Antimikrobna rezistencija i sposobnost stvaranja biofilma kliničkih izolata Acinetobacter baumannii

Živković, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:402793

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Valentina Živković

ANTIMIKROBNA REZISTENCIJA I SPOSOBNOST STVARANJA BIOFILMA KLINIČKIH IZOLATA *ACINETOBACTER BAUMANNII*

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Valentina Živković

ANTIMIKROBNA REZISTENCIJA I SPOSOBNOST STVARANJA BIOFILMA KLINIČKIH IZOLATA *ACINETOBACTER BAUMANNII*

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet u Osijeku na Katedri za mikrobiologiju, parazitologiju i kliničko-laboratorijsku dijagnostiku i Zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije.

Mentor rada: izv.prof.dr.sc. Domagoj Drenjančević, dr. med., spec. kliničke mikrobiologije

Rad ima 31 radni list, 5 tablica i 7 slika.

Zahvala

Zahvaljujem se svom mentoru izv.prof.dr.sc. Domagoju Drenjančeviću dr.med., spec. kliničke mikrobiologije, na stručnom vodstvu, nesebičnoj pomoći te ustupljenom vremenu tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se dr.sc. Maji Bogdan dr.med., spec. kliničke mikrobiologije, sa Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, na ustupljenim podatcima i korisnim savjetima, kao i Marijanu Orloviću, dr. med. na podršci i pomoći prilikom pisanja rada.

Posebno i veliko hvala mojim roditeljima, dečku i prijateljima koji su mi uvijek bili najveća podrška i oslonac tijekom studiranja, vjerovali u mene i pružali mi podršku, razumijevanje i ljubav.

SADRŽAJ

1. UVOD **1**

1.1.Rezistencija bakterija na antibiotike **1**

1.2.Biofilm – čimbenik virulencije **1**

1.3. *Acinetobacter baumannii* – mikrobiološke karakteristike **2**

1.4. Sposobnost stvaranja biofilma **5**

1.4.1. Identifikacija biofilma **6**

1.5. Infekcije uzrokovane s *Acinetobacter baumannii* **7**

1.6. Antimikrobni testovi **8**

2. CILJ RADA **10**

3. MATERIJALI I METODE RADA **11**

3.1. Ustroj studije **11**

3.2. Kulture mikroorganizama i testiranje *A. baumannii* **11**

3.3. Kvantifikacija biofilma **12**

3.4. Testiranje osjetljivosti na antibiotike **12**

3.5. Statističke metode **13**

4. REZULTATI **15**

4.1. Rezultati ispitivanja produkcije biofilma izolata Acinetobacter baumannii **15**

4.2. Razlike u osjetljivosti izolata **15**

4.3. Razlike u produkciji biofilma po kategorijama i antibioticima **16**

4.4. Osjetljivost na imipenem i produkcija biofilma **17**

4.5. Osjetljivost na ampicillin sulbaktam i produkcija biofilma **17**

4.6. Osjetljivost na amikacin i produkcija biofilma **18**

4.7. Produkcija biofilma među izolatima koji su osjetljivi na ispitivane antibiotike ... **19**

4.8. Produkcija biofilma među izolatima koji su rezistentni na ispitivane antibiotike **20**

5. RASPRAVA **21**

6. ZAKLJUČAK **24**

7. SAŽETAK **25**

8. SUMMARY **26**

9. LITERATURA **27**

10. ŽIVOTOPIS **31**

1. UVOD

1.1.Rezistencija bakterija na antibiotike

Jedan od vodećih problema u zdravstvu 21. stoljeća jest otpornost bakterija na antibiotike. Od uvođenja penicilina za liječenje bakterijskih infekcija početkom 40-ih godina prošlog stoljeća, mnoge su se bolesti koje su završavale letalnim ishodom ovim otkrićem smanjile na najmanji mogući postotak. Paralelno otkrićima lijekova, razvija se i kirurška i invazivna grana medicine, pri čemu se pacijenti izlažu mogućem riziku infekcija. Taj je rizik sveden na minimum zahvaljujući profilaktičnoj i terapijskoj primjeni antibiotika. Međutim, zbog prekomjerne primjene antibiotika, bakterije su stekle mnoge mehanizme otpornosti na sve skupine antibiotika koje se koriste u kliničkoj primjeni (1). Najčešći mehanizmi otpornosti uključuju promjenu ciljnoga mjesta, inaktivaciju antibiotika stvaranjem enzima, smanjenu propustljivost stijenke za ulaženje antibiotika, ili aktivno izbacivanje antibiotika iz stanice (2).

Na samom početku primjene antibiotika, tzv. „antibiotiska era“ (1), liječnici su bili svjesni mogućeg nastanka problema povezanih s rezistencijom, no vjerovalo se u neprekidan izvor nastanka novih ciljanih antibiotika. Danas se zna da je vrlo teško doći do neotkrivenih supstanci za novi lijek, a u prilog tome idu i činjenice kako u SAD-u u periodu 1968.-2000. nije registriran nijedan novi antibiotik koji bi pripadao novoj skupini antibiotika (3). Dakle, jedna od suvremenih zadaća zdravstva jest primjenu antibiotika smanjiti na najmanju razinu kako bi se usporilo razvijanje otpornosti bakterija na antibiotike. Zdravstvenog problema rezistencije bakterija na antibiotike svjesne su i stručne udruge, vlade pojedinih zemlja, te se on upravo iz tog razloga svrstava među prioritete Svjetske zdravstvene organizacije s ciljem suprimiranja rezistencije (4).

1.2. Biofilm – čimbenik virulencije

Biofilm predstavlja zajednicu mikroorganizama koji su ireverzibilno povezani s površinom te produciraju ekstracelularne polimerne supstance (EPS) i pri tome pokazuju promijenjene osobine u usporedbi s pojedinačnim bakterijama. Biofilm je specifična baterijska organizacija, skup različitih bakterija u jednoj maloj populaciji, koje su udružene radi međusobne koristi i veće otpornosti na vanjska djelovanja (5). U zajednicu se naseljavaju i dijele različite vrste bakterija, što nazivamo „sazrijevanjem“ biofilma, odnosno, slojevi

postaju deblji, a međubakterijska organizacija sve jača i otpornija na antibiotike, što ujedno predstavlja i najveći problem u zdravstvu zbog nemogućnosti djelovanja na navedenu sesilnu zajednicu.

Strukturu biofilma čini tradicionalni hidratizirani biofilm, nadogradnja biofilma i suhi površinski biofilm. Biofilm je na svojoj površini zaštićen ovojnicom koja ga čini otpornijim na vanjska djelovanja (toplina, dezinficijensi...), a unutar mase bakterija postoje sitni kanalići za dotok hranjivih tvari i uklanjanje štetnih tvari za normalno funkcioniranje sesilne zajednice. Unutar biofilma postoje različite bakterijske vrste koje jedna drugoj rade na korist, odnosno međusobno si čine simbiozu. Tako, ono što je jednoj bakterijskoj vrsti otpadni produkt, drugoj bude hrana. Također, poznat je fenomen „kolektivne svijesti“ ili bakterijske komunikacije. Bakterije imaju određene „signalne“ molekule kojima prenose obavijesti i na taj način komuniciraju i održavaju se međusobno. To je primitivan oblik komunikacije, koji je vrlo učinkovit kada je u pitanju preživljavanje. Bakterije tako jedna drugoj mogu prenijeti informaciju kada, npr. zbog promjena u okolini (npr. promjena u vrsti prehrane domaćina), treba provesti prilagodbu metabolizma. Iz svega ovoga vidi se sama razvijenost biofilma i njegova velika mogućnost prilagodbe na sve uvjete u okolini.

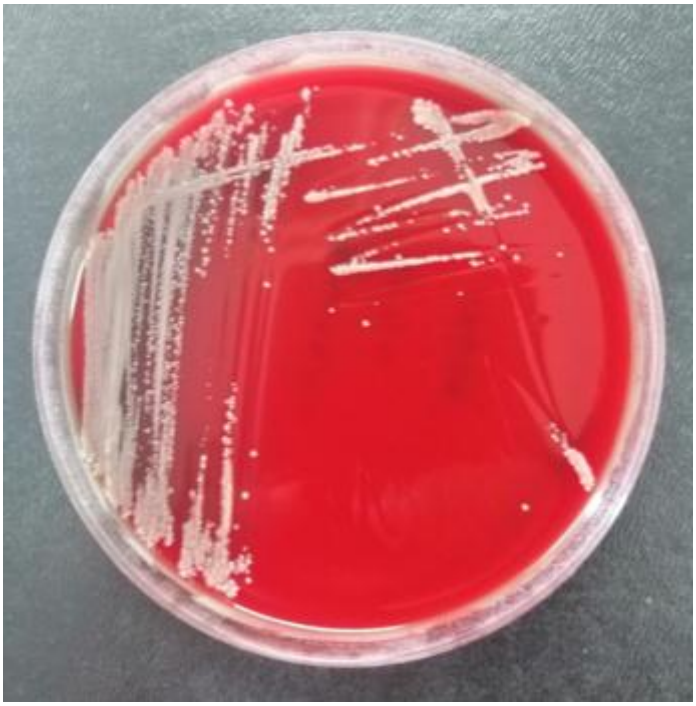
Njihova komunikacija služi im kako bi jedna bakterija mogla upozoriti drugu na djelovanje antibiotika. To je u situacijama kada one bakterije koje su prve u doticaju s antibiotikom šalju informaciju u dublje dijelove sloja biofilma o kojemu se antibiotiku radi, tj. koje receptore na membrani stanice treba promijeniti da se taj antibiotik ne veže za bakterijsku stanicu (5). To je osnovni mehanizam nastanka rezistencije na antibiotik. Zato je izuzetno važno antibiotik uzimati samo po liječničkom naputku, i ne često. U slučaju parodontne terapije antibiotik se smije koristiti samo i isključivo paralelno s mehaničkom terapijom, upravo zbog biofilma.

