

# Molekularna osnova smanjene osjetljivosti kliničkih izolata vrste *Acinetobacter baumannii* na karbapeneme

---

**Goić Barišić, Ivana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2009**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:569951>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-21**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET

Ivana Goić Barišić

**MOLEKULARNA OSNOVA SMANJENE OSJETLJIVOSTI  
KLINIČKIH IZOLATA VRSTE *Acinetobacter baumannii* NA  
KARBAPENEME**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2009.



## *ZAHVALA*

Ugodna mi je dužnost zahvaliti svima koji su pomogli u izradi disertacije.

Iskreno zahvaljujem prof. dr. sc. Volgi Punda Polić, voditeljici Odjela za zarazne bolesti i mikrobiologiju s parazitologijom KBC Split i Pročelnici Katedre za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. Kevinu Towneru, Department of Clinical Microbiology, Nottingham University Hospitals NHS Trust, Queen's Medical Centre, Nottingham, Velika Britanija, na pomoći i smjernicama u izradi ove disertacije.

Hvala obitelji, suprugu Igoru i sinovima Miroslavu i Krešimiru, na bezgraničnoj podršci.

Ova disertacija je izrađena na Odjelu za zarazne bolesti i mikrobiologiju s parazitologijom KBC Split. Molekularne metode napravljene su u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC Rebro.

Mentor disertacije je prof. dr. sc. Branka Bedenić.

## Popis oznaka i kratica

AmpC –  $\beta$ -laktamaza

AN – amikacin

ARPAC – Antibiotic Resistance Prevention And Control; međunarodni projekt

ARI – acinetobakter rezistentan na imipenem (engl. *Acinetobacter Resistant to Imipenem*)

ATCC – kontrola testiranja na antibiotike (engl. *American Type Culture Collection*)

*bla* – betalaktamaza (*gen*)

bp – parovi baza (engl. *base pair* )

CAZ – ceftazidim

CFU – engl. *colony forming unit*

CIP – ciprofloksacin

CIT F – Jedinica intenzivnog liječenja Firule

CIT K – Jedinica intenzivnog liječenja Križine

CLSI – klinički i laboratorijski standardi (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*)

CRO – ceftriakson

csu E – pilus chaperon sekrecijski sistem

CTX –  $\beta$ -laktamaza (engl. *active on cefotaxime*)

DDD – definirana dnevna doza antibiotika

EDTA – etilen diamin tetraoctena kiselina

ESBL –  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra (engl. *extended-spectrum  $\beta$ -lactamase*)

FEP – cefepim

GN – gentamicin

IMI – imipenem

IMP – metalo  $\beta$ -laktamaza, (engl. *active on imipenem*)

IS $Aba1$ - insercijska sekvencija *A. baumannii* 1, (engl. *insertion sequence of A. baumannii*)

IS - insercijska sekvencija

JILD – Jedinica intenzivnog liječenja djece

KI – Jedinica za kirurško liječenje

LMP – vrsta agaroze, (engl. *low melting point*)

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

MEM – meropenem

MOS –  $\beta$ -laktamaza (engl. *discovered at Moscow*)

MRSA - meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*

MYSTIC – Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection; studija

NKI – Neurokirurška intenzivna jedinica

OMP – vanjski protein membrane (engl. *outer membrane protein*)

ompA – porini proteina A vanjske membrane (engl. *outer membrane protein A porin*)

OXA – oksacilinaza, (engl. *active on oxacillin*)

PBP – penicilin vezni protein (engl. *PBP- penicillin binding protein*)

PCR - lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

PER –  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra, (engl. *Pseudomonas extended resistant*)

PFGE – elektroforeza u pulsirajućem polju (engl. *pulsed-field gel electrophoresis*)

RAPD – genotipizacijska metoda, (engl. *random amplified polymorphic DNA*)

SIM – metalo  $\beta$ -laktamaza, (engl. *Seoul imipenemase*)

SHV –  $\beta$ -laktamaza, (engl. *sulfhydryl reagent variable*)

TBE – tris-borat-EDTA, pufer

TE – tris-EDTA, pufer

TEM –  $\beta$ -laktamaza, (engl. *patient name Temoneira*)

TEN – tris-EDTA-NaCl, pufer

TZP – piperacilin/tazobaktam

VEB –  $\beta$ -laktamaza, (engl. *Vietnam extended-spectrum  $\beta$ -lactamase*)

VIM – metalo  $\beta$ -laktamaza, (engl. *Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase*)

VRE – vankomicin rezistentni enterokok

UPGMA- metoda grupiranja parova uzoraka (engl. *unweighted pair group method*)



## SADRŽAJ

	Popis oznaka i kratica	1
<b>1.</b>	<b>UVOD</b>	7
<b>1.1.</b>	<b><i>Acinetobacter baumannii</i> – mikrobiologija i taksonomija</b>	8
1.1.1.	Mikrobiologija mikroorganizma	8
1.1.2.	Taksonomija mikroorganizma	10
<b>1.2.</b>	<b><i>A. baumannii</i> – rasprostranjenost</b>	11
<b>1.3.</b>	<b>Učestalost i klinička važnost infekcija uzrokovanih s <i>A. baumannii</i></b>	13
1.3.1.	Učestalost infekcija uzrokovanih s <i>A. baumannii</i>	13
1.3.2.	Klinička važnost infekcija uzrokovanih s <i>A. baumannii</i>	14
<b>1.4.</b>	<b>Karbapenemi – mehanizam djelovanja i razvoj rezistencije u kliničkih izolata <i>A. baumannii</i></b>	15
1.4.1.	Karbapenemi – mehanizam djelovanja	15
1.4.2.	Rezistencija na karbapeneme u kliničkih izolata <i>A. baumannii</i> uzrokovana $\beta$ -laktamazama	16
1.4.2.1.	Podjela $\beta$ -laktamaza prema K. Bush	18
1.4.2.2.	Podjela beta-laktamaza prema Ambleru	19
1.4.2.2.1.	Klasa <b>A</b> prema Ambleru	19
1.4.2.2.2.	Klasa <b>B</b> prema Ambleru	20
1.4.2.2.3.	Klasa <b>C</b> prema Ambleru	21
1.4.2.2.4.	Klasa <b>D</b> prema Ambleru	22
<b>1.5.</b>	<b>Dosadašnje spoznaje o rezistenciji na karbapeneme u izolata <i>A. baumannii</i> u Hrvatskoj</b>	27
<b>1.6.</b>	<b>Hipoteze rada</b>	29

<b>2.</b>	<b>CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	30
<b>3.</b>	<b>MATERIJAL I METODE</b>	32
3.1.	Izolati <i>A. baumannii</i>	33
3.2.	Testiranje izolata <i>A. baumannii</i> disk-difuzijskom metodom	33
3.3.	Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) izolatima <i>A. baumannii</i>	35
3.4.	Određivanje prisustva i vrste oksacilinaze metodom lančane reakcije polimeraze (PCR)	36
3.5.	Određivanje supstratnog profila	40
3.6.	Sekvencioniranje PCR produkta	41
3.7.	Genotipizacija izolata <i>A. baumannii</i>	41
3.7.1.	Izolacija i uzgoj bakterijskog soja	42
3.7.2.	Uklapanje stanica u agarozu	43
3.7.3.	Cijepanje kromosomske DNA pomoću restrikcijskih endonukleaza koje “rijetko” cijepaju	44
3.7.4.	Elektroforeza u pulsirajućem polju	45
3.7.5.	Interpretacija rezultata genotipizacije prema Tenoveru	46
3.8.	Potrošnja antibiotika u KBC Split	47
3.9.	Statističke metode	47
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b>	48
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA</b>	91
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b>	104
<b>7.</b>	<b>SAŽETAK</b>	106
<b>8.</b>	<b>SUMMARY</b>	109

<b>9.</b>	<b>LITERATURA</b>	112
<b>10.</b>	<b>ŽIVOTOPIS</b>	128

## **1. UVOD**

## 1. UVOD

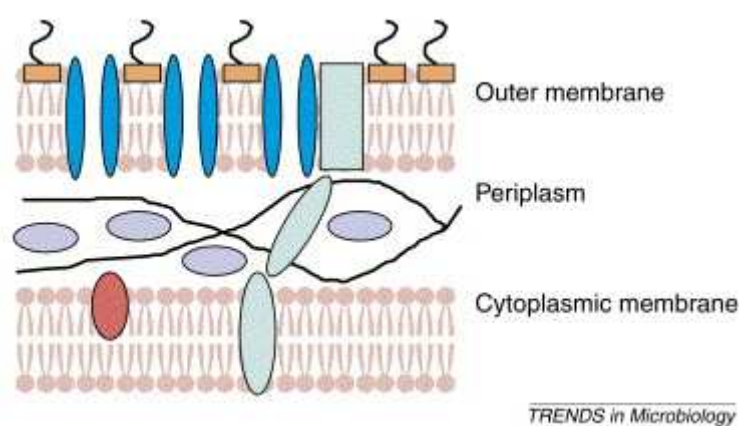
### 1.1 *Acinetobacter baumannii* – mikrobiologija i taksonomija

#### 1.1.1 Mikrobiologija mikroorganizma

*Acinetobacter baumannii* je aerobni gram-negativni kokobacil koji posljednjih godina postaje značajan uzročnik teških bolničkih infekcija kao što su bakterijemije, pneumonije, meningitisi, endokarditisi te urinarne infekcije i infekcije rana u hospitaliziranih bolesnika (1). Pripadnici roda *Acinetobacter* dugi su od 1,5 do 2,5  $\mu\text{m}$ , široki od 1 do 1,5  $\mu\text{m}$ , dok u stacionarnoj fazi razmnožavanja mogu poprimiti kokoidni oblik. Sve vrste unutar roda posjeduju enzim katalazu, a nemaju enzim citokrom-oksidazu (1). Svi mikroorganizmi unutar roda dobro rastu na uobičajenim hranilištima, te stvaraju bijele ili krem sjajne kolonije promjera oko jedan milimetar na krvnom agaru. Neki sojevi posjeduju sposobnost hemolize krvnog agara (*A. haemolyticus*) (1).

U sastavu stanične stijenke gram-negativnog mikroorganizma nalazi se citoplazmatska membrana, periplazmatski prostor s tankim slojem peptidoglikana, vanjska membrana te polisaharidna kapsula. Citoplazmatska membrana konačno je mjesto djelovanja  $\beta$ -laktamskih antibiotika vezivanjem za penicilin vezne proteine (engl. PBP- *penicillin binding protein* PBP) (slika1.1). Peptidoglikan je sastavljen od muraminske kiseline, glukozamina, alanina, glutaminske kiseline i diaminopimelinske kiseline, dok vanjska

membrana sadrži porinske kanale i izlazne dijelove mehanizma za izbacivanje antibiotika (engl. *efflux*) (1, 2). Prisustvo polisaharidne kapsule sastavljene od ramnoze, glukoze, glukuronske kiseline i manoze značajan je činitelj virulencije unutar roda *Acinetobacter* (1). Novija istraživanja navode i sposobnost stvaranja endotoksina i lučenje enzima koji dovode do oštećenja tkiva, kao značajne činitelje virulencije u kliničkoj slici bakterijemije (1, 3).



**Slika 1.1** Presjek kroz staničnu stijenku gram-negativnog mikroorganizma. Ciljno mjesto djelovanja  $\beta$ -laktamskih antibiotika je PBP (crveno) u citoplazmatskoj membrani. U vanjskoj membrani nalaze se porinski kanali (plavo) i izlazna vrata za mehanizam izbacivanja (svijetlo plavo). U periplazmi se nalaze tanki sloj peptidoglikana (crno),  $\beta$ -laktamaze (ljubičasto) te vezni proteini za mehanizam izbacivanja (svijetlo plavo) (Trends in Microbiology, 2006.) (2).

Pripadnici roda *Acinetobacter* su nefermentativni mikroorganizmi, zbog izostanka reakcije na dvostrukom šećeru te negativnih biokemijskih promjena u dekarboksilaciji lizina, ornitina, arginina i deaminaciji fenilalanina (3).

U svakodnevnom radu u mikrobiološkim laboratorijima, pripadnici roda *Acinetobacter* dijele se u tri glavna kompleksa koja se biokemijskom reakcijom razgradnje glukoze i prisustvom ili odsustvom hemolize na krvnom agaru dijele u *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* kompleks (razgrađuje glukozu, ne stvara hemolizu na krvnom agaru), *Acinetobacter lwoffii* (ne razgrađuje glukozu, ne stvara hemolizu na krvnom agaru), te *Acinetobacter haemolyticus* (na krvnom agaru stvara hemolizu) (1, 3). *A. lwoffii*, za razliku od drugih vrsta, ne raste na MacConkey agaru (1). *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* je kompleks odgovoran za većinu acinetobakterom uzrokovanih infekcija, i predstavlja 75% acinetobaktera izoliranih iz kliničkih uzoraka u bolesnika (1, 4). Osim *A. baumannii*, unutar kompleksa nalaze se *A. calcoaceticus* i neimenovane genomske vrste 3 i 13 sensu Tjenberg i Ursing (13TU) (1).

### 1. 1. 2. Taksonomija mikroorganizma

Prvi opisi roda *Acinetobacter* vjerojatno potječu iz 1896. godine, a opisao ih je liječnik Morax radeći na Pasteurovom institutu (5). Godinu dana kasnije Theodor Axenfeld, neovisno o Moraxovim zabilješkama, opisuje slične bakterije, pa mikroorganizam postaje poznat pod nazivom Morax-Axenfeldov bacil (5). Tijekom proteklog stoljeća rod *Acinetobacter* doživio je brojne taksonomske promjene, te je najmanje 15 različitih 'generičkih' imena korišteno kao naziv ovog mikroorganizma, među kojima se najčešće spominju *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*, *Mima polymorpha*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *B5W*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Moraxella glucidolytica* i *Moraxella lwoffii* (1). U rod *Acinetobacter* su danas svrstani gram-negativni aerobni, nepokretni, katalaza pozitivni, oksidaza negativni kokobacili s DNA C+G količinom 39 do 47 mol%, (1, 3).

Bakterija *Acinetobacter* spp. se nalazi u koljenu *Proteobacteria* i redu *Pseudomonadales* (3). Rod *Acinetobacter* je prema starijoj klasifikaciji, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, bio svrstan u porodicu *Neisseriaceae*, koja je obuhvaćala jednu vrstu, *Acinetobacter calcoaceticus* (1). Ova je vrsta u literaturi često dijeljena u dvije podvrste: podvrstu *anitratus* (prije *Herellea vaginicola*) i podvrstu *lwoffii* (prije *Mima polymorpha*). Novija taksonomska istraživanja zasnovana na analizi 16S rRNA premjestila su rod *Acinetobacter* u novu porodicu *Moraxellaceae*, koja uključuje rodove *Acinetobacter*, *Moraxella* i *Psychrobacter* (1). Modernom molekularnom taksonomskom metodom DNA-DNA hibridizacijom dokazano je postojanje 33 različite genomske grupe, od kojih 18 posjeduje ime vrste (6). Dodatna istraživanja, zasnovana na molekularnoj taksonomiji, potvrdila su da, za sada, 28 genomskih grupa sadrži multiple izolate, uz do danas otkrivena barem 21 negrupirana pojedinačna izolata (7).

## **1. 2. *A. baumannii* – rasprostranjenost**

Pripadnici roda *Acinetobacter* su saprofiti široko rasprostranjeni u prirodi. Pojedine vrste roda *Acinetobacter* mogu se naći u hrani, vodi, povrću i zemlji (1), a danas se zna da i do 25% zdravih osoba može biti kolonizirano s *Acinetobacter* spp., poglavito na dijelovima kože i usne šupljine (8). Istraživanje koje su proveli Berlau i suradnici na 192 zdrava dragovoljca otkrilo je da 40% ispitanika nosi na koži određenu vrstu *Acinetobacter* spp. (u 60% ispitanika to je bio *Acinetobacter lwoffii*) (9). U hospitaliziranih bolesnika koji imaju traheostomu prisutna je kolonizacija kože do 45% (10). Opisana je i kolonizacija probavnog sustava kao važno spremište i ishodište infekcija uzrokovanih rezistentnim



uzročnikom (11). Najnovija istraživanja ukazuju na mogućnost prijenosa bolničkom hranom (povrće, voće), koja predstavlja potencijalni izvor za kolonizaciju probavnog sustava (12). Ovaj mikroorganizam posjeduje sposobnost preživljavanja na suhim površinama i prašini do 10 dana (prosjeak za *Staphylococcus aureus* je sedam dana), dok inkapsulirani sojevi mogu preživjeti do četiri mjeseca na plastičnim PVC površinama, keramici, gumenim površinama i čeliku (7), što je posljedica minimalnih prehrambenih zahtjeva potrebnih za rast *Acinetobacter* spp., kao i njegove sposobnosti da raste na različitim temperaturama i pH vrijednostima. Opisano je i preživljavanje ovog mikroorganizma nakon izlaganja dezinficijensima na bazi fenola, glukonata i klorheksidina (7), te preživljavanje nakon izlaganja radijaciji (13). Danas ga možemo smatrati ubikvitarnim hospitalnim patogenom, te je zasigurno među najčešćim gram-negativnim mikroorganizmima izoliranim s ruku bolničkog osoblja (14). Izoliran je kao uzročnik hospitalnih infekcija koje su ishodište imale u bolničkim jastucima (15) i mobilnim telefonima (16). Pored svega navedenog, 2004. godine u Francuskoj je *A. baumannii* izoliran iz uši prikupljene s beskućnika u Marseilleu, što ukazuje na mogućnost pojave epidemijskih *A. baumannii* infekcija posredovanih ovim nametnikom (17). Danas je dokazano da nema razlike u preživljavanju epidemijskih i sporadičnih sojeva *Acinetobacter* spp. (18). *Acinetobacter lwoffii* (uz *A. johnsonii* i *A. radioresistens*) može se naći na koži ljudi i životinja te nekim prehrambenim proizvodima, i predstavlja dobro osjetljivu skupinu acinetobaktera. *A. calcoaceticus* prisutan je u zemlji, otpadnim vodama i okolišu, i uglavnom je osjetljiv na većinu antibiotika, a dolaskom u bolničku sredinu može, uz *A. baumannii*, postati značajan bolnički patogen. Najznačajniji uzročnik bolničkih infekcija uzrokovanih ovim rodом je vrsta *A. baumannii*, koja posjeduje posebne sposobnosti prilagodbe bolničkoj sredini, dok se rijetko opisuju vrste 3 i 13TU (4).

### **1. 3. Učestalost i klinička važnost infekcija uzrokovanih s *A. baumannii***

#### 1.3.1. Učestalost infekcija uzrokovanih s *A. baumannii*

Posljednjih godina šira medicinska javnost upoznata je s brojnim infekcijama uzrokovanim multiplerezistentnim *A. baumannii*, nastalim nakon ozljeda u velikim prirodnim katastrofama kao što je potres u Marmari na sjeveru Turske (19), te infekcijama rana američkih vojnika koji su se borili u Kuvajtu, Afganistanu i Iraku (20, 21, 22).

*Acinetobacter baumannii* je postao važan uzročnik bolničkih infekcija prvenstveno zbog naročite sposobnosti preživljavanja i širenja u bolničkom okruženju, te brzog razvoja rezistencije na brojna antimikrobna sredstva. Njegova sposobnost izmjene (engl. *switch*) genomske strukture u kombinaciji s promjenjivom ekspresijom gena, za posljedicu ima razvoj rezistencije nakon izlaganja antimikrobnim sredstvima (7). Pojavu epidemije uzrokovane ovim mikroorganizmom teško je nadzirati.

Multiplerezistentni izolati *A. baumannii* sve su učestaliji u jedinicama intenzivne njege svih europskih država osim Švedske i Švicarske, i ozbiljan su problem kliničarima koji liječe bolesnike. U Tajvanu su opisani i izolati *A. baumannii* otporni na sve antibiotike koje je moguće primijeniti u liječenju infekcija uzrokovanih ovim mikroorganizmom (engl. *pandrag*) (23).

Učestalost hospitalnih infekcija uzrokovanih *A. baumannii* u jedinicama intenzivnog liječenja u europskim zemljama kreće se od 2% do 10% svih infekcija uzrokovanih gram-negativnim mikroorganizmima, dok u Americi taj postotak iznosi 2,5% (24, 25).

### 1.3.2. Klinička važnost infekcija uzrokovanih s *A. baumannii*

Kliničku važnost infekcija uzrokovanih *A. baumannii* možda najbolje opisuje naziv koji se posljednjih godina spominje u literaturi kao sinonim za ovaj mikroorganizam, a to je **gram-negativni MRSA** (MRSA – meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*).

Zašto se *Acinetobacter baumannii* danas smatra gram-negativnim MRSA?

U literaturi, Rello 1999. prvi put povezuje multiplo rezistentne kliničke izolate *A. baumannii* s nazivom gram-negativni MRSA, a kasnije se taj naziv spominje sporadično (26, 27). Dio bakterija ima kokoidnu formu u tekućem mediju, osobito tijekom rane faze rasta, i zadržava kristal-violet pri bojenju po Gramu te slabije odbojava 95% -tnim alkoholom. Prilikom mikroskopiranja može se, poglavito na rubnim dijelovima preparata, obojiti ljubičasto, podsjećajući na stafilokokne nakupine. Infekcije uzrokovane ovim uzročnikom, kao i infekcije koje uzrokuje meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*-MRSA, učestalije su u jedinicama intenzivnog liječenja, a prethodi im kolonizacija bolesnika koji tamo leže (26, 28).

Postoji razlika u načinu prijenosa infekcija uzrokovanih meticilin rezistentnim stafilokokom koji uglavnom kolonizira nosnice i kožu hospitaliziranih bolesnika, te se prenosi od osobe do osobe kontaktom, dok se nefermentativni gram-negativni mikroorganizmi, osim kontaktom, prenose i uporabom respiratora i ovlaživača zraka (aerosolom), te koloniziraju probavni i respiratorni sustav, kožu i urogenitalne dijelove tijela (26, 29). Kolonizirana su mjesta ishodišta kasnijih infekcija te je, prema istraživanju,

omjer koloniziranih i inficiranih bolesnika u jedinicama intenzivne njege 10:1 (26). Istraživanje koje je objavila skupina španjolskih istraživača prije desetak godina, otkrilo je kolonizaciju bolesnika u jedinici intenzivnog liječenja u 41 % (77/189), 71% hospitaliziranih bolesnika koloniziralo se tijekom prvog tjedna boravka u jedinici intenzivnog liječenja, a 26% je razvilo klinički značajnu infekciju (12).

Istraživanje belgijske skupine autora otkrilo je, tijekom jednogodišnjeg praćenja, da je 71,4% bolesnika kolonizirano ili inficirano multiplorezistentnim *Acinetobacter baumannii* za vrijeme boravka na jedinici intenzivnog liječenja (30). U ovoj studiji prikazano je klonalno širenje izolata porijeklom iz Grčke, koji posjeduje OXA-58 oksacilinazu, a koji se proširio po belgijskoj sveučilišnoj bolnici nakon premještaja bolesnika s ozljedom zadobivenom u prometnoj nesreći u Grčkoj.

#### **1.4. Karbapenemi – mehanizam djelovanja i razvoj rezistencije u kliničkih izolata *A. baumannii***

##### **1.4.1. Karbapenemi – mehanizam djelovanja**

Pripadnici karbapenemske skupine antibiotika u sastavu  $\beta$ -laktamskog prstena imaju hidroksietilni postranični lanac na poziciji 6 i nedostaju im atomi sumpora i kisika unutar jezgre. Ova jedinstvena građa, uz potporu hidroksietilnog postraničnog lanca, nosi stabilnost prema  $\beta$ -laktamazama, enzimima koje luči većina gram-pozitivnih i gram-negativnih mikroorganizama. Mehanizam djelovanja karbapenema zasniva se na vezivanju za PBP 1 i PBP 2 (engl. PBP- *penicillin binding protein*) gram-pozitivnih i gram-

negativnih mikroorganizama, što uzrokuje elongaciju i lizu stanice. Karbapenemi su izrazito otporni na većinu plazmidskih i kromosomskih  $\beta$ -laktamaza, osim onih koje stvaraju *Stenotrophomonas maltophilia* i neki sojevi *Bacteroides fragilis*. Karbapenemi (imipenem, meropenem), kao  $\beta$ -laktamski antibiotici s najširim spektrom djelovanja, dugo vremena su predstavljali terapijsko rješenje za gram-negativne nefermentativne uzročnike (7). Bakterijska rezistencija nastaje kao posljedica stvaranja enzima karbapenemaza koji hidroliziraju karbapenemsku jezgru, a promjene u porinskim kanalima bakterijskog staničnog zida imaju za posljedicu smanjenje permeabilnosti lijeka u bakterijskoj stanici. (6, 27). Imipenem je dugo prisutan kao antibiotik rezervne liste (od 1996. godine), te je u kliničkoj primjeni s dodatkom cilastatina koji ga štiti od bubrežne dihidropeptidaze-I koja hidrolizira imipenem (31). Meropenem je parenteralni antibiotik s odličnom baktericidnom aktivnošću in vitro, stabilan prema bubrežnoj dihidropeptidazi, te je kao drugi karbapenemski antibiotik prisutan u KBC Split od 2000. godine. Meropenem ima antibakterijsku širinu sličnu imipenemu, s nešto slabijom djelotvornošću na stafilokoke i enterokoke, ali i boljom djelotvornošću na *Pseudomonas aeruginosa*, enterobakterije i *Haemophilus influenzae* (32).

#### 1.4.2. Rezistencija na karbapeneme u kliničkih izolata *A. baumannii*

##### uzrokovana $\beta$ -laktamazama

Razvoj rezistencije na  $\beta$ -laktamske antibiotike gram-negativnih bakterija najčešće je posljedica stvaranja  $\beta$ -laktamaza, enzima koji ih razaraju. Do danas je opisano dvjestotinjak  $\beta$ -laktamaza, a od 1960-ih godina postoje pokušaji klasificiranja sve većeg broja  $\beta$ -laktamaza. Dugo se upotrebljavala Richmond & Sykes klasifikacija iz 1973.

godine, koja je  $\beta$ -laktamaze gram-negativnih bakterija dijelila u pet grupa označenih rimskim brojkama od I do V. Ova klasifikacija razlikuje osam različitih tipova  $\beta$ -laktamaza u enterobakterija, te nema praktičnu primjenu u klasifikaciji enzima koji imaju sposobnost hidrolize karbapenema. Danas se primjenjuju dvije klasifikacije: funkcionalna, prema Bush-Jacoby-Medeiros, te molekularna klasifikacija, prema Ambler (33, 34, 35).

Osim posredstvom karbapenemaza i oksacilinaza koje hidroliziraju karbapeneme, otpornost na karbapeneme može biti uzrokovana i smanjenom propusnošću vanjske membrane uslijed gubitka ili promjene porina (engl. OMP- *outer membrane protein*) i proteina (engl. PBP- *penicillin-binding protein*), pojačanim izbacivanjem (engl. *efflux*) karbapenema iz stanice ili kombinacijom ovih mehanizama (6). Smatra se da su ovi mehanizmi rezistencije manje značajni u ekspresiji rezistencije na karbapeneme u kliničkih izolata *A. baumannii*, u odnosu na karbapenemaze i oksacilinaze koje hidroliziraju karbapeneme (36). Quale sa suradnicima opisao je karbapenem rezistentne izolate *A. baumannii* sa smanjenom ekspresijom 47, 44 i 37 kDa OMP, te povećanom ekspresijom AmpC bez drugih, do sada opisanih, mehanizama rezistencije na karbapeneme (37). Među izolatima *A. baumannii* iz Madrida opisan je gubitak 22 kDa i 33 kDa OMP u kombinaciji s OXA-24 enzimom (38). Porini opisani kod *A. baumannii* manji su po veličini u odnosu na porine opisane kod *P. aeruginosa* (39).

Mehanizam rezistencije posredovan izbacivanjem antibiotika pomoću AdeABC pumpe opisan je među izolatima *A. baumannii* i prvenstveno je povezan s rezistencijom na aminoglikozide, tetraciklin, eritromicin, kloramfenikol, trimetoprim i florokinolone (6).

### 1.4.2.1. Podjela $\beta$ -laktamaza prema K. Bush

Od 1990-ih na snazi je Bush-Jacoby-Medeiros funkcionalna klasifikacija koja  $\beta$ -laktamaze dijeli u grupe 1, 2, 3 i 4 (33). Ova se klasifikacija temelji na sljedećim kriterijima: genskoj podlozi proizvodnje enzima (kromosomska ili plazmidska); supstratnom profilu kojim se uspoređuju brzine hidrolize različitih penicilina, cefalosporina, monobaktama i karbapenema; osjetljivosti na inhibitore kao što su klavulanska kiselina, sulbaktam, te aztreonam i kloksacilin; osjetljivosti na inhibiciju s p-kloromerkuribenzoatom ili s EDTA (etilen diamin tetraoctena kiselina); molekularnoj težini određivanoj metodom gel filtracije te izoelektričnom točkom (33).

