang. skin and soft tissue infection, SSTI), dróg moczowych (ang. urinary tract infection, UTI) i najgroźniejszych – łożyska krwi (ang. bloodstream infection, BSI). Wśród SSTI bardzo duże znaczenie mają zakażenia miejsca operowanego, ran oparzeniowych, a także odleżyn. W USA *P. aeruginosa* należy do pierwszej piątki bakterii wywołujących zakażenia szpitalne, w tym plasuje się na drugim miejscu wśród czynników respiratorowego zapalenia płuc i odcewnikowych zakażeń dróg moczowych (VINCENT 2003). Zebrane dane z OIT polskich szpitali także wymieniają *P. aeruginosa* jako jeden z pięciu najważniejszych czynników etiologicznych SSTI, RTI, BSI oraz UTI (Deptuła i Hryniewicz, dane niepublikowane). Śmiertelność wśród pacjentów zakażonych *P. aeruginosa* jest wysoka i sięga ogólnie około 20% przypadków, przy czym w wyniku respiratorowego zapalenia płuc jest wyższa (ponad 30%), w zakażeniu krwi zaś wynosi blisko 50% (LAUTENBACH i współaut. 2010, CENICEROS i współaut. 2016). *Pseudomonas aeruginosa* jest częstym czynnikiem RTI towarzyszących późnym stadiom przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP), a co więcej, odpowiada on też za 70% występujących RTI u pacjentów chorujących na mukowiscydozę (SORDE i współaut. 2011). Biorąc pod uwagę zagrożenia jakie stanowi *P. aeruginosa*, kluczowe okazują się mechanizmy, które je warunkują: wielki i plastyczny genom, pokaźna liczba czynników wirulencji, szeroka naturalna antybiotykooporność, rozbudowana sieć regulatorowa i łatwość pozyskiwania oporności nabytej.

## CECHY OGÓLNE GENOMU

Rozmiar genomu *P. aeruginosa* waha się między 5,5 a 7 milionami par zasad (Mpz), co czyni go jednym z największych wśród bakterii (KLOCKGETHER i współaut. 2011). Co ciekawe, nie posiada on wielu powtórzeń poszczególnych genów, a ich liczne rozbudowane rodziny o zaznaczonej odrębności. Fakt ten może tłumaczyć silne zróżnicowanie genetyczne i funkcjonalne tego patogenu (D'AGATA 2015). Duży rozrzut (~1,5 Mpz) w podawanej wielkości genomu wynika z cech

tw. genomu dodatkowego (ang. accessory genome), którego rozmiar może się znacząco różnić (6,9–18,0% całości). W jego skład wchodzić mogą plazmidy oraz sekwencje znajdujące się w obrębie chromosomu, np. ICE (ang. integrative and conjugative elements; głównie z grupy pKLC102/PAGI-2), sekwencje insercyjne, transpozony (najczęściej z rodziny Tn3), integrony czy profagi, nabyte na drodze HGT. Poszczególne elementy dodatkowe mogą być obecne w pojedynczych szczepach lub też charakteryzować linie filogenetyczne, kłady lub grupy klonalne *P. aeruginosa*, determinując tym samym duże zróżnicowanie wewnątrz- i międzypopulacyjne. Zawarta w genomie dodatkowym informacja genetyczna warunkuje tolerancję lub oporność na liczne antybiotyki i metale ciężkie, koduje dodatkowe czynniki wirulencji (np. egzotoksyny ExoS oraz ExoU) i zawiera elementy regulatorowe (KUNG i współaut. 2010). Ciekawe cechy wnoszą niektóre profagi, których DNA włączany jest w genom *P. aeruginosa*. Przykładowo, fag  $\phi$ CTX jest w stanie podnieść zjadliwość bakterii dzięki genowi *ctx*, kodującemu toksynę typu PFT (ang. pore-forming toxin), zdolną przerwać ciągłość błony atakowanej komórki. W efekcie infekcji innym fagiem, D3 z rodziny Siphoviridae, dochodzi do modyfikacji w strukturze LPS (lipopolisacharyd; endotoksyna). Zjawisko to, określane jako serokonwersja, przyczyniać się może do efektywniejszej adhezji bakterii do powierzchni komórek gospodarza. Co więcej, infekcja *P. aeruginosa* fagiem FIZ15, podobnym do D3, warunkuje większą odporność patogenu na fagocytozę (CEYSSENS i LAVIGNE, 2010, KUNG i współaut. 2010).

Warto pamiętać, że schemat lokalizacji opisywanych elementów w obrębie genomu dodatkowego nie jest dziełem przypadku. Miejsca o zwiększonej podatności na modyfikacje genetyczne, nazywane regionami plastyczności genomu (ang. region of genome plasticity, RGP), znajdują się najczęściej na końcach 3' genów tRNA. Regiony te mogą być zarówno punktami insercji tzw. wysp genomowych lub profagów, jak i ich późniejszych modyfikacji (MATHEE i współaut. 2008). Do tej pory poznano ponad 80 RGP w obrębie kilku genomów *P. aeruginosa* (KLOCKGETHER i współaut. 2011). Do tej pory funkcje biologiczne przypisano stosunkowo niewielkiej części genów obserwowanych w genomie dodatkowym; udało się to zaledwie w przypadku ok. 30% tych genów (w porównaniu z ponad 60% genów genomu podstawowego), podczas gdy pozostała część jest słabo lub w ogóle niescharakteryzowana (OZER i współaut. 2014). W przeciwieństwie do genomu dodatkowego, zmienność

sekwencji genomu podstawowego (ang. core genome) jest niewielka i wynosi około 0,5-0,7%. W efekcie częstych rearanżacji genetycznych w obrębie pangenomu, genom podstawowy jest opisywany jako mozaikowy (KLOCKGETHER i współaut. 2011, BEZUIDT i współaut. 2013).

#### CZYNNIKI WIRULENCJI – ROLA W PATOGENEZIE, REGULACJA WYTWARZANIA

Gama wytwarzanych przez *P. aeruginosa* czynników wirulencji jest niepospolicie szeroka i są one kodowane zarówno przez genom podstawowy, jak i dodatkowy, często w obrębie tzw. wysp genomowych lub wysp patogenności (ang. *P. aeruginosa* genomic island, PAGI; *P. aeruginosa* pathogenicity island, PAPI). Ze względu na ich lokalizację dzieli się je na związane z komórką, tj. LPS, pile czy rzeska, oraz na wydzielane pozakomórkowo, w tym: piocyjanina i inne barwniki, polisacharydy zewnątrzkomórkowe czy różnorodne enzymy i toksyny, wydzielane przez specyficzne systemy sekrecyjne. Umożliwiają one inwazję organizmu gospodarza przez *P. aeruginosa*, wywołanie ostrego zakażenia oraz jego przejście w stan przewlekły, w co zaangażowane są lub czemu towarzyszą takie aktywności, właściwości, procesy i zjawiska, jak ruchliwość, adhezja, cytotoksyczność, niszczenie tkanek, stan zapalny, chelatacja jonów żelaza, unikanie odpowiedzi immunologicznej czy tworzenie biofilmu (SCHUREK i współaut. 2012). Pomimo że mechanizmy działania większości czynników (lub efektorów) zjadliwości *P. aeruginosa* już poznano w szczegółach, to trzeba mieć na uwadze fakt, iż zostały one zidentyfikowane głównie podczas badań na zwierzętach lub liniach komórkowych. Ich dokładna rola w patogenie u ludzi często nie jest do końca ustalona (D'AGATA 2015).

Wśród dobrze poznanych czynników wirulencji *P. aeruginosa* są cytotoksyny (egzotoksyny), do których należą, m. in. (i) ExoA, odpowiedzialna za miejscowe uszkodzenie tkanek oraz udział w hamowaniu syntezy białek w komórkach gospodarza; (ii) ExoS i ExoT, których działanie polega na spowalnianiu procesu fagocytozy, (iii) ExoU, która wywołuje efekt cytotoksyczny względem komórek nabłonkowych i makrofagów oraz (iv) ExoY uczestnicząca w reorganizacji cytoszkieletu komórki eukariotycznej (ALHAZMI 2015). Oprócz egzotoksyn, *P. aeruginosa* wytwarza zewnątrzkomórkowe proteazy, takie jak alkaliczna proteaza, czy proteazy LasA i LasB, które podobnie jak niektóre egzotoksyny uszkodzają komórki i tkanki organizmu gospodarza (ALHAZMI 2015). Szczegółne

znaczenie ma elastaza, która rozkłada białka strukturalne, jak lamininy i kolageny, bierze udział w degradacji połączeń między komórkami nabłonkowymi oraz inaktywuje ludzki inhibitor proteinaz  $\alpha$ -1 i immunoglobuliny IgG oraz IgA (GALLOWAY 1991). Egzotoksyny i proteazy należą do grupy efektorów procesu patogeny *P. aeruginosa*. Warto jednak pamiętać, że w obrębie czynników wirulencji klasyfikuje się także systemy sekrecyjne, odpowiedzialne za wydzielanie określonych białek efektorowych, w tym także bezpośrednio do wnętrza komórek eukariotycznych lub do przestrzeni międzykomórkowych. Należy tutaj wymienić układy sekrecyjne, takie jak T1SS, T2SS, T3SS, czy T6SS (ang. type... secretion system, TSS). Wydzielają one wymienione wyżej egzotoksyny i proteazy, np. T1SS alkaliczną proteazę, T2SS egzotoksynę ExoA i elastazę, a T3SS egzotoksyny ExoS, T, U i Y (ALHAZMI 2015). Ciekawą rolę w procesie patogeny pełni ostatni z wymienionych systemów sekrecji, T6SS. Nie uczestniczy on (w przeciwieństwie do pozostałych TSS) w kontakcie z komórkami eukariotycznymi, ale z innymi komórkami bakteryjnymi. Transportowane przez T6SS do ich wnętrza różne białka efektorowe (fosfolipazy, amidazy, muramidazy, nukleazy) powodują uszkodzenie, a w konsekwencji obumieranie innych komórek bakteryjnych. Jak się okazuje, usprawnia to proces kolonizacji tkanek przez patogen ze względu na osłabianą w ten sposób naturalną florę bakteryjną gospodarza (RUSSELL i współaut. 2014). Na uwagę zasługują również czynniki wirulencji związane z komórką *P. aeruginosa*, tj. pile typu IV (PT4) i lipopolisacharyd (LPS). Pile typu IV biorą udział w adhezji do komórek gospodarza, a także odpowiadają za proces wyboru atakowanej tkanki przez bakterię (tropizm tkankowy) (JAGUSZTYN-KRYNICKA 2012, ALHAZMI 2015). Z kolei LPS uczestniczy w wywoływaniu wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej oraz stanowi czynnik etiologiczny stanów zapalnych (ALHAZMI 2015). W posiadanym przez *P. aeruginosa* arsenale znajduje się również kilka barwników, w tym piowerdyna i piocyjanina. Piowerdyna jest sideroforem, który bierze udział w chelatacji jonów żelaza (WOLSKA i współaut. 2010). Z kolei piocyjanina, nadająca charakterystyczny zielono-niebieski kolor koloniom *P. aeruginosa*, wywołuje produkcję reaktywnych form tlenu (RFT) w komórce gospodarza. Duże stężenie RFT w komórce może wywołać apoptozę niektórych typów komórek układu odpornościowego, np. neutrofilów, co skutkuje hamowaniem odpowiedzi immunologicznej (WOLSKA i współaut. 2010). Nie bez znaczenia w procesie patogeny pozostaje wydzielany zewnątrzkomórkowo polisacharyd alginian. Stano-

wi on jeden z głównych składników struktury biofilmów. Pełni bardzo istotną rolę w adhezji do komórek gospodarza. Dzięki jego obfitemu wydzielaniu do przestrzeni międzykomórkowej *P. aeruginosa* podwyższa odporność na fagocytozę i zwiększa oporność na antybiotyki; zjawisko to jest szczególnie charakterystyczne dla szczepów izolowanych od pacjentów z mukowiscydozą (SCHUREK i współaut. 2012, ALHAZMI 2015).

