



Serotipizacija i analiza vrsta proizvedenih pigmenata kliničkih izolata *Pseudomonas aeruginosa*

Serotyping and analysis of produced pigments kinds by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates

Nataša Stanković Nedeljković*, Branislava Kocić†, Branislav Todorović†, Srbobran Branković‡, Snežana Mladenović Antić§

Zdravstveni centar „Aleksinac“, *Higijensko-epidemiološka služba, †Hirurško-ortopedska služba, Aleksinac, Srbija; ‡Medicinski fakultet, Niš, Srbija; §Institut za javno zdravlje, Niš, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Prema *International Antigenic Typing Scheme Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) deli se na 20 serotipova. *P. aeruginosa* jedan je od najvažnijih uzročnika bolničkih infekcija, pa je njegova serotipizacija važna iz epidemioloških razloga. Cilj ove studije bio je serotipizacija kliničkih izolata *P. aeruginosa*, analiza prisustva pojedinih serotipova *P. aeruginosa* u pojedinim bolesničkim materijalima i analiza proizvodnje fluorescina i piocijanina kod različitih serotipova. **Metode.** U mikrobiološkoj laboratoriji Zdravstvenog centra „Aleksinac“ ispitana su 233 izolata *P. aeruginosa*. Izolati *P. aeruginosa* presejavani su na: pseudomonas izolacioni agar, pseudomonas agar bazu, acetamidni agar, asparagin prolin bujon, pseudomonas asparagin bujon, Bushnell-Haasov agar, cetrimid agar bazu, King A i King B podlogu, podlogu za proizvodnju piocijanina, podlogu za proizvodnju fluorescina i triptikaza soja agar (Himedia). Za aglutinaciju korišćeni su polivalentni i monovalentni serum (Biorad). Proizvodnja pigmenata praćena je na osnovu porasta na podlogama za proizvodnju fluorescina i piocijanina. **Rezultati.** Serološki, identifikovani su sledeći serotipovi: O1, O3, O4, O5, O6, O7, O8, O10, O11 i O12. Najprisutniji bili su serotipovi O1 (38%), O11 (19%) i O6 (8,6%). Izolati koji nisu pokazali pozitivnu reakciju aglutinacije ni sa jednim serumom činili su 18,6% (42) uzoraka, dok je 21 izolat aglutinisao samo sa polivalentnim serumima. Najveći broj izolata *P. aeruginosa* proizvodio je fluorescin (58,54%), 53 (22,94%) piocijanin, a 49 (21,21%) sojeva oba pigmenta. **Zaključak.** *P. aeruginosa* izolovan je najčešće iz urina, sputuma i drugih bolesničkih materijala. Najčešće izolovani serotipovi *P. aeruginosa* bili su O1, O6 i O11. Najveći broj izolata *P. aeruginosa* proizvodio je fluorescin (58,54%) dok je 22,94% proizvodio piocijanin, a 21,21% oba pigmenta.

Ključne reči:

pseudomonas aeruginosa; infekcija, intrahospitalna; serotipizacija.

Abstract

Background/Aim. *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) is divided into 20 serotypes on the base of the International Antigenic Typing Scheme. *P. aeruginosa* serotyping is important because of few reasons but epidemiological is the most important. The aim of the study was serotyping of *P. aeruginosa* clinical isolates, analysing of single clinical isolates *P. aeruginosa* present in the particular samples, and analysing of pyocyanin and fluorescin production in different isolates of *P. aeruginosa*. **Methods.** A total of 233 isolates of *P. aeruginosa*, isolated in the microbiological laboratory of the Health Center “Aleksinac”, Aleksinac, were examined. *P. aeruginosa* isolates were put on the pseudomonas isolation agar, pseudomonas agar base, acetamid agar, asparagin prolin broth, pseudomonas asparagin broth, Bushnell-Haas agar, cetrimid agar base, King A and King B plates, plates for pyocyanin production, plates for fluorescin production and tripticasa soya agar (Himedia). Polyvalent and monovalent serums were used in the agglutination (Biorad). Pigment production was analysed on the bases of growth on the plates for pyocyanin and fluorescin production. **Results.** Serologically, we identified the serovars as follows: O1, O3, O4, O5, O6, O7, O8, O10, O11 and O12. O1 (38%) was the most often serovar, then O11 (19%) and O6 (8.6%). A total of 18.6% (42) isolates did not agglutinate with any serum, whereas 21 isolates agglutinated only with polyvalent serum. The majority of *P. aeruginosa* isolates produced fluorescin, 129 (58.54%), 53 (22.94%) produced pyocyanin whereas 49 (21.21%) isolates produced both pigments. **Conclusion.** *P. aeruginosa* was isolated most of the from urine, sputum and other materials. The majority often serovars were O1, O6 and O11. The most of isolates produced fluorescin (58.54%), while 22.94% produced pyocyanin and 21.21% both pigments.

Key words:

pseudomonas aeruginosa; cross infection; serotyping.