**Skupina 1**  $\beta$ -laktamaza obuhvaća cefalosporinaze kromosomskog podrijetla, koje slabo inhibiraju klavulanska kiselina i sulbaktam, a dobro aztreonam i kloksacilin. Molekularna težina im je veća od 30 000 daltona.

**Skupina 2**  $\beta$ -laktamaza obuhvaća veći broj podskupina različitih supstratnih profila. Ti enzimi imaju visok afinitet za klavulansku kiselinu, a nizak za aztreonam. Grupa 2 ima pet podskupina (2a, 2b, 2c, 2d i 2e). U podskupini 2d nalaze se  $\beta$ -laktamaze koje hidroliziraju kloksacilin brže od benzilpenicilina i koje su inhibirane klavulanskom kiselinom. Tu spadaju OXA enzimi koji se odlikuju brzom hidrolizom cefaloridina i cefalotina. Dobro ih inhibira 100 mM natrijev klorid. Izoelektrične točke im se nalaze između 6,1 i 7,7.

**Skupina 3**  $\beta$ -laktamaza obuhvaća enzime koji se mogu inhibirati s EDTA, a aktivnost im se obnavlja dodatkom cinka. Nisu osjetljivi na inhibiciju klavulanskom kiselinom i nemaju serin u aktivnom središtu. U ovu grupu spadaju  $\beta$ -laktamaze koje brzo hidroliziraju imipenem, a luče ih *Bacillus cereus* i *Flavobacterium* spp.

**Skupina 4**  $\beta$ -laktamaza sadrži penicilinaze koje nisu inhibirane klavulanskom kiselinom. Neki od tih enzima hidroliziraju dobro karbencilin i kloksacilin. Oni nisu svrstani ni u jednu skupinu na temelju molekularne strukture (33).

#### **1. 4. 2. 2. Podjela beta-laktamaza prema Ambleru**

Paralelno s funkcionalnom klasifikacijom Bush-Jacoby-Medeiros razvijala se i molekularna klasifikacija koja, prema Ambleru,  $\beta$ -laktamaze dijeli u klase A, B, C i D (34, 35). Ova se klasifikacija zasniva na sekvenciji aminokiselina; klase A, C i D obuhvaćaju evolucijski različite grupe serinskih esteraza, dok enzimi klase B sadrže cink kao kofaktor.

##### **1.4.2.2.1. Klasa A prema Ambleru**

Klasa A obuhvaća enzime molekularne mase ili težine od 30 000 daltona koji su najaktivniji prema penicilinima. U ovoj se klasi nalaze penicilinaze gram-pozitivnih bakterija kao što je *Staphylococcus aureus* i plazmidne  $\beta$ -laktamaze širokog spektra (TEM-1 i TEM-2, SHV-1) i proširenog spektra (TEM, SHV, CTX-M) gram-negativnih bakterija. Aktivno im središte sadrži serin (40).

Amblerova klasa A obuhvaća i PER-1  $\beta$ -laktamazu proširenog spektra opisanu prvi put u izolatima *A. baumannii* iz Turske, a kasnije i u izolatima iz Francuske (VEB 1) i Belgije (41, 42, 43). PER je kratica od engl. *Pseudomonas extended resistant*, a ujedno i sadrži prva slova istražitelja koji su je prvi opisali (**P**atrice, **E**sthel i **R**oger) (44). Ove  $\beta$ -laktamaze



osjetljive su na karbapeneme, za razliku od nedavno otkrivene MOS-1 u izolatu *A. baumannii* iz sputuma bolesnika hospitaliziranog u Moskvi, osjetljive samo na kolistin i rifampicin (45). Svi enzimi iz molekularne skupine A pripadaju skupini 2  $\beta$ -laktamaza, prema K. Bush.

#### 1.4.2.2.2. Klasa **B** prema Ambleru

Klasa B sadrži enzime s molekularnom težinom od 23000 daltona, koji su primarno cefalosporinaze i enzimi koji zahtijevaju cink kao kofaktor (metaloenzimi).

Do danas je u kliničkim izolatima *A. baumannii* opisano više metalo  $\beta$ -laktamaza koje mogu hidrolizirati karbapeneme (Amblerova klasa B) iz grupe IMP, VIM i SIM karbapenemaza, poglavito u Aziji i zapadnoj Europi. IMP je kratica od engl. *active on imipenem*, VIM od engl. *Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase*, a SIM od engl. *Seoul imipenemase* (44). To su o cinku ovisne metalo- $\beta$ -laktamaze kodirane plazmidom ili integronom, koje mogu hidrolizirati sve  $\beta$ -laktame osim monobaktama, i nisu osjetljive na inhibitore  $\beta$ -laktamaza: klavulanat, tazobaktam i sulbaktam (46, 47). Njihovu enzimsku aktivnost inhibira EDTA. Metalo  $\beta$ -laktamaze IMP-1 grupe opisane su u Italiji (48), Japanu (49), Koreji (50), Velikoj Britaniji (51), IMP-2 u Italiji (52) i Japanu (53), IMP-4 u Hong Kongu (54) i Singapuru (55), IMP-5 u Portugalu (56), IMP-6 u Brazilu (57), te IMP-11 u Japanu (58). IMP-4 otkrivena je u kliničkim izolatima vrste *Acinetobacter junii* u Australiji (59). VIM metalo  $\beta$ -laktamaze rjeđe su zastupljene nego IMP karbapenemaze, a do sada su opisane dvije vrste: VIM-1 u izolatima *A. baumannii* u Grčkoj (60), te VIM-2 karbapenemaza u izolatima iz Južne Koreje (50). Na istim zemljopisnim prostorima također je otkrivena i jedina karbapenemaza SIM grupe, označena kao SIM-1 (61).

Prisustvo IMP i VIM karbapenemaza povezano je s visokom razinom rezistencije na karbapeneme, te podrazumijeva i rezistenciju bakterijskog izolata na sve  $\beta$ -laktame osim aztreonama (47). Svi enzimi iz molekularne skupine B pripadaju skupini 3  $\beta$ -laktamaza prema K. Bush.

#### 1.4.2.2.3. Klasa C prema Ambleru

Klasa C  $\beta$ -laktamaza kodirana je kromosomom gram-negativnih bakterija i prisutna u malim količinama većine gram-negativnih bakterija (46). Ove urođene  $\beta$ -laktamaze osobina su pojedine bakterijske vrste pa je kod *A. baumannii* prisutna AmpC  $\beta$ -laktamaza, kromosomska cefalosporinaza koja ima važnu ulogu u ekspresiji rezistencije na  $\beta$ -laktamske antibiotike, prvenstveno ceftazidim (62). AmpC enzimi odgovorni su i za pojavu rezistencije na amino i ureidopeniciline, cefalosporine uskog spektra djelovanja, i cefamicine (46).

Karbapenemi su otporni na djelovanje spomenutih  $\beta$ -laktamaza molekularne klase A i C, a imipenem i meropenem, s odličnom učinkovitošću i na nefermentativne bakterije, imaju najširi spektar djelovanja među  $\beta$ -laktamima (47). Prema K. Bush, svi enzimi iz molekularne skupine C pripadaju skupini 1  $\beta$ -laktamaza.

#### 1.4.2.2.4. Klasa **D** prema Ambleru

Prvi izolat *A. baumannii* rezistentan na karbapenem otkriven je 1985. u Edinburgu, Velikoj Britaniji, te je označen kao ARI-1, što je kratica od engl. *Acinetobacter resistant to imipenem* (63). Značajno je napomenuti da je izolat otkriven prije nego je započela primjena karbapenema u engleskim bolnicama, te je kasnijim analizama svrstan u oksacilinaze klase D koje hidroliziraju karbapenem.

Daleko najveće kliničko značenje danas imaju karbapenemaze koje po molekularnoj Amblerovoj klasifikaciji pripadaju klasi D, a poznate su i pod nazivom oksacilinaze (engl. OXA- *active on oxacillin*). Po Bushovoj funkcionalnoj klasifikacijskoj shemi, ova grupa oksacilinaza pripada grupi 2d (33). To je velika i brojna skupina  $\beta$ -laktamaza koje obično hidroliziraju oksacilin, meticilin i kloksacilin bolje nego benzilpenicilin, te se njihova aktivnost može inhibirati s NaCl (64). Porijeklo OXA enzima za sada je dvojbeno; činjenica je da neki geni za OXA enzime imaju kromosomski smještaj, dok su drugi dokazani na plazmidu ili integronu. Svi geni za OXA enzime imaju razmjere C+G 34 do 39% , što je karakteristično za genom *Acinetobacteria* u cijelosti (64, 65). OXA enzimi sa sposobnošću hidrolize karbapenema razvrstani su u osam različitih grana ili grupa, a sličnost sekvencija aminokiselinskog slijeda unutar svake grupe je  $\geq 92.5\%$  (66). Prva grupa OXA enzima predstavljena je kromosomski kodiranom OXA-55 u *Shewanella algae* (67). U drugu grupu je smještena plazmidom kodirana OXA-48 u *Klebsiella pneumoniae* i kromosomski kodirana OXA-54 u *Shewanella oneidensis* (68, 67). Treća i četvrta grupa predstavljene su s OXA-50 enzimom u *P. aeruginosa* i OXA-60 enzimom u *Ralstonia pickettii* (69, 70). Preostale četiri grupe specifične su za kliničke izolate *A. baumannii* i klinički su najznačajnije unutar klase D oksacilinaza (66, 71). U prvu skupinu spada

oksacilinaza otkrivena 1985. u Velikoj Britaniji, prvobitno poznata pod nazivom ARI-1 (akronim od *Acinetobacter* rezistentan na imipenem), a kasnije preimenovana u OXA-23 (72), te njoj vrlo slična (razlikuju se u samo dvije aminokiseline) OXA-27 otkrivena u Singapuru i OXA-49 otkrivena u Kini (73). Plazmidski kodirana OXA-23 proširila se tijekom 2003. i 2004. godine na većinu bolnica u Velikoj Britaniji, kao i u južnoj Francuskoj, Rumunjskoj, Brazilu, Južnoj Koreji i Polineziji (74, 75). Najnoviji publicirani podatci otkrivaju prisustvo OXA-23 oksacilinaze u pet izolata *A. baumannii* iz Ujedinjenih Arapskih Emirata (76). Najčešće korišteni naziv za ovu skupinu enzima je OXA-23-like skupina. Drugu skupinu oksacilinaza čine OXA-24 i OXA-25 otkrivene u Španjolskoj, OXA-26 otkrivena u Belgiji, i OXA-40 otkrivena u Francuskoj kod bolesnika koji se liječio u Portugalu (77, 73, 78). Nedavno su toj grupi pridodane OXA 33 i OXA 72 (usmeno priopćenje, K. Towner, Nottingham, UK). Neki autori koriste skupni naziv OXA-24-like enzimi, dok novija literatura navodi OXA-40-like kao naziv ove grupe enzima (64). Prva i druga grupa oksacilinaza dijele 63% sličnosti u aminokiselinskom slijedu, te 60% sličnosti s trećom, najvećom i najzastupljenijom grupom oksacilinaza, koje su poznate kao prirodno kromosomski kodirane oksacilinaze (79).

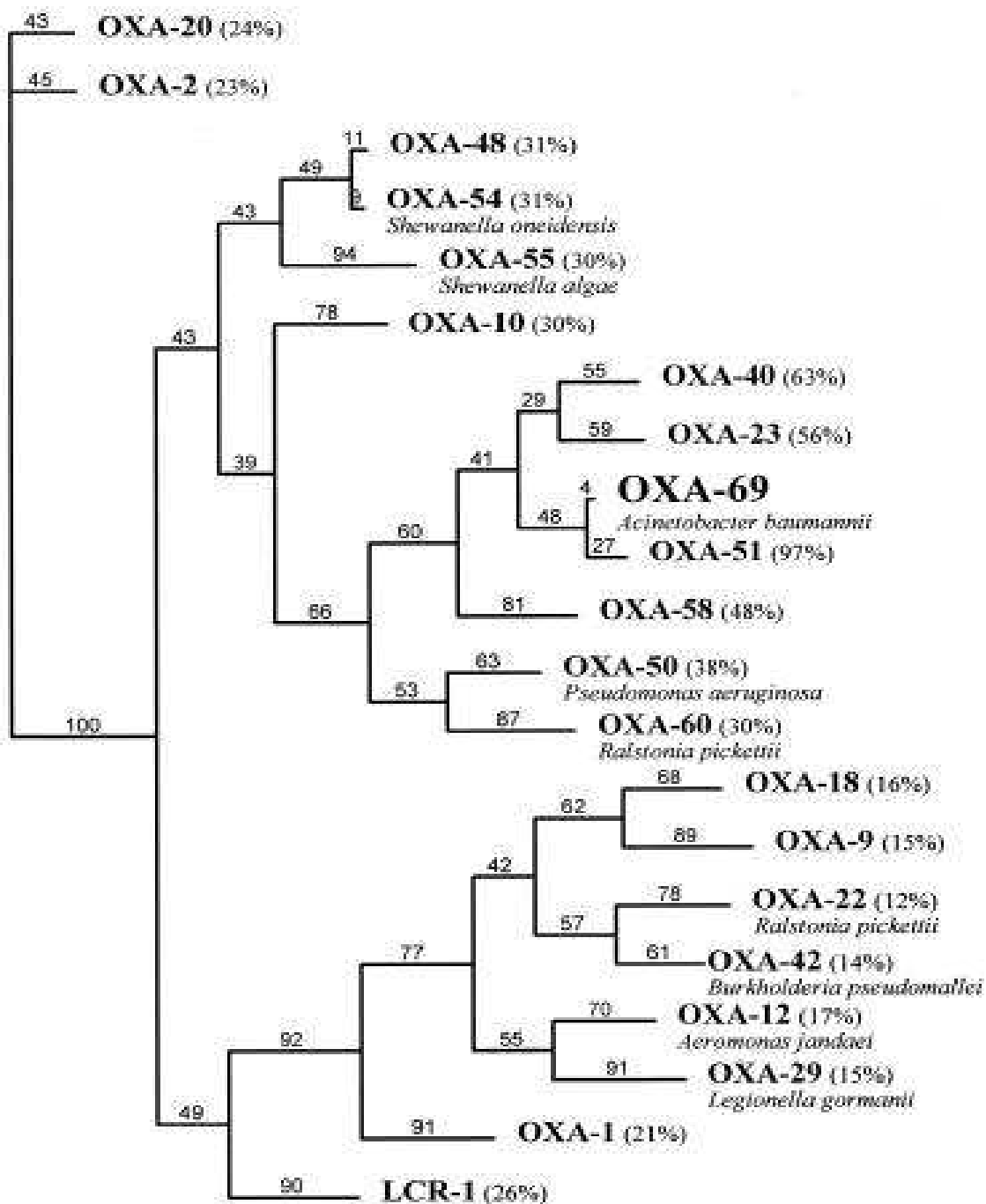
U treću skupinu spadaju OXA-51-like enzimi, najbrojnija i ubikvitarno zastupljena skupina oksacilinaza koja, prema podacima iz 2008. godine, broji 39 enzima (<http://www.lahey.org/studies/webt.asp>), među kojima postoje razlike u strukturi od jedne do šesnaest aminokiselina. Po prvi put su OXA-51 beta-laktamaze otkrivene u izolatima *A. baumannii* u Argentini 2004. godine (80). Stariji enzimi unutar ove skupine su OXA-64, OXA-65, OXA-66, OXA-68, OXA-69, OXA-70 i OXA-71 (64, 71, 75). Tijekom 2007. godine ovoj skupini je pridodano 11 novih OXA-51-like enzima pronađenih u kliničkim izolatima *A. baumannii*, označenih kao OXA-79, OXA-80, OXA-82, OXA-104 i OXA-

106 – OXA-112 (81). Unutar ove skupine nalazi se, 2007. godine po prvi put opisana, OXA-107 oksacilinaza (81). Poznato je da ova skupina karbapenemaza ima slabu sposobnost hidrolize karbapenema, ali je i dokazano da može biti povezana sa značajnim smanjenjem osjetljivosti na karbapeneme, kao što je opisano u izolatima iz KBC Split (82). U ovoj ekspresiji karbapenemske rezistencije izgleda da važnu ulogu ima i prisustvo insercijske sekvencije IS*Aba1* (engl. *insertion sequence of A. baumannii*) smještene neposredno uz *bla* *OXA-51 like* gen, koja djeluje kao promotor i predstavlja mehanizam rezistencije ili smanjene osjetljivosti na karbapeneme (83).

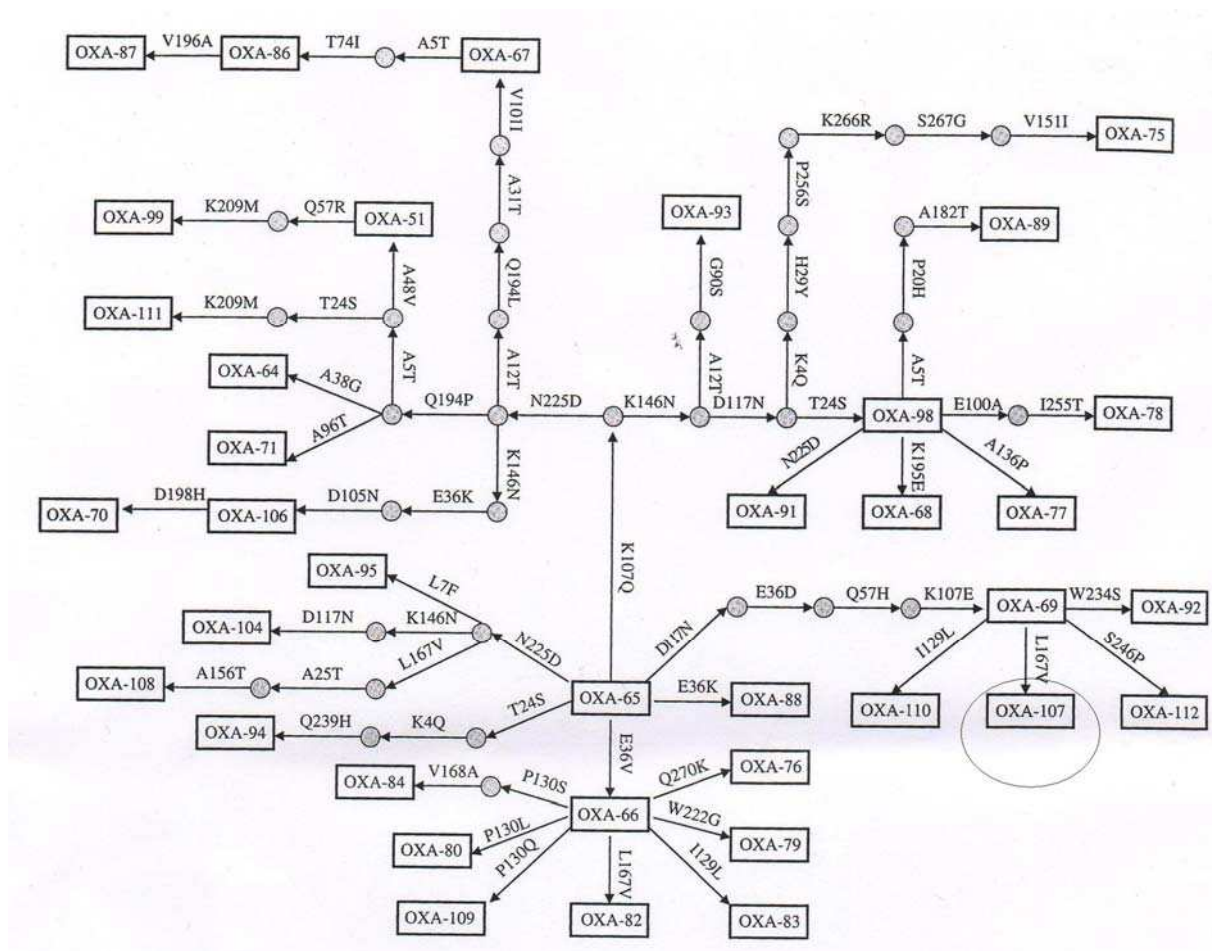
Četvrtu skupinu predstavlja plazmidski kodirana OXA-58, prvi put opisana na karbapenem rezistentnim izolatima *A. baumannii* iz Toulousea, Francuske (84). OXA-58 dijeli 59% sličnosti u aminokiselinskom slijedu sa skupinom OXA-51 like enzima i manje od 50% s ostalim oksacilinazama koje hidroliziraju karbapenem. Do danas je OXA-58 otkrivena u Španjolskoj, Turskoj, Rumunskoj, Grčkoj, Austriji, Velikoj Britaniji, Argentini, Kuvajtu, Italiji, a izolirana je i u američkih vojnika koji su se borili u Iraku (22). Ovoj skupini nedavno je priključena i OXA-96, otkrivena u kliničkim izolatima u Singapuru (55), te OXA-97, također plazmidski kodirana oksacilinaza, prvi put opisana u karbapenem rezistentnim izolatima *A. baumannii* podrijetlom iz Tunisa (85). OXA-97 razlikuje se od OXA-58 supstitucijom jedne aminokiseline u slijedu. Prva i četvrta skupina oksacilinaza (OXA-23 i OXA-58) dijele 48 % sličnosti u aminokiselinskom slijedu (71).

Dendrogramski prikaz podrijetla i sličnosti OXA enzimskih skupina prema Heritieru i sur. prikazan je na slici 1.2 (64).

Nova dendrogramska mapa OXA-51-like enzima objavljena početkom 2008. godine prikazana je na slici 1.3 i otvara novi pogled na evoluciju enzima OXA skupine (86).



**Slika 1.2.** Dendrogramski prikaz podrijetla i sličnosti OXA enzima prema Heritieru i sur. (Antimicrob Agents Chemother, 2005.) (64). Brojevi u zagradama pokazuju postotak aminokiselinske sličnosti s OXA-69 β-laktamazom.



**Slika 1.3.** Dendrogramski prikaz OXA enzima koji podrijetlo prikazuje s obzirom na aminokiselinske zamjene u odnosu na enzim OXA-65 (Evans i sur, Clin Microbiol Infect, 2008.) (86). Unutar kruga nalazi se enzim OXA-107, otkriven u izolatima iz KBC Split.

## 1.5. Dosadašnje spoznaje o rezistenciji na karbapeneme u izolata *A.*

### *baumannii* u Hrvatskoj

Rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj kontinuirano se istražuje posljednjih deset godina pri Akademije medicinskih znanosti Hrvatske, u čijem sastavu djeluje i Odbor za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike (87, 88). U Hrvatskoj se izolati *A. baumannii* rezistentni na karbapenem počinju javljati 1999. godine, kada je rezistencija na imipenem iznosila između 0% do 8% u 22 hrvatska mikrobiološka laboratorija koja su bila uključena u rad Odbora za praćenje rezistencije u Republici Hrvatskoj (87).

Zabrinjavajući porast rezistencije na karbapeneme, poglavito meropenem, zabilježen je posljednjih godina među izolatima *A. baumannii* u velikim bolničkim ustanovama u Hrvatskoj (KBC Split, KBC Zagreb) te, prema podacima Odbora za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u 2006. godini, doseže i do 41% (88).

Prvi na karbapeneme rezistentni izolati *A. baumannii* unutar KBC Split uočeni su 2002. godine u bolesnika u Jedinici intenzivnog liječenja Firule (CIT-Firule). Prema arhivskim podacima Odjela za kliničku mikrobiologiju KBC Split, smanjena osjetljivost *A. baumannii* na karbapeneme tijekom 2002. godine iznosila je 3,2% na imipenem i 10,3 % na meropenem. Prije 2002. godine nije zabilježen niti jedan klinički izolat *A. baumannii* rezistentan na karbapeneme, premda su karbapenemi već godinama bili u upotrebi unutar KBC Split, i to poglavito imipenem s cilastatinom (prisutan od 1996.). Od 2000. godine na tržište i u uporabu je ušao i drugi karbapenem, meropenem. Tijekom 2000. i 2001. godine, ukupan broj kliničkih izolata *A. baumannii* bio je nizak (11 izolata 2000., 35 izolata 2001.



godine), i oni nisu predstavljali terapijski problem jer su bili osjetljivi na piperacilin/tazobaktam, ciprofloksacin, amikacin i karbapeneme. Tijekom 2002. godine raste učestalost kliničkih izolata *A. baumannii* (2002. ukupno 126), a sljedećih se godina rast nastavlja. Tijekom 2007. godine izolirano je 267 klinički značajnih izolata vrste *A. baumannii*. Usporedno s porastom broja izolata *A. baumannii* sve je učestalija smanjena osjetljivost na karbapeneme, koja 2007. godine doseže 8,6% na imipenem i 57% na meropenem. Ovaj razvoj rezistencije na karbapeneme prati veća potrošnja karbapenemskih antibiotika, poglavito meropenema.

Prvi objavljeni podatci o molekularnoj osnovi rezistencije na karbapeneme kod kliničkih izolata *A. baumannii* u Hrvatskoj su rezultati vlastite pilot studije na izolatima iz KBC Split (82). U radu je prikazano dvanaest izolata koji potječu iz tri različite jedinice intenzivnog liječenja, a molekularnu osnovu predstavlja prisustvo OXA-51 i OXA-69 enzima koji se nalaze u osnovi smanjene osjetljivosti na karbapeneme. U trenutku publiciranja rezultata pilot studije nismo raspolagali rezultatima sekvencioniranja izolata iz naše ustanove, koje je rađeno u suradnji s engleskim ekspertima i suradnicima na ARPAC (Antibiotic Resistance Prevention And Control) projektu. Sekvencioniranjem PCR produkta izolata iz KBC Split, uključenog i u pilot studiju, otkrivena je OXA-107 oksacilinaza (86).

## 1.6. HIPOTEZE RADA

1. Među kliničkim izolatima *Acinetobacter baumannii* postoje izolati koji su slabije osjetljivi na karbapeneme. Rezistencija acinetobaktera nije jednaka, već postoji razlika u osjetljivosti sojeva na imipenem i meropenem.
2. Razlika u osjetljivosti na karbapeneme posljedica je razlike u potrošnji karbapenemskih antibiotika imipenema i meropenema na pojedinim odjelima unutar KBC Split.
3. Povećana potrošnja samo jednog karbapenema na nekim odjelima KBC Split dovela je do pojave određene vrste rezistencije na karbapeneme na tom odjelu.
4. Za rezistenciju na karbapeneme odgovorno je stvaranje enzima koji hidroliziraju karbapeneme. Dodatni utjecaj na ekspresiju rezistencije ima i prisustvo insercijske sekvencije IS*Aba1*.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Prikupiti dovoljan broj kliničkih izolata *Acinetobacter baumannii* koji pokazuju smanjenu osjetljivost na karbapeneme u KBC Split (n=100 ili više).
2. Odrediti minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) metodom mikrodilucije u bujonu za sve sojeve koji pokažu smanjenu osjetljivost na karbapeneme u rutinskom testiranju disk - difuzijskom metodom.
3. Odrediti učestalost rezistencije na karbapeneme u kliničkim izolatima *Acinetobacter baumannii* te utvrditi raspodjelu tih izolata po odjelima i vrsti biološkog uzorka.
4. Odrediti postojanje razlike u osjetljivosti i smanjenoj osjetljivosti na korištene karbapeneme kliničkih izolata *Acinetobacter baumannii*.
5. Odrediti fenotip rezistencije (korezistencije) kliničkih izolata *Acinetobacter baumannii*.
6. Utvrditi povezanost između potrošnje antibiotika (imipenem, meropenem) i vrste rezistencije na karbapeneme na pojedinim odjelima.
7. Genotipizacijom izolata s različitih odjela utvrditi da li postoji epidemiološka srodnost metodom elektroforeze u pulsirajućem polju.
8. Odrediti prisustvo insercijske sekvencije IS*Aba1* u kliničkim izolatima *A. baumannii*.
9. Odrediti prisustvo kodirajućih gena za klasu D oksacilinaza tehnikom PCR.
10. Odrediti sekvencije nukleotida novootkrivene oksacilinaze, ukoliko bude otkrivena.
11. Dobivene rezultate usporediti s podacima iz literature.

### **3. MATERIЈAL I METODE**

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. Izolati *A. baumannii***

Kao uzorak za izradu ove doktorske disertacije korišteni su klinički izolati vrste *Acinetobacter baumannii* koji pokazuju smanjenu osjetljivost na jedan ili oba karbapenema, a prospektivno su prikupljeni od 2002. do 2007. godine. Ukupno je prikupljeno 106 izolata *A. baumannii*. Kopije sojeva nisu uključene u izradu ove disertacije. Izolati su identificirani klasičnim biokemijskim testovima (nefermentativni dvostruki šećer, oksidacija glukoze, odsustvo hemolize na krvnom agaru, nedostatak enzima citokrom oksidaza) i komercijalnim setom za identifikaciju nefermentativnih bakterija API 20NE (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francuska), te pohranjeni u dubokom agaru do trenutka istraživanja za izradu disertacije (3).