1.3. *Acinetobacter baumannii* – mikrobiološke karakteristike

Nizozemski mikrobiolog Beijerinck među prvima je 1911. izolirao organizam iz tla, koristeći minimalni medij obogaćen kalcijevim acetatom (6), no sam naziv Acinetobacter predložili su 43 godine kasnije Brisou i Prevot (7). U rod *Acinetobacter* pripadaju gram-negativne aerobne, katalaza-pozitivne i okisdaza-negativne bakterije, nepokretne bakterije *(grč. akineto*s-nepokretan) i nefermentativni kokobacili, što potvrđuje negativna reakcija na Kligerovu agaru, s posjedovanjem kapsule koja omogućava inhibiciju fagocitoze. Njeno

stanište je na raznim mjestima u tlu i vodi u obliku slobodno živućih saprofita, s klizućom i trzajućom pokretljivošću.

U mikroskopskom preparatu izgledaju kao kratki, zdepasti štapići koji se teško odbojavaju, stoga se mogu zamijeniti za gram-negativne ili gram-pozitivne koke. Laki su za uzgojiti u laboratorijskim uvjetima na krvnom agaru ili MacConkeyjevu agaru pri temperaturi od 37 ℃ i inkubaciji od 18 do 24 sata, a kolonije se opisuju kao okrugle, glatke površine, pravilnih rubova, sivobijele boje, sluzave, nalik kolonijama enterobakterija (8).



Slika 1. *Acinetobacter baumannii* uzgojen na krvnom agaru (fotografirao Marijan Orlović, dr.med., Medicinski fakultet Osijek)

Acinetobakteri se definiraju kao oportunistički patogeni koji najčešće uzrokuju infekcije u respiratornom i urinarnom traktu, ranama, a pojavljuju se i nakon operacijskih zahvata u obliku meningitisa i sepse. *A. baumannii* najčešći je uzročnik pneumonije povezane sa strojnom ventilacijom, a također se sve češće spominje kao vodeći uzročnik infekcija kod pacijenata s intravaskularnim kateterima, pri produljenoj hospitalizaciji i provođenju invazivnih pretraga (8). Osim u hospitalnim infekcijama, znanstveno su dokazane i sporadične izvanbolničke infekcije uzrokovane *A. baumannii,* čime se potvrđuje činjenica njegove izrazite sposobnosti preživljavanja (9). Uzorci iz kojih se mogu analizirati Acinetobakteri ovise o samom mjestu infekcije. Kao mogući uzorci navode se aspirati iz donjih dijelova dišnog sustava, bronhoalveolarni lavat (BAL), krv, likvor, mokraća te bris rane.

A. baumannii se, zajedno s vrstama *Enteroccocus faecium, Staphylococcus aureus, Clostridium difficile, Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter spp*. svrstava u posebnu novonastalu kategoriju ESCAPE patogena, što znači da može izbjeći djelovanje brojnih antibiotika te stvarati nove probleme u patogenezi, transmisiji i rezistenciji (10), što naposljetku predstavlja globalni javnozdravstveni problem u 21. stoljeću. U prirodnoj površinskoj vodi pronađeno je nekoliko izolata *A. baumannii* višestruko rezistentnih na antibiotike, npr. u rijeci Savi u gradu Zagrebu detektirana su četiri izolata u 10 ml vode (11). Ovakav problem izrazito je značajan jer zbog njegove prisutnosti i izrazite patogenosti dolazi do puta prijenosa i zaraze u ljudi i životinja prilikom kupanja ili konzumacije navedene vode te se vrlo brzo širi među navedenim jedinkama, što predstavlja jedan od ozbiljnijih zdravstvenih problema.

Kod gram-negativnih nefermentativnih bakterija (*Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii*) otpornost na najsnažnije antibiotike imipenem i meropenem već bilježimo i u Hrvatskoj, a penje se i preko 90 % (12). Otpornost tih bakterija na karbapeneme u pojedinim većim bolnicama iznosi oko 88 %, za razliku od Enterobakterija, čija je rezistencija na karbapeneme u vrlo malom postotku (12). Njihova rezistencija može biti uzrokovana hiperprodukcijom AmpC-cefalosporinaza u kombinaciji sa smanjenom propustljivosti stanične stijenke, smanjenim afinitetom ciljnoga mjesta (PBP molekula) za karbapeneme, ili produkcijom karbapenemaza (13, 14, 15). Karbapenemi su skupina antibiotika koja se uspješno koristila za tretiranje infekcija uzrokovanih s *A. baumannii*. Međutim, rezistencija na karbapeneme povećala se od 2008. s 10 % na 86 % u 2017. godini (CAMS, 2017.).

Rezistencija na karbapeneme u pravilu je povezana s rezistencijom na više klasa antibiotika. Načelno, rezistentne bakterije možemo razvrstati prema slijedećim kategorijama:

- **senzitivni** - osjetljivi na sve antibiotike;

- **višestruko rezistentni (MDR, multidrug-resistant)** – neosjetljivi na 1 ili više agensa u više od 3 antimikrobne kategorije;

- **prošireno rezistentni (XDR, extensively drug-resistant)** – neosjetljivi na 1 ili više agensa u svim, izuzev 2 ili manje antimikrobne kategorije;

- **sveopće rezistentni (PDR, pandrug-resistant)** – neosjetljivi na sve agense u svim antimikrobnim kategorijama (16).

Kontrolu razvoja rezistencije i širenja vodi se u nekoliko koraka, a to su: praćenje otpornosti bakterija na antibiotike u vlastitoj sredini, praćenje potrošnje antibiotika, racionalno propisivanje antibiotika, kontrola širenja infekcija te naposljetku brza mikrobiološka dijagnostika koja je ključna u smanjenju nepotrebne primjene antibiotika jer svaka nesigurna i nepotpuna dijagnoza vodi ka nepotrebnom propisivanju lijeka pacijentu (1).

S obzirom na brz i opsežan razvoj rezistencije na antibiotike, učinjeno je nekoliko pokušaja razvoja alternativne strategije kontrole infekcija izazvanih s *A. baumannii,* a neki od njih su prema dosadašnjim istraživanjima:

a) Primjena bakteriofaga: Zbog visoke specifičnosti faga i njihove sposobnosti brzog djelovanja, bakteriofagna terapija preispituje se kao alternativni tretman za pomoć u suzbijanju fenomena rezistencije na antibiotike (17). Nedavna studija Yanga i njegova tima istraživača (18) rezultirala je izolacijom i karakterizacijom virulentnog AB1 bakteriofaga za koji se pokazalo da je učinkovit protiv *A. baumannii* i kao takav predstavlja novu terapiju određenog potencijala u budućnosti.

b) Radioimunoterapija: Iako se radi o eksperimentalnom konceptu i još nije iskorišten kao terapijska antimikrobna strategija u kliničkoj primjeni, premisa je da radioimunoterapija može ciljati mikroorganizme jednako brzo i učinkovito kao i stanice raka u onkoloških bolesnika. Ovaj pristup koristi prednosti specifičnosti interakcija antigen-antitijelo za isporuku radionuklida koji zrače smrtonosne doze citotoksičnog zračenja izravno u ciljnu stanicu. Izuzimajući samo prolaznu hematološku toksičnost u pokusnih životinja, radioimunoterapija uspješno je prilagođena za liječenje bakterijskih, gljivičnih i virusnih infekcija (19). Protutijela koja se koriste u terapiji mišjeg su porijekla (izotip IgG1). Na njihov Fc fragment posebnom je tehnikom pričvršćen izotop. Kada se anti-CD20 monoklonsko protutijelo veže za CD20 antigen, ono inducira apoptozu stanica pomoću aktivacije o protutijelima i komplementu ovisne stanične citotoksičnosti. To je princip djelovanja neobilježenih protutijela (20).

1.4. Sposobnost stvaranja biofilma

Iako se vjeruje da nekoliko čimbenika može doprinijeti virulentnom potencijalu *A. baumannii,* jedan faktor posebno se ističe. Utvrđeno je da OmpA, član proteina vanjske membrane (OMPs), značajno doprinosi razvoju infekcije (21), time što se veže za epitel stanice domaćina i mitohondrije. Jednom vezan za mitohondrije, OmpA inducira mitohondrijsku disfunkciju i uzrokuje bubrenje mitohondrija. Nakon toga slijedi oslobađanje

citokroma c i hem proteina, što dovodi do stvaranja apoptosoma. Sve navedene reakcije doprinose apoptozi stanice (21).

Sposobnost *A. baumannii* da stvara biofilm omogućuje joj stalan rast u nepovoljnim uvjetima i okolini, čime je osigurana za preživljavanja u svim medijima. Dokazano je da *A. baumannii* stvara biofilm na abiotskim površinama, poput opreme koja se koristi u hospitalnim uvjetima, posebice u jedinicama intenzivne njege, te na biotskim površinama kao što su epitelne stanice čovjeka (22). Najčešći čimbenici koji kontroliraju formiranje biofilma uključuju dostupnost hranjivih tvari, prisutnost proteina pila i vanjskih membrana i makromolekularnu sekreciju. Proizvodnja pila i proteina povezanih s biofilmom (BAP) doprinosi iniciranju proizvodnje samog biofilma i sazrijevanja nakon što se *A. baumannii* veže na određene površine. Kada pili dođu u doticaj s abiotičkim površinama, oni iniciraju stvaranje mikrokolonija, nakon čega slijedi puni razvoj struktura biofilma. BAP su prisutni na površini bakterijskih stanica i doprinose razvoju i sazrijevanju biofilma stabiliziranjem zrelog biofilma na abiotskim ili biotskim površinama.

Ekološki signali, kao što su metalni kationi, također igraju ulogu u kontroli formiranja biofilma, povećavajući sposobnost *A. baumannii* da prianja na određene površine. Ostali ključni proteini za koje je dokazano da doprinose virulenciji *A. baumannii* uključuju fosfolipazu D i C (23). Zajedno s OmpA, fimbrije, također eksprimirane na površini bakterijske stanice, doprinose adheziji patogena u epitelu domaćina.

