

Pseudomonas aeruginosa – trudny przeciwnik lekarzy weterynarii

Alina Wiśniewska

z Powiatowego Inspektoratu Weterynarii w Żninie

Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* to Gram-ujemne, bezwzględnie tlenowe, biegunowo urzęsione pałeczki wykazujące ruch. Są proste lub nieznacznie zakrzywione. Nie fermentują laktozy oraz są oksydazo-dodatnie. Ich wymagania odżywcze są niewielkie i mogą rosnąć w szerokim zakresie temperaturowym – od 5 do 45°C. Jest to jeden z najbardziej zróżnicowanych rodzajów bakterii, który obejmuje ponad 200 gatunków (1). Większość bakterii z tego rodzaju wytwarza barwniki, np. *Pseudomonas aeruginosa*, wytwarza niebieskozieloną piocyjaninę, a *Pseudomonas fluorescens* zieloną piowerdynę, która daje efekt fluorescencji. Kultury pałeczki ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*) wydzielają charakterystyczny zapach jaśminu. Pałeczki wytwarzają duże, szare kolonie o nieregularnych brzegach i wyniesionym środku. Kolonie bakterii produkują liczne polisacharydy warunkujące ich śluzowatą konsystencję. Mikroorganizmy te są szeroko rozpowszechnione w środowisku – występują w glebie, wodzie, a także stanowią naturalny składnik mikroflory zwierząt i roślin. Są metabolicznie wszechstronne, a ich genom określa się jako plastyczny (1). Stanowią mikroflorę oportunistyczną, niektóre z nich są chorobotwórcze – pałeczka ropy błękitnej odpowiedzialna za zakażenia szpitalne (nosocomial infections) ludzi i zwierząt (2), *Pseudomonas fluorescens* powodujący problemy zdrowotne ryb (3), a także zapalenia skóry, stany zapalne górnych dróg oddechowych i zapalenia zewnętrznego przewodu słuchowego małych zwierząt (4). *Pseudomonas* spp. mogą produkować liczne substancje ułatwiające ich wnikanie do komórek gospodarza – lipazę, proteiny, hemolizyny, kolagenazę, egzotoksynę A-cytotoksynę (5). Istotny klinicznie jest fakt, że bakterie z rodzaju *Pseudomonas* mają zdolność tworzenia biofilmu, który obecnie uważany jest za główny czynnik wirulencji, chroniący drobnoustroje przed działaniem układu immunologicznego makroorganizmu, a także przed stosowanymi chemioterapeutykami (6, 7, 8). Lekoooporność opisanych bakterii jest problemem powszechnie znanym. Najdokładniej dotychczas przebadanym pod tym względem jest *Pseudomonas aeruginosa*, będący w Stanach Zjednoczonych jednym z pięciu drobnoustrojów chorobotwórczych najczęściej wywołujących zakażenia szpitalne u ludzi (9).

Genom pałeczki ropy błękitnej

Genom *Pseudomonas aeruginosa* jest duży, ponieważ liczy ponad sześć mln par zasad (dane wahają się między 5,5 a 7 Mbp; 10). Różnorodność genetyczna tego patogenu wynika z licznych rodzin genów o znaczonej odrębności. Różnice w podawanej przez

Pseudomonas aeruginosa – veterinarians difficult enemy

Wiśniewska A., District Veterinary Inspectorate in Żnin

Pseudomonas aeruginosa is Gram-negative bacillus, which has worldwide distribution and is ubiquitous in water, soil vegetation and decaying organic matter. The organism is opportunistic pathogen of animals. It rarely infects uncompromised tissues and remains a challenge for doctors and scientists due to complications wound healing process. Nowadays, *P. aeruginosa* infections are among the most resistant to chemotherapeutic drugs. Infections caused by multidrug-resistant strains are particularly demanding and combination therapy is most often used. The aim of this review was to present the key mechanisms responsible for the inherent and acquired drug resistance of *P. aeruginosa*. Furthermore, the article presents the antimicrobials currently used for therapy, as well as prognosis of pharmacotherapy.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, drug resistance, biofilm, virulence, nosocomial infections.

badaczy wielkości genomu wynikają z genomu dodatkowego (accessory genome). W skład genomu dodatkowego wchodzić mogą sekwencje chromosomu bakteryjnego, plazmidy, profagi nabyte drogą horyzontalnego transferu genów (horizontal gene transfer, HGT) czy integrony (11). Zmienność w obrębie genomu dodatkowego skutkuje odrębnymi fenotypami *Pseudomonas aeruginosa*, co prowadzi do wykształcenia specyficznych szlaków katabolicznych umożliwiających adaptację drobnoustroju do trudnych warunków środowiskowych, np. działania antybiotyków, obecności metali ciężkich, zmiennej temperatury (10). W genomie wyróżnia się tzw. regiony plastyczności genomu (region of genome plasticity, RGP), które najczęściej zlokalizowane są na końcach 3' genów tRNA i mogą być punktami insercji profagów lub wysp genomowych, a także innych modyfikacji (12, 13). Do tej pory poznano ponad 80 regionów plastyczności genomu *Pseudomonas aeruginosa*. Zmienność genomu podstawowego (core genome) jest mała i wynosi 0,5–0,7%. Uwzględniając zmiany pangenu, przyjęło się określać genom podstawowy *Pseudomonas aeruginosa* jako mozaikowy (13).