Za 16 izolata koji su uključeni u ARPAC studiju napravljen je tRNA potvrdni otisak (engl. *spacer fingerprinting*) kao potvrda identifikacije *A. baumannii* (89).

Pohranjeni izolati razvrstani su prema odjelima s kojih su izolirani i prema vrsti biološkog uzorka iz kojega su izolirani, za što su korišteni arhivski podatci s Odjela za kliničku mikrobiologiju KBC Split.

#### **3.2. Testiranje izolata *A. baumannii* disk-difuzijskom metodom**

Prikupljeni izolati *A. baumannii* testirani su disk - difuzijskom metodom po Kirby-Baueru na Mueller-Hinton agaru s diskovima (BioRad, Francuska) za sljedeće antibiotike: ceftriakson (30 µg), ceftazidim (30 µg), cefepim (30 µg), cefotaksim (30µg), gentamicin

(10 µg), amikacin (30 µg), ampicilin/sulbaktam (10/10 µg), meropenem (10 µg), imipenem (10 µg) i piperacilin/ tazobaktam (100/10 µg).

Disk - difuzijska metoda uobičajena je metoda ispitivanja bakterijske osjetljivosti na antibiotike koja se svakodnevno koristi u svim mikrobiološkim laboratorijima u Hrvatskoj. Prilikom izvođenja testiranja ovom metodom, suspenzija testiranog soja se nanosi pomoću brisa na površinu Mueller-Hinton agara, na koji se zatim nanose diskovi s antibioticima pomoću dispnzera ili pincete. Suspenziju soja pripremamo tako da bakteriološkom ušicom pokupimo 3 do 5 kolonija s površine krute hranjive podloge, stavimo ih u fiziološku otopinu (5ml) i rotiramo uz pomoć električne treskalice da se dobije homogena suspenzija. Gustoću suspenzije podešavamo prema standardnoj suspenziji 0,5 MacFarlanda. Suspenziju u tri sloja nanosimo na površinu krutog Mueller-Hinton agara, na koju stavljamo diskove s određenim antibioticima. Antibiotik iz diska širi se po površini agara tako da se stvara gradijent koncentracija i na određenoj udaljenosti od ruba diska, ovisno o osjetljivosti, soj prestaje rasti. Nakon 24 sata mjerimo promjer inhibicijske zone ravnalom i izražavamo ga u mm. Na osnovi širine inhibicijske zone određuje se je li ispitivani soj osjetljiv, umjereno osjetljiv ili rezistentan. Ovaj način ispitivanja bakterijske osjetljivosti je standardiziran prema pravilima za rad u mikrobiološkim laboratorijima, a rezultati se interpretiraju prema općeprihvaćenim CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, ranije NCCLS) kriterijima (90). Disk- difuzijskom metodom u rutinskom radu tijekom nekoliko godina probrani su izolati *A. baumannii* sa smanjenom osjetljivošću na jedan ili oba karbapenema, te je prikupljenim izolatima određena minimalna inhibitorna koncentracija.

### **3.3. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) izolatima *A.***

#### ***baumannii***

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je najniža koncentracija antibiotika koja sprječava umnožavanje testiranog soja, a može se određivati bujonskom dilucijskom metodom ili agar - dilucijskim testom. Pri izradi ove disertacije korištena je metoda dilucije antibiotika u bujonu (90).

Raspon koncentracija antibiotika za određivanja minimalne inhibitorne koncentracije ovisi o vrsti antibiotika, testiranom mikroorganizmu i mjestu infekcije. Raspon mora obuhvaćati koncentracije antibiotika za tri razrjeđenja više i tri razrjeđenja niže od zadanih CLSI prijelomnih točaka kako bi se organizam mogao interpretirati kao osjetljiv, umjereno osjetljiv ili rezistentan (90). Dilucijska se metoda izvodi u standardiziranoj podlozi, tj. Mueller-Hintonovu bujonu. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) odredili smo metodom mikrodilucije u mikrotitarskim pločicama s dvostrukim razrjeđenjima antibiotika ( od 0,008 do 128 mg/l ) u Mueller-Hintonovu bujonu na sljedeće antibiotike: ceftriakson (Hoffmann-La Roche AG), ceftazidim (Pliva), cefepim (Bristol-Myers Squibb), cefotaksim (Aventis), gentamicin (Pliva), amikacin (Bristol-Myers Squibb), imipenem (Merck, Sharp&Dohme), meropenem (Astra Zeneca) i piperacilin/tazobaktam (Wyeth Laboratories) (90). Čiste suspenzije antibiotika za navedeno istraživanje dobivene su suradnjom na MYSTIC istraživanju (MYSTIC- Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) (91).



Početne otopine antibiotika su pripremljene u sterilnoj destiliranoj vodi u koncentraciji od 5120 µg/ml i zatim razrijeđene u omjeru 1:10. Dvostruka serijska razrjeđenja pripremljena su u Mueller-Hintonovu bujonu te ukapana mikropipetom u količini od 50 µl u jažice mikrotitar pločica. Bakterijski inokulum je dodavan u koncentraciji od  $5 \times 10^5$  CFU/ml u količini od 50 µl. Pločice su inkubirane 18 h na 37°C te je nakon inkubacije očitana MIK pomoću ogledala. MIK odgovara najnižoj koncentraciji antibiotika u kojoj nije došlo do umnažanja soja. U provjeri točnosti testiranja korišteni su prema CLSI preporučeni standardni kontrolni sojevi: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 osjetljiv na karbapeneme, i *Escherichia coli* ATCC 25922 osjetljiva na karbapeneme (90). Prema važećim kriterijima CLSI za interpretaciju osjetljivosti na karbapenem u kliničkih izolata *A. baumannii*, u kategoriju osjetljivo (S) pripadaju izolati s MIK-om  $\leq 4$  mg/l, dok u kategoriju rezistentnih (R) pripadaju izolati s MIK-om  $\geq 16$  mg/l (90). Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) obavljeno je u Odjelu za kliničku mikrobiologiju KBC Split. Sojevi *Acinetobacter baumannii* sa smanjenom osjetljivošću na karbapeneme (MIK > 4 mg/l na imipenem i/ili meropenem) po gore navedenim testovima, molekularno su karakterizirani.

### **3.4. Određivanje prisustva i vrste oksacilinaze metodom lančane reakcije polimeraze (PCR)**

Za kliničke izolate *Acinetobacter baumannii* koji su bili smanjeno osjetljivi na karbapeneme napravljena je lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*; PCR) s početnicama za *bla*<sub>OXA</sub> gene (64, 79).

Uporabljene su četiri skupine grupnih početnica, i to za određivanje OXA-23, OXA-24, OXA-58 i OXA-51 skupine enzima (Tib Molbiol, Njemačka). Točan redoslijed sekvencija

aminokiselina u navedenim početnicama dobiven je ljubaznošću dr. Susan Brown i prikazan u tablici 3.1 (75). Za određivanje insercijske sekvencije *ISAbal* korištene su posebne početnice (5' CACGAATGCAGAAGTTG 3' i 5'CGACGAATACTATGACAC 3') metodom PCR (83). Prisustvo PCR produkata s gore navedenim početnicama potvrđeno je elektroforezom u 1% agaroznom gelu nakon bojanja s etidijum-bromidom. Testiranje metodom lančane reakcije polimeraze napravljeno je u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Za određivanje smještaja insercijske sekvencije *ISAbal* neposredno uz OXA-51 gen korištena je tehnika amplifikacije pomoću početnica *ISAbal* F i OXA-51 R, čime je amplificiran produkt veličine ~1400 bp (83, 92).

Uzorci za lančanu reakciju polimeraze pripremaju se na sljedeći način: sterilnim vrhom bakteriološke ušice se dotakne svježa kolonija bakterije s obične krute hranjive podloge (pepton, mesni ekstrakt, ekstrakt kvasca, natrijev klorid, agar; Bio-Rad, Francuska) te se suspendira u 0.5 ml sterilne destilirane vode. Stanice se liziraju grijanjem na 95°C tijekom 15 minuta. Reakcijska smjesa za lančanu reakciju polimeraze sadržava sljedeće komponente: 25µl PCR Master Mix (Roche, Švicarska) (25 U Taq DNA polymerase u 20 mM Tris-HCl, 100mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01%, dNTP mix -dATP, dCTP, dGTP, dTTP svaki 0.4 mM, konačni pH 8.3), 20µl vode, 3 µl uzorka izolata, 1µl+1µl (30 pmol/µl) početnice, te je ukupnog volumena 50 µl. Reakcijska smjesa se promiješa, kratko centrifugira a zatim stavlja u termalni reaktor Biometra (Applied Biosystems, Warrington, Velika Britanija). Reakcija za OXA-23 grupu enzima se izvodi pod sljedećim uvjetima: 94°C pet minuta, 30 ciklusa na: 94°C 25 sekunda, 52°C 40 sekunda, 72°C 50 sekunda, te završno šest minuta na 72°C. Reakcija za OXA-24 grupu enzima se izvodi pod sljedećim uvjetima: 94°C četiri minute, 30 ciklusa na: 94°C jednu minutu, 50°C jednu minutu, 72°C

dvije minute, te završno deset minuta na 72°C. Reakcija za OXA-58 grupu enzima se izvodi pod sljedećim uvjetima: 94°C četiri minute, 30 ciklusa na: 94°C jednu minutu, 50°C jednu minutu, 72°C dvije minute, te završno sedam minuta na 72°C. Reakcija za OXA-51 grupu enzima se izvodi pod sljedećim uvjetima: 94°C četiri minute, 30 ciklusa na: 94°C jednu minutu, 55°C jednu minutu, 72°C jednu minutu, te završno sedam minuta na 72°C. Reakcija za IS*Aba1* insercijsku sekvenciju se izvodi pod sljedećim uvjetima: 94°C pet minuta, 30 ciklusa na: 94°C jednu minutu, 54°C jednu minutu, 72°C jednu minutu, te završno 10 minuta na 72°C. Unutar OXA-51 grupe enzima napravljena je reakcija za OXA-69 like enzim s početnicama 5' CTAATAATTGATCTACTCAAG 3' i 5'CCAGTGGATGGATGGATAGATTATC 3' i pod sljedećim uvjetima: 94°C pet minuta, 30 ciklusa na 94°C tijekom 25 sekunda, 52°C tijekom 40 sekunda, i 72°C tijekom 50 sekunda, te završna elongacija 6 minuta na 72°C (64, 92). Reakcija za dokazivanje smještaja insercijske sekvencije IS*Aba1* neposredno uz OXA-51 gen napravljena je pomoću posebnog PCR kita za velike produkte (Expand high fidelity plus PCR system; Roche, Švicarska), te je za lančanu reakciju polimeraze korišten sljedeći protokol: početna denaturacija na 94°C u trajanju 2 minute, 10 ciklusa na 94°C tijekom 20 sekunda, 58°C tijekom 30 sekunda, 70°C tijekom 4 minute, te završna elongacija na 70°C tijekom 7 minuta (83). Po 10 µl svakog PCR produkta podvrgnuto je elektroforezi u 2% agarozu gelu u trajanju od 90 minuta. Veličina PCR produkta određena je prema markeru MassRuler DNA Ladder (Fermentas, Njemačka), te se za OXA-23 grupu enzima očekuje veličina produkta od 1058 bp, za OXA-24 grupu enzima 1023 bp, za OXA-58 grupu enzima 972 bp, te za OXA-51 grupu enzima 353 bp. Za OXA-69 enzim očekivana veličina PCR produkta je 975 bp, a za smještaj insercijske sekvencije IS*Aba1* neposredno (engl.

*upstream*) uz *bla*<sub>OXA-51</sub> gen produkt veličine ~1400 bp (83, 92). Prikaz početnica i protokola za navedene PCR reakcije prikazan je u tablici 3.1.

**Tablica 3.1.** Prikaz početnica, protokola reakcije i očekivane veličine produkta korištenih u određivanju prisustva i vrste oksacilinaze metodom lančane reakcije polimeraze (PCR)

Početnica	redoslijed sekvencija	temperature PCR reakcije	veličina produkta
OXA-23F OXA-23R	5'-GATGTGTCATAGTATTCGTCG-3' 5'-TCACAACAACATAAAAGCACTG-3'	94°C – 5 min 94°C – 25 sec 52°C – 40 sec 72°C – 50 sec 72°C – 6 min	1,058 bp 30 ciklusa
OXA-24F OXA-24R	5'-GTACTAATCAAAGTTGTGAA-3' 5'-TTCCCCTAACATGAATTTGT-3'	94°C – 4 min 94°C – 1 min 50°C – 1 min 72°C – 2 min 72°C – 10 min	1,023 bp 30 ciklusa
OXA-51F OXA-51R	5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3' 5'-TGGATTGCACTTCATCTTGG-3'	94°C – 4 min 94°C – 1 min 55°C – 1 min 72°C – 1 min 72°C – 7 min	353 bp 30 ciklusa
OXA-58F OXA-58R	5'-CGATCAGAATGTTCAAGCGC-3' 5'-ACGATTCTCCCCTCTGCGC-3'	94°C – 4 min 94°C – 1 min 50°C – 1 min 72°C – 2 min 72°C – 7 min	972 bp 35 ciklusa
IS <i>Aba</i> 1 F IS <i>Aba</i> 1 R	5'-CACGAATGCAGAAGTTG-3' 5'-CGACGAATACTATGACAC-3'	94°C – 5 min 94°C – 1 min 54°C – 1 min 72°C – 2 min 72°C – 10 min	900 bp 35 ciklusa

### 3.5 Određivanje supstratnog profila

Metoda određivanja supstratnog profila UV spektrofotometrijskom metodom napravljena je radi karakterizacije enzima koji imaju sposobnost hidrolize karbapenema. Supstratni profil je naziv kojim označavamo hidrolitičku aktivnost enzima prema određenom  $\beta$ -laktamskom antibiotiku. To je parametar koji obilježava spektar aktivnosti određenog enzima, a koristi se za klasifikaciju  $\beta$ -laktamaza, uključujući i karbapenemaze (93).

Sojevi se inokuliraju u 300 ml Lurian-Bentonijeva bujona i inkubiraju 18-20 sati na 37 °C. Nakon inkubacije bujonska se kultura centrifugira 15 minuta na 10000 G, talog se ispere u fosfatnom puferu i ponovno suspendira u 10 ml istog pufera. Enzim se ekstrahira sonifikacijom pomoću ultrazvučnog disruptora, a supernatant se koristi kao nepročišćeni enzim (93). Hidrolitičku aktivnost enzima prema imipenemu i meropenemu odredili smo pomoću UV spektrofotometrijske metode na UV spektrofotometru na 25°C u 0,1 M fosfatnom puferu pri valnoj dužini od 295 nm za imipenem i meropenem. Određivanje supstratnog profila napravljeno je u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i potvrđeno u suradnji s francuskim kolegama s Hospital de Bicetre u Parizu, u Francuskoj.

### 3.6. Sekvencioniranje PCR produkta

Među izolatima iz KBC Split, koji su uključeni u međunarodni ARPAC projekt 2004. godine, otkrivena je i opisana nova oksacilinaza (OXA-107), pa smo rezultate PCR produkta s početnicama za OXA-51 i OXA-69 gene podvrgnuli sekvencioniranju radi potvrde postojeće ili otkrivanja sasvim nove oksacilinaze (86). Na temelju rezultata genotipizacije izdvojeni su izolati s promjenom u tri ili više segmenata dendrogramskog prikaza; PCR produkti tih sojeva pročišćeni su na kolonama pomoću Quiagen purifikacijskog kita (Roche, Švicarska). Za izabrane sojeve koji su pokazali određene razlike u genotipskom profilu napravljeno je sekvencioniranje dobivenih PCR produkata (94). Uz usporedbu slijeda nukleotida napravljena je i usporedba slijeda aminokiselina. Sekvencioniranje je obavljeno na ABI Prism 310 genetskom analizatoru (Applied Biosystems, Warrington, Velika Britanija) na Institutu Ruđera Boškovića u Zagrebu, te je redosljed sekvencija analiziran pomoću BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) i MultiAlin (<http://bioinfo.genopole-toulouse-prd.fr/multalin>) softverskog programa. Rezultati sekvencioniranja uspoređeni su s rezultatima sekvencioniranja unutar ARPAC projekta i grupirani unutar Europskog klona 1 *Acinetobacter baumannii*.

### 3.7. Genotipizacija izolata *A. baumannii*

Za genotipizaciju (utvrđivanje klonske pripadnosti) sojeva koji pripadaju različitim rezistotipovima napravljeno je određivanje makrorestriksijskog profila kromosomske DNA (engl. *pulsotyping*) početnicom *Apa I* metodom elektroforeze u pulzirajućem polju (od engl. *pulsed field gel electrophoresis*; PFGE) po Galesu (95). PFGE je metoda analize

kromosomske DNA ispitivane bakterije elektroforezom u agaroznom gelu djelovanjem izmjenične električne struje (96, 97, 98). Bakterijske stanice se liziraju centrifugiranjem u puferu i cijela kromosomska DNA se cijepa u dijelove restrikcijским enzimima (endonukleazama) specifičnima za vrstu. Tako nastali fragmenti se razdvajaju po veličini elektroforezom u 1 % agaroznom gelu na aparatu za elektroforezu u pulzirajućem polju tijekom 18-24 sata. Dobiveni specifični ulomci DNA se nakon bojenja etidij bromidom vizualiziraju pod UV lampom. Kao kontrole koriste se sojevi poznatih veličina fragmenata. Kao kontrolni soj korišten je RUH 2034, koji je preporučeni standardni kontrolni soj u međunarodnom ARPAC projektu (98). Testiranje je napravljeno u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

### 3.7.1. Izolacija i uzgoj bakterijskog soja

Elektroforezu u pulsirajućem polju prvi su opisali Schwartz i Cantor 1984. godine (99). Od tada pa do danas, posebno u posljednjih desetak godina, objavljen je niz radova iz područja genotipizacije mikroorganizama koji uzrokuju bolničke infekcije. U izradi doktorske disertacije korišten je protokol iz međunarodnog ARPAC projekta ([http:// www.Abdn. Ac.uk/arpac/](http://www.Abdn.Ac.uk/arpac/)) koji se zasniva na metodi koju je Bannerman opisao 1995. godine. (98). Nakon postupka uzgoja i identifikacije bakterijski soj se inokulira na svježe priređenu ploču krvnog agara i inkubira 18-24 sata. Nekoliko kolonija (dvije do tri) prenesu se u 5 ml tekućeg hranjivog medija s ekstraktom mozga i srca (BH bujon). Kultura se inkubira preko noći uz miješanje na optimalnoj temperaturi (35-37 °C) na rotacijskoj platformi do kasne logaritamske faze, odnosno do koncentracije stanica 4 MacFarlanda ( $10^9$  CFU/ml).

Po 0,7 ml prekonocne stanične bujonske kulture se centrifugira (2 minute pri 10.000 okretaja u kivetama od 1,5 ml), a istaložene bakterijske stanice isperu se s 1 ml pufera TEN (0,1M TrisCl, 0,1M EDTA, 0,1M NaCl; pH 8,0). Nakon dodatka pufera stanice se ponovno suspendiraju vorteksiranjem, centrifugiraju se i cijeli se postupak ponavlja još jednom.

### 3.7.2. Uklapanje stanica u agarozu

Istaložene bakterijske stanice ponovno se suspendiraju električnom mješalicom u 300  $\mu$ l pufera EC (6mM TrisCl, 1M NaCl, 0,1M EDTA, 0,5M Brij-58, 0,2% natrijev deoksikolat, 0,5% natrijev laurilsarkozin; pH 8,0). U EC-staničnu suspenziju doda se 10  $\mu$ l otopine lizozima i 300  $\mu$ l 2,0 % agaroze LMP (engl. *low melting point*) uravnotežene na 55° C. Po 100  $\mu$ l dobivene stanično-agarozne suspenzije brzo se otpipetira u kalupe za formiranje blokova agaroze i ostavi 10 minuta na sobnoj temperaturi da se agarozna učvrsti i započne djelovanje lizozima. Poslije učvršćivanja gelići se istisnu i prenesu u test ploče koje sadrže 2 ml pufera EC, te se inkubiraju 1 sat na 37° C. Blokovi agaroze prenesu se u 300  $\mu$ l ESP pufera (0,5M EDTA, 1% natrijev laurilsarkozin, 1mg proteinaze K/ml) i inkubiraju minimalno 2 sata na 55°C. Nakon toga blokovi agaroze se inkubiraju na sobnoj temperaturi u 2 ml pufera PMSF (1 mM TE pufera) 30 minuta. Blokovi agaroze ispiru se 3 do 5 puta u 5 ml pufera TE (10mM TrisCl, 5mM EDTA; pH 8,0) po 30 minuta pri +4 °C. Završno se ispiru tri puta u 5 ml destilirane vode (po 30 minuta pri +4 °C). Ako se istoga dana ne nastavlja s postupkom restrikcije bakterijske DNA, blokovi se mogu pohraniti nekoliko mjeseci na +4 °C uz ispiranje svakih nekoliko dana u TE puferu.



### 3.7.3. Cijepanje kromosomske DNA pomoću restrikcijskih endonukleaza koje “rijetko” cijepaju

Kao preporučeni enzim za cijepanje kromosomske DNA *A. baumannii* korišten je *Apa I* (Sigma, USA) (98). Neposredno prije cijepanja s odgovarajućom restrikcijskom endonukleazom, blokovi agaroze isperu se od TE pufera 4 puta u destiliranoj vodi. Blokovi agaroze s uklopljenom kromosomskom DNA uravnoteže se u 300 µl odgovarajućeg pufera za restrikcijski enzim. Intaktna kromosomska DNA u bloku agaroze cijepa se s odgovarajućom restrikcijskom endonukleazom za pojedini soj u mikrokiveti konačnog volumena 200 µl u kojem se nalazi:

- 2 µl enzima *Apa I* (10 jedinica enzima /1 µl)
- 20 µl odgovarajućeg pufera (10x) za restrikcijski enzim
- 178 µl vode.

Blokovi agaroze se inkubiraju na temperaturi propisanoj od proizvođača (30°C) za odgovarajući enzim (*Apa I*), uz vrlo lagano miješanje (15 o/min.). Nakon završetka inkubacije blokovi agaroze se prenesu u 2 ml prethodno ohlađenog TE pufera (+4° C) i postavljaju u jažice gela 1,2% agaroze za elektroforezu, te zaliju s 0,7% LMP agarozom.

#### 3.7.4. Elektroforeza u pulsirajućem polju

Elektroforeza u pulsirajućem polju za svaki je soj izvedena zbog genotipizacije kliničkih izolata *A. baumannii* (96). Izvođenje elektroforeze odvija se pod zajedničkim i posebnim uvjetima za pojedine izolate.

*Zajednički uvjeti za izvođenje elektroforeze:* Za postavljanje elektroforeze potrebno je 150 ml 1%-tnog gela agaroze (PFGE agaroz) u TBE puferu (89 mM TrisCl, 89 mM borna kiselina, 2mM EDTA; pH 8,0). U jažice gela smješteni su blokovi agaroze koji sadrže pocijepanu kromosomsku DNA te blokovi agaroze koji sadrže molekularni standard (lambda konkatamer, Fermentas, Njemačka). Blokovi su učvršćeni s 0,6% agarozom (50° C). U pufer TBE dodana je Tiourea (50 mmol dm<sup>-3</sup>). Gel s učvršćenim blokovima agaroze postavljen je u pufer i uravnotežen na sobnoj temperaturi 5 minuta prije početka elektroforeze.

*Posebni uvjeti za izvođenje elektroforeze:* Za svaki izolat postavljeni su i posebni uvjeti: *Acinetobacter baumannii* (enzim *Apa I*; vrijeme pulsiranja: inicijalno 5 sekunda, a konačno 13 sekunda; jačina električnog polja: 6,0 V/cm; kut pulsiranja: 120°; trajanje elektroforeze 20 sati; temperatura 14°C) (98).

Po završetku elektroforeze gel je standardno obojen otopinom etidij bromida (1 µg/ml, 30 minuta), te odbojen u destiliranoj vodi (tri izmjene vode po 20 minuta uz lagano miješanje). Gel s obojenim DNA vrpčama se fotografira Polaroid 667 filmom uz osvjetljenje na UV transiluminatoru (254 nm). Koristeći računalni program *GelCompar*™ (Applied Maths, Belgium), pomoću dendrograma je određen postotak sličnosti između pojedinih bakterijskih sojeva. PFGE genotipovi (podtipovi) su određeni prema sličnosti odijeljenih profila DNA između istih bakterijskih vrsta.

### 3.7.5. Interpretacija rezultata genotipizacije prema Tenoveru

Rezultati se interpretiraju po Tenoverovim kriterijima, prema kojima se smatra da su sojevi genotipski identični ako se razlikuju u manje od tri ulomka DNA (100). Osnovu analize predstavlja određivanje broja razlika u ulomcima (vrpcama) između pojedinih uzoraka, odnosno sojeva. Prema prisutnosti ili odsutnosti DNA ulomaka (odijeljeni pocijepani dijelovi DNA) u pojedinom uzorku, mikroorganizmi se svrstavaju u četiri kategorije sličnosti (srodnosti) po Tenoveru (100).

1. Istovjetni sojevi – nema razlike u ulomcima DNA između testiranih izolata
2. Vrlo slični sojevi – razlika u 1 do 2 ulomka
3. Eventualno slični sojevi – razlika u 3 do 5 ulomaka
4. Različiti sojevi – razlika u 6 ili više ulomaka.

S obzirom na veliki broj sojeva, DNA sličnost analizirana je kompjutorskim programom *GelCompar*<sup>TM</sup> kojim se izračunava Diceov koeficijent sličnosti između testiranih sojeva. Na temelju ovog koeficijenta, metodom grupiranja parova uzoraka bez statističke obrade s aritmetičkom sredinom UPGMA (engl. *unweighted pair group method using arithmetic averages*) izrađen je dendrogram kojim se prikazuje srodnost sojeva.

### **3.8. Potrošnja antibiotika u KBC Split**

Podatci o potrošnji karbapenemskih antibiotika unutar KBC Split, kao i na odjelima s kojih potječe većina kliničkih izolata *A. baumannii*, potječu iz arhive Odjela za lijekove i sanitetski materijal KBC Split. Podatci o potrošnji karbapenemskih antibiotika izraženi u definiranim dnevnim dozama (DDD) na 100 bolesničkih dana izrađeni su pomoću računalnog programa ABC kalkulator 3,0. Navedeni računalni program prihvaćen je od strane Akademije medicinskih znanosti Hrvatske i Odbora za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj, kao jedinstveni način praćenja potrošnje antibiotika u zdravstvenim ustanovama u Hrvatskoj (88). Podatci o potrošnji karbapenemskih antibiotika po odjelima dostupni su od 2003. godine.

### **3.9. Statističke metode**

Statističkom obradom rezultata istražili smo postojanje razlike među proporcijama pomoću paketa Statistica 6.0. U statističkoj analizi podataka potrošnje karbapenemskih antibiotika korišten je jednosmjerni  $\chi^2$  test. Rezultati statističke analize interpretirani su na razini značajnosti  $P < 0,001$ .

## **4. REZULTATI**

## 4. REZULTATI

Tijekom proteklih godina primijećeno je značajno povećanje broja kliničkih izolata *A. baumannii* unutar KBC Split. Odjeli s kojih su najčešće izolirani ovi izolati su Jedinica intenzivnog liječenja Križine (CIT Križine), Jedinica intenzivnog liječenja Firule (CIT Firule), Neurokirurška intenzivna jedinica (NKI) i Jedinica za kirurško liječenje (KI), a sporadično i ostali odjeli unutar KBC Split. Ukupan broj kliničkih izolata *A. baumannii* izoliranih u razdoblju od 2000. do 2007. godine unutar KBC Split prikazan je u tablici 4.1. Usporedo s porastom broja kliničkih izolata *A. baumannii* raste i broj izolata sa smanjenom osjetljivošću na jedan i/ili oba karbapenema s MIK-om  $> 4\text{mg/l}$  na imipenem i/ili meropenem. Tijekom 2002. i 2003. godine dolazi do značajnog porasta broja kliničkih izolata *A. baumannii*, što se podudara sa sve većom potrošnjom karbapenemskih antibiotika, kao što je i prikazano u tablici 4.2. Potrošnja karbapenema izrazito raste 2002. godine, a svoj vrhunac doseže 2003. godine. Tijekom 2001. godine potrošnja oba karbapenema (imipenem, meropenem) bila je podjednaka, da bi tijekom razdoblja praćenja dominantna bila potrošnja meropenema. Statistička analiza jednosmjernim  $\chi^2$  testom potvrdila je postojanje razlike na razini značajnosti  $P < 0,001$  između potrošnje imipenema i meropenema tijekom 2002.-2007. godine, kao što je prikazano u tablici 4.2. Grafički prikaz potrošnje karbapenema po godinama prikazan je na slici 4.1

**Tablica 4.1.** Raspodjela kliničkih izolata *A. baumannii* sa smanjenom osjetljivošću (N) na karbapeneme u KBC Split po godinama

Godina	Ukupan broj izolata N	Smanjena osjetljivost na	
		Imipenem	Meropenem
		N (%)	N (%)
2000.	11	0	0
2001.	35	0	0
2002.	126	4 (3,2)	13 (10,3)
2003.	136	10 (7,4)	40 (29,4)
2004.	307	4 (1,3)	40 (13,0)
2005.	310	9 (2,9)	80 (25,8)
2006.	204	8 (3,9)	78 (38,2)
2007.	268	23 (8,6)	153 (57,1)

Podatci prikazani u tablici 4.1 ukazuju na postojanje razlike u osjetljivosti na imipenem i meropenem u kliničkih izolata *A. baumannii*. Tijekom 2000. i 2001. svi izolati su bili osjetljivi na karbapeneme. Tijekom 2007. godine svega 42,9 % izolata je osjetljivo na meropenem, dok je 91,4 % *Acinetobacter baumannii* osjetljivo na imipenem.