1.4.1. Identifikacija biofilma

Acinetobacter baumannii i drugi *Acinetobacter spp.* formiraju biofilm na abiotskim površinama. Stupanj formiranja biofilma znatno varira ovisno o izolatima. Dok se kultivira, bakterije imaju afinitet vezanja za abiotske površine, a za neke površine bolje od drugih. Dostupne su brojne metode za proučavanje *in vitro* formiranja bakterijskog biofilma pod statičkim rastom i one se u osnovi oslanjaju na kultiviranje bakterija na podlogama, nakon čega slijedi bojenje bakterijskog rasta vezanog za abiotičku površinu s prikladnom bojom kao što je kristalno ljubičasta za vizualizaciju biofilma, potom se boja eluira s prikladnim otapalom i mjeri se optička gustoća na spektrofotometru kako bi se kvantificirala pridružena bakterijska masa na ispitivanoj površini, a potom svrstala u određenu kategoriju produkcije biofilma (Tablica 1).

Preciznija detekcija biofilma primjena je molekularnih metoda poput lančane reakcije polimeraze (PCR) i fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH). Novije metode direktne

vizualizacije trodimenzionalne strukture biofilma su konfokalna laserska skener mikroskopija koja se temelji na vizualizaciji 16S ribosomne RNA uz FISH metodu (24) te skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) koja služi za proučavanje reljefa površine uzoraka koji mogu biti i masivni, za elektrone nepropusni, a njime se može vrlo dobro oslikati trodimenzionalnost samog uzorka. Sustavom elektronskih kondenzorskih leća elektroni se fokusiraju u vrlo uzak snop, koji se otklonskim elektronskim lećama usmjerava na površinu. Djelovanje snopa na površinu uzrokuje emisiju sekundarnih elektrona, koje je u emisijskom načinu rada moguće registrirati kao sliku na zaslonu katodne cijevi. S obzirom na način zapisivanja signala koji nastaju interakcijom elektronskoga snopa i površine, razlikuju se refleksijski, apsorpcijski, transmisijski, rendgenski i katodoluminiscentni način rada (25). Razvijene su naprednije metode molekularne dijagnostike za identifikaciju acinetobaktera na razini vrste, a to su: amplifikacija 16S rRNA restrikcijskom analizom gena, analiza otiska prsta visoke rezolucije pomoću pojačanog polimorfizma duljine fragmenta (AFLP) i ribotipizacija.

1.5. Infekcije uzrokovane s *Acinetobacter baumannii*

Infekcije *A. baumannii* javljaju se uglavnom među pacijentima koji su primljeni u bolnice, a posebice onima koji se liječe u jedinicama intenzivne njege (JIL-a). Infekcije ovim mikroorganizmom uzrokuju negativne, pa čak i letalne kliničke ishode, kao i značajna ekonomska opterećenja zbog neracionalnog prepisivanja neučinkovitih antibiotika. Temeljem brojnih istraživanja u posljednjih dvadesetak godina među gram-negativnim bakterijama, *Acinetobacter spp.* zauzeo je 5. mjesto po učestalosti infekcija (26), i privukao je veliku pozornost osobito u jedinicama intenzivnog liječenja (JIL). U posljednjih nekoliko godina dodijeljen mu je sinonim "crvena uzbuna", razlog uglavnom proizlazi iz opsežnog spektra otpornosti na antibiotike (27). Jedne od najvažnijih, a ujedno i najproblematičnijih karakteristika navedene bakterije su sposobnost stvaranja biofilma, dugotrajno preživljavanja izvan domaćina (čovjeka) te njihova velika mogućnost stvaranja rezistencije na glavne klase antibiotika putem višestrukih mehanizama (28).

Ove bakterije čest su uzrok upale pluća povezane s kardiovaskularnim poremećajem koja se javlja > 5 – 7 dana nakon prijema u bolnicu, a povezana je s povećanom prevalencijom bakterija otpornih na više lijekova u posljednjih nekoliko godina, posebice u jedinicama za intenzivnu njegu (29). Adekvatna empirijska terapija teških infekcija uzrokovanih acinetobakterom ključna je u smislu preživljavanja kako bi se djelomično zaustavio njen rast i progresija u organizmu pacijenta. No, liječenje infekcija uzrokovanih

navedenom bakterijom predstavlja veliki izazov za liječnika. Mnogi sojevi rezistentni su na β-laktame širokog spektra zbog gubitka proteina vanjske membrane, što rezultira smanjenjem propusnosti stijenke za antibiotike. U navedenu skupinu antibiotika ubrajaju se cefalosporini treće generacije, karbapenemi i karboksipenicilini, a trajanje liječenja infekcija uzrokovanih acinetobakterom procijenjeno je na 10 do 22 dana (8).

Ovaj mikroorganizam često igra ulogu kolonizatora među pacijentima s komorbiditetima, izloženošću antibioticima i nedavnim infekcijama, što otežava razjašnjenje je li to primarni uzročnik određene infekcije, osobito među pacijentima s infekcijama poput pneumonije i infekcija rana na tijelu.

1.6. Antimikrobni testovi

Za ispitivanje osjetljivosti bakterija na određene antibitiotike u svrhu što preciznije terapije za pacijenta koriste se različite metode među kojima su najvažnije: dilucijska metoda i disk difuzijska metoda. Zbog svoje jednostavnosti u praksi i u istraživanjima najčešće se primjenjuje disk difuzijska metoda (30). Karakteristike ove kvalitativne metode daju joj prednost nad dilucijskom metodom; jeftina je, jednostavna i u kratkom vremenu daje rezultate (već kroz 18-24 sata nakon izolacije i identifikacije bakterije), što je u medicini najbitnije – dobiti u što kraćem vremenu, točne i pouzdane rezultate testa kako bi se počela primjenjivati terapija i djelovanje na ciljanu bakteriju u organizmu pacijenta (31). Na temelju dobivenog rezultata preporuča se najučinkovitiji antibiotik. No, i pri ovoj metodi nailazimo na mogućnost pogrješke pri dobivanju rezultata ili je pak produljeno vrijeme do dobivanja rezultata, a uzrok tome su nedostatak ili neispravnost odgovarajuće laboratorijske opreme.

S druge pak strane, kvantitativna dilucijska metoda temelji se na određivanju minimalnih inhibitornih koncentracija antibiotika (MIK). Postoji nekoliko vrsta ove metode. Jedna je od njih je metoda dilucije u agaru, gdje se određena koncentracija antibiotika dodaje u agar, a potom se na njegovu površinu nasadi ispitivana bakterija. Rezultati ovakve metode očitavaju se na temelju prisustva, odnosno odsustva rasta mikroorganizma poslije prekonoćne inkubacije. Kod metode dilucije u bujonu koriste se tekuće podloge s dodatkom antibiotika u točno određenoj koncentraciji. Posljednja metoda makrodilucije izvodi se u epruvetama, a preporučeni volumen bujona u koji se dodaje ispitivani mikroorganizam i antibiotike treba biti 2 ml. Makrodilucijska metoda bila je prva metoda koja se primijenjivala za određivanje MIK vrijednosti, ali se danas u praksi više ne koristi, već ju je zamijenila mikrodilucijska metoda, koja je manje zahtjevna i jeftinija. Mikrodilucijska metoda podrazumijeva korištenje

mikrotitarskih pločica, pri kojoj ukupan volumen u jažici ne prelazi 500 µl. Standardne mikrotitarske pločice imaju veličinu 8 x 12 jažica pa se na jednoj ploči može ispitivati 8 antibiotika u 12 koncentracija ili 12 antibiotika u 8 koncentracija. Koncentracije antibiotika obično su u nizu dvostrukog razrjeđenja. Mikrodilucijske mikrotitarske pločice mogu se napraviti izravno u laboratoriju, ali su dostupne i najviše se koriste komercijalne pločice, u čijim se jažicama već nalazi dehidrirani antibiotik u određenim koncentracijama. Rezultati kod navedene metode tumače se na temelju prisustva, odnosno odsustva sedimenta u mikrotitarskoj jažici. Najmanja koncentracija antibiotika pri kojoj nema stvaranja sedimenta predstavlja MIK vrijednost za ispitivanu bakteriju (32).

Rezultat, odnosno antibakterijska aktivnost ispitivanog antibiotika, ovisi o nekoliko čimbenika: temperaturi i vremenu inkubacije, izboru hranjive podloge, pH vrijednosti podloge, starosti i načinu skladištenja antibiotika (33). Kako bi se izbjegli navedeni problemi, koriste se nacionalni standardi za testiranje osjetljivosti bakterijskih izolata. Prema podatcima iz literature, pri nižim pH vrijednostima hranjivog medija aminoglikozidi, kinoloni i makrolidi gube djelotvornost, dok se djelotvornost tetraciklina povećava. Povišenje pH djeluje obrnuto pa povećava učinak aminoglikozida, makrolida i kinolona, a smanjuje učinak tetraciklina. Sukladno tome, pri izradi antibiograma treba se voditi nacionalnim standardima i protokolima kako se ne bi dogodile greške i odstupanje rezultata (34). Kontinuirana unutarnja i vanjska kontrola rada mikrobioloških laboratorija osigurava točnost rezultata testiranja antimikrobne osjetljivosti (35).

2. CILJ RADA

Ciljevi su ovog istraživanja:

1. Ispitati sposobnost stvaranja biofilma kod kliničkih izolata *Acinetobacter baumannii* u *in vitro* uvjetima.
2. Ispitati antimikrobnu rezistenciju ispitivanih kliničkih izolata *A. baumannii* mikrodilucijskom metodom.
3. Ispitati povezanost između osjetljivosti izolata *A. baumannii* na antibiotike i sposobnosti stvaranja biofilma.

3. MATERIJALI I METODE RADA

3.1. Ustroj studije

Ova je studija eksperimentalno *in vitro* istraživanje.

3.2. Kulture mikroorganizama i testiranje *A. baumannii*

U istraživanju je korišteno 47 kliničkih izolata *A. baumannii* prikupljenih u periodu 2007.-2019. i pohranjenih u Zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije. Osim kliničkih izolata u istraživanju je korištena i baza podataka i arhivski podatci Službe za mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije. Bolesnici, kao ni njihovi osobni podatci nisu korišteni ni na koji način u istraživanju. Podatci o uzorcima i rezultatima mikrobiološke pretrage te o rezultatima testiranja osjetljivosti bakterijskih izolata na antibiotike te dostupni podatci o testiranju sposobnosti stvaranja biofilma dobiveni su iz elektronske baze podataka Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije. Tijekom promatranog razdoblja različiti klinički uzorci obrađeni su u laboratoriju za mikrobiologiju Službe za mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije prema uobičajenom protokolu u skladu s pravilima struke, standardiziranim metodama izolacije i identifikacije bakterija i ispitivanja osjetljivosti na antibiotike.