Zagadnieniem równie interesującym, jak same czynniki wirulencji, jest regulacja ich wytwarzania. Produkcja wielu determinant zjadliwości przez *P. aeruginosa* zależna jest od mechanizmu „wyczuwania obecności” (ang. quorum sensing, QS), pełniącego rolę nadrzędną w kontroli ekspresji wielu genów. Wyczuwanie obecności innych bakterii odbywa się za pomocą wydzielanych do środowiska tzw. autoinduktorów (typu AHL lub AQ). Zależnie od ich stężenia w otoczeniu, komórka bakteryjna niejako monitoruje liczebność populacji. Jeżeli dojdzie do zmiany ilości AHL/AQ wskutek działania określonego czynnika środowiskowego, bakteria poprzez wyrażanie konkretnych genów dostosowuje się do zmieniających warunków (JAGUSZTYN-KRYNICKA 2012). QS jest kluczowe w procesie patogenezy *P. aeruginosa*, reguluje bowiem ekspresję zewnątrzkomórkowych proteaz, pomp wyrzutowych (ang. efflux), chelatorów jonów, a ponadto wpływa na ruchliwość i unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Ze względu na rolę jaką QS pełni u wielu bakterii patogennych, oprócz *P. aeruginosa*, także m.in. *S. aureus*, *S. enterica* czy *E. coli*, proces ten może stanowić atrakcyjny cel dla potencjalnych, nowych leków przeciwbakteryjnych (BALASUBRAMANIAN i współaut. 2013). W regulację ekspresji genów wirulencji *P. aeruginosa* zaangażowane są również inne mechanizmy, tworzące tzw. systemy dwuskładnikowe (ang. two-component system, TCS). W klasycznym wariantcie, pierwszym składnikiem takiego systemu jest związana z błoną komórkową kinaza histydynowa (ang. histidine kinase, HK), która odbiera określony sygnał ze środowiska zewnętrznego, drugim zaś regulator odpowiedzi (ang. response regulator, RR), zlokalizowany w cytoplazmie. Odebranie sygnału przez HK implikuje fosforylację RR, co z kolei powoduje zmianę jego konformacji i wiązanie się z odpowiednim regionem DNA (wówczas działa jako regulator procesu transkrypcji, zapobiegając lub umożliwiając przyłączenie się polimerazie RNA do DNA) lub konkretnym białkiem. Umożliwia to regulację ekspresji wybranych genów, a także zmianę aktywności enzymatycznej części białek, również tych współodpowiedzialnych za zjadliwość bakterii czy antybiotyko-

oporność (GOODERHAMAND i HANCOCK 2009). Jak już wspomniano, sieć regulatorowa *P. aeruginosa* jest bardzo rozbudowana; kodowana jest przez ok. 8% wszystkich genów. Dobrze obrazuje to też liczba TCS. Szczep laboratoryjny *P. aeruginosa* PAO1 może ich mieć nawet 127, podczas gdy *B. subtilis* ok. 70, a *E. coli* ok. 60. Ogółem *P. aeruginosa* posiada ponad 400 czynników transkrypcyjnych, 24 podjednostki  $\sigma$  polimerazy RNA i 34 sRNA (ang. small RNA; cząsteczki RNA o funkcjach regulatorowych), których dokładna rola wciąż wymaga analizy doświadczalnej. Wszystkie te elementy tworzą niezwykle gęstą i zawiłą sieć powiązań funkcjonalnych (BALASUBRAMANIAN i współaut. 2013).

Omawiając tematykę wirulencji *P. aeruginosa*, trudno nie wspomnieć o wybitnej zdolności tego drobnoustroju do tworzenia biofilmu. Strukturę tę definiuje się jako osiadłe zbiorowisko komórek trwale związane z podłożem, otoczone matriks zewnątrzkomórkową (MARKIEWICZ 2012). Biofilmy ograniczają dostęp cząsteczek antybiotyków do komórek bakterii, przez co mogą być one nawet 1000 razy bardziej odporne na działanie antybiotyków niż formy planktonowe (SCHUREK i współaut. 2012). Ponadto, biofilm chroni je też przed działaniem dezynfektantów i odpowiedzią immunologiczną. Proces tworzenia biofilmu jest wieloetapowy i skomplikowany pod względem regulacji i uczestniczą w nim liczne efekторы zjadliwości, włączając w to egzopolisacharydy (Pel, Psl, alginian), piowerdynę, biosurfaktant - ramnolipid, pozakomórkowy DNA (eDNA) czy pile typu IV (PT4), rzęskę, i fimbrie typu Cup (WEI i MA 2013). Podczas formowania biofilmu dochodzi do różnicowania profilu ekspresji różnych genów (SAUER i współaut. 2002), a ponadto, istnieje zależność składu proteomu komórek znajdujących się w obrębie biofilmu od rodzaju podłoża, na którym on powstaje (MARKIEWICZ 2012). Obecność biofilmów jest szczególnie niebezpieczna na powierzchni przyrządów medycznych, takich jak cewniki, rurki intubacyjne i tracheostomijne, wenflony, rozruszniki lub endoprotezy. *P. aeruginosa* jest w stanie rosnąć w formie biofilmu również bezpośrednio na powierzchni ran oparzeniowych i uważa się, że właśnie *P. aeruginosa* tworzący biofilm jest odpowiedzialny za zakażenia u pacjentów z mukowiscydozą. Biofilm jest więc jedną z cech zakażenia przewlekłego (SCHUREK i współaut. 2012).

## OPORNOŚĆ NATURALNA I MUTACYJNA

Palczki *P. aeruginosa* są naturalnie odporne na wiele zróżnicowanych strukturalnie antybiotyków. Dotyczy to części

$\beta$ -laktamów (benzylpenicyliny, penicyliny izoksazolilowe, aminopenicyliny i ich połączenia z inhibitorami  $\beta$ -laktamaz, cefalosporyny I i II generacji), tetracyklin i tygecykliny, chloramfenikolu oraz trimetoprimu. Co więcej, w porównaniu z przedstawicielami rodziny Enterobacteriaceae, dzikie (ang. wild-type) szczepy *P. aeruginosa* odznaczają się mniejszą wrażliwością na antybiotyki, które są wobec nich aktywne. Zjawisko określa się mianem oporności naturalnej lub własnej (ang. intrinsic resistance) *P. aeruginosa*. Wynika ono ze stosunkowo niskiej przepuszczalności błony zewnętrznej (ponad dwunastokrotnie mniejszej niż u *E. coli*), konstytutywnej ekspresji licznych pomp typu *efflux* i obecności chromosomowo kodowanych enzymów inaktywujących leki (STRATEVA i YORDANOV 2009, LISTER i współaut. 2009). W leczeniu zakażeń *P. aeruginosa* najczęściej stosuje się karboksypenicyliny (np. tikarcyliną) i ureidopenicyliny (np. piperacyliną) oraz ich połączenia z inhibitorami  $\beta$ -laktamaz, niektóre cefalosporyny III i IV generacji (np. ceftazydym, cefepim), aztreonam, karbapenemy (np. imipenem, meropenem), a także fluorochinolony (ciprofloksacyna, lewofloksacyna), aminoglikozydy (amikacyna, gentamicyna, tobramycyna) oraz polimyksyny (np. kolistyna) (STRATEVA i YORDANOV 2009).

Jak wspomniano wyżej, w chromosomie *P. aeruginosa* kodowanych jest kilka enzymów zdolnych inaktywować antybiotyki. Najistotniejszym klinicznie jest  $\beta$ -laktamaza klasy C, tzw. cefalosporynaza AmpC, mająca odpowiedniki m. in. u różnych przedstawicieli Enterobacteriaceae (BREIDENSTEIN i współaut. 2011). Podobieństwa zasadzają się w strukturze i właściwościach tych enzymów oraz regulacji ich ekspresji. Spektrum substratowe AmpC obejmuje zdecydowaną większość  $\beta$ -laktamów, w tym wszystkie penicyliny, niemal wszystkie cefalosporyny i monobaktamy (aztreonam), a więc liczne antybiotyki stosowane w terapii zakażeń *P. aeruginosa*. Jedynie cefalosporyny IV generacji (np. cefepim) i karbapenemy (z wyjątkiem ertapenemu) praktycznie nie są rozkładane przez AmpC. Ponadto, enzymy te są w nikłym stopniu hamowane przez inhibitory  $\beta$ -laktamaz (zwłaszcza kwas klawulanowy). Dzikie szczepy *P. aeruginosa* wytwarzają AmpC w sposób kontrolowany, tzn. wyłącznie w obecności związku zdolnego indukować ekspresję genu *ampC*, kodującego enzym. Ilości AmpC, powstające w czasie indukcji są bardzo duże, przy czym jest to zjawisko odwracalne i poza stanem indukcji ekspresja cefalosporynazy zachodzi na bardzo niskim, śladowym poziomie. Z punktu widzenia fenotypu lekooporności, krytyczną kwestią pozostaje, które  $\beta$ -laktamy są dobry-

mi induktorami AmpC i jak się ma ta aktywność w stosunku do ich podatności na hydrolizę enzymatyczną. Większość znanych induktorów stanowią związki będące jednocześnie doskonałymi lub dobrymi substratami AmpC, czyli aminopenicyliny (np. ampicylina), cefalosporyny I generacji (np. cefalotylna) i cefalosporyny II generacji (np. cefoksytyna i cefuroksym). Przez to *P. aeruginosa* wykazuje naturalną oporność na te antybiotyki i jednocześnie ich połączenia z inhibitorami  $\beta$ -laktamaz (np. amoksycylinę z klawulanianem). Pozostałe  $\beta$ -laktamy, aktywne wobec *P. aeruginosa*, różnią się między sobą „zachowaniem” wobec cefalosporynazy AmpC i jej systemu regulacyjnego: karboksy- i ureidopenicyliny, cefalosporyny III generacji i aztreonam są substratami, ale już nie induktorami jej ekspresji, cefalosporyny IV generacji nie są ani induktorami, ani substratami, natomiast karbapenemy są induktorami, ale nie substratami (z wyjątkiem ertapenemu). W związku z tym, naturalna aktywność każdej z tych grup leków wobec *P. aeruginosa* wynika niejako z innych przyczyn (LISTER i współaut. 2009, BREIDENSTEIN i współaut. 2011). Do zaniku regulacji i konstytutywnego wytwarzania ponadnormalnych ilości AmpC dojść może wskutek mutacji w obrębie genów, których produkty uczestniczą w systemie regulacji ekspresji tej cefalosporynazy (geny *ampR*, *ampD*) (LISTER i współaut. 2009). Zjawisko to określa się mianem „derepresji” i w odróżnieniu od pałeczek Enterobacteriaceae, u *P. aeruginosa* może ono zachodzić trzystopniowo, z dwoma pierwszymi stadiami, przy których podstawowy poziom ekspresji AmpC jest coraz bardziej podwyższony w stosunku do układu dzikiego, ale który nadal jest indukowalny do poziomu maksymalnego (derepresja częściowa). Dopiero ostatnie stadium oznacza w pełni konstytutywną ekspresję, na poziomie wyższym nawet niż w stanie indukcji (derepresja całkowita) (CAMPBELL i współaut. 1997). Zjawisko to zostało wyjaśnione obecnością w genomie *P. aeruginosa* trzech genów *ampD*, kodujących amidazę związaną z metabolizmem peptydoglikanu, której mutacyjna utrata jest najczęstszą przyczyną derepresji AmpC (JUAN i współaut. 2006). W stanie całkowitej derepresji w pełni ujawnia się fenotypowo omówione wyżej spektrum substratowe AmpC, będące jednym z najszerszych wśród  $\beta$ -laktamaz, a wytwarzana w tak dużej ilości cefalosporynaza jest w stanie nadać szczepowi wysoką oporność nawet na antybiotyków stanowiący dla niej niedoskonały substrat (np. ceftazydym lub aztreonam). Co więcej, w sytuacji derepresji AmpC i jednoczesnego obniżenia przepuszczalności błony zewnętrznej, oporność ta