U razdoblju od 2002. do 2007. godine raste broj kliničkih izolata *A. baumannii*, pa 2007.

godine imamo dvostruko veći broj kliničkih izolata u odnosu na 2002. godinu. Najveći broj izolata zabilježen je 2004. i 2005. godine, kada ukupan broj godišnjih izolata prelazi 300. Usporedo s većim brojem kliničkih izolata *A. baumannii* raste i broj izolata sa smanjenom osjetljivošću na jedan i/ili oba karbapenema.

**Tablica 4.2.** Ukupna potrošnja karbapenema po godinama izražena u definiranim dnevnim dozama (DDD) na 100 bolesničkih dana u KBC Split

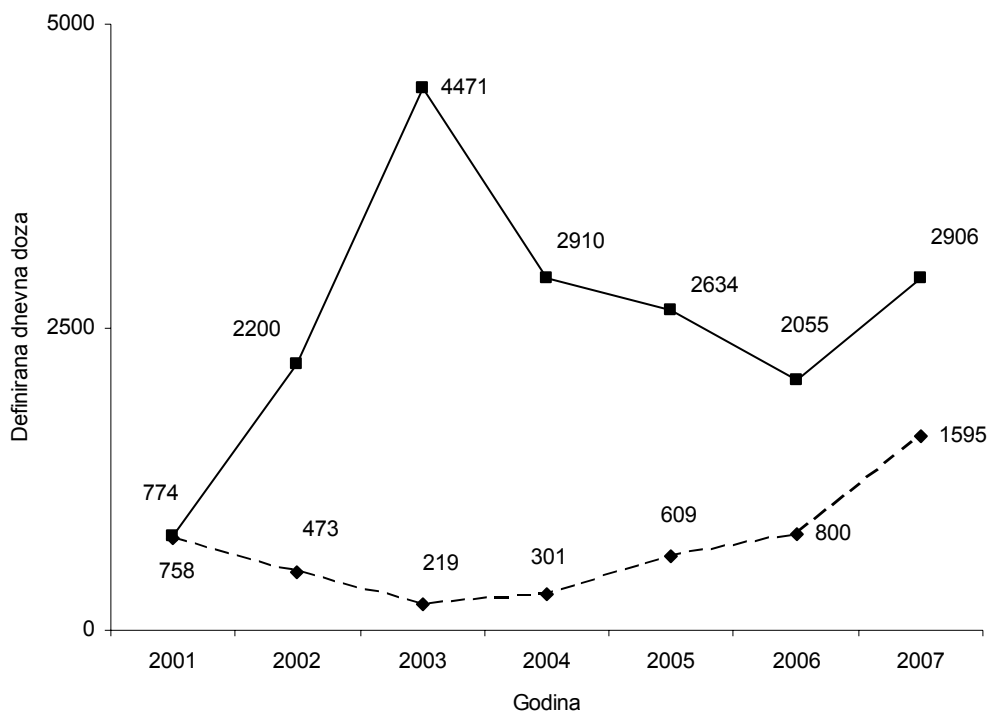
Godina	Potrošnja imipenema (DDD)	Potrošnja meropenema (DDD)	p
2001.	758	774	0,683
2002.	473	2200	< 0,001*
2003.	219	4471	< 0,001*
2004.	301	2910	< 0,001*
2005.	609	2634	< 0,001*
2006.	800	2055	< 0,001*
2007.	1595	2906	< 0,001*

$\chi^2$  test, \* statistički značajno

Podatci prikazani u tablici 4.2 ukazuju na statistički značajno povećanje potrošnje karbapenemskih antibiotika, prvenstveno meropenema od 2002. godine, koje je prisutno sve do kraja istraživanja 2007. godine. Prema prikupljenim podacima s početka istraživanja, 2001. godine oba karbapenema su bila podjednako zastupljena. Najveća potrošnja meropenema zabilježena je 2003. godine kada se, u odnosu na imipenem,

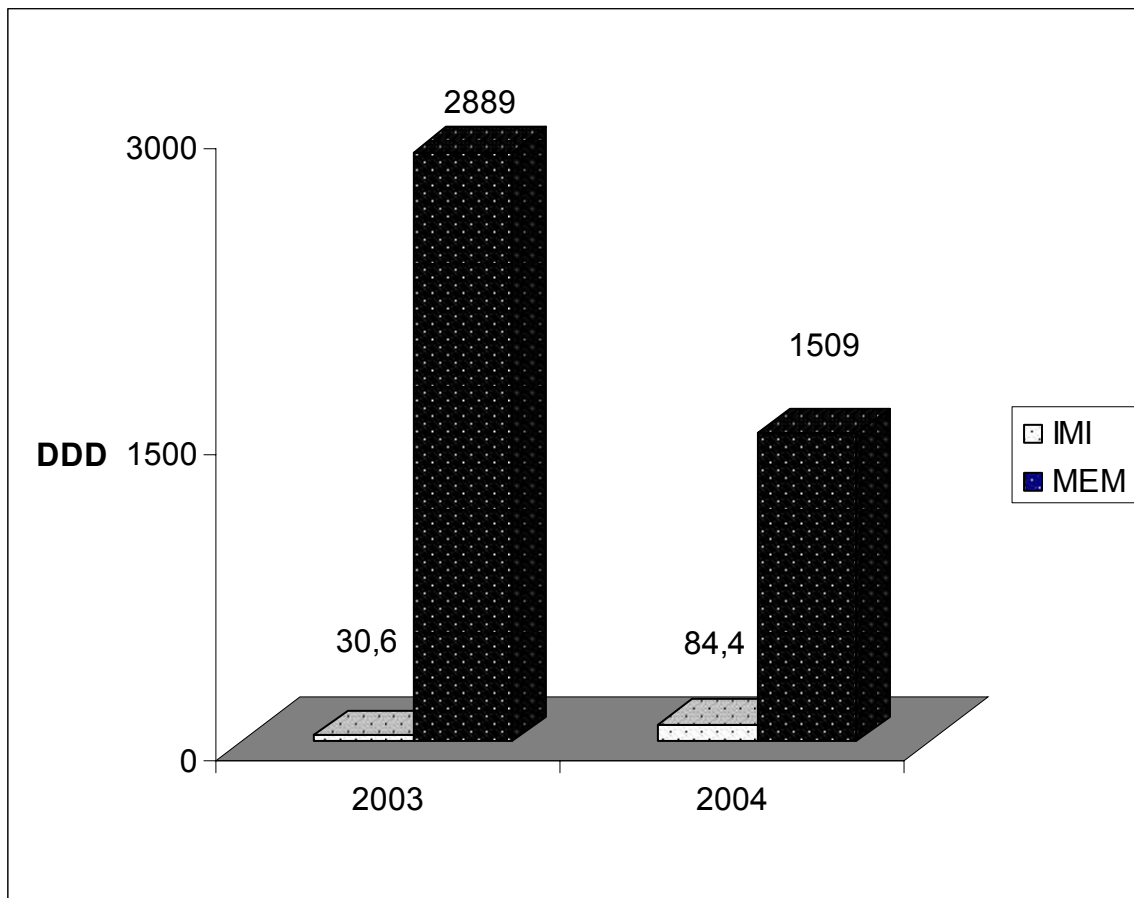


meropenema trošilo i do 20 puta više. Godine 2007. meropenema se trošilo dva puta više u odnosu na imipenem.



**Slika 4.1.** Grafički prikaz potrošnje imipenema (isprekidana crta, romb) i meropenema (puna crta, kvadratić) u definiranim dnevnim dozama po godinama unutar KBC Split.

Na slici 4.1 vidljiva kontinuirano visoka potrošnja meropenema od 2002. do 2007. godine. Potrošnja imipenema gotovo je uravnotežena do 2006. godine, dok tijekom 2007. dolazi do dvostrukog povećanja potrošnje imipenema u odnosu na 2006. godinu, ali ipak gotovo dvostruko manje od potrošnje meropenema.

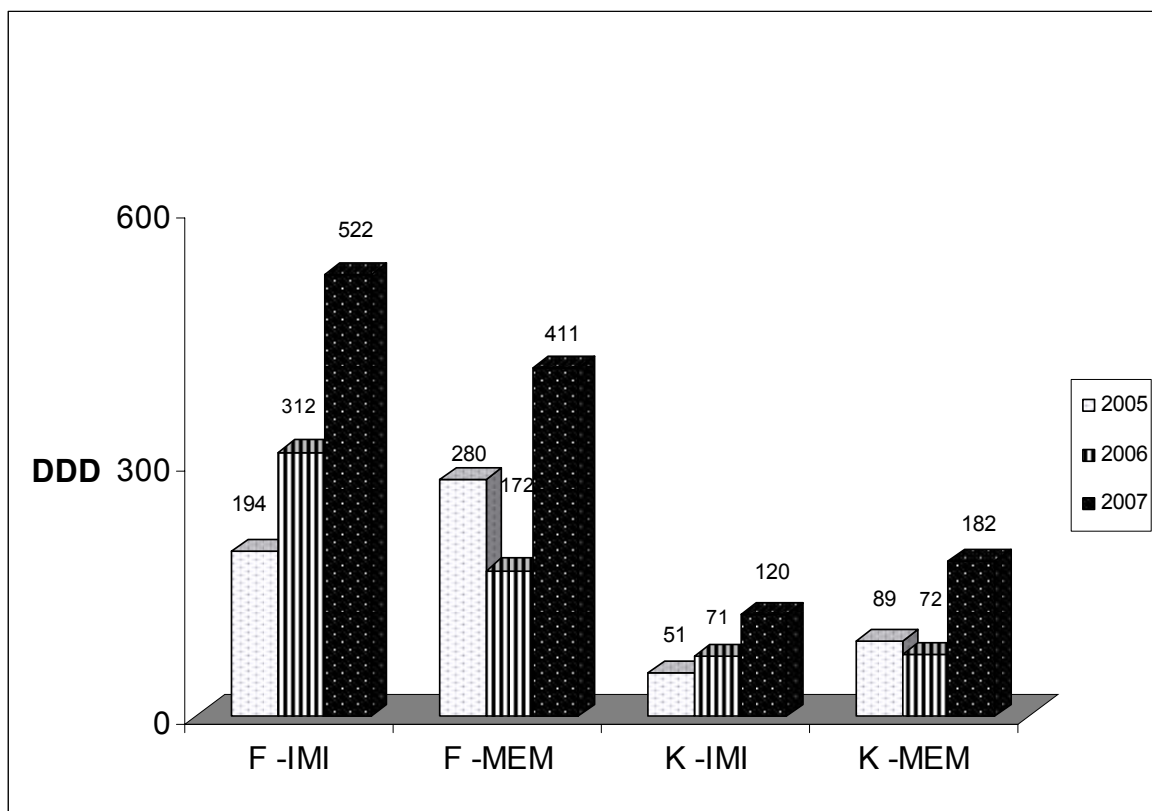


**Slika 4.2** Usporedba potrošnje imipenema i meropenema u DDD u dva CIT-a (Firule i Križine) KBC Split tijekom 2003.-2004. godine.

IMI – imipenem; MEM - meropenem

Usporedba potrošnje karbapenemskih antibiotika u dvije centralne intenzivne jedinice prikazana je na slici 4.2. Podatci o potrošnji karbapenemskih antibiotika unutar pojedinih odjela dostupni su od 2003. godine. Tijekom 2003. i 2004. godine nije bilo moguće razlučiti potrošnju unutar Jedinice intenzivnog liječenja Firule i Križine, pa su podatci prikazani skupno. Iz slikovnog prikaza je vidljivo da su oba odjela značajno više trošila meropenem u odnosu na imipenem. Potrošnja meropenema značajno je viša 2003. godine, što se podudara i s ukupnom potrošnjom meropenema navedene godine, kao što je

prikazano u tablici 4.2. Iste godine raste i broj kliničkih izolata *A. baumannii* sa smanjenom osjetljivošću na karbapeneme (tablica 4.1).

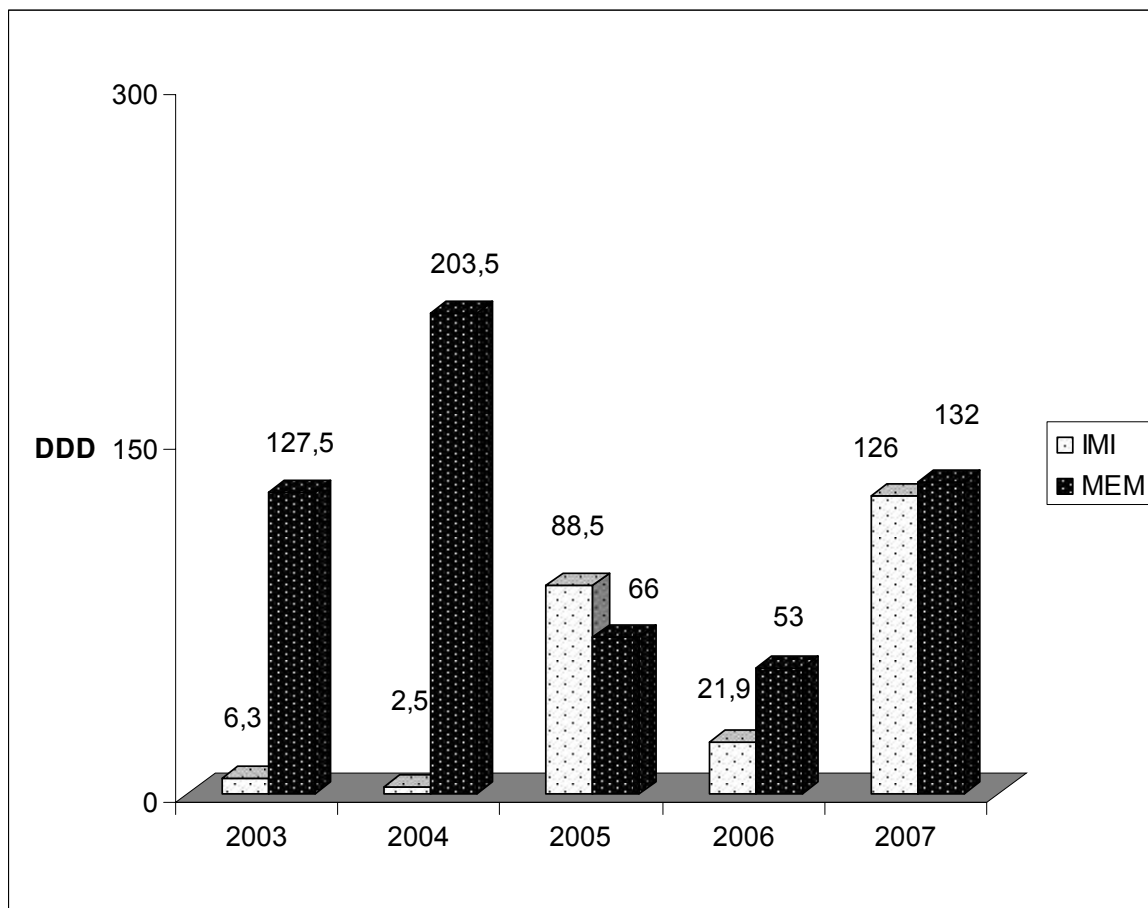


**Slika 4.3.** Usporedba potrošnje imipenema i meropenema u DDD u CIT Firule (F) i CIT Križine (K) po godinama tijekom 2005.-2007.

IMI – imipenem; MEM - meropenem

Usporedba potrošnje karbapenema unutar Jedinice intenzivnog liječenja Firule (CIT F) i Jedinice intenzivnog liječenja Križine (CIT K) prikazan je na slici 4.3. CIT Firule ima veći broj kreveta (12) u odnosu na CIT Križine (8), te veću potrošnju karbapenemskih antibiotika, kao što je vidljivo na slici 4.3. Tijekom trogodišnjeg razdoblja (2005., 2006. i 2007.) uspoređena je potrošnja imipenema i meropenema za obje jedinice intenzivne njege. Tijekom trogodišnjeg razdoblja raste potrošnja imipenema u CIT Firule, za razliku od potrošnje meropenema u promatranom razdoblju. U CIT-u Križine bilježi se blagi porast

potrošnje imipenema od 2005. do 2007. godine, dok je potrošnja meropenema veća u odnosu na potrošnju imipenema u promatranom razdoblju.

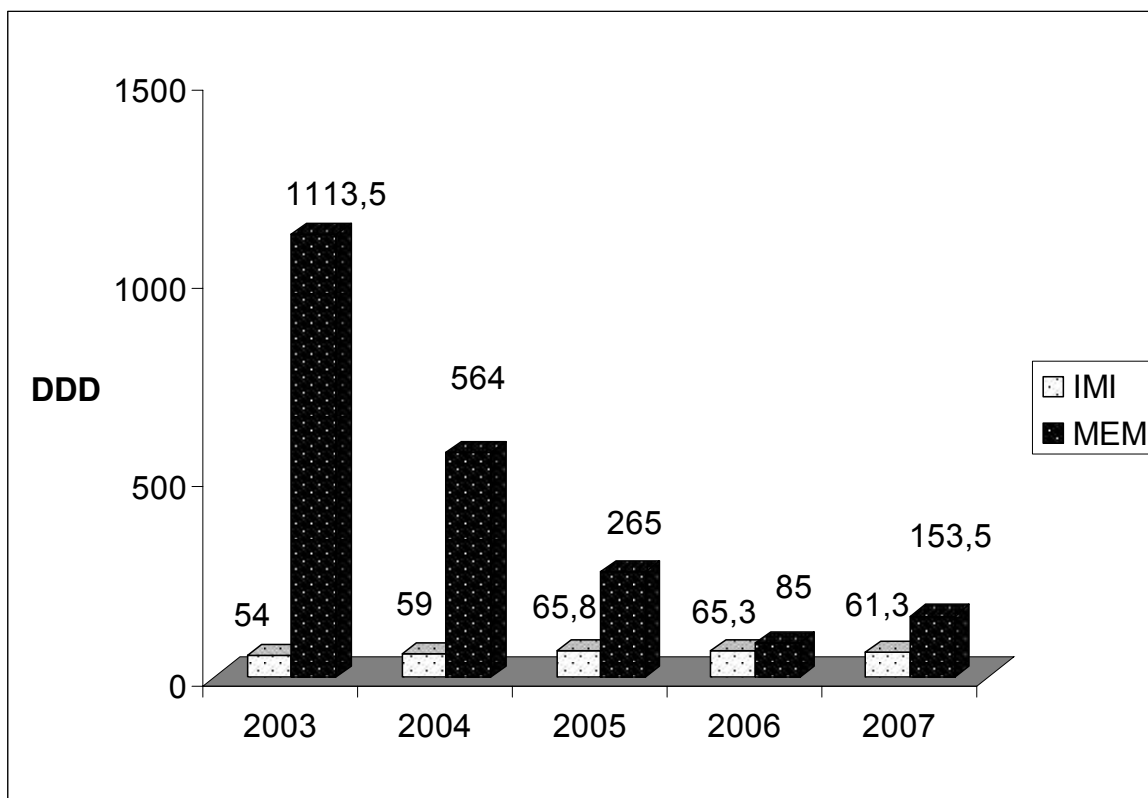


**Slika 4.4.** Prikaz potrošnje imipenema i meropenema u DDD u Neurokirurškoj intenzivnoj jedinici po godinama tijekom 2003.-2007.

IMI – imipenem; MEM - meropenem

Neurokirurška intenzivna jedinica (NKI), kao samostalna jedinica intenzivne njege osnovana je 1998. godine i ima 9 kreveta. Prikaz potrošnje karbapenema unutar NKI prikazan je na slici 4.4. Ukupna potrošnja karbapenemskih antibiotika u NKI tijekom 2003.-2004. godine veća je u odnosu na potrošnju tijekom 2005.-2007. godine. Tijekom 2003. i 2004. godine dominantna je potrošnja meropenema, dok tijekom 2007. godine imamo gotovo podjednaku potrošnju oba karbapenemska antibiotika. Ukupna potrošnja

karbapenemskih antibiotika u NKI značajno je smanjena tijekom 2005. i 2006. godine, dok se tijekom 2007. godine bilježi porast potrošnje oba karbapenema.



**Slika 4.5.** Prikaz potrošnje imipenema i meropenema u DDD u Kirurškoj intenzivnoj jedinici po godinama tijekom 2003.-2007.

IMI – imipenem; MEM - meropenem

Kirurška intenzivna jedinica (KI), kao samostalna jedinica intenzivnog liječenja osnovana je 1995. godine i ima 10 kreveta. Prikaz potrošnje karbapenema unutar KI prikazan je na slici 4.5. Uočljiva je velika potrošnja meropenema tijekom 2003. i 2004. godine, kada se meropenem davao i u profilaksi kirurških operacija. Tijekom 2005. godine značajno je smanjena uporaba meropenema, a nakon 2005. opada broj kliničkih izolata *A. baumannii* rezistentih na karbapeneme podrijetlom iz kirurškog šoka. Tijekom 2007. godine s ovoga je odjela izoliran samo jedan izolat *A. baumannii* rezistentan na

karbapeneme. Značajno je naglasiti da je potrošnja imipenema tijekom petogodišnjeg razdoblja istraživanja gotovo jednaka.

Rezultati testiranja osjetljivosti disk-difuzijskom metodom poslužili su za probir među kliničkim izolatima *A. baumannii* koji imaju smanjenu osjetljivost na meropenem i/ili imipenem. Među izolatima koji imaju smanjenu osjetljivost na karbapeneme uočena je velika fenotipska sličnost. Gotovo svi izolati su multiplo rezistentni na većinu testiranih antibiotika, uključujući ceftazidim, ceftriakson, cefotaksim, ciprofloksacin, gentamicin, amikacin te piperacilin/tazobaktam. Svi su izolati osjetljivi na kombinaciju ampicilin/sulbaktam u kojoj sulbaktam može imati djelotvornost na kliničke izolate *A. baumannii*. Smanjena osjetljivost na karbapeneme uočena disk - difuzijskom metodom testiranja potvrđena je određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije metodom mikrodilucije u bujonu. Raspon minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) za imipenem iznosio je od 2 mg/l do 64 mg/l, dok je za meropenem taj raspon iznosio od 8 mg/l do 128 mg /l. Kumulativni postotci inhibicije karbapenemima prikupljenih i testiranih kliničkih izolata *A. baumannii* prikazani su u tablici 4.3.

**Tablica 4.3** Kumulativni postotci izolata *A. baumannii* (n=106) inhibirani imipenemom i meropenemom u KBC Split

Antibiotik	Koncentracija antibiotika (mg/l)								
	≤ 0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
Imipenem			18	71	85	96	98	100	
Meropenem					52	79	87	99	100

Podatci prikazani u tablici 4.3 ukazuju na postojanje razlike u osjetljivosti kliničkih izolata *A. baumannii* na karbapeneme. Uspoređujući kumulativne postotke, više od polovice izolata (71%) ima MIK za imipenem 4 mg/l, što po kriterijima CLSI spada u kategoriju osjetljivih. Uspoređujući MIK za meropenem, 52% izolata ima MIK 8 mg/l, što po kriterijima spada u kategoriju umjereno osjetljivih izolata. Ukupan broj testiranih izolata inhibiran je imipenemom u koncentraciji 64 mg/l, dok je za isti broj inhibitorna koncentracija za meropenem 128 mg/l.

Svi prikupljeni izolati *A. baumannii* mogu se nazvati multiplerezistentnim ili multirezistentnim izolatima, zbog postojeće korezistencije na aminoglikozide, kinolone i beta-laktamske antibiotike. Iznimku predstavlja osjetljivost izolata na ampicilin/sulbaktam, gdje djelatnu komponentu predstavlja i sulbaktam koji ima antibakterijski učinak na *Acinetobakter spp.* Raspon minimalnih inhibitornih koncentracija na pojedine antibiotike kao i vrijednost MIK<sub>50</sub> i MIK<sub>90</sub> prikazani su u tablici 4.4.

**Tablica 4.4.** Prikaz vrijednosti raspona MIK-a, te MIK<sub>50</sub> i MIK<sub>90</sub> za prikupljene izolate *A. baumannii*

Antibiotik	Raspon MIK (mg/l)	MIK <sub>50</sub>	MIK <sub>90</sub>
Imipenem	2–64	4	8
Meropenem	8 – 128	8	32
Ceftazidim	128 - >128	128	>128
Cefotaksim	32->128	64	128
Ceftriakson	64 - >128	128	>128
Cefepim	32 - >128	64	128
Ciprofloksacin	4 – 64	16	32
Amikacin	32 - >128	64	128
Gentamicin	8 - >128	128	>128
Piperacilin/tazobaktam	64 - >128	128	>128

Podatci prikazani u tablici 4.4 ukazuju da se vrijednosti MIK<sub>50</sub> i MIK<sub>90</sub> razlikuju za jedno dvostruko serijsko razrjeđenje za sve testirane antibiotike osim za meropenem. Raspon MIK za imipenem kreće se od 2 mg/l, što bi po interpretaciji CLSI pripadalo u kategoriju osjetljivih izolata do 64 mg/l, što se tumači kao rezistentan. Raspon MIK za meropenem kreće se od 8 mg/l, što odgovara umjereno osjetljivom, do 128 mg/l, što se tumači kao



rezistentan. Za sve ostale testirane antibiotike navedene u tablici 4.4,  $MIK_{50}$  i  $MIK_{90}$  nalaze se u kategoriji rezistentnih izolata. S obzirom na navedene vrijednosti MIK u tablici 4.4, možemo zaključiti da se radi o multiplo rezistentnim izolatima *A. baumannii*.

Multiplorezistentni klinički izolati *A. baumannii* prikupljeni za izradu ove disertacije iskazuju korezistenciju i na većinu ostalih skupina antibiotika (tablica 4.5). Svi izolati su rezistentni na treću i četvrtu generaciju cefalosporina, aminoglikozide te piperacilin/tazobaktam.

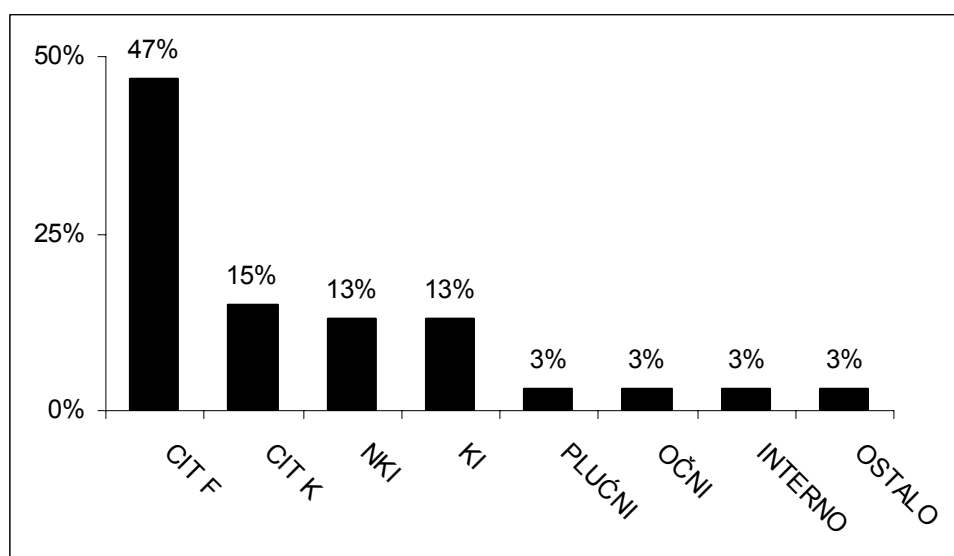
**Tablica 4.5.** Prikaz korezistencije odabranih kliničkih izolata *A. baumannii* s pojedinih intenzivnih njega i odjela unutar KBC Split

Odjeli	Izolat	IMI	MEM	GN	AN	CIP	TZP	CAZ	FEP
CIT F	1	I	R	R	R	R	R	R	R
CIT K	3	S	I	R	R	R	R	R	R
NKI	6	S	R	R	R	I	R	R	R
KI	78	R	R	R	R	R	R	R	R
JILD	7	R	R	R	R	I	R	R	R
Interna klinika	11	I	R	R	R	R	R	R	R
Plućna klinika	73	I	R	R	R	R	R	R	R
Očna klinika	99	S	R	R	R	R	R	R	R

S – osjetljiv, I – umjereno osjetljiv, R - rezistentan  
 IMI – imipenem, MEM – meropenem, GN – gentamicin, AN – amikacin,  
 CIP – ciprofloksacin, TZP – piperacilin/tazobaktam, CAZ – ceftazidim, FEP - cefepim

Usporedba odabranih kliničkih izolata *A. baumannii* s pojedinih odjela KBC Split prikazana u tablici 4.5 potvrđuje da su multiplo rezistentni izolati prošireni u svim navedenim jedinicama intenzivnog liječenja, a sporadično i na pojedinim odjelima.

