UČINAK SUBMINIMALNIH INHIBITORNIH KONCENTRACIJA ANTIBIOTIKA NA SPOSOBNOST STVARANJA BIOFILMA I OSJETLJIVOST NA BAKTERICIDNU AKTIVNOST LJUDSKOG SERUMA KLINIČKIH IZOLATA ACINETOBACTER BAUMANNII U IN VITRO UVJETIMA

Bogdan, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:186831

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Maja Bogdan

UČINAK SUBMINIMALNIH INHIBITORNIH KONCENTRACIJA ANTIBIOTIKA NA SPOSOBNOST STVARANJA BIOFILMA I OSJETLJIVOST NA BAKTERICIDNU AKTIVNOST LJUDSKOG SERUMA KLINIČKIH IZOLATA *ACINETOBACTER BAUMANNII* U *IN VITRO* UVJETIMA

Doktorska disertacija

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Maja Bogdan

UČINAK SUBMINIMALNIH INHIBITORNIH KONCENTRACIJA ANTIBIOTIKA NA SPOSOBNOST STVARANJA BIOFILMA I OSJETLJIVOST NA BAKTERICIDNU AKTIVNOST LJUDSKOG SERUMA KLINIČKIH IZOLATA *ACINETOBACTER BAUMANNII* U *IN VITRO* UVJETIMA

Doktorska disertacija

Osijek, 2017.

Mentor: doc.dr.sc. Domagoj Drenjančević, dr.med
spec. med. mikrobiologije i parazitologije

Rad ima 103 lista

Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Domagoju Drenjančeviću, dr. med. spec. med. mikrobiologije i parazitologije za pomoć u osmišljavanja rada, podršku i vodstvo.

Zahvaljujem se poslodavcu, Zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, za financiranje doktorskog studija.

Zahvaljujem se voditeljici Službe, Dubravki Vuković za neizmjernu podršku i pomoć u realizaciji istraživanja.

Kolegici Vlasti Zujić Atalić velika hvala za upornost, pomoć i podršku.

Zahvaljujem se djelatnicima Službe za mikrobiologiju za nesebičnu pomoć pruženu prigodom izrade ovog rada.

Posebna zahvala mojoj obitelji, djeci Luciji i Bruni te suprugu Zvonimiru za strpljenje, razumijevanje, ljubav i podršku.

Ovaj rad posvećujem mojoj majci.

SADRŽAJ **V**

POPIS KRATICA **VII**

1. UVOD **1**

1.1. Opće karakteristike roda *Acinetobacter* spp. **1**

1.2. Epidemiologija **3**

1.3. Klinički značaj **5**

1.3.1. Infekcije respiratornog trakta 6

1.3.2. Bakterijemija 7

1.3.3. Infekcije kože i potkožja 8

1.3.4. Meningitis 9

1.3.5. Infekcije urinarnog trakta 9

1.3.6. Ostale infekcije 9

1.4. Molekularne osnove virulencije *A. baumannii* **10**

1.4.1. Pili, fimbrije, filamentozni izdanci 10

1.4.2. Proteini vanjske membrane 12

1.4.3. Površinski polisaharidi 13

1.4.4. Mjehurići vanjske membrane 14

1.4.5. Enzimi 14

1.4.6. Unos željeza 15

1.4.7. Detekcija kvoruma bakterijskih stanica 16

1.5. Uloga biofilma u patogenezi *A. baumannii* infekcije i regulacija njegova nastanka **17**

1.6. Komplement i rezistencija na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma **20**

1.7. Subminimalne inhibitorne koncentracije antibiotika **23**

2. HIPOTEZA **27**

3. CILJ ISTRAŽIVANJA **28**

4. MATERIJAL I METODE **29**

4.1. Ispitivnje stvaranja biofilma **29**

4.2. Ispitivanje osjetljivosti sojeva na baktericidnu aktivnost seruma **30**

4.3. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija antibiotika **31**

4.4. Izlaganje sojeva *A. baumannii* sub-MIK-u ispitivanih antibiotika **31**

4.5. Ispitivanje učinka sub-MIK-a antibiotikana sposobnost stvaranja

biofilma sojeva *A. baumannii* **32**

4.6. Ispitivanje učinka sub-MIK-a antibiotika na osjetljivost sojeva *A. baumannii* na baktericidnu aktivnost seruma (serumska rezistencija) **32**

4.7. Genotipizacija ispitivanih sojeva *A. baumannii* **33**

4.7.1. Priprema bakterijskog soja 33

4.7.2. Uklapanje stanica 34

4.7.3. Cijepanje kromosomalne DNA 34

4.7.4. Elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE) 34

4.8. Obrada podataka, statistička analiza **35**

5. REZULTATI **36**

6. RASPRAVA **66**

7. ZAKLJUČCI **77**

8. SAŽETAK **78**

9. SUMMARY **79**

10. LITERATURA **81**

11. ŽIVOTOPIS **102**

12. PRILOZI **103**

PRILOG 1. Obrazloženje istraživanja za potencijalnog dobrovoljnog davatelja krvi

PRILOG 2. Izjava o suglasnosti

POPIS KRATICA

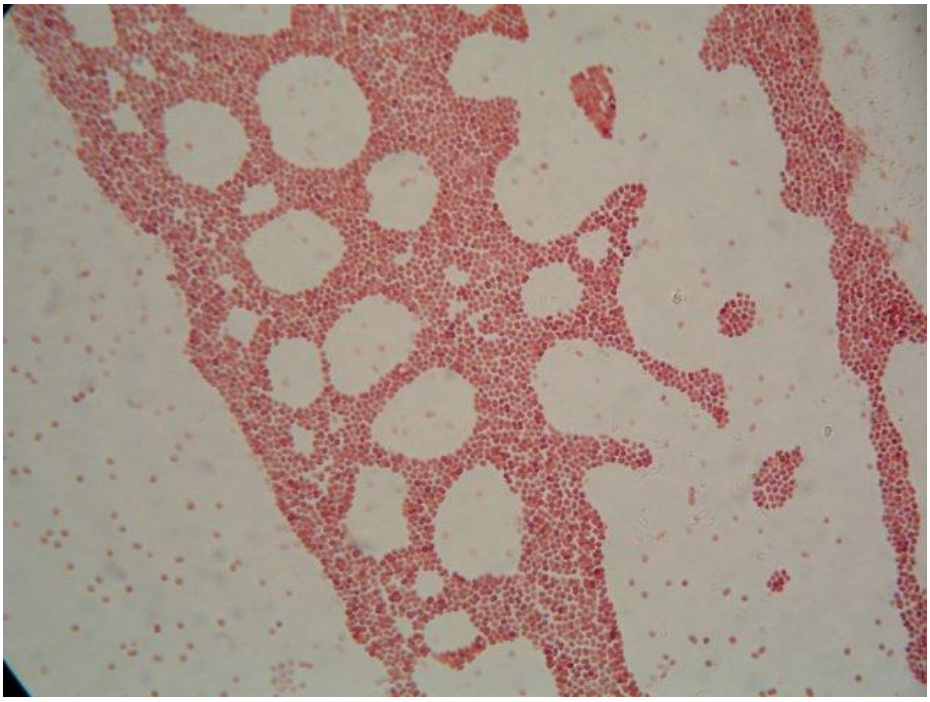
AbOmpA	*A. baumannii* protein vanjske membrane A
AMZH	Akademija medicinskih znanosti Hrvatske
ATCC soj	kontrolni soj poznate antimikrobne osjetljivosti (eng. American type culture collection)
Bap	protein vezan uz razvoj biofilma (eng. biofilm associated protein; Bap)
B-	soj ne stvara biofilm
B+	soj stvara biofilm
ECDC	Europski centar za kontrolu i prevenciju bolesti (eng. European Centre for Disease prevention and Control; ECDC)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
ETA	endotrahealni aspirat
EU I-III	Europski klon *A. baumannii* I-III (eng. European clone I-III)
IL	Internacionalna linija klonova *A. baumannii* (eng. International lineage)
JIL	jedinica intenzivnog liječenja
LB	Luria Bertani hranjivi bujon
LOS	lipooligosaharid
LPS	lipopolisaharid
MAC	terminalni litički kompleks (eng. membrane attack complex; MAC)
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija antibiotika
MRSA	meticilin rezistentan *Staphylococcus aureus*
MRAB	multiploezistentni *Acinetobacter baumannii*
OMP	protein vanjske membrane (eng. outer membrane protein; OMP)
OMV	mjehurić vanjske membrane (eng. outer membrane vesicles; OMV)
PFGE	elektroforeza u pulzirajućem polju (eng. pulsed field gel electrophoresis; PFGE)
PNAG	poli-β-(1,6)-*N*-acetilglukozamin
SR	soj otporan na baktericidnu aktivnost seruma
SS	soj osjetljiv na baktericidnu aktivnost seruma
SSTI	infekcija kože i potkožja (eng. skin and soft-tissue infection; SSTI)
sub-MIK	subminimalna inhibitorna koncentracija antibiotika
TAA	trimerni autotransportni adhezini (eng. trimeric autotransporter adhesins; TAA)

TLR	vrsta receptora (eng. Toll-like receptors)
VAP	pneumonija vezana uz mehaničku ventilaciju (eng. ventilation associated pneumonia)
VRE	vankomicin rezistentan *Enterococcus faecium*

1. UVOD

1.1. Opće karakteristike roda *Acinetobacter* spp.

Kada je početkom prošlog stoljeća, točnije 1911. godine, nizozemski mikrobiolog Beijernick izolirao i opisao mikroorganizam koji sada poznajemo kao rod *Acinetobacter*, nije bio ni svjestan njegovog budućeg značaja (1). Od tada su članovi roda prošli kompleksni niz klasifikacijskih izmjena i bili poznati pod najmanje 15 različitih generičkih imena (npr. *Bacterium anitratum, Herella vaginicola, Myma polymorpha, Achromobacter, Alcaligenes, Micrococcus calcoaceticus,* B5W, *Moraxella glucidolityca* i *Moraxella lwoffi*) (2). Prema klasifikaciji, rod *Acinetobacter* nalazi se u koljenu *Proteobacteria*, redu *Pseudomonadales*, porodici *Moraxellaceae* zajedno s rodom *Moraxella* i *Psychrobacter* (3, 4). *Acinetobacer* spp. su striktno aerobni gram-negativni kokobacili širine 1-1,5 μm i duljine 1,5-2,5 μm (slika1.1).



Slika1.1. Mikromorfologija *Acinetobacter* spp. bojanjem po Gramu

Uzgojno nisu zahtjevni i pri optimalnoj temperaturi od 33 do 35°C rastu na uobičajenim hranjivim podlogama, gdje stvaraju sivkaste do sivobijele, glatke, ponekad sluzave kolonije promjera 1,5 do 3 mm, nalik na kolonije roda *Enterobacteriaceae* (slika1.2.). Nepokretni su, što se može zaključiti iz samog naziva roda (grč. ακινετοζ – nepokretan), oksidaza negativni, katalaza pozitivni, indol negativni, nefermentativni kokobacili od kojih većina ne može reducirati nitrate u nitrite (3, 5). Kao izvor ugljika mogu koristiti cijeli niz organskih tvari,

iako samo nekoliko vrsta može oksidirati glukozu (6). Na temelju biokemijskih karakeristika (oksidacije glukoze i hemolize na krvnom agaru), članovi roda se mogu svrstati u tri glavne grupe: *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* kompleks (oksidira glukozu, nema hemolizu), *Acinetobacter lwoffii* (glukoza negativan, bez hemolize) i *Acinetobacter haemolyticus* (ima hemolizu) (3, 4).

Slika1.2. Izgled kolonija *Acinetobacter* spp. na krvnom agaru

Godine 1986. rod *Acinetobacter* je reklasificiran i danas ga čini 25 imenovanih vrsta i još 9 neimenovanih genomskih vrsta, definiranih na temelju DNA-DNA hibridizacije (7). Iz cijelog se roda, kao onaj od najvećeg kliničkog značaja, izdvaja upravo *A. baumannii-calcoaceticus* kompleks. Čine ga, na antibiotike osjetljivi, članovi vrste *A. calcoaceticus,* oni se primarno nalaze u okolišu, zemlji i otpadnim vodama, ali introdukcijom u bolničku sredinu mogu postati značajni patogeni, zatim *Acinetobacter baumannii* te *Acinetobacter pittii* (genomska vrsta 3) i *Acinetobacter nosocomialis* (genomska vrsta 13 TU), koji su rijetko od kliničkog značaja, a koje je uobičajenim metodama identifikacije ponekad teško razdvojiti od vrste *A. baumannii*, stoga su u novije vrijeme poznati kao *A. baumannii* grupa (2, 8, 9). U bolničkom okruženju *Acinetobacter baumannii* danas predstavlja klinički najznačajniji član roda i ovog kompleksa.

1.2. Epidemiologija

Vrste iz roda *Acinetobacter* široko su rasprostranjene u prirodi. Mogu se naći u tlu, biljkama, prehrambenim proizvodima, slatkoj i otpadnim vodama (3, 4). Na suhim neživim površinama mogu preživjeti od 3 dana do čak 5 mjeseci, u širokom rasponu pH, temperatura i vlage (10-12). *Acinetobacter radioresistens* iznimno je otporan na isušivanje i prosječno preživljava 157 dana pri vlazi od 31%, *A. baumannii* dulje od 30 dana, a *A. lwoffii* do 21 dan (13, 14). Na staklenim površinama izloženim isušivanju prosječno vrijeme preživljenja *A. baumannii* je 27 dana, a na okvirima bolničkih kreveta može preživjeti i do 9 dana (15-17). U suhom okolišu i na vršcima prstiju može preživjeti do 60 minuta, a do 4 sata na površini izrađenoj od plastike (polivinilklorid), gume, keramike ili čelika (18-20). Nema razlike u duljini preživljenja epidemijskih i neepidemijskih sojeva *A. baumannii* (17).

Acinetobacter spp. može činiti dio fiziološke flore kože ljudi, posebice u vlažnim područjima kao što su pazuh i prepone (21). Kolonizacija kože dokazana je u 44% (85/192) uzoraka uzetih dobrovoljcima (pri čemu je u 61% nađen *A. lwoffii*), a izoliran je i s kože u 20% bolničkog osoblja (22, 23). Povremeno je prisutan u usnoj šupljini i dišnom sustavu zdravih odraslih osoba, ali rijetko u izvanbolničkoj populaciji (3). Tijekom nekoliko epidemija zabilježen je različiti stupanj kolonizacije kože, ždrijela, probavnog i dišnog sustava bolesnika (3). Prirodni rezervoar uzročnika infekcije izvan bolničkog okružja još nije pronađen, iako je prisutstvo *A. baumannii* dokazano u parazitskoj uši beskućnika (24, 25). Nakon uzimanja samo jednog zaraženog obroka krvi, eksperimentalno je uspješno izazvana bakterijemija u uši. Također je evidentirano i izlučivanje živih bakterija fecesom uši, ali bez daljnje transmisije bilo tijekom idućeg hranjenja ili transovarijalno, što upravo dovodi u pitanje mogućnost prijenosa uzročnika infekcije putem vektora (26). Iz uzoraka tla, otpadnih voda, biljaka i hrane izoliran je cijeli niz vrsta iz ovog roda, pa čak i one odgovorne za nastanak infekcija u ljudi (27, 28). Slijedom navedenog, danas se smatra da je upravo kolonizacija bolesnika vodeći izvor kontaminacije ruku bolničkog osoblja prigodom svakodnevnog kontakta s oboljelim i da pridonosi nastanku i širenju epidemija.

Tijekom kasnih 70.-tih, kao posljedica ekscesivne uporabe antibiotika širokog spektra, acinetobakter se javlja kao značajan nozokomijalni patogen u bolnicama širom svijeta (2). U desetogodišnjem razdoblju praćenja u jednoj američkoj bolnici (1971.-1981. godine) zabilježena je 1,4% incidencija nozokomijalnih infekcija vezanih uz acinetobakter (29). U Španjolskoj je 1992. godine incidencija infekcija vezanih uz *A. baumannii* bila u rasponu od

3,7% do 8,2%, a za cijelu Europu 1995. godine iznosila je 9% (24, 30, 31). Europskim programom praćenja infekcija u JIL-u tijekom 2009. godine *Acinetobacter* spp. involviran je čak u 21,8% bolničkih pneumonija, 17,1% bakterijemija i 11,9% infekcija urinarnog trakta (32). Prema podatcima Europskog centra za kontrolu i prevenciju bolesti za 2011.-2012. godinu ukupna prevalencija svih bolničkih infekcija za cijelu Europu iznosila je 6% (raspon zemalja 2,3-10,8%), uz *A. baumannii* na 11 mjestu prema učestalosti izazivanja bolničkih infekcija (3,6%), pri čemu je zabrinjavajući podatak 80% rezistencija na karbapeneme. U istom je periodu, u 11 bolnica u Hrvatskoj koje su sudjelovale u praćenju, zabilježena prevalencija bolničkih infekcija od 5,7% s *Acinetobacter* spp. na 9 mjestu liste uzročnika (33).

Usporedbom različitih epidemijskih sojeva *A. baumannii,* izoliranih u bolnicama širom Europe, utvrdilo se postojanje tri uspješna klona nazvana „Europski klonovi I-III“ (EU I-III) (34, 35). Obzirom da su ti klonovi potom identificirani diljem svijeta, preimenovani su u „Internacionalne klonove I-III“, a pored njih opisani su i drugi klonovi odnosno internacionalne linije klonova (36-38). Upravo je pojava ovih uspješnih klonova odgovorna za porast globalne incidencije infekcija uzrokovanih ovom bakterijskom vrstom (36). Tako je 90.-tih godina prošlog stoljeća dominirao EU klon I, a u zadnje vrijemeu epidemije je češće involviran EU klon II, uz činjenicu da su mnogi pripadnici klona rezistentni na karbapeneme (39, 40). Većina do sada objavljenih radova potvrđuje pripadnost multiplih izolata iz jedne bolnice istom klonu tijekom višegodišnjeg razdoblja praćenja (9, 38).

Ni Hrvatska nije ostala pošteđena trenda porasta broja hospitalnih infekcija kao ni rezistencije na *A. baumannii*. Prvi hrvatski klon zabilježen je u KBC Split tijekom 2002.-2009. godine i genotipizacijom u sklopu međunarodnog projekta smješten je u EU I klon (38). Tijekom posljednjih godina došlo je do promjene u klonskoj pripadnosti izolata, a radi širenja novog klona (EU II) i do značajnog porasta rezistencije na karbapeneme unutar najvećih bolnica u Hrvatskoj, koja prema podatcima Odbora za praćenje rezistencije Akademije medicinskih znanosti Hrvatske (AMZH) unazad nekoliko godina seže i do 90% (41-44).

Upravo je neracionalna upotreba širokospektralnih antibiotika odgovorna za selekcijski pritisak i neizbježan razvoj rezistencije na antimikrobne lijekove u raznih bakterijskih rodova i vrsta. Pripadnici ESKAPE grupe u posljednje vrijeme alarmantno dominiraju diljem svijeta. Čine ju: **E** vankomicin rezistentni *Enterococcus faecium* (VRE), **S** *Staphylococcus aureus* rezistentan na meticilin (MRSA), **K** *Klebsiella pneumoniae* rezistentna na karbapeneme, **A** multiplorezistentni *Acinetobacter baumannii,* **P** multiplorezistentni *Pseudomonas aeruginosa*

i **E** *Enterobacter* spp. rezistentan na karbapeneme. Ova je skupina mikroorganizama od iznimnog značaja, ne samo jer su uzročnici većinskog dijela bolničkih infekcija, već upravo oni predstavljaju paradigmu patogeneze, transmisije i rezistencije mikroorganizama (45).

1.3. Klinički značaj

Prije desetak godina u literaturi se po prvi put multiplorezistentne kliničke izolate *A. baumannii* povezalo s nazivom gram-negativna MRSA, što bi možda najbolje moglo opisati njegov klinički značaj (24, 46). Taj je sinonim dobio jer dio bakterija u tekućem mediju ima kokoidnu formu, naročito tijekom rane faze rasta, a pri bojanju po Gramu zadržava kristal-violet i slabije se odbojava alkoholom pa prigodom mikroskopiranja, poglavito na rubnim dijelovima preparata, morfološki može podsjećati na nakupine stafilokoka. Kao i infekcije koje uzrokuje MRSA, infekcije vezane uz *A. baumannii* učestalije su u JIL-u, a prethodi im kolonizacija bolesnika koji tamo leže (46, 47). MRSA uglavnom kolonizira nosnice i kožu hospitaliziranih bolesnika te se prenosi kontaktom s osobe na osobu, za razliku od gram-negativnih nefermentativnih bakterija koji se, osim kontaktom prenose i upotrebom respiratora i ovlaživača zraka, te koloniziraju probavni i respiratorni sustav, kožu i urogenitalne dijelove tijela (46, 48). Kao što je već ranije navedeno, ta su kolonizirana mjesta vjerojatna ishodišta kasnijih infekcija.