może dotyczyć nawet tych związków, które praktycznie nie są zaliczane do substratów AmpC (cefepim, imipenem, meropenem) i szczep może się okazać oporny na wszystkie leki  $\beta$ -laktamowe. Derepresja AmpC jest często spotykanym mechanizmem oporności wśród izolatów klinicznych *P. aeruginosa* (ok. 20%) (OLIVER i współaut. 2015). Wartym uwagi jest też fakt identyfikacji najpierw u *E. coli*, a potem u *P. aeruginosa*, wariantów AmpC o rozszerzonym spektrum substratowym (ang. extended-spectrum AmpC, ESAC). Enzymy te, zawierające substytucję aminokwasową w określonej pozycji (T105A), posiadają podwyższoną zdolność hydrolizy cefalosporyn (ceftazydymu, cefepimu) oraz karbapenemów (imipenemu, meropenemu) i powodują obniżenie wrażliwości na te leki, zwłaszcza w stanie całkowitej derepresji. Stanowią też doskonale tło do dalszego rozwoju oporności, w miarę nabywania innych mechanizmów (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ i współaut. 2009). W ostatnim czasie opisano inne warianty sekwencyjne AmpC, których ekspresja obniża wrażliwość na najnowszą cefalosporynę skierowaną przeciw *P. aeruginosa*, zaliczany do tzw. V generacji ceftolozan (BERRAZEG i współaut. 2015). Do tej pory jednak, szczepom wytwarzającym ESAC nie przypisuje się istotnej roli epidemiologicznej i klinicznej.

AmpC nie jest jedynym chromosomalnie kodowanym, naturalnym enzymem *P. aeruginosa* zdolnym do hydrolizy  $\beta$ -laktamów, bowiem geny dwóch innych, PoxB (OXA-50) oraz PIB-1, zidentyfikowano w obrębie sekwencji genomowych tego gatunku. Żaden z nich zdaje się nie pełnić istotnej roli w oporności *P. aeruginosa* na antybiotyki. PIB-1 jest cynko-zależnym enzymem, którego nie da się zakwalifikować do żadnej z czterech znanych obecnie klas strukturalnych  $\beta$ -laktamaz. Wykazano że, PIB-1 posiada aktywność względem imipenemu, a delecja jego genu podwyższa wrażliwość badanego szczepu *P. aeruginosa* na karbapenemy (imipenem i meropenem) (FAJARDO i współaut. 2014). Druga z wymienionych  $\beta$ -laktamaz, PoxB, jest produkowana na bardzo niskim poziomie, prawdopodobnie nie warunkując oporności na żaden  $\beta$ -laktam. Jak inne enzymy klasy D (oksacylinazy), hydrolizuje penicyliny, a niektóre doświadczenia zasugerowały też jej niewielką aktywność w stosunku do karbapenemów; niemniej, pełna specyficzność substratowa PoxB (OXA-50) pozostaje niecałkowicie sprecyzowana (ZINCKE i współaut. 2016).

Wraz z transportem aminokwasów, peptydów lub cukrów do komórki bakterii Gram-ujemnej mogą wnikać antybiotyki, np. fluorochinolony czy  $\beta$ -laktamy. Utrata, zmia-

na struktury lub obniżenie ekspresji konkretnego kanału porynowego (poryny), przez który dany lek dostaje się do wnętrza komórki jest przewidywalnym mechanizmem oporności. Nie inaczej jest w przypadku poryny OprD *P. aeruginosa*, przez którą transportowane są karbapenemy. Brak funkcjonalnych kanałów OprD lub ich zredukowana liczba nadaje oporność lub obniżoną wrażliwość na imipenem i w mniejszym stopniu meropenem. Zmniejszona ekspresja lub utrata w wyniku mutacji kanałów OprD była pierwszym rozpoznany mechanizmem oporności na karbapenemy. Co więcej, to właśnie tego rodzaju mechanizmy selekcjonowane są najczęściej podczas leczenia tą klasą  $\beta$ -laktamów. Warto pamiętać, że mechanizmy związane z OprD samodzielnie nadają oporność na niskim poziomie i dopiero kombinacja z innymi wyraża się w oporności wysokiego stopnia i jednocześnie szeroko spektralnej (LI i współaut. 2012). O ile utrata OprD wskutek mutacji typu *non-sense* w genie *oprD*, jego delecji lub dysrupcji przez element transpozycyjny jest kwestią wyjaśnioną, o tyle konsekwencje licznych innych polimorfizmów w jego strukturze już nie i wymagają one szczegółowych badań. Podobnie jest z regulacją ekspresji OprD. Wiadomo na przykład, że nadprodukcja systemu pompowo-porynowego MexEF-OprN powoduje jednocześnie obniżenie lub zatrzymanie ekspresji genu *oprD*. Odpowiedzialne są za to, pośrednio lub bezpośrednio, czynniki regulatorowe: MexT, MexS oraz MvaT, jednak ich wzajemne oddziaływanie z MexEF-OprN i OprD jest niejasne, doświadczenia zaś z mutantami w poszczególnych genach nie dostarczyły jednoznacznych odpowiedzi (LISTER i współaut. 2009).

Redukcja stężenia antybiotyku w komórce może być także zasługą aktywności transbłonowych pomp, które aktywnie wyrzucają lek z wnętrza bakterii. Pompy typu *efflux* podzielono na pięć kategorii, różniących się strukturą, rodzajem zużywanej energii do transportu i typem przenoszonych substratów. Dane pochodzące z sekwencjonowania genomowego *P. aeruginosa* wykazują, że najbardziej rozpowszechnioną grupą są transportery (systemy pompowo-porynowe) RND (ang. resistance, nodulation, division), obejmująca 12 systemów, z których co najmniej cztery uczestniczą w antybiotykooporności (LISTER i współaut. 2009). Wszystkie one posiadają szerokie spektrum substratowe, stanowiące m. in. źródło naturalnej oporności *P. aeruginosa* na tetracykliny, trimetoprim, chloramfenikol, nowobiocynę, czy sulfonamidy. Spektrum to obejmuje jednak też antybiotyki skuteczne wobec *P. aeruginosa*, w tym  $\beta$ -laktamy, aminogli-

kozydy i fluorochinolony. Warto pamiętać, że zakresy usuwanych przez poszczególne pompy substratów zachodzą na siebie. Najistotniejszy system, MexAB-OprM, jest aktywny zarówno wobec różnorodnych antybiotyków  $\beta$ -laktamowych (w tym meropenemu i inhibitorów  $\beta$ -laktamaz), fluorochinolonów, a także dezynfektantów i detergentów. Pompa ta w dużej mierze przyczynia się do całokształtu fenotypu oporności własnej *P. aeruginosa*. Pozostałe transportery leków: MexCD-OprJ, MexEF-OprN i MexXY-OprM, oprócz wyrzucania fluorochinolonów mogą też usuwać cefepim (MexCD-OprJ) lub aminoglikozydy (MexXY-OprM) (LISTER i współaut. 2009, POOLE 2011). Wskutek mutacji (delecje, insercje) zachodzących w obrębie genów regulujących ekspresję wymienionych pomp RND, ich aktywność może zostać znacząco zwiększona. Tak dzieje się w przypadku np. mutantów delecyjnych  $\Delta$ nalB,  $\Delta$ nalC i  $\Delta$ nalD, u których stwierdzono nadekspresję MexAB-OprM. Ten profil oporności mutacyjnej, obejmujący obniżoną wrażliwość na różne  $\beta$ -laktamy, w tym meropenem, oraz fluorochinolony, występuje najczęściej, bo u 10-30% szczepów klinicznych *P. aeruginosa*. Stosunkowo często identyfikuje się też podwyższenie ekspresji pompy MexXY-OprM, wynikające z mutacyjnej inaktywacji represora MexZ i warunkujące tzw. nieenzymatyczną oporność na aminoglikozydy. Obecność szczepów *P. aeruginosa* nadprodukcujących MexXY-OprM jest charakterystyczna u pacjentów z mukowiscydozą (LISTER i współaut. 2009). Dużo mniejszy udział w oporności typu *efflux* u *P. aeruginosa* ma nadekspresja pozostałych pomp: MexCD-OprJ (mutanty  $\Delta$ nfxB; niewrażliwość na cefepim i fluorochinolony) i MexEF-OprN ( $\Delta$ mexT; niewrażliwość na fluorochinolony) (POOLE 2011). Warto nadmienić, że poziomy nabytej oporności, wynikającej z mutacyjnego podwyższenia aktywności pomp RND są stosunkowo niskie i z reguły nie pozwalają zakwalifikować szczepu jako opornego w sensie klinicznym. Jednak różne mutacje regulatorowe ulegają akumulacji i często towarzyszą innym mechanizmom oporności, takim jak utrata OprD, derepresja AmpC lub wytwarzanie enzymów kodowanych przez geny nabyte z zewnątrz. Wówczas w istotny sposób „dokładają” się one do ewidentnej oporności szczepu na różnorodne leki przeciwbakteryjne.

#### OPORNOŚĆ KODOWANA PRZEZ GENY NABYTE

Same już naturalne mechanizmy wraz z towarzyszącymi im mutacjami czynią *P. aeruginosa* trudnym do zwalczania patogenem i

w przeważającej mierze to one decydują o zjawisku jego wielooporności. Jednakże, jak wspomniano wcześniej, tak kodowana oporność stanowi też doskonale tło dla nabywanych z zewnątrz, kolejnych mechanizmów; „współpraca” obu tych źródeł poszerza profile i wydatnie podwyższa poziomy oporności. Za nabywanie nowych cech, głównie w postaci enzymów inaktywujących aminoglikozydy i  $\beta$ -laktamy odpowiedzialny jest HGT (FROST i współaut. 2005), zachodzący przede wszystkim za pomocą plazmidów. Wskazują na to liczne obserwacje obecności u *P. aeruginosa* różnych determinant oporności na plazmidach (POIREL i współaut. 2000, 2001; AUBERT i współaut. 2001; GIRLICH i współaut. 2002; FIETT i współaut. 2006; GARZA-RAMOS i współaut. 2008), przy czym bardzo częstym zjawiskiem jest również ich lokalizacja chromosomalna (NORDMANN i współaut. 1993, PHILIPPON i współaut. 1997, DUBOIS i współaut. 2002, GIRLICH i współaut. 2002, FIETT i współaut. 2006, JOVČIĆ i współaut. 2013), do której zapewne dochodzi w drodze rekombinacji, transpozycji lub integracji plazmidów (CHIU i THOMAS 2004). Niestety, sam proces transferu, jak i zaangażowane weń elementy genetyczne u *Pseudomonas* spp. nie są tak dobrze poznane jak u *Enterobacteriaceae*. Ten niejasny aspekt genetyki *P. aeruginosa* ulega jednak stopniowemu wyjaśnianiu w związku z rozwojem technik sekwencjonowania genomowego i zwiększaniem się liczby znanych sekwencji chromosomowych i plazmidowych tego gatunku (BORONIN 1992, HAINES i współaut. 2007, SEVASTSYANOVICH i współaut. 2008, BONNIN i współaut. 2013, XIONG i współaut. 2013, MARCHIARO i współaut. 2014, VILACOBIA i współaut. 2014).