Czynniki wirulencji *Pseudomonas aeruginosa*

Pałeczka ropy błękitnej charakteryzuje się bardzo szeroką gamą czynników wirulencji, które kodowane są zarówno poprzez genom podstawowy, jak i dodatkowy, najczęściej w obrębie wysp genomowych (*Pseudomonas aeruginosa* genomic island, PAGI) oraz wysp patogenności (*Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity island, PAPI; 11).

Czynnikami wirulencji *Pseudomonas aeruginosa* są: pile, wić, proteaza alkaliczna, elastaza, egzotoksyna A (ExoA), fosfolipaza A, proteaza IV, egzotoksyny S (ExoS), T (ExoT), U (ExoU) i Y (ExoY), lipopolisacharyd, alginian, piocjanina, piowerdyna oraz czynniki „wyczuwania obecności” (quorum-sensing molecules, QS), a także zdolność tworzenia biofilmu (10, 11, 13, 14). Należy również pamiętać o układach sekrecyjnych, w które wyposażona jest bakteria. Każdy z wymienionych czynników wirulencji odgrywa istotną rolę w patogenezie zakażeń, dlatego zostały poniżej scharakteryzowane.

Pile i wić

Pile są strukturami bakteryjnymi, które u opisywanej bakterii mają istotne znaczenie w procesie adhezji do wielu komórek i są ważne dla zjawiska tropizmu tkankowego, a także tworzenia biofilmu oraz fagocytozy (10, 15). Wśród szczepów *Pseudomonas aeruginosa* zidentyfikowano dotąd pięć alleli pil A (grupy od I do IV). Najszerzej przebadane zostały pilusy typu IV (T4P), ponieważ okazuje się, że mogą one pośredniczyć w ruchu bakterii niezależnie od wici. Umożliwiają komórkom ruch drgający, który jest uznawany za istotny czynnik w tworzeniu biofilmów *in vitro* (6, 8, 10, 15).

Pojedyncza wić, którą posiada pałeczka ropy błękitnej, również odpowiada za ruch bakterii. Niemniej jej rola wykracza poza ruchliwość. Badania wykazują, że białka tworzące wić odgrywają kluczową rolę w adhezji do komórek, inwazji organizmu oraz pośredniczą w odpowiedziach zapalnych. Mutanty *Pseudomonas aeruginosa* pozbawione wici są izolowane w medycynie ludzkiej od pacjentów z mukowiscydozą. Prawdopodobnie utrata wici ułatwia inwazję na układ odpornościowy pacjenta (10, 15).

Układy sekrecyjne

Pseudomonas aeruginosa dysponuje kilkoma układami sekrecyjnymi (type secretion system, TSS). Układ sekrecyjny I typu (T1SS) w jednoetapowym procesie wydziela proteazę alkaliczną do przestrzeni pozakomórkowych. Jest to enzym, który hamuje tworzenie fibryny, co sprzyja rozprzestrzenianiu się bakterii (11).

Układ sekrecyjny typu II (T2SS) działa 2-etapowo. Pierwotnie toksyny są wydzielane w postaci białek prekursorowych, a następnie rozszczepiane. Do tego układu należą: egzotoksyna A (ExoA), elastaza, fosfolipaza C oraz proteaza IV. Substancje wydzielane przez T2SS działają cytotoksycznie oraz odpowiadają za rozwój procesów zapalnych (10, 15).

Szeroko opisywanym jest również układ sekrecyjny typu III (T3SS), który działa w sposób złożony, a główną jego funkcją jest wstrzykiwanie egzotoksyn do cytoplazmy komórek. Naukowcy zidentyfikowali cztery białka, które wchodzi w skład T3SS: ExoU, ExoS, ExoT, ExoY (10, 12). ExoU to fosfolipaza indukująca apoptozę i powodująca apoptozę komórek mięszszowych i fagocytów. ExoS i ExoT to 2-funkcyjne białka wpływające na wzrost komórek przez hamowanie syntezy DNA i wywoływanie zmian w cytoszkieletcie. ExoY jest cyklazą adenylanową, która ma zdolność upośledzenia funkcji bariery komórek śródbłonna płuc (10, 12).

Interesujący jest układ sekrecyjny typu VI (T6SS), który – w przeciwieństwie do pozostałych TSS – nie służy głównie do komunikacji z komórkami eukariotycznymi, a pośredniczy w kontakcie z komórkami bakteryjnymi. Budową przypomina białka kurczliwe bakteriofagów, co umożliwia wprowadzanie toksyn do wnętrza komórek. Białka efektorowe, takie jak muramidazy, nukleazy czy fosfolipazy, transportowane są do wnętrza komórek innych bakterii i powodują ich obumieranie (16). *Pseudomonas aeruginosa* wykorzystuje ten mechanizm do osłabienia naturalnej flory bakteryjnej gospodarza, tym samym zwiększając swoje szanse na kolonizację tkanek (15, 17).

Endotoksyna, alginian oraz barwniki

Lipopolisacharyd, zwany również endotoksyną, występuje na powierzchni zewnętrznej błony bakterii Gram-ujemnych. Zbudowany jest z lipidu A, który stanowi część hydrofobową, oligosacharydu rdzeniowego oraz antygeny O, inaczej zwanego polisacharydem dystalnym. Analizując skład antygeny O, można określić serotypy izolatu *Pseudomonas aeruginosa*, które różnią się reaktywnością serologiczną polisacharydu dystalnego. Duża zmienność opisanego czynnika warunkuje wysoką oporność na mechanizmy obronne organizmu gospodarza.