A. baumannii je prvenstveno oportunistički patogen, najčešći predstavnik roda involviran u infekcije vezane uz zdravstvenu skrb (49). Nastale nozokomijalne infekcije mogu zahvatiti bilo koje područje ljudskog organizma. Predominantna mjesta su se tijekom vremena mijenjala, ovisno o poboljšanju mjera kontrole bolničkih infekcija kao i općim globalnim napretkom invazivnih postupaka u medicini. Do 70.-tih godina prošlog stoljeća, infekcije uzrokovane bakterijama iz roda acinetobakter primarno su bile poslijekirurške uroinfekcije na kirurškim ili drugim odjelima, ali se napretkom tehnika resuscitacije promijenila epidemiologija infekcija tako da je danas najvažnija uloga acinetobaktera u izazivanju nozokomijalnih pneumonija vezanih uz mehaničku ventilaciju (eng. ventilation-associated pneumonia; VAP) (24). U kliničkoj su praksi nastale oportunističke infekcije, uglavnom blage i srednje teške, usko vezane uz kirurške postupke i uporabu umjetnih materijala, ali mogu imati i smrtni ishod (24). Pojava i diseminacija *A. baumannii* predstavlja veliko opterećenje za zdravstvenu ustanovu u kojoj se pojavi, nastale infekcije je teško liječiti, a eradikacija patogena i sprječavanje njegovog daljnjeg širenja često zahtijeva izričite mjere kontaktne izolacije bolesnika, ponekad čak i zatvaranje cijelih bolničkih odjela (5, 50). Točnu

frekvenciju nozokomijalnih infekcija uzrokovanih rodom *Acinetobacter* nije lako odrediti jer je prigodom izolacije ovog mikroorganizma iz uzorka teško razlučiti kada se radi o kolonizaciji, a kada zaista o infekciji (51). *A. baumannii* pokazuje iznimu sposobnost stjecanja rezistencije na antimikrobne lijekove, intrahospitalno kao i širenje između različitih ustanova te nacionalnu i internacionalnu sposobnost klonalne diseminacije što ga čini najvažnijim hospitalnim patogenom iz ovog bakterijskog roda (24, 50).

Opisan je niz predisponirajućih rizičnih čimbenika za nastanak infekcije vezane uz *A. baumannii* koji uključuju: opsežnu traumu, posebice opeklinu ili kirurški zahvat, prethodnu antimikrobnu terapiju, produljeni boravak u bolnici ili JIL-u i upotrebu različitih umjetnih materijala ili mehaničke ventilacije (5, 24). Rezervoar za nastanak bolničke infekcije vezane uz *A. baumanni* još uvijek nije jasan i može varirati između zdravstvenih ustanova (2). U bolničkom okružju postoji niz mogućih izvora infekcije iz kojih je izoliran *A. baumannii*, kao što su: ruke bolničkog osoblja, medicinska oprema (ventilatori, oksigenatori, bronhoskopi, manšete za mjerenje tlaka, ovlaživači zraka), okviri kreveta, slivnici, rukavice, koševi za otpad, plastični zasloni, tipkovnice računala, mobiteli, bolnička posteljina, madraci i jastuci, sapun, krema za ruke i dispenzori za losion, kao i sami bolesnici (2). Smatra se da je upravo transmisija rukama bolničkog osoblja najvažniji činitelj u kolonizaciji bolesnika, a sami inficirani bolesnici primarni rezervoar uzročnika infekcije (2, 24).

1.3.1. Infekcije respiratornog trakta

Pneumonije akvirirane u bolnici najvažniji su klinički sindrom vezan uz *A. baumannii*, koji posebice zahvaća bolesnike na mehaničkoj ventilaciji u jedinicama intenzivog liječenja (16). Veća učestalost pojave infekcija uzrokovanih acinetobakterom, dijelom je posljedica porasta invazivnih dijagnostičkih i terapijskih postupaka, posebice u JIL-u. Acinetobakter se pojavljuje kao česta komplikacija mehaničke ventilacije, neovisno o napretku brige za mehanički ventilirane bolesnike i rutinskom praćenju postupaka dezinfekcije pribora za umjetnu ventilaciju (52). Uz povećani rizik od kolonizacije, odnosno razvoja pneumonije veže se cijeli niz čimbenika pri čemu u JIL-u dominiraju starija dob bolesnika, kronična plućna bolest, ranija antimikrobna terapija, uporaba invazivnih tehnika liječenja poput endotrahealne intubacije i gastrične sonde (3). Uočeno je da se 3-5% ukupnih bolničkih pneumonija vezuje uz *Acinetobacter* spp., a taj postotak seže od 25% do 45% kod bolesnika koji su mehanički ventilirani. Mortalitet nozokomijalih pneumonija vezanih uz acinetobakter iznosi 30-75%, a najviši je upravo u bolesnika na mehaničkoj ventilaciji (52). Iako je

statistika nemilosrdna i govori u prilog visoke stope mortaliteta (>75%) u pneumonija uzrokovanih nonfermentorima (*P. aeruginosa* i *A. baumannii*), u odnosu na druge gram-negativne bacile (55%), teško je utvrditi koje bi bilo moguće preživljenje istih bolesnika da nije došlo do razvoja VAP-a (53). U pomno dizajniranoj kohortnoj studiji bolesnike i njihove kontrole su birali i usklađivali prema težini osnovne bolesti, dobi, spolu, indikaciji za mehaničku ventilaciju i duljini trajanja izloženosti riziku i tom je prigodom utvrđen pripisivi mortalitet od 27,1%. U bolesnika s miješanom infekcijom, uzrokovanom vrstama roda *Pseudomonas* i *Acinetobacter* mortalitet je iznosio 71.4%, a pripisivi mortalitet je bio 42,8% (54). Grupa španjolskih autora, u istraživanju provedenom u JIL-u, detektirala je 53% atributivni mortalitet u bolesnika s *A. baumannii* infekcijom, pri čemu je trajanje hospitalizacije produženo za 13 dana u odnosu na kontrolnu skupinu (55). Sve gore navedeno potvrđuje ozbiljnost i težinu nozokomijalne pneumonije uzrokovane acinetobakterom.

1.3.2. Bakterijemija

Infekcije krvnožilnog sustava su rjeđe, ali su opasne po život, a bakterijemija je jedna od infekcija s najvećim mortalitetom u bolnicama. Smatra se da je incidencija sepsi uzrokovanih acinetobakterom 10 puta manja od onih uslijed *S. aureus* infekcije, a ukupna prevalencija *A. baumannii* bakterijemija u inficiranih bolesnika manja od 10% (24, 56, 57). Bakterijemije zauzimaju drugo mjesto učestalosti infekcija vezanih uz *A. baumannii*, iza pneumonija, a prognoza ovisi o osnovnoj bolesti i stanju oboljelog, uz septički šok koji se može razviti u 20-30% bolesnika (58, 59). Bakterijemija može biti mono ili polimikrobna. Rizični su čimbenici za bakterijemiju, kao i predominantni izvor mikroorganizma: pneumonije, trauma, kirurški postupci, prisutnost katetera ili intravenskih linija, hemodijaliza u bolesnika i opekline (60-62). Zatajenje disanja pri prijemu i imunosupresija trostruko povećavaju rizik od bakterijemije. Maligne bolesti, trauma i opekline najčešći su predisponirajući faktori, a bakterijemija se uglavnom javlja krajem drugog tjedna hospitalizacije (3). Prigodom izolacije acinetobaktera iz uzorka krvi teško je reći radi li se o infekciji ili kontaminaciji s kože, a najčešći izolirani predstavnik roda, je upravo *A. baumannii* (63). Najveću skupinu oboljelih čine odrasli imunokompromitirani bolesnici, u kojih je najčešći izvor infekcije respiratorni trakt. Izvor bakterijemije u respiratornom traktu povezuje se uz veći mortalitet u odnosu na drugo ishodište bakterijemije (npr. intravaskularne katetere). Grupa autora s Tajvana je, u istraživanju provedenom na 146 bolesnika, uz smrtni ishod oboljelih povezala raniju potrebu za mehaničkom ventilacijom, istovremenu prisutnost više

komorbiditeta, odnosno rizičnih čimbenika za kolonizaciju i infekciju (stariju dob, imunosupresiju, nedavni operativni zahvat i razvoj komplikacija poput septičkog šoka, akutnog zatajenja bubrega i disanja) kao i neadekvatnu antimikrobnu terapiju. Obzirom na visok morbiditet i mortalitet oboljelih, preporuča se rano prepoznavanje osoba s povećanim rizikom za nastanak infekcije (64, 65). Osim imunokompromitiranih odraslih osoba, u zadnje se vrijeme u literaturi opisuju i bakterijemije u nedonoščadi i djece u kojih su bolničke infekcije vezane uz *A. baumannii* bile podcijenjene (66).

1.3.3. Infekcije kože i potkožja

Kao što je već ranije navedeno, *A. baumannii* vrlo često i brzo kolonizira kožu hospitaliziranih bolesnika. Obzirom na to, vrlo je teško razlikovati kolonizaciju od infekcije postoperativnih rana, opeklina ili oštećenja kože nastalih uslijed traume. Infekcije mogu biti mono ili polimikrobne, pri čemu je važno kritično pristupiti nalazima identificiranih uzročnika izoliranih iz površinskih obrisaka rana, upravo radi već ranije navedene česte višestruke kolonizacije raznim bakterijskim vrstama. Opisana je pojava celulitisa oko mjesta ulaska intravenskog katetera, nekroza mekog tkiva, ali i nekrotični fascitis kod kombinirane infekcije sa *Streptococcus pyogenes* (60, 67). Učestalost kolonizacija opeklina slična je onoj kod *P. aeruginosa* (68). Kolonizaciju, kao što je već ranije rečeno, učestalo prati nastanak bakterijemije krajem drugog tjedna bolesti.

U novijoj je medicinskoj literaturi opisan razvoj infekcija uzrokovanih multiplorezistentnim *A. baumannii*, nakon ozljeda u velikim prirodnim katastrofama (npr. potres u Marmari na sjeveru Turske i veliki vodeni val (tsunami) u jugistočnoj Aziji) (69, 70). Učestalija kolonizacija rana na ekstremitetima ozlijeđenih, praćena bakterijemijom, zapažena je još u Vijetnamskom ratu (71). Brojne infekcije rana uzrokovane *A. baumannii* javile su se u vojnika koji su se borili u Iraku, Kuvajtu, Afganistanu i Ukrajini, a zabilježene su i u vojnika na našem području 90.-tih godina prošlog stoljeća (72-77). Prvenstveno se smatralo da su te infekcije posljedica kontakta s kontaminiranom zemljom u ratnim zonama, ali obzirom na nove spoznaje o epidemiologiji vrste, postalo je jasno da je glavni izvor infekcija bila kontaminacija bolnica na terenu kao i drugih zdravstvenih ustanova odgovornih za zbrinjavanje vojnika (78). U bolničkom okružju, različiti mikroorganizmi, uključivo i *A. baumannii*, mogu izazvati nastanak infekcije kože i mekog tkiva (eng. skin and soft tissue infection; SSTI), što je bez prisutstva bakterijemije ili izolacije uzročnika kultivacijom uzorka tkiva, vrlo teško dokazati (79). Smatra se da je upravo sposobnost stvaranja biofilma ove

bakterijske vrste odgovorna za dug opstanak, kolonizaciju/infekciju i nastanak kroničnih rana u bolesnika.

1.3.4. Meningitis

Meningitis uzrokovan acinetobakterom vrlo je rijetka manifestacija kolonizacije i infekcije ovim uzročnikom. Predominantni oblik je sekundarni meningitis, nastao kao posljedica direktnog unošenja mikroorganizma u SŽS nakon neurokirurškog zahvata, mijelografije ili ventrikulografije, transnazalne aspiracije kraniofaringeoma ili lumbalne punkcije (80). Opisano je svega nekoliko slučajeva primarnog nastanka meningitisa nakon traume (81). Rizični čimbenici uključuju prisutnost kontinuirane drenaže likvora (veze između ventrikula i okoliša), ventrikulostomije i cerebrospinalne fistule, a rizik je povećan uz priststvo ventrikulskog katetera u trajanju duljem od 5 dana (80).

1.3.5. Infekcije urinarnog trakta

Čimbenici rizika za razvoj ove infekcije ne razlikuju se od onih za nastanak VAP-a ili bakterijemije (60-62). Urinarni kateter, starija životna dob i muški spol (vjerojatno radi učestalije uporabe trajnih urinarnih katetera) opisani su kao dodatni rizični čimbenici nastanka kolonizacije, a potom i infekcije. Incidencija bolničkih urinarnih infekcija izuzetno je varijabilna i u rasponu je od 2-61% (3). U ranijim su izvješćima infekcije urinarnog trakta (napose u JIL-u) bile na vodećem mjestu, ali su, vjerojatno zahvaljujući i boljem zbrinjavanju tj. njezi kateteriziranih bolesnika, sada na vodećem mjestu bolničke pneumonije (82).

1.3.6. Ostale infekcije

Opisano je svega nekoliko slučajeva infektivnog endokarditisa uzrokovanog bakterijama iz roda acinetobakter, opisanih kao posljedica kirurškog zahvata na otvorenom srcu i dentalne manipulacije (83). Klinički se on ne razlikuje od endokarditisa uzrokovanog drugim patogenom. Peritonitis se može javiti u bolesnika na peritonealnoj dijalizi, pri čemu su tehničke pogreške i, vjerojatno, diabetes mellitus, glavni rizični čimbenici (84, 85). Kao komplikacija perkutane transhepatalne kolangiografije i perkutane bilijarne drenaže opisan je razvoj kolangitisa. Drugi rijetki opisani slučajevi uključuju tiflitis nakon autologne transplantacije koštane srži, osteomijelitis i infekciju ekstremiteta nakon ozljede, endoftalmitis, infekcije oka nakon traume, keratoplastike nakon penetracije rožnice, kao i nošenje leća (4, 86, 87).

1.4. Molekularne osnove virulencije *A. baumannii*

Iako je *A. baumannii* poznat po tome što uzrokuje infekcije u imunokompromitiranom domaćinu, vrlo malo se zna o načinu na koji mu to uspijeva. U taj je uspjeh, ove bakterijske vrste globalnih razmjera, uključen cijeli niz raznih molekularnih čimbenika koji u konačnici vrsti omogućuju pokretljivost, adheziju, zaštitu odnosno izbjegavanje komponenti imunološkog sustava domaćina, nastanak biofilma, rezistenciju na antibiotike i preživljenje u nepovoljnim uvjetima akvizicijom stranog genetskog materijala. Prema današnjim spoznajama, molekularni činitelji nužni za nastanak bolesti uključuju Csu pile i protein vezan uz stvaranje biofilma (eng. biofilm associated protein; Bap) odgovorne za nastanak biofilma, poli-β-(1,6)-*N*-acetilglukozamin (PNAG) nužan za potpuno sazrijevanje biofilma, acinetobakter trimerni autotransporter (eng. *Acinetobacter* trimeric autotransporter; AtaA), protein A vanjske membrane (eng. outer membrane protein A; OmpA) koji ima ulogu prigodom vezanja bakterije za stanicu domaćina i apoptozu stanice, lipopolisaharide uključene u imunološki odgovor domaćina, fosfolipazu D odgovornu za rezistenciju na ljudski serum, K1 kapsularni polisaharid koji je značajan zaštitnik prigodom nastanka infekcije u animalnom modelu, sustav za O-glikozilaciju, sekreciju serinske proteaze i unos željeza posredovan acinetobaktinom koji je odgovoran za bakterijsku perzistenciju, oštećenje stanica i ubijanje stanica domaćina (88).

1.4.1. Pili, fimbrije i filamentozni izdanci

Iako *A. baumannii* nema flagela koje bi mu omogućile kretanje, brzo se širi po površini. Trzajući pokreti (eng. twitching) odgovorni za to pokretanje već su ranije opisani u *A. calcoaceticus* i u nekih drugih gama-proteobakterija bez bičeva (89). Pokretanje vjerojatno nastaje uslijed uvlačenja/izvlačenja tip IV pila, a detektirani su i signalni transdukcijski sustavi koji se smatraju odgovornima za njihovu kontrolu (8, 90). Ovaj tip pokretljivosti vrlo je značajan jer je gubitkom funkcionalnog *pilT* gena uočena 54% redukcija pokretljivosti ispitivanih *A. baumannii* sojeva (91). Tip IV pili (eng. type IV pili; TFP) poliproteinski su izdanci na površini većine gram-negativnih bakterija. Obzirom na dinamičku prirodu, odnosno brzu mogućnost njihova sklapanja i rasklapanja, osim u trzajuću pokretljivost uključeni su i u transformaciju (horizontalni prijenos genetskog materijala), kao i adheziju bakterijske stanice na žive i nežive površine (88).

Adhezija je možda najvažniji korak u patogenezi nastanka same infekcije. U nju je uključen cijeli niz strukturnih tvorbi, kao i drugih površinskih molekula prisutnih na samoj bakterijskoj stanici. Oni omogućuju najprije reverzibilno, a potom ireverzibilno vezanje na ciljnu površinu, nužno za invaziju ili daljnji nastak biofilma, notorne tvorevine danas prepoznate kao odgovorne za cijeli niz fenotipskih karakteristika patogenih bakterijskih vrsta. Glavne činitelje adhezije predstavljaju *csu* pili, ranije opisani u ATCC soju 19606 (92). *CsuC* i *csuE* kodiraju gene za sastavljanje pila (93). *CsuE* gen je odgovoran za adheziju bakterijskih stanica u polistirenskim mikrotitar pločicama, stvaranje i produkciju pila te stvaranje biofilma (92). Karakterizacijom gena je dokazano da je *csu* operon sastavljen od 6 gena (*csuA/BABCDE*) koji kodiraju sustav odgovoran za nastanak pila (92). Analizom bakterijskih stanica elektronskim mikroskopom u bujonu i na suhoj površini pokrovnog stakla uočena je njihova međusobna povezanost ekstracelularnim nastavcima, najvjerojatnije pilima ili fimbrijama, isključivo u sojeva *A. baumannii* koji stvaraju biofilm (94). Ta je produkcija pila uočena i u *A. baumannii* ATCC 19606 soju prigodom adhezije i stvaranja biofilma na neživim površinama (92). Inaktivacija *csuE* gena rezultira prestankom stvaranja pila, kao i izostankom adhezije na površinu i stvaranjem biofilma (92). Slijedom navedenog upravo bi se pili mogli smatrati važnim, odnosno neizostavim čimbenikom bakterijske adhezije na čvrste površine i napose medicinske uređaje (95). Ispitivanja su pokazala da je, za razliku od neživih površina, kod stvaranja biofilma na stanicama sisavaca *csu* operon manje važan (96).

Osim pila, na površini bakterijske stanice mogu se naći i tzv „adhezivna nano-vlakna“, tj. filamentozni izdanci promjera nekoliko nanometara koji omogućuju vezanje bakterijskih stanica za biomolekule domaćina, kao i za nežive površine (97). Brojne specifične interakcije između patogenih bakterija i stanica odnosno tkiva domaćina posredovano je proteinskim filamentima (nanovlaknima) bakterija. Dijelimo ih u dvije glavne skupine, fimbrije građene od stotina podjedinica i nefimbrijske filamente (vlakna), koja imaju jednostavnu monomernu ili oligomernu strukturu (97). Trimerni autotransportni adhezini (eng. trimeric autotransporter adhesins; TAA) pripadaju u grupu nefimbrijskih autotransportnih adhezina koji u zadnje vrijeme privlače pažnju kao činitelji virulencije gram-negativnih bakterija. Oni posreduju u adheziji bakterijske stanice na stanicu domaćina ili proteine ekstracelularnog matriksa (npr. kolagen, fibronektin i laminin), invaziji stanice domaćina, rezistenciji na serum, autoaglutinaciji i stvaranju biofilma (98, 99). U početku su nespecifične interakcije između bakterijskih nanovlakana i neživih površina slabe i reverzibilne i bakteriji omogućuju puzanje, klizanje i trzajuće kretanje na površini solidnog materijala. Potom slijedi ireverzibilno vezanje

na površinu putem višestruke interakcije staničnih biomolekula, što uključuje i filamente. Tijekom svog rasta, bakterije na površini zatim stvaraju mikrokolonije, izlučuju egzopolimer, što rezultira nastankom biofilma i u konačnici čvrste adhezije. U vrsti *Acinetobacter* spp. Tol 5 detektirano je stvaranje AtaA (acinetobakter autotrasportnih adhezina) odgovornih za autoaglutinaciju, važan korak u nastanku biofilma na živim i neživim površinama. AtaA je primarni medijator visoke adhezivnosti i autoaglutinacijske prirode bakterija (97).

1.4.2. **Proteini vanjske membrane**

Proteini vanjske membrane (eng. outer membrane proteins; OMP) gram-negativnih bakterija povezuju se uz rezistenciju na antimikrobne lijekove, adaptaciju i patogenezu u stanici domaćina. Neki proteini iz grupe OmpA opisani su i u acinetobakteru (AbOmpA) i predstavljaju većinu proteina vanjske membrane. OmpA proteini na površini bakterijske stanice mogu se vezati za fibronektin stanice domaćina i time omogućiti njegovu adheziju (100). OmpA protein je također važan za produkciju debelog sloja biofilma na polistirenu (16, 101). Ključni činitelj virulencije u procesu adhezije bakterija na stanice respiratornog trakta sisavaca je OmpA protein koji, ako je smješten u mitohondriju, uzrokuje oštećenje, aktivaciju kaspaza i, na kraju, apoptozu stanice. Osim za mitohondrije OmpA se veže i u jezgri stanice gdje pokazuje enzimatsku aktivnost poput DNA-aze i tako oštećuje samu kromosomalnu DNA (16).