Uvod

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) spada u vodeće uzročnike bolničkih infekcija zbog svojih fizioloških osobina¹⁻¹¹. Tipizacija izolata *P. aeruginosa* važna je zbog epidemioloških ispitivanja jer omogućava lakše praćenje prisustva pojedinih serotipova, pomaže da se lociraju izvori infekcija i epidemija i prati rezistencija bacila¹². Fenotipske metode tipizacije su: serotipizacija, biotipizacija, mikrobiološka ispitivanja osetljivosti na antibiotike, bakteriofag tipizacija, piocin tipizacija, multilokularna enzimska elektroforeza (MEE), masena spektrofotometrija (MS), DNAb tipizacija i druge^{13,14}. Genotipske metode su: direktna i reverzna hibridizacija, ribotipizacija, analiza restrikcionih endonukleaza (REA), PSR fingerprinting, analiza multilokularnih promenljivih gena, ispitivanje varijabilnih promenljivih parova (MLVA), tipizacija pojedinih sekvenci (SLST), genotipizacija profila plazmida (SNP) i druge¹⁵. Rezultati serotipizacije *P. aeruginosa* koriste se i u imunološkim, genetičkim i biohemijским ispitivanjima¹⁶⁻²¹.

P. aeruginosa proizvodi dve različite vrste LPS, označene kao A i B. Razlika u građi B-antigena deli *P. aeruginosa* na 20 različitih serotipova, kao što je to definisano u *International Antigenic Typing Scheme*^{22,23}. Temelji serotipizacije *P. aeruginosa* postavljeni su početkom prošlog veka. Aoki, 1926. god, aglutinacionom metodom klasifikovao je 50 kliničkih izolata u 18 serotipova. Kanzaki, 1934. god, klasifikovao je 102 izolata u 34 serotipa čime je izmenjena prvobitna klasifikacija. Wron, 1961, uspostavio je podelu na osnovu 13 antiseruma, a sojevi su podeljeni na tri grupe: A (tipovi 1, 3, 4, 6, 10), B (tipovi 2, 5, 7, 8) i C (tipovi 9, 11, 12, 13). U Japanu 1976. Homma klasifikovao je 13 serotipa *P. aeruginosa* aglutinacionom slajd metodom. Zatim, Terada i sar. 1977. god. predložili su grupisanje 17 serotipova u 13 grupa, od A do M. Kao dodatak tome, grupu N predložili su Terada i Sugiyama 1982. god. Liu je predložio internacionalni antigen tipizirajući sistem (IATS) 1983. god. Na osnovu termostabilnih antigena uvedena su tri nova serotipa, a 1990. još tri serotipa²⁴⁻²⁷.

Proizvodnja pigmenta jedna je od najvažnijih karakteristika *P. aeruginosa*. Plavičasti pigment, piocijanin, po hemijskom sastavu je derivat fenazina. Struktura fluorescentnog žutozelenog pigmenta pioverdina uključuje dihidrosikinolinske derivate, priključene tip-specifične peptide, obično karboksilnu kiselinu ili amide i kratke tip specifične peptide (6–12 aminokiselina). Peptidni deo molekula isti je kod svih sojeva, a postoji razlika u acil grupi. Postoje tri tipa pioverdina a, označeni kao I, II i III²⁸.

Cilj ove studije bio je serotipizacija kliničkih izolata *P. aeruginosa*, analiza prisustva pojedinih serotipova *P. aeruginosa* u različitim bolesničkim materijalima, kao i analiza proizvodnje fluorescina i piocijanina kod pojedinih serotipova i u različitim bolesničkim materijalima.

Metode

Istraživanjem, koje je sprovedeno od avgusta do decembra 2009. god, obuhvaćena su 233 klinička izolata *P. aeruginosa*, izolovana u mikrobiološkoj laboratoriji Higijen-

ske-epidemiološke službe Zdravstvenog centra „Aleksinac“ i Instituta za javno zdravlje u Nišu. Izolati su uzeti iz sledećih bolesničkih materijala: urinokultura, briseva iz rana, uva, grla i nosa, sputuma, punktata i sekreta dojke.

Od svih bolesnika kod kojih je izolovan *P. aeruginosa* anketom su uzimani anamestički podaci. Bolesnicima su postavljana pitanja u zavisnosti od toga iz kog bolesničkog materijala je izolovan *P. aeruginosa*. Bolesnici kod kojih je *P. aeruginosa* izolovan iz urina, pitani su da li su imali neku operaciju urogenitalnog trakta i da li nose kateter. Ako je *P. aeruginosa* izolovan iz uzoraka respiratornog trakta bolesnici su pitani da li su odlazili na inhalacije u zdravstvene ustanove. Bolesnici kod kojih je uzročnik izolovan iz briseva iz rana odgovarali su na pitanje da li su operisani i da li odlaze na previjanje u neku zdravstvenu ustanovu.

Izolacija i identifikacija bakterija

Izolacija *P. aeruginosa* iz ispitivanih bolesničkih materijala vršena je klasičnim mikrobiološkim metodama²⁹. Identifikacija *P. aeruginosa* obavljena je na osnovu njihovih mikroskopskih, kulturalnih i fiziološko-biohemijških osobina. Izolati su presejavani na podloge specijalizovane za *P. aeruginosa*: pseudomonas agar bazu, acetamidni agar, pseudomonas izolacioni agar, asparagin prolin bujon, pseudomonas asparagin bujon, Bushnell-Haasov agar, cetrimid agar bazu, King A i King B podlogu, podlogu za proizvodnju piocijanina, podlogu za proizvodnju fluorescina i triptikaza soja agar (Himedia). Zasejane podloge inkubisane su 24 časa aerobno.

Aglutinacija

Izolati *P. aeruginosa* aglutinirani su sa triptikaza soja agara, slajd aglutinacionom tehnikom^{14,16}. Za aglutinaciju korišćeni su polivalentni i monovalentni zečji antiserumi (Biorad). Set za aglutinaciju sadrži četiri polivalentna i 16 monovalentnih seruma. Polivalentni serumi su PMA, PMF, PME i PMC. Grupa PMA obuhvata sledeće serotipove: O1, O3, O4 i O6 a, PME O2, O5, O15 i O16, dok grupa PMC obuhvata O9, O10, O13 i O14, a PMF O7, O8, O11 i O12.