Alginian to pozakomórkowy polisacharyd, który wykazuje właściwości antyfagocytarne i jest odporny na proces opsonizacji. Jego zadaniem jest usuwanie wolnych rodników, które są uwalniane przez makrofagi gospodarza w odpowiedzi na infekcję. Ponadto hamuje aktywację układu dopełniacza i chemotaksję neutrofilów (10, 15, 17). Wydzielany przez kolonie bakteryjne hodowane na podłożach stałych, nadaje im śluzowatą konsystencję. Istotną klinicznie cechą zakażeń tą bakterią jest jej zdolność do zmiany fenotypu z nieśluzowego na śluzowy, co stanowi szczególnie problem w medycynie ludzkiej podczas opieki nad pacjentami z mukowiscydozą (15).

Substancje, które warunkują charakterystyczne zabarwienie kolonii bakteryjnych, również odgrywają rolę w patogenezie *Pseudomonas aeruginosa*. Piowerdyna jest sideroforem, którego zadaniem jest konkutowanie z organizmem gospodarza o żelazo. Natomiast piocjanina wchodzi w reakcję z tlenem, produkując wolne rodniki, a co za tym idzie – uszkadza tkanki oraz hamuje funkcję rzęsek i proliferację limfocytów (10, 15, 17).

Biofilm

Badania wskazują, że 99% bakterii ma zdolność tworzenia biofilmu. Biofilm bakteryjny określa się jako zbiorowisko komórek bakteryjnych tworzących mikrokolonie, otoczonych polisacharydową macierzą (matryks). Struktura przytwierdzona jest do powierzchni żywej, np.: biofilm na błonach śluzowych lub brzegach ran oparzeniowych, albo abiotycznej: na powierzchni aparatury medycznej, instalacji sanitarnych czy narzędziach użytkowanych w codziennej pracy klinicznej (10, 15, 18). Mikrokolonie różnią się właściwościami fizjologicznymi i fenotypowymi od bakterii rosnących w planktonie. Badania

epidemiologiczne wskazują, że biofilm bakteryjny odpowiada za około 80% zakażeń u ludzi i zwierząt (6, 18).

Biofilm to zwarta struktura składająca się z kilkunastu do kilkudziesięciu warstw bakterii należących do tego samego lub różnych gatunków otoczonych pozakomórkową substancją polisacharydową (extracellular polymeric substances, EPS). W jego budowie bardzo ważną rolę odgrywają kanały biegnące pomiędzy poszczególnymi warstwami bakterii, odpowiadające za przepływ substancji odżywczych, tlenu i wody (19, 20). Wspomniane kanały umożliwiają również lepsze przytwierdzenie biofilmu do podłoża. Niemniej ważnym składnikiem struktury biofilmu jest EPS, która stanowi około 90% całej masy (pozostałe 10% to masa bakteryjna). Pozakomórkowa substancja polisacharydowa złożona jest z glikoprotein, lipidów, zewnątrzkomórkowego DNA, polisacharydów, białek, lipopolisacharydów oraz kwasów lipoteichoowych. Ponad 90% EPS stanowi woda, która zapobiega wysuszeniu biofilmu (19, 21, 22). Wszystkie wymienione wyżej składowe sprawiają, że biofilm jest odporny na działanie licznych czynników zewnętrznych, takich jak środki dezynfekcyjne, leki, promieniowanie UV, bakteriofagi czy czynniki odpornościowe pochodzące z organizmu gospodarza. Tworzenie biofilmu to skomplikowany, wieloetapowy proces, w którym uczestniczą liczne czynniki wirulencji opisane powyżej, a także mechanizm QS (6).

Niezmierznie istotny jest fakt, że bakterie wchodzące w skład biofilmu wykazują dużą oporność na chemioterapeutyki. Badania wskazują, że bakterie tworzące biofilm mogą być nawet 100-krotnie bardziej odporne na działanie substancji przeciwbakteryjnych (23). W przypadku *Pseudomonas aeruginosa* rosnącego w biofilmie najbardziej istotnym czynnikiem zwiększającym oporność bakterii na antybiotyki jest wspomniany wcześniej alginian, który chroni przed opsonizacją, a co za tym idzie – nie pozwala na zniszczenie struktury biofilmu (17, 20). Zwiększona oporność bakterii na dostępne chemioterapeutyki jest sporym problemem zarówno dla medycyny ludzkiej, jak i weterynarii. Kluczowe dla skutecznej terapii jest poznanie szlaków odpowiedzialnych za niewrażliwość biofilmu na substancje przeciwbakteryjne (24).

Regulacja produkcji czynników wirulencji

Regulacja wytwarzania czynników wirulencji jest niezmiernie istotna i stanowi bardzo ciekawe, intensywnie badane zjawisko. Mechanizm „wyczuwania liczebności” (quorum-sensing, QS) jest nadrzędny w kontroli ekspresji wielu genów bakterii. Jest to proces komunikacji międzykomórkowej (25). Krytyczna liczba bakterii (quorum) jest niezbędna, aby komórki bakteryjne mogły wytworzyć odpowiednią ilość autoinduktorów typu AHL lub AQ, czyli cząsteczek sygnałowych. Stwierdzono również, że poza AHL *Pseudomonas aeruginosa* może wykorzystywać do komunikacji międzykomórkowej również inne substancje – cząsteczki chinolone przypominające antybiotyki (ang. pseudomonas quinolone signal molecule, PQS; 17). Można powiedzieć, że mechanizm QS jest zjawiskiem społecznym, dlatego też, wraz z tworzeniem biofilmu, został nazwany socjomikrobiologią.