AbOmpA (*A. baumannii* OmpA) najobilniji je površinski protein, involviran u adheziju i invaziju epitelnih stanica, inducira apoptozu epitelnih stanica u ranim stadijima *A. baumannii* infekcije (102). Indukcijom apoptoze epitelnih stanica, AbOmpA na taj način bakterijama omogućuje prodor kroz oštećenu sluznicu (103). Osim apoptoze stanica, AbOmpA je involviran i u rezistenciju na komplement i stvaranje biofilma (102, 104). Otpornost na aktivnost ljudskog seruma uključuje inhibiciju cijepanja i vezanja C3 komponente komplementa domaćina na površinu bakterije, što inhibira prepoznavanje od strane fagocitnih stanica i u konačnici rezultira preživljenjem bakterije, tj. rezistencijom na baktericidnu aktivnost seruma (104). Obzirom da je za aktivaciju komplementa odgovoran alternativni put vezanja OMP-a bakterija i faktora H (regulatorne komponente komplementa), ona izostaje jer ga bakterije vežu na svoju površinu i time omogućuju perzistenciju i diseminaciju. Ako je na površini bakterijske stanice, AbOmpA se smatra glavnim regulatornim proteinom za aktivaciju komplementa, a prigodom sekrecije inducira apoptozu epitelnih stanica (103, 105)

Protein vezan uz razvoj biofilma (eng. biofilm associated protein; Bap) član je grupe proteina visoke molekularne težine, oni su prisutni na površini bakterijske stanicei stanici omogućuju stvaranje biofilma. Homologan je Bap proteinu u stafilokoka, no za razliku od njega nije uključen u primarnu adheziju na površinu, već je odgovoran za održavanje arhitekture „zrelog“ biofilma (16, 106).

1.4.3. Površinski polisaharidi

Površinski polisaharidi imaju važnu ulogu u patogenezi infekcija. Za mnoge su gram negativne bakterije kapsula (K antigen) i površinski polisaharidi, koji čine O antigen, glavni imunogeni i među najvažnijim su glavnim činiteljima virulencije samih stanica. Razlika u strukturi K i O antigena može značajno varirati između bakterijskih vrsta unutar jednog roda. Oba su antigena građena od oligosaharidnih ponavljajućih molekula različite dužine. Osnovna razlika između K i O antigena je u tome što se kapsularni polisaharid izlučuje direktno iz bakterijske stanice na površinu, a O antigen predstavlja najistureniji dio lipopolisaharida koji se sintetizira u periplazmatskom prostoru prije izlaska iz stanice. Ligaza je odgovorna za vezanje O antigena za lipid A lipooligosaharida (LOS) i, ako ono izostane, LOS kao takav izlazi na površinu bakterijske stanice (107).

Kapsula ima protektivnu ulogu i bakterijskoj stanici omogućuje rezistenciju na baktericidnu aktivnost komplementa (8). Naše znanje o ulozi kapsule u patogenezi nastanka infekcije vezane uz acinetobakter je manjkavo. Ulogu K1 polisaharidne kapsule *A. baumannii* soja AB307-0294, ispitala je 2010. godine skupina autora. Opisali su njezinu važnost za optimalan rast bakterija u humanom ascitesu i u modelu infekcije tkiva štakora kao i ulogu u preživljenju baktericidnog učinka ljudskog seruma. Za sintezu kapsule neophodan je *ptk* gen koji kodira protein tirozin kinazu (PTK) i *epsA* gen odgovoran za sintezu proteina vanjske membrane (EpsA), a to su proteini nužni za preživljavanje bakterije u serumu (108).

Egzopolisaharid je važan sastavni dio *A. baumannii* biofilma, a poli-β-(1,6)-*N*-acetilglukozamin (PNAG) je njegov glavni polisaharid (16, 109). Odgovoran je za nastanak biofilma u dinamičkim, ali ne i u statičkim uvjetima (109). Kod drugih je bakterijskih vrsta PNAG uključen u staničnu adheziju kao i u zaštitu od prirođene imunosti domaćina, dok u *A. baumannii* ovu funkciju još treba potvrditi (8, 110).

Lipopolisaharid (LPS) ima sinergistički učinak s kapsularnim egzopolisaharidom, s kojim je uključen u rezistenciju na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma (24). Induktor je

ekspresije upalnih citokina u ljudskim monocitima putem Toll-like receptora 2 i 4 (TLR-2, TLR-4). Čisti LPS aktivira samo odgovor putem TLR-4, dok fragmenti cijele mrtve stanice stimuliraju oba odgovora. Smatra se da slaba sposobnost indukcije upalnog odgovora *A. baumannii* u ljudskim monocitima značajno pridonosi patogenezi nastanka infekcije (1). Dobra adhezija na ljudske epitelne stanice izaziva slab imunološki odgovor, što bi moglo objasniti dugo preživljenje i sposobnost perzistencije ovog mikroorganizma (95). Svi virulenti sojevi *A. baumannii* imaju glatki tip LPS (eng. smooth LPS; LPSs) (111).

1.4.4. **Mjehurići (vezikuli) vanjske membrane**

Mjehurići vanjske membrane (eng. outer membrane vesicles; OMV) kuglasti su mjehurići promjera 20 do 200 nm, građeni od lipopolisaharida, OMP, masti DNA i RNA (112). Oni sudjeluju u detekciji kvoruma, transportu činitelja virulencije, inhibiciji sazrijevanja fagosoma unutar makrofaga, stvaranju biofilma i prijenosu gena (113, 114). Činitelji virulencije se pomoću mjehurića dostavljaju izravno u stanicu domaćina. Tako dostavljen AbOmpA, smješten unutar mjehurića, može djelovati citotoksično i izazvati apoptozu (8). Proteomskom analizom sadržaja *A. baumannii* ATCC 19696 i kliničkog izolata DU202, unutar OMVa, detektirane su serinske i cink proteaze, fosfolipaze, bakterioferitin, katalaza i receptor za ferikrom, kao i nekoliko proteinskih sekrecijskih signala, lipoproteina i LPS (112, 115). Osim toga, OMV mogu prenositi plazmide s genima za rezistenciju na karapeneme i tako širiti karbapenemsku rezistenciju bakterijama u okružju. Unutar mjehurića genetski je materijal zaštićen od nukleaza i uz konjugaciju, transformaciju i transdukciju možda predstavlja novu vrstu diseminacije gena rezistencije (114).

1.4.5. Enzimi

Fosfolipaze C i D smatraju se dodatnim činiteljima virulencije u *A. baumannii*. Fosfolipaza D odgovorna je za rezistenciju na ljudski serum, a ima i ulogu u sustavnoj diseminaciji *Corynebacterim pseudotuberculosis* unutar animalnog modela (116). U mutanti *A. baumannii* za gen fosfolipazu D, uočena je smanjena aktivnost fosfolipaze D, kao i smanjena invazija stanica i otpornost na serum, što je za posljedicu imalo nižu bakterijemiju i kolonizaciju visceralnih organa animalnog modela (117). Fosfolipaza C je važna u procesu oštećenja tkiva jer pojačava toksični učinak na epitelne stanice (118). Serinske proteaze su uključene u rezistenciju na serum, a u novije se vrijeme povezuju i uz supresiju stvaranja biofilma (119).

Penicilin vežući proteini (PBP) su enzimi koji kataliziraju sintezu peptidoglikana, sastavljenog od međusobno povezanih lanaca N-acetil glukozamina i N-acetilmuraminske kiseline. Odgovorni su za morfologiju i diobu same stanice, kao i otpornost prema raznim fizičkim činiteljima. Klasificiraju se u dvije grupe. Jednu čine PBP visoke molekulske mase, koji omogućuju polimerizaciju peptidoglikana i njegovu inserciju u staničnu stijenku, a drugu čine PBP niske molekulske mase koji pridonose razdvajanju stanica i remodeliranju peptidoglikana. Niskomolekulski PBP 7/8 je hidrolaza/endopeptidaza koja hidrolizira transpepdidaciju D-alanil-ε-mezo-2,6-diaminopimelinske veze. PBP-8 je proteinom OmpT, posredovan produkt razgradnje PBP-7 kojeg nemaju gram pozitivne bakterije. PBP-7 i PBP-8, *in vitro* stabiliziraju i pojačavaju učinak litičke transglikozilaze. Točna uloga PBP7/8 u gram negativnih bakterija još uvijek nije jasna. Nije esencijalna za normalnu elongaciju, stanica ali je implicirana kao akcesorni enzim koji modulira staničnu morfologiju i odvajanje stanica kćeri (120, 121). U *A. baumannii* AB307-0394 mutanti za PBP7/8 je uočeno direktno, odnosno indirektno sudjelovanje ovih proteina u rezistenciji na serum, vjerojatno kao posljedica remodeliranja peptidoglikana bakterijske stanice, koja se morfološki vidi kao nastanak kokobacilarnih formi (122).

O-glikozilacija proteina, odgovornih za virulenciju bakterija, potrebna je različitim patogenim vrstama na sluznicama domaćina. Nastali glikoproteini imaju ulogu u adheziji, pokretljivosti, unosu DNA, stabilnosti proteina, izbjegavanju imunog odgovora, kao i kolonizaciji životinja. U većini bakterijskih vrsta koje imaju glikoproteine, glikozilacija je usmjerena na adhezine, flageline ili piline (123).

1.4.6. Unos željeza

Željezo je važan element koji bakteriji u domaćinu nije uvijek dostupan u dovoljnoj količini. Uglavnom se nalazi vezan za proteine (hem, laktoferin i feritin). Bakterije mogu preživjeti u uvjetima smanjene koncentracije željeza jer imaju razvijen cijeli niz strategija za povećanje unosa željeza u stanicu, uključivo stvaranje kelatora (siderofora) koje se otpuštaju u okoliš, unos egzogenih kelatora poput hema i heterolognih siderofora i unosa samih iona željeza (8).

Siderofore su molekule niske molekulske mase i visokog afiniteta za željezo, klasificirane prema svojoj kemijskoj strukturi (124). Acinetobakter ima sposobnost stvaranja siderofora u uvjetima smanjene koncentracije željeza (125). Prva siderofora, acinetobaktin,

opisana je u *A. baumannii* ATCC 19606 i omogućuje mu 30% veći unos željezom zasićenog transferina i 15% veći unos zasićenog laktoferina, prigodom korištenja željeza vezanog u ovim proteinima. Acinetobaktinom posredovan unos željeza značajan je mehanizam u patogenezi nastanka *A. baumannii* infekcije jer omogućuje preživljenje u nepovoljnim uvjetima (126, 127). Nastali kompleks željezo-siderofora premješta se u bakterijsku stanicu uz pomoć receptora na vanjskoj membrani, periplazmatskih proteina i proteina vezanih uz unutarnju membranu kao što je IROMP (eng. iron-regulated outer membrane protein system) (127). Ti su receptori u gram-negativnih bakterija smješteni na vanjskoj membrani, a unos siderofora je posredovan gradijentom protona na unutarnjoj membrani, koji nastaje djelovanjem Ton B proteinskog kompleksa u periplazmatskom prostoru (126). Unos željeza je moguć i direktno pomoću Feo sustava sastavljenog od FeoA proteina u citosolu, FeoB permeaze i Feo C represora za transkripciju. Transkripcija svih gena, odgovorna za unos željeza, ovisi o regulaciji Fur (eng. ferric uptake regulator) represorskog proteina koji djeluje kao represor transkripcije gena uključenih u sustav siderofora/globina (127).

1.4.7. **Detekcija kvoruma bakterijskih stanica**

Bakterije su razradile cijeli niz kemijskih signala koje izlučuju iz stanice da bi uspostavile međustaničnu komunikaciju i adaptaciju na okoliš. Upravo ta sposobnost utvrđivanja gustoće bakterijske populacije u okolišu prije ekspresije nekog fenotipa naziva se detekcija kvoruma (eng. quorum detection, quorum sensing; QD, QS) (128). Detekcija kvoruma je važan i široko rasprostranjen regulatorni mehanizam u gram-negativnih bakterija. Odvija se uz pomoć acil-homoserin-laktonskog sustava (eng. acyl-homoserine lactone-like signal molecules; AHL) koji nastaje djelovanjem Lux porodice AHL sintetaza (129). Učinak acil homoserinskog i ne acil homoserinskog sustava očituje se u gustoći stanica tijekom faza rasta. Detekcija kvoruma je središnji mehanizam autoindukcije različitih činitelja virulencije u oportunističkih bakterija, poput bakterija roda *Acinetobacter*. U acinetobakteru je detektirano četiri različita tipa signalnih molekula koje mogu aktivirati n-acilhomoserin-laktonske biosenzore prigodom stvaranja biofilma. Najjače su izraženi u stacionarnoj fazi rasta (24, 130). AHL posredovana detekcija kvoruma povezana je sa stvaranjem činitelja virulencije, pokretljivošću, prijenosom plazmida, stvaranjem antibiotika, produkcijom bioemulsana, bioluminiscencijom i stvaranjem biofilma (128). Komunikacija među bakterijama odgovorna je za sazrijevanje biofilma.

Definirani su tzv. „otočići patogenosti“ (eng. putative alien islands; PAI) koji sadrže većinu faktora virulencije i rezistencije na lijekove. Mnogi od njih akvirirani su iz okoliša, a imaju važnu ulogu u patogenosti *A. baumannii*. Neki od ovih otoka sadrže gene koji kodiraju otpornost na teške metale, unos željeza i metabolizam, gene za stvaranje fimbrija, autoinduktora i sintezu staničnog omotača, a vezane uz patogenezu *A. baumannii* infekcije. Drugi vjerojatno sadrže pokretne elemente čija je uloga još nerazjašnjena (118).

1.5. Uloga biofilma u patogenezi *A. baumannii* infekcije i regulacija njegova nastanka

Biofilm je sesilna mikrobna zajednica karakterizirana stanicama koje su ireverzibilno vezane uz podlogu ili jedna uz drugu, uklopljene u ekstracelularni polimerni matriks koji su same proizvele (131). Nakon adhezije, esencijalno primarnog koraka u kolonizaciji, stvaraju se bakterijske mikrokolonije, pri čemu bakterije počinju stvarati egzopolisaharid, što za posljedicu ima nastanak viskoko strukturirane sesilne mikrobne zajednice, tj. nastanak biofilma (131). Početak i razvoj biofilma nije samo slučajan proces adhezije bakterijskih stanica na površinu nego visokoregulirani niz molekularnih događaja koji te stanice drži u uskoj kontroli (102). Biofilm se može razviti na živim stanicama i neživim površinama kao i na dodirnim granicama tvari različitih agregatnih stanja (tekućina, zrak, čvrsta tvar). Za *A. baumannii* je u nekoliko različitih studija dokazana sposobnost stvaranja biofilma na neživim površinama (staklenim i plastičnim), kao i živim stanicama (epitelne stanice i filamenti gljiva), na granici zraka i tekućine, kao i čvrstih tvari i tekućine, uključivo i na nekim medicinski značajnim površinama (92, 102, 132-137). Sposobnost stvaranja biofilma je multifaktorijalna i različita, ovisno o površini s kojom su bakterijske stanice u dodiru (102).

Organizmi koji uzrokuju većinu infekcija vezanih uz umjetne materijale, kao i druge kronične infekcije, rastu unutar biofilma i kao takve ih je teško eradicirati, obzirom na otpornost biofilma na brojne antimikrobne agense i produkte imunološkog sustava (131, 138). Smatra se da je sposobnost stvaranja biofilma važan čimbenik u kolonizaciji bolesnika kao i tijekom odgovora bakterije na stanični i okolišni stres (93). Biofilm ima važnu ulogu u preživljenju bakterije u koloniziranom/inficiranom bolesniku, kao i u bolničkom okružju, s izravnom implikacijom u nastanak rekurentnih bolničkih infekcija (50). Bakterije unutar biofilma postaju otpornije na antimikrobne stresore, antibiotike ili čišćenje, u odnosu na svoj planktonski oblik, i time biofilm kao struktura predstavlja važan činitelj virulencije (94, 102, 139, 140). Unutar biofilma bakterije su zaštićene od isušivanja. Zabilježeno je maksimalno

vrijeme preživljenja od 36 dana za dva ispitana soja koji stvaraju biofilm u odnosu na petnaestodnevno preživljenje sojeva koji biofilm ne stvaraju. U njih je elektronskim mikroskopom uočena značajna redukcija broja poraslih bakterijskih kolonija nakon 48-satne inkubacije u sojeva koji ne stvaraju biofilm, što izravno korelira s dehidracijom stanica i promjenom njihove morfologije (94). Pomoću transmisijskog i scanning elektronskog mikroskopa, u tekućini i na suhoj površini, u sojevima koji stvaraju biofilm, jasno je dokazano stvaranje velikih agregata, prisutstvo staničnih izdanaka i debelog sloja egzopolisaharida bez promjene morfologije stanica. Za razliku od njih, u sojevima koji ne stvaraju biofilm, u tekućini je agregiralo svega nekoliko stanica, a na suhoj površini uočena je morfološka promjena stanica koje su izgledale dehidrirano (94). Tijekom stvaranja biofilma u polistirenskim mikrotitar pločicama, značajan utjecaj ima medij koji se koristi za ispitivanje, kao i temperatura (93).

Čini se da multiplorezistentni *A. baumannii* izolati iz kliničkih uzoraka stvaraju značajnu količinu biofilma (133). Unutar biofilma povećana je mogućnost horizontalnog prijenosa gena između bakterijskih stanica i, na taj način, širenja rezistencije na antimikrobne lijekove (138). Slijedom toga može nastati selekcija sojeva sposobnih za stvaranje biofilma i obrnuto, *A. baumannii* može steći višestruku rezistenciju na antibiotike unutar biofilma. U svakom slučaju, visoka sposobnost kolonizacije, zajedno s rezistencijom na antibiotike pridonosi, preživljenju mikroorganizma i daljnoj diseminaciji u bolničkom okružju (134). Mogućnost stvaranja biofilma može biti dobra strategija za poboljšanje sposobnosti preživljavanja mikroorganizma u stresnim uvjetima, kao prigodom invazije domaćina ili tijekom liječenja antibioticima. To je posljedica visokog stupnja rezistencije sojeva koji stvaraju biofilm na komponente imunološkog sustava ljudi i brojne tipove antimikrobnih lijekova (134). Unutar dobro opisanih *A. baumannii* sojeva uočena je razlika u stvaranju biofilma, pri čemu je nezamjetna u stvaranju biofilma između epidemijskih i neepidemijskih sojeva, ali je ona izražena unutar europskih klonova, tj. EU klon II stvara veću količinu biofilma od klona I (95). To govori u prilog klonske odlike stvaranja biofilma, a ne svojstva karakterističnog za cijelu bakterijsku vrstu.

Postoji nekoliko činitelja koji mogu utjecati na stvaranje biofilma. Najčešće su to dostupnost hranjivih tvari, prisustvo bakterijskih struktura (pila, bičeva) i drugih komponenti površine bakterijske stanice (adhezini, proteini vanjske membrane), detekcija kvoruma bakterijskih stanica i sekrecija makromolekula (polisaharidi, nukleinske kiseline) (102). U

adheziji *A. baumannii* ATCC 19606 na staklo i polistiren nužni su CsuA/BABCDE posredovani pili. Oni imaju ulogu u inicijalnom koraku stvaranja biofilma jer bakterijskim stanicama omogućuju prijanjanje na nežive površine i iniciraju stvaranje mikro kolonija koje prethode nastanku zrelog biofilma (92). Za *csu* operon sastavljen od 6 gena (*csuA/BABCDE*), postoji dvokomponentni regulatorni sustav, nazvan *bfmRS* (141). Dokazano je da inaktivacijom *bfmR* regulatora, ali ne i *bfmS* kinaze, dolazi do potpunog gubitka ekspresije *csu* gena, prestanka stvaranja pila i time gubitka adhezivnih sposobnosti, kao i stvaranja biofilma na plastičnim površinama (141). Nasuprot tome, inaktivacija *bfmS* kinaze nema utjecaja na regulaciju gena i učinak na stvaranje biofilma je samo djelomičan (141). Ovo opažanje sugerira da BfmR može koristiti drugu senzornu kinazu za svoju aktivaciju (16). Prekid *csuC* i *csuE* otvorenog okvira čitanja rezultira prestankom stanične adhezije i stvaranja biofilma, uslijed stvaranja stanica bez pila (92). Nasuprot tome, čini se da u adheziji bakterije na epitelne stanice bronha nisu uključeni pili i csu sekrecijski sustav (16, 96). Sposobnost stvaranja biofilma na plastičnim površinama i mogućnost adhezije na humane stanice nije uvijek praćena prisustvom površinskih struktura nalik na pile i dugačkih staničnih izdanaka (95). Slijedom toga, čini se da je sposobnost stvarnja biofilma i adhezije na ljudske stanice više odlika samog ispitivanog soja, a ne cijele vrste unutar roda (95). Izolati *A. baumannii* iz respiratornog trakta stvaraju biofilm na površini pokrovnog stakalca, sastavljen od amorfnog materijala sličnog egzopolisaharidu (132).