Tak nabytą oporność *P. aeruginosa* na  $\beta$ -laktamy warunkują  $\beta$ -laktamazy. Już pod koniec lat 60. ubiegłego wieku zaczęto identyfikować te enzymy i przypisywać im rolę w procesie szerzącej się oporności na stosowane ówczesnie penicyliny oraz cefalosporyny (LIVERMORE 1998). Należy tutaj wymienić takie  $\beta$ -laktamazy jak np.: PSE-1/CARB-2, PSE-4/CARB-1, CARB-3 czy CARB-4 (ang. *Pseudomonas*-specific enzyme lub carbencillinase; cyfra określa wariant enzymu), początkowo uznawane za typowe dla *P. aeruginosa*, które rozkładają karboksypenicyliny i ureidopenicyliny (BUSH i współaut. 1995). Enzymy te, obecnie określane jako karbenicylinazy, należą do klasy A  $\beta$ -laktamaz i wrażliwe są na działanie inhibitorów, np. kwas klawulanowy lub tazobaktam (BUSH i JACOBY 2010). Ponadto, już we wczesnej fazie prac identyfikowano też u *P. aeruginosa* inne nabyte  $\beta$ -laktamazy o aktywności skierowanej głównie przeciw penicylinom. Należą

do nich tzw.  $\beta$ -laktamazy o szerokim spektrum substratowym (ang. broad-spectrum  $\beta$ -lactamases) klasy A TEM-1 i TEM-2, obserwowane przede wszystkim u Enterobacteriaceae, oraz oksacylinazy (ang. oxacillinases) klasy D: OXA-2, OXA-5 lub OXA-10 (BUSH i JACOBY 2010, POIREL i współaut. 2010).

W 1983 r. świat obiegła wiadomość o identyfikacji pierwszego enzymu z nowej grupy, tzw.  $\beta$ -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (ang. extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, ESBL), zidentyfikowanego u Enterobacteriaceae. Należą one do klasy A i stanowią dominujący czynnik oporności na oksymino- $\beta$ -laktamy (cefalosporyny III i IV generacji, aztreonam) u pałeczek jelitowych (GNIADKOWSKI 2001). Obecnie wyróżnia się 12 rodzin nabytych ESBL, z czego przedstawiciele aż ośmiu typów zdołano już odnaleźć w izolatach klinicznych *P. aeruginosa*. Pierwszym i jak dotąd najpowszechniej występującym u tego gatunku enzymem typu ESBL jest PER-1, opisany pierwszy raz w 1993 r. (NORDMANN i współaut. 1993). Szczepy wytwarzające PER-1 zidentyfikowano początkowo w Turcji, później również stwierdzano ich obecność w szpitalach w Europie, Azji i północnej Afryce. *Pseudomonas aeruginosa* wraz z *Acinetobacter baumannii* pozostają do dziś głównymi producentami PER-1 (POTRON i współaut. 2015). Inną grupą ESBL występującą stosunkowo często u *P. aeruginosa* są enzymy VEB, zidentyfikowane w 1998 r., najpierw w Azji południowo-wschodniej, potem również w Europie (POTRON i współaut. 2015). Kolejnymi ESBL zaobserwowanymi wcześniej u *P. aeruginosa* są  $\beta$ -laktamazy typu GES/IBC, występujące głównie w Europie i Ameryce Łacińskiej, także u Enterobacteriaceae (POTRON i współaut. 2015). Wreszcie, odnalezione w Belgii po raz pierwszy enzymy typu BEL i PME-1 pochodzenia azjatyckiego, jak do tej pory zidentyfikowano niemal wyłącznie u *P. aeruginosa* (POTRON i współaut. 2015). Co ciekawe, inne, dominujące u Enterobacteriaceae rodziny ESBL, tj. CTX-M, SHV i TEM, są rzadkie u *P. aeruginosa*. Geny kodujące ESBL częściej obserwowane u *P. aeruginosa* lokują się w obrębie transpozonów ( $bla_{PER-1}$  w Tn1213) lub integronów klasy 1 o różnorodnej strukturze ( $bla_{GES}$ ,  $bla_{VEB}$ ,  $bla_{BEL}$ ). Wymienione elementy genetyczne znajdują się zarówno na plazmidach, jak i w chromosomie, a czasem w obu miejscach jednocześnie (POTRON i współaut. 2015). Inną grupą enzymów zdolnych do rozkładu oksymino- $\beta$ -laktamów są oksacylinazy (OXA) o rozszerzonym spektrum substratowym klasy D, ES-OXA (ang. extended-spectrum oxacillinases). W odróżnieniu do ESBL, aktywność większości ES-OXA jest słabo hamowana

przez kwas klawulanowy. Co ciekawe, ES-OXA są charakterystyczne niemal wyłącznie dla *P. aeruginosa*, a pierwsze enzymy tego typu, OXA-14 i OXA-15, zidentyfikowano na początku lat 90. (DANEL i współaut. 1995, 1997). W sensie strukturalnym, niemal wszystkie ES-OXA można zaklasyfikować do trzech linii ewolucyjnych, wywodzących się od zwykłych oksacylinaz OXA-1, OXA-2 i OXA-10, i kodowane są one przez kasety integronów klasy 1 (POIREL i współaut. 2010). Uważa się, że u *P. aeruginosa* jest to częściej występujący mechanizm oporności od ESBL, niemniej, brakuje wiarygodnych danych w tym zakresie, pochodzących z większej liczby krajów. Powodem są trudności diagnostyczne; zarówno ESBL, jak i ES-OXA mogą być skutecznie maskowane przez nadproduktowaną cefalosporynazę AmpC. Ponadto, dla ES-OXA nie istnieje żaden specyficzny test fenotypowy i jedyną metodą wiarygodnego wykrycia takiego enzymu jest amplifikacja i zsekwencjonowanie jego genu (LIVERMORE 1998, POTRON i współaut. 2015).

Spośród wszystkich nabytych  $\beta$ -laktamaz, najistotniejszą rolę w zjawisku antybiotykooporności *P. aeruginosa* pełnią metallo- $\beta$ -laktamazy klasy B (ang. metallo- $\beta$ -lactamases, MBL). Stanowią one odrębną i odległą od pozostałych gałąź drzewa ewolucyjnego  $\beta$ -laktamaz, charakteryzując się specyficzną strukturą i mechanizmem działania katalitycznego. Jako jedyne  $\beta$ -laktamazy, wymagają one obecności kofaktora w postaci jonów  $Zn^{2+}$ . Podobnie jak AmpC, ESBL i ES-OXA, MBL cechuje bardzo szerokie spektrum substratowe, obejmujące wszystkie penicyliny, cefalosporyny i karbapenemy, a ponadto enzymy te są całkowicie niewrażliwe na dostępne, możliwe do stosowania klinicznego inhibitory. Spośród wszystkich antybiotyków  $\beta$ -laktamowych tylko aztreonam nie jest hydrolizowany przez MBL. Szczególnie niepokojąca jest wysoka aktywność tych  $\beta$ -laktamaz względem karbapenemów, określanych jako leki ostatniej szansy w leczeniu zakażeń wywołanych przez wielooporne szczepy pałeczek Gram-ujemnych (POTRON i współaut. 2015). W badaniach laboratoryjnych wykazano, że mimo tej aktywności, sama ekspresja MBL na typowym poziomie nie warunkuje jeszcze oporności wysokiego stopnia i do tego potrzebne jest „wsparcie” dodatkowych mechanizmów. Ponieważ jednak, jak wspomniano wyżej, u *P. aeruginosa* często dochodzi do różnych mutacji powodujących ograniczenie przepuszczalności osłon komórkowych lub podwyższenie aktywności pomp typu *efflux*, szczepy kliniczne tego gatunku posiadające MBL z reguły są wysoce odporne na stosowane kli-

nicznie karbapenemy (imipenem, meropenem i doripenem). Po raz pierwszy szczepy MPPA (ang. MBL-producing *P. aeruginosa*) zidentyfikowano w 1988 r. w jednym z japońskich szpitali, po czym w ciągu kilku lat zdołały się one rozprzestrzenić, najpierw w Japonii, a następnie w innych krajach Dalekiego Wschodu. Równocześnie następował międzygatunkowy transfer tego typu oporności i np. od 1993 r. obserwowano tam już także pałeczki Enterobacteriaceae wytwarzające MBL. W Europie pierwsze szczepy *P. aeruginosa* MBL(+) izolowano w latach 1996-1997 we Francji i Włoszech, i niemal natychmiast potem w kilkunastu innych krajach (WALSH i współaut. 2005). Do tej pory zidentyfikowano 13 rodzin nabytych MBL, niektóre posiadające nawet po kilkadziesiąt wariantów. Są to enzymy: IMP (n=56), VIM (n=47), NDM (n=16), SPM, GIM, SIM, AIM, KHM, DIM, TMB, SMB, FIM, LMB. U *P. aeruginosa* stwierdzono obecność większości z nich, a niektóre występują wyłącznie u tego gatunku jak do tej pory. Najstarszymi, najbardziej wewnętrznie zróżnicowanymi i najczęściej identyfikowanymi typami MBL są enzymy VIM i IMP. Ich producentów obserwuje się na całym świecie, przy czym IMP są bardziej rozprzestrzenione i typowe dla Azji, podczas gdy VIM dominują na pozostałych kontynentach, w tym w Europie (POTRON i współaut. 2015). Pomimo skutecznej „penetracji” populacji pałeczek Enterobacteriaceae przez determinanty genetyczne IMP i VIM, *P. aeruginosa* pozostaje najważniejszym ich producentem, co ostatnio ponownie wykazały badania typu *surveillance*, wykonane na dużej próbie szpitalnych szczepów bakterii Gram-ujemnych z 40 krajów. Okazało się, że *P. aeruginosa* stanowił 68% wszystkich poddanych analizie szczepów MBL(+) (głównie z enzymami IMP i VIM) (KAZMIERCZAK i współaut. 2015). Szerzące się w szybkim tempie wśród Enterobacteriaceae MBL z rodziny NDM odnotowywane są w szczepach *P. aeruginosa* w niektórych krajach, niemniej na nieporównanie mniejszą skalę niż u pałeczek jelitowych. Ich częstość u *P. aeruginosa* jest jak na razie niewielka, zwłaszcza w porównaniu z IMP i VIM (JOVČIĆ i współaut. 2013, POTRON i współaut. 2015).