Proces QS najdokładniej przebadano na *Pseudomonas aeruginosa* i wiadomo już, że ponad 300 genów jest regulowanych podczas owego zjawiska (10, 20). W zależności od stężenia autoinduktorów w środowisku bakteria może kontrolować liczebność populacji. Jest to niewątpliwie mechanizm kluczowy w patogenezie *Pseudomonas aeruginosa*, ponieważ reguluje ekspresję pomp wyrzutowych, proteaz zewnątrzkomórkowych oraz wpływa na ruchliwość bakterii. Umożliwia jednocześnie ochronę przed odpowiedzią immunologiczną ze strony gospodarza (6, 7, 19, 26).

Mechanizm QS cieszy się zainteresowaniem naukowców w aspekcie wykorzystania go w celach terapeutycznych. Ze względu na konkurencję między mikroorganizmami a komórkami gospodarza wytworzyły się mechanizmy, które mają na celu zniszczenie systemu QS, wykorzystując antagonistyczne substancje lub doprowadzając do niszczenia autoinduktorów (25). Potencjalne inhibitory quorum-sensing mogłyby ułatwić eliminację patogenów z wykorzystaniem układu immunologicznego gospodarza, co z pewnością zapobiegłoby powstawaniu form niewrażliwych. Niestety, trzeba mieć na uwadze ograniczenia diagnostyczne, ponieważ obecnie stosowana w ocenie lekooporności bakterii metoda MIC (minimum inhibitory concentration) jest bezużyteczna w charakterystyce działania inhibitorów quorum-sensing. Powodem tego jest fakt, że wspomniane inhibitory nie wykazują działania bakteriobójczego (17). Kolejnym ograniczeniem działania potencjalnych inhibitorów quorum-sensing jest zależność ich skuteczności od poziomu odporności organizmu gospodarza. Wynika z tego, że tylko wobec niektórych pacjentów będzie można zastosować terapię ww. substancjami, choćby ze względu na dysfunkcje układu immunologicznego.

Pseudomonas aeruginosa jako ważny czynnik zakażeń szpitalnych

Zakażenia szpitalne, zarówno w przypadku ludzi, jak i zwierząt, są następstwem leczenia szpitalnego, które w związku z intensywnym rozwojem opieki weterynaryjnej jest coraz częściej stosowane przez lekarzy weterynarii. Za tego rodzaju zakażenia uznaje się te, które rozwinęły się w ciągu trzech dni od pobytu pacjenta w klinice. Okres ten ulega wydłużeniu w przypadku ran pooperacyjnych, jeśli zabieg przebiegał ze wszczęciem implantu (2).

W pierwszej dekadzie XXI wieku Amerykańskie Towarzystwo Chorób Zakaźnych (Infectious Diseases Society of America, IDSA) stworzyło listę głównych patogenów szpitalnych, tzw. ESAKPE. Należą do niej m.in.: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. (9). Choć to zagadnienie jest szczegółowo badane w medycynie ludzkiej, w weterynarii również stanowi istotny problem kliniczny. Do głównych patogenów wywołujących zakażenia szpitalne u zwierząt zalicza się: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Clostridium difficile*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Bacteroides* spp., przedstawicieli rodziny Enterobacteriaceae,

Candida spp. oraz niektóre wirusy – FeLV, FIV, CPiV, CDV (4, 27).

Lekarze weterynarii, chcąc ustrzec swych pacjentów przed objawami wywołanymi przez te drobnoustroje, powinni zwracać szczególną uwagę na zwierzęta starsze, z upośledzonym funkcjonowaniem układu immunologicznego, z problemami endokrynologicznymi i niewydolnością nerek, ponieważ są to czynniki predysponujące do rozwoju zakażeń szpitalnych (4). Najbardziej narażeni są pacjenci z otwartymi ranami lub wkłuciami dożylnymi. U osobników zdrowych ilość pałeczki ropy błękitnej w górnych drogach oddechowych, układzie moczowym czy na powierzchni skóry jest kontrolowana przez naturalną mikroflorę organizmu.

Wśród gatunków bakterii umieszczonych na liście ESKAPE istotne znaczenie ma *Pseudomonas aeruginosa*. Jak już wcześniej wspomniano, drobnoustroje należące do rodzaju *Pseudomonas* charakteryzują się szerokim wachlarzem mechanizmów chroniących je przed układem odpornościowym chorego, a także przed stosowaną terapią. Ze względu na liczne czynniki zjadliwości, nabyte i naturalne mechanizmy oporności, patogen ten jest jednym z najpoważniejszych zagrożeń, z jakimi mogą spotkać się specjaliści z zakresu medycyny ludzkiej i weterynarii (9).

Pierwsze doniesienia na temat zakażeń pałeczką ropy błękitnej u ludzi pochodzą z XIX wieku. Wszyscy badacze podobnie opisywali, iż opatrunki i bandaże chorych oraz rannych przyjmowały charakterystyczne, niebieskozielone zabarwienie. Francuski uczony Charles Sédillot zauważył w 1850 r., że owo zabarwienie może być przenoszone między pacjentami. Drobnoustrój został wyizolowany dopiero pod koniec XIX wieku przez Carla Gessarda i pierwotnie nazwany był *Bacillus pyocyaneus*, później nazwę zmieniono na obecnie obowiązującą (10). Pałeczkę ropy błękitnej można odróżnić od pozostałych bakterii tego rodzaju (np. *Pseudomonas fluorescens* czy *Pseudomonas putida*) po wzroście w temperaturze 37–42°C. Od połowy XX wieku *Pseudomonas aeruginosa* był jednym z najdokładniej badanych mikroorganizmów chorobotwórczych. Szczególnie niebezpieczna jest ewentualna obecność tej bakterii na powierzchni sprzętu diagnostycznego, sprzętu czyszczącego, instalacji sanitarnej czy aparaturze medycznej (10, 19).