Ispitivanjem uloge Bap proteina, uočeno je da je njegov gubitak doveo do redukcije volumena i debljine sloja nastalog biofilmana staklenim površinama. Na temelju toga se pretpostavlja da je ovaj protein uključen u međustaničnu interakciju koja podržava sazrijevanje biofilma (106).

Metalni kationi također imaju važnu ulogu u nastanku biofilma. Najvažniji su ioni željeza, oni imaju ulogu u ekspresiji gena same bakterije, a neki od njih su centralni činitelji virulencije patogenih bakterija. Unos željeza reguliran je putem Fur represorskog proteina, koji djeluje kao represor transkripcije gena uključenih u sustav siderofora/globina. U većine bakterija željezo je važan okolišni signal za nastanak čimbenika adhezije i stvaranje biofilma (142, 143).

Detekcija kvoruma bakterijskih stanica središnji je mehanizam autoindukcije različitih činitelja virulencije. U acinetobakteru je detektirano četiri različita tipa signalnih molekula koje su sposobne aktivirati n-acilhomoserin-laktonske biosenzore prigodom stvaranja

biofilma. Najjače su izraženi u stacionarnoj fazi rasta (24, 130). Uobičajeni AHL sustav posredovan je dvama proteinima LuxI i LuxR koji čine kompleks koji se veže na sekvenciju odgovornu za promociju ekspresije ciljnih gena za detekciju kvoruma, tzv. *lux*-box. AbaI i AbaR u *A. baumannii* komunicira s AHL i kontrolira ekspresiju gena (144). *AbaI* autoinducirajući gen odgovoran je za sintezu 3-hidroksi-C_{12}-HSL molekula za detekciju kvoruma bakterija prigodom nastanka *A. baumanni* biofilma na neživim površinama (16, 144). Mutacije *abaI* gena dovele su do redukcije stvaranja biofilma (144).

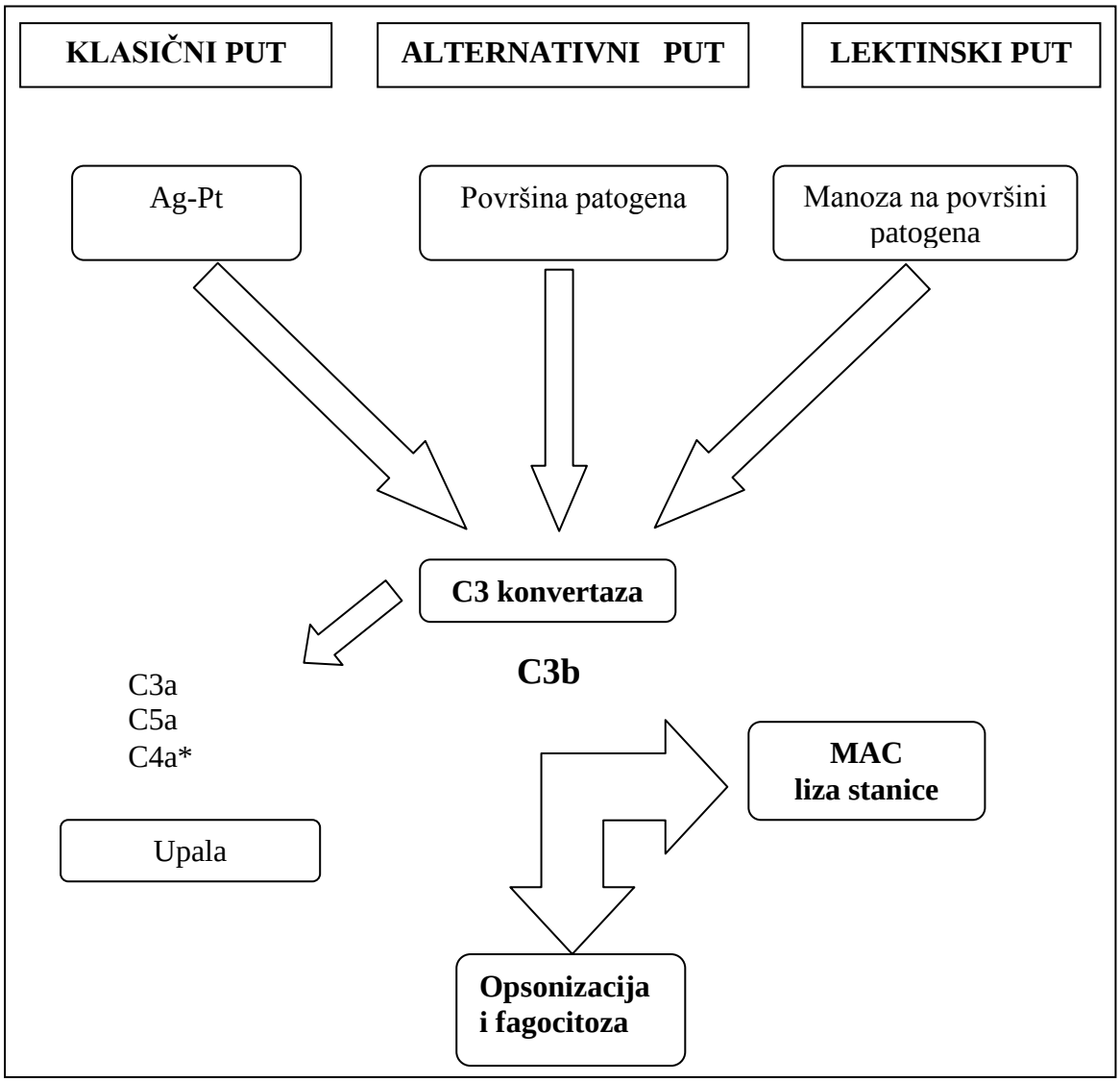
Uz pile, Bap protein, detekcije kvoruma bakterija i ione željeza, prigodom proučavanja produkcije biofilma na epitelnim stanicama uočena je pozitivna korelacija ekspresije *blaPER-1* β-laktamaze i stupnja adhezije i stvaranja biofilma na tim stanicama. To bi, pored mogućnosti izmjene genetskog materijala, objašnjavalo sposobnost dugog zadržavanja i diseminacije čak i u prisutstvu antibiotika širokog spektra (134).

Usprkos svemu, klinički značaj odnosno primjenjivost rezultata *in vitro* istraživanja biofilma na neživim površinama, još uvijek nije jasan. U teoriji se očekuje korelacija laboratorijskih istraživanja sa kliničkim rezultatima. Istraživanje provedeno na velikom broju potpuno različitih sojeva pokazalo je postojanje velike razlike u stvaranju količine biofilma, epidemiologiji i antimikrobnoj osjetljivosti ispitivanih sojeva (16, 95). Danas se smatra da je stvaranje biofilma važna karika u patogenezi nastanka infekcije vezane uz *A. baumannii*.

1.6. Komplement i rezistencija *A. baumannii* na baktericidnu aktivnost seruma

Prigodom bakterijemije i sepse, komplement je centralni čimbenik prirođenog imunološkog odgovora na prodor bakterija u krv, pri čemu većina gram-negativnih bakterija bude direktno eliminirana. Sustav komplementa obuhvaća cijeli niz termolabilnih plazmatskih proteina koji međusobno reagiraju i djeluju kao posrednici humoralne imunosti. Može se aktivirati na tri različita načina ovisno o molekulama odgovornim za inicijaciju. Svi putovi aktivacije konvergiraju u jednu zajedničku točku, a to je nastanak C3 konvertaze, s istim nizom efektorskih mehanizama. Klasični put komplementa aktivira se prigodom vezanja C1 komponekte komplementa i Fc fragmenta IgG i IgM protutijela, a aktivacija lektinskog slijedi nakon vezanja lektina za manozne polisaharide u stijenci bakterijske stanice. Alterntivni put aktivacije komplementa nastaje vezanjem spontano aktivirane komponente komplementa uz površinu patogena. Aktivacijom komplementa dolazi do točno programiranog slijeda aktivacije komponenti komplementa i smrti bakterijske stanice uslijed stvaranja terminalnog

litičkog kompleksa (eng. membrane attack complex; MAC) i C3b opsoninom olakšane fagocitoze (104).



*C4a komponenta komplementa stvara se na početku aktivacije klasničnog puta, a ne djelovanjem C3 konvertaze

Slika 1.3. Putovi aktivacije komplementa

Komplement ima važnu ulogu u baktericidnoj aktivnosti ljudskog seruma, a alternativni put aktivacije komplementa je ključan pri uklanjanju dospjelih bakterijskih stanica iz krvi oboljelih (24, 104). Usprkos tome, mnogo patogenih bakterija uspijeva odoljeti tim komplementom posredovanim mehanizmima eliminacije, upravo inhibicijom njegove aktivacije (104). Sposobnost izbjegavanja baktericidnog učinka seruma zajedničko je svojstvo invazivnih bakterijskih vrsta (145). Patogene bakterije mogu sustav komplementa regulirati na više mjesta pomoću više različitih mehanizama (146). Najrašireniji mehanizam je akvizicija regulacijskih molekula komplementa na površini bakterijske stanice (147). Vezanje C4b komponente komplementa za površinu inhibira klasični put aktivacije, a vezani činitelj H

(eng. factor H; FH) i protein-1 sličan FH (eng. factor H-like protein 1; FHL-1) inhibiraju alternativni put aktivacije komplementa (104). Sposobnost vezanja FH faktora opisana je već ranije u *Streptoccocus pneumoniae.*

Većina kliničkih izolata *A. baumannii* pokazuje intrinzičnu rezistenciju na litičku aktivnost ljudskog seruma (148). Smatra se da su za tu rezistenciju odgovorni polisaharidna kapsula i lipopolisaharid O. Polisaharidna kapsula komplementu onemogućuje pristup staničnom zidu bakterije, time sprječava aktivaciju alternativnog puta komplementate tako sprječava lizu bakterijske stanice (24, 125). Stvaranje egzopolisaharida glavni je činitelj virulencije, štiti bakteriju od obrambenih činitelja domaćina, a smatra se da ga oko 30 % sojeva stvara i da su ti sojevi patogeniji od neproducirajućih, posebice u polimikrobnim infekcijama s drugim virulentnijim mikroorganizmima (24, 149). Prethodnom obradom stanica *A. baumannii* bizmut-subsalicilatom pokušala se potvrditi uloga kapsularnog polisaharida, ali je učinak izostao, tako da se dovodi u pitanje zaštitna uloga kapsule, kao i njezina uloga u rezistenciji na serum (148). Osim toga, prema jednoj grupi autora, serum rezistentni sojevi imaju sposobnost akviriranja (vezanja) faktora H, centralnog solubilnog činitelja u regulaciji aktivacije alternativnog puta komplementa na vanjske membranske proteine (AbOmpA) i time uspješno izbjegavaju učinak komplementa, koji se očituje lizom ili opsoninima olakšanom fagocitozom same bakterijske stanice (104). Druga grupa autora smatra da serum rezistentni *A. baumannii* sojevi putove aktivacije komplementa reguliraju u prvim koracima njegove aktivacije, bilo izbjegavanjem odlaganja i spontane aktivacije C3 proteinske komponente ili inhibicijom same C3 konvertaze odgovorne za daljnju aktivaciju kaskadnog niza, s konačnim ishodom u lizi ili opsonizaciji bakterijske stanice (150). Pored toga što je rezistentan na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma, *A. baumannii* izaziva slab upalni odgovor u humanim epitelnim stanicama, neovisno o dobroj adheziji bakterijskih stanica na njih (95). Sličan je slab imuni odgovor uočen i kod kliničkih izolata *Haemophilus influenzae* (151). Obzirom na uočenu slabiju produkciju upalnih citokina (IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNFα) u respiratornim stanicama i makrofagima prema *A. baumannii* u odnosu na *A. jejunii*, upravo to bi moglo ukazivati na mogućnost/sposobost perzistencije u respiratornom traktu, barem djelomice zbog slabe indukcije upalnog odgovora (95). Osim toga, sojevi koji stvaraju biofilm češće u svom repertoaru činitelja virulencije imaju i sposobnost rezistencije na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma. Prema jednom istraživanju, 3 od 7 ispitivanih sojeva pokazalo je rezistenciju na baktericidnu aktivnost seruma, a većina njih je stvarala i značajnu količinu biofilma (150). Dvojba je može li rezistencija na baktericidnu aktivnost

seruma pomoći bakteriji prigodom stvaranja velike količine biofilma, zahvaljujući povećanoj sposobnosti preživljenja u prisutstvu imunoloških stanica domaćina ili obrnuto. Pitanje je pomaže li sekrecija supstanci nužnih za stvaranje biofilma u rezistenciji na serum. Još se ne zna odgovor na to pitanje, no izgleda da postoji korelacija ta dva činitelja (150). Mišljenja oko činjenice korelira li stvaranje biofilma s rezistencijom na antimikrobne lijekove također su podvojena. Uočeno je da su neki sojevi koji stvaraju biofilm otporniji na antimikrobne lijekove, ali ima publiciranih i suprotnih rezultata istraživanja (134, 152, 153). U svakom slučaju, otpornost na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma je, uz sposobnost stvaranja biofilma i brzi razvoj rezistencije na cijeli niz antimikrobnih lijekova, značajan činitelj u procesu kolonizacije i infekcije uzrokovane ovim patogenom.

1.7. Subminimalne inhibitorne koncentracije antibiotika

Od sredine prošlog stoljeća, kada je prepoznat kao emergentan nozokomijalni oportuni patogen, *A. baumannii* je do danas značajno evoluirao. U početku su izolati bili dobro osjetljivi na antibiotike korištene u kliničkoj primjeni, no uslijed selekcijskog pritiska došlo je do razvoja rezistencije. Danas razlikujemo multiplorezistentne sojeve otporne na tri ili više skupina antibiotika, ekstremnorezistentne, otporne na sve antibiotike osim kolistina, a u novije vrijeme su se pojavili i panrezistentni sojevi, otporni na sve poznate antibiotike uključivo, i kolistin. Upravo bi širenjem pan rezistentnih sojeva kao uzročnika infekcija, završila era antimikrobnog liječenja. Obzirom na taj ozbiljan i rastući problem, kao i nedostatak novih terapijskih opcija, ispituju se potencijalni učinci poznatih, netradicionalnih lijekova u liječenju nastalih infekcija, kao i njihovi mogući sinergistički učinci u raznim rasponima koncentracija.

Kombinacije kolistina s rifampicinom, meropenemom ili azitromicinom već su se ranije pokazale učinkovitima u eliminaciji multiplorezistentnih *A. baumannii* sojeva u koncentraciji koja odgovara MIK-u. Njihov je učinak bio djelomice ili potpuno sinergističan u maloj grupi od 5 ispitivanih sojeva *A. baumannii*, od kojih su neki bili otporni i na meropenem (154). Sinergizam baktericidnog učinka sulbaktama s azitromicinom i rifampicinom uočen je i u sojevima rezistentnim na imipenem, gentamicin, ciprofloksacin, sulfametoksazol-trimetoprim, cefotaksim, ceftazidim, tobramicin i piperacilin/tazobaktam, uz očuvanu umjerenu osjetljivost na ampicilin/sulbaktam (155). Ti su učinci ispitivani u koncentraciji koja odgovara minimalnoj inhibitornoj koncentraciji (MIK), što je najmanja koncentracija antibiotika koja inhibira vidljivi porast bakterija nakon prekonoćne inkubacije (156). Subminimalna

inhibitorna koncentracija (sub-MIK) antibiotika je koncentracija ispod MIK-a (< 1 MIK) za ispitivani mikroorganizam (157, 158). Subminimalnim inhibitornim koncentracijama antibiotika, bakterije su izložene na početku, na kraju ili između perioda administracije lijeka ili čak tijekom cijelog vremena primjene antibiotika u niskoj dozi (159).

Unutar biofilma bakterijske su stanice otporne na koncentracije antibiotika 10-1000 puta veće u odnosu na koncentraciju istog dovoljnu da „ubije“ pojedinačni, odnosno njezin planktonski oblik (160). Stanice smještene duboko unutar biofilma mogu biti izložene subMIK-u antibiotika uslijed gradijenta difuzije samog antibiotika (161). Činitelji koji pridonose antimikrobnoj rezistenciji posredovanoj biofilmom uključuju nedovoljnu difuziju ili sekvestriranje antibiotika u matriks biofilma, sporo umnožavanje bakterija unutar biofilma, prisutstvo tzv. „perzistera“ ili malih rezistentnih bakterijskih kolonija, kao i još neke nepoznate fenotipske razlike (160-165). Upravo ovaj visoki stupanj otpornosti biofilma čini većinu infekcija vezanih uz upotrebu umjetnih materijala teškom ili čak nemogućom za liječenje (157). Izlaganje bakterija koncentracijama imipenema i sulbaktama višestruko višim od MIK-a, izaziva morfološke promjene sesilnih bakterijskih stanica (stvaranje filamenata i kokoidnih formi) unutar nastalog *A. baumannii* biofilma. Utjecaj starosti *A. baumannii* biofilma na njegovu rezistenciju na sulbaktam i imipenem opisala je grupa autora iz Čilea, pri čemu se starenjem biofilma usporava brzina njegova rasta i povećava stvaranje egzopolisaharida, time se smanjuje osjetljivost na sulbaktam i, u manjoj mjeri, na imipenem (166).

Brojne su studije pokazale da sub-MIK antibiotika, iako nedovoljne da ubiju bakterije, mogu inhibirati stvaranje biofilma (157). Temeljni je odgovor na primjenu sub-MIK-a antibiotika bifazičan, karakteriziran stimulacijom stvaranja biofilma pri niskoj dozi i inhibicijom stvaranja biofilma pri visokoj dozi, odnosno visokim koncentracijama antibiotika (157). Za neke je antibiotike karakterističan antagonizam stvaranja pri niskoj dozi, agonizam pri većoj, te konačno ponovno antagonizam pri još većoj koncentraciji antibiotika (157). Ovaj višefazični odgovor na dozu (tzv.U-oblik) karakterističan je za mnoge kemikalije, lijekove, hormone, biološke molekule i fizičke stresore, često se još naziva i „hormetički odgovor“ (158, 167, 168). Maksimalna amplituda odgovora na antibiotik, kao i širina stimulatornog raspona doze, različita je za pojedini antibiotik, odnosno za pojedinu bakterijsku vrstu (157). Koncentracija antibiotika koja inducira najveću produkciju biofilma različita je za različite antibiotike (157). Za većinu je antibiotika maksimalna indukcija stvaranja biofilma pri koncentraciji $\leq 1/2$ dok je kod nekih ta koncentracija >1/2 MIK-a (157).

Prva zapažanja da sub-MIK antibiotika može interferirati s nekim bakterijskim funkcijama opisane su još u prvoj polovini 20. stoljeća, kada je Gardner uočio da izlaganje *Clostridium perfringens* penicilinu izaziva izduživanje i stvaranje filamenata, odnosno morfološke promjene bakterijskih stanica (157). Brojne studije koje su uslijedile pokazale su da subMIK antibiotika lako mijenjaju ultrastrukturu i antigena svojstva bakterija, njihovu sposobnost adhezije na epitelne stanice, njihovu sintezu i sekreciju enzima i toksina, brzinu rasta *in vitro* kao i *in vivo*, čak izazivaju i indukciju profaga, a na taj način utječu na virulenciju same bakterije (169-173). Azitromicin učinkovito suprimira stvaranje biofilma u *Pseudomonas aeruginosa* pri niskim koncentracijama, čak do 1/128 MIK-a (174, 175). Obzirom da upravo *P. aeruginosa* u bolesnika s cističnom fibrozom stvara biofilm u plućima oboljelih, niska doza azitromicina poboljšava plućnu funkciju oboljelih, neovisno o njegovim razmjerno visokim MIK-ovima (MIK $\geq$ 64 mg/l) (176-178). Sub-MIK koncentracije azitromicina inhibiraju detekciju kvoruma bakterijskih stanica i stvaranje alginata, mukoidnog polisaharida u matriksu biofilma, nužnih za nastanak biofilma u *Pseudomonas aeruginosa* (174, 179-181). Sub-MIK klindamicina, linezolida i tigeciklina značajno smanjuju virulenciju *S. aureus* djelovanjem na stvaranje Panton-Valentin leukocidina, α- hemolizina i proteina A (182). Izlaganjem ispitivanih 6 sojeva *A. baumannii* 1/2 i 1/4 MIK-a kolistina došlo je do značajne redukcije adhezivne sposobnosti ispitivanih sojeva i smanjenja stvaranja biofilma na urinarnim kateterima u odnosu na kontrolne. Pri tome izlaganje 1/2 MIK-a kolistina ima izraženiji učinak (183).