Częstość występowania MBL w populacjach szpitalnych *P. aeruginosa* wykazuje wielkie różnice między krajami, od wartości bliskich zera w krajach skandynawskich, do ok. 3% w Hiszpanii i aż ok. 30% w Rosji i Korei. Podobnie waha się udział MBL w całkowitej oporności na karbapenemy u *P. aeruginosa*, z wartościami takimi jak ok. 7% w Hiszpanii i ok. 40% w Rosji i Korei (RIERA i współaut. 2011, EDELSTEIN i współaut. 2013, BAE i współaut. 2014, HONG i

współaut. 2015). Zasadniczo można przyjąć, że MBL należą do najczęstszych nabytych  $\beta$ -laktamaz u *P. aeruginosa*, prawdopodobnie przewyższając pod tym względem ESBL i ES-OXA w różnych krajach. Analiza genetycznego kontekstu występowania genów MBL wykazuje, że w większości rodzin, w tym IMP i VIM, są to integrony, najczęściej klasy 1, o wielkiej różnorodności strukturalnej. Spośród enzymów bardziej typowych dla *P. aeruginosa* wyjątek stanowi gen *bla*<sub>SPM-1</sub>, zlokalizowany w module transpozycyjnym z sekwencją *ISCR4* i wraz z nim w elemencie typu ICE (FONSECA i współaut. 2015). Podobnie jak w przypadku innych nabytych genów oporności *P. aeruginosa*, geny MBL mogą lokować się w plazmidowym lub chromosomalnym DNA (WALSH i współaut. 2005, POTRON i współaut. 2015). Szczepy MPPA powszechnie uważane są za jedne z najgroźniejszych obecnie patogenów szpitalnych (ang. alert pathogens). Inne nabyte karbapenemazy, takie jak enzymy KPC klasy A (ang. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) i oksacylinazy CHDL klasy D (ang. carbapenem-hydrolysing class D  $\beta$ -lactamases), które wraz z MBL są obecnie jednymi z najważniejszych mechanizmów oporności bakterii chorobotwórczych, u *P. aeruginosa* występują rzadko lub wręcz sporadycznie i jak dotąd w określonych regionach świata (POTRON i współaut. 2015).

Oprócz  $\beta$ -laktamaz, *P. aeruginosa* bardzo często nabywa geny enzymów modyfikujących inną klasę antybiotyków, aminoglikozydy (ang. aminoglycoside-modifying enzymes, AME). AME tworzą niezwykle zróżnicowaną grupę o różnych mechanizmach działania. Ze względu na sposób inaktywacji aminoglikozydu, enzymy te dzieli się na trzy podgrupy: acetylotransferazy (AAC), nukleotydylotransferazy (ANT) oraz fosfotransferazy (APH). Wśród nich wyróżnia się jeszcze wiele podrodziny, w każdej z nich zaś znaleźć można po kilka odmiennych wariantów. U *P. aeruginosa* najczęściej występują podrodziny AAC(3), AAC(6') oraz ANT(2''), o zróżnicowanej aktywności wobec gentamycyny, tobramycyny i amikacyny (POOLE 2005). Geny AME występują w formie kaset integronowych i bardzo często lokują się wraz z genami określonych  $\beta$ -laktamaz w obrębie tych samych integronów, przez co elementy te są jednym z głównych źródeł zjawiska wielooporności *P. aeruginosa*. Dodatkowym mechanizmem oporności na aminoglikozydy są niedawno odkryte, w tym u *P. aeruginosa*, metylazy 16S rRNA. Z rosnącej ich listy, enzymy ArmA, RmtA, RmtC, RmtD i RmtF zidentyfikowano już u tego gatunku w kilku krajach świata (POTRON i współaut. 2015, RAHMAN i współaut. 2015). Metylazy 16S

rRNA modyfikują cel działania aminoglikozydów, jakim jest podjednostka 30S rybosomu (KOS i współaut. 2015).

Oporność na fluorochinolony, wynikająca z obecności dodatkowych genów, występuje bardzo rzadko u *P. aeruginosa* w porównaniu z Enterobacteriaceae. Do tej pory zidentyfikowano zaledwie kilka przypadków obecności enzymu AAC(6<sup>7</sup>)-Ib-cr, będącego wariantem AME i zdolnego oprócz aminoglikozydów inaktywować również niektóre fluorochinolony (KOS i współaut. 2015). Ponadto, niedawno odkryto u *P. aeruginosa* nowy enzym nadający oporność na te chemioterapeutyki, QnrVC-1. Wykazał on homologie sekwencji z chromosomowo kodowanym genem oporności na fluorochinolony znalezionym u przedstawicieli rodziny Vibrionaceae (BELOTTI i współaut. 2015).

### STRUKTURA POPULACJI *P. AERUGINOSA*

Globalna populacja *P. aeruginosa*, w tym szczepy odpowiedzialne za zakażenia w środowisku szpitalnym, określana jest jako zasadniczo nieklonalna, czyli składająca się z wielkiej liczby odrębnych, niespokrewnionych ze sobą bliżej genotypów. Ta duża zmienność genetyczna w obrębie populacji przypisywana jest głównie wysokiej częstości zjawisk rekombinacji u *P. aeruginosa*. Niemniej, zwłaszcza wśród szczepów szpitalnych, można wyróżnić stosunkowo niewielką grupę rozprzestrzeniających się epidemicznie lub wręcz pandemicznie klonów, które stopniowo różnicując się w drodze mutacji tworzą grupy lub kompleksy klonalne blisko spokrewnionych genotypów. Rozwijająca się intensywnie genomika pozwala identyfikować stopniowo markery charakterystyczne dla poszczególnych kładów i są wśród nich zarówno geny pewnych czynników zjadliwości, jak i, przede wszystkim, geny oporności. Zwłaszcza te ostatnie muszą znacznie wpływać na szczególną zdolność adaptacji tych klonów do środowiska szpitalnego. Dane z zakresu epidemiologii molekularnej donoszą o niezwykle wprost stopniu akumulacji oporności nabytej w niewielkiej liczbie klonów *P. aeruginosa*, które obserwowane są na całym lub niemal całym świecie jako czynniki zakażeń szpitalnych. Dotyczy to głównie klonów ST235 i ST111 (ang. sequence type; typ sekwencyjny) oraz ich kompleksów lub grup klonalnych. Posiadają one niezwykle zdolność do gromadzenia oporności, zarówno mutacyjnej, jak i wynikającej z nabywania genów, przez co należące do nich szczepy z reguły wykazują fenotypy MDR, XDR, a nawet PDR. Klon ST235 został najpierw zidentyfikowany w Rosji, na Węgrzech

i w Polsce, gdzie też po raz pierwszy został opisany, i szybko utożsamiony z obserwowanym wcześniej w Europie tzw. wieloopornym serotypem *P. aeruginosa* O11 (EMPEL i współaut. 2007, OLIVER i współaut. 2015). ST235 potrafi dominować wśród szczepów klinicznych o fenotypach MDR-XDR-PDR w skali całego kraju, np. w Japonii (58,5%) (KITAO i współaut. 2012), Chorwacji (40,8%) (GUZVINEC i współaut. 2014) lub Czechach (18%) (NEMEC i współaut. 2010). U przedstawicieli tego typu sekwencyjnego odnaleziono wszystkie znane do tej pory geny nabytej oporności *P. aeruginosa*, obecne w ponad 100 elementach genetycznych, w tym 39 różnych  $\beta$ -laktamaz (OLIVER i współaut. 2015). ST235 jest głównym producentem ESBL PER-1 w skali międzynarodowej (EMPEL i współaut. 2007, LIBISCH i współaut. 2008) oraz MBL z rodzin IMP i VIM, kodowanych przez ponad 50 różnych integronów (OLIVER i współaut. 2015). W latach 2002-2010 w Rosji doszło do niezwykle spektakularnego rozprzestrzenienia się ST235 z enzymem VIM-2 na terenie całego kraju. O ile na początku tego okresu stanowił on ok. 7,5% szczepów opornych na karbapenemy, to pod koniec było to już ok. 38,0%. Warto nadmienić, że Rosja jest jednym z krajów o najwyższej częstości (75,3% w 2010 r.) opornych na karbapenemy *P. aeruginosa* (EDELSTEIN i współaut. 2013). Dane te doskonale ilustrują potencjał epidemiczny ST235; wraz z ST111, przeważającym wśród szczepów MDR-XDR-PDR w innych krajach, są one dzisiaj obiektami zakrojonych na szeroką skalę badań genomicznych, mających na celu pełne zrozumienie źródeł ich globalnego „sukcesu” ekologiczno-epidemiologicznego.

### TERAPIA ZAKAŻEŃ *P. AERUGINOSA* – NOWE NADZIEJE

W związku z rosnącą antybiotykoopornością w skali globalnej i cieniem, jaki rzuca to zjawisko na współczesną medycynę zakażeń, mnożą się wysiłki w celu opracowania nowych, skutecznych form zwalczania wieloopornych szczepów bakterii. Pole walki z najtrudniejszymi z punktu widzenia terapeutycznego zakażeniami *P. aeruginosa* typu MDR-XDR-PDR jest duże. Odpowiednio podjęta strategia wdrażania i stosowania nowych terapeutyków i nowatorskie wykorzystanie starszych pozwalają wierzyć, że pojedynk z tym ciężkozbrojnym przeciwnikiem okaże się na pewien czas zwycięski.

Można wyróżnić dwa główne założenia przy tworzeniu nowych leków i terapii przeciwko opornym szczepom *P. aeruginosa*. Pierwszym jest wyszukiwanie nowych antybiotyków, które mogłyby z powodzeniem

zastąpić te, które obecnie okazują się już nieskuteczne. W ostatnich latach kilka nowych leków przeciwbakteryjnych zostało lub niedługo zostanie wprowadzonych na rynek, aktywnych również wobec *P. aeruginosa*. Nowe wynalazki pojawiły się w grupie chinolonów (nemonoksacyna), cefalosporyn (cefzololan, ceftobiprol) oraz karbapenemów (tomopenem). Co więcej, wynaleziono nowe inhibitory  $\beta$ -laktamaz (awibaktam), które mogą zwiększyć skuteczność terapeutyczną dotychczas stosowanych  $\beta$ -laktamów (BASSETTI i współaut. 2011, 2013). Druga koncepcja zakłada opracowywanie związków, których celem są systemy regulacji ekspresji czynników wirulencji (tzw. leki przeciwpatogenne). Ich działanie może powodować obniżenie zjadliwości szczepu, co w konsekwencji może też zadecydować o spadku jego oporności na podawane antybiotyki (ALLEN i współaut. 2014). Dodatkowo, do leczenia wdraża się klasę adiuwantów, związków pomocniczych w terapii (WAGNER i współaut. 2016).