Aglutinacija je opisivana kao pozitivna ako je dolazilo do jasne reakcije aglutinacije na pločici nakon mešanja kulture i seruma. Ispitivani izolati prvo su aglutinirani sa polivalentnim serumima, a nakon toga sa monovalentnim. Izolati su označavani kao netipibilni (NT), ako su bili poliaglutibilni, autoaglutibilni ili nisu pokazali pozitivnu reakciju aglutinacije ni sa jednim serumom. Neki izolati pokazali su pozitivnu reakciju aglutinacije samo sa polivalentnim serumima, ali ne pojedinačnim.

Proizvodnja pigmenta

Proizvedeni pigmenti ispitivanih izolata bili su uočljivi na skoro svim korišćenim podlogama. S obzirom na to da neki izolati luče više vrsta pigmenta, rezultati proizvodnje pigmenta očitavani su samo sa specijalizovanih podloga za proizvodnju pigmenta: pseudomonas podlozi za diferencijaciju fluorescina i pseudomonas podlozi za diferencijaciju piocijanina. Proizvodnja pigmenta očitavana je na osnovu izgleda i boje kolonija na specijalizovanim podlogama. Proizvodnja fluorescina očitavana je kao pozitivna ako je dolazilo

do proizvodnje zelenih fluorescentnih kolonija na pseudomonas podlozi za diferencijaciju fluorescina (slika 1). Proizvodnja piocijanina očitavana je kao pozitivna ako je dolazilo do proizvodnje plavog pigmenta na pseudomonas podlozi za proizvodnju piocijanina. Neki izolati proizvodili su fluorescin, drugi piocijanin, a neki oba pigmenta. Metoda je orijentaciona i pokazuje koju vrstu pigmenta, kao faktora virulencije proizvodi *P. aeruginosa*.



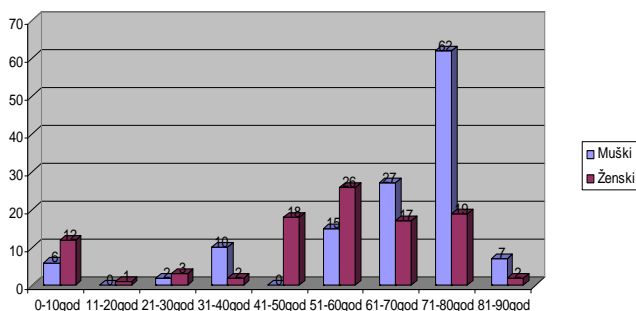
Sl. 1 – Izgled kolonija *P. aeruginosae* na pseudomonas podlozi za diferencijaciju fluorescina

Statistička obrada podataka

Datoteka je formirana u računar u programu SPSS 12,0 i pomoću njega je vršena analiza podataka. Za analizu dobijenih rezultata primenjeni su χ^2 test, C-koeficijent kontigencije i test parametrijskih i neparametrijskih malih i velikih uzoraka.

Rezultati

U toku ispitivanja analizirana su 233 izolata *P. aeruginosa*, izolovana od 110 ispitanika. U analiziranoj grupi bilo je 57 (51,81%) muškaraca i 53 (48,18%) žena ($\chi^2 = 0,14$; $C = 0,03$). Od muškaraca uzeta su 133 (57,08%) uzorka, a od žena 100 (42,91%) ($t = 1,06$; $p > 0,01$). Pojedini ispitanici imali su veći broj uzoraka: dva, tri, jedan ispitanik čak 14 i svi su prikazani u radu. Demografske karakteristike ispitivane populacije prikazane su na slici 2. Ambulantno uzorkovani materijali činili su većinu uzoraka (90,12%).



Sl. 2 – Starosne i demografske karakteristike ispitivane populacije

P. aeruginosa najčešće je izolovan kod ispitanika starosti od 50 do 80 godine, koji su činili 71,7% populacije. Kod ispitanika u 8. deceniji bacil je izolovan iz 35% uzoraka, u 7. kod 19%, tako da je u te dve grupe bilo 54% ispitanika.

Bolesnički materijali iz kojih je izolovan *P. aeruginosa* prikazani su u tabeli 1. Bacil je najčešće izolovan iz urinokultura (36,79%), briseva rana (29%), sputuma (17,74%), dok su sojevi iz brisa grla, uva i nosa, sekreta dojke i punktata bili manje zastupljeni ($\chi^2 = 31,41$; $C = 0,34$) (tabela 1).

Tabela 1
Prikaz različitih vrsta uzoraka iz kojih je izolovan *P. aeruginosa*

Vrsta uzorka	n	%
Urinokultura	85	36,79
Bris rane	67	29
Sputum	41	17,74
Bris grla	19	8,22
Bris uva	14	6,06
Bris nosa	3	1,2
Sekret dojke	1	0,43
Punktat	1	0,43

Identifikovani serotipovi pripadali su svim serološkim grupama: PMA, PME, PMF i PMC. Najveći broj identifikovanih serotipova pripadao je serogrupama PMA (49,6%) i PMF (21,1%), a serotipovi koji su pripadali drugim bili su ređi ($\chi^2 = 37,64$; $C = 0,4$) (tabela 2).