Jedini izolat s Jedinice intenzivnog liječenja djece umjereno je osjetljiv na kinolon, za razliku od drugih izolata prikupljenih tijekom višegodišnjeg razdoblja istraživanja.

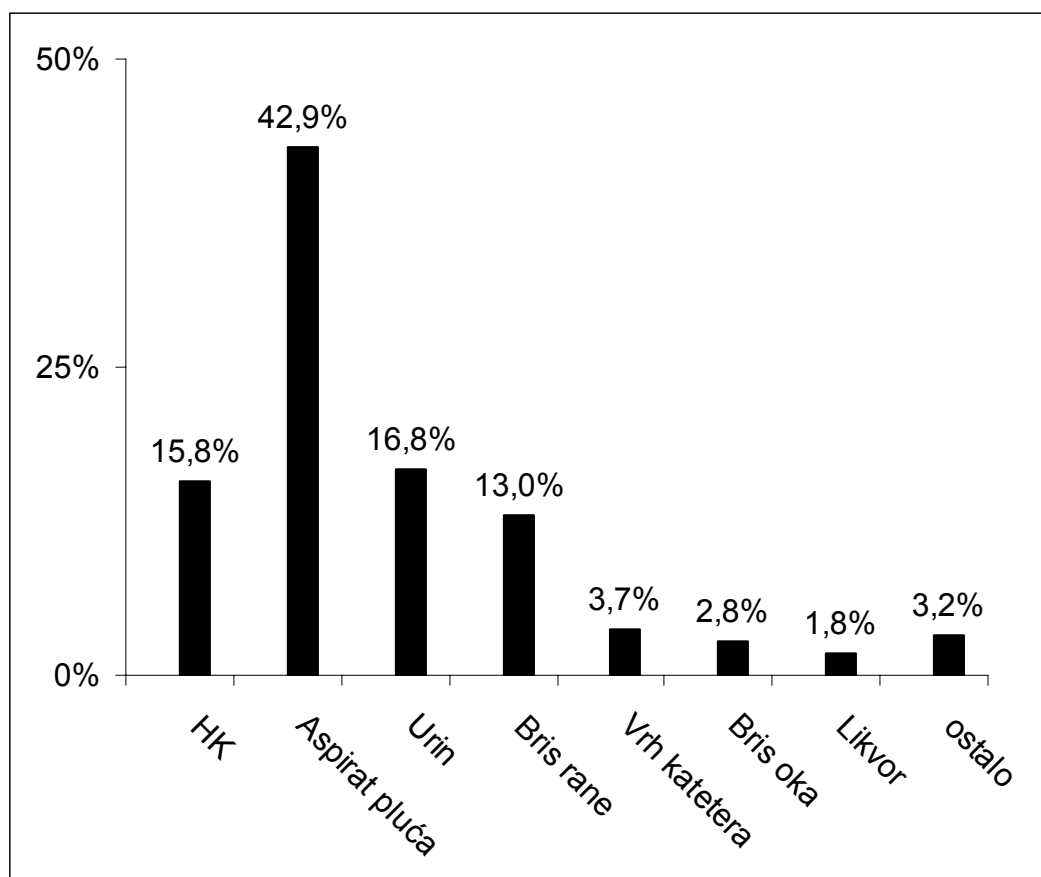


**Slika 4.6.** Raspodjela prikupljenih kliničkih izolata *A. baumannii* po odjelima tijekom 2003.-2007.godine unutar KBC Split. CIT F – Jedinica intenzivnog liječenja Firule; CIT K – Jedinica intenzivnog liječenja Križine; NKI – Neurokirurška intenzivna Jedinica; KI – Kirurška intenzivna jedinica

Rezultati raspodjele kliničkih izolata *A. baumannii* po odjelima s kojih potječu, prikazani su na slici 4.6. CIT Firule je najveća jedinica intenzivnog liječenja unutar KBC Split, a kao i CIT Križine ima godišnju popunjenost od preko 90 %. Među izolatima *A. baumannii* sa smanjenom osjetljivošću na karbapeneme, u razdoblju od 2002. do 2007. godine unutar KBC Split najviše je kliničkih izolata prikupljeno u CIT Firule (47 %). Drugi po redu po

broju prikupljenih kliničkih izolata je CIT Križine, a zatim slijede NKI i KI. Malen broj izolata prikupljen je s Plućnoga, Očnoga i Internoga odjela, po jedan izolat s Jedinice intenzivnog liječenja djece, Odjela za uho, grlo i nos, te s vanjskog pacijenta koji je imao nekoliko hospitalizacija u anamnezi.

Prospektivno prikupljeni klinički izolati *A. baumannii* sa smanjenom osjetljivošću na karbapeneme analizirani su i prikazani u odnosu na vrstu biološkog uzorka iz kojega su izolirani (slika 4.7).



**Slika 4.7.** Raspodjela prikupljenih kliničkih izolata *A. baumannii* prema vrsti biološkog uzorka. HK – hemokultura.

Najviše izolata prikupljeno je iz aspirata pluća (42,9 %) hospitaliziranih bolesnika, iz hemokulture izolirano je 15,8 % klinički značajnih izolata, a 16,8 % iz urina bolesnika. Značajan postotak (13 %) izoliran je iz brisa rane, dok su rjeđe zastupljeni izolati iz vrha katetera, brisa oka, likvora, brisa ždrijela i gnoja.

Popis svih izolata *A. baumannii* uključenih u izradu ove studije prikazan je u tablici 4.6.

**Tablica 4.6.** Prikaz svih izolata *A. baumannii* uključenih u izradu ove studije

Broj PFGE	Odjel <sup>†</sup>	Uzorak <sup>*</sup>	Mj / God	MIK Imi	MIK Mem	IS <i>Aba1</i> /OXA 51	Lab br
1	CIT F	hk	9/03	8	32	+	Hk 4246
2	CIT F	hk	3/02	4	16	+	Hk 166
3	CIT K	as	2/04	4	8	+	Dg 1391
4	KIR	br	9/03	2	8	+	Dg 7502
5	CIT F	ur	9/03	16	64	+	Ur 10038
6	NKI	ur	10/03	8	32	+	Ur 11123
7	JILD	bž	9/03	16	64	+	Dg 8008
8	CIT K	as	9/03	2	8	+	Dg 8037
9	NKI	ur	10/03	16	64	+	Ur 11204
10	NKI	li	11/03	16	64	+	L 314
11	INT	hk	4/04	8	16	+	Hk 2040

**Tablica 4.6.** (nastavak)

Broj PFGE	Odjel <sup>†</sup>	Uzorak <sup>*</sup>	Mj / God	MIK Imi	MIK Mem	ISAba1/OXA 51	Lab br
12	NKI	ur	11/03	2	8	+	Ur 12795
13	NKI	ur	11/03	16	64	+	Ur 12961
14	CIT K	ur	12/03	2	8	-	Ur 13570
15	CIT K	as	12/03	16	64	+	Dg 10379
16	CIT F	as	12/03	4	8	+	Dg 10700
17	ORL	br	11/03	2	8	-	Dg 9089
18	CIT F	as	2/04	2	8	-	Dg 1884
19	CIT F	as	11/03	2	8	+	Dg 9462
20	NKI	ur	3/04	4	8	+	Ur 3151
21	CIT F	kt	3/04	2	8	+	Dg 2339
22	CIT F	hk	1/04	2	8	+	Hk 503
23	CIT F	as	7/04	4	16	+	Dg 5989

**Tablica 4.6.** (nastavak)

Broj PFGE	Odjel <sup>†</sup>	Uzorak <sup>*</sup>	Mj / God	MIK Imi	MIK Mem	ISAba1/OXA 51	Lab br
24	CIT F	as	6/04	4	16	+	Dg 5440
25	CIT F	as	3/04	4	16	+	Dg 3070
26	CIT K	hk	9/04	4	8	+	Hk 4837
27	KI	as	9/04	2	8	+	Dg 7710
28	CIT K	as	8/04	16	64	+	Dg 7340
29	CIT F	ur	9/04	2	8	+	Ur 9772
30	KI	as	11/04	4	8	+	Dg 9361
31	NKI	as	10/04	4	32	+	Dg 8824
32	NKI	as	10/04	4	16	+	Dg 9008
33	CIT F	as	11/04	4	16	+	Dg 9226
34	NKI	br	10/04	4	8	+	Dg 8821
35	NKI	as	12/04	4	8	-	Dg 10246
36	CIT F	as	11/04	4	16	+	Dg 9567

**Tablica 4.6.** (nastavak)

Broj PFGE	Odjel <sup>†</sup>	Uzorak <sup>*</sup>	Mj / God	MIK Imi	MIK Mem	IS <i>Aba1</i> /OXA 51	Lab br
37	NKI	as	12/04	4	8	-	Dg 10220
38	KI	br	3/05	4	8	+	Dg 2299
39	CIT K	as	1/04	2	8	+	Dg 289
40	KI	br	4/05	4	8	+	Dg 3528
41	CIT F	as	3/05	4	16	+	Dg 3130
42	NKI	li	4/05	4	16	+	Li 72
43	CIT F	pus	4/05	4	8	+	Dg 3545
44	CIT F	hk	5/05	4	16	+	Hk 2301
45	KI	br	4/05	4	16	+	Dg 3806
46	CIT F	as	6/05	8	8	+	Dg 6012
47	CIT F	as	6/05	16	32	+	Dg 6018
48	KI	hk	5/05	64	64	+	Hk 2592



**Tablica 4.6.** (nastavak)

Broj PFGE	Odjel <sup>†</sup>	Uzorak <sup>*</sup>	Mj / God	MIK Imi	MIK Mem	ISAba1/OXA 51	Lab br
49	CIT F	br	5/05	4	8	+	Dg 4966
50	CIT F	as	6/05	16	64	+	Dg 5823
51	CIT F	br	6/05	4	8	+	Dg 6043
52	CIT F	hk	8/05	2	8	+	Hk 4621
53	CIT F	ur	8/05	4	8	+	Ur 8549
54	CIT F	kt	8/05	4	8	+	Dg 7464
55	KIR	br	8/05	4	8	+	Dg 7410
56	VP	br	8/05	8	8	+	Dg 4711
57	CIT F	hk	7/05	4	8	+	Hk 3906
58	CIT F	hk	8/05	8	8	+	Hk 4555
59	INT	ur	7/05	8	8	+	Ur 7917
60	CIT K	as	7/05	4	8	+	Dg 6928
61	CIT F	as	7/05	4	8	+	Dg 6752

**Tablica 4.6.** (nastavak)

Broj PFGE	Odjel <sup>†</sup>	Uzorak <sup>*</sup>	Mj / God	MIK Imi	MIK Mem	ISAba1/OXA 51	Lab br
62	CIT F	ur	7/05	4	8	+	Ur 7739
63	KIR	br	7/05	4	8	+	Dg 6770
64	NKI	as	7/05	8	8	+	Dg 6880
65	CIT F	as	7/05	8	8	+	Dg 6869
66	CIT F	ur	7/05	4	8	+	Ur 7845
67	CIT F	as	7/05	4	8	+	Dg 6808
68	CIT F	vk	7/05	4	8	+	Dg 6916
69	CIT F	as	7/05	4	8	+	Dg 7002
70	CIT F	br	5/05	8	16	+	Dg 5005
71	CIT F	ur	9/05	4	8	+	Ur 9139
72	CIT F	ur	9/05	8	8	+	Ur 9373
73	PL	as	8/05	8	16	+	Dg 7715

**Tablica 4.6.** (nastavak)

Broj PFGE	Odjel <sup>†</sup>	Uzorak <sup>*</sup>	Mj / God	MIK Imi	MIK Mem	ISAba1/OXA 51	Lab br
74	INT	as	9/05	4	8	+	Dg 7913
75	KIR	br	9/05	64	128	+	Dg 7861
76	NKI	as	8/05	4	8	+	Dg 7718
77	CIT F	as	7/05	32	32	+	Dg 6404
78	KIR	br	7/05	2	8	-	Dg 6320
79	CIT F	ur	6/05	4	8	+	Ur 6903
80	CIT F	hk	9/05	8	8	+	Hk 5307
81	KI	hk	9/05	2	16	+	Hk 5463
82	CIT F	as	1/06	4	8	+	Dg 514
83	CIT F	as	10/05	2	8	+	Dg 8656
84	CIT F	ur	7/05	2	16	+	Ur 7715
85	CIT F	ur	9/05	2	8	+	Ur 9922

**Tablica 4.6.** (nastavak)

Broj PFGE	Odjel <sup>†</sup>	Uzorak <sup>*</sup>	Mj / God	MIK Imi	MIK Mem	ISAbal/OXA 51	Lab br
86	CIT F	ur	9/05	2	8	+	Ur 9883
87	CIT K	hk	10/05	2	8	+	Hk 5897
88	PL	as	10/07	4	16	+	Dg 8846
89	CIT F	as	10/07	4	32	+	Dg 8521
90	CIT K	br	9/07	32	64	+	Dg 8002
91	CIT K	hk	10/07	8	16	+	Hk 5537
92	CIT K	kt	9/07	4	16	+	Dg 7904
93	CIT K	as	9/07	4	16	+	Dg 7615
94	CIT K	hk	9/07	16	32	+	Hk 5412
95	CIT F	as	11/07	8	16	+	Dg 9591
96	CIT F	as	11/07	4	16	+	Dg 9211
97	NKI	as	11/07	4	16	+	Dg 9071
98	OČNO	bo	7/07	4	16	+	Dg 5696

**Tablica 4.6.** (nastavak)

Broj PFGE	Odjel <sup>†</sup>	Uzorak*	Mj / God	MIK Imi	MIK Mem	ISAbal/OXA 51	Lab br
99	OČNO	bo	7/07	4	16	+	Dg 5694
100	CIT K	hk	9/07	16	32	+	Hk 5413
101	CIT K	hk	9/07	4	16	+	Hk 5080
102	CIT F	as	11/07	4	16	+	Dg 8980
103	PL	as	11/07	4	16	+	Dg 9042
104	CIT F	as	11/07	4	16	+	Dg 9182
105	CIT F	as	12/07	4	32	+	Dg 9932
106	CIT F	as	11/07	4	16	+	Dg 9590
107	RUH	ARPAC project		0.25	0.125	-	

\*Hk – hemokultura; as – aspirat bronha; br – bris rane; ur – urin; kt – vrh katetera; li – likvor; pus – gnoj; bo – bris spojnice oka; bž – bris ždrijela

<sup>†</sup>KI – Jedinica za kirurško liječenje; KIR – Kirurgija odjel; PL – Klinika za plućne bolesti; VP – vanjski pacijent, prethodna hospitalizacija, više odjela; CIT K – Jedinica intenzivnog liječenja Križine; CIT F – Jedinica intenzivnog liječenja Firule; NKI – Neurokirurška intenzivna jedinica; JILD – Jedinica intenzivnog liječenja djece; INT – Interna klinika; ORL – Odjel za uho, grlo, nos; OČNO – Klinika za očne bolesti

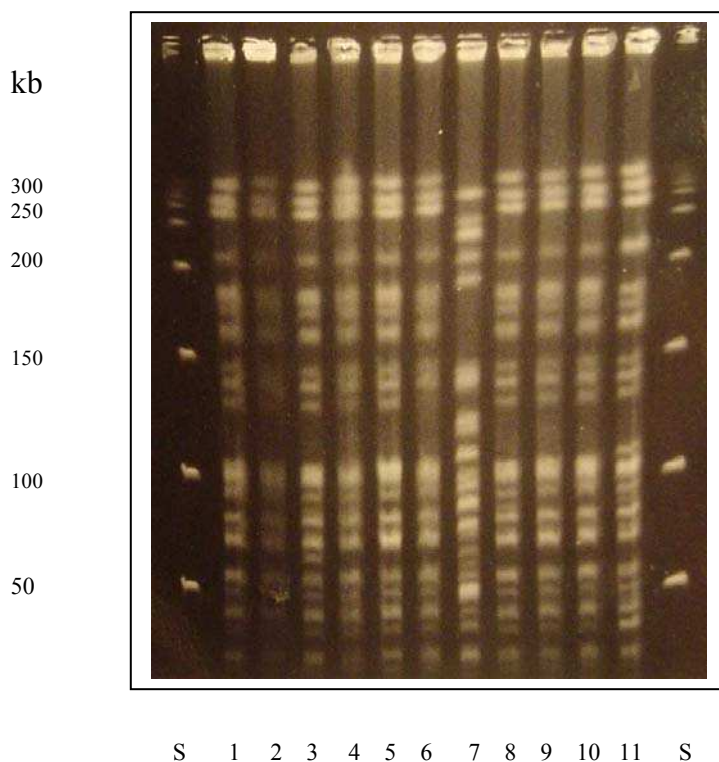
U tablici 4.6 prikazani su svi izolati uključeni u izradu ove disertacije. Podatci prikazani u tablici navode odjel s kojeg izolat potječe, bolesnički uzorak, mjesec i godinu izolacije, MIK imipenema, MIK meropenema, prisustvo insercijske sekvence IS*Aba*1 uz *bla* OXA gen, te laboratorijski broj izolata.

Najstariji izolat (broj 2) koji je uključen u izradu ove disertacije potječe iz 2002. godine, a izoliran je iz hemokulture bolesnika hospitaliziranog na Jedinici intenzivnog liječenja Firule (CIT F). Iste godine zabilježena je smanjena osjetljivost na karbapeneme, kao i porast potrošnje karbapenemskih antibiotika, što je prikazano u tablici 4.1 i 4.2. Do 2002. godine, ukupan broj izolata *A. baumannii* bio je malen i nije zabilježena smanjena osjetljivost na karbapeneme. Sto od 106 prikupljenih izolata (94,3 %) imalo je insercijsku sekvenciju smještenu neposredno uz OXA-51-like gen. Izolati kojima nismo dokazali smještaj insercijske sekvencije IS*Aba*1 neposredno uz *bla*<sub>OXA</sub> gen (broj 14, 17, 18, 35, 37, 78), bili su osjetljivi na imipenem (MIK 2-4 mg/l) i umjereno osjetljivi na meropenem (MIK 8 mg/l). Po jedan izolat prikupljen je tijekom 2003. godine s ORL odjela, te tijekom 2005. godine od bolesnika koji je imao nekoliko hospitalizacija u KBC Split. Tijekom 2007. godine prikupili smo po dva izolata s Klinike za plućne bolesti i Klinike za očne bolesti, pa ih možemo smatrati sporadičnim izolatima.

Rezultati genotipizacije sakupljenih izolata *A. baumannii* pokazali su veliku sličnost koja se najbolje uočava dendrogramskim prikazom svih 106 izolata (slika 4.9). Da je riječ o klonski sličnim izolatima prikupljenim tijekom šestogodišnjeg razdoblja unutar raznih odjela i jedinica intenzivne njege u KBC Split, uočava se i na slikovnim prikazima (slika 4.7 i 4.8), gdje smo usporedili izolate s početka istraživanja (2002., 2003., 2004. godina) s izolatima prikupljenim tijekom 2007. godine (kraj istraživanja). Uočava se sličnost između

izolata, kao i podudarnost s kontrolnim Europskim klonom I (RUH). Na slici 4.7 vidljiv je rezultat PFGE analize za jedanaest izolata s različitih intenzivnih njega i odjela ( CIT F, CIT K, NKI, JILD, KI, Interna klinika). Na slici je vidljiva podudarnost DNA ulomaka za izolate 1-6 i 8-11 u veličini 50, 100, 150, 200, 250 i 300 kilobaza (kb). Izolat broj 7 predstavlja jedini izolat s Jedinice intenzivnog liječenja djece tijekom razdoblja istraživanja i ima različite DNA ulomke veličine 150-300 kb. Na slici 4.8 prikazan je rezultat PFGE analize za deset izolata prikupljenih tijekom 2007. godine, te za kontrolni soj RUH 2034 za Europski klon I. Prikazani izolati pod rednim brojevima 97-106 potječu s različitih intenzivnih njega i odjela (CIT F, NKI, CIT K, Klinika za plućne bolesti, Klinika za očne bolesti). Na slici je vidljiva podudarnost DNA ulomaka za sve izolate uključujući i kontrolni soj u veličini molekularnog markera 50, 100, 150, 200, 250 i 300 kb.

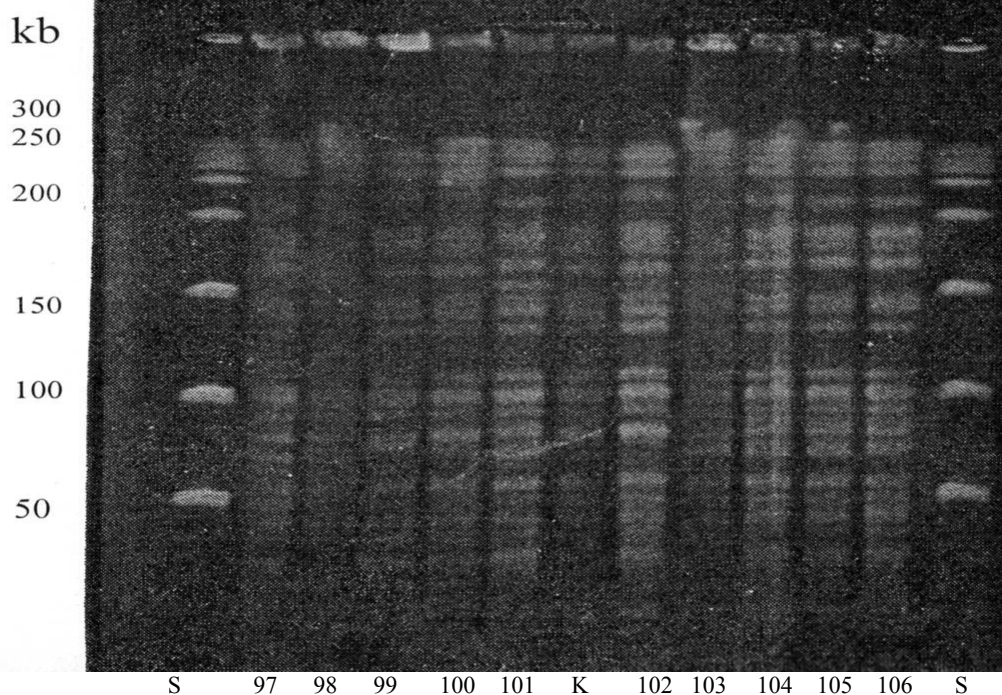
Genotipizacija prikupljenih izolata *A. baumannii* tijekom višegodišnjeg razdoblja ukazala je na proširenost klonski sličnih izolata unutar različitih intenzivnih njega i odjela unutar KBC Split. Rezultati genotipizacije potvrđuju prisustvo klona koji je sličan s Europskim klonom I (sekvencijska grupa 2 ).



**Slika 4.7.** Slika 1,2 % agarozna gela s DNA ulomcima za jedanaest izolata prikupljenih tijekom 2002., 2003. i 2004. godine. Stupac S na lijevoj i desnoj strani su markeri molekularne veličine (S) u kb. Izolati 1-11 nalaze se redom u stupcima između markera molekularne veličine.

Na slici 4.7 nalazi se fotografski prikaz DNA ulomaka u svrhu genotipizacije jedanaest izolata prikupljenih tijekom prve tri godine istraživanja. U stupcu 2 nalazi se izolat 1 (hemokultura, CIT F, 2003. godina); slijedi izolat 2 (hemokultura, CIT F, 2002. godina); idući stupac je izolat 3 (aspirat bronha, CIT K, 2004. godina); slijedi izolat 4 (bris rane, KIR, 2003. godina); izolat 5 (urin, CIT F, 2003. godina); izolat 6 (urin, NKI, 2003. godina); izolat 7 (bris ždrijela, JILD, 2003. godina); izolat 8 (aspirat bronha, CIT K, 2003. godina); izolat 9 (urin, NKI, 2003. godina); izolat 10 (likvor, NKI, 2003. godina) i izolat 11 (hemokultura, Interni odjel, 2004. godina). Svi izolati osim sedmog podudaraju se u svim ulomcima DNA. Izolat 7 jedini je izolat s Jedinice intenzivnog liječenja djece tijekom višegodišnjeg istraživanja.

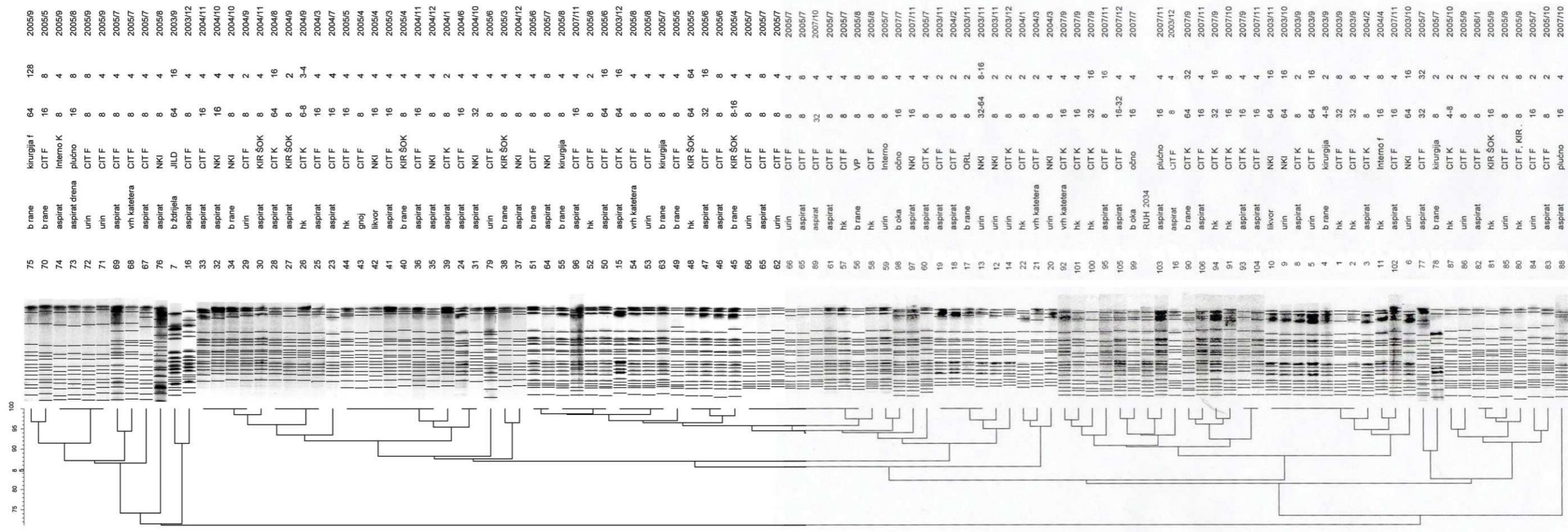




**Slika 4.8.** Slika 1,2 % agarozna gela s DNA ulomcima za jedanaest izolata prikupljenih tijekom 2007. godine. S su markeri molekularne veličine (S). K- kontrolni soj RUH 2034, predstavnik Europskog klona 1. Izolati 97 do 106 nalaze se redom u stupcima između markera molekularne veličine.

Na slici 4.8 se nalazi fotografski prikaz DNA ulomaka deset izolata prikupljenih tijekom 2007. godine i kontrolni soj RUH 2034. U stupcu 2 nalazi se izolat 97 (aspirat bronha, NKI); slijede izolati 98 i 99 (Očni odjel, bris oka); izolat 100 (hemokultura, CIT K); izolat 101 (hemokultura, CIT K); zatim slijedi kontrolni soj RUH 2034, predstavnik Europskog klona 1; izolat 102 (aspirat bronha, CIT F); izolat 103 (aspirat bronha, Plućni odjel); izolat 104 (aspirat bronha, CIT F); izolat 105 (aspirat bronha, CIT F), te posljedni izolat 106 (aspirat bronha, CIT F). Na slici se uočava podudarnost DNA ulomaka među svim izolatima prikupljenim tijekom 2007. godine s različitim odjela, te sličnost s kontrolnim sojem.