Nasuprot opisanih učinaka, brojne su studije pokazale da *in vitro* izlaganje sub-MIK-u antibiotika može rezultirati indukcijom adaptivnih odgovora i stimulacijom stvaranja biofilma, koje putem različitih molekularnih mehanizama u različitim bakterijskim rodovima i vrstama može dovesti do porasta tolerancije na antibiotike (184, 185). Prva takva studija objavljena je 1988. godine, u njoj je pokazana sposobnost indukcije stvaranja biofilma u *Staphylococcus epidermidis* pri primjeni 1/4 MIK-a rifampicina, a bez indukcije, odnosno uz supresiju stvaranja biofilma kod ostalih osam ispitivanih antibiotika (186). Tek se 2005. godine, nakon objavljene studije o indukciji stvaranja biofilma primjenom sub-MIK-a aminiglikozidnog antibiotika tobramicina u *P. aeruginosa*, ponovno javilo zanimanje za istraživanje ovog područja (184). Sposobnost indukcije stvaranja biofilma, porast površinske adhezije i pojačan unos željeza nakon izlaganja bakterijskih stanica subMIK-u imipenema u patogenih sojeva *A. baumannii*, uočila je i opisala grupa talijanskih autora. Učinak je opisan u tzv. „SMAL“ klonu, koji ne pripada opisanim europskim klonovima, čime se dovodi u pitanje

ta sposobnost kao značajka cijele vrste, ali se ipak smatra da je to odlika određenog ispitivanog klona. Ista skupina autora utvrdila je i značajan utjecaj uvjeta rasta (medija i temperature) na stvaranje biofilma u *A. baumannii* SMAL klonu, mjereno sposobnošću adhezije na polistirenske mikrotitar pločice. Inhibirano je u peptonom bogatom hranjivom LB bujonu, dok je njegovo četverostruko razrjeđenje dovelo do stimulacije adhezije koja je bila viša u mediju s dodatkom glukoze. 1/4 do 1/16 koncentracija MIK-a imipenema u M9Glu/sup mediju (medij koji sadržava glukozom) stimulira čak trostruko povećanje stvaranja biofilma pri 30°C i 37°C. Nasuprot tome, nije zabilježeno povećanje stvaranja biofilma nakon izlaganja sojeva subMIK-u tetraciklina, što direktno govori u prilog specifičnosti učinka imipenema. U predstavnika Europskog klona I (RUH 875) i II (RUH 134) nije bilo stimulacije površinske adhezije i indukcije stvaranja biofilma, kao u ispitivanom SMAL klonu. Uzgoj u glukoznom mediju stimulira stvaranje celuloze ili egzopolisaharida koji ima β-1,4- glukanski dio, a upravo je glukoza specifični induktor stvaranja egzopolisaharida. Subminimalne inhibitorne koncentracije imipenema imaju pozitivan učinak na površinsku adheziju, kao i unos željeza (93).

Kao što je već ranije rečeno, iako sub-MIK antibiotika nisu dovoljne da ubiju bakterijsku stanicu, mijenjanjem njihovih svojstava utječu na virulenciju same bakterijske stanice. Uslijed toga one postaju osjetljivije na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma. Primjer tog učinka vidljiv je nakon izlaganja sojeva *P. aeruginosa* eritromicinu, koji ometa sintezu proteina, smanjuje stvaranje proteaza i leukocidina, bez učinka na rast same bakterijske stanice. Obzirom da interferira sa sinetezom proteina, moguće je da sub-MIK eritromicina mijenjaju površinske komponente bakterijske stanice, inhibiraju ekstracelularne produkte i, slijedom toga, reduciraju virulenciju same bakterije, tj. bakterijske stanice postaju osjetljive na baktericidan učinak seruma, a pritom je učinak ovisan o dozi antibiotika (187). Osim makrolida, pojačanu osjetljivost na baktericidnu aktivnost seruma, uz morfološke promjene bakterijskih stanice, *P. aeruginosa* pokazuje i nakon izlaganja sub-MIK-u ceftazidima i meropenema (188).

2.0. HIPOTEZA

Subminimalne inhibitorne koncentracije antibiotika imaju učinak na baktericidnu aktivnost seruma i stvaranje biofilma, čimbenike patogenosti *Acinetobacter baumannii*.

3.0. CILJ ISTRAŽIVANJA

Zbog sve značajnije uloge *A. baumannii* kao uzročnika nozokomijalnih infekcija, nedostatnog znanja o činiteljima virulencije, kao i porastu otpornosti prema konvencionalnim antimikrobnim lijekovima u uporabi, postavljeni su slijedeći ciljevi istraživanja:

- Ispitati minimalne inhibitorne koncentracije ispitivanih sojeva *A. baumannii* za imipenem, kombinaciju ampicilin/sulbaktam, azitromicin, rifampicin i kolistin.
- Ispitati osjetljivost istraživanih sojeva na baktericidnu aktivnost seruma
- Ispitati učinak sub-MIK-a navedenih antibiotika na biofilm producirajuće sojeve *A. baumannii*
- Ispitati sposobnost indukcije stvaranja biofilma nakon izlaganja sojeva *A. baumannii* sub-MIK-u navedenih antibiotika
- Ispitati utjecaj sub-MIK-a navedenih antibiotika na osjetljivost na baktericidnu aktivnost seruma ispitivanih sojeva
- Ispitati stupanj korelacije između sojeva koji stvaraju biofilm i osjetljivosti na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma
- Ispitati klonalnu raspodjelu sojeva *A. baumannii*
- Ispitati eventualno postojanje fenotipski i/ili genotipski različitih sojeva *A. baumannii* s učestalijom sposobnošću stvaranja biofilma, odnosno pojavom serumske rezistencije

4.0. MATERIJAL I METODE

U istraživanju su korišteni sojevi *A. baumannii*, odabrani iz zbirke sojeva izoliranih iz različitih kliničkih uzoraka tijekom redovitog rutinskog rada u različitim laboratorijima Službe za mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, u periodu od 1. lipnja 2007. do 30. listopada 2012. godine. Do izvođenja testova sojevi su bili pohranjeni u pričuvnom agaru u Laboratoriju za dijagnostiku ostalih bakterijskih infekcija ZZJZ Osječko-baranjske županije. Nakon provedenog početnog ispitivanja svih sojeva *A. baumannii* iz zbirke na temelju inicijalne sposobnosti stvaranja biofilma, izabrana su 34 soja koji stvaraju biofilm i 34 koji ga ne stvaraju. Na izabranim sojevima potom je provedeno ispitivanje utjecaja subminimalnih inhibitornih koncentracija imipenema, ampicilina u kombinaciji sa sulbaktamom, azitromicina, rifampicina i kolistina na sposobnost stvaranja biofilma i učinak na baktericidnu aktivnost seruma.

Za potrebe ispitivanja serumske rezistencije, krv je uzeta dobrovoljnim davateljima venepunkcijom u količini od 5 mililitara u 3 navrata, s razmakom od 30 dana u Prijamnoj ambulanti ZZJZ Osječko-baranjske županije. Nakon centrifugiranja uzetih uzoraka krvi, dobiveni serumi su pulirani i do izvođenja testa pohranjeni u ledenici pri -80ºC (KW, Italija) u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku ZZJZ Osječko-baranjske županije. Nakon iscrpnog informiranja davatelja o svrsi uzimanja uzorka krvi, svi su potpisali suglasnost. Primjerak Obrazloženja za potencijalnog davatelja krvi i Izjava o suglasnosti o oduzimanju uzorka priloženi su na kraju (Prilog 1 i Prilog 2).

4.1. Ispitivanje stvaranja biofilma

Postupak ispitivanja stvaranja biofilma proveden je modifikacijom ranije opisane metode (150, 189). Ukratko, supkulturom soja *A. baumannii* poraslog na krvnom agaru (Merck) inokulirano je 5 ml Luria Bertani (LB) bujona (Difco) do koncentracije od 10^7 bakterija/ml. Potom je 50 µl ovako inokuliranog bujona premješteno u jažicu mikrotitar pločice zajedno s 50 µl sterilnog LB bujona. Istovremeno je u kontrolnim jažicama dodan ukupan volumen od 100 µl sterilnog LB bujona. Postupak je izveden u triplikatu za svaki ispitivani soj. Pločica je potom inkubirana u termostatu (Binder, Njemačka) tijekom noći na 37 ºC u aerobnim uvjetima. Nakon prekonoćne inkubacije jažice mikrotitar pločice su 4 puta isprane dd H_2O i osušene na zraku. Potom je svakoj dodano po 100 µl 0.025 % otopine safranina (Kemika, Hrvatska) i, nakon 2 minute inkubacije na sobnoj temperaturi, jažice

mikrotitar pločica su ponovno isprane 4 puta dd H_2O. Nakon ispiranja, provedena je solubilizacija tako što je u svaku jažicu dodano po 200 µl 95% etanola (Kemig, Hrvatska), a po 125 µl ovako pripremljene otopine prebačeno je iz svake jažice u novu mikrotitar pločicu. Apsorbcija otopine mjerena je na 492 nm uređajem (Asys, Biochrom V. Britanija).

Sukladno opisanoj metodi, srednja vrijednost izmjerene apsorbcije dvostruko veća od srednje vrijednosti negativne kontrole smatra se pozitivnim rezultatom, odnosno interpretira se da soj stvara biofilm (150). U kontroli postupka korišten je ATCC soj *A. baumannii* 19606 koji ima sposobnost stvaranja biofilma.

4.2. Ispitivanje osjetljivosti sojeva na baktericidnu aktivnost seruma

Bakterijske kolonije porasle subkultivacijom soja na krvnom agaru tijekom 18-24 h/37 ºC suspendirane su u fosfatima puferiranoj fiziološkoj otopini (PBS) i centrifugirane 10 minuta na 1200g (Eppendorf, Njemačka). Tako dobiveni talog resuspendiran je PBS-u do optičke gustoće 1 McF (McFarland standard, bio Merieux sa, Lyon, France) pomoću denzitometra (bio Merieux, Lyon, France) što u konačnici predstavlja gustoću od $3x10^8$ bakterija/ml. Tako dobivena suspenzija razrijeđena je do koncentracije od 3×10^2 bakterija u mililitru PBS-a. U jažicama mikrotitar pločice potom su pomiješane alikvote (0,1 ml) tako dobivene suspenzije i nerazrijeđeni ljudski serum dobiven od dobrovoljnog davatelja, u omjeru 1:1. U kontrolnim jažicama pomiješane su ranije navedeni volumeni ispitivanog bakterijskog soja i serum inaktiviran u vodenoj kupelji (pbi International, Italija) 30 minuta/56 ºC. Postupak je izvršen u triplikatu. Pločice su potom inkubirane u termostatu 2h/37 ºC, a potom je iz svake jažice u kojoj su se nalazili ispitivani sojevi i serum kao i iz kontrolnih jažica, prebačeno po 0,05 ml suspenzije na Mueller-Hinton agar (Bio Rad) i inkubirano aerobno 18-24 h/37 ºC. Nakon inkubacije izbrojan je broj poraslih kolonija na površini hranilišta i na temelju tih podataka izračunat je postotak preživjelih, odnosno ubijenih bakterija djelovanjem seruma. Serum rezistentni ili serum osjetljivi sojevi definirani su ovisno o postotku preživljenja bakterija uslijed djelovanja seruma. Serum osjetljiv je onaj soj u kojem je broj preživjelih bakterija $\leq$ 10% u odnosu na kontrolu (190).

4.3. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija antibiotika

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) najniža je koncentracija antibiotika koja inhibira vidljivi porast mikroorganizama nakon prekonoćne inkubacije (156). Može se odrediti metodom dilucije u bujonu ili agar dilucijskim testom. Određivanje MIK-a provedeno

je metodom mikrodilucije u Mueller-Hinton bujonu (Bio Rad) i mikrotitar pločicama s 96 jažica, po CLSI-u (Clinical and Laboratory Standards Institute) za imipenem, ampicilin u kombinaciji sa sulbaktamom, azitromicin, rifampicin i kolistin (191). U provjeri točnosti provedenog testiranja korišteni su kontrolnim ATCC sojevi: *Acinetobacter baumannii* 19606 i *Pseudomonas aeruginosa* 27853. Dobiveni rezultati interpretirani su prema EUCAST-ovim (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) smjernicama (192).

4.4. Izlaganje sojeva *A. baumannii* sub-MIK-u ispitivanih antibiotika

Svi ispitivani *A. baumannii* sojevi supkultivirani su na krvnom agaru 18-24 h/37 ºC. Od poraslih bakterijskih kolonija za svaki je napravljena suspenzija u fiziološkoj otopini. Nakon centrifugiranja na 1200 g tijekom 10 minuta, supernatant je odbačen (dekantiran), a talog reuspendiran do optičke gustoće od 0,5 McFarlanda (McF), što odgovara gustoći od 1,5 x 10^8 bakterija/ml. Ovako pripremljenim suspenzijama bakterijskih sojeva inokuliran je Mueller-Hinton (MH) bujon i optička gustoća suspenzije soja prilagođena je koncentraciji od 1 x 10^6 bakterija/ml. U prethodno pripremljenom nizu od pet epruveta s razrjeđenjima ispitivanih antibiotika pomiješane su alikvote (po 2 ml) inokuliranog MH bujona i određenog razrjeđenja antibiotika tako da konačne postignute koncentracije antibiotika u epruvetama iznose 1/2, 1/4, 1/8 i 1/16 prethodno određenih MIK-a ispitivanih antibiotika za svaki soj. Peta epruveta je bila kontrolna i sadržavala je samo 2 ml sterilnog MH bujona inokuliranog s 2 ml prethodno sojem inokuliranog MH bujona. Epruvete su preko noći inkubirane (18-24 sata) aerobno pri 37 ºC. Nakon inkubacije svaka epruveta je centrifugirana na 1200 g tijekom 10 minuta, supernatant dekantiran i talog još 2 puta ispran u fosfatima puferiranoj fiziološkoj otopini (PBS). Nakon ispiranja, talog je ponovno resuspendiran u PBS-u do optičke gustoće od 1 McF (189, 193).

Ovako pripremljena suspenzija potom je dalje korištena u postupku ispitivanja učinka sub-MIK-a antibiotika na sposobnost stvaranja biofilma i osjetljivost na baktericidnu aktivnost seruma ispitivanih sojeva *A. baumannii.*

4.5. Ispitivanje učinka sub-MIK-a antibiotika na sposobnost stvaranja biofilma sojeva *A. baumannii*

U daljnjem je postupku ispitana sposobnost stvaranja biofilma u ispitivanih sojeva, a nakon djelovanja subminimalnih inhibitornih koncentracija (1/2, 1/4, 1/8 i 1/16 MIK-a) ranije navedenih antibiotika.

Suspenzija bakterija, koja je dobivena u prethodno opisanom koraku 3.4. (Izlaganje sojeva *A. baumannii* sub-MIK-u ispitivanih antibiotika), podešena je u PBS-u do optičke gustoće od 10^7 bakterija/ml. Potom su inokulirane jažice mikrotitar pločice kako je već ranije opisano u koraku 3.1. (Ispitivanje stvaranja biofilma) i nakon prekonoćne aerobne inkubacije na 37°C jažice mikrotitar pločice isprane su četiri puta dd H_2O, obojane sa 100 µl 0,025 % otopine safranina i, nakon inkubacije na sobnoj temperaturi tijekom 2 minute, ponovno četiri puta isprane s ddH_2O. Svaka je jažica potom solubilizirana s po 200 µl 96% etanola, a po 125 µl dobivene otopine zatim je iz svake jažice prebačeno u novu mikrotitar pločicu. Postupak je za svaku koncentraciju izveden u triplikatu, a srednja je vrijednost izmjerene apsorbcije na 492 nm interpretirana prema ranije navedenim kriterijima.

4.6. Ispitivanje učinka sub-MIK-a antibiotika na osjetljivost sojeva *A. baumanni* na baktericidnu aktivnost seruma (serumska rezistencija)

U ovom postupku je suspenzija bakterija dobivena u koraku 3.4. (Izlaganje sojeva *A. baumannii* sub-MIK-u ispitivanih antibiotika) dalje upotrijebljena za inokulaciju jažica mikrotitar pločica prema postupku opisanom u koraku 3.2 (Postupak ispitivanja sojeva na baktericidnu aktivnost seruma). Nakon izlaganja sub-MIK-u ispitivanih antibiotika, bakterijskim suspenzijama gustoća je prilagođena koncentraciji od 3 x 10^2 bakterija u mililitru PBS-a. U jažicama mikrotitar pločice pomiješane su potom alikvote (0,1 ml) tako dobivene suspenzije i nerazrijeđeni ljudski serum u omjeru 1:1, a u kontrolnim je jažicama dodana suspenzija soja i serum inaktiviran u vodenoj kupelji 30 minuta/56ºC. Postupak je izveden u triplikatu. Pločice su potom inkubirane 2h/37ºC, a nakon inkubacije iz svake jažice u kojoj su se nalazili ispitivani sojevi i serum, kao i iz kontrolnih jažica, prebačeno je po 0,05 ml na Mueller-Hinton agar. Nakon inkubacije 18-24 h/37ºC brojanjem je utvrđen broj poraslih kolonija na površini hranilišta i izračunati je postotak preživjelih, odnosno ubijenih bakterija djelovanjem seruma te je interpretiran prema ranije navedenim kriterijima. Serum rezistentni ili serum osjetljivi sojevi definirani su, ovisno o postotku preživljenja bakterija uslijed djelovanja seruma. Serum osjetljiv je onaj soj u kojem je broj preživjelih bakterija $\leq$ 10% u odnosu na kontrolu.

4.7. Genotipizacija ispitivanih sojeva *Acinetobacter baumannii*

Utvrđivanje klonske pripadnosti sojeva (genotipizacija) napravljeno je određivanjem makrorestrikcijskog profila kromosomske DNA (engl. pulsotyping) cijepanjem s

restrikcijskom endonukleazom metodom elektroforeze u pusirajućem polju (eng. PFGE-pulsed field gel electrophoresis) u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC Zagreb.

PFGE je metoda analize kromosomske DNA ispitivane bakterije elektroforezom na agaroznom gelu djelovanjem izmjenične električne struje. Bakterijske se stanice liziraju i tako dobivena cijela kromosomska DNA cijepa se u dijelove pomoću restrikcijskih enzima (endonukleaza) specifičnih za vrstu. Dobiveni se fragmenti razdvajaju po veličini elektroforezom na agaroznom gelu tijekom 18-24 sata na uređaju CHEF- DRIIIv(Bio-Rad Laboratories). Tako dobiveni specifični ulomci DNA se nakon bojenja etidij bromidom vizualiziraju pod UV lampom. U kontroli postupka koriste se sojevi poznatih veličina fragmenata. Usporedba vrpci vrši se pomoću *GelCompare* TM (Applied Maths, Belgium) računalnog programa (194).

4.7.1. Priprema bakterijskog soja

Svježa, 24-satna subkultura bakterijskog soja, koristi se u daljnjem postupku. Dvije do tri porasle kolonije prenese se u 5 ml tekućeg hranjivog srčano-moždanog bujona (eng. Brain heart broth; BH) i inkubira ih se preko noći, uz miješanje na rotacijskoj platform, pri temperaturi 35-37ºC. Zatim se 0,7 ml tako dobivene kulture centrifugira 2 minute pri 10000 okretaja, supernatant se dekantira, a talog ispere s 1 ml TEN pufera. Po dodatku pufera, stanice se ponovno resuspendiraju na vibrirajućoj mješalici (pbi International, Italija), centrifugiraju i supernatant se ponovno dekantira.

4.7.2. Uklapanje stanica

Talog dobiven centrifugiranjem resuspendira se u 0,3 ml EC pufera, uz dodatak 10 µl otopine lizozima i 0,3 ml 2,0% LMP (low melting point) agaroze ohlađene na 55ºC. U pripremljene kalupe za formiranje otpipetira se po 0,1 ml tako pripremljene suspenzije i ostavi 10 minuta na sobnoj temperaturi da se agaroza skrutne i započne djelovanje lizozima. Svaki tako dobiveni blok agaroze se prenese u po 2 ml EC pufera i inkubiraju se 1 sat pri 37ºC. Po završetku inkubacije, blokovi se prenesu u 0,3 ml ESP pufera ii inkubiraju najmanje 2 sata pri 55ºC. Potom slijedi inkubacija u trajanju od 300 minuta na sobnoj temperaturi u po 2 ml PMSF pufera. Potom slijedi niz od 3 do 5 ispiranja u 5 ml TE pufera u trajanju od 30 minuta pri 4ºC. Završno ispiranje izodi se 3 puta u 5 ml destilirane vode, u trajanju od 30 minuta pri

4ºC. Do postupka restrikcije bakterijske DNA, ovako pripremljeni agarozni blokovi, mogu se čuvati više mjeseci pri 4ºC.

4.7.3. Cijepanje kromosomalne DNA

Prije cijepanja restrikcijskom endonukleazom, blokovi agaroze isperu se u destiliranoj vodi radi uklajanja TE pufera, prebace u 0,3 ml za enzim odgovarajućeg pufera i potom pripreme za konačno premještanje u kivete za cijepanje. Na koncu se u kivetama nalazi agarozni blok s intaktnom kromosomskom DNA ispitivanog bakterijskog soja i restrikcijska endonukleaza u konačnom volumenu od 0,2 ml koji sadržava 2 µL enzima *ApaI* (koncentracije 10 jedinica enzima/1µL), 20 µL enzimu odgovarajućeg pufera i 178µL vode.