Wśród obiecujących cząsteczek o charakterze przeciwbakteryjnym znajduje się związek CHIR-090 oraz jego pochodne. Są to inhibitory deacetylazy N-acetyloglukozaminy (LpxC), enzymu zaangażowanego w syntezę lipidu A, krytycznego elementu błony zewnętrznej większości Gram-ujemnych bakterii. Testowana aktywność *in vitro* i *in vivo* przy zastosowaniu różnych modeli infekcji u zwierząt wskazuje, że pochodna CHIR-090 o nazwie LpxC-4 wykazuje dobre właściwości antybiotyczne. Osiągnięty wynik może kwalifikować ten inhibitor do badań przedklinicznych (TOMARAS i współaut. 2014). Ze względu na barierę, jaką stanowi mało przepuszczalna błona zewnętrzna *P. aeruginosa*, kluczowym zagadnieniem jest sposób dostarczenia antybiotyku do wnętrza komórki bakteryjnej. Innowacyjnym pomysłem jest zastosowanie strategii „molekularnych koni trojańskich”, jakimi mogą być naturalne lub syntetyczne siderofory. Wydzielane na zewnątrz, wychwytyują jony żelaza obecne w środowisku, wiążą je w kompleksy i wracają do komórki w drodze transportu aktywnego. Tę ostatnią właściwość postanowiono wykorzystać w celu dostarczenia leków przeciwbakteryjnych, tworząc koniugaty siderofor-antybiotyku. Po wejściu do komórki ulegają one dysocjacji, uwalniając lek (MISLIN i SCHALK 2014). Przykładem może być związek monosulfaktamu i meropenemu, znajdujący się w fazie I testów klinicznych. Do dalszej, II fazy badań klinicznych, kwalifikuje się cefalosporyna o właściwościach chelatujących S-649266 (www.clinicaltrials.gov; identyfikator: NCT02321800) (WAGNER i współaut. 2016). Ponadto, wykazano, że S-649266 jest mało podatna na działanie niektórych

$\beta$ -laktamaz należących do klasy A oraz B (NDM-1, VIM-2, IMP-1, KPC-3) (ITO-HORIYAMA i współaut. 2016). Duże nadzieje wiąże się też ze związkami galu (Ga). Pierwiastek ten jest dobrze znany dzięki zdolności naśladowania żelaza w układach żywych, nie pełniąc jednak tych samych funkcji. Zastępując jon żelaza w strukturze niektórych enzymów, gal jest w stanie zatrzymywać istotne dla komórki reakcje typu redoks, wpływać na konformację białek, a w efekcie na żywotność komórki. Wymienione właściwości galu mogą okazać się szczególnie przydatne dla intensywnie dzielących się, aktywnych metabolicznie komórek, takich jak komórki nowotworowe czy bakteryjne (BERNSTEIN 1998). Rola galu doceniono w leczeniu hiperkalcemii pojawiającej się w trakcie choroby nowotworowej (preparat Ganite®). W testach aktywności przeciwbakteryjnej substancja czynna Ganite®, Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> okazała się wysoce efektywna w stosunku do *P. aeruginosa*, włączając w to szczepy typu mukoidalnego (typowe dla pacjentów z mukowiscydozą) oraz szczepy wielolekooporne. Ponadto, u myszy chorych na mukowiscydozę podawany Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> skutecznie zredukował wywołane zakażeniem uszkodzenia płuc (KANEKO i współaut. 2007). Aktualnie podejmowana jest II faza badań klinicznych preparatu Ganite® u osób chorych na mukowiscydozę, którym towarzyszą przewlekłe zakażenia *P. aeruginosa* (www.clinicaltrials.gov; identyfikator NCT02354859). Niestety, stosowanie galu wzmacnia wytwarzanie czynników zjadliwości u *P. aeruginosa*, co może zaostrzyć przebieg zakażenia. Chcąc zachować dobre efekty terapeutyczne należałoby skoniugować je z lekami przeciwpatogennymi (GARCÍA-CONTRERAS i współaut. 2014). W latach 70. ubiegłego wieku stosowano powszechnie w wielu krajach aminoglikozyd arbekacynę, jednakże po 20 latach zaniechano jej używania. Oprócz potwierdzonej aktywności wobec bakterii Gram-dodatnich (np. MRSA) posiada ona także dobrą skuteczność w leczeniu zakażeń bakteriami Gram-ujemnymi, szczególnie *A. baumannii* czy *P. aeruginosa*. Co ważne, arbekacyna jest odporna na działanie wielu klas AME, dzięki czemu może być z powodzeniem stosowana wobec szczepów aminoglikozydoopornych. Analiza aktywności *in vitro* arbekacyny w połączeniu z aztreonamem pokazała, że kombinacja tych dwóch leków jest efektywna wobec szczepów MDR *P. aeruginosa* (MATSUMOTO 2014). Obecnie arbekacyna przechodzi I fazę testów klinicznych (www.clinicaltrials.gov; identyfikator: NCT02459158). Innym rozbudzającym nadzieję lekiem jest antybiotyk POL7080, należący do grupy peptydomimetyków. Lek ten przeszedł już II fazę badań klinicz-

nych (www.clinicaltrials.gov; identyfikator: NCT02096328). Mechanizm jego działania zasada się na modyfikacji procesu składania LPS i mógłby być stosowany szczególnie w leczeniu respiratorowego zapalenia płuc wywołanego przez *P. aeruginosa* (RAMIREZ-ESTRADA i współaut. 2016). Obecnie rozwijany jest projekt, którego celem jest opracowanie szczepionki przeciwko *P. aeruginosa*. Zespół austriacki pod kierownictwem Berndta Jilma niedawno dowiódł, że tworzona szczepionka, IC43 jest bezpieczna, przechodzi I fazę badań klinicznych (WESTRITSCHNIG i współaut. 2014), a obecnie trwają przygotowania do fazy II/III (www.clinicaltrials.gov; identyfikator: NCT01563263). Sukces tych prac umożliwiłby zwalczanie zakażeń przewlekłych, jednocześnie omijając ryzyko rozwijającej się antybiotykooporności u wywołujących je szczepów *P. aeruginosa*.

Lista innych potencjalnych leków, które w przyszłości mogą być stosowane w terapii *P. aeruginosa* MDR jest długa. Czytelnicy zaciekawieni tą materią zapoznać się mogą z pracami przeglądowymi, które ukazały się niedawno (BASSETTI i współaut. 2013, PAGE i BUSH 2014, CHENG i współaut. 2016, TANEJA i KAUR 2016, WAGNER i współaut. 2016). Pomimo, że duża część tych związków nie jest jeszcze wprowadzona do leczenia, nadzieję budzi dynamika, z jaką podejmowane są kolejne próby ich efektywności w terapii. Wydawać się więc może, że zagrożenie, jakie stanowi oporny patogen *P. aeruginosa*, może być już niedługo zażegnane. Niestety, samo wprowadzanie coraz nowszych leków nie wystarczy. Osiągnięcie sukcesu w walce ze szczepami opornymi jest możliwe tylko dzięki ciągle udoskonalanym systemom kontroli zakażeń, racjonalnej antybiotykoterapii, a także dokładnemu monitorowaniu zjawiska lekooporności. Bardzo ważna jest jej społeczna świadomość. Rozumiejąc wagę zagrożenia, jakie niesie ze sobą globalne zjawisko antybiotykkooporności, znając mechanizmy jej rozprzestrzeniania i zapobiegania, a wreszcie racjonalnie stosując nowoczesne leki przeciwbakteryjne nie musimy być skazani na powrót do ery przed-antybiotykowej.

#### Streszczenie

Występujące powszechnie i narastające zjawisko oporności na antybiotyki wśród bakterii chorobotwórczych jest jednym z największych wyzwań dzisiejszej medycyny zakażeń. Szczególnie zagrożenie stanowią zakażenia szpitalne wywołane przez wielooporne szczepy określonych gatunków, np. *Pseudomonas aeruginosa*. Jest to patogen oportunistyczny, odznaczający się opornością naturalną na kilka klas stosowanych antybiotyków. Dzięki wysokiej plastyczności genomu, obejmującej różnorodne mutacje funkcjonalne (strukturalne i regulacyjne) oraz pozyskiwanie obcego DNA, jest w stanie szybko adaptować się do niesprzyjających warunków środowiska. Szczególnie niepokoi zdolność nabywania

przez *P. aeruginosa* dodatkowych cech oporności, co w połączeniu z naturalnymi mechanizmami czyni ten patogen wybitnie trudnym do zwalczania. Bakteria ta jest w stanie wywoływać m. in. ostre zapalenie płuc, zakażenia łożyska krwi, skóry i tkanek miękkich (w tym ran operacyjnych i oparzeniowych). Jest również czynnikiem etiologicznym zakażeń przewlekłych, towarzyszących np. mukowiscydozie. Antybiotykami stosowanymi obecnie przeciwko zakażeniom *P. aeruginosa* są najczęściej cefalosporyny III i IV generacji, karbapenemy, fluorochinolony i aminoglikozydy. W związku z malejącą liczbą dostępnych, skutecznych opcji terapeutycznych pracuje się nad nowymi terapeutykami lub nowatorskim wykorzystywaniem dotąd już poznanych.

#### LITERATURA

- ALHAZMI A., 2015. *Pseudomonas aeruginosa* – Pathogenesis and Pathogenic mechanisms. Int. J. Biol. 7, 44-67.
- ALLEN R. C., POPAT R., DIGGLE S. P., BROWN S. P., 2014. Targeting virulence: can we make evolutionproof drugs? Nat. Rev. Microbiol. 12, 300-308.
- AMINOV R. I., 2010. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. Front. Microbiol. 1, 1-7.
- AUBERT D., POIREL L., BEN ALI A., GOLDSTEIN F.W., NORDMANN P., 2001. OXA-35 is an OXA-10-related  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. 48, 717-721.
- BAE I. K., SUH B., JEONG S. H., WANG K. K., KIM Y. R., YONG D., LEE K., 2014. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Korea producing  $\beta$ -lactamases with extended-spectrum activity. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 79, 373-377.
- BALASUBRAMANIAN D., SCHNEPER L., KUMARI H., MATHEE K., 2013. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. Nucleic Acid Res. 41, 1-20.
- BASSETTI M., GINOCCHIO F., MIKULSKA M., 2011. New treatment options against Gram-negative organisms. Crit. Care 15, 1-9.
- BASSETTI M., MERELLI M., TEMPERONI C., ASTILEAN A., 2013. New antibiotics for bad bugs: where are we? Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 12, 22.
- BELOTTI P. T., THABET L., LAFFARGUE A., ANDRE C., COULANGE-MAYONNOVE L., ARPIN C., MES-SADI A., M'ZALI F., QUENTIN C., DUBOIS V., 2015. Description of an integron encompassing blaVIM-2, qnrVC1 and genes encoding bacterial group II intron proteins in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. 70, 2237-2240.
- BERNSTEIN L. R., 1998. Mechanisms of therapeutic activity for gallium. Pharmacol. Rev. 50, 665-682.
- BERRAZEG M., JEANNOT K., NTSOGO ENGUENÉ V. Y., BROUTIN I., LOEFFERT S., FOURNIER D., PLESIA P., 2015. Mutations in  $\beta$ -Lactamase AmpC Increase Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Antipseudomonal Cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 6248-6255.
- BEZUIDT O. K. I., KLOCKGETHER J., ELSSEN S., ATTREE I., DAVENPORT C., TÜMMLER B., 2013. Intraclonal genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* clones CHA and TB. BMC Genomics 14, 416.