Tabela 2
Grupna pripadnost identifikovanih serotipova *P. aeruginosa*

Serološka grupa	n	%
PMA	114	49,6
PME	19	8,2
PMC	5	2,2
PMF	49	21,1

Identifikovani su sledeći serotipovi: O1, O3, O4, O5, O6, O7, O8, O10, O11 i O12. Reakcijom aglutinacije najčešće su identifikovani serotipovi O1, O11, O6, a ostali serotipovi bili su prisutni u manjem procentu (tabela 3). Serotip O1 bio je prisutan u 38% uzoraka, O11 u 19% a O6 u 8,6%. Ukupno, 21 izolat aglutinisao je samo sa polivalentnim, ali ne i monovalentnim serumima. Izolati koji su pokazali pozitivnu reakciju aglutinacije samo sa grupnim serumima reagovali su najčešće sa grupnim PME serumom (7,8%). Mali broj izolata reagovao je samo sa PMA (0,4%) i PMF (0,9%) serumom. Ukupno, 43 (18,6%) izolata nije aglutinisalo ni sa jednim grupnim serumom i oni su označeni kao netipibilni. Dva izolata kod jednog ispitanika pokazala su pozitivnu reakciju aglutinacije sa dva različita antiseruma i oni su tako i prikazani.

Analizom pojedinačnih uzoraka uočava se da je u urinokulturama najizolovaniji serotip O11 (11,2%) ($\chi^2 = 9,21$; $C = 0,31$ za $p > 0,95$). Ukupno, 6,5% izolata aglutinisalo je samo sa PME serumom, dok 8,6% izolata nije aglutinisalo ni sa jednim serumom. Serotip O1 bio je prisutan kod 6,5% slučajeva u urinokulturama. Ostali serotipovi bili su ređe prisut-

Tabela 3

Prevalencija pojedinih serotipova *P. aeruginosa* i vrste uzoraka iz kojih su izolovani

Vrsta uzorka	Serotipovi <i>P. aeruginosa</i>													
	O1	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O10	O11	O12	NT	PME	PMA	PMF
Urinokultura														
broj sojeva	15	–	4	1	4	–	–	–	26	–	20	15	–	–
%	6,5	–	1,7	0,4	1,7	–	–	–	11,2	–	8,6	6,5	–	–
Bris rane														
broj sojeva	21	1	1	–	12	–	–	–	15	1	13	1	1	1
%	9	0,4	0,4	–	5,2	–	–	–	6,5	0,4	5,6	0,4	0,4	0,4
Sputum														
broj sojeva	35	–	–	–	2	–	–	–	2	–	2	–	–	–
%	15,1	–	–	–	0,9	–	–	–	0,9	–	0,9	–	–	–
Bris iz grla														
broj sojeva	8	–	–	–	2	1	–	–	1	–	6	–	–	1
%	3,5	–	–	–	0,9	0,4	–	–	0,4	–	2,6	–	–	0,4
Bris iz nosa														
broj sojeva	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–
%	0,9	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,4	–	–	–
Bris iz uva														
broj sojeva	5	–	–	–	–	–	1	5	–	–	1	2	–	–
%	2,2	–	–	–	–	–	0,4	2,2	–	–	0,4	0,9	–	–
Sekret dojke														
broj sojeva	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
%	0,4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Punktat														
broj sojeva	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
%	–	–	–	–	0,4	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Ukupno														
broj sojeva	87	1	5	1	21	1	1	5	44	1	3	4	18	1
%	38	0,4	2,2	0,4	9,1	0,4	0,4	2,2	19	0,4	18,6	7,8	0,4	0,9

ni. U brisevima rane bio je najčešće prisutan serotip O1 (9%), pa O11 (6,5%) i O6 (5,2%) ($\chi^2 = 8,5$; $C = 0,33$; $p > 0,95$). U ovim uzorcima 5,6% izolata nije aglutinisalo ni sa jednim grupnim serumom. U sputumima serotip O1 činio je 15,1% izolata, a ređe su identifikovani O6 i O11 (u po 4,87% uzoraka) ($\chi^2 = 25,06$; $C = 0,78$ za $p > 0,05$).

Najveći broj izolata *P. aeruginosa* produkovao je fluorescin, 129 (58,54%), dok je 53 (22,94%) produkovalo piocijanin. Ukupno 49 izolata produkovalo je oba pigmenta (21,21%) ($\chi^2 = 17,58$; $C = 0,26$; $p > 0,001$). Proizvodnja pigmenta kod izolata prikazana je u tabeli 4.

Ako analiziramo proizvodnju pigmenta *P. aeruginosa* kod različitih uzoraka, uočava se da su fluorescin najučestalije proizvodili izolati iz urinokultura (64,4%), ($\chi^2 = 14,49$;

$C = 0,37$; $p > 0,001$), briseva rana (51,5%), ($\chi^2 = 1,9$; $C = 0,2$; $p > 0,95$) i sputuma (46,7%), ($\chi^2 = 4,002$, $C = 0,23$; $p > 0,95$), a izolati iz drugih bolesničkih materijala ređe (tabela 5).

Anamnestički podaci dobijeni od bolesnika kod kojih je izolovan *P. aeruginosa* govore da su svi imali kontakte sa zdravstvenim ustanovama. Bolesnici kod kojih je bacil izolovan iz urina operisali su prostatu ili su nosili kateter. Ispitanici kod kojih je bacil izolovan iz sputuma i briseva iz grla i nosa, odlazili su na inhalacije. Ispitanici kod kojih je *P. aeruginosa* bio prisutan u uzorcima briseva rana, sekreta dojke i punktata odlazili su na previjanje u hiruršku ambulantu ili bili hospitalizovani u hirurško i ginekološko odeljenje.