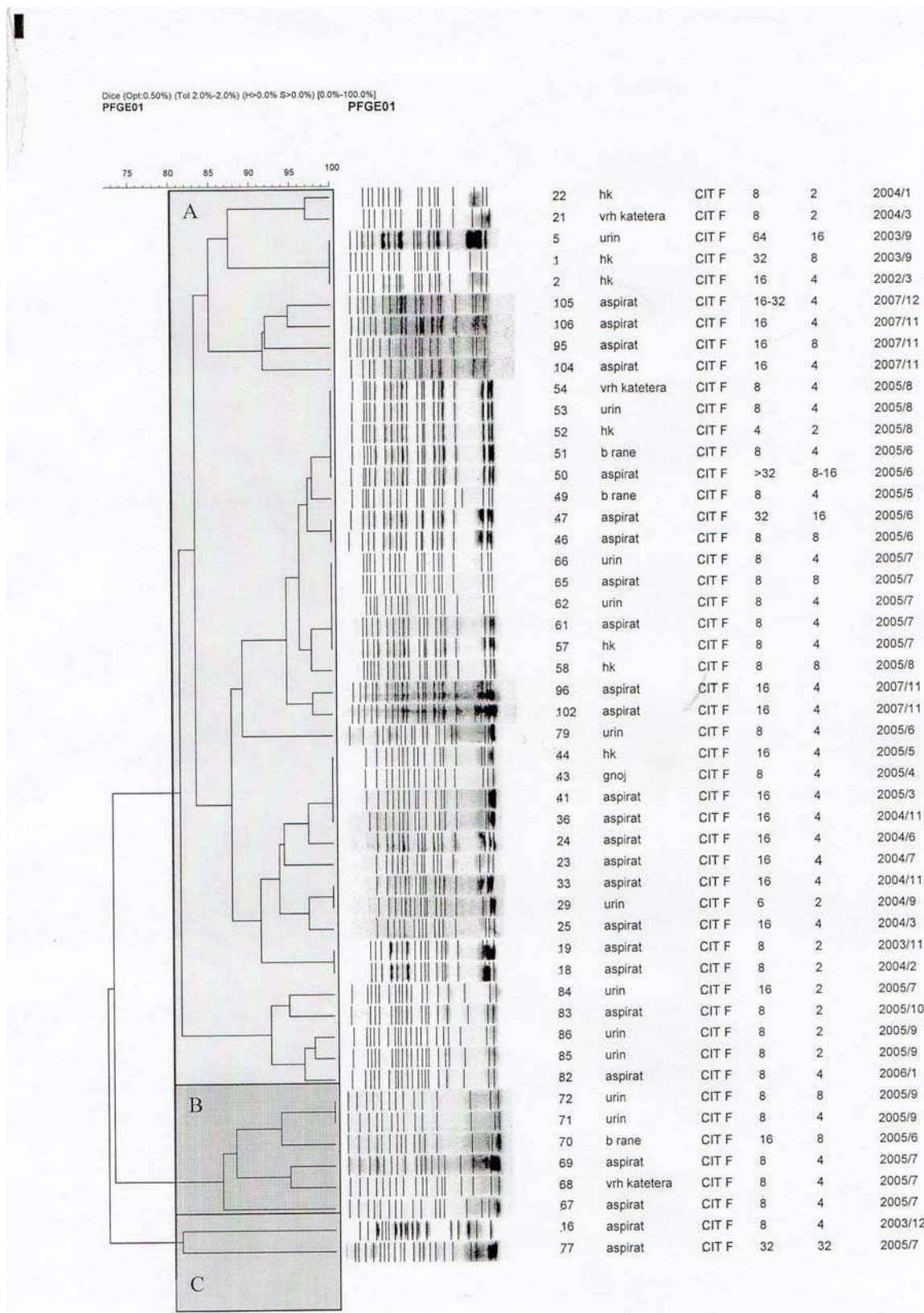
Dist (0.50, 0.50%) (Tab 2.0%+2.0%) (H=0.0% S=0.0%) 50-100.0%  
PFGE01



Slika 4.9. Dendrogram 106 izolata *A. baumannii* uključениh u disertaciju.

Na slici 4.9 prikazan je dendrogram svih 106 izolata uključenih u ovo istraživanje i prikaz kontrolnog soja RUH 2034. Uz dendrogramski prikaz navedeni su i redni broj izolata, vrsta biološkog uzorka iz kojeg izolat potječe, odjel s kojega je izoliran, MIK meropenema, MIK imipenema, te godina i mjesec kada su izolirani. Na ovom velikom broju uzoraka uočeni su klonski slični izolati na razini vrijednosti od 80 %, što bi ukazivalo na prisustvo jednog klona s nekoliko genotipova unutar KBC Split. Korištenjem restriktivnog enzima *Apa I* u genotipizaciji izolata dobili smo veliki broj ulomaka (14-18 vrpce po izolatu), što je omogućilo potvrdu prisustva klonski sličnih izolata u razdoblju od 2000. do 2007. godine.

Još bolji uvid u proširenost klonski sličnih izolata pruža nam dendrogramski prikaz po odjelima. Na slici 4.10 je dendrogramski prikaz izolata iz Jedinice intenzivnog liječenja Firule (CIT F), na kojem se uočavaju tri genotipa (A, B, C). Genotipu A pripada najveći broj izolata, genotipu B izolati od 72 do 67, dok bi se u genotip C mogla svrstati posljednja dva izolata (16 i 77). Unutar genotipa A zabilježeno je nekoliko epidemijskih pojava, i to tijekom 2003. (rujan; izolati 5, 1, ), 2007. (studeni-prosinac; izolati 95, 104, 106, 96, 102 ) i 2005. (lipanj - rujan; izolati 54, 53, 52, 51, 50, 47, 46, 66, 65, 62, 61, 57, 58 ). Sojevi koji pripadaju genotipu B pojavljuju se tijekom 2005. (lipanj – rujan) te imaju epidemijski tijek širenja unutar CIT Firule. Genotip C uključuje dva izolata, 16 i 77 i obzirom na sporadično pojavljivanje ovog genotipa, do sada nije zabilježen njegov epidemijski tijek.

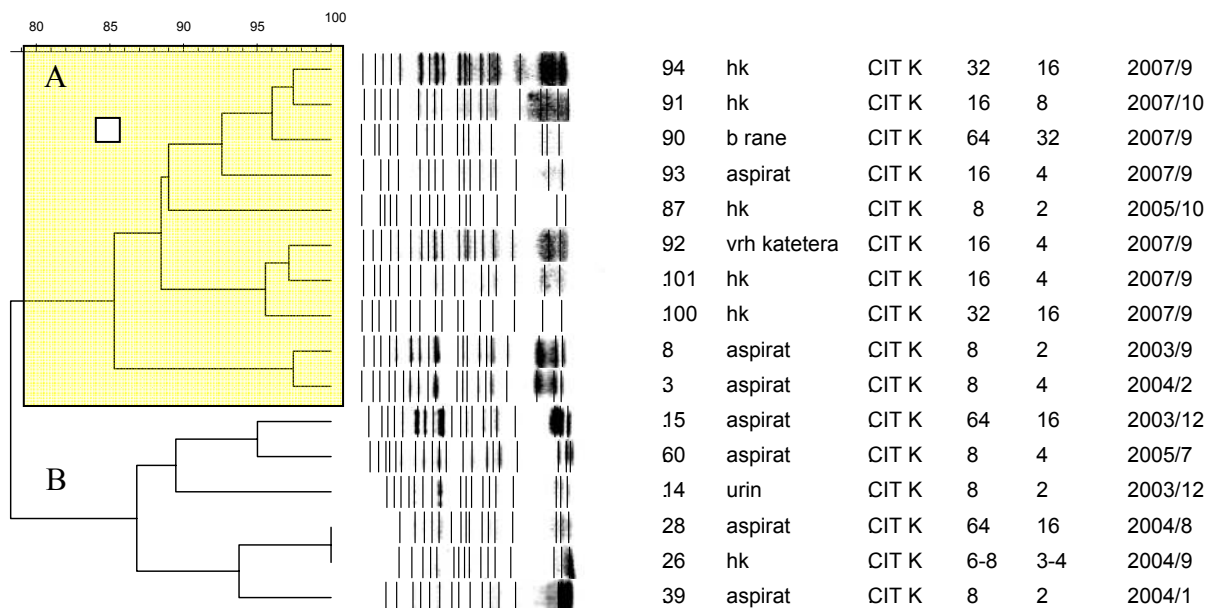


Slika 4.10. Dendrogramski prikaz kliničkih izolata s Jedinice intenzivnog liječenja Firule (CIT F) tijekom 2002.- 2007. godine

Dice (Opt:0.50%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

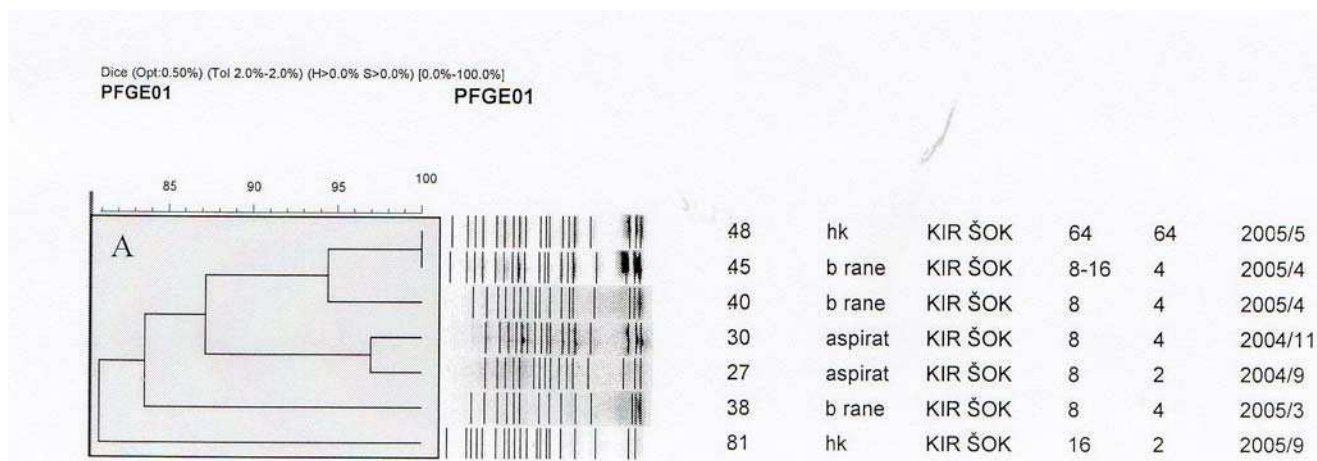
PFGE01

PFGE01



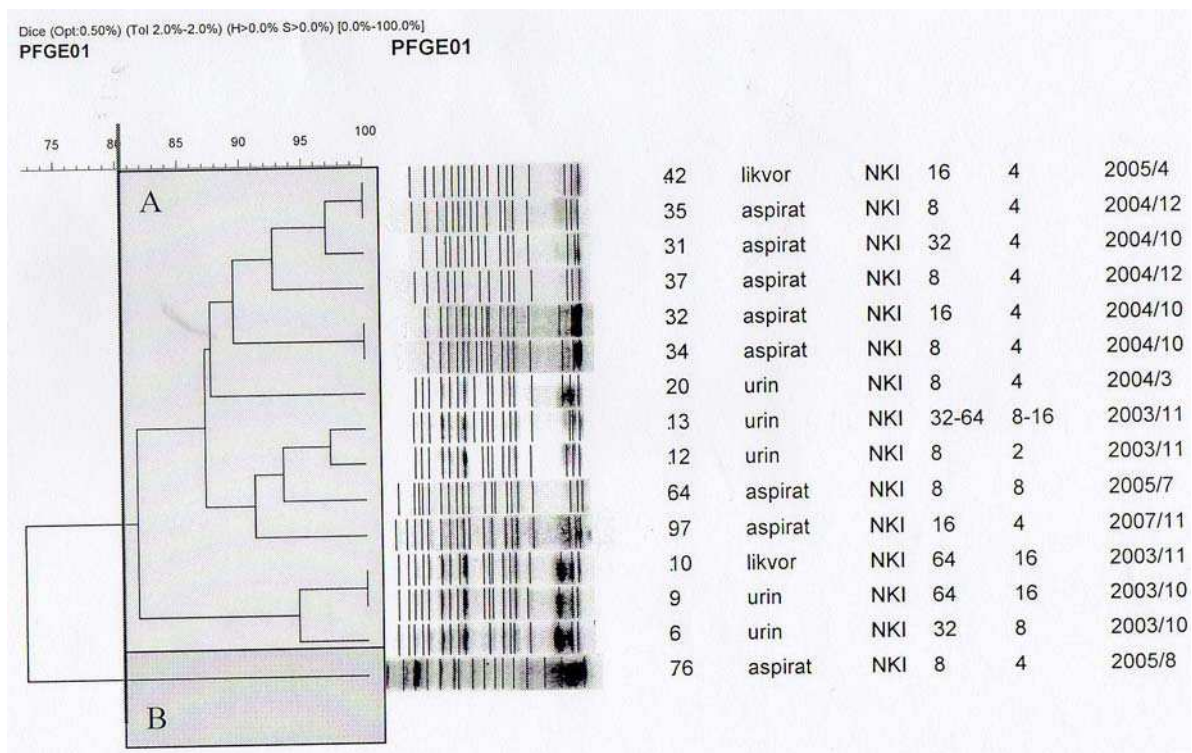
**Slika 4.11.** Dendrogramski prikaz kliničkih izolata s Jedinice intenzivnog liječenja Križine (CIT K) tijekom 2003.-2007. godine.

Na dendrogramskom prikazu izolata s Jedinice intenzivnog liječenja na Križinama (CIT K) tijekom razdoblja praćenja uočava se vrlo velika sličnost među izolatima grupiranim u dva genotipa (A i B). Genotip A sporadično se pojavljuje tijekom 2003., 2004. i 2005. godine (izolati 8, 3, 87), a pravi epidemijski potencijal iskazuje tijekom rujna i listopada 2007. godine kada je Jedinica intenzivnog liječenja na Križinama predstavljala i mjesto liječenja teških opekline (izolati 94, 91, 90, 93, 92, 101, 100). Genotip B ima manji epidemijski potencijal, a zabilježen je tijekom 2003.-2005. godine na manjem broju izolata (39, 26, 28, 14, 60, 15) unutar ove jedinice intenzivne njege.



**Slika 4.12.** Dendrogramski prikaz kliničkih izolata iz Jedinice za kirurško liječenje.

Od bolesnika iz Jedinice za kirurško liječenje (“kirurški šok”) izolirano je sedam sojeva *A. baumannii* koji su svi bili međusobno srodni (slika 4.12) i pripadali su genotipu A. Sličnost izolata ukazuje na klonalno širenje tijekom 2004 i 2005. godine.



**Slika 4.13.** Dendrogramski prikaz kliničkih izolata s Neurokirurške intenzivne jedinice tijekom 2003. – 2007. godine.

Na slici 4.13 prikazani su izolati od bolesnika iz Neurokirurške intenzivne jedinice (NKI). Dominantno prisutan genotip A ima epidemijski karakter pojavljivanja tijekom listopada i studenog 2003. (izolati 6, 9, 10, 12, 13), te listopada i prosinca 2004. godine (izolati 31, 32, 34, 35, 37). Izolat broj 6 uključen je u projekt genotipizacije unutar međunarodne ARPAC studije (Europski klon I ili sekvencijska grupa 2). Samo je izolat broj 76 pripadao genotipu B i izoliran je tijekom ljeta 2005. godine.

Lančanom reakcijom polimeraze dokazano je prisustvo *bla*<sub>OXA-51</sub> gena u svim prikupljenim izolatima. Nisu pronađene OXA-23 i OXA-24 β-laktamaze, kao ni plazmidski smješten *bla*<sub>OXA-58</sub> gen. Kao podvrsta unutar kromosomski smještenog *bla*<sub>OXA-51</sub> gena, lančanom reakcijom polimeraze dokazali smo *bla*<sub>OXA-69</sub> gen kod većine prikupljenih izolata. Na temelju rezultata genotipizacije izdvojeni su izolati s promjenom u tri ili više segmenata dendrogramskog prikaza te su PCR produkti tih sojeva pročišćeni i sekvencionirani na ABI PRISM 377 Genetic Analyser (Applied Biosystems, SAD). Rezultati sekvencioniranja šest izdvojenih PCR produkata (izolati označeni brojevima 8, 83, 10, 17, 68 i 16) otkrili su veliku podudarnost u pet izolata s novootkrivenim OXA-107 enzimom kao podvrstom OXA-69 enzima (slika 4.18). Šesti izolat (br. 16) ima tri promjene u odnosu na referentnu sekvenciju, i to su mutacije u sredini sekvencije vidljive i na kromatogramu (G-A; G-A; i A-G) (slika 4.18). Za prikaz rezultata sekvencioniranja odabrali smo sekvencije dobivene pomoću OXA-51 skupnih početnica. PCR produkti OXA-51 enzima manji su po veličini i pružaju bolje rezultate u analizi sekvencija. Lančanom reakcijom polimeraze utvrđeno je da je IS*Aba1* insercijska sekvencija smještena neposredno uz *bla*<sub>OXA-51</sub> gen.

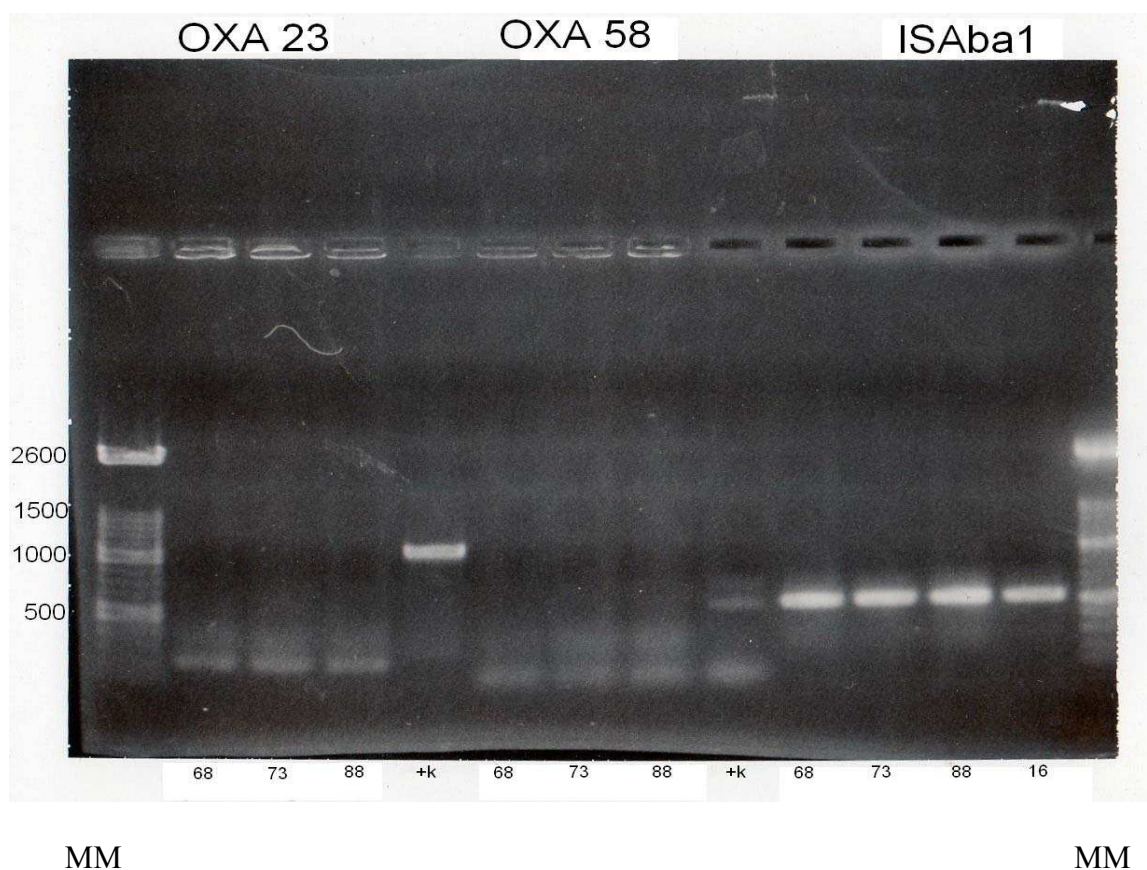




**Slika 4.14.** Slika 1% agarozna gela s produktima PCR reakcije s početnicama za gen koji kodira OXA-51 skupinu enzima. PCR produkti veličine oko 353 bp prisutni su kod svih izolata unutar ove studije. Stupac 1- molekularni marker veličine produkta u bp; u stupcima 2-14 su PCR produkti 12 izolata uključenih u izradu studije; u stupcu 14 je pozitivna kontrola (kontrolni soj RUH 2034).

Na slici 4.14 s lijeve strane (stupac 1) nalazi se molekularni marker (MM) kojim određujemo veličinu PCR produkta u bp. U stupcu 2 nalazi se izolat 1 (hemokultura, CIT F, 2003. godina); idući stupac je izolat 3 (aspirat bronha, CIT K, 2004. godina); slijedi izolat 4 (bris rane, KIR, 2003. godina); izolat 6 (urin, NKI, 2003. godine); izolat 7 (bris ždrijela, JILD, 2003. godina); izolat 11 (hemokultura, Interni odjel, 2004. godina); izolat 17 (bris rane, ORL, 2003. godina); izolat 56 (bris rane, vanjski pacijent, 2005. godina);

izolat 76 (aspirat bronha, NKI, 2005. godina); izolat 98 (bris oka, Očni odjel, 2007. godina); izolat 102 (aspirat bronha, CIT F, 2007. godina); izolat 103 (aspirat bronha, Plućni odjel, 2007. godina), a posljednji stupac, broj 14, je pozitivna kontrola (RUH). Kod svih izolata uključenih u izradu disertacije dokazano je prisustvo 353 bp PCR produkta početnicama za gen koji kodira OXA-51 skupinu enzima.



**Slika 4.15.** Slika 1% agarozna gela s produktima PCR reakcije s početnicama za OXA-23, OXA-58 i *ISAbal1* na izolatima broj 68, 73 i 88. Stupac 1 i 14 – molekularni marker (MM) veličine PCR produkta u bp. Stupac 5, 9 i 13 – PCR produkti pozitivnih kontrola (stupac 5- OXA-23; stupac 9- OXA-58; stupac 13 – *ISAbal1*). U stupcima 2-4 su rezultati PCR reakcije s početnicama za OXA-23 na izolatima 68, 73 i 88. U stupcima 6-8 su rezultati PCR reakcije s početnicama za OXA-58 na izolatima 68, 73 i 88. U stupcima 10-12 su rezultati PCR reakcije s početnicama za *ISAbal1* na izolatima 68, 73 i 88.

U istraživanim izolatima nisu dokazani geni za enzime OXA-23 skupine (slika 4.15). Također nismo otkrili prisustvo enzima OXA-24 i OXA-58 skupine. PCR reakcijom dokazali smo prisustvo insercijske sekvencije *ISAbal* kod svih izolata sa smanjenom osjetljivošću na jedan ili oba karbapenema.

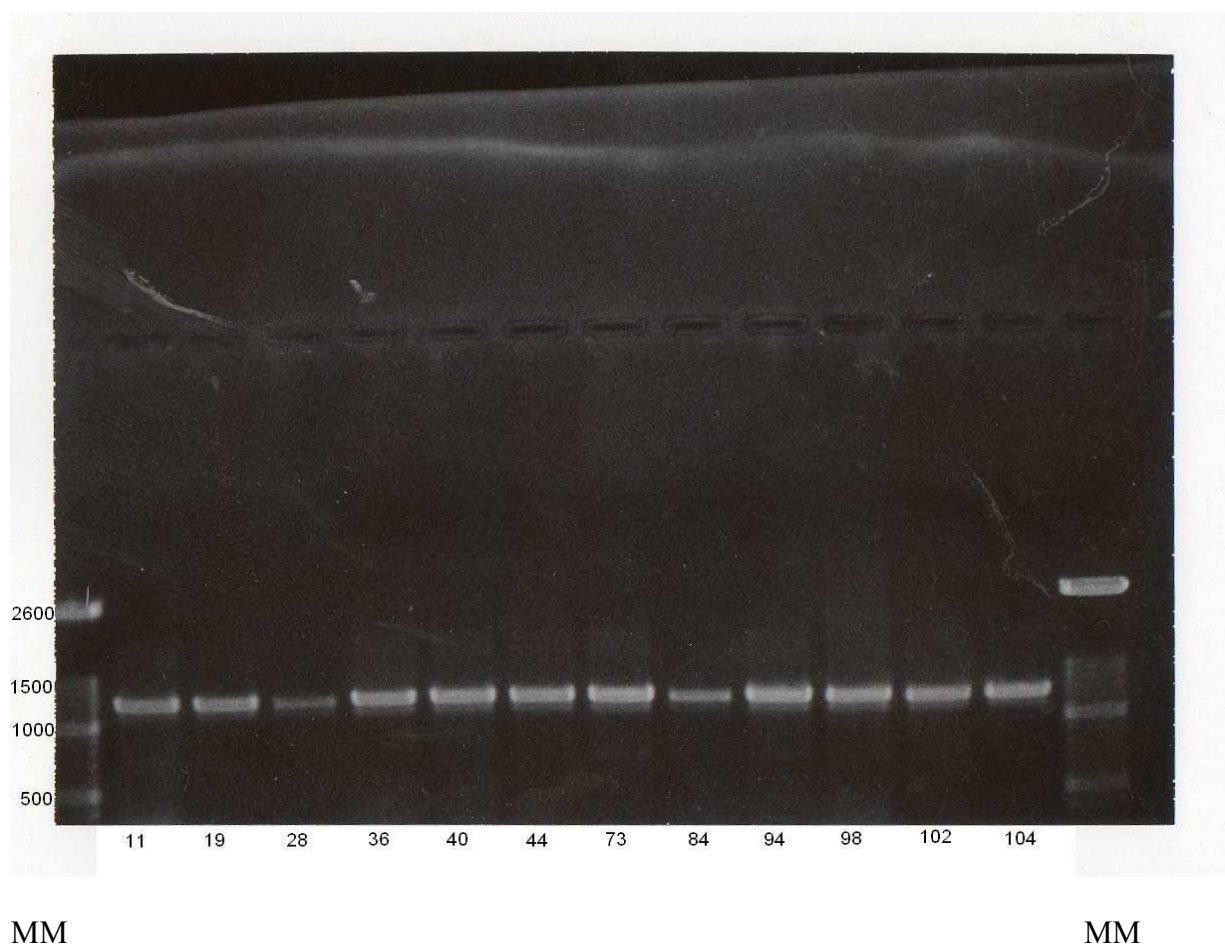


MM

MM

**Slika 4.16.** Slika 1% agarozna gela s produktima PCR reakcije s početnicama za *ISAbal* F i OXA-51 R. Stupac 1 i 14 – molekularni marker veličine PCR produkta u bp. U stupcima 2-12 su PCR produkti 11 izolata (1, 6, 14, 22, 71, 93, 99, 101, 103, 104, 17) uključenih u izradu studije; u stupcu 13 je negativna kontrola.

U izolatima broj 1, 6, 22, 71, 93, 99, 101, 103 i 104 dokazani su produkti PCR reakcije s IS*Aba*1 F i OXA-51 R početnicama veličine 1441 bp (slika 4.16). Izolati broj 14 i 17 (stupci 4 i 12) nemaju PCR produkt, kao ni kontrolni soj RUH (stupac 13) koji predstavlja negativnu kontrolu. Izolat br 6 predstavlja pozitivnu kontrolu potvrđenu u ARPAC projektu. PCR reakcijom s IS*Aba*1 F i OXA-51 R početnicama dokazali smo da je insercijska sekvencija IS*Aba*1 smještena neposredno uz *bla*<sub>OXA-51</sub> gen kod većine (100/106) izolata. Prisustvo insercijske sekvencije IS*Aba*1 potvrđeno je u svim izolatima prikupljenima za izradu ove disertacije. Prisustvo insercijske sekvencije dokazano je lančanom reakcijom polimeraze, kojom prilikom smo amplificirali PCR produkt veličine ~ 900 bp. Prikaz PCR produkta IS*Aba*1 dokumentiran je na slici 4.15. Potvrdu smještaja insercijske sekvencije neposredno uz gen *bla*<sub>OXA-51</sub> dokazali smo posebnim protokolom lančane reakcije polimeraze pomoću Expand High Fidelity PCR Systema (Roche) koji omogućava amplifikaciju produkta veličine 1 do 3 kb. Početnice korištene u ovoj reakciji su IS*Aba*1 F (engl. *forward*) i OXA-51 R (engl. *reverse*), pri čemu smo amplificirali PCR produkt veličine 1440 bp u većine (100/106; 94,3 %) prikupljenih izolata. Prikaz PCR produkta dobivenog amplifikacijom IS*Aba*1F/OXA-51R za 12 izolata dokumentiran je i na slici 4.17.