- BLAIR J., WEBBER M. A., BAYLAY A. J., OGBOLU D. O., PIDDOCK L. J. V., 2015. *Molecular mechanisms of antibiotic resistance*. Nat. Rev. Microbiol. 13, 42-51.
- BONNIN R., POIREL L., NORDMANN P., EIKMEYER F.G., WIBBERG D., PUHLER A., SCHLUTER A., 2013. *Complete sequence of broad-host-range plasmid pNOR-2000 harbouring the metallo- $\beta$ -lactamase gene bla<sub>VIM-2</sub> from Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. 68, 1060-1065.
- BORONIN A. M., 1992. *Diversity of Pseudomonas plasmids: to what extent?* FEMS Microbiol. Lett. 100, 461-467.
- BOUCHER H. W., TALBOT G. H., BRADLEY J. S., EDWARDS J. E., GILBERT D., RICE L. B., SCHELD M., SPELBERG B., BARTLETT J., 2009. *Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America*. Clin. Infect. Dis. 48, 1-12.
- BREIDENSTEIN E. B. M., DE LA FUENTE-NUNEZ C., HANCOCK R. E., 2011. *Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance*. Trends Microbiol. 19, 419-426.
- BUSH K., JACOBY G. A., 2010. *Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases*. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 969-976.
- BUSH K., JACOBY G. A., MEDEIROS A. A., 1995. *A Functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure*. Antimicrob. Agents. Chemother. 39, 1211-1233.
- CAMPBELL J. I. A., CIOUFU O., HOIBY N., 1997. *Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis have different beta-lactamase expression phenotypes but are homogenous in the ampC-ampR genetic region*. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 1380-1384.
- CENICEROS A., PERTEGA S., GALEIRAS R., MOURELO M., LÓPEZ E., BROULLÓN J., SOUSA D., FREIRE D., 2016. *Predicting mortality in burn patients with bacteraemia*. Infection 44, 215-222.
- CEYSSENS P. J., LAVIGNE R., 2010. *Bacteriophages of Pseudomonas*. Future Microbiol. 5, 1041-1055.
- CHAMBERS H. F., DELEO F. R., 2009. *Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era*. Nat. Rev. Microbiol. 2009, 7629-7641.
- CHENG G., DAI M., AHMED S., HAO H., WANG X., YUAN Z., 2016. *Antimicrobial Drugs in Fighting against Antimicrobial Resistance*. Front. Microbiol. 7, 470.
- CHIU C. M., THOMAS C. M., 2004. *Evidence for past integration of IncP-1 plasmids into bacterial chromosomes*. FEMS Microbiol. Lett. 241, 163-169.
- COHEN M. L., 1992. *Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era*. Science 257, 1050-1055.
- COHEN M. L., 2000. *Changing patterns of infectious disease*. Nature 406, 762-767.
- D'AGATA E., 2015. *Pseudomonas aeruginosa and other Pseudomonas species* [W:] *Principles and Practice of Infectious Diseases*. BENNET J. E., DOLIN R., BLASER M. (red.). Elsevier-Saunders, Philadelphia, 2518-2532.
- DANEL F., HALL L. M., GUR D., LIVERMORE D. M., 1995. *OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 1881-1884.
- DANEL F., HALL L. M., GUR D., LIVERMORE D. M., 1997. *OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase, isolated from a Pseudomonas aeruginosa strain*. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 785-790.
- DATTS N., 1962. *Transmissible drug resistance in an epidemic strain of Salmonella typhimurium*. J. Hygiene 60, 301-310.
- DAVIES J., 1995. *Vicious circles: looking back on resistance plasmids*. Genetics 139, 1465-1468.
- DAVIES J., DAVIES D., 2010. *Origin and evolution of antibiotic resistance*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 74, 417-433.
- DUBOIS V., ARPIN C., NOURY P., QUENTIN C., 2002. *Clinical strain of Pseudomonas aeruginosa carrying a bla<sub>TEM21</sub> gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon*. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 3624-3626.
- FAJARDO A., AMADO-HERNANDO S., OLIVER A., BALL G., FILLOUX A., MARTINEZ L. J., 2014. *Characterization of a novel Zn<sup>2+</sup>-dependent intrinsic imipenemase from Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. 69, 2972-2978.
- EDELSTEIN M. V., SKLEENOVA E. N., SHEVCHENKO O. V., D'SOUZA J. W., TAPALSKI D. V., AZIZOV I. S., SUKHORUKOVA M. V., PAVLUKOV R. A., KOZLOV R. S., TOLEMAN M. A., WALSH T. R., 2013. *Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 Pseudomonas aeruginosa in Belarus, Kazakhstan and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study*. Lancet Infect. Dis. 13, 867-876.
- EMPEL J., FILCZAK K., MRÓWKA A., HRYNIEWICZ W., LIVERMORE D. M., GNIADKOWSKI M., 2007. *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. 45, 2829-2834.
- FAIR R. J., YITZHAK T., 2014. *Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21<sup>st</sup> Century*. Perspect. Medicin. Chem. 6, 25-64.
- FIETT J., BARANIAK A., MRÓWKA A., FLEISCHER M., DRULIS-KAWA Z., NAUMIUK Ł., SAMET A., HRYNIEWICZ W., GNIADKOWSKI M., 2006. *Molecular Epidemiology of Acquired-Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Bacteria in Poland*. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 880-886.
- FLEMING A., 1999. *Penicillin, Nobel lecture 1945*. [W:] *Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1942-1962*. STRANDELL B. (red.). World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 83-93.
- FONSECA E. L., MARIN M. A., ENCINAS F., VICENTE A. C., 2015. *Full characterization of the integrative and conjugative element carrying the metallo- $\beta$ -lactamase bla<sub>SPM-1</sub> and bicyclomycin bcr1 resistance genes found in the pandemic Pseudomonas aeruginosa clone SP/ST277*. J. Antimicrob. Chemother. 70, 2547-2550.
- FROST L. S., LEPLAE R., SUMMERS A. O., TOUSSAINT A., 2005. *Mobile genetic elements: the agents of open source evolution*. Nat. Rev. Microbiol. 3, 722-32.
- GALLOWAY D. R., 1991. *Pseudomonas aeruginosa elastase and elastolysis revisited: recent developments*. Mol. Microbiol. 10, 2315-2321.
- GARCÍA-CONTRERAS R., PÉREZ-ERETZA B., LIRA-SILVA E., JASSO-CHÁVEZ R., CORIA-JIMÉNEZ R., RANGEL-VEGA A., MAEDA T., WOOD T. K., 2014. *Gallium induces the production of virulence factors in Pseudomonas aeruginosa*. Pathog. Dis. 70, 95-98.
- GARZA-RAMOS U., MORFIN-OTERO R., SADER H. S., JONES R. N., HERNÁNDEZ E., RODRÍGUEZ-NORIEGA E., SANCHEZ A., CARRILLO B., ESPARZA-AHUMADA S., SILVA-SANCHEZ J., 2008. *Metallo- $\beta$ -lactamase gene bla<sub>IMP-15</sub> in a class 1 integron, In95, from Pseudomonas aeruginosa*



- clinical isolates from a hospital in Mexico. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 2943-2946.
- GIRLICH D., NAAS T., LEELAPORN A., POIREL L., FENNEWALD M., NORDMANN P., 2002. Nosocomial spread of the integron-located *veb-1-like* cassette encoding an extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. Clin. Infect. Dis. 34, 603-611.
- GNIADKOWSKI M., 2001. Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. Clin. Microbiol. Infect. 11, 597-608.
- GOODERHAMAND W. J., HANCOCK R. E., 2009. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Rev. 33, 279-294.
- GUZVINEC M., IZDEBSKI R., BUTIC I., JELIC M., ABRAM M., KOSCAK I., BARANIAC A., HRYNIEWICZ W., GNIADKOWSKI M., TAMBIC ANDRASEVIC A., 2014. Sequence types 235, 111 and 132 predominate among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Croatia. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 6277-6283.
- HAINES A. S., JONES K., BATT S. M., KOSHELEVA I. A., THOMAS C. M., 2007. Sequence of plasmid pBS228 and reconstruction of the IncP-1 alpha phylogeny. Plasmid 58, 76-83.
- HEDGES R. W., JACOB A., 1974. Transposition of ampicillin resistance from RF<sup>4</sup> to other replicons. Mol. Gen. Genet. 132, 31-40.
- HONG D. J., BAE, I. K., JANG I.-H., JEONG S. H., KANG H. K., LEE K., 2015. Epidemiology and characteristics of metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Chemother. 47, 81-97.
- ITO-HORIYAMA T., ISHII Y., ITO A., SATO T., NAKAMURA R., FUKUHARA N., TSUJI M., YAMANO Y., YAMAGUCHI K., TATEDA K., 2016. Stability of novel siderophore cephalosporin s-649266 against clinically relevant carbapenemases. Antimicrob. Agents Chemother. 60, 4384-4386.
- JAGUSZTYN-KRYNICKA E. K., 2012. Molekularne podstawy bakteryjnej patogenezy [W:] *Biologia molekularna bakterii*. Markiewicz Z., Baj J. (red.) PWN, Warszawa, 510-605.
- JOVČIĆ B., LEPSANOVIĆ Z., BEGOVIĆ J., RAKONJAC B., PEROVANOVIĆ J., TOPISIROVIĆ L., KOJIĆ M., 2013. The clinical isolate *Pseudomonas aeruginosa* MMA83 carries two copies of the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene in a novel genetic context. Antimicrob. Agents Chemother. 57, 3405-3407.
- JUAN C. B., MOYA J. L., PEREZ O. A., 2006. Step-wise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level beta-lactam resistance involves three AmpD homologues. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 1780-1787.
- KANEKO Y., THOENDEL M., OLAKANMI O., BRITIGAN B. E., SINGH P. K., 2007. The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity. J. Clin. Invest. 117, 877-888.
- KAZMIERCZAK K. M., RABINE S., HACKEL M., MC-LAUGHLIN R. E., BIEDENBACH D. J., BOUCHILLION S. K., SAHM D. F., BRADFORD P. A., 2015. Multiyear, multinational survey of the incidence and global distribution of metallo-β-lactamase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 60, 1067-1078.
- KITAO T., TADA T., TANAKA M., NARAHARA K., SHIMOJIMA M., SHIMADA K., MIYOSHI-AKIYAMA T., KIRIKAE T., 2012. Emergence of a novel multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain producing IMP-type metallo-β-lactamases and AAC(6<sup>7</sup>)-Iae in Japan. Int. J. Antimicrob. Agents. 39, 518-521.
- KLOCKGETHER J., CRAMER N., WIEHLMANN L., DAVENPORT C. F., TÜMMLER, B., 2011. *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. Front. Microbiol. 2, 150.
- KOS V. N., DERASPE M., MCCLAUGHLIN R. E., WHITEAKER J. D., ROY P. H., ALM R. A., CORBEIL J., GARDNER H., 2015. The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 427-436.
- KUNG V. L., OZER E. A., HAUSER A. R., 2010. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 74, 621-641.
- LAUTENBACH E., SYNNESTVEDT M., WEINER M. G., BILKER W. B., VO L., SCHEIN J., KIM W., 2010. Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: emergence, epidemiology, and impact on clinical and economic outcomes. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 31, 47-53.
- LEBEK G., 1963. Über die Entstehung mehrfachresistanter Salmonellen. Ein experimenteller Beitrag. Zbl. Bakt., Abt. I, Orig. 188, 494-499.
- LEVY S. B., MARSHALL B., 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nat. Med. 10, 122-129.
- LI H., LUO Y. F., WILLIAMS B. J., BLACKWELL T. S., XIE C. M., 2012. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to a novel therapies. Int. J. Med. Microbiol. 302, 63-68.
- LIBISCH B., POIREL L., LEPSANOVIĆ Z., MIROVIĆ V., BALOGH B., PASZTI J., HUNYADI Z., DOBAK A., FUZI M., NORDMANN P., 2008. Identification of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates of the international clonal complex CC11 from Hungary and Serbia. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 54, 330-338.
- LISTER P. D., WOLTER D. J., HANSON N. D., 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin. Microbiol. Rev. 22, 582-610.
- LIVERMORE D. M., 1995. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev. 8, 557-584.
- LIVERMORE D. M., 1998. Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. J. Antimicrob. Chemother. 41, 24-41.
- MAGIORAKOS A. P., SRINIVASAN A., CAREY R. B., CARMELI Y., FALAGAS M. E., GISKE C. G., HARBATH S., KAHLMETER G., OLSSON-LILJEQUIST B., PATERSON D. L., RICE L. B., STELLING J., STRUELENS M. J., VATOPOULOS A., WEBER J. T., MONNET D. L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin. Microbiol. Infect. 18, 268-281.
- MARCHIARO P. M., BRAMBILLA L., MORAN-BARRIO J., REVALE S., PASTERAN F., VILA A. J., VIALE A. M., LIMANSKY A. S., 2014. The complete nucleotide sequence of the carbapenem resistance-conferring conjugative plasmid pLD209 from a *Pseudomonas putida* clinical strain reveals a chimeric design formed by modules derived from both environmental and clinical bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 1816-1821.
- MARKIEWICZ Z., 2012. Budowa i funkcje komórki bakteryjnej [W:] *Biologia molekularna bakterii*.