Apa I (Sigma, Saint Louis, USA) je preporučeni enzim za cijepanje kromosomske DNA *A. baumannii*. Nakon inkubacije, uz lagano miješanje, svaki se blok agaroze s pocijepanom DNA prenese u po 2 ml ohlađenog TE pufera.

4.7.4. Elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE)

Za postavljanje elektroforeze pripremi se 150 ml 1% agaroze (za PFGE) u TBE puferu. Prigodom izlijevanja gela, odgovarajućim se kalupima osiguraju mjesta za ranije pripremljene blokove agaroze s pocijepanom DNA, kao i standardi veličine (lambda concatamer, New England Biolabs). Po umetanju u kalupe, blokovi se zatale 0,6% agarozom, a tako pripremljen gel prenese se u pufer za odjeljivanje. Posebni uvjeti za izvođenje elektroforeze u CHEF-DRIII uređaju (Bio-Rad) su: ApaI enzim, trajanje elektroforeze 22 sata, početno i završno vrijeme pulsiranja 5-35 sekundi, voltaža 6V/cm, kut pulsiranja 120 stupnjeva, temperatura 14°C. Po završetku elektroforeze, gel se boja otopinom etidij-bromida i fotografira. Pomoću *GelCompare* TM (Applied Maths, Belgium) računalnog programa obrađeni su dobiveni makrorestrikcijski profili i izrađeni dendrogrami za ispitivane sojeve.

4.8. Obrada podataka, statistička analiza

Prikupljeni podaci prikazani su tablicama kontingencije, a razlike kategorijskih varijabli testirane McNemarovim testom.

Za usporedbu dva nezavisna uzorka, pri čemu se uspoređuju rezultati jedne te iste skupine „prije“ i „poslije“, ili se uspoređuje ista skupina u dvije različite aktivnosti, primjenjuje se McNemarov test. Razina značajnosti je postavljena na g=0,05. Podatci su statistički analizirani upotrebom Microsoft Office Excel tabličnog kalkulatora.

5.0. REZULTATI

U ovom je istraživanju ispitivan učinak subminimalnih inhibitornih koncentracija imipenema, kombinacije ampicilina i sulbaktama, azitromicina, rifampicina i kolistina na kliničke izolate *A. baumannii*. Na temelju ranije navedenih postupaka za detekciju i kriterija za interpretaciju stvaranja biofilma i osjetljivost na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma, određene su osnovne karakteristike ispitivanih sojeva čija je distribucija prikazana u tablici 5.1.

Tablica 5.1. Distribucija ispitivanih svojstava *A. baumannii* sojeva

	SR‡	**SS**§	**UKUPNO (%)**
B+*	31	3	**34**(50%)
B-†	34	0	**34**(50%)
UKUPNO (%)	**65**(95%)	**3**(5%)	**68**(100%)

***sojevi koji stvaraju biofilm; †sojevi koji ne stvaraju biofilm; ‡serum rezistentni sojevi; §sojevi osjetljivi na baktericidan učinak seruma

Na temelju osnovne distribucije u tablici, uočljivo je da je 95% ispitivanih sojeva (65/68) rezistentno na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma. Intrinzična rezistencija na serum već je ranije opisana u literaturi.

Distribucija sojeva i njihovih ispitivanih svojstava prema kliničkim odjelima hospitalizacije bolesnika iz čijih su uzoraka izolirani sojevi, prikazana je utablici 5.2.

Tablica 5.2. Distribucija ispitivanih sojeva i njihovih svojstava prema kliničkim odjelima

ODJEL	BIOFILM N=68		SERUM N=68		**UKUPNO** N=68(%)
	B+‡ N=34(%)	B-§ N=34(%)	SR‖ N=65(%)	SS‖ N=3(%)	
JIL*	13(38%)	16(47%)	29(45%)	0	29 (43%)
KIRURGIJA	6(18%)	6(18%)	12(18%)	0-	12 (17%)
NEUROKIRURGIJA	6(18%)	5(15%)	10(15%)	1(33%)	11 (16%)
INFEKTOLOGIJA	2(6%)	3(9%)	5(8%)	0	5 (7%)
HEMATOLOGIJA	2(6%)	1(3%)	2(3%)	1(33%)	3 (4%)
NEUROLOGIJA	1(3%)	1(3%)	2(3%)	0	2 (3%)
DIJALIZA	1(3%)	0	0	1(33%)	1 (1%)
DERMATOLOGIJA	1(3%)	0	1(2%)	0	1 (1%)
MFK†	1(3%)	0	1(2%)	0	1 (1%)
ORTOPEDIJA	0	1(3%)	1(2%)	0	1 (1%)
KARDIOKIRURGIJA	0	1(3%)	1(2%)	0	1 (1%)
PSIHIJATRIJA	1(3%)	0	1(2%)	0	1 (1%)
UKUPNO	34(100%)	34(100%)	34(100%)	3(100%)	68 (100%)

*JIL- jedinica intenzivnog liječenja; †MFK- maksilofacijalna kirurgija, ‡ soj stvara biofilm, §soj ne stvara biofilm,‖ soj otporan na baktericidnu aktivnost seruma, ¶ soj osjetljiv na baktericidnu aktivnost seruma

Iz prikazanih podataka jasno se vidi da je 43% (29/68) ispitivanih sojeva poteklo od bolesnika hospitaliziranih u JIL-u što korelira s podatcima iz literature o najvećoj zastupljenosti hospitalnih infekcija upravo na tim bolničkim odjelima.

Raspodjela ispitivanih svojstava *A. baumannii* sojeva prema porijeklu, odnosno vrsti kliničkog uzorka iz kojeg su izolirani, prikazana je u tablici 5.3.

Tablica 5.3. Distribucija ispitivanih sojeva prema kliničkim uzorcima i ispitivanim svojstvima

UZORAK	BIOFILM N=68		SERUM N=68		UKUPNO N=68
	B+	B-	SR	SS	N(%)
RESPIRATORNI UZORCI	**12**(36%)	**9**(27%)	**20**(34%)	**1**(33%)	**21**(30%)
-Endotrahealni aspirat (ETA)	**8** (24%)	**7**(21%)	**15**(23%)	**0**	**15**(22%)
-Aspirat bronha	**0**	**1**(3%)	**1**(2%)	**0**	**1**(1%)
-Bris traheje	**4**(12%)	**0**	**3**(5%)	**1**(33%)	**4**(6%)
-Bris kanile	**0**	**1**(3%)	**1**(2%)	0	**1**(1%)
KRV	**5** (15%)	**10**(29%)	**15**(23%)	**0**	**15**(22%)
vrh CVK*	**1**(3%)	0	**1**(2%)	**0**	**1**(1%)
vrh femoralnog katetera	**1**(3%)	0	**1**(2%)	**0**	**1**(1%)
LIKVOR	**2**(6%)	**2**(6%)	**4**(6%)	**0**	**4**(6%)
KOŽA	**12**(36%)	**10**(30%)	**0**	**2**(66%)	**22**(31%)
-bris rane	**8**(24%)	**5**(15%)	**12**(18%)	**1**(33%)	**13**(19%)
-bris ulkusa	**1**(3%)	**0**	**1**(2%)	**0**	**1**(1%)
-bris dekubitusa	**0**	**3**(9%)	**3**(5%)	**0**	**3**(4%)
-bris kože /prepone	**1**(3%)	**1**(3%)	**1**(2%)	**1**(33%)	**2**(3%)
-bris drena	**1**(3%)	**0**	**1**(1%)	**0**	**1**(1%)
-bris fistule	**1**(3%)	**1**(3%)	**2**(3%)	**0**	**2**(3%)
URIN	**1**(3%)	**3**(9%)	**4**(6%)	**0**	**4**(6%)
UKUPNO	**34**(100%)	**34**(100%)	**31**(100%)	**3**(100%)	**68**(100%)

*Vrh CVK- vrh centralnog venskog katetera

U skupini ispitivanih sojeva dominiraju izolati *A. baumannii* primarno izolirani iz uzoraka rana, kože i potkožja, zastupljeni s 22/68 (31%), potom slijede izolati iz uzoraka podrijetlom iz respiratornog trakta, zastupljeni s 21/68 (30%) i uzoraka krvi 15/68 (22%). Pojedinačno gledano, prema podrijetlu ispitivanih sojeva, u ovom su istraživanju najzastupljeniji izolati iz uzoraka aspirata traheje i krvi s po 15/68 (22%) svaki. Zatim slijede

izolati iz obrisaka rana s 13/68 (19%), likvor, urin i obrisak traheje s po 4/68 (6%), obrisak dekubitusa s 3/68 (4%), obrisci fistule i kože 2(3%) te još pojedinačni uzorci obrisaka kanile, ulkusa, aspirat bronha, vrh CVK i vrh femoralnog katetera 1/68 (1%).

Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) imipenema, kombinacije ampicilina sa sulbaktamom, azitromicina, rifampicina i kolistina, određenesu ranije opisanom metodom sukladno CLI dokumentu M7A7, mikrodilucijom u Mueller-Hinton bujonu. Raspon vrijednosti MIK-a antibiotika naveden je u tablici 5.4., uz vrijednosti MIK_{50} i MIK_{90} za svaki ispitivani antibiotik.

Tablica 5.4. Raspon vrijednosti MIK-a, MIK_{50} i MIK_{90} za pojedini antibiotik

ANTIBIOTIK	RASPON MIK-a (mg/l)	MIK_{50} (mg/l)	MIK_{90}(mg/l)
IMIPENEM	0,125-128	1	64
AMPICILIN/SULBAKTAM	1-32	4	16
AZITROMICIN	4-512	16	64
RIFAMPICIN*	0,25-8	2	4
KOLISTIN	0,032-0,5	0,125	0,5

*za dva ispitivana soja vrijednost MIK-a bila je >2560mg/L

Osnovna obilježja ispitivanih sojeva kao i pojedinačne vrijednosti MIK-a antibiotika, nužne za daljnje izvođenje testa i ocjenu učinka sub-MIK-a antibiotika prema ispitivanim svojstvima, prikazane su u tablici 5.5.

Tablica 5.5. Osnovna obilježja ispitivanih sojeva

REDNI BROJ	ODJEL	UZORAK	DATUM	BIOFILM	SERUM	MIK				
						IMIPENEM	AMPICILIN/ SULBAKTAM	AZITROMICIN	RIFAMPICIN	KOLISTIN
1	kirurgija	bris prepone	srp-07	B-†	SR‡	1	4	4	0,5	0,064
2	JIL*	aspirat bronha	srp-07	B-	SR	4	2	4	1	0,125
3	neurokirurgija	bris kanile	kol-07	B-	SR	1	4	8	1	0,125
4	traumatologija	bris fistule	ruj-07	B-	SR	0,5	8	32	1	0,125
5	kirurgija	bris rane	vlj-08	B-	SR	1	8	32	2	0,064
6	traumatologija	bris rane	vlj-08	B-	SR	1	4	16	2	0,25
7	infektologija	bris dekubitusa	stu-09	B-	SR	0,5	4	8	1	0,125
8	kirurgija	krv	pro-09	B-	SR	8	16	32	0,5	0,064
9	JIL	krv	svi-11	B-	SR	0,5	4	512	2	0,125
10	JIL	bris rane noge	lip-11	B-	SR	1	4	16	2	0,25
11	JIL	ETA§	srp-11	B-	SR	128	16	16	1	0,064
12	JIL	ETA	kol-11	B-	SR	64	32	16	1	0,125
13	JIL	ETA	ruj-11	B-	SR	1	8	16	2	0,125
14	JIL	ETA	ruj-11	B-	SR	0,5	8	32	1	0,5
15	traumatologija	urin	ruj-11	B-	SR	1	8	4	1	0,5
16	JIL	bris rane koljena	ruj-11	B-	SR	8	16	32	0,5	0,5
17	infektologija	bris dekubitusa	ruj-11	B-	SR	128	32	64	4	0,125
18	neurokirurgija	urin	stu-11	B-	SR	16	32	32	1	0,5
19	JIL	urin	pro-11	B-	SR	1	4	32	2	0,25
20	JIL	ETA	pro-11	B-	SR	0,5	8	32	2	0,25
21	kardiokirurgija	krv	pro-11	B-	SR	0,125	2	8	2	0,5
22	neurologija	bris dekubitusa	pro-11	B-	SR	2	8	32	2	0,125
23	neurokirurgija	bris rane	pro-11	B-	SR	64	16	32	2	0,25
24	JIL	ETA	sij-12	B-	SR	16	4	32	2	0,125

Tablica 5.5. Osnovna obilježja ispitivanih sojeva (nastavak)

REDNI BROJ	ODJEL	UZORAK	DATUM	BIOFILM	SERUM	MIK				
						IMIPENEM	AMPICILIN/ SULBAKTAM	AZITROMICIN	RIFAMPICIN	KOLISTIN
25	JIL	ETA	sij-12	B-	SR	32	16	4	2	0,5
26	JIL	krv	vlj-12	B-	SR	32	32	32	2	0,064
27	infektologija	krv	ožu-12	B-	SR	0,5	4	8	4	0,25
28	JIL	krv	svi-12	B-	SR	0,5	4	32	4	0,064
29	ortopedija	krv	svi-12	B-	SR	0,5	4	32	4	0,064
30	JIL	krv	svi-12	B-	SR	1	8	32	4	0,064
31	neurokirurgija	krv	svi-12	B-	SR	0,5	8	32	4	0,125
32	JIL	likvor	stu-12	B-	SR	0,5	4	16	2	0,064
33	hematologija	krv	lis-12	B-	SR	32	16	32	2	0,5
34	neurokirurgija	likvor	kol-12	B-	SR	16	32	4	2	0,5
35	neurologija	bris traheje	svi-07	B+[II]	SR	0,5	4	8	8	0,5
36	JIL	ETA	svi-07	B+	SR	4	4	64	2	0,125
37	JIL	bris rane	lip-07	B+	SR	0,5	4	8	8	0,125
38	JIL	ETA	srp-07	B+	SR	1	4	16	2	0,064
39	hematologija	briskože	srp-07	B+	OSJETLJIV	0,5	16	16	4	0,25
40	JIL	bris drena	srp-07	B+	SR	4	4	8	2	0,064
41	JIL	ETA	kol-07	B+	SR	2	8	16	1	0,5
42	neurokirurgija	vrh fem.kat.	kol-07	B+	SR	0,5	4	4	1	0,125
43	infektologija	bris ulkusa	kol-07	B+	SR	0,5	4	16	1	0,25
44	psihijatrija	bris rane	ruj-07	B+	SR	0,5	4	4	2	0,5
45	dijaliza	bris rane	ruj-07	B+	OSJETLJIV	0,125	1	4	1	0,5
46	traumatologija	bris rane	ruj-07	B+	SR	1	4	16	4	0,125
47	plastična kir.	bris rane	ruj-07	B+	SR	0,5	2	16	2	0,125

Tablica 5.5. osnovna obilježja ispitivanih sojeva (nastavak)

REDNI BROJ	ODJEL	UZORAK	DATUM	BIOFILM	SERUM	MIK				
						IMIPENEM	AMPICILIN/ SULBAKTAM	AZITROMICIN	RIFAMPICIN	KOLISTIN
48	dermatologija	bris rane	ruj-07	B+	SR	0,5	2	32	2	0,032
49	neurokirurgija	bris traheje	lis-07	B+	SR	2	4	8	1	0,25
50	plastična kir.	bris fistule	lis-07	B+	SR	0,5	4	16	4	0,5
51	MFK¶	bris rane	stu-07	B+	SR	1	4	4	2	0,125
52	neurokirurgija	bris traheje	pro-07	B+	OSJETLJIV	4	4	64	2	0,125
53	JIL	likvor	tra-08	B+	SR	0,5	4	32	4	0,5
54	JIL	ETA	lis-09	B+	SR	1	4	32	4	0,032
55	JIL	ETA	stu-09	B+	SR	64	32	2	2	0,064
56	kirurgija	bris rane	pro-09	B+	SR	0,5	4	16	2	0,125
57	JIL	ETA	srp-11	B+	SR	128	16	8	2	0,125
58	JIL	ETA	kol-11	B+	SR	64	32	8	>2560	0,064
59	JIL	krv	ruj-11	B+	SR	64	16	32	>2560	0,25
60	JIL	vrh CVK**	ruj-11	B+	SR	32	16	8	2	0,064
61	JIL	ETA	ruj-11	B+	SR	0,5	8	32	2	0,125
62	neurokirurgija	bris traheje	lis-11	B+	SR	32	16	16	2	0,032
63	infektologija	urin	sij-12	B+	SR	32	16	4	1	0,032
64	neurokirurgija	krv	ožu-12	B+	SR	32	16	32	2	0,5
65	JIL	krv	lip-12	B+	SR	0,5	4	16	2	0,125
66	plastična kir.	krv	srp-12	B+	SR	0,5	4	16	0,25	0,25
67	hematologija	krv	ruj-12	B+	SR	16	16	32	4	0,125
68	neurokirurgija	likvor	lis-12	B+	SR	32	16	16	4	0,5

*JIL- jedinica intenzivnog liječenja; †B- soj ne stvara biofilm; ‡SR- serum rezistentan soj;§ETA endotrahealniaspirat; ‖ B+ soj stvara biofilm¸

¶MFK- maksilofacijalna kirurgija,**vrh CVK- vrh centralnog venskog katetera

Učinak sub-MIK-a antibiotika na ispitivane sojeve koji prije izlaganja antibiotiku nisu stvarali biofilm, tj. indukcija njegova stvaranja, prikazan je u tablici 5.6. Učinak sub-MIK-a antibiotika na ispitivane sojeve koji su prije izlaganja antibiotika stvarali biofilm, tj. supresija stvaranja biofilma, prikazana je u tablici 5.7. za svaki ispitivani *A. baumannii* soj.

Frekvencije opaženih promjena u stvaranju biofilma, nastale nakon izlaganja sub-MIK-u antibiotika, prikazane su u tablici 5.8.

Opažena sposobnost indukcije stvaranja biofilma, nakon izlaganja sub-MIK-u ispitivanih antibiotika, nije statistički značajna.

Nasuprot tome, u sojeva koji su prije izlaganja sub-MIK-u antibiotika stvarali biofilm, opažena frekvencija supresije stvaranja biofilma u sve četiri ispitivane subminimalne inhibitorne koncentracije imipenema i azitromicina pokazuje statističku značajnost.

Učinak rifampicina na supresiju stvaranja biofilma značajan je samo u koncentracijama od 1/2 i 1/4 MIK-a.

Statistički značajna supresija stvaranja biofilma prisutnaje u koncentracijama od 1/2 i 1/8 utvrđenog MIK-a kolistina ispitivanih sojeva.

Opažena supresija stvaranja biofilma nakon izlaganja sub-MIK-u ampicilin/ sulbaktama nije statistički značajna.

*Ispitivanje učinka sub-MIK-a rifampicina uspješno je provedeno za 32 soja jer je u dva ispitivana *A. baumannii* soja (red.br. 58 i 59) MIK bio > 2560 mg/l što predstavlja najveću koncentraciju antibiotika koja se može postići metodom mikrodilucije u bujonu prigodom određivanja minimalnih inhibitornih koncentracija antibiotika.

Tablica 5.6. Učinak sub-MIK-a antibiotika na stvaranje biofilma (indukcija stvaranja biofilma)

REDNI BROJ	BIO-FILM	IMIPENEM				AMPICILIN/SULBAKTAM				AZITROMICIN				RIFAMPICIN				KOLISTIN			
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
11	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

"+" stvara biofilm; "-" ne stvara biofilm

Tablica 5.7. Učinak sub-MIK-a antibiotika na sojeve koji stvaraju biofilm (supresija stvaranja biofilma)

REDNI BROJ	BIO-FILM	IMIPENEM				AMPICILIN/SULBAKTAM				AZITROMICIN				RIFAMPICIN				KOLISTIN			
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16
35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
46	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
47	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
48	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
49	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
51	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
52	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
53	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
54	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
55	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
56	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
57	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
58*	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	*	*	*	*	+	+	+	+
59*	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*	*	*	+	+	+	+
60	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
61	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
62	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
63	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
64	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
66	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
67	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
68	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-

"+" soj stvara biofilm; "-" soj ne stvara biofilm; "*" nije testirano

Tablica 5.8. Frekvencije promjena učinka sub-MIK-a antibiotika na stvaranje biofilma

	KONC. ANTIBIOTIKA (xMIK)	IMIPENEM		AMPICILIN SULBAKTAM		AZITROMICIN		RIFAMPICIN		KOLISTIN	
		FREKVENCIJA PROMJENE†	χ^2	FREKVENCIJA PROMJENE†	χ^2	FREKVENCIJA PROMJENE†	χ^2	FREKVENCIJA PROMJENE†	χ^2	FREKVENCIJA PROMJENE†	χ^2
B-§ (N=34)	**1/2**	2	0,5	3	1,33	1	0	3	1,33	4	2,25
	1/4	1	0	2	0,5	1	0	0	-	5	3,2
	1/8	0	-	0	-	1	0	1	0	5	3,2
	1/16	0	-	0	-	1	0	1	0	3	1,33
B+‖ (N=34)	**1/2**	10	8,1*	4	2,25	11	9,09*	5‡	3,2*	6	4,16*
	1/4	7	5,14*	2	0,5	12	10,08*	5‡	3,2*	4	2,25
	1/8	9	7,11*	2	0,5	11	9,09*	4‡	2,25	6	4,16*
	1/16	15	13,06*	3	1,33	10	8,1*	0‡	-	4	2,252

* statistički značajno, u proračunima je korištena referentna razina značajnosti (g) od 0,05

† Yateova korekcija je korištena za frekvenciju <20

‡ učinak je ispitivan na 32 izolata

§ B- ne stvara biofilm; ‖ B+ - stvara biofilm

Učinak sub-MIK-a antibiotika na rezistenciju ispitivanih sojeva na baktericidnu aktivnost seruma prikazana je u tablici 5.9. Ispitivanje je provedeno na 65 sojeva koji su u inicijalnom testiranju pokazivali rezistenciju na baktericidnu aktivnost seruma, osim za rifampicin, gdje je ispitivanje učinka sub-MIK-a provedeno na 63 soja zbog, već ranije u tekstu navedene, nemogućnosti određivanja točne vrijednosti MIK-a. Ukupne frekvencije promjena uslijed djelovanja sub-MIK-a ispitivanih antibiotika prikazane su u tablici 5.10.