Tabela 4

Proizvodnja pigmenta pojedinih serotipova *P. aeruginosa*

Vrsta uzorka	Serotipovi <i>P. aeruginosa</i>													
	O1	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O10	O11	O12	NT	PME	PMA	PMF
Fluorescin														
broj sojeva	48	1	2	1	12	1	1	–	31	–	20	11	–	1
%	55,2	100	40	100	57,1	100	100	–	70,4	–	46,5	61,1	–	50
Piocijanin														
broj sojeva	16	–	3	–	6	–	–	3	6	1	18	–	–	–
%	18,4	–	60	–	28,6	–	–	66,6	13,6	100	41,8	–	–	–
Fluorescin i piocijanin														
broj sojeva	23	–	–	–	3	–	–	2	7	–	5	7	1	1
%	26,4	–	–	–	14,3	–	–	33,3	15,9	–	11,6	38,9	100	50
Ukupno														
broj sojeva	87	1	5	1	21	1	1	5	44	1	43	18	1	2
%	38	0,4	2,2	0,4	9,1	0,4	0,4	2,2	19	0,4	18,6	7,8	0,4	0,9

Tabela 5

Proizvodnja pigmenta *P. aeruginose* kod različitih uzoraka

Vrsta pigmenta	Vrsta uzorka		Vrsta uzorka				Punktat	Sekret dojke
			Urinokultura	Sputum	Bris			
	rana	uva			grla	nosa		
Fluorescin broj sojeva	56	21	35	3	9	1	–	1
%	64,4	46,7	51,5	37,5	45	100	–	100
Piocijanin broj sojeva	9	16	21	1	4	–	–	–
%	10,4	35,6	30,9	12,5	20	–	–	–
Fluorescin i piocijanin broj sojeva	22	8	12	4	7	–	1	–
%	25,3	17,8	17,6	50	20	–	100	–

Diskusija

Svaka od metoda tipizacije *P. aeruginosa* ima i prednosti i nedostatke. Ispitivanja osjetljivosti dolaze do izražaja kod sojeva koji su multirezistentni. Bakteriocin tipizacija nije ponovljiva¹³. Nedostaci bakteriofag tipizacije su slabija ponovljivost i povremeno nedovoljna dostupnost bakteriofaga. Analiza plazmidskih ispitivanja daje brze rezultate, ali ta metoda može biti nedovoljno osjetljiva¹³. Analize DNK su najbolje. Ipak, najpotpuniji rezultati dobijaju se kombinacijom više metoda. *Study Group for Epidemiologic Markers* (ESGEM) u okviru *European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID) bavi se standardizacijom tipizacionih metoda¹⁵. Neophodna je koordinacija metodoloških postupaka koji se izvode u različitim delovima sveta.

Serotipizacija *P. aeruginosa* je ponovljiva, jednostavna za izvođenje, brzo se izvodi i osjetljiva je. U odnosu na druge metode relativno je jeftina. Za većinu drugih metoda ispitivanja potrebna je dodatna oprema, te je serotipizacija adekvatna tipizaciona metoda za epidemiološka ispitivanja.

Serotipizacija *P. aeruginosa* ima i neka ograničenja. Izolati koji su neaglutibilni, poliaglutibilni ili autoaglutibilni označavaju se kao netipibilni¹⁶. Neki izolati reaguju samo sa polivalentnim, a ne pojedinačnim serumima. Serotizacija može biti otežana kod izolata koji su kultivisani na krvnim agar pločama ili nakon supkultivacije. Kod ovih izolata može se desiti poliaglutibilnost. U tim slučajevima preporučuje se zagrevanje izolata 10 min na 120°C, pa, nakon hlađenja, ponovno izvođenje reakcije aglutinacije¹². Izolati kod hroničnih bolesti, naročito kod cistične fibroze, zbog smanjene količine lipopolisaharida (LPS), preciznije zbog manjka D-glukoze i L-ramnoze, ne mogu aglutinisati²². Soler i sar.²⁴ bavili su se serotipizacijom netipibilnih izolata *P. aeruginosa*. Aglutinisalo je 108 izolata iz 14 različitih bolnica. Među ovim izolatima bili su najzastupljeniji O1 i O13. Mogućnost aglutinacije kod netipibilnih izolata povećava se ako se u glikozni bujon sa kulturom *P. aeruginosa* doda amikacin u količini od 1/6 minimalne inhibitorne koncentracije za taj soj.

Serotipovi O2, O5, O16, O18 i O20, koji čine drugu serogrupu, pokazuju imunohemijski ukrštenu reaktivnost, a hemijski se razlikuju među sobom na osnovu tipa glikozidne

veze ili izomera monosaharida i po prisustvu ili odsustvu acetil supstituenata u šećerima antigena²⁹.

P. aeruginosa u našem ispitivanju nije bio statistički značajnije prisutan ni kod jednog pola. Bacil je izolovan sa najvećom statističkom značajnošću kod starijih ispitanika, žena u 6. deceniji (11,2%) i muškaraca u 7. (11,7%) i 8. deceniji (26,8%) ($\chi^2 = 22,13$; $C = 0,29$).