Bakterije su uzgajane na krvnom agaru tijekom 24 sata inkubacije u atmosferskim uvjetima pri 37˚C, a potom su kolonije kulture bakterija inokulirane u 3 ml Luria-Bertani (LB) bujona. Suspenzije su zatim dalje inkubirane u termostatu na 37˚C tijekom 24 sata u istim uvjetima. Nakon inkubacije, epruvete su dobro promiješane na laboratorijskoj mješalici te je presađeno 20 µl iz prijašnje suspenzije na nove Luria-Bertani bujone. Ovim postupkom pripremljene su suspenzije gustoće ($5x10^5$) koje su korištene za ispitivanje sposobnosti stvaranja biofilma koje se izvodilo u triplikatu.

Nakon pripreme suspenzije su nasađene na poliesterske mikrotitarske pločice s ravnim dnom, u koje je za kontrolu ispipetirano 100 µl čistog LB bujona, a u preostala tri mjesta (triplikat) po 50 µl čistog LB bujona i 50 µl pripravljene suspenzije. Potom je slijedila inkubacija u termostatu tijekom 24 sata pri temperaturi 37˚C u već navedenim uvjetima. Nakon inkubacije i ispiranja sterilnom destiliranom vodom slijedilo je bojanje s 100 µl

0.025 % otopine safranina i nakon 2 minute inkubacije na sobnoj temperaturi jažice mikrotitar pločica potom su ponovno isprane 4 puta destiliranom vodom. U sljedećem koraku provedena je solubilizacija s 95%-tnim etanolom.

3.3. Kvantifikacija biofilma

Zadnji korak bilo je spektrofotometrijsko očitavanje na čitaču na 492 nm. Dobiveni rezultati, koji predstavljaju produkciju biofilma u pojedinoj jažici, klasificirani su u sljedeće kategorije: slabi, umjereni i jaki produktori biofilma te sojevi koji ne produciraju biofilm sukladno već opisanoj klasifikaciji prema Stepanović i suradnici, 2000. U Tablici 1 prikazan je način razvrstavanja sukladno rezultatima dobivenog testiranja. Ukratko, dobivene su vrijednosti izražene kao njihova srednja vrijednost, odnosno OD (od eng. o*ptical density*), nakon čega se pomoću formule izračunala granična vrijednost produkcije (pri kojoj se proizvodi bar malo biofilma), ODc (od eng. *optical density cut-off value*), tako da su se srednjoj vrijednosti OD-a negativnih kontrola dodale tri standardne devijacije negativnih kontrola (36). Po završetku ovog dijela, ispitana je antimikrobna rezistencija za sojeve *A. baumannii* standardnim postupcima – disk difuzijskom ili mikrodilucijskom metodom ovisno prema smjernicama Europskog odbora za testiranje antimikrobne osjetljivosti (EUCAST). Na kraju je učinjena statistička obrada i analiza te je ispitana povezanost sposobnosti stvaranja biofilma, intenziteta ovog svojstva i odlika antimikrobne rezistencije za navedene izolate.

Tablica 1. Prikaz kriterija za ocjenjivanje produkcije biofilma

OD < ODc	Neproduktori
ODc < OD < 2 × ODc	Slabi produktori
2 × ODc < OD < 4 × ODc	Umjereni produktori
4 × ODc < OD	Jaki produktori

OD = srednja vrijednost produkcije biofilma u pojedinoj jažici; ODc = granična vrijednost produkcije biofilma (pri kojoj se proizvodi bar malo biofilma)

3.4. Testiranje osjetljivosti na antibiotike

Antibiogramom se ispituje osjetljivost mikroorganizma na antibiotik nasađivanjem standardizirane koncentracije mikroorganizma specifičnim koncentracijama antibiotika. Za neke se mikroorganizme prema osjetljivosti na jedan lijek može predvidjeti osjetljivost na slične lijekove. Zbog toga se ne ispituje osjetljivost baš na sve lijekove koji dolaze u obzir.

Antibiogram se određuje *in vitro* te se u obzir ne uzimaju mnogi faktori koji djeluju *in vivo* (npr. farmakodinamika, koncentracije lijeka specifične za pojedino sijelo bolesti, imunosno stanje domaćina...) i utječu na uspjeh liječenja. Stoga se na temelju antibiograma ne može uvijek predvidjeti ishod liječenja. Pretragom se također može odrediti učinak kombiniranja različitih antibiotika, odnosno testiranje sinergije.

U ovom istraživanju za sve antibiotike vrijednosti MIK-a (minimalna inhibitorna koncentracija) određene su mikrodilucijom u jažicama mikrotitar pločice. To je semikvantitativna metoda kojom se određuje minimalna koncentracija lijeka koja *in vitro* inhibira rast određenog mikroorganizma. MIK se izražava kao brojčana vrijednost koja se svrstava u jednu od triju skupina: S (osjetljiv), I (srednje osjetljiv) ili R (otporan). Određivanje MIK–a koristi se ponajprije za bakterije, uključujući i mikobakterije i anaerobe.

Određivanje MIK-a provedeno je metodom mikrodilucije u Mueller-Hinton bujonu (Bio Rad) i mikrotitar pločicama po CLSI-u (Clinical and Laboratory Standards Institute) za imipenem, ampicilin u kombinaciji s gentamicinom, amikacinom, ciprofloksacinom i kolistinom (37). U provjeri točnosti provedenog testiranja korišteni su kontrolni ATCC sojevi: *Acinetobacter baumannii* 19606 i *Pseudomonas aeruginosa* 27853. Dobiveni rezultati interpretirani su prema EUCAST-ovim (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) smjernicama (38).

3.5. Statističke metode

Podatci definirani ciljevima istraživanja kao i rezultati provedenog ispitivanja prikazani su grafički i tablično te obrađeni deskriptivnom statistikom. Kategorijski podatci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike kategorijskih varijabli testirane su χ^2 testom ili Fisherovim egzaktnim testom. Razina značajnosti namještena je na $\alpha=0.05$. Podatci su statistički analizirani upotrebom informatičkog programa SPSS (inačica 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, SAD) i Microsoft Office Excel tabličnog kalkulatora.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati ispitivanja produkcije biofilma izolata Acinetobacter baumannii

Tablica 2. Rezultati produkcije biofilma kod ispitivanih izolata *Acinetobacter baumannii*

Neproduktori	Slabi produktori	Umjereni produktori	Jaki produktori
20 (42,5 %)	16 (34,1 %)	11 (23,4 %)	0 (0 %)

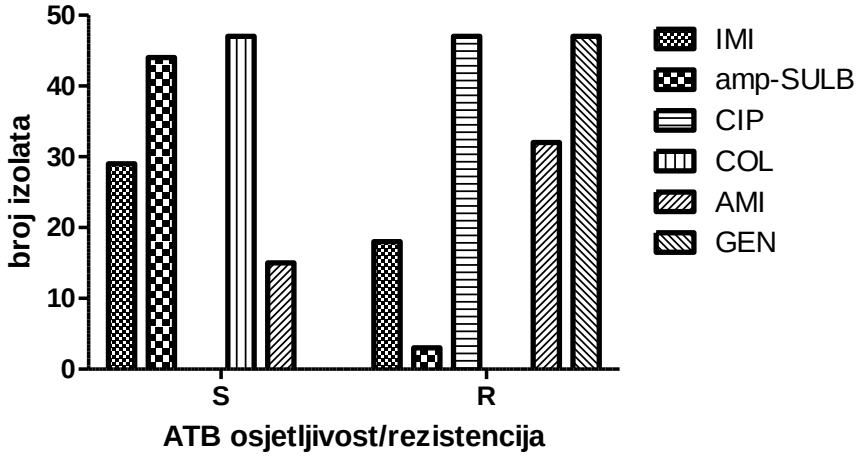
U Tablici 2 nalaze se rezultati ispitivanja produkcije biofilma izolata *Acinetobacter baumannii*. Uočena je razlika u produkciji biofilma kod ispitivanih izolata (χ^2 test, $P < 0.001$).

4.2. Razlike u osjetljivosti izolata

Tablica 3. Rezultati ispitivanja osjetljivosti izolata na antibiotike

	IMI	amp-SULB	CIP	COL	AMI	GEN
S	29 (61,7 %)	44 (93,6 %)	0 (0 %)	47 (100 %)	15 (31,9 %)	0 (0 %)
R	18 (38,3 %)	3 (6,4 %)	47 (100 %)	0 (0 %)	32 (68,1 %)	47 (100 %)

IMI = imipenem, amp-SULB = ampicillin sulbaktam, CIP = ciprofloksacin, COL = kolistin, AMI = amikacin, GEN = gentamicin, S = osjetljivi izolati, R = rezistentni izolati



Slika 2. Rezultati ispitivanja osjetljivosti izolata na antibiotike

IMI = imipenem, amp-SULB = ampicillin sulbaktam, CIP = ciprofloksacin, COL = kolistin, AMI = amikacin, GEN = gentamicin, S = osjetljivi izolati, R = rezistentni izolati

U Tablici 3 i grafičkom prikazu na Slici 2 nalaze se rezultati ispitivanja osjetljivosti izolata *Acinetobacter baumannii* na antibiotike. Uočena je razlika u osjetljivosti izolata na ispitivane antibiotike (χ^2 test, $P < 0.001$).