Za ispitivane *A. baumannii* sojeve rezistentne na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma, statistički značajan učinak ostvaren je nakon njihovog izlaganja svim ispitivanim subminimalnim inhibitornim koncentracijama ampicilin/sulbaktama i azitromicina.

U drugih ispitivanih antibiotika (imipenem, rifampicin i kolistin), subminimalne koncentracije antibiotika nisu imale statistički značajan učinak na osjetljivost ispitivanih serumrezistentnih sojeva na baktericidnu aktivnost seruma.

U tablici 5.11. nalazi se zbirni prikaz statističke značajnosti učinka subminimalnih inhibitornih koncentracija antibiotika na ispitivana svojstva *A. baumannii*.

Tablica 5.9. Učinak sub-MIK-a antibiotika na otpornost ispitivanih sojeva na baktericidnu aktivnost seruma

REDNI BROJ	IMIPENEM				AMPICILIN SULBAKTAM				AZITROMICIN				RIFAMPICIN*				KOLISTIN			
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
10	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
13	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablica 5.9. Učinak sub-MIK-a antibiotika na otpornost ispitivanih sojeva na baktericidnu aktivnost seruma (nastavak)

REDNI BROJ	IMIPENEM				AMPICILIN SULBAKTAM				AZITROMICIN				RIFAMPICIN*				KOLISTIN			
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16
35	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
50	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*	-	-	-	-
58	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	*	*	*	*	-	-	-	-
59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
61	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
64	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
68	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Učinak sub-MIK-a rifamipicina ispitan na 63 izolata; "+" ima učinak; "-" nema učinak

Tablica 5.10. Frekvencija učinka sub-MIK-a antibiotika na baktericidnu aktivnost seruma u serum rezistentnih izolata *A. baumannii*

	KONC. ANTIBIOTIKA (xMIK)	**IMIPENEM**		**AMPICILIN SULBAKTAM**		**AZITROMICIN**		**RIFAMPICIN**		**KOLISTIN**	
		FREKVENCIJA PROMJENE†	χ^2	FREKVENCIJA PROMJENE†	χ^2	FREKVENCIJA PROMJENE†	χ^2	FREKVENCIJA PROMJENE†	χ^2	FREKVENCIJA PROMJENE†	χ^2
SR (N=65)	**1/2**	4	2,25	14	12,07*	14	12,07*	5‡	3,2	5	3,2
	1/4	1	0	12	10,08*	11	9,09*	3‡	1,33	3	1,33
	1/8	0	-	10	8,1*	11	9,09*	5‡	3,2	0	-
	1/16	2	0,5	10	8,1*	10	8,1*	5‡	3,2	1	0

* statistički značajno, u proračunima je korištena referentna razina značajnosti (g) od 0,05;

† Yateova korekcija je korištena za frekvenciju <20;

‡ učinak je ispitivan na 63 izolata

Tablica 5.11.Ukupni učinak sub-MIK-a antibiotika na ispitivana svojstva

	ANTIBIOTIK (xMIK)	IMIPENEM				AMPICILIN/ SULBAKTAM				AZITROMICIN				RIFAMPICIN				KOLISTIN			
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16
SVOJSTVO	**B+***	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
	B-†	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SR‡	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

*B+ sojevi stvaraju biofilm

†B- sojevi ne stvaraju biofilm

‡SR soj otporan na baktericidnu aktivnost normalnog ljudskog seruma

“+” antibiotik ima statistički značajan učinak;

“-“ antibiotik nema statistički značajan učinak

U tablici 5.11. zbirno je prikazan ukupni učinak subminimalnih inhibitornih koncentracija antibiotika prema ispitivanim svojstvima kliničkih izolata *A. baumannii*. Promjena u ekspresiji ispitivanih svjostava jasno je uočljiva nakon izlaganja sojeva nekim ili svim subminimalnim inhibitornim koncentracijama svih ispitivanih antibiotika.

Prema vrijednosti MIK-a imipenema, ispitivani *A. baumannii* sojevi su podijeljeni u dvije skupine. Prva je s MIK-om >2 mg/l, što se prema EUCAST standardima interpetira kao soj smanjene osjetljivosti ili soj rezistentan na ovaj karbapenem. U drugoj skupini su sojevi s MIK-om ≤2 mg/l, što označava osjetljivost spitivanih sojeva na imipenem. Skupinu 1 čini 26 ispitivanih sojeva (13 B- i 13B+), dok se u skupini 2 nalaze 42 soja (21 B- i 21 B+). U tablici 5.12. prikazan je učinak sub-MIK imipenema na skupinu 1, a u tablici 5.13. na skupinu 2 ispitivanih sojeva.

Tablica 5.12.Učinak sub-MIK-a imipenema na skupinu 1 (MIK > 2 mg/l)

	SKUPINA 1						
	red.broj soja	**MIK IMIPENEMA**	BIOFILM	**1/2**	**1/4**	**1/8**	**1/16**
B-*	11	128	-	-	-	-	-
	17	128	-	-	-	-	-
	12	64	-	-	-	-	-
	23	64	-	-	-	-	-
	25	32	-	-	-	-	-
	26	32	-	-	-	-	-
	33	32	-	-	-	-	-
	18	16	-	-	-	-	-
	24	16	-	-	-	-	-
	34	16	-	-	-	-	-
	8	8	-	-	-	-	-
	16	8	-	-	-	-	-
	2	4	-	+	-	-	-
UKUPNO		**Σ**	13	1	0	0	0
B+†	57	128	+	-	-	-	-
	55	64	+	+	+	+	+
	58	64	+	+	+	+	+
	59	64	+	-	+	+	+
	60	32	+	-	+	+	-
	62	32	+	-	+	+	+
	63	32	+	+	+	+	+
	64	32	+	-	-	-	-
	68	32	+	-	-	-	-
	67	16	+	+	+	+	+
	36	4	+	+	+	+	+
	40	4	+	-	-	-	-
	52	4	+	+	+	+	+
UKUPNO		**Σ**	13	7	4	4	5

*B- soj ne stvara biofilm; †B+ soj stvara biofilm; “+” soj stvara biofilm; “-“soj ne stvara biofilm

Tablica 5.13. Učinak sub-MIK-a imipenema na skupinu 2 (MIK ≤ 2 mg/l)

SKUPINA 2							
	red.broj soja	**MIK IMIPENEMA**	BIOFILM	**1/2**	**1/4**	**1/8**	**1/16**
B-	22	2	-	-	-	-	-
	1	1	-	-	-	-	-
	5	1	-	-	-	-	-
	3	1	-	-	-	-	-
	6	1	-	-	-	-	-
	10	1	-	-	-	-	-
	13	1	-	-	-	-	-
	15	1	-	-	-	-	-
	19	1	-	-	-	-	-
	30	1	-	-	-	-	-
	4	0,5	-	-	-	-	-
	7	0,5	-	-	-	-	-
	9	0,5	-	-	-	-	-
	14	0,5	-	-	-	-	-
	20	0,5	-	-	-	-	-
	27	0,5	-	-	-	-	-
	28	0,5	-	-	-	-	-
	29	0,5	-	+	-	-	-
	31	0,5	-	-	-	-	-
	32	0,5	-	-	-	-	-
	21	0,125	-	-	-	-	-
UKUPNO		**Σ**	21	1	0	0	0
B+	41	2	+	+	+	+	+
	49	2	+	+	+	+	-
	38	1	+	+	+	+	+
	46	1	+	+	+	+	+
	51	1	+	+	+	+	+
	54	1	+	+	+	+	-
	35	0,5	+	+	+	+	+
	37	0,5	+	+	+	+	+
	39	0,5	+	+	+	+	+
	42	0,5	+	+	+	+	+
	43	0,5	+	-	+	+	+
	44	0,5	+	+	+	+	+
	47	0,5	+	+	+	+	+
	48	0,5	+	-	-	-	-
	50	0,5	+	+	+	+	-
	53	0,5	+	+	+	+	-
	56	0,5	+	+	+	+	-
	61	0,5	+	-	-	+	-
	65	0,5	+	+	+	+	-
	66	0,5	+	+	-	-	-
	45	0,125	+	+	+	+	+
UKUPNO		**Σ**	21	3	3	2	9

Ukupne frekvencije promjena sposobnosti stvaranja biofilma zapaženih u skupini 1 i skupini 2, nakon izlaganju učinku sub-MIK-a imipenema, prikazane su u tablici 5.14.

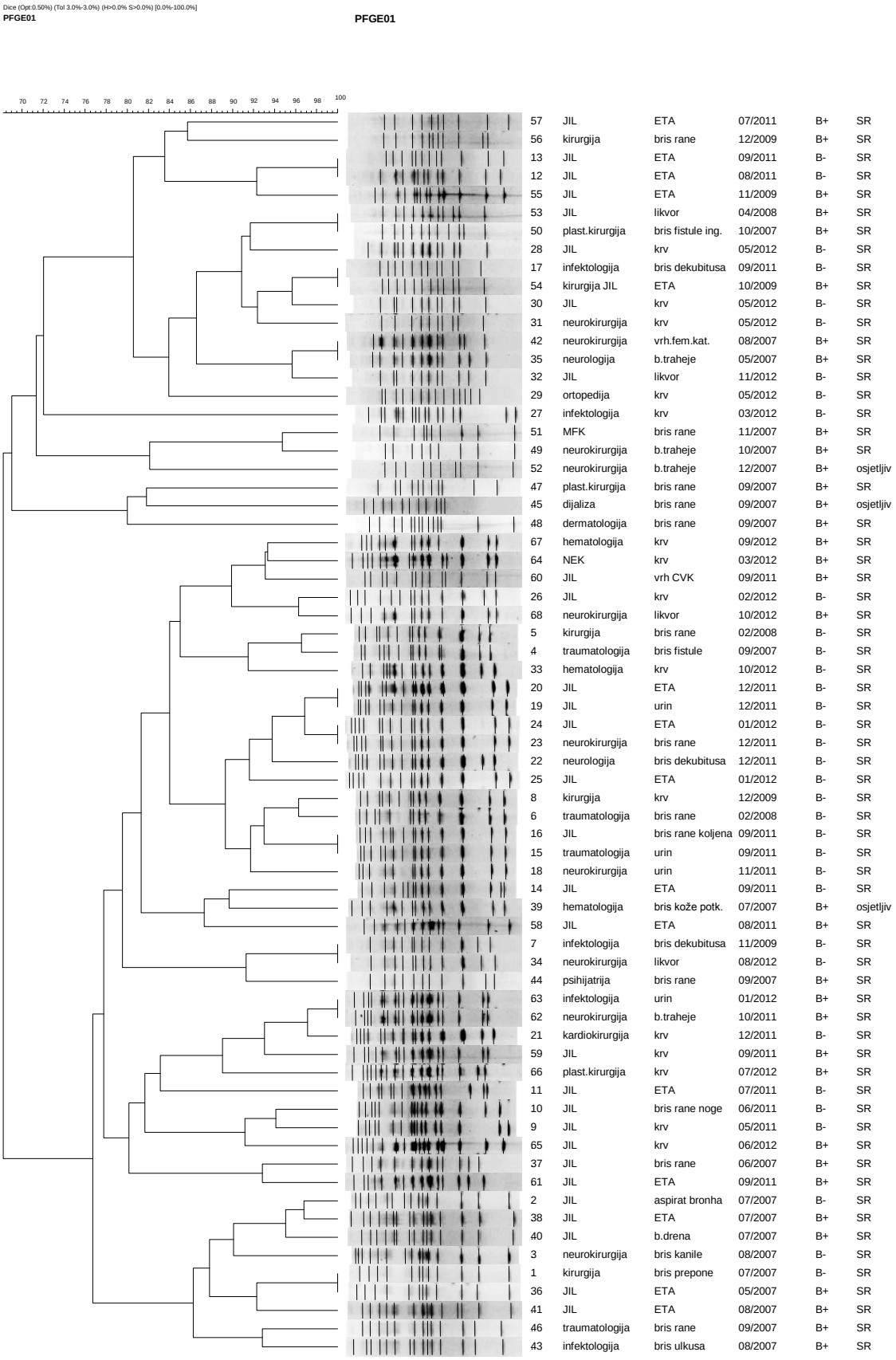
Tablica 5.14. Frekvencije opaženih promjena u skupini 1 i 2, nakon izlaganja sub-MIK-u imipenema

IMIPENEM						
			koncentracija (xMIK)			
		N	1/2 (%)	1/4 (%)	1/8 (%)	1/16 (%)
Skupina1 (MIK > 2)	B-	13	1	0	0	0
	B+	13	7*	4	4	5
	Σ	26(100%)	8 (31%)	4(15%)	4(15%)	5(19%)
Skupina 2 (MIK ≤ 2)	B-	21	1	0	0	0
	B+	21	3	3	2	9*
	Σ	42(100%)	4(10%)	3(7%)	2(5%)	9(21%)

* statistički značajna razlika

Statistički značajna razlika učinka imipenema u skupini 1 (MIK ≥ 2 mg/l) uočena je za subminimalnu inhibitornu koncentraciju imipenema od 1/2 MIK-a, pri čemu je došlo do supresije stvaranja biofilma.

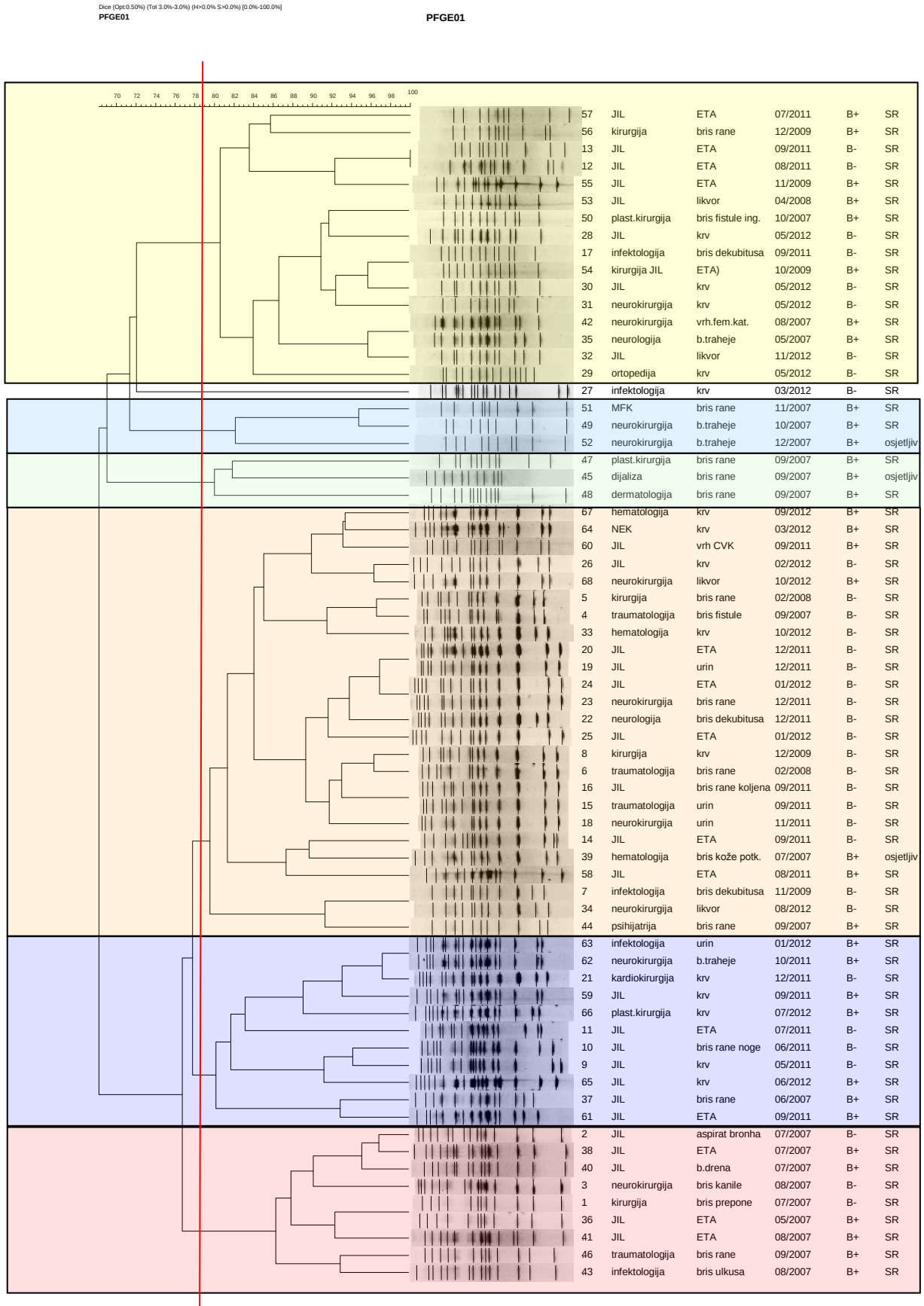
U skupini 2 (MIK < 2 mg/l) statistički značajna razlika učinka imipenema, odnosno supresija stvaranja biofilma, ostvarena je u koncentraciji od 1/16 MIK-a.



Slika 5.1. Dendrogram klonalne raspodjele ispitivanih sojeva

Molekularna karakterizacija ispitivanih sojeva učinjena je elektroforezom u pulsirajućem polju (PFGE), a dobiveni makrorestrikcijski profili uspoređeni su *GelCompare* TM (Applied Maths, Belgium) računalnim programom koji izračunava Diceov koeficijent sličnosti, aprikazani su na slici 5.1. Granična vrijednost (cut-off) od 80% korištena je za definiranje različitih genotipova.

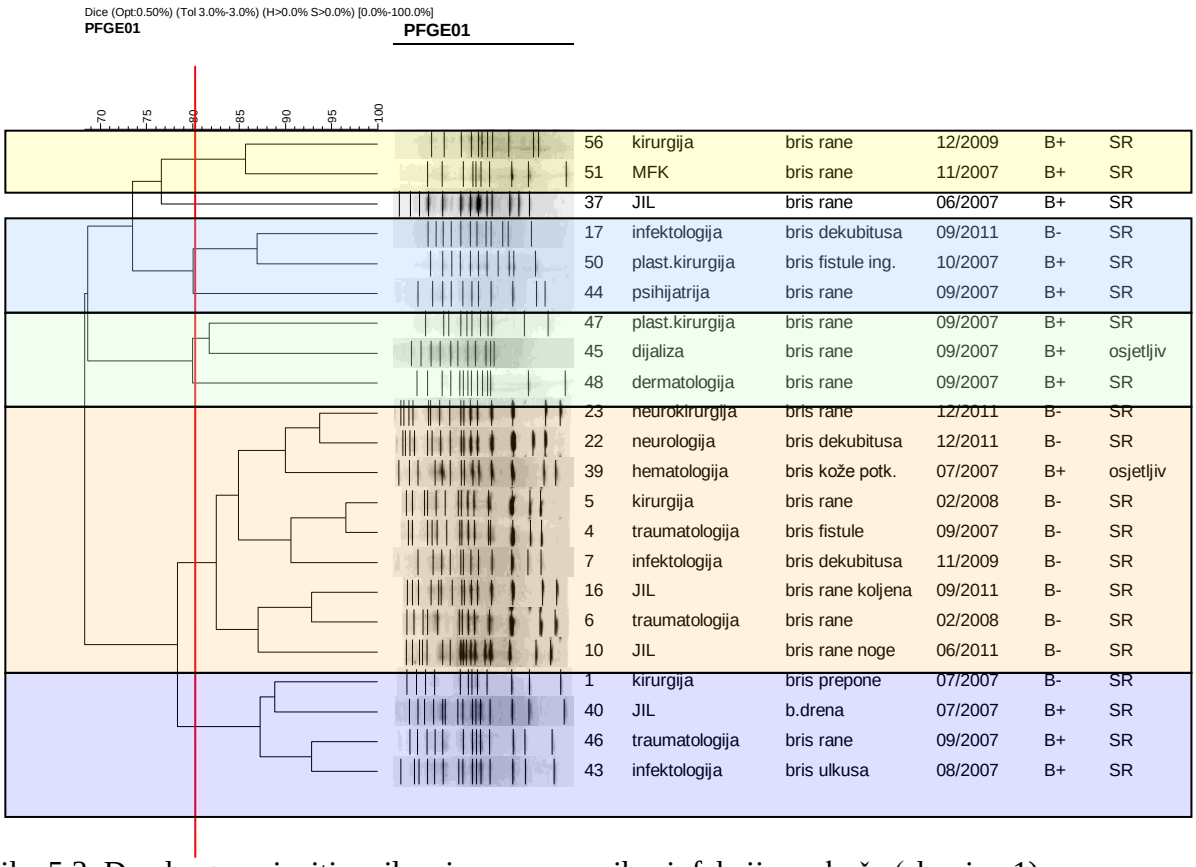
Na temelju tog kriterija za definiranje sličnosti makrorestrikcijskih profila, 68 ispitivanih *A. baumannii* sojeva razvrstano je u šest većih genskih skupina, vidljivo na slici 5.2.