Lekooporność *Pseudomonas aeruginosa*

Wskaźniki oporności *Pseudomonas aeruginosa* na środki przeciwbakteryjne i oporność wielolekowa należą do najwyższych w porównaniu z innymi mikroorganizmami. Pałeczki ropy błękitnej wykazują naturalną oporność na wiele antybiotyków. Bakterie są odporne na różnicowane strukturalnie terapeutyki, np.: penicyliny izoksazolinowe, benzylopenicyliny, cefalosporyny I i II generacji, chloramfenicol, tetracykliny, trimetoprim. Zjawisko naturalnej oporności *Pseudomonas aeruginosa* wynika z niskiej przepuszczalności błony zewnętrznej, ekspresji pomp *efflux* oraz obecności enzymów, które inaktywują leki (28). Jak wcześniej wspomniano, w chromosomie bakteryjnym zakodowanych jest kilka enzymów, które inaktywują antybiotyki. Z klinicznego punktu widzenia najistotniejsza jest

β-laktamaza klasy C – cefalosporynaza AmpC (28, 29). Ta substancja posiada szerokie spektrum substratowe, które obejmuje większość antybiotyków β-laktamowych, tj. prawie wszystkie cefalosporyny i penicyliny oraz monobaktamy. Tylko karbapenemy i cefalosporyny IV generacji nie są inaktywowane przez AmpC. *Pseudomonas aeruginosa* wykazuje naturalną oporność na ww. antybiotyki oraz ich połączenia z inhibitorami β-laktamaz (28). Wśród izolatów klinicznych częstym zjawiskiem jest derepresja AmpC. Polega ona na wytwarzaniu ponadnormatywnych ilości cefalosporynazy AmpC. Jest to spowodowane mutacjami w genach regulujących ekspresję tej β-laktamazy. W przypadku gdy zjawisku derepresji towarzyszy obniżona przepuszczalność błony zewnętrznej komórki bakteryjnej, oporność może dotyczyć również leków, które nie są substratami AmpC, co powoduje, że dany szczep jest odporny na wszystkie β-laktamy (30). Poza AmpC pałeczka ropy błękitnej charakteryzuje się również innymi, kodowanymi w chromosomie bakteryjnym enzymami, które hydrolizują β-laktamy. Są to PoxB oraz PIB-1, ale według badaczy nie pełnią one istotnej roli w antybiotykooporności (28, 30).

Naturalnym mechanizmem oporności bakterii jest zmienna przepuszczalność kanałów porynowych, za pomocą których leki dostają się do wnętrza komórki bakteryjnej. Mechanizm ten zależy od utraty, obniżenia ekspresji czy zmiany struktury poryny. *Pseudomonas aeruginosa* chroni się przed działaniem karbapenemów właśnie poprzez całkowitą utratę funkcjonalnych kanałów OprD lub przez redukcję ich liczby. Niestety tego rodzaju mechanizm oporności jest najczęściej rozpoznawany w przypadku wystąpienia oporności na karbapenemy.

Komórki bakteryjne wykształciły również mechanizm aktywnego usuwania substancji leczniczych poza komórki. Mowa o pompach typu *efflux*, które są swoiste substratowo i mogą wypompowywać jeden rodzaj antybiotyku lub wiązać substancje przeciwbakteryjne różnych rodzajów (8). W przypadku *Pseudomonas aeruginosa* przykładem może być pompa MexAB-OprM, która usuwa poza komórkę aztreonam, tetracyklinę, tobramycynę oraz gentamycynę (31).

Wymienione mechanizmy, którymi naturalnie dysponuje *Pseudomonas aeruginosa*, sprawiają, że stanowi on ogromne wyzwanie kliniczne. Jednak poza naturalnymi mechanizmami pałeczka ropy błękitnej, podobnie jak inne bakterie, nabywa oporność ze środowiska zewnętrznego. Odpowiedzialny za nabywanie nowych cech jest wspomniany wcześniej horyzontalny transfer genów (HGT), do którego dochodzi głównie za pomocą plazmidów. W wyniku HGT bakteria zdobywa enzymy inaktywujące głównie β-laktamy i aminoglikozydy. Procesy transpozycji, rekombinacji, czy też integracji plazmidów również leżą u podstaw poszerzenia lekooporności (28, 29).

Pierwszy enzym z grupy tzw. β-laktamaz o poszerzonym spektrum substratowym (extended-spectrum β-lactamases, ESBL) został zidentyfikowany w latach 80. XX wieku. Wykryto go u Enterobacteriaceae, ale *Pseudomonas aeruginosa* posiada w swym arsenale kilka typów nabytych ESBL. Najpowszechniej występującym i pierwszym zidentyfikowanym

u *Pseudomonas aeruginosa* jest PER-1, który opisano po raz pierwszy w 1993 r. Ponadto bakteria posiada inne substancje z tej grupy, tj.: VEB, GES/IBC, BEL oraz PME (28, 30). Najczęściej geny kodujące powyższe ESBL są zlokalizowane w integronach klasy I i transpozonach.