4.3. Razlike u produkciji biofilma po kategorijama i antibioticima

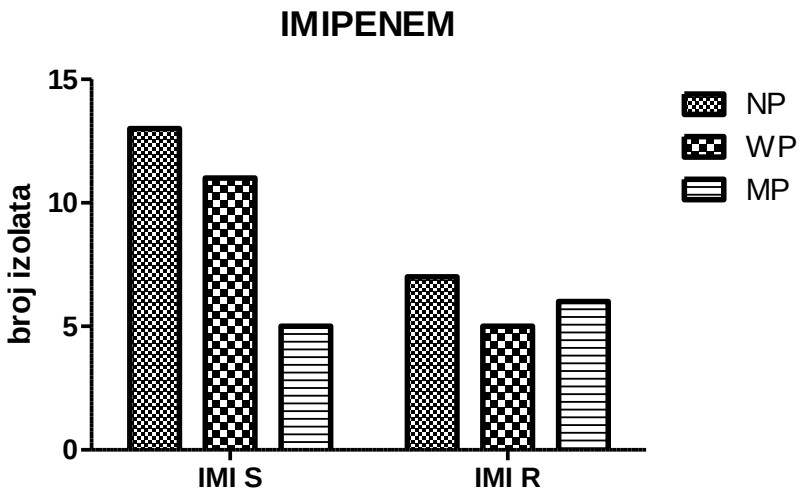
Tablica 4. Rezultati produkcije biofilma po kategorijama i antibioticima

	IMI	amp-SULB	CIP	COL	AMI	GEN
NPS	13 (27,7 %)	19 (40,5 %)	0 (0 %)	20 (42,6 %)	12 (25,5 %)	0 (0 %)
NPR	7 (14,9 %)	1 (2,1 %)	20 (42,6 %)	0 (0 %)	8 (17 %)	20 (42,6 %)
WPS	11 (23,4 %)	15 (31,9 %)	0 (0 %)	16 (34 %)	2 (4,3 %)	0 (0 %)
WPR	5 (10,6 %)	1 (2,1 %)	16 (34 %)	0 (0 %)	14 (29,8 %)	16 (34 %)
MPS	5 (10,6 %)	10 (21,3 %)	0 (0 %)	11 (23,4 %)	1 (2,1 %)	0 (0 %)
MPR	6 (12,8 %)	1 (2,1 %)	11 (23,4 %)	0 (0 %)	10 (21,3 %)	11 (23,4 %)

IMI = imipenem, amp-SULB = ampicillin sulbaktam, CIP = ciprofloksacin, COL = kolistin, AMI = amikacin, GEN = gentamicin, NPS = osjetljivi neproduktori, NPR = rezistentni neproduktori, WPS = osjetljivi slabi produktori, WPR = rezistentni slabi produktori, MPS = osjetljivi umjereni produktori, MPR = rezistentni umjereni produktori

U Tablici 4 izloženi su dobiveni rezultati produkcije biofilma po kategorijama (neproduktori, slabi, umjereni i jaki produktori) i antibioticima. Dokazano je da postoji razlika u osjetljivosti na antibiotike s obzirom na različitu produkciju biofilma što upućuje da su izolati koji ne produciraju biofilm osjetljiviji na antibiotike, odnosno da su izolati s jačom produkcijom biofilma rezistentniji (χ^2 test, $P < 0.001$).

4.4. Osjetljivost na imipenem i produkcija biofilma



Slika 3. Rezultati ispitivanja osjetljivosti izolata na imipenem

IMI S = osjetljivi na imipenem, IMI R = rezistentni na imipenem, NP = neproduktori, WP = slabi produktori., MP = umjereni produktori

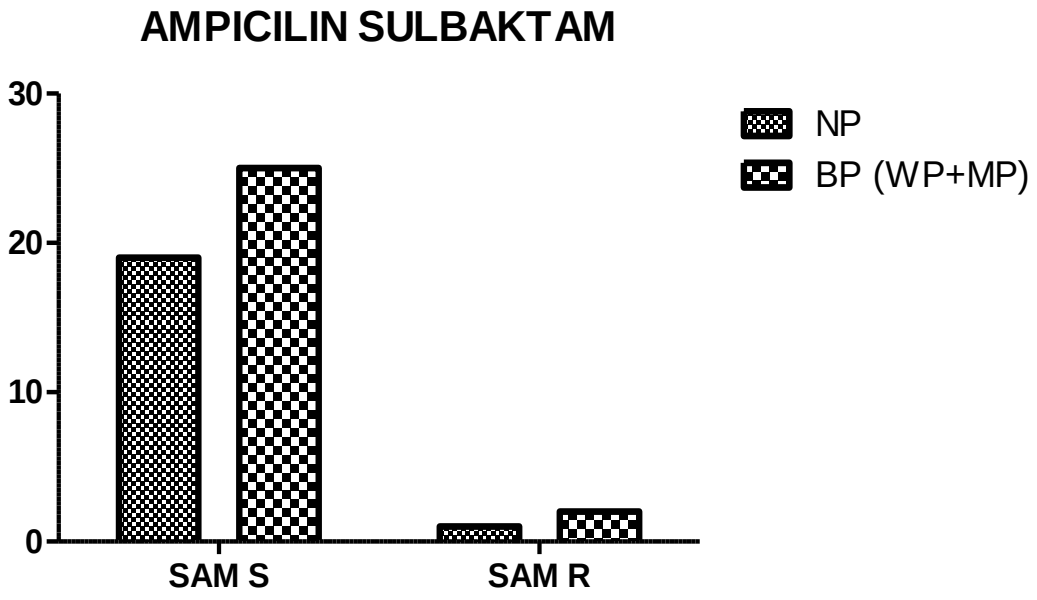
Grafički prikaz na Slici 3 daje uvid u rezultate ispitivanja osjetljivosti na imipenem. Dok se osjetljivim pokazalo 13 neproduktora, 11 slabih i 5 umjerenih produktora, rezistentih je bilo 7 neproduktora, 5 slabih i 6 umjerenih produktora. Ipak, nije uočena statistički značajna osjetljivost na imipenem (χ^2 test, P = 0.4367).

4.5. Osjetljivost na ampicillin sulbaktam i produkcija biofilma

Tablica 5. Rezultati ispitivanja osjetljivosti izolata na ampicilin sulbaktam

	NP	**BP (WP+MP)**	**Ukupno**
SAM S	19 (40,5 %)	25 (53,1 %)	44 (93,6 %)
SAM R	1 (2,1 %)	2 (4,3 %)	3 (6,4 %)
Ukupno	20 (42,6 %)	27 (57,4 %)	47 (100 %)

SAM S = osjetljivi na ampicilin sulbaktam, SAM R = rezistentni na ampicilin sulbaktam, NP = neproduktori, BP = produktori biofilma (zbroj slabih i umjerenih produktora)

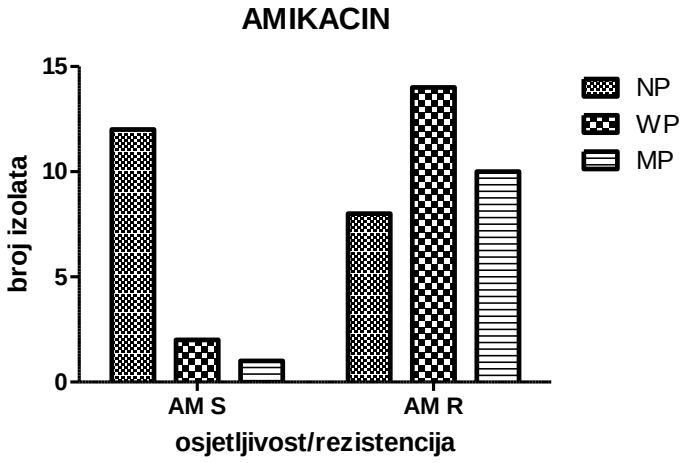


Slika 4. Rezultati ispitivanja osjetljivosti izolata na ampicilin sulbaktam

SAM S = osjetljivi na ampicilin sulbaktam, SAM R = rezistentni na ampicilin sulbaktam, NP = neproduktori, BP = produktori biofilma (zbroj slabih i umjerenih produktora)

Tablica 5 i grafički prikaz na Slici 4 prikazuju rezultate ispitivanja osjetljivosti izolata na ampicilin sulbaktam. Osjetljivih je neproduktora bilo 19, a produktora (zbroj slabih i umjerenih produktora) 25. Rezistentnim se pokazao samo 1 neproduktor te 2 produktora. Nije uočena osjetljivost ispitivanih izolata na ampicilin sulbaktam (Fisherov egzaktni test, $P > 0.05$).

4.6.Osjetljivost na amikacin i produkcija biofilma

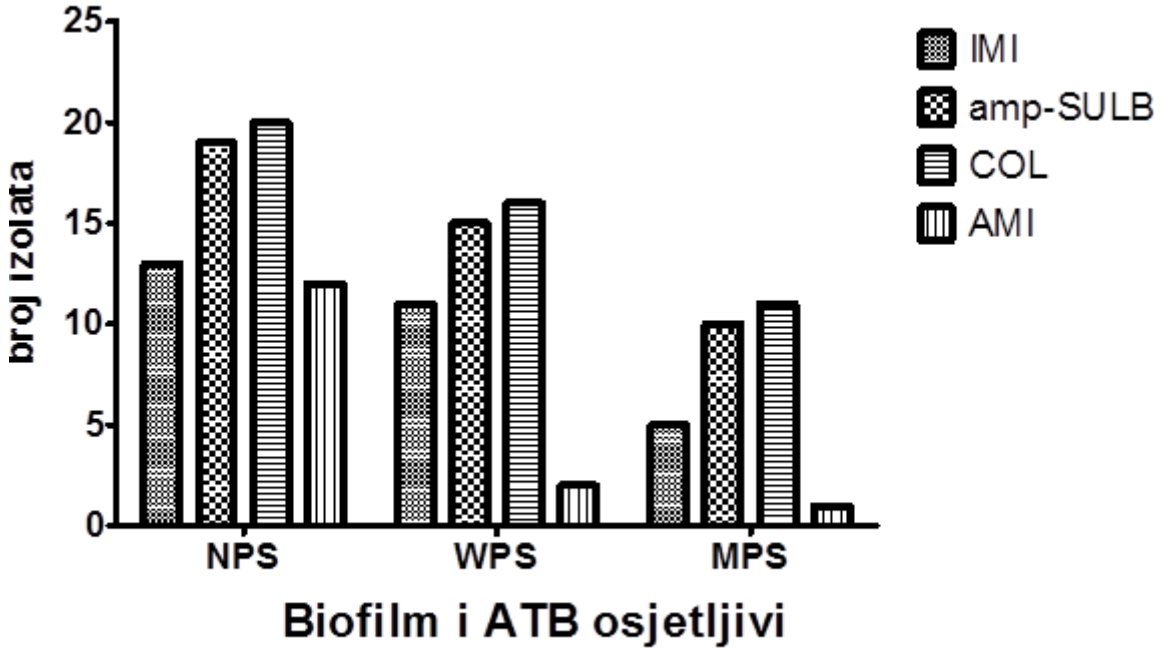


Slika 5. Rezultati ispitivanja osjetljivosti izolata na amikacin

AM S = osjetljivi na amikacin, AM R = rezistentni na amikacin, NP = neproduktori, WP = slabi produktori, MP = umjereni produktori

U grafičkom prikazu na Slici 5 prikazani su rezultati ispitivanja osjetljivosti izolata na amikacin koji govore kako je osjetljivih neproduktora bilo 12, slabih produktora 2 te 1 umjereni, a rezistentnih 8 neproduktora te 14 slabih i 10 umjerenih produktora. Uočene su razlike između sposobnosti produkcije biofilma vezano uz osjetljivost izolata na amikacin: osjetljvi izolati značajno slabije produciraju (ne produciraju) biofilm, za razliku od rezistentnih izolata (χ^2 test, P = 0.0018).