- Markiewicz Z., Baj J. (red.). PWN, Warszawa, 26-131.
- MARKIEWICZ Z., KWIATKOWSKI Z. A., 2012. *Bakterie, antybiotyki, lekooporność*. PWN, Warszawa.
- MATHEE K., NARASIMHAN G., VALDES C., QIU X., MATEWISH J. M., KOEHRSEN M., ROKAS A., YANDAVA C. N., ENGELS R., ZENG E., OLAVARIETTA R., DOUD M., SMITH R.S., MONTGOMERY P., WHITE J. R., GODFREY P. A., KODIRA C., BIRREN B., GALAGAN J. E., LORY S., 2008. *Dynamics of Pseudomonas aeruginosa genome evolution*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 3100-3105.
- MATSUMOTO T., 2014. *Arbekacin: another novel agent for treating infections due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus and multi-drug-resistant Gram-negative pathogens*. Clin. Pharmacol. 6, 139-148.
- MEDEIROS A. A., 1997. *Evolution and Dissemination of  $\beta$ -lactamases Accelerated by Generations of  $\beta$ -lactam Antibiotics*. Clin. Infect. Dis. 24, 19-45.
- MISLIN G. L. A., SCHALK I. J., 2014. *Siderophore-dependent iron uptake systems as gates for antibiotic trojan horse strategies against Pseudomonas aeruginosa*. Metallomics 6, 408-420.
- NAKAYA R., NAKAMURA A., MURATA Y., 1960. *Resistance transfer agents in Shigella*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 3, 654-659.
- NEMEC A., KRIZOVA L., MAIXNEROVA M., MUSILEK M., 2010. *Multidrug-resistant epidemic clones among bloodstream isolates of Pseudomonas aeruginosa in the Czech Republic*. Res. Microbiol. 161, 234-242.
- NORDMANN P., RONCO E., NAAS T., DUPORT C., MICHEL-BRIAND Y., LABIA R., 1993. *Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 37, 962-969.
- OLIVER A., MULET X., LOPEZ-CAUSAPE C., JUAN C., 2015. *The increasing threat of Pseudomonas aeruginosa high-risk clones*. Drug Resist. Updat. 21-22, 41-59.
- OZER E. A., ALLEN J., HAUSER A. R., 2014. *Characterization of the core and accessory genomes of Pseudomonas aeruginosa using bioinformatic tools Spine and AGEnt*. BMC Genomics 15, 737.
- PAGE M. G. P., BUSH K., 2014. *Discovery and development of new antibacterial agents targeting Gram-negative bacteria in the era of pan-drug resistance: is the future promising?* Curr. Opin. Pharmacol. 18, 91-97.
- PHILIPPON L. N., NAAS T., BOUTHORS A. T., BARAKETT V., NORDMANN P., 1997. *OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 2188-2195.
- POIREL L., NAAS T., NICOLAS D., COLLET L., BELLAIS S., CAVALLO J. D., NORDMANN P., 2000. *Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate in France*. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 891-897.
- POIREL L., GIRLICH D., NAAS T., NORDMANN P., 2001. *OXA-28, an Extended-Spectrum Variant of OXA-10  $\beta$ -Lactamase from Pseudomonas aeruginosa and its plasmid- and integron-located gene*. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 447-453.
- POIREL L., NAAS T., NORDMANN P., 2010. *Diversity, epidemiology, and genetics of class d  $\beta$ -lactamases*. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 24-38.
- POOLE K., 2005. *Aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 479-487.
- POOLE K., 2011. *Pseudomonas aeruginosa – resistance to the max*. Front. Microbiol. 65, 1-13.
- POTRON A., POIREL L., NORDMANN P., 2015. *Emerging broad-spectrum resistance in Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: Mechanisms and epidemiology*. Int. J. Antimicrob. Agents 45, 568-585.
- RAMIREZ-ESTRADA S., BORGATTA B., RELLO J., 2016. *Pseudomonas aeruginosa ventilator-associated pneumonia management*. Infect. Drug Resist. 9, 7-18.
- RAHMAN M., PRASAD K. N., PATHAK A., PATI B. K., SINGH A., OVEJERO C. M., AHMAD S., GONZALEZ-ZORN B., 2015. *RmtC and RmtF 16S rRNA methyltransferase in NDM-1-producing Pseudomonas aeruginosa*. Emerg. Infect. Dis. 21, 2059-2062.
- RIERA E., CABOT G., MULET X., GARCIA-CASTILLO M., DEL CAMPO R., JUAN C., CANTON R., OLIVER A., 2011. *Pseudomonas aeruginosa carbapenems resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem*. J. Antimicrob. Chemother. 66, 2022-2027.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ J. M., POIREL L., NORDMANN P., 2009. *Extended-spectrum cephalosporinases in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 53, 1766-1771.
- RUSSELL A. B., PETERSON S. B., MOUGOUS J. D., 2014. *Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose*. Nat. Rev. Microbiol. 12, 137-148.
- SAUER K., CAMPER A. K., EHRLICH G. D., COSTERTON J. W., DAVIES D. G., 2002. *Pseudomonas aeruginosa Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm*. J. Bacteriol. 184, 1140-1154.
- SCHUREK K. N., BREIDENSTEIN E. B. M., HANCOCK R. E. W., 2012. *Pseudomonas aeruginosa: A persistent pathogen in cystic fibrosis and hospital-associated infections*. [W:] *Antibiotic Discovery and Development*. DOUGHERTY T. J., PUCCI M. J. (red.). Springer, 679-715.
- SCHAEFER B., 2014. *Natural Products in Chemical Industry*. Springer, Berlin Heidelberg.
- SORDÉ R., PAHISSA A., RELLO J., 2011. *Management of refractory Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis*. Infect. Drug Resist. 4, 31-41.
- SEVASTSYANOVICH Y. R., KRASOWIAK R., BINGLE L. E. H., HAINES A. S., SOKOLOV S. L., KOSHELEVA I. A., LEUCHUK A. A., TITOK M. A., SMALLA K., THOMAS C. M., 2008. *Diversity of IncP-9 plasmids of Pseudomonas*. Microbiology 154, 2929-2941.
- STOKES H. W., HALL R. M., 1989. *A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons*. Mol. Microbiol. 12, 1669-1683.
- STOKES H. W., GILLINGS M. R., 2011. *Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistant genes into Gram-negative pathogens*. FEMS Microbiol. Rev. 35, 790-819.
- STRATEVA T., YORDANOV D., 2009. *Pseudomonas aeruginosa – a phenomenon of bacterial resistance*. J. Med. Microbiol. 58, 1133-1148.
- TANEJA N., KAUR H., 2016. *Insights into Newer Antimicrobial Agents Against Gram-negative Bacteria*. Microbiol. Insights 20, 9-19.

- TOMARAS A. P., MCPHERSON T. C. J., KUHN M., CARIFA A., MULLINS L., GEORGE D., DESBONNET C., EIDEM T. M., MONTGOMERY J. I., BROWN M. F., REILLY U., MILLER A. A., O'DONNELL J. P., 2014. *LpxC inhibitors as new antibacterial agents and tools for studying regulation of lipid a biosynthesis in Gram-negative pathogens*. mBio 5, e01551-14.
- VILACOBA E., QUIROGA C., PISTORIO M., FAMIGLIETTI A., RODRÍGUEZ H., KOVENSKY J., DERASPE M., RAYMOND F., ROY P. H., CENTRÓN D., 2014. *A bla<sub>VIM-2</sub> plasmid disseminating in extensively drug-resistant clinical Pseudomonas aeruginosa and Serratia marcescens isolates*. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 7017-7018.
- VILLAVICENCIO R. T., 1998. *The history of blue pus*. J. Coll. Surg. 187, 212-216.
- VINCENT J. L., 2003. *Nosocomial infections in adult intensive-care units*. Lancet 361, 2068-77.
- WAGNER S., SOMMER R., HINSBERGER S., LU C., HARTMANN R. W., EMPTING M., TITZ A., 2016. *Novel strategies for the treatment of Pseudomonas aeruginosa infections*. J. Med. Chem. <http://pubs.acs.org/doi/ipdf/10.1021/acs.jmedchem.5b01698>.
- WALSH T. R., TOLEMAN M. A., POIREL L., NORDMANN P., 2005. *Metallo-β-lactamases: the quiet before the storm?* Clin. Microbiol. Rev. 18, 306-325.
- WATANABE T. T., FUKUSAWA T., 1960. *„Resistance transfer factor” on episome in Enterobacteriaceae*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 3, 87-115.
- WEI Q., MA L. Z., 2013. *Biofilm matrix and its regulation in Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Mol. Sci. 14, 20983-21005.
- WESTRITSCHNIG K., HOCHREITER R., WALLNER G., FIRBAS C., SCHWAMEIS M., JILMA B., 2014. *A randomized, placebo-controlled phase I study assessing the safety and immunogenicity of a Pseudomonas aeruginosa hybrid outer membrane protein OprF/I vaccine (IC43) in healthy volunteers*. Hum. Vaccin. Immunother. 10, 170-183.
- WOLSKA I. K., GRUDNIAK M. A., KRACZKIEWICZ-DOWJAT A., KUREK A., 2010. *Różnorodne funkcje wybranych pigmentów bakteryjnych*. Post. Mikrobiol. 40, 105-114.
- XIONG J., ALEXANDER D. C., MA J. H., DÉRASPE M., LOW D. E., JAMIESON F. B., ROY P. H., 2013. *Complete sequence of pOZ176, a 500-kilobase IncP-2 plasmid encoding IMP-9-mediated carbapenem resistance, from outbreak isolate Pseudomonas aeruginosa 96*. Antimicrob. Agents Chemother. 57, 3775-3782.
- ZINCKE D., BALASUBRAMANIAN D., SILVER L. L., MATHEE K., 2016. *Characterization of a carbapenem-hydrolyzing enzyme, PoxB, in Pseudomonas aeruginosa PAO1*. Antimicrob. Agents Chemother. 60, 936-945.

**KOSMOS Vol. 66, 1, 11-29, 2017**

PAWEŁ URBANOWICZ, MAREK GNIADKOWSKI

Department of Molecular Microbiology, National Medicines Institute, Chelmska 30/34, 00-725 Warszawa,

E-mail: purbanowicz@cls.edu.pl, gniadkow@cls.edu.pl

**“HEAVILY ARMED” PSEUDOMONAS AERUGINOSA: MECHANISMS AND GENETIC BACKGROUND OF DRUG RESISTANCE**

## Summary

The rapid spread of antibiotic resistance (AMR) in pathogenic bacteria is one of the greatest challenges of modern infectiology. In particular, the most threatening are nosocomial infections caused by multi-drug-resistant strains of several major species, such as *Pseudomonas aeruginosa*. This opportunistic pathogen exhibits a broad-spectrum of natural resistance. Due to its high genome plasticity, comprising functional mutations and acquisition of foreign DNA, *P. aeruginosa* can easily adapt and persist in harsh environmental niches. The critical issue is its outstanding ability to acquire diverse AMR mechanisms, including those encoded by mobile genetic determinants. In addition to the intrinsic resistance, *P. aeruginosa* can be highly resistant to all of the currently available antipseudomonadal antimicrobials. *P. aeruginosa* is the etiological agent of a variety of infections, including acute pneumonia, bloodstream infections or skin and soft tissue infections (e. g. postoperative or burn wounds). It is responsible also for chronic infections, like those in cystic fibrosis (CF) patients. The major antimicrobials used in *P. aeruginosa* infections are newer-generation cephalosporins, carbapenems, fluoroquinolones or aminoglycosides. Owing to limitations of the effective therapeutic options against *P. aeruginosa*, new antimicrobials and novel indications and thus applications for older drugs are being developed.