**Slika 4.17.** Slika 1% agarozna gela s produktima PCR reakcije s početnicama za IS*Aba*1 F i OXA-51 R. Stupac 1 i 14 – molekularni marker veličine PCR produkta u bp. U stupcima 2-13 su PCR produkti 12 izolata (11, 19, 28, 36, 40, 44, 73, 84, 94, 98, 102 i 104) veličine 1441 bp.

Određivanja supstratnog profila OXA-51 enzima dokazano je da izolati *A. baumannii* stvaraju oksacilinaze sa slabom sposobnošću hidrolize karbapenema. Prisustvo insercijske sekvencije unutar kromosomskog genoma *A. baumannii* smještene neposredno uz *bla*<sub>OXA-51</sub> gen djeluje kao promotor za lučenje ovih enzima.

Na slici 4.18 prikazani su rezultati sekvencioniranja odabranih izolata *A. baumannii* uključenih u izradu ove studije. Ukupno je sekvencionirano šest PCR produkata OXA-51 skupine enzima koji prema rezultatima genotipizacije odgovaraju različitim genotipovima. Na lijevoj strani slike su brojevi izolata studije unutar koje su sekvencionirani, te referentni soj s enzimom OXA-107 (izolat 6) s kojim su sekvencije uspoređene. Brojevi na lijevoj strani odgovaraju sljedećim rednim brojevima prikupljenih izolata: 22 = 8, 248 = 83, 27 = 10, 67 = 17, 238 = 68, 66 = 16. Prema rezultatima genotipizacije, izolati broj 8, 83 i 10 svrstavaju se u genotip A, izolat broj 68 u genotip B, a izolat broj 16 u genotip C. Rezultati sekvencioniranja 5 PCR produkata OXA-51 skupine enzima dokazali su identičnost parova baza i aminokiselinskog slijeda s OXA-107 enzimom. Novootkrivena OXA-107 ima ishodište u enzimu OXA-69 s kojim dijeli 99% sličnosti u aminokiselinskom slijedu, a promjena jednog para baza na poziciji 499 (zamjena citozina s gvaninom) ima za posljedicu promjenu u aminokiselinskom slijedu i zamjenu leucina s valinom na poziciji 167 (slika 1.3).

Izolat broj 16 (oznaka 66 na slici 4.18) jedinstven je izolat unutar ove studije. Za razliku od ostalih izolata, ovaj izolat ima nekoliko promjena u odnosu na referentnu sekvenciju, a to su mutacije u sredini sekvencije (pozicija 426, 438, 447, 451 i 454) vidljive i na kromatogramu (G-A; G-T; G-A; G-A; G-A). Ovaj izolat uključen je u dodatna istraživanja i postoji mogućnost da se radi o još jednoj, sasvim novoj oksacilinazi.

```

261 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390
|-----|
22      AACCCACAGTAG-TATTTAATGGGATGGGAAAA--GGCTATCCAGATGGGAAAGAATGACCCTAGGCGATGCTATGAAGCTCCGCTATCCG
248     ACCACCACAGAG-TATTTAATGGGATGGGAAAA--GGCTATCCAGATGGGAAAGAATGACCCTAGGCGATGCTATGAAGCTCCGCTATCCG
27      ACCACCACAGTAGTATTTAATGGGATGGGAAAA--GGCTATCCAGATGGGAAAGAATGACCCTAGGCGATGCTATGAAGCTCCGCTATCCG
67      GGCAACCACCACAGTAG-TATTTAATGGGATGGGAAAA--GGCTATCCAGATGGGAAAGAATGACCCTAGGCGATGCTATGAAGCTCCGCTATCCG
238     AAGGCA-CCACCACAGTAGTATTTAATGGGATGGGAAAAAAGGCTATCCAGATGGGAAAGAATGACCCTAGGCGATGCTATGAAGCTCCGCTATCCG
OXA-107 TTTGATCGGCCTTGAGCACATAAGGCACCACCACAGAGTATTTAATGGGATGGGAAAAAAGGCTATCCAGATGGGAAAGAATGACCCTAGGCGATGCTATGAAGCTCCGCTATCCG
66      CACTACAGTAG-TATTTAGTGGGACGGGCAAAA--GGCTATCCAGATGGGAAAGAATGACCCTAGGCGATGCTATGAAGCTCCGCTATCCG
R
F      TTTGATCGGCCTTG
Consensus ..... accaccacagtag,tatttaatgggatgggaaaa,,ggctattcccagaatgggaaaagaacatgaccctaggcgatgctatgaagctccgctattccg

391 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520
|-----|
22      GTTTATCAGATTAGCTCGTCGTATTGGACTTGAGCTCATGCTAAGGAGTGAAGCGTGTGGTATGGCAATGCAGATATCGGTACCCAGTCGATAATTTTGGGTGGTGGGCTCTAAAATTA
248     GTTTATCAGATTAGCTCGTCGTATTGGACTTGAGCTCATGCTAAGGAGTGAAGCGTGTGGTATGGCAATGCAGATATCGGTACCCAGTCGATAATTTTGGGTGGTGGGCTCTAAAATTA
27      GTTTATCAGATTAGCTCGTCGTATTGGACTTGAGCTCATGCTAAGGAGTGAAGCGTGTGGTATGGCAATGCAGATATCGGTACCCAGTCGATAATTTTGGGTGGTGGGCTCTAAAATTA
67      GTTTATCAGATTAGCTCGTCGTATTGGACTTGAGCTCATGCTAAGGAGTGAAGCGTGTGGTATGGCAATGCAGATATCGGTACCCAGTCGATAATTTTGGGTGGTGGGCTCTAAAATTA
238     GTTTATCAGATTAGCTCGTCGTATTGGACTTGAGCTCATGCTAAGGAGTGAAGCGTGTGGTATGGCAATGCAGATATCGGTACCCAGTCGATAATTTTGGGTGGTGGGCTCTAAAATTA
OXA-107 GTTTATCAGATTAGCTCGTCGTATTGGACTTGAGCTCATGCTAAGGAGTGAAGCGTGTGGTATGGCAATGCAGATATCGGTACCCAGTCGATAATTTTGGGTGGTGGGCTCTAAAATTA
66      GTTTATCAGATTAGCTCGTCGTATTGGACTTGAGCTCATGCTAAGGAGTGAAGCGTATTAGTTATGGCAATGCAGATATCGGTACCCAGTCGATAATTTTGGGTGGTGGGCTCTAAAATTA
R
F
Consensus gtttatcaagatttagctcgtcgtattggacttgagctcatgctaaaggaagtgaagcgtgttggttatggcaatgcagatatcggtagcccaagtcgataaattttgggtggtgggtcctctaaaaatta

521 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650
|-----|
22      CTCCTCAGCAGAGGACACAGTTTGCTTACAGCTAGCTAATAAACCGCTCCATTTAGCCAAAAGTCCAGATGAAG--TGCAATCCA
248     CTCCTCAGCAGAGGACACAGTTTGCTTACAGCTAGCTAATAAACCGCTCCATTTAGCCAAAAGTCCAGATGAAG--TGCAATCCA
27      CTCCTCAGCAGAGGACACAGTTTGCTTACAGCTAGCTAATAAACCGCTCCATTTAGCCAAAAGTCCAGATGAAG--TGCAATCCA
67      CTCCTCAGCAGAGGACACAGTTTGCTTACAGCTAGCTAATAAACCGCTCCATTTAGCCAAAAGTCCAGATGAAG--TGCAATCCA
238     CTCCTCAGCAGAGGACACAGTTTGCTTACAGCTAGCTAATAAACCGCTCCATTTAGCCAAAAGTCCAGATGAAG--TGCAATCCA
OXA-107 CTCCTCAGCAGAGGACACAGTTTGCTTACAGCTAGCTAATAAACCGCTCCATTTAGCCAAAAGTCCAGATGAAG--TGCAATCCATGCTATTCATGAGAGAAAGATGGAATAAATATACCCA
66      CTCCTCAGCAGAGGACACAGTTTGCTTACAGCTAGCTAATAAACCGCTCCATTTAGCCAAAAGTCCAGATGAAGTTGCAATCCA
R
F      CCAAGATGAAG--TGCAATCCA
Consensus ctctcagcaagaggcacagtttgcttacaagctagctaataaaacgctccatttagccaaaaagtccaagatgaag,,tgcaatcca

```

Slika 4.18. Rezultati sekvencioniranja PCR produkata OXA-51-like enzima u BLAST

programu.

## **5. RASPRAVA**



## 5. RASPRAVA

Prvi soj *A. baumannii* rezistentan na karbapeneme izoliran je iz hemokulture bolesnika hospitaliziranog 1985. godine u Kraljevskoj bolnici u Edinburgu i označen je kao ARI-1 (Acinetobacter Resistant to Imipenem, kasnije preimenovan u OXA-23) (63). Unatoč činjenici da je ARI-1 predstavljao sporadičan izolat, najavio je i nadolazeći problem rezistencije na karbapeneme prisutan posljednjih godina u gotovo svim zemljama Europe i svijeta (62). Važno je pripomenuti da je ova oksacilinaza otkrivena prije nego što su se karbapenemi počeli primjenjivati u engleskim bolnicama (63).

U Hrvatskoj se izolati *A. baumannii* rezistentni na karbapeneme počinju javljati 1999. godine, kada je, prema podacima iz 22 hrvatska mikrobiološka laboratorija koja su bila uključena u rad Odbora za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj pri Akademiji medicinskih znanosti Hrvatske, rezistencija na imipenem iznosila između 0% do 8% (87, 88). Ranijih godina nije zabilježen niti jedan klinički izolat *A. baumannii* rezistentan na karbapeneme, iako su karbapenemi godinama bili u uporabi, i to poglavito imipenem s cilastatinom (prisutan od 1996.), a od 2000. godine na tržište i u uporabu dolazi i drugi karbapenem, meropenem.

Prvi izolati *A. baumannii* rezistentni na karbapeneme u KBC Split uočeni su 2002. godine na jedinici intenzivnog liječenja (CIT-Firule) i jedinici neurokirurške intenzivne njege

(NKI). Prema arhivskim podacima Odjela za kliničku mikrobiologiju KBC Split, rezistencija na karbapeneme u kliničkih izolata *Acinetobacter baumannii* tijekom 2002. godine iznosila je 3,2% na imipenem i 10,3 % na meropenem. Tijekom 2000. i 2001. godine, ukupan broj kliničkih izolata *A. baumannii* bio je malen (11 izolata tijekom 2000. godine, 35 izolata tijekom 2001. godine), i oni nisu predstavljali problem u terapijskom smislu jer su bili osjetljivi na piperacilin/tazobaktam, ciprofloksacin, amikacin i karbapeneme. Tijekom 2002. godine raste broj kliničkih izolata *A. baumannii* (2002. godine ukupno 126), a porast se nastavlja i sljedećih godina. Tijekom 2007. godine izolirano je 267 klinički značajnih izolata vrste *A. baumannii*. Usporedo s porastom broja izolata *A. baumannii* sve češće se propisuju karbapenemi, osobito meropenem, a raste i njihova otpornost na karbapeneme koja tijekom 2007. iznosi 8,6% na imipenem i 57% na meropenem.

Nema sumnje da karbapenemski antibiotici, kao antibiotici rezerve, imaju svoju poziciju u liječenju teških infekcija uzrokovanih bolničkim sojevima koji luče  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra (engl. *extended-spectrum  $\beta$ -lactamase*; ESBL) poput *E. coli*, *K. pneumoniae* i *P. mirabilis*, te gram-negativnih nefermentativnih uzročnika poput *P. aeruginosa* i *A. baumannii*. Prema podacima iz 2001. i 2002. godine, prevalencija ESBL pozitivnih izolata *E. coli* iznosila je 4,7%, dok je prevalencija *K. pneumoniae* ESBL pozitivnih izolata iznosila 36,8% u KBC Split, i od tada je u porastu (101). Porast ESBL pozitivnih izolata povlači za sobom opravdanu potrošnju karbapenama kao antibiotika s rezervne liste unutar KBC Split, jer su takvi izolati u pravilu osjetljivi na karbapeneme. Potrošnja karbapenemskih antibiotika višestruko je porasla unutar posljednjih sedam godina, pri čemu se porast potrošnje prvenstveno odnosi na meropenem. Prvi na karbapenem rezistentni izolati *A. baumannii* uočeni su tijekom 2002. godine, kada je

potrošnja meropenema iznosila 2200 DDD, dok 2003. godine potrošnja meropenema doseže svoj vrhunac i iznosi 4471 DDD godišnje. Potrošnja karbapenemskih antibiotika najveća je na jedinicama intenzivnog liječenja, gdje je empirijska terapija svih hospitaliziranih bolesnika sadržavala meropenem. Primjena meropenema u profilaksi kirurških operacija zabilježena je na Kirurškoj intenzivnoj jedinici. Tijekom 2002. godine uočeni su na karbapenem rezistentni izolati sa značajno višim MIK-om na meropenem u odnosu na imipenem, pa su prikupljeni izolati uključeni i u međunarodni ARPAC projekt, gdje su PCR produkti OXA-69 skupine sekvencionirani. ARPAC projekt pokrenut je 2003. godine, a jedan od ciljeva mu je utvrditi postoji li na karbapenem specifično rezistentan klon (klonovi) proširen unutar europskih bolnica. U projekt je uključeno 169 bolnica iz 32 zemlje, a KBC Split je bila jedina hrvatska bolnica uključena u ovaj međunarodni projekt. Među našim izolatima (ukupno je 16 izolata uključeno u ARPAC projekt) otkrivena je oksacilinaza OXA-107 koja hidrolizira karbapenem (81, 86). Novootkriveni OXA-107 ishodište ima u enzimu OXA-69, s kojim dijeli 99% sličnosti u aminokiselinskom slijedu, a promjena jednog para baza na poziciji 499 (zamjena citozina s gvaninom) ima za posljedicu promjenu u aminokiselinskom slijedu i zamjenu leucina s valinom na poziciji 167. OXA-107 otkriven u kliničkim izolatima *A. baumannii* sa smanjenom osjetljivošću na karbapeneme iz KBC Split, povezan je s višom minimalnom inhibitornom koncentracijom na meropenem ( $\text{MIK} \geq 16 \mu\text{g/ml}$ ) i insercijskom sekvencijom smještenom neposredno uz *bla*<sub>OXA-51</sub> gen. Istraživači na ARPAC projektu nalaze povezanost OXA-107 oksacilinaze s višim MIK-om na meropenem značajnim i vrlo rijetkim nalazom (86). Budući da izolat iz Hrvatske s enzimom OXA-107 nosi u međunarodnoj ARPAC studiji oznaku A424, a potječe iz urina bolesnice hospitalizirane na NKI 2003. godine, zasigurno možemo reći da predstavlja prvu dokazanu oksacilinazu ovog tipa u kliničkim izolatima *A. baumannii* ne

samo u Hrvatskoj (86). OXA-107 do sada je opisana u kliničkim izolatima *A. baumannii* podrijetlom iz Poljske, Slovenije i Hrvatske, a kod svih izolata prisutan je viši MIK (8-16 µg/ml) na meropenem nego na imipenem (2-4 µg/ml) (86). Na temelju naših istraživanja o proširenosti OXA-107 enzima među kliničkim izolatima *A. baumannii*, smatramo da ovaj enzim predstavlja evolucijski odgovor na neopravdano veliku uporabu meropenema tijekom višegodišnjeg razdoblja u KBC Split.

Dosadašnja istraživanja potvrđuju da skupina enzima OXA, za razliku od karbapenemaza klase A i B, ima slabu sposobnost hidrolize karbapenema, što pokazuju i rezultati spektrofotometrijskog istraživanja. Istraživanje engleskih autora pojašnjava mehanizam djelovanja enzima OXA skupine unutar bakterijske periplazme sposobnošću prelaska enzima iz monomera (manje aktivan oblik) u dimer (aktivniji oblik) (64). Enzimi OXA u formi dimera nakupljaju se u većoj koncentraciji u periplazmi bakterijske stanice, čime se pojačava učinak ovih enzima “*in vivo*” (2). Skupina francuskih istraživača opisala je biokemijske osobine enzima OXA-69 molekularne mase 27 i 55 kDa, koji bi odgovarali monomernom i dimernom obliku enzima OXA-69 (64). OXA-69 ima sposobnost hidrolize imipenema i meropenema, slično urođenim oksacilinazama kao što su OXA-50 u *P. aeruginosa*, OXA-54 u *Shewanella oneidensis*, OXA-55 u *Schewanella algae* i OXA-60 u *R. pickettii* (64, 69, 67). Sposobnost hidrolize karbapenema od urođene OXA-69 opisuje se kao vrlo slaba, s niskim afinitetom za imipenem i meropenem.

Razlika u osjetljivosti unutar karbapenemske skupine antibiotika tek je nedavno dokumentirana u literaturi. Prvi dostupni bibliografski podatci španjolske grupe autora ukazuju na postojanje razlike u osjetljivosti kliničkih izolata *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii* kompleksa na imipenem i meropenem, te navode slabiju osjetljivost na meropenem u odnosu na imipenem (102). U ovom radu, objavljenom 2004. godine, autori

nisu istražili genetsku osnovu smanjene osjetljivosti acinetobaktera unutar karbapenemske skupine antibiotika. Dvije godine kasnije, rad australskih istraživača navodi značajan porast rezistencije na meropenem (64% rezistentnih izolata) u kliničkim izolatima iz hemokultura bolesnika hospitaliziranih u bolnici za produženu njegu u Melbourneu tijekom trogodišnjeg istraživanja (103). Od karbapenemskih antibiotika u ovoj ustanovi za tercijalnu produženu njegu dominantna je uporaba meropenema od 2002. godine. Rezultati naših istraživanja sukladni su s navedenim istraživanjem španjolskih i australskih istraživača i potvrđuju postojanje razlike u osjetljivosti acinetobaktera unutar karbapenemske skupine antibiotika. Suprotno našim nalazima, skupina grčkih autora, tijekom četverogodišnjeg (2001.-2005.) razdoblja istraživanja na 320 kliničkih izolata *A. baumannii* iz različitih grčkih bolnica, pronalazi meropenem značajno djelotvornijim u odnosu na imipenem (59% osjetljivih na meropenem te 32% osjetljivih na imipenem) (104). Većina europskih zemalja ima dužu tradiciju u primjeni imipenema kao predstavnika karbapenemske skupine antibiotika (poput Velike Britanije), pa i prvi izolat *A. baumannii* rezistentan na imipenem iz 1985. godine nosi oznaku ARI (63). Većina europskih zemalja danas koristi oba karbapenema, s izuzetkom Francuske koja troši samo imipenem (62). Najnovija istraživanja u sklopu ARPAC studije nalaze povezanost rezistencije na meropenem, kao rijetkog oblika fenotipske rezistencije, s prisustvom OXA-107 oksacilinaze, opisane među izolatima iz Poljske, Slovenije i Hrvatske (86). Bilo bi interesantno imati podatke o potrošnji karbapenemskih antibiotika u dvije spomenute zemlje te ih usporediti s podacima iz Hrvatske!

Prisustvo i značaj mobilnog elementa kao što je insercijska sekvencija IS*Aba1*, prvi put je opisala grupa francuskih autora 2006. godine, uočivši povezanost insercijske sekvencije s pojačanom ekspresijom *bla*<sub>AmpC</sub> gena u kliničkih izolata *A. baumannii* rezistentnih na

ceftazidim, dok je odsustvo insercijske sekvencije povezano s kliničkim izolatima *A. baumannii* osjetljivim na ceftazidim (105). Iste godine grupa engleskih autora dovodi u vezu prisustvo IS*Aba1* insercijske sekvencije s ekspresijom *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gena i stvaranjem OXA enzima (83). Insercijska sekvencija IS*Aba1* pripada porodici IS4 i djeluje kao promotor pojačavajući ekspresiju gena za prirodne cefalosporinaze AmpC i oksacilinaze OXA-51 skupine *A. baumannii*. Najnovija istraživanja francuske skupine autora predvođenih Nordmannom i Poirelom, prikazana na 18. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) u Barceloni 2008. godine, dokazuju da je IS*Aba1* mobilni element u genomu *E. coli* (106). U literaturi se opisuju dva načina određivanja prisustva insercijske sekvencije IS*Aba1* smještene neposredno uz *bla*<sub>OXA</sub> gen. Prvi način određivanja opisuje engleska grupa autora predvođena Jane Turton koja je amplificirala zajednički IS*Aba1* i OXA-51 like produkt veličine ~1400 bp ukoliko se nalaze neposredno jedan uz drugoga (83). Ovaj način određivanja smještaja insercijske sekvencije korišten je u našem radu. Druga skupina engleskih autora opisuje amplifikaciju pomoću posebno sastavljenih vanjskih početnica (engl. *external primers*) koja omogućava istodobnu identifikaciju IS*Aba1* smještene neposredno uz *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gen, čime se amplificira produkt veličine 1790 bp. PCR produkti dalje se sekvencioniraju i identificiraju pomoću BLAST i MultAlin softverskog programa (107). Sposobnost pomicanja insercijske sekvencije uzduž genoma *A. baumannii* i smještaj uzvodno od *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gena, predstavlja mogućnost prošle ili buduće mobilizacije rezistencije. Dio istraživanja u sklopu međunarodnog ARPAC projekta ograničio se na 60 karbapenem rezistentnih izolata *A. baumannii* različitog zemljopisnog podrijetla (25 bolnica, 17 europskih zemalja), među kojima se nalazi izolat A424 podrijetlom iz Hrvatske, iz KBC Split. Izolati su identificirani unutar *A. baumannii* kompleksa pomoću tRNA fingerprintingom (108). Unutar ove velike i

raznovrsne skupine nađeno je prisustvo insercijske sekvencije *ISAbal* među samo deset izolata *A. baumannii*, uključujući i izolat iz Hrvatske (86). Prema dostupnim bibliografskim podacima, skupina engleskih autora ustanovila je povezanost insercijske sekvencije *ISAbal* smještene neposredno uzvodno od *bla*<sub>OXA-51-like</sub> gena i ekspresije karbapenemske rezistencije na trideset kliničkih izolata iz različitih britanskih bolnica (83).

Rezultati naših istraživanja potvrđuju povezanost prisustva insercijske sekvencije s ekspresijom rezistencije na karbapeneme, poglavito na meropenem, i sukladni su rezultatima engleske skupine autora (83). Na velikom broju kliničkih izolata *A. baumannii*, naša su istraživanja potvrdila da svi izolati s MIK-om  $\geq 8$   $\mu\text{g/ml}$  na meropenem imaju insercijsku sekvenciju smještenu neposredno uz *bla*<sub>OXA-51</sub> gen. To smo dokazali PCR produktom dobivenim amplifikacijom *ISAbal* F početnice i OXA-51-like R početnice, čime smo dobili produkt veličine  $\sim 1400$  bp. Naš izolat iz 2002. godine (izolat br. 2) ima insercijsku sekvenciju smještenu neposredno uz *bla*<sub>OXA-51 like</sub> gen, pa smatramo da iste godine dolazi do pomaka mobilnog elementa *ISAbal*, koji se inače nalazi unutar genoma *A. baumannii*, neposredno uz *bla*<sub>OXA-51</sub> gen. Smještajem insercijske sekvencije neposredno uz *bla*<sub>OXA-51 like</sub> gen dolazi do pojačanog djelovanja OXA-107 enzima, koji u osnovi pripada skupini urođenih oksacilinaza, i ekspresiji karbapenemske rezistencije.

Rezultati ove disertacije potvrđuju ulogu insercijske sekvencije *ISAbal* u ekspresiji karbapenemske rezistencije među izolatima *A. baumannii*. Nalaz dobiva na važnosti jer se radi o mobilnom genetskom elementu, pa ukazuje na mogućnost mobilizacije rezistencije među različitim rodovima, pa čak i vrstama mikroorganizama.

Izolati *A. baumannii* rezistentni na karbapeneme iz Kliničkog bolničkog centra Split tipizirani su metodom PFGE, a dodatnim analizama sekvencija tri gena unutar klastera (*bla*<sub>oxa-51-like</sub>, *ompA* i *csuE*) utvrđeno je da pripadaju Europskom klonu I, kojem pripadaju i

izolati iz Bugarske, Njemačke, Grčke, Nizozemske, Norveške, Poljske i Slovenije (89). U Europski klon II pripadaju izolati podrijetlom iz Češke, Njemačke, Grčke, Italije, Španjolske, te izolati iz Poljske, Argentine i Tajvana koji se nalaze i u klonu I i klonu II. Europski klon III izolata *A. baumannii* koji su rezistentni na karbapenem predstavljaju izolati podrijetlom iz Francuske, te ponovo iz Njemačke, Nizozemske i Španjolske (7, 109). U sklopu ARPAC projekta genotipizirano je 16 kliničkih izolata *A. baumannii* sa smanjenom osjetljivošću na jedan ili oba karbapenema koji su prikupljeni tijekom 2003. – 2004. godine unutar različitih jedinica intenzivnog liječenja KBC Split. Rezultati genotipizacije sojeva unutar ovog europskog projekta pokazali su da, u pravilu, brojni izolati iz jedne bolnice pripadaju istom PFGE tipu, kao što je potvrđeno i na najbrojnijoj skupini izolata podrijetlom iz KBC Split. Svi testirani izolati iz naše ustanove pripadaju PFGE tipu V, dok je unutar 96 kliničkih izolata različitog geografskog podrijetla genotipiziranih metodama PFGE i RAPD (engl. *randomly amplified polymorphic DNA*) utvrđeno ukupno 17 genotipova. Rezultati genotipizacije izolata *A. baumannii* potvrđuju veliku sličnost svih kliničkih izolata iz naše ustanove prikupljenih tijekom šest godina. Rezultati genotipizacije pomoću 85 % razine podudarnosti u visokom postotku potvrđuju sličnost naših izolata prikupljenih tijekom šestogodišnjeg razdoblja. U ovom radu je dokazana proširenost jednog klona s tri genotipa među različitim jedinicama intenzivnog liječenja koje su smještene na različitim lokacijama (Firule i Križine) udaljenim 1,5 km. Mišljenja smo da je do prijenosa ovog klona moglo doći na nekoliko načina. Jedan od načina prijenosa je kolonizacijom bolničkog osoblja koje radi na obje lokacije jer je dokazano da je *A. baumannii* među najčešćim gram-negativnim mikroorganizamima izoliranim s ruku bolničkog osoblja (14). Drugi način prijenosa zasigurno je premještajem koloniziranih bolesnika s jednog lokaliteta na drugi, i smještajem takvog bolesnika na



drugi odjel ili jedinicu intenzivnog liječenja. Kao treći mogući način opisan je prijenos karbapenem rezistentnih izolata *A. baumannii* korištenjem zajedničkih aparata za mehaničku potpurnu ventilaciju bolesnika (28, 29), a upravo takvi prijenosni respiratori postoje i u jedinicama intenzivnog liječenja na lokacijama Firule i Križine.

Posebnost koja se uočava genotipizacijom naših izolata prikupljenim tijekom višegodišnjeg istraživanja jest prisustvo tri genotipa (A, B, C), koji se razlikuju u 3-5 ulomaka unutar jednog klona koji obitava u KBC Split. Svi genotipovi prisutni su unutar najveće Jedinice intenzivnog liječenja Firule (CIT F), ali genotip A zasigurno ima najveći epidemijski potencijal i proširen je i na druge jedinice intenzivnog liječenja. Većina europskih zemalja opisuje proširenost jednog klona unutar iste ustanove te među susjednim bolnicama na užem geografskom području (110, 109). Rijetke ustanove, poput sveučilišne bolnice u Chicagu i medicinske akademije u Sofiji, zabilježile su prisustvo nekoliko genotipova unutar iste ustanove tijekom višegodišnjeg praćenja karbapenem rezistentnih izolata *A. baumannii*, od kojih jedan dominira kroz nekoliko godina praćenja i zadržava epidemijski potencijal (111, 112).