4.7. Produkcija biofilma među izolatima koji su osjetljivi na ispitivane antibiotike

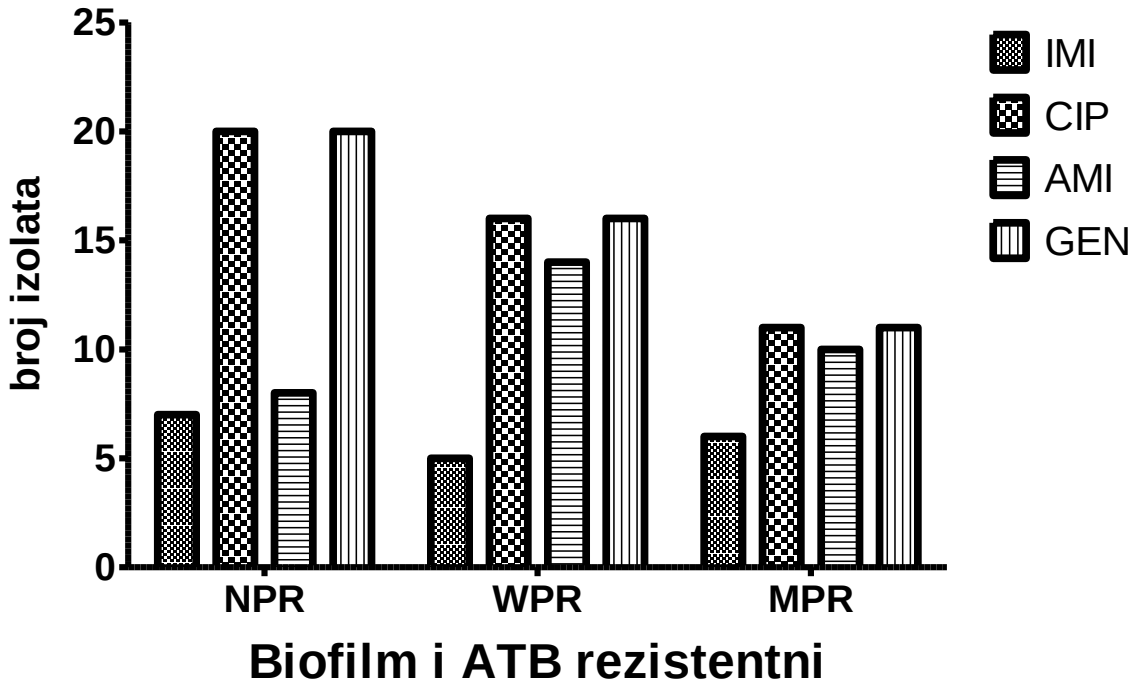


Slika 6. Rezultati ispitivanja produkcije biofilma među izolatima koji su osjetljivi

IMI = imipenem, amp-SULB = ampicillin sulbaktam, COL = kolistin, AMI = amikacin, NPS = osjetljivi neproduktori, WPS = osjetljivi slabi produktori, MPS = osjetljivi umjereni produktori

U grafičkom prikazu na Slici 6 nalaze se podatci o produkciji biofilma kod izolata koji su se pokazali osjetljivima na antibiotike. Nije uočena statistički značajna produkcija biofilma (χ^2 test, P < 0.2608).

4.8.Produkcija biofilma među izolatima koji su rezistentni na ispitivane antibiotike



Slika 7. Rezultati ispitivanja produkcije biofilma među izolatima koji su rezistentni

IMI = imipenem, CIP = ciprofloksacin, AMI = amikacin, GEN = gentamicin, NPR = rezistentni neproduktori, WPR = rezistentni slabi produktori, MPR = rezistentni umjereni produktori

Grafički prikaz na Slici 7 sadrži podatke o produkciji biofilma kod izolata koji su se pokazali rezistentnima na antibiotike. Iz navedenog je razvidno kako nije uočena statistčki značajna produkcija biofilma među izolatima koji su se pokazali rezistentnima na antibiotike također nije statistički značajna (χ^2 test, $P < 0.6989$).

5. RASPRAVA

Ovo istraživanje dovodi nas do nekoliko spoznaja o produkciji biofilma kod izolata *Acinetobacter baumannii* i njegove povezanosti s povećanom bakterijskom rezistencijom na antibiotike. Kao prvo, ispitivani su izolati *A. baumannii* uspješno i statistički značajno producirali biofilm, što je zasigurno jedan od glavnih uzroka velike bakterijske rezistencije acinetobaktera. Nadalje, ispitivanjem ukupne antimikrobne rezistencije navedenih izolata mikrodilucijskom metodom utvrđeno je da postoji statistički značajna osjetljivost izolata na ispitivane antibiotike. Kako se pri pojedinačnom ispitivanju antimikrobne rezistencije izolata kod antibiotika imipenema, ampicilin sulbaktama i amikacina pojavio i određen broj osjetljivih i određen broj rezistentnih izolata, njihovi su podatci detaljnije obrađeni. Time se došlo do zaključaka da osjetljivost ispitivanih izolata na imipenem i ampicilin sulbaktam ipak nije statistički značajna, dok je dokazana statistički značajna osjetljivost ispitivanih izolata na amikacin. Naposljetku, dokazana je i povezanost između osjetljivosti ispitivanih izolata na antibiotike i stvaranja biofilma tako što je utvrđena statistički značajna razlika u osjetljivosti na antibiotike s obzirom na različitu produkciju biofilma. U skladu s početnom pretpostavkom, izolati sa slabijom ili nikakvom produkcijom biofilma pokazali su se osjetljivijima na antibiotike, a oni s većom produkcijom rezistentnijima.

Sve veća rezistencija bakterija na antibiotike u posljednjem je desetljeću ovu temu prometnula u jednu od najvažnijih izazova moderne medicine. U nepunih sto godina, od otkrića antibiotika, zbog njihove sve češće, nerijetko i nepotrebne primjene i dostupnosti, bakterije su uspješno razvile i usavršile brojne mehanizme obrane te evolutivno stvorile oblike rezistentne na antibiotike. Dok su u prošlosti veći problem predstavljale akutne infekcije, pravi su izazov današnje mikrobiologije kronične infekcije. Razlog tomu jest upravo bakterijska rezistencija, a jedan od glavnih spomenutih bakterijskih mehanizama obrane je biofilm. Ispitivani acinetobakter tipični je uzročnik s ovim mehanizmom obrane.

Kao što je već navedeno u uvodu rada, infekcije uzrokovane *Acinetobacter baumannii* teško je liječiti kod oboljelih jer su često otporne na više skupina lijekova i često tvore biofilmove. U jedom srodnom istraživanju ispitivala se aktivnost minociklina, polimiksina B, meropenema i amikacina protiv različitih kliničkih izolata *A. baumannii* s tvorbom biofilma koji su klasificirani kao slabi u odnosu na umjerene, odnosno jake. U kliničkom istraživanju dokazano je kako je kod minociklina spriječeno stvaranje biofilma za 96 % izolata, dok je čak

u pola manje, odnosno 54 % za polimiksin B, 29 % za meropenem i 29 % za amikacin. Minociklin i polimiksin B pokazali su najveću *in vitro* aktivnost protiv *A. baumannii* i spriječili stvaranje biofilma za većinu izolata (39).

Rezultati sličnog istraživanja, u kojemu su korišteni neki od antibiotika kao u ovom istraživanju, također pokazuju da subminimalne inhibitorne koncentracije antibiotika imaju učinak na sposobnost produkcije biofilma. U ispitivanih izolata koji stvaraju biofilm došlo je do supresije njegove produkcije za neke od ispitivanih antibiotika. Uočen učinak statistički je značajan za subminimalne inhibitorne koncentracije imipenema, azitromicina, rifampicina i kolistina. Uz to, to je istraživanje došlo i do zaključka da je većina ispitivanih izolata rezistentna i na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma, ali i da subminimalne inhibitorne koncentracije azitromicina i ampicilin sulbaktama imaju učinak na osjetljivost takvih serum rezistentnih izolata (40).

Sljedeća spoznaja do koje su došla srodna znanstvena istraživanja jest kako dvostruka antimikrobna terapija nije bila povezana s pozitivnim ishodima kod infekcija uzrokovanih *A. baumannii* među bolesnicima na mehaničkoj ventilaciji u jedinicama intenzivnog liječenja, gdje prije svega takvi pacijenti imaju sami po sebi lošiju prognozu bolesti i skloniji su razvoju bolničkih infekcija. Također, produljeno antimikrobno liječenje nije bilo povezano s kliničkim izlječenjem od infekcije *A. baumannii* povezanih s mehaničkom ventilacijom. Čini se da su prethodni komorbiditeti i stupanj povezanih organskih ozljeda pacijenta važniji čimbenici u prognozi bolesti uzrokovanih navedenom bakterijom (41).