P. aeruginosa najčešće je izolovan iz urina, rana i uzoraka respiratornog trakta: sputuma i brisa grla i nosa. Identifikovani su sledeći serotipovi: O1, O3, O4, O5, O6, O7, O8, O10, O11 i O12. Veliki broj prisutnih serotipova opravdava primenu serotipizacije kao tipizacione metode koja se primenjuje u kontroli i nadzoru nad infekcijama, posebno bolničkim. Prema podacima američkog Centra za kontrolu bolesti *Pseudomonas* spp. je na drugom mestu u bolničkim infekcijama u SAD (od gram-negativnih mikroorganizama *E. coli* izaziva 10% infekcija, vrste roda *Pseudomonas* 8%, *Enterobacter* 7%, *Proteus* 4%, *Klebsiella* 3% i to kod infekcija kože i sluznica, respiratornog sistema mokraćnog sistema³⁰. Kada se ovome doda i činjenica da je otporan na uslove okoline, na kvarterne amonijeve baze, a osjetljiv na kiseline i hlorne preparate, onda ova ubikvitarna bakterija, koja se može naći i u probavnom sistemu ljudi, predstavlja veoma značajnog izazivača bolničkih infekcija, pre svega kod imunokompromitovanih³¹. Još uvek nema dovoljno podataka o kretanju pojedinih serotipova u našoj sredini, naročito u bolničkoj. Osim serotipizacije preporučuje se primena i neke dodatne metode, analiza osjetljivosti na antibiotike, na primer, ili genetička ispitivanja.

Rezultati našeg ispitivanja donekle se razlikuju od rezultata ispitivanja koje su obavili Tomanović i sar.³² 1991. Ispitivana je proizvodnja piocijanina, a serotipizacijom sojeva *P. aeruginosa* došlo se do novih saznanja o bolničkim infekcijama u našoj zemlji. Analizirano je 235 izolata od 131 ispitanika. Najčešće identifikovani serotipovi bili su O11 (21%), O6 (18%) i O12 (16%)³².

Različiti serotipovi preovlađuju u pojedinim delovima sveta i imaju različiti klinički značaj^{33–38}. Jamasbi i Proudfoot³⁹ vršili su serotipizaciju 167 izolata *P. aeruginosa*, dobijenih iz Ohajo bolnice, zajedno sa ispitivanjem osjetljivosti i genetskim ispitivanjima (PSR). Serotipizacija je vršena tehnikom slajd aglutinacije. Od 167 sojeva, 25 nije bilo tipibilno. Serotip O11 bio je najzastupljeniji, dok serotipovi O8, O12, O13 i O17 nisu detektovani.

Winstanley i sar.⁴⁰ vršili su fenotipska i genotipska ispitivanja 63 izolata *P. aeruginosa* koji su izazivali ulcerozni keratitis. Ispitivani su izolati iz šest bolnica iz Londona, Birminghama, Njukastla, Bristola, Mančestera i Liverpoola. Konačna identifikacija izolata vršena je pomoću PCR testa za *exoA* gen. Serotipizacija je obavljena komercijalnim kompletom Biorad. Identifikovano je 59 od 63 izolata. Preostala četiri izolata aglutinisala su polivalentni PME serum, ali ne monovalentne serume. Ukupno, 61% izolata pripadalo je serotipovima O1 i O11. Dominantni serotipovi O1 i O11 bili su povezani sa tipom a flagelina.

Ispitivanje u Ljubljani obuhvatilo je 208 kliničkih izolata *P. aeruginosa*. Vršena je serotipizacija i ispitivanja osetljivosti na antibiotske lekove. Kod 16 izolata vršena su i genetička ispitivanja. Najzastupljeniji bio je serotip O11 (36% izolata), pa O6 (14,4% izolata). Ukupno 25,6% izolata pripadalo je drugim serotipovima, a 20,2% aglutinisalo je sa više seruma. Rezišencija na antibiotike bila je najveća kod serotipa O11³⁶.

Autori iz Indije ispitivali su 19 serotipova *P. aeruginosa* koji su korišćeni da se njima eksperimentalno izazovu urinarne infekcije kod miša. Osim serotipizacije merili su nivo enzima koji su važni faktori patogenosti: proteaze, elastaze, alginate, hemolizin, piohelin, pioverdin i fosfolipaze C. Serotipizacijom najčešće je identifikovan serotip O11. Svi izolati lučili su ispitivane enzime i njihova proizvodnja opisivana je kao niska i visoka. Uočena je najveća podudarnost između proizvodnje hemolizina i patogenog efekta bakterije⁴¹.

Pigmenti *P. aeruginosa* na različite načine učestvuju u nastanku i održavanju lezija u inflamiranom tkivu. Pocijanin je toksičan za respiratorni epitel i deluje na strukturu ćelija i funkciju pila. Služi kao ćelijski transmitter koji učestvuje u regulaciji ekspresije gena. Pocijanin i njegov derivat piohelin vezuju se za jone gvožđa, pa tako omogućavaju opstanak *P. aeruginosa*. Pioverdin je toksičan za respiratorne ćelije. Utiče na pokretljivost ćelija i narušava integritet membrane. Deluje baktericidno na mnoge bakterije. Zato proizvodnja pigmenta nije samo fenotipska karakteristika, nego ukazuje i na nivo patogenosti pojedinog soja.