Inne enzymy odpowiedzialne za rozkład β -laktamów, a dokładnie oksymino- β -laktamów, to oksacylinazy o poszerzonym spektrum (ang. extended-spectrum oxacillinases, ES-OXA). Z klinicznego punktu widzenia istotną różnicą między ESBL a ES-OXA jest fakt, że aktywność tych ostatnich jest w niewielkim tylko stopniu hamowana przez kwas klawulany (28). Trudność w leczeniu zakażeń wywołanych *Pseudomonas aeruginosa* wynika m.in. z tego, że ES-OXA są charakterystyczne niemal wyłącznie dla tego gatunku bakterii. Wyzwaniem jest diagnostyka, ponieważ zarówno ES-OXA, jak i ESBL mogą być maskowane poprzez cefalosporynazę AmpC, która produkowana jest w dużych ilościach (30).

Największą rolę w zjawisku antybiotykooporności nabywanej przez pałeczkę ropy błękitnej odgrywają metalo- β -laktamazy (ang. metallo- β -lactamases, MBL). Ewolucyjnie odbiegają od pozostałych β -laktamaz i jako jedyne spośród tych substancji wymagają kofaktora – Zn^{2+} . Charakteryzują się szerokim spektrum substratowym, które obejmuje wszystkie penicyliny, karbapenemy oraz cefalosporyny (29, 32). Jedyne aztreonam nie ulega hydrolizie przez MBL. Metallo- β -laktamazy są wysoce aktywne względem karbapenemów, co jest szczególnie niepokojące ze względu na zastosowanie wspomnianych leków jako substancji ostatniej szansy w leczeniu schorzeń wywołanych wielolekoopornymi szczepami Gram-ujemnych bakterii. Naukowcy przyjmują, że MBL należą do najczęściej nabywanych przez *Pseudomonas aeruginosa* β -laktamaz (29).

Poza β -laktamazami pałeczka ropy błękitnej bardzo często zyskuje ze środowiska zewnętrznego geny kodujące enzymy modyfikujące aminoglikozydy (ang. aminoglycoside-modifying enzymes, AME). Jest to grupa enzymów bardzo zróżnicowana pod względem budowy, ale także mechanizmów ich działania. Geny kodujące AME występują w postaci kaset integronowych i najczęściej są zlokalizowane w tych samych integronach, co geny β -laktamaz. To niewątpliwie dowodzi, że integrony są głównym źródłem nabytej wielolekooporności *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa jako wyzwanie terapeutyczne

Długotrwała terapia antybiotykami ułatwia proliferację pałeczki ropy błękitnej, dlatego szczególnie istotne jest, aby lekarze stosowali tzw. terapię celowaną i wykorzystywali chemioterapeutyki działające na dany szczep bakterii. Przytoczone w artykule informacje dowodzą, że *Pseudomonas aeruginosa* jest ogromnym wyzwaniem terapeutycznym. Aby antybiotykoterapia okazała się skuteczna, lekarz powinien w sposób rozsądny dobrać leki (33). Lekarze weterynarii pracujący klinicznie, napotykający oporne w leczeniu drobnoustroje, najczęściej zgłaszają się do laboratoriów

diagnostycznych celem wyizolowania szczepu odpowiedzialnego za zakażenie danego pacjenta, a także zlecają wykonanie antybiogramu. Jest to postępowanie o tyle ważne, że pozwala określić, który z chemioterapeutyków w konkretnym przypadku cechuje się najlepszą skutecznością i jednocześnie zapobiega poszerzaniu zjawiska wielolekooporności. Proces leczenia *Pseudomonas aeruginosa* determinowany jest sporem naukowców między monoterapią a terapią skojarzoną. Skuteczność terapii skojarzonej została już wielokrotnie potwierdzona. W walce ze szczepami wielolekoopornymi najczęściej stosuje się połączenia fluorochinolonów z β -laktamami i amikacyną. Badania wskazują, że wobec wysoce opornych szczepów *Pseudomonas aeruginosa* skuteczna jest kombinacja lewofloksacyny i cyprofloksacyny podawanych w połączeniu z ceftazidimem lub cefepimem albo w połączeniu z piperacyliną z tazobaktamem i imipenemem (34).

Monoterapia antybiotykami wobec pałeczki ropy błękitnej obejmuje różne substancje. Lekiem z wyboru w zakażeniach wywołanych tym gatunkiem bakterii jest gentamycyna, a także spektynomycyna, która nie jest wykorzystywana w medycynie ludzkiej. Ponadto w terapii stosowane są cefalosporyny III generacji, takie jak cefoperazon, cefsulodyna czy ceftazidim oraz cefepim należący do IV generacji cefalosporyn. Wobec *Pseudomonas aeruginosa* skuteczne są również ticarcylina, karbenicylina oraz tobramycyna (2, 28, 35).

Ze względu na narastające zjawisko antybiotykkooporności wprowadzane są różnego rodzaju ograniczenia w stosowaniu leków, a naukowcy intensywnie pracują nad opracowaniem nowych, skutecznych metod leczenia zakażeń bakteryjnych. Świat nauki nie tylko szuka nowych antybiotyków, ale także alternatywnych terapii przeciwbakteryjnych. Bardzo obiecujące w leczeniu chorób wywołanych bakteriami jest wykorzystanie bakteriofagów. Są to wirusy wysoce swoiste wobec bakterii, dlatego wykorzystuje się je do terapii celowanych, obecnie na etapie badań eksperymentalnych. Niemniej, mogłyby być bardzo użyteczne w leczeniu chorób dermatologicznych, urologicznych czy okulistycznych (36, 37).