Infekcija gram-negativnim bakterijama otpornim na više lijekova sve je veći problem, posebice u zdravstvenim ustanovama. Kolistin je jedan od krajnjih antibiotika za takve infekcije, kod kojih su mogućnosti liječenja vrlo ograničene. Povećana otpornost na kolistin globalni je javnozdravstveni problem na kojem bi se trebalo raditi i pokušati pronaći rješenje. Klinički i laboratorijski institut za standarde (CLSI) i Europski odbor za ispitivanje osjetljivosti na antimikrobne pripravke (EUCAST) preporučili su ISO-standardnu metodu mikrodilucije u bujonu kao referentnu metodu za određivanje osjetljivosti na kolistin. Budući da metoda mikrodilucije u bujonu nije praktična metoda, rijetko se koristi u rutinskim kliničkim mikrobiološkim laboratorijima, ali jednostavne i točne fenotipske metode detekcije za određivanje otpornosti na kolistin u rutinskim laboratorijama za mikrobiologiju nisu točno definirane (42).

Jedno znanstveno istraživanje imalo je za cilj utvrditi mehanizme rezistencije u izolatima *Acinetobacter baumannii* s kolistinom MIK većim ili jednakim 4 mg/l i povezati mehanizme otpornosti s poteškoćama u otkrivanju. U 13 izolata otkrivene su kategoričke

pogrješke; osnovni razlog za 5 izolata bio je spor rast, dok je u preostalih 8 izolata usporeni rast zajedno s malim udjelom subpopulacija otpornih na kolistin. Da bi se razumio vjerojatni razlog primijećenih MIK vrijednosti, provedeno je sekvencioniranje gena povezanih s otpornošću prema kolistinu. Otkrivene su mutacije gena lpxA, lpxC i pmrB i primijećeno je da izolati koji nose mutacije u lpxC pokazuju spor rast pri ubijanju (43).

Grupa znanstvenika u još jednom srodnom istraživanju došla je do spoznaje kako postojeće modificirane metode inaktivacije karbapenema (mCIMs) koje CLSI preporučuje za otkrivanje proizvodnje karbapenemaze nisu primjenjive za *Acinetobacter baumannii*. Procijenili su utjecaj matrica koje se koriste u mCIMs i CIMTris na stabilnost diskova za otkrivanje proizvođača karbapenemaze i predložili optimalne mCIM uvjete za otkrivanje *A. baumannii* koji proizvodi karbapenemazu (44). 73 izolata *A. baumannii* karakterizirana genima osjetljivosti na antimikrobne lijekove i karbapenemazu testirana su na proizvodnju karbapenemaze primjenom mCIM i CIMTris. Utvrđen je i utjecaj matrica (Tryptic soj bujon [TSB] i Tris-HCl) korištenih u tim metodama na stabilnost diska s meropenemom (MEM). Uvjeti mCIM-a prilagođeni su poboljšanju screening osjetljivosti i specifičnosti za otkrivanje *A. baumannii* koji proizvodi karbapenemazu (44).

Zaključno, istraživanja biofilma, njegovih struktura i načina njegova suzbijanja jedne su od ključnih tema u suvremenoj mikrobiologiji zbog sve težeg antimikrobnog liječenja infekcija povezanih s biofilmom. Stoga su ovakva i srodna istraživanja koja pružaju uvid u korelaciju produkcije biofilma i povećane antimkrobne rezistencije mali, ali važan korak k puno zahtjevnijem izazovu – pronalasku i razvoju ciljane antimikrobne terapije za sprječavanja nastanka i suzbijanja već nastalog biofilma.

6. ZAKLJUČAK

Iz provedenog istraživanja i analize obrađenih rezultata, zaključci su sljedeći:

- Ispitivani izolati *Acinetobacter baumannii* uspješno i statistički značajno stvaraju biofilm. Od ukupnih 47 izolata bilo je 42,6 % neproduktora, 34 % slabih, 23.4 % umjerenih te niti jedan jaki produktor (Tablica 2).
- Izolati *A. baumannii* pokazali su statistički značajnu osjetljivost na ispitivane antibiotike. Na imipenem se osjetljivim pokazalo 61,7 % izolata, dok je rezistentnih bilo 38,3 %, na ampicilin sulbaktam 93,6 % osjetljiva, a samo 6,4 % rezistentna izolata te na amikacin 31,9 % osjetljivih i 68,1 % rezistentna. Na ciprofloksacin i gentamicin nije bilo osjetljivih, svih 47 bilo je rezistentno, a nasuprot tomu, na kolistin se svih 47 izolata pokazalo osjetljivima, a 0 rezistentno.
- Pri ispitivanju antimikrobne rezistencije izolata kod antibiotika imipenema, ampicilin sulbaktama i amikacina, pojavio se i određen broj osjetljivih i određen broj rezistentnih izolata, dok su se kod antibiotika kolistina, gentamicina i ciprofloksacina pojavili isključivo osjetljivi ili rezistentni izolati.
- U zasebnoj analizi ispitivanja osjetljivosti izolata na imipenem u odnosu na produkciju biofilma osjetljivih je bilo 27,7 % neproduktora, 23,4 % slabih i 10,6 % umjerenih produktora, rezistentih pak 14,9 % neproduktora, 10,6 % slabih i 12,8 % umjerenih produktora. Osjetljivost ispitivanih izolata na imipenem ipak nije statistički značajna.
- Posebna analiza ispitivanja osjetljivosti izolata na ampicilin sulbaktam pak ukazuje na 40,5 % osjetljivih neproduktora, 53,1 % osjetljivih produktora (zbroj slabih i umjerenih produktora) te samo 2,1 % rezistentnih neprodutkora i 4,3 % rezistentna produktora biofilma. Fisherov egzaktni test statistističke značajnosti navedene rezultate za ampicilin sulbaktam ne nalazi statistički značajnima.
- Zasebna analiza ispitivanja osjetljivosti izolata na amikacin pokazuje 25,5 % osjetljivih neproduktora, 4,3 % slaba produktora i 2.1 % umjerenih te 17 % rezistentnih neproduktora, 29,8 % slabih i 21,3 % umjerenih produktora. Iz pripadajućeg χ^2 testa iščitava se da postoji statistički značajna osjetljivost ispitivanih izolata na amikacin.
- **Podrobnijom analizom navedenih rezultata nalazi se korelacija između proizvodnje biofilma i osjetljivosti, odnosno rezistencije na antibiotike. U skladu s početnom pretpostavkom, izolati sa slabijom produkcijom biofilma pokazali su se osjetljivijima na antibiotike, a oni s većom produkcijom rezistentniji.**

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Ciljevi ovog istraživanja bili su ispitati sposobnost stvaranja biofilma kod kliničkih izolata *Acinetobacter baumannii* u *in vitro* uvjetima, zatim ispitati njihovu antimikrobnu rezistenciju mikrodilucijskom metodom te dokazati povezanost između osjtljivosti izolata *A. baumannii* na antibiotike i njihove sposobnosti stvaranja biofilma.

Materijali i metode: U ovom istraživanju korišteno je 47 kliničkih izolata *A. baumannii* prikupljenih u razdoblju 2007.-2019. i pohranjenih u Zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije. Ispitivane bakterije inokulirane su u 3 ml Luria-Bertani bujona, na 24 sata u termostatu pri 37˚C, nakon čega je presađeno 20 µl na nove LB bujone, a ovim postupkom pripremljena je i suspenzija gustoće $5x10^5$. Suspenzije su nasađene na mikrotitarske pločice s ravnim dnom, a biofilm je očitan nakon spektrofotometrije na čitaču pri 492 nm. Dobiveni rezultati klasificirani su u četirima kategorijama. Posljednji je korak određivanje antimikrobne rezistencije mikrodilucijskom metodom na odabrane antibiotike.

Rezultati: Rezultati pokazuju da ispitivani izolati *Acinetobacter baumannii* uspješno i statistički značajno stvaraju biofilm te da je osjetljivost ispitivanih izolata na antibiotike statistički značajna. Također, rezultati ukazuju i na korelaciju između osjetljivosti na antibiotike i produkcije biofilma pa tako izolati sa slabijom produkcijom biofilma pokazuju veću osjetljivost na antibiotike, dok su oni s većom produkcijom rezistentniji.

Zaključak: Ovakva i srodna istraživanja koja pružaju uvid u korelaciju produkcije biofilma i povećane antimkrobne rezistencije u *in vitro* uvjetima vode pronalasku i razvoju ciljane antimikrobne terapije za sprječavanja nastanka i suzbijanja već nastalog biofilma *in vivo*.

Ključne riječi: *Acinetobacter baumannii*, antimikrobni testovi, biofilm

8. SUMMARY

ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND ABILITY TO FORM BIOFILM IN CLINICAL ISOLATES OF *ACINETOBACTER BAUMANNII*

Objectives: The objectives of this study were to examine the ability of biofilm production in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates under *in vitro* conditions, to investigate their antimicrobial resistance by the dilution method, and to demonstrate a correlation between antibiotic susceptibility of *A. baumannii* isolates and their biofilm production ability.

Material and methods: This study used 47 clinical isolates of *A. baumannii* collected from 2007-2019 and stored at the Public Health Institute of Osijek-Baranja County. Tested bacteria was inoculated into 3 ml of Luria-Bertani broth for 24 hours in a thermostat at 37 ˚C, after which 20 µl was transplanted to new LB broths, and $5x10^5$ density suspension was also prepared by this procedure. The suspensions were mounted on flat bottom microtiter plates, and the biofilm reading was spectrophotometrically on a reader at 492 nm. Obtained results were classified into four categories. The final step was to determine the antimicrobial resistance by the dilution method of the selected antibiotics.

Results: The results show that the tested *Acinetobacter baumannii* isolates successfully and statistically significant produce biofilm and that the susceptibility of the tested isolates to antibiotics is also statistically significant. Furthermore, the results indicate a correlation between antibiotic susceptibility and biofilm production, so isolates with lower biofilm production show higher antibiotic susceptibility, while those with higher production are more resistant.