Analizom proizvodnje pigmenta došli smo do saznanja da su izolati *P. aeruginosa* statistički značajnije lučili fluorescein (79,75%) nego pocijanin (44,14%). Najčešće identifikovani serotip O1 pratila je proizvodnja fluoresceina kod 55,2% uzoraka, O11 kod 70,4%, a O6 kod 57,1%. Ako se *P. aeruginosa* razvija u atmosferi u kojoj nema dovoljno kiseonika, može se desiti da se pigment ne uočava, pošto se nalazi u leuko obliku. Takve kulture treba izložiti dejstvu vazduha jer pigment prelazi u oksidisan oblik i uočava se. Ako ni to ne pomogne, pomoću testa citohrom-oksidge može se proveriti da li soj uopšte proizvodi pigment²⁸.

Lamont i Martin²⁸ ispitivali su 14 gena za koje se pretpostavlja da su vezani za proizvodnju pioverdina. Sintetisane su jedinice sa mutantnim ispitivanim genima. Identifikovano je osam novih pvd gena, pored šest starih. Prisustvo homolognih pvd gena određivano je Southern blot analizama. Pet pvd gena bilo je ograničeno na sojeve *P. aeruginosa* koji proizvode isti pioverdin kao serotip O1, ukazujući da oni direktno sintetišu tip-specifične peptide. Ostali geni bili su prisutni kod svih serotipova *P. aeruginosa*. Geni neophodni za sintezu pioverdina najbolje su opisani kod serotipa O1 i nalaze se na 47 min na genetičkoj mapi. Odvojeni klaster četiri gena (pvcABCD) na 66–70 min na genetičkoj mapi potreban je za sintezu pioverdina. Pvc mutanti su sposobni da sintetišu pioverdin, pa ovi geni nisu neophodni za sintezu pigmenta.

Zaključak

Najveći broj kliničkih izolata *P. aeruginosa* potiče iz urinokultura, briseva rana i sputuma. Identifikovani su sledeći serotipovi: O1, O3, O4, O5, O6, O7, O8, O10, O11 i O12. Najčešće izolovani serotipovi *P. aeruginosa* su O1, O11 i O6. Analizom proizvodnje pigmenta ustanovljeno je da većina izolata proizvodi fluorescein (54,47%), manji broj proizvodi oba pigmenta, a najmanji broj sojeva proizvode pocijanin. Serotipizacija *P. aeruginosa* je ponovljiva, jednostavna za izvođenje, brza osetljiva je i prikladna za epidemiološka ispitivanja. S obzirom na veliki broj identifikovanih serotipova preporučuje se pronalaženje izvora infekcija i praćenje kretanja pojedinih serotipova u našoj populaciji.

L I T E R A T U R A

1. Severino P, Magalhães VD. The role of integrins in the dissemination of antibiotic resistance among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from an intensive care unit in Brazil. *Res Microbiol* 2002; 153(4): 221–6.
2. Loughlin MF, Jones MV, Lambert PA. *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not to clinically relevant antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49(4): 631–9.
3. Li L, Ledizet M, Kar K, Koski RA, Kazmierczak BI. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for rapid and quantitative assessment of Type III virulence phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2005; 4: 22.
4. Worgall S, Krause A, Qin J, Job J, Hackett NR, Crystal RG. Protective immunity to *Pseudomonas aeruginosa* induced with a capsid-modified adenovirus expressing *P. aeruginosa* OprF. *J Virol* 2007; 81(24): 13801–8.
5. Komiyama K, Habbick BF, Martin T, Tumber SK. Characterization by pyocine typing and serotyping of oral and sputum strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *Can J Microbiol* 1987; 33(3): 221–5.
6. Loureiro MM, de Moraes BA, Mendonca VL, Quadra MR, Pinheiro GS, Asensi MD. *Pseudomonas aeruginosa*: study of antibiotic resistance and molecular typing in hospital infection cases in a neonatal intensive care unit from Rio de Janeiro City, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(3): 387–94.
7. Albrecht MT, Wang W, Shamova O, Lehrer RI, Schiller NL. Binding of protegrin-1 to *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Respir Res* 2002; 3: 18.
8. Estabbanati HK, Kashani PP, Ghanaatpisheb F. Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. *Burns* 2002; 28(4): 340–8.