Najnovija istraživanja engleske skupine autora daju novi pogled na podrijetlo OXA enzima kodiranih *bla*<sub>OXA-51-like</sub> genom. Rezultati njihovih istraživanja upućuju na OXA-65 ili neki vrlo sličan gen (za sada neotkriven) kao ishodišni gen za sve *bla*<sub>OXA-51</sub> enzime (86). Podrijetlo ovih enzima do sada nije otkriveno, premda se prisustvo OXA-51 enzima danas koristi i kao potvrda identifikacije kompleksa *A. baumannii*, te postoje navodi u literaturi koji ukazuju da se identifikacija vrste može zasnivati na otkrivanju jednog OXA-51-like enzima (113). Prisustvo *bla*<sub>oxa-51-like</sub> gena, uz *ompA* gen (gen koji kodira porine proteina A vanjske membrane) te *csuE* gen (kodirajući gen za pilus chaperon sekrecijski sistem),

predstavlja temelj analize sekvencija pomoću multipleks PCR i sasvim novu tehniku tipizacije sojeva unutar klona identificiranih pomoću PFGE metode (114).

Rezultati engleskih istraživanja objavljeni početkom 2008. godine navode da su tri vrste OXA enzima prisutne u pojedinim klasterima ili klonovima unutar Europe, kao što se vidi na slici 1.3 (86, 107). Najveći broj izolata unutar Europskog klona II sadrži enzim OXA-66 i pripada sekvencijskoj grupi 1 (SG1). Druga po veličini skupina pripada Europskom klonu I i sadrži enzim OXA-69, a pripada sekvencijskoj grupi 2 (SG2). Treća skupina prisutna na ovom geografskom području Europe pripada u Europski klon III, sekvencijsku grupu 3 (SG3) i sadrži enzim OXA-71 (86). Izolati *A. baumannii* iz KBC Split sadrže OXA-107 enzim koji ima osnovu u OXA-69 enzimu, te se sukladno istraživanju engleske skupine autora uklapaju i po vrsti enzima u Europski klon I.

Zabrinjavajući porast rezistencije na karbapeneme, poglavito meropenem, zabilježen je posljednjih godina među izolatima *A. baumannii* u velikim bolničkim ustanovama u Hrvatskoj (KBC Split, KBC Zagreb). Stoga je pred nama teško pitanje empirijske primjene karbapenema, poglavito meropenema, u jedinicama intenzivnog liječenja pri sumnji na infekciju uzrokovanu s *A. baumannii*. U liječenju infekcije uzrokovane izolatom koji pokazuje otpornost na oba karbapenema (imipenem i meropenem), terapijsku nadu može pružiti kombinacija ampicilin/sulbaktama u kojoj djelatnu komponentu predstavlja sulbaktam, koji nije dostupan u samostalnom obliku i stoga je teško terapijski primjenjiv. Ampicilin/sulbaktam se nije koristio kao terapijski izbor u KBC Split sve do rujna 2007. godine, prvenstveno zbog otežane nabave i prestanka proizvodnje u Sloveniji. Liječenje teških infekcija ampicilin/sulbaktamom tijekom listopada 2007. godine imalo je terapijski uspjeh kod bolesnika hospitaliziranog na Jedinici intenzivnog liječenja Križine (CIT K). Korištenje polimiksina E (kolistin sulfat) kao djelotvornog, ali i toksičnog, antibiotika u

liječenju infekcija uzrokovanih multiplorezistentnim *A. baumannii* ima ograničenu primjenu (115, 116, 117, 118). Intravenska primjena kolistina moguća je u liječenju sistemskih infekcija, ali ne i u slučaju pneumonije uzrokovane multiplorezistentnim izolatom *Acinetobacteria*, zbog slabog prodora u plućni parenhim (118). Nema preciznih podataka primjene rifampicina u kombinaciji s kolistinom, što bi moglo predstavljati terapijski izbor u liječenju na karbapenem rezistentnih izolata *A. baumannii*, te usporiti brzi razvoj rezistencije na rifampicin u monoterapiji (119).

Rezultati ove disertacije otvaraju vrata za nastavak istraživanja problema smanjene osjetljivosti na karbapeneme kliničkih izolata vrste *A. baumannii* unutar nekoliko bolnica u Hrvatskoj koje imaju zabilježenu rezistenciju na karbapeneme, te pokretanje multicentrične studije u koju će biti uključeni izolati iz drugih ustanova. Rezultati dosadašnje međunarodne suradnje nameću potrebu praćenja i kontrole širenja ovog, sve učestalijeg bolničkog patogena. Buduća bi istraživanja trebala obuhvatiti karbapenem rezistentne izolate iz više hrvatskih bolnica te ih genotipizirati da se dobije uvid u proširenost klona otkrivenog unutar KBC Split (Europski klon 1) na druge ustanove. Posebice bi bilo zanimljivo, utvrditi prevalenciju enzima OXA-107 (ili nekih drugih) među drugim bolničkim sredinama na ovom geografskom području.

Rezultati ove disertacije nedvojbeno potvrđuju prisutnost klona s epidemijskim potencijalom koji obitava unutar KBC Split tijekom trajanja ove studije. Europske zemlje koje prate problem multiplo rezistentnih bolničkih patogena poput MRSA, vankomicin rezistentnog enterokoka (VRE) i ESBL izolata enterobakterija, posljednji godina rade probir (engl. *screening*) na najčešće uzročnike bolničkih infekcija. Najnovija medicinska literatura navodi potrebu probira na karbapenem rezistentnih izolata *A. baumannii* u Velikoj Britaniji (120).

Racionalnija primjena karbapenemskih antibiotika u odnosu na prethodne godine, kao i uvođenje probira na karbapenem rezistentnih izolata *A. baumannii* unutar jedinica intenzivne njege, zasigurno bi pridonijeli ograničavanju širenja ovog multiplerezistentnog patogena i manjem broju bolničkih infekcija.

## **6. ZAKLJUČCI**

## 6. ZAKLJUČCI

1. U istraživanim izolatima *Acinetobacter baumannii* dokazana je smanjena osjetljivost na karbapeneme.
2. Postoji razlika u osjetljivosti unutar karbapenemske skupine antibiotika.
3. Učestalost izolata rezistentnih na meropenem je viša nego na imipenem, što je posljedica značajne razlike u potrošnji određenog karbapenema, poglavito tijekom 2002.-2007. godine.
4. Povećana potrošnja meropenema dovela je do pojave enzima oksacilinaze koji hidrolizira karbapeneme.
5. Dokazali smo postojanje novog OXA-107 enzima koji ima viši MIK za meropenem i predstavlja evolucijski odgovor OXA-69 enzima na selektivni pritisak meropenema.
6. Osim oksacilinaze, dokazano je prisustvo insercijske sekvencije IS*Aba1* smještene neposredno uz *bla*<sub>OXA</sub> gen u 100 od 106 (94,3 %) izoliranih acinetobaktera, kao dodatni utjecaj na ekspresiju rezistencije.
7. Racionalnija primjena karbapenemskih antibiotika u odnosu na prethodne godine, kao i uvođenje probira na izolate *A. baumannii* rezistentne na karbapeneme u jedinicama intenzivne njege, zasigurno bi pridonijeli ograničavanju širenja ovog multiplo rezistentnog patogena i manjem broju bolničkih infekcija.
8. Buduća bi istraživanja trebala biti usmjerena na pronalaženje i primjenu učinkovitih mjera sprječavanja širenja multiplo rezistentnog *Acinetobacter* spp. unutar bolničkih sredina, jedinica intenzivnog liječenja i koloniziranih bolesnika.

## **7. SAŽETAK**

## 7. SAŽETAK

Tijekom šestogodišnjeg razdoblja istraživanja (2002.-2007.) prikupljeno je 106 izolata *A. baumannii* sa smanjenom osjetljivošću na jedan ili oba karbapenema s različitih odjela i jedinica intenzivnog liječenja unutar KBC Split. Osjetljivost na antibiotike određena je disk-difuzijskom metodom i potvrđena mikrodilucijom u bujonu prema standardima CLSI. Kod svih izolata *A. baumannii* nađena je osjetljivost ili rezistencija na imipenem (MIK 2-32 µg/ml), te umjerena osjetljivost ili rezistencija na meropenem (MIK 8-128 µg/ml) s višim vrijednostima MIK-a za meropenem. Svi izolati uključeni u izradu disertacije bili su rezistentni ili umjereno osjetljivi na sve druge skupine antibiotika osim ampicilin/sulbaktam. Prisustvo *bla*<sub>OXA</sub> gena istraženo je lančanom reakcijom polimeraze (PCR). Genotipizacijom izolata metodom elektroforeze u pulzirajućem polju (PFGE) istražena je sličnost među izolatima. PCR produkti *bla*<sub>OXA-51 like</sub> gena sekvencionirani su za šest odabranih reprezentativnih izolata.

Lančanom reakcijom polimeraze dokazano je prisustvo *bla*<sub>OXA-51</sub> enzima u svim prikupljenim izolatima. Nisu pronađene OXA-23 i OXA-24 β-laktamaze, kao ni na plazmidu smješteni *bla*<sub>OXA-58</sub> gen. Rezultati sekvencioniranja potvrdili su prisustvo novog enzima OXA-107 u šest reprezentativnih izolata s različitih odjela KBC Split.

Kod većine izolata (100/106) sa smanjenom osjetljivošću na jedan ili oba karbapenema otkrivena je insercijska sekvencija *ISAbal* smještena neposredno uz *bla*<sub>OXA-51</sub> gen.



Rezultati genotipizacije potvrdili su klonsku sličnost na razini 80 % među svim prikupljenim izolatima, te tri genotipa (A, B, C) unutar KBC Split. Genotip A je najzastupljeniji, proširen je unutar različitih odjela i jedinica intenzivne njege u KBC Split, te posjeduje najveći epidemijski potencijal.

Racionalnija primjena karbapenemskih antibiotika u odnosu na prethodne godine i uvođenje probira na karbapenem rezistentne izolate *A. baumannii*, zasigurno bi pridonijeli ograničavanju širenja ovog multiplo rezistentnog patogena i manjem broju bolničkih infekcija.

## **8. SUMMARY**

## 8. SUMMARY

In total, 106 carbapenem resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* were obtained from different intensive care units inside University Hospital of Split, Croatia, during six years (2002-2007) study period. The susceptibility to a wide range of antibiotics was determined by disc-diffusion and broth microdilution method according to CLSI. All isolates of *A. baumannii* displayed susceptible or resistant profile to imipenem (MICs 2-32 mg/L) and intermediate or resistant profile to meropenem (MICs 8-128 mg/L) with higher MICs values to meropenem. Susceptibility testing found all isolates to be resistant to all tested antibiotics except of ampicillin/sulbactam. *Bla<sub>OXA</sub>* genes were detected by PCR using conditions and protocols as described previously. Genetic relatedness of the isolates was determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Amplicons of the selected representative strains were subjected to sequencing of *bla<sub>OXA</sub>*-genes.

In present study we found OXA-51 group of oxacillinases in all tested isolates by PCR. No other class D oxacillinases (OXA-23-like, OXA-24-like or OXA-58-like) were detected by PCR. Sequencing data confirmed presence of new OXA-107 enzyme in six representative strains. The most of isolates with carbapenem resistance profile (100/106) were found to possess *ISAbal* insertion sequence located upstream of *bla<sub>OXA-51</sub>* gene. According to PFGE all isolates were clonally related with similarity cut-off value of 80% and were assigned into three PFGE clusters (A, B, C). Cluster A was representative with

the largest epidemic potential and distended inside different departments and intensive care units in Split University Hospital.

Changes in antibiotic policy are recommended to reduce selection pressure which favors spread of carbapenem resistant *A. baumannii* isolates in the hospital environment. Furthermore, the factors responsible for dissemination of such strains need to be identified, controlled and prevented to avoid major outbreaks.

## **9. LITERATURA**

## 9. LITERATURA

1. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9:148-65.
2. Livermore D, Woodford N. The  $\beta$ -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Trends in Microbiology 2006; 14: 413-20.
3. Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative gram-negative rods. U: Murray P.R, Baron E.J, Jorgensen J.H, Pfaller M.A, Tenover F.C, Tenover K.C. ur, Manual of Clinical Microbiology 8. izd. Washington, D.C.:ASM; 2003: 749-79.
4. Richet H, Fournier PE. Nosocomial infections caused by *Acinetobacter baumannii*: a major threat worldwide. Infect Control Hosp Epidemiol 2006; 27: 645-6.
5. Rossau R, Van Landschoot A, Gillis M, de Ley J. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychobacter* and related organisms. Int J Syst Bacteriol 1991 ; 41: 310-9.
6. Vila J, Marti S, Sanchez-Cespedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2007; 59: 1210-5.
7. Towner KJ. Global epidemiology of *Acinetobacter*. Clin Microbiol Infect 2007; 13 (Suppl 1): S47 S242.
8. Al-Khoja MS, Darell JH. The skin as the source of *Acinetobacter* and *Moraxella* species occurring in blood cultures. J Clin Pathol 1979; 32: 497-9.

9. Berlau J, Aucken H, Malnick H, Pitt T. Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 179-83.
10. Rosenthal SL. Sources of pseudomonas and acinetobacter species found in human culture materials. *Am J Clin Pathol* 1974; 62: 807-11.
11. Wise KA, Tosolini FA. Epidemiological surveillance of *Acinetobacter* species. *J Hosp Infect* 1990; 16: 319-29.
12. Corbella X, Pujol M, Ayats J, Sendra M, Ardanuy C, Domingez MA i sur. Relevance of digestive tract colonization in the epidemiology of nosocomial infections due to multiresistant *A. baumannii*. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 329-34.
13. Christensen EA, Gerner-Smidt P, Kristensen H. Radiation resistance of clinical *Acinetobacter* spp.: a need for concern? *J Hosp Infect* 1991; 18: 85-92.
14. Larson EL. Persistent carriage of gram-negative bacteria on hands. *Am J Infect Control* 1981; 9: 112-9.
15. Weernink A, Severin WP, Tjernberg I, Dijkshoorn L. Pillows, an unexpected source of *Acinetobacter*. *J Hosp Infect* 1995; 29: 189-99.
16. Borer A, Gilad J, Smolyakov R, Eskira S, Peled N, Porat N i sur. Cell phones and *Acinetobacter* transmission. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1160-1.
17. La Scola B, Raoult D. *Acinetobacter baumannii* in human body louse. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1671-3.
18. Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1938-41.

19. Oncul O, Keskin O, Acar HV, Kucukardali Y, Evrenkaya R, Atasoyu EM i sur. Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. *J Hosp Infect* 2002; 51: 47-51.
20. Davis KA, Moran KA, McAlister CK, Gray PJ. Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1218-24.
21. Hawley JS, Murray CK, Griffith ME, McElmeel ML, Fulcher LC, Hospenthal DR i sur. Susceptibility of *Acinetobacter* strains isolated from deployed U.S. military personnel. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 376-8.
22. Jones A, Morgan D, Walsh A, Turton J, Livermore D, Pitt T i sur. Importation of multidrug-resistant *Acinetobacter* spp infections with casualties from Iraq. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 317-8.
23. Hsueh PR, Teng LJ, Chen CY, Chen WH, Yu CJ, Ho SW i sur. Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a University Hospital, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 827-32.
24. Hanberger H, Garcia Rodriguez JA, Gobernado M, Goossens H, Nilsson LE, Struelens MJ. Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 european countries. French and Portuguese ICU Study Groups. *JAMA* 1999; 281: 67-71.
25. Jones ME, Draghi DC, Thornsberry C, Karlowski JA, Sahn DF, Wenzel PR. Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit- A European and North American Surveillance study (2000-2002). *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2004; 3:14.
26. Rello J. *Acinetobacter baumannii* infections in the ICU. *Chest* 1999; 115: 1226-9.
27. Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 868-73.



28. Playford EG, Craig JC, Iredell JR. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit patients: risk factors for acquisition, infection and their consequences. *J Hosp Infect* 2007; 65: 204-11.
29. Loh LC, Yii CT, Lai KK, Seevaunnamtum SP, Pushparasah G, Tong JM. *Acinetobacter baumannii* respiratory isolates in ventilated patients are associated with prolonged hospital stay. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 597-8.
30. Wybo I, Blommaert L, De Beer T, Soetens O, De Regt J, Lacor P i sur. Outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Belgian university hospital after transfer of patient from Greece. *J Hosp Infect* 2007; 67: 374-80.
31. Balfour JA, Bryson HM, Brogden RN. Imipenem/cilastatin: an update of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy in the treatment of serious infections. *Drugs* 1996; 51: 99-136.
32. Edwards JR. Meropenem: a microbiological overview *J Antimicrob Chemother* 1995; 36: 1-17.
33. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1211-33.
34. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289: 321-31.
35. Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 19-45.
36. Marti S, Sanchez-Cespedes J, Oliveira E, Belido D, Giralt E, Vila J. Proteomic analysis of a fraction enriched in cell envelope proteins of *Acinetobacter baumannii*. *Proteomics* 2006; 6: 82-7.

37. Quale J, Bratu S, Landman D, Heddurshetti R. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. Clin Infect Dis 2003; 37: 214-20.
38. Bou G, Cervero G, Dominquez MA, Quereda C, Martinez-Beltran J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of  $\beta$ -lactamases. J. Clin Microbiol 2000; 38: 3299-305.
39. Walsh FM, Amyes SGB. Microbiology and drug resistance mechanisms of fully resistant pathogens. Current Opinion in Microbiology 2004; 7: 439-44.
40. Ambler PR, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M i sur. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. Biochem J 1991; 276: 269-70.
41. Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A i sur. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 2265-9.
42. Naas T, Coignard B, Carbonne A, Blanckaert K, Bajolet O, Bernet C i sur. VEB-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. Emerg Infect Dis 2006; 12: 1214-22.
43. Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, Degheldre Y, Glupczynski Y, Nordmann P. Emergence of PER and VEB extended-spectrum beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. J Antimicrob Chemother 2006; 58: 178-82.

44. Jacoby GA.  $\beta$ -Lactamase nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:1123-9.
45. Naas T, Kernbaum S, Allali S, Nordmann P. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, Russia. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 669-71.
46. Gallant CV, Daniels C, Leung JM, Ghosh AS, Young KD, Kotra LP i sur. Common  $\beta$ -lactamases inhibit bacterial biofilm formation. *Mol Microbiol* 2005; 58: 1012-24.
47. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microb Infect* 2006; 12: 826-36.
48. Cornaglia G, Riccio ML, Mazzariol A, Lauretti L, Fontana R, Rossolini GM. Appearance of IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase in Europe. *Lancet* 1999; 353: 899-900.
49. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K i sur. PCR typing of genetic determinants for metallo- $\beta$ -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5407-13.
50. Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y. VIM and IMP-type metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 868-71.
51. Tysall L, Stockdale MW, Chadwick PR, Palepou MF, Towner KJ, Livermore DM i sur. IMP-1 carbapenemase detected in an *Acinetobacter* clinical isolate from UK. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 217-8.
52. Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R i sur. Characterization of the metallo- $\beta$ -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*<sub>IMP</sub> allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1229-35.

53. Takahashi A, Yomoda S, Kobayashi I, Okubo T, Tsunoda M, Iyobe S. Detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in a hospital. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 526-9.
54. Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET, Palepou MI, Lyon DJ, Woodford N i sur. IMP-4, a novel metallo- $\beta$ -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 710-4.
55. Koh TH, Sng LH, Wang GCY, Hsu LY, Zhao Y. IMP-4 and OXA  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 627-32.
56. Da Silva GJ, Correia M, Vital C, Ribeiro G, Sousa JC, Leitão R i sur. Molecular characterization of bla<sub>IMP-5</sub>, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 215: 33-9.
57. Gales AC, Tognim MC, Reis AO, Jones RN, Sader HS. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45: 77-9.
58. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 306-25.
59. Peleg AY, Franklin C, Walters LJ, Bell JM, Spelman DW. OXA-58 and IMP-4 carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases in an *Acinetobacter junii* blood culture from Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 399-400.
60. Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S, Tzouvelekis LS, Sofianou D, Legakis NJ i sur. VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 981-3.

61. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD i sur. Novel acquired metallo- $\beta$ -lactamase gene, bla (SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4485-91.
62. Van Looveren M, Goossens H. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. In Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 684-704.
63. Paton RH, Miles RS, Hood J, Amyes SGB. ARI-1:  $\beta$ -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 1993; 2: 81-8.
64. Heritier C, Poirel L, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D, Nordmann P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4174-9.
65. Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore D. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:756-8.
66. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Oxa-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2006; 373-83.
67. Heritier C, Poirel L, Nordmann P. Genetic and biochemical characterization of a chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing Ambler class D beta-lactamase from *Shewanella* algae. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1670-5.
68. Poirel L, Heritier C, Tolun V. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:15-22.
69. Girlich D, Naas T, Nordmann P. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2034-8.

70. Girlich D, Naas T, Nordmann P. OXA-60, a chromosomal, inducible, and imipenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamase from *Ralstonia pickettii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4217-25.
71. Brown S, Amyes S. OXA  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 1-3.
72. Donald HM, Scaife W, Amyes SG, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 196-9.
73. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D  $\beta$ -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:583-8.
74. Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Woodford N, Warner M i sur. Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacte baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3623-7.
75. Brown S, Amyes SGB. The sequences of seven class D  $\beta$ -lactamases isolated from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 326-8.
76. Mugnier P, Poirel L, Pitout M, Nordmann P. Carbapenem-resistant and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in the United Arab Emirates. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 879-82.
77. Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1556-61.

78. Heritier C, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 268-73.
79. Merkier AK, Centron D. *Bla*<sub>OXA-51</sub> type  $\beta$ -lactamase genes are ubiquitous and vary within a strain in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrobial Agents* 2006; 28: 110-3.
80. Brown S, Young HK, Amyes SGB. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 15-23.
81. Evans BA, Brown S, Hamouda A, Findlay J, Amyes SGB. Eleven novel OXA-51-like enzymes from clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 1137-8.
82. Goić-Barišić I, Bedenić B, Tonkić M, Katić S, Kalenić S, Punda-Polić V. First report of molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in different intensive care units in University Hospital Split, Croatia. *J Chemother* 2007; 19: 416-8.
83. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TL. The role of *ISAbal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 258: 72-7.
84. Poirel L, Marque S, Heritier C, Seqonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 202-8.

85. Poirel L, Mansour W, Bouallegue O, Nordmann P. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Tunisia producing the OXA-58-like carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-97. *Antimicrobial Agents Chemother* 2008; 52: 1613-7.
86. Evans BA, Hamouda A, Towner KJ, Amyes SGB. OXA-51-like  $\beta$ -lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:268-75.
87. Tambić Andrašević A, Tambić T, Kalenić S, Janković V. Surveillance for antimicrobial resistance in Croatia. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 14-8.
88. Odbor za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2006. godini. AMZH, Zagreb 2007.
89. Towner KJ, Levi K, Vlassiadi M. Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:161-7.
90. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 15th Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15 (ISBN 1-56238-556-9). Wayne (Pennsylvania): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
91. Turner PJ. Use of program-specific website to disseminate surveillance data obtained from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53: 273-9.
92. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S i sur. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 351-3.



93. Sykes RB, Matthew M. Detection, assay and immunology of beta-lactamases. U: Hamilton-Miller JMT, Smith JT, ur. Beta-lactamases. London: Academic Press, 1979: 17-49.
94. Ausubel FM. DNA sequencing. U: Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, ur. Current protocol in molecular biology. New York: Wiley&Sons, Inc; 1995: 56-95.
95. Gales AC, Pfaller MA, Sader HS, Hollis RJ, Jones RN. Genotypic characterization of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter* spp. isolated in Latin America. Microb Drug Resist 2004; 10: 286-91.
96. Gouby A, Carles-Nurit MJ, Bouziges N, Bourg G, Mesnard R, Bouvet PJ. Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of hospital outbreak of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microb 1992; 30: 1588-91.
97. Marcos MA, Jimenez de Anta MT, Vila J. Correlation of six methods for typing nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Med Microbiol 1995; 42: 328-35.
98. PFGE Typing Protocol Recommended by ARPAC for *Acinetobacter baumannii*.  
[www.abdn.ac.uk/arpac/](http://www.abdn.ac.uk/arpac/)
99. Van der Ploeg LH, Schwartz DC, Cantor CR, Borst P. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei* analyzed by electrophoretic separation of chromosome-sized DNA molecules. Cell 1984; 37: 77-84.
100. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Pershing DH i sur. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microb 1995; 33: 2233-9.

101. Tonkic M, Goić-Barišić I, Punda-Polić V. Prevalence and antimicrobial resistance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in a university hospital in Split, Croatia. *Int Microbiol* 2005; 8: 119-24.
102. Duenas Diez AI, Bratos Perez MA, Eiros Bouza JM, Almaraz Gomez A, Gutierrez Rodriguez P, Miguel Gomez MA i sur. Susceptibility of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex to imipenem, meropenem, sulbactam and colistin. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23: 487-93.
103. Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* recovered from blood cultures in Australia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27: 759-61.
104. Ikonomidis A, Pournaras S, Maniatis AN. Discordance of meropenem versus imipenem activity against *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28: 376-7.
105. Heritier C, Poirel L, Nordmann P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:123-30.
106. Poirel L, Mugnier P, Nordmann P. In vivo transposition of insertion sequence ISAbal at the origin of genome plasticity and acquired antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14; 7: S59-60 O295.
107. Evans B, Hamouda A, Towner K, Amyes S. The OXA-51-like enzymes of *Acinetobacter baumannii*: markers of success? *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 7; S60 O296.

108. Ehrenstein B, Bernards AT, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Towner KJ, Bouvet PJ i sur. *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. J Clin Microbiol 1996; 34: 2414-20.
109. Van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden T, Bakker N, Paauw A, van den Broek P i sur. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. Res Microbiol 2004; 155: 105-12.
110. Turton JF, Kaufmann ME, Warner M, Coelho J, Dijkshoorn L, van der Reijden T i sur. A prevalent, multiresistant clone of *Acinetobacter baumannii* in Southeast England. J Hospital Infect 2004; 58: 170-9.
111. Dobrewski R, Savov E, Bernards AT, van den Barselaar M, Nordmann P, van den Broek PJ i sur. Genotypic diversity and antibiotic susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolates in a Bulgarian hospital. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 1135-7.
112. Qi C, Malczynski M, Parker M, Scheetz M. Characterization of genetic diversity of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains collected from 2004 to 2007. J Clin Microbiol 2008; 46: 1106-9.
113. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*<sub>oxa-51-like</sub> carbapenemase gene intrinsic to this species. J Clin Microbiol 2006; 44: 2974-6.
114. Turton JF, Gabriel SN, Valderrey C, Kaufmann ME, Pitt TL. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect 2007; 13: 807-15.
115. Peleg AY, Paterson DL. Multidrug-resistant *Acinetobacter*: a threat to the antibiotic era. Intern Med J 2006; 36: 479-82.

116. Arroyo LA, Garcia-Curiel A, Pachon-Ibanez ML, Llanos AC, Ruiz M, Pachón J i sur. Reliability of the E-test method for detection of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 2005; 43: 903-5.
117. Tong W, Wang R, Chai D, Li Z, Pei F. In vitro activity of cefepime combined with sulbactam against clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents 2006; 28: 454-6.
118. Levin AS, Barone AA, Penco J, Santos MV, Marinho IS, Arruda EA i sur. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Clin Infect Dis 1999; 28: 1008-11.
119. Saballs M, Pujol M, Tubau F, Peña C, Montero A, Domínguez MA i sur. Rifampicin/imipenem combination in the treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. J Antimicrob Chemother 2006; 58: 697-700.
120. Enoch DA, Summers C, Brown NM, Moore L, Gillham MI, Burnstein RM i sur. Investigation and management of an outbreak of multidrug-carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Cambridge, UK. J Hosp Infect 2008; 70: 109-18.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## 10. ŽIVOTOPIS

Ivana Goić Barišić rođena je 20. travnja 1965. godine u Splitu, gdje je završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala je u ožujku 1989. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Obvezni pripravnički staž završila je u travnju 1990. godine i kao liječnik opće medicine radi u Domu zdravlja Split, Solin i Kaštela do lipnja 1997. godine. Iste godine, za potrebe Kliničke bolnice Split, započinje specijalizaciju iz medicinske mikrobiologije s parazitologijom koju završava u srpnju 2001. godine. Tijekom specijalizacije završila je stručni poslijediplomski studij iz medicinske mikrobiologije, a po završetku specijalizacije upisala doktorski znanstveni poslijediplomski studij iz temeljnih i kliničkih medicinskih znanosti na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu.

Na Katedri za medicinsku mikrobiologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu izabrana je u zvanje naslovnog asistenta 2006. godine, kada prijavljuje i doktorsku disertaciju.

Objavila je osam radova u časopisima indeksiranim u Current Contentsu i šest radova u časopisima indeksiranim u Excerpta medica/Index Medicus. Autorica je i koautorica 22 kongresna priopćenja, od čega četiri s međunarodnom recenzijom. Govori engleski i njemački jezik. Član je Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog društva za medicinsku mikrobiologiju s parazitologijom, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Udana je, majka dvojice sinova.