Conclusion: This and related studies that provide insight into the correlation of biofilm production and increased antimicrobial resistance under *in vitro* conditions lead to the invention and development of targeted antimicrobial therapy for preventing the onset and suppression of biofilm already formed *in vivo*.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, antimicrobial tests, biofilm

9. LITERATURA

1. Tambić Andrašević A. Otpornost bakterija na antibiotike – vodeći problem u 21. Stoljeću. Medicina. 2007;43:7-14.
2. Opal SM, Medeiros AA. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005;253-71.
3. Weber JT, Courvalin P. An Emptying Quiver: Antimicrobial Drugs and Resistance. Emerg Infect Dis. 2005;11:791-3.
4. WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance. WHO: 2001
5. Donlan R M. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerging infectious diseases. 2002;8(9):881-90.
6. Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev. 1996;9:148–65.
7. Brisou J, Prevot AR. [Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under Acromobacter group] Ann Inst Pasteur (Paris) 1954;86:722–8.
8. Kalenić S i sur. Medicinska mikrobiologija. 14. izd. Zagreb. Medicinska naklada. 2013.
9. Dexter, C., Murray, G.L., Paulsen, I.T., Peleg, A.Y. Community-acquired Acinetobacter baumannii: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. Expert. Rev. Anti. Infect. Ther., 2015;13(5):567–73.
10. Lance R. Peterson. Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE Revisited. Clinical Infectious Diseases. 2009;49:992–93.
11. Šeruga Musić, M. Hrenović, J.Goić-Barišić, I. Hunjak, B. Škorić, D. Ivanković, T. Emission of extensively-drug resistant Acinetobacter baumannii from hospital settings to the natural environment. J. Hosp. Infect. 2017.
12. Tambić Andrašević A, Tambić T, Katalinić-Janković V i sur. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2017.g. Zagreb. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske. 2017.
13. Lee EH, Nicolas MH, Kitzis MD, Pialoux G, Collatz E, Gutmann L. Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of Enterobacter cloacae with high level resistance to imipenem. Antimicrob Agents Chemother. 1991;35:1093-8.

14. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect. 2002;8:321-31.
15. De Champs C, Henquell C, Guelon D, Sirot D, Gazuy N, Sirot J. Clinical and bacteriological study of nosocomial infections due to Enterobacter aerogenes resistant to imipenem. J Clin Microbiol. 1993;31:123-7.
16. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;18(3):268-81.
17. Poole K. Overcoming multidrug resistance in gram-negative bacteria. Curr Opin Investig Drugs. 2003;4(2):128-39.
18. Yang H, Liang L, Lin S, Jia S. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of Acinetobacter baumannii. BMC Microbiol. 2010;9:131.
19. Dadachova E, Burns T, Bryan RA, Apostolidis C, Brechbiel MW, Nosanchuk JD, Casadevall A, Pirofski L. Feasibility of radioimmunotherapy of experimental pneumococcal infection. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(5):1624-9.
20. Larson Steven M, Carrasquillo Jorge A., Nai-Kong V. Cheung, Press O. Radioimmunotherapy of human tumours. Nat Rev Cancer. 2015;15(6): 347–60.
21. Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, Kim SA, Lee SK, Lee JC. Outer membrane protein 38 of Acinetobacter baumannii localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. Cell Microbiol. 2005;7(8):1127-38.
22. Gaddy JA, Actis LA. Regulation of Acinetobacter baumannii biofilm formation. Future Microbiol. 2009;4(3):273-8.
23. Jacobs AC, Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S, Sayood K, Iwen PC, Skaar EP, Dunman PM. Inactivation of phospholipase D diminishes Acinetobacter baumannii pathogenesis. Infect Immun. 2010;78(5):1952-62.
24. Škrlin J. Utjecaj biofilma na cijeljenje rane i postupak za identifikaciju biofilma u rani. Acta Med Croatica. 2016;70(1):29-32.
25. Schultz G, Bjarnsholt T, James GA, Leaper DJ, McBain AJ, Malone M, Stoodley P, Swanson T, Tachi M, Wolcott RD. Global Wound Biofilm Expert Panel. Consensus guidelines for the identification and treatment of biofilms in chronic nonhealing wounds. Wound Repair Regen. 2017;25(5):744-57.
26. Goić-Barišić I. Multiplorezistentni Acinetobacter baumannii (MRAB) – deset godina nakon pojave prvih izolata u Hrvatskoj. Infektološki glasnik. 2012;32:2,67–70.

27. Cerqueira GM, Peleg AY. Insights into Acinetobacter baumannii pathogenicity. IUBMB Life. 2011;63:1055–60.
28. Hrenović, Jasna; Prirodno stanište klinički značajnih Acinetobacter baumannii // 9th Croatian Symposium on Antibiotic Resistance / Tambić Andrašević, Arjana (ur.)., Zagreb, 2018. str. 10-10 (pozvano predavanje, recenziran, sažetak, znanstveni)
29. da Silveira F, Nedel WL, Cassol R, Pereira PR, Deutschendorf C, Lisboa T. Acinetobacter etiology respiratory tract infections associated with mechanical ventilation: what impacts on the prognosis? A retrospective cohort study. J Crit Care. 2019;49:124-28.
30. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol . 1966;45:493-6.
31. Bubonja M, Mesarić M, Miše A, Jakovac M, Abram M. Utjecaj različitih čimbenika na rezultate testiranja osjetljivosti bakterija disk difuzijskom metodom. Hrčak. 2008;3-4,44:285-88.
32. Ledina T i sur. Metode za određivanje antimikrobne rezistencije kod mikroorganizama u hrani. Veterinarski žurnal Republike Srpske. 2018;18:207-24.
33. Jorgensen JH, Turnidge JD. Susceptibility test methods: dilution and disc diffusion methods. In: Murray PR, Baron E J, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH (eds). Manual of Clinical Microbiology, 8th Edition. Washington DC: ASM Press. 2003;1119-25.
34. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: 9th informational supplement M2-A9. Wayne, PA: CLSI, 2006.
35. Bronzwaer S, Buchholz U, Courvalin P, Snell J, Cornaglia G, De Neeling A et al; EARSS participants. Comparability of antimicrobial susceptibility test results from 22 European countries and Israel: an external quality assurance exercise of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) in collaboration with the United Kingdom National External Quality Assurance Scheme (UK NEQAS). J Antimicrob Chemother 2002;50:953-64.
36. Zivkovic V, Kurevija T, Harsanji Drenjancevic I, Bogdan M, Tomic Paradzik M, Talapko J, Drenjančević, D. To Biofilm or not to Biofilm? SEEMEDJ 2018;2(1);12-19)
37. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobicaly; Approved Standard-Seventh Edition. CLSI document M7-A7 (ISBN 1-56238-587-9). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road,

Suite 1400,Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.

38. European Committee on Antimirobial Susceptibility Testing. Breakpoint table for interpretation of MICs and zone diameters. Verison 2.0 January 2012.
39. Beganovic M, K.Luther M, E.Daffinee K, L.LaPlante K. Biofilm prevention concentrations (BPC) of minocycline compared to polymyxin B, meropenem, and amikacin against Acinetobacter baumannii. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2019;94:223-6.
40. Bogdan M. (2017). „Učinak subminimalnih inhibitronih koncentracija antibiotika na sposobnost strvaranja biofilma i osjetljivost na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma kliničkih izolata Acinetobacter baumannii u in vitro uvjetima“, Disertacija, Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek, citirano: 26.08.2019.; https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:186831
41. Silveira F, Luis Nedel W, Cassol R, Reis Pereira P, Deutschendorf C, Lisbo T. Acinetobacter etiology respiratory tract infections associated with mechanical ventilation: what impacts on the prognosis? A retrospective cohort study. Journal of Critical Care. 2019;49:124-8.
42. Koyuncu Özyurt Ö, Özhak B, Öğünç D, Yıldız E, Çolak D, Günseren F, Öngüt G. Evaluation of the BD Phoenix100 System and Colistin Broth Disk Elution Method for Antimicrobial Susceptibility Testing of Colistin Against Gram-negative Bacteria. Mikrobiyol Bul. 2019;53(3):254-61.
43. Rodriguez CH, Traglia G, Bastias N, Pandolfo C, Bruni G, Nastro M, Barrios R. Discrepancies in susceptibility testing to colistin in Acinetobacter baumannii: The influence of slow growth and heteroresistance. Int J Antimicrob Agents. 2019;54:111-5.
44. Vu TN, Byun JH, D'Souza R, Pinto NA, Nguyen LP1, Yong D, et al. Adjustment of Modified Carbapenem Inactivation Method Conditions for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Acinetobacter baumannii. Ann Lab Med. 2020;40(1):21-26

10. ŽIVOTOPIS

Valentina Živković

Datum i mjesto rođenja

- 23.10.1995., Osijek

Obrazovanje

- 2002. – 2010. Osnovna škola „Ivan Filipović“, Osijek
- 2010. – 2014. Medicinska škola Osijek, zdravstveno-laboratorijska tehničarka
- 2014. – 2017. Medicinski fakultet Osijek, Preddiplomski studij medicinsko – laboratorijske dijagnostike
- 2017. – 2019. Medicinski fakultet Osijek, Diplomski studij medicinsko – laboratorijske dijagnostike

Radno iskustvo

- 2018. – 2019. Stručno osposobljavanje u KBC Osijek u zvanju Prvostupnik medicinsko – laboratorijske dijagnostike

Kongresi i znanstveno djelovanje

- 1st author of manuscript „To biofilm or not to biofilm?“ published in Southerneastern European Medical Journal (SEEMEDJ), [S.l.], v. 2, n. 1, p. 12-19, nov. 2018. ISSN 2459-9484.
- Member of the Organising Committee and Scientiffic participant as coauthor of Abstract „Investigation of biofilm production capacity of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates“ at 1st Osijek Student Congress OSCON, February 7-8, 2019, Osijek, Croatia
- Scientiffic participant at International student congress „Practical Knowledge for Students Split“ as coauthor of Abstract „Examination of biofilm formation ability of *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Luria Bertani and Mueller Hinton broths“, April 4-7, 2019, Split, Croatia