9. Engländer M, Harell M, Guttman R, Segal S. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* ear infections related to outcome of treatment. *J Laryngol Otol* 1990; 104(9): 678–81.
10. Parks QM, Young RL, Poch KR, Malcolm KC, Vasil ML, Nick JA. Neutrophil enhancement of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: human F-actin and DNA as targets for therapy. *J Med Microbiol* 2009; 58(Pt 4): 492–502.
11. O'May CY, Sanderson K, Roddam LF, Kirov SM, Reid DW. Iron-binding compounds impair *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, especially under anaerobic conditions. *J Med Microbiol* 2009; 58(Pt 6): 765–73.
12. Ninane G, Harper PB. The in vitro activity of ceftazidime against a multi-resistant serotype 12 *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection* 1983; 11 Suppl 1: S16–9.
13. Jamasbi JR. Frequency and distribution of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes O:3, O:6, O:11 in three northwestern Ohio hospitals as determined by ELISA using specific monoclonal antibodies. *Ohio J Sci* 1999; 99(2): 10–5.
14. Al-Dujaili HA, Harris DM. Evaluation of commercially available antisera for serotyping of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Path* 1974; 27(7): 569–71.
15. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggen S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(Suppl 3): 1–46.
16. Perumal D, Lim CS, Chow VT, Sakbarkar KR, Sakbarkar MK. A combined computational-experimental analyses of selected metabolic enzymes in *Pseudomonas* species. *Int J Biol Sci* 2008; 4(5): 309–17.
17. Faure K, Shimabukuro D, Ajayi T, Allmond LR, Sawa T, Wiener-Kronish JP. O-antigen serotypes and type III secretory toxins in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2003; 41(5): 2158–60.
18. McLean MD, Almqvist KC, Niu Y, Kimmel R, Lai Z, Schreiber JR, et al. A human anti-*Pseudomonas aeruginosa* serotype O6ad immunoglobulin G1 expressed in transgenic tobacco is capable of recruiting immune system effector function in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(9): 3322–8.
19. Kaluzny K, Abeyratne PD, Lam JS. Coexistence of two distinct versions of O-antigen polymerase, Wzy-alpha and Wzy-beta, in *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O2 and their contributions to cell surface diversity. *J Bacteriol* 2007; 189(11): 4141–52.
20. Grothues D, Koopmann U, von der Hardt H, Tümmler B. Genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* indicates colonization of cystic fibrosis siblings with closely related strains. *J Clin Microbiol* 1988; 26(10): 1973–7.
21. Elaichouni A, Verschaegen G, Claeys G, Devleeschouwer M, Godard C, Vaneeboutte M. *Pseudomonas aeruginosa* serotype O12 outbreak studied by arbitrary primer PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32(3): 666–71.
22. Raymond CK, Sims EH, Kas A, Spencer DH, Kutyanin TV, Ivey RG, et al. Genetic variation at the O-antigen biosynthetic locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2002; 184(13): 3614–22.
23. Currie HL, Lightfoot J, Lam JS. Prevalence of *gca*, a gene involved in synthesis of A-band common antigen polysaccharide in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2(5): 554–62.
24. Soler CP, Gidenne S, Saint-Blancard P, Kerleguer A, Gerome P. Recovery method of serotypable character in non serotypable *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Pathol Biol (Paris)* 2004; 52(1): 33–8. (French)
25. Zierdt CH, Williams RL. Serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis of the pancreas. *J Clin Microbiol* 1975; 1(6): 521–6.
26. Mutbaria LM, Nicas TI, Hancock RE. Outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* serotype strains. *J Infect Dis* 1982; 146(6): 770–9.
27. Goto S, Tsuji A, Oguri T, Kobayashi I, Nishida M, Yabuuchi E. Present situation of serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* in Japan and correlation among three kinds of commercially available serotyping kits. *J Infect Chemother* 1999; 5(4): 201–5.
28. Lamont IL, Martin LW. Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2003; 149(Pt 4): 833–42.
29. Karakašević B. Manual on standard methods for microbiological routine experiments. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga; 1967. (Serbian)
30. Kumar A, Gao N, Standiford TJ, Gallo RL, Yu FS. Topical flagellin protects the injured corneas from *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes Infect* 2010; 12(12–13): 978–89.
31. Shupp JW, Pavlovich AR, Jeng JC, Pezzullo JC, Oetgen WJ, Jaskille AD, et al. Epidemiology of bloodstream infections in burn-injured patients: a review of the national burn repository. *J Burn Care Res* 2010; 31(4): 521–8.
32. Tomanović B, Joković B, Tatić M, Mirović V, Nanusević O. Serotyping and pyocin typing of *Pseudomonas aeruginosa* in a study of intrahospital infections. *Vojnosanit Pregl* 1991; 48(1): 31–3. (Serbian)
33. Thuruthyl SJ, Zhu H, Willcox MD. Serotype and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from contact lens wearers. *Clin Experiment Ophthalmol* 2001; 29(3): 147–9.
34. de Vicente A, Codina JC, Martínez-Manzanares E, Aviles M, Borrego JJ, Romero P. Serotypes and pyocin types of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from natural waters. *Lett Appl Microbiol* 1990; 10(2): 77–80.
35. Burke V, Richardson CJ, Robinson J. Serotype and serum sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* from children with cystic fibrosis: longitudinal studies and typing with monoclonal antibodies. *Pathology* 1990; 22(4): 223–6.
36. Millesimo M, de Intinis G, Chirillo M, G. Musso T, Savoia D. *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: Serotypes, resistance phenotypes and plasmid profiles. *European journal of epidemiology* 1996; Vol. 12, No2: 123-130
37. Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepon MF, Babini GS, Dauboyas J, et al. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol* 2000; 38(3): 1290–2.
38. Manos J, Arthur J, Rose B, Tingpej P, Fung C, Curtis M, et al. Transcriptome analyses and biofilm-forming characteristics of a clonal *Pseudomonas aeruginosa* from the cystic fibrosis lung. *J Med Microbiol* 2008; 57(Pt 12): 1454–65.
39. Jamasbi JR, Proudfoot ME. Phenotypic and genotypic characteristics of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: Rate of occurrence and distribution of different serotypes antimicrobial susceptibility profiles and molecular typing. *Lab Med* 2008; 39(3): 155–61.
40. Winstanley C, Kaye SB, Neal TJ, Chilton HJ, Miksch S, Hart CA. Genotypic and phenotypic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates associated with ulcerative keratitis. *J Med Microbiol* 2005; 54(Pt 6): 519–26.
41. Mittal R, Khandvaha RK, Gupta V, Mittal PK, Harjai K. Phenotypic characters of urinary isolates of *Pseudomonas aeruginosa* & their association with mouse renal colonization. *Indian J Med Res* 2006; 123(1): 67–72.

Primljen 18. II 2010.
Revidiran 22. VII 2010.
Prihvaćen 31. VIII 2010.