W przypadku *Pseudomonas aeruginosa*, który – jak wiadomo – bardzo często tworzy biofilm, skuteczną mogłaby się okazać terapia przeciwbiofilmowa. Przykładem substancji, która ma potwierdzone badaniami właściwości przeciwbiofilmowe, jest laktoferyna. Jest to białko występujące naturalnie w organizmach ludzi i zwierząt, stanowiące wrodzoną odporność nieswoistą. Laktoferyna ma zdolność do sekwestracji żelaza, co uniemożliwia wykorzystanie tego pierwiastka przez bakterie, a w konsekwencji zaburza ich wzrost i rozwój (38). Wiążąc się z białkami powierzchniowymi bakterii, laktoferyna doprowadza do zwiększenia przepuszczalności błony komórkowej, co ułatwia wnikanie substancji przeciwbakteryjnych do wnętrza komórek.

Ostatnią grupą substancji, które warto wymienić jako przyszłość terapii przeciwdrobnoustrojowej, są inhibitory *quorum-sensing* (QSI). Jak już wcześniej podkreślano, mechanizm QS jest niezwykle istotny w uwalnianiu czynników wirulencji (25). Autoinduktory *Pseudomonas aeruginosa* są głównie laktony

N-acylohomoseryny (AHL). Leki hamujące zjawisko QS zablokują tworzenie biofilmu bakteryjnego, powodując jednocześnie, że układ immunologiczny gospodarza będzie mógł samodzielnie zwalczać drobnoustroje (24). Nie jest to koncepcja rodem z filmów science fiction, ponieważ tego typu mechanizmy mają miejsce naturalnie w przyrodzie. Bardzo istotnym faktem jest to, że QSI nie przyczyniają się do powstania szczepów o podwyższonej zjadliwości (24).

Arsenał broni przeciwko bakterii jest ograniczony i stale ulega modyfikacji naturalnej, czy też wynikającej z działań mających na celu ograniczenie wielolekooporności. Przykładem systemowego działania jest rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2022/1255 z dnia 19 lipca 2022 r. określające środki przeciwdrobnoustrojowe lub grupy środków przeciwdrobnoustrojowych zarezerwowane do leczenia niektórych zakażeń u ludzi zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2019/6 (38). Efektem rozporządzenia jest opracowanie listy antybiotyków, które mogą być stosowane wyłącznie w medycynie ludzkiej, a jednocześnie są zakazane w weterynarii.

Podsumowanie

Pałeczka ropy błękitnej występująca naturalnie w wodzie, powietrzu, glebie, a także stanowiąca element naturalnej mikroflory ludzi i zwierząt jest niezwykle niebezpiecznym patogenem. Jest wyposażona w naturalne mechanizmy, które stanowią o jej oporności. Bakteria ze środowiska zewnętrznego nabywa to, co najlepsze i najbardziej niebezpieczne z punktu widzenia medycyny ludzkiej i weterynarii. Narastające zjawisko lekooporności zmusza badaczy do wyłożonych prac nad nowymi sposobami zwalczania bakterii, w tym także *Pseudomonas aeruginosa*. Lekarze weterynarii mierzą się z tym patogenem choćby w przypadku hospitalizacji małych zwierząt. Zebrane w przedstawionym artykule informacje jednoznacznie wskazują, że *Pseudomonas aeruginosa* stanowi szczególne wyzwanie dla lekarzy klinicyistów, a także dla prowadzących badania naukowców. Jedynie połączenie wysiłków, racjonalne stosowanie leków i świadomość nierównej walki z patogenami może uchronić społeczeństwo przed problemem, jakim są szczepy patogenów odporne na wszelkie dostępne substancje.