Slika 5.2. Prikaz dobivenih klonskih skupina ispitivanih sojeva

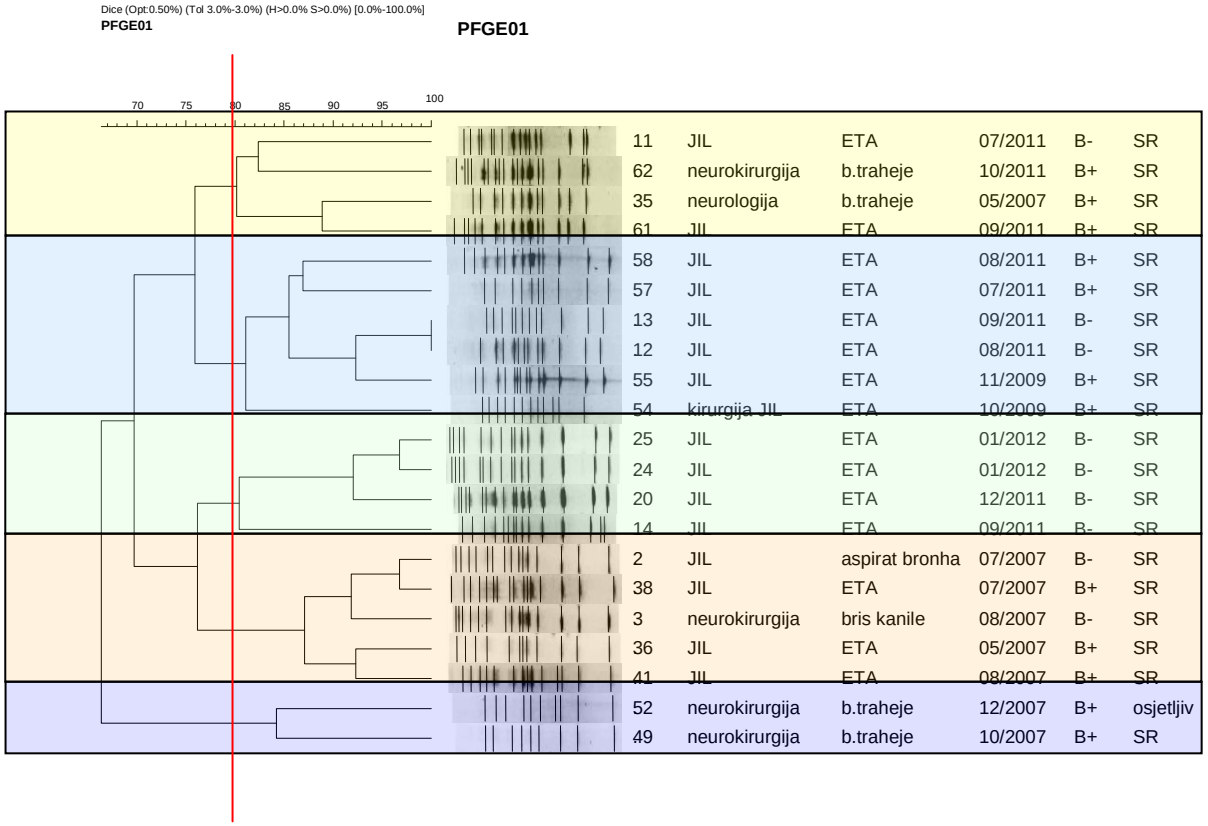
U dendrogramu na slici 5.2. može se vidjeti da su tijekom 2007. godine, među ispitivanim sojevima *A. baumannii* dominirale 3 genske skupine s mogućnošću stvaranja biofilma.

Analiza makrorestrikcijskih profila dobivenih elektroforezom u pulsirajućem polju izolata *A. baumannii* vezanih uz infekcije kože i potkožja (skupina 1) prikazana je na slici 5.3.

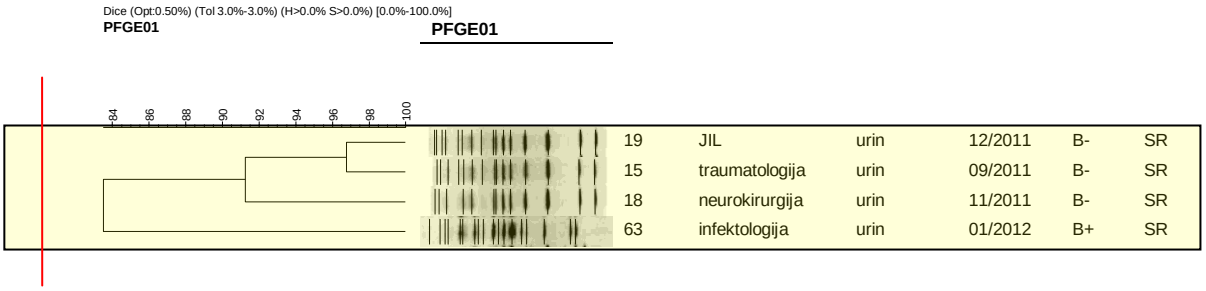


Slika 5.3. Dendrogram ispitivanih sojeva povezanih s infekcijama kože (skupina 1)

Na slici 5.4. vidljiv je dendrogram analize PFGE profila izolata porijeklom iz respiratornog sustava (skupina 2), dok su na slici 5.5. prikazani ispitivani izolati porijeklom iz urina (skupina 3).

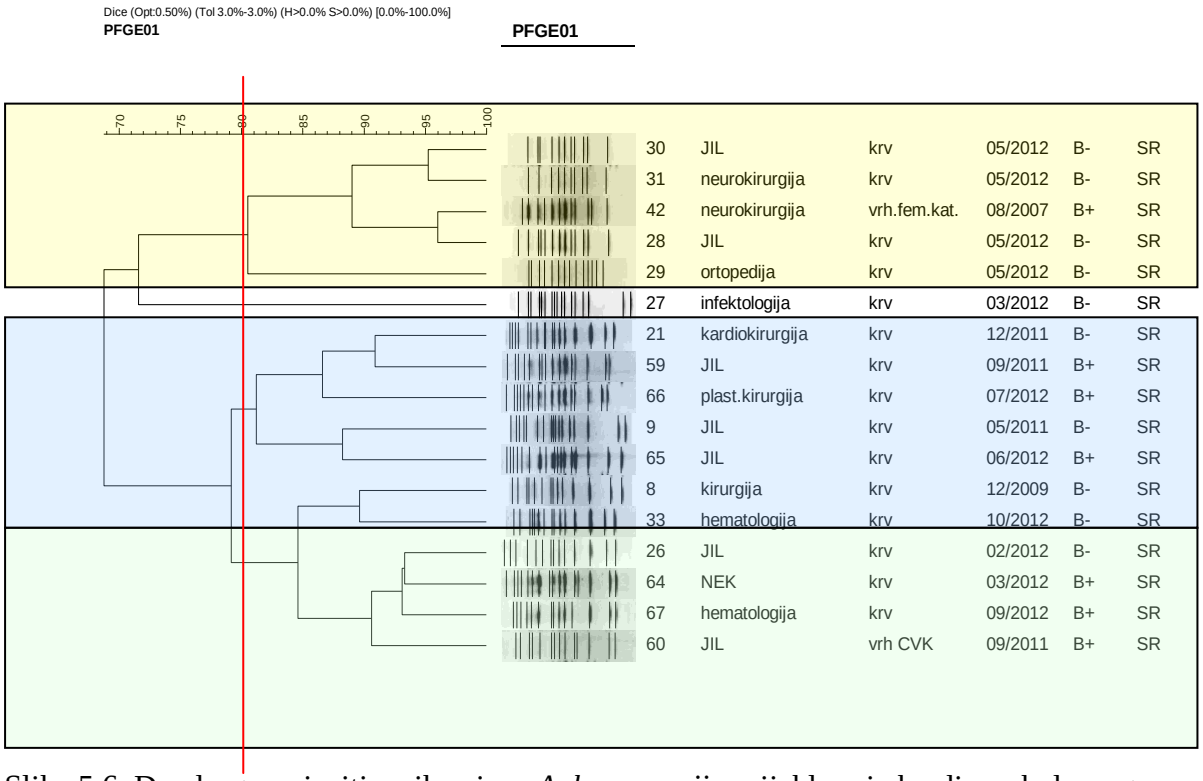


Slika 5.4. Dendrogram klonske raspodjele ispitivanih sojeva porijeklom iz respiratornog sustava (skupina 2)

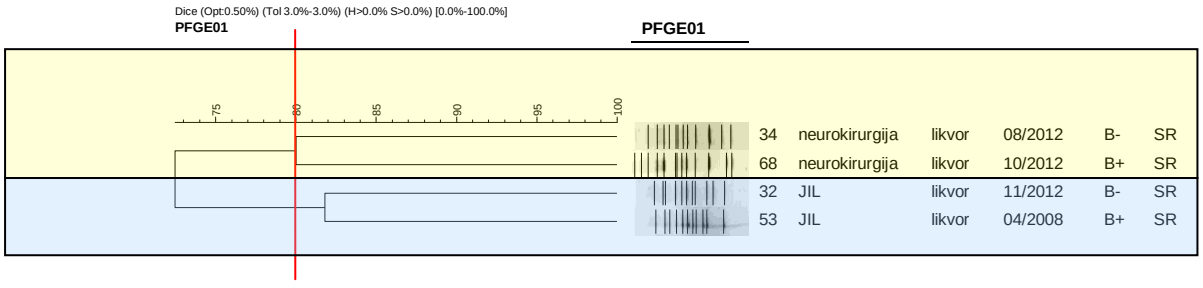


Slika 5.5. Dendrogram klonalne raspodjele sojeva porijeklom iz urogenitalnog sustava (skupina 3)

Dendrogram makrorestrikcijskih profila invazivnih uzoraka *A. baumannii* porijeklom iz kardiovaskularnog sustava (skupina 4) prikazan je na slici 5.6, a izolata iz likvora (skupina 5) na slici 5.7.



Slika 5.6. Dendrogram ispitivanih sojeva *A. baumannii* porijeklom iz kardiovaskularnog sustava (skupina 4)



Slika 5.7. Dendrogram ispitivanih sojeva *A. baumannii* izoliranih iz likvora (skupina 5)

Na slici 5.6. vidljivo je da su svi ispitivani klinički izolati *A. baumannii* podrijetlom iz kardiovaskularnog sustava, rezistentni na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma. Klonalno su raspoređeni u tri veće skupine, na temelju sličnosti makrorestrikcijskih profila većoj od 80%. 7/17 (41%) ispitivanih kliničkih izolata ima sposobnost stvaranja biofilma, dok većina

ispitivanih sojeva 10/17 (59%) nije stvarala biofilm. Izolati vezani uz intravaskularne katetere imali su sposobnost stvaranja biofilma.

Tablica 5.15. Raspodjela ispitivanih svojstava prema porijeklu ispitivanog soja (pregled po skupinama)

	B-*(%)	**B+†(%)**	**SR‡(%)**	**SS§ (%)**
SKUPINA 1 (N=22)	10 (45%)	12 (55%)	20 (91%)	2 (9%)
SKUPINA 2 (N=21)	9 (43%)	12 (57%)	20 (95%)	1 (5%)
SKUPINA 3 (N=4)	3 (75%)	1 (25%)	4 (100%)	0
SKUPINA 4 (N=17)	10 (59%)	7 (41%)	17 (100%)	0
SKUPINA 5 (N=4)	2 (50%)	2 (50 %)	4 (100%)	0

*B- ne stvara biofilm; †B+ stvara biofilm; ‡SR otporan na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma; §SS osjetljiv na baktericidnu aktivnost ljuskog seruma

U tablici 5.16. prikazani su klonovi dobiveni analizom makrorestrikcijskih profila i njihova svojstva.

Tablica 5. 16. Prikaz klonova i njihovih svojstava dobivenih analizom makrorestrikcijskih profila tijekom PFGE

RED.BR	ODJEL	UZORAK	DATUM	BIOFILM	S.REZIST.	IMI*	SAM†	AZM‡	RIF§	COL‖
13	JIL¶	ETA**	ruj-11	B-††	SR‡‡	1	8	16	2	0,125
12	JIL	ETA	kol-11	B-	SR	64	32	16	1	0,125
53	JIL	likvor	tra-08	B+§§	SR	0,5	4	32	4	0,5
50	plastična kir.	bris fistule	lis-07	B+	SR	0,5	4	16	4	0,5
17	infektologija	bris dekubitusa	ruj-11	B-	SR	128	32	64	4	0,125
54	JIL	ETA	lis-09	B+	SR	1	4	32	4	0,032
42	neurokirurgija	vrhfemor.kat.	kol-07	B+	SR	0,5	4	4	1	0,125
35	neurologija	bris traheje	svi-07	B+	SR	0,5	4	8	8	0,5
20	JIL	ETA	pro-11	B-	SR	0,5	8	32	2	0,25
19	JIL	urin	pro-11	B-	SR	1	4	32	2	0,25
16	JIL	bris rane	ruj-11	B-	SR	8	16	32	0,5	0,5
15	traumatologija	urin	ruj-11	B-	SR	1	8	4	1	0,5
7	infektologija	brisdekubitusa	stu-09	B-	SR	0,5	4	8	1	0,125
34	neurokirurgija	likvor	kol-12	B-	SR	16	32	4	2	0,5
63	infektologija	urin	sij-12	B+	SR	32	16	4	1	0,032
62	neurokirurgija	bris traheje	lis-11	B+	SR	32	16	16	2	0,032
1	kirurgija	bris prepone	srp-07	B-	SR	1	4	4	0,5	0,064
36	JIL	ETA	svi-07	B+	SR	4	4	64	2	0,125

*IMI-imipenem, †SAM- ampicilin/sulbaktam, ‡AZM- azitromicin, §RIF- rifampicin, ‖COL- kolistin, ¶JIL-jedinica intenzivnog liječenja, **ETA- endotrahealni aspirat, †B- ne stvara biofilm; §§ B+ stvara biofilm; ‡‡SR- otporan na baktericidnu aktivnost seruma;

U tablici 5.17. je prikazana ukupna frekvencija izmjene stvaranja biofilma ispitivanih sojeva razvrstanih u skupine prema porijeklu izolata, a nakon izlaganja subminimalnim inhibitornim koncentracijama pojedinog antibiotika.

U tablici 5.18. je prikazana ukupna frekvencija izmjene otpornosti na baktericidnu aktivnost normalnog ljudskog seruma ispitivanih sojeva razvrstanih u skupine a nakon izlaganja subminimalnim inhibitornim koncentracijama antibiotika.

Tablica 5.17. Frekvencija izmjene stvaranja biofilma ovisno o porijeklu skupine i sub-MIK-u antibiotika

		BIOFILM									
	KONC. ANTIBIOTIKA (xMIK)	IMIPENEM		AMPICILIN/ SULBAKTAM		AZITROMICIN		RIFAMPICIN		KOLISTIN	
		FREKVENCIJA PROMJENE	χ^2	FREKVENCIJA PROMJENE	χ^2	FREKVENCIJA PROMJENE	χ^2	FREKVENCIJA PROMJENE	χ^2	FREKVENCIJA PROMJENE	χ^2
skupina 1 (N=22)	**1/2**	4	2,25	0	-	3	1,33	2	0,5	2	0,5
	1/4	3	1,33	0	-	5	3,2*	1	0	2	0,5
	1/8	3	1,33	0	-	4	2,25	1	0	2	0,5
	1/16	4	2,25	0	-	6	4,16*	1	0	2	0,5
skupina 2 (N=21)	**1/2**	4	0,25	3	1,33	5	3,2*	3	1,33	4	0,25
	1/4	2	0,5	2	0,5	5	3,2*	3	1,33	2	0,5
	1/8	1	0	1	0	2	0,5	1	0	2	0,5
	1/16	3	1,33	1	0	0	0	0	-	1	0
skupina 3 (N=4)	**1/2**	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	1/4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	1/8	0	-	0	-	0	-	0	-	1	0
	1/16	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
skupina 4 (N=17)	**1/2**	3	1,33	2	0,5	5	3,2*	3	1,33	1	0
	1/4	2	0,5	0	0	2	0,5	2	0,5	1	0
	1/8	2	0,5	0	-	2	0,5	1	0	1	0
	1/16	2	0,5	0	-	2	0,5	0	-	1	0
skupina 5 (N=4)	**1/2**	1	0	0	-	0	-	1	0	2	0,5
	1/4	1	0	0	-	0	-	1	0	1	0
	1/8	1	0	0	-	0	-	1	0	2	0,5
	1/16	2	0,5	0	-	0	-	0	-	1	0

* statistički značajno

Tablica 5.18. Frekvencija izmjene osjetljivosti na baktericidnu aktivnost seruma ovisno o porijeklu skupine i sub-MIK-u antibiotika

		SERUMSKA REZISTENCIJA									
	KONC. ANTIBIOTIKA (xMIK)	IMIPENEM		AMPICILIN SULBAKTAM		AZITROMICIN		RIFAMPICIN		KOLISTIN	
		FREKVENCIJA PROMJENE	χ^2	FREKVENCIJA PROMJENE	χ^2	FREKVENCIJA PROMJENE	χ^2	FREKVENCIJA PROMJENE	χ^2	FREKVENCIJA PROMJENE	χ^2
skupina1 (N=22)	**1/2**	3	1,33	4	2,25	3	1,33	2	0,5	2	0,5
	1/4	1	0	4	2,25	3	1,33	0	-	1	0
	1/8	0	-	4	2,25	3	1,33	1	0	0	-
	1/16	0	-	4	2,25	3	1,33	1	0	0	-
skupina 2 (N=21)	**1/2**	1	0	6	4,16*	4	2,25	1	0	2	0,5
	1/4	0	-	6	4,16*	4	2,25	1	0	1	0
	1/8	0	-	5	3,2*	3	1,33	2	0,5	0	-
	1/16	1	0	5	3,2*	3	1,33	2	0,5	0	-
skupina 3 (N=4)	**1/2**	0	-	0	-	0	-	0	-	1	0
	1/4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	1/8	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	1/16	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
skupina 4 (N=17)	**1/2**	0	-	3	1,33	5	3,2*	2	0,5	0	-
	1/4	0	-	2	0,5	3	1,33	2	0,5	1	0
	1/8	0	-	1	0	3	1,33	2	0,5	0	-
	1/16	0	-	1	0	3	1,33	2	0,5	1	0
skupina 5 (N=4)	**1/2**	0	-	1	0	2	0,5	0	-	0	-
	1/4	0	-	0	-	1	0	0	-	0	-
	1/8	0	-	0	-	2	0,2	0	-	0	-
	1/16	1	0	0	-	1	0	0	-	0	-

*statistički značajno

6.0. RASPRAVA

Zahvaljujući iznimnom napretku znanosti i tehnike, došlo je i do napretka u skrbi za oboljele osobe. Taj je napredak snažan i gotovo nezaustavljiv, pa je istovremeno došlo i do promjene u globalnoj epidemiologiji zaraznih i nezaraznih bolesti. Danas je zdravstvena skrb za imunokompromitirane osobe visokosofisticirana i, uglavnom, široko dostupna, a obuhvaća cijeli niz postupaka koji poboljšavaju i produljuju život oboljelog. Nasuprot tom snažnom napretku medicine i tehnike, dostupnosti lijekova, opreme i medicinskog znanja, nalazi se iznimna adaptibilnost cirkulirajućih oportunističkih patogenih mikroorganizama, uzročnika bolesti, nastala uslijed vršenja kontinuiranog selekcijskog pritiska, pri čemu je *A. baumannii* jedan od predstavnika skupine.

Upravo je neracionalna uporaba antibiotika širokog spektra, kao i iznimna adaptibilnosti samog *A. baumannii*, dovela do toga da nam je postantibiotska era liječenja infekcija vezanih uz acinetobakter nažalost na obzoru. Obzirom na izniman uspjeh ovog oportunističkog patogena, danas se pokušava što minucioznije proučiti za to zaslužne komponente, a s ciljem pronalaska mogućih novih terapijskih mogućnosti. U svijetu su već zabilježeni i panrezistentni sojevi, stoga je proučavanje mogućih učinaka netradicionalnih antimikrobnih lijekova u liječenju nastalih infekcija, kao i odgovornih činitelja virulencije samog mikroorganizma, u središtu zanimanja medicinske javnosti. Budući da su spoznaje učinka tradicionalnih i netradicionalnih antimikrobnih lijekova