Piśmiennictwo

- Jun S., Wassenaar T.M., Nookaew I., Hauser L., Wanchai V., Land M., Timm C.M., Lu T., Schadt Ch.W., Doktycz M.J., Pelletier D.A., Ussery D.W.: Diversity of *Pseudomonas* Genomes, Including *Populus*-Associated Isolates, as Revealed by Comparative Genome Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016, **82**, 375–383.
- Adaszek E., Górna M., Ziętek J., Kutrzuba J., Winiarczyk S.: Bakteryjne zakażenia szpitalne u psów i kotów. *Życie Wet.* 2009, **84**, 805–808.
- Antychowicz J., Pękala-Safińska A.: Stres i zależne od stresu bakteryjne choroby ryb. *Życie Wet.* 2015, **90**, 450–460.
- Couto G., Nelson R.: *Choroby wewnętrzne małych zwierząt*. Wyd. V, Edra Urban & Partner. 2016, t. 1–3.
- Sanchez S., McCrackin Stevenson M.A., Hudson C.R., Maier M., Buffington T., Dam Q., Maurer J.J.: Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infections in dogs. *J. Clin. Microbiol.* 2002, **40**, 3586–3595.
- Czyżewska-Dors E., Dors A., Pomorska-Mól M.: Właściwości biofilmu bakteryjnego warunkujące oporność na antybiotyki oraz metody jego zwalczania. *Życie Wet.* 2018, **93**, 765–771.
- Sillankorva S., Neubauer P., Azeredo J.: *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiBB-PF7A. *BMC Biotechnol.* 2008, **8**, art. 79.
- Vikram A., Bomberger J.M., Bibby K.J.: Efflux as a Glutaraldehyde Resistance Mechanism in *Pseudomonas fluorescens* Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015, **59**, 3433–3440.
- Boucher H.W., Talbot G.H., Bradley J.S., Edwards J.E., Gilbert D., Rice L.B., Scheld M., Spellberg B., Bartlett J.: Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2009, **48**, 1–12.
- Araos R., D'Agata E.: *Pseudomonas aeruginosa* and other *Pseudomonas* species. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2019, 2686–2699.
- Ben Haj Khalifa A., Moissenet D., Vu Thien H., Khedher M.: Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. *Ann Biol Clin. (Paris)*. 2011, **69**, 393–403.
- Idigo A.J., Wells J.M., Brown M.L., Wiener H.W., Griffin R.L., Cutter G., Shrestha S., Lee R.A.: Clinical risk factors for admission with *Pseudomonas* and multidrug-resistant *Pseudomonas* community-acquired pneumonia. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2022, **11**, art. 95.
- Klockgether J., Cramer N., Wiehlmann L., Davenport C. F., Tummeler B.: *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Front. Microbiol.* 2011, **2**, 150.
- Nolan Ch., Behrends V.: Sub-Inhibitory Antibiotic Exposure and Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotic (Basel)*. 2021, **10**, 1393.
- Alhazmi A.: *Pseudomonas aeruginosa* – Pathogenesis and Pathogenic mechanisms. *Int. J. Biol.* 2015, **7**, 44–67.
- Gallique M., Decoin V., Barbey C., Rosay T., Feuilloley M.G.J., Orange N., Merieau A.: Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 Type VI Secretion System to Biofilm Formation. *PLoS One*. 2017, **12**.
- Kołyński J., Jankowski S.: Systemy międzykomórkowej sygnalizacji u bakterii. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2005, **14**, 343–348.
- Garcia A.B., Percival S.L.: Zoonotic Infections: The Role of Biofilm. *Vet. Med.* 2011, **6**, 69–110.
- Moser C., Jensen P. O., Thomsen K., Kolpen M., Rybtkke M., Lauland A. S., Trøstrup H., Tolker-Nielsen T.: Immune Responses to *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. *Front. Immunol.* 2021, **12**, 625597.
- Thi M.T.T., Wibowo D., Rehm B.H.A.: *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, **21**, 8671.
- Vu B., Chen M., Crawford R.J., Ivanova E.P.: Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*. 2009, **14**, 2535–2554.
- Zhurina M.V., Gannesena A.V., Zdorovenko E.L., Plakunova V.K.: Composition and functions of the extracellular polymer matrix of bacterial biofilms. *Microbiology*. 2014, **83**, 713–722.
- Zhang Y., Hu Z.: Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with bacteriophages and chlorine. *Biotechnol. Bioeng.* 2013, **110**, 286–295.
- Brackman G., Coenye T.: Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Curr. Pharm. Des.* 2015, **21**, 5–11.
- Smith K.M., Bu Y., Suga H.: Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by synthetic autoinducer analogs. *Chem Biol.* 2003, **10**, 81–89.
- Moker N., Dean Ch.R., Tao J.: *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *J. Bacteriol.* 2010, **192**, 1946–1955.
- Greene C.E. (edit.): *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 3rd ed. Saunders Elsevier. 2006.
- Rzewuska M.: Antybiotykooporność Gram-ujemnych pałeczek wytwarzających beta-laktamazy. *Życie Wet.* 2009, **84**, 199–205.
- Holmes A.H., Moore L.S., Sundsfjord A., Steinbakk M., Regmi S., Karkey A., Guerin P.J., Piddock L.J.: Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*. 2016, **387**, 176–187.
- Berrazeg M., Jeannot K., Ntsogo Eguéné V.Y., Broutin I., Loeffert S., Fournier D., Plésiat P.: Mutations in β -Lactamase AmpC Increase Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to Antipseudomonal Cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015, **59**, 6248–6255.
- Zhang L., Mah T.F.: Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. *J. Bacteriol.* 2008, **190**, 4447–4452.
- Lee N.-Y., Ko W.-Ch., Hsueh P.-R.: Nanoparticles in the Treatment of Infections Caused by Multidrug-Resistant Organisms. *Front. Pharmacol.* 2019, **10**, 1153.
- Pejsak Z., Truszczyński M.: Racjonalne stosowanie chemioterapeutyków w terapii profilaktyce. *Życie Wet.* 2005, **80**, 642–645.
- Drago L., De Vecchi E., Nicola L., Colombo A., Guerra A., Gismondo M.R.: Activity of levofloxacin and ciprofloxacin in combination with cefepime, ceftazidime, imipenem, piperacillin-tazobactam and amikacin against different *Pseudomonas aeruginosa* phenotypes and *Acinetobacter* spp. *Chemother.* 2004, **50**, 202–210.
- Truszczyński M., Pejsak Z.: Antybiotyki zalecane w leczeniu chorób bakteryjnych zwierząt oraz zjawisko antybiotykooporności. *Życie Wet.* 2013, **88**, 101–104.
- Bagnicka E., Strzałkowska N., Józwiak A., Horbańczuk J. O., Krzyżewski J., Zwierzchowski L.: Peptydy przeciwdrobnoustrojowe w zwalczaniu patogenów opornych na powszechnie stosowane antybiotyki. *Med. Weter.* 2011, **67**, 512–526.
- Pyzik E., Radzki R.P., Urban-Chmiel R.: Experimental Phage Therapies in Companion Animals with a Historical Review. *Curr. Rev. Clin. Exp. Pharmacol.* 2021, **16**, 17–29.
- Urban-Chmiel R., Pyzik E., Dec M., Puchalski A., Marek A., Stepien-Pyśniak D., Nowacek A., Herman K.: Schyłek ery antybiotyków? Przykłady działań alternatywnych dla antybiotyków. *Życie Wet.* 2022, **97**, 445–450.
- Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2022/1255 z dnia 19 lipca 2022 r. określające środki przeciwdrobnoustrojowe lub grupy środków przeciwdrobnoustrojowych zarezerwowane do leczenia niektórych zakażeń u ludzi zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2019/6.

Lek. wet. Alina Wiśniewska, e-mail: ala77264@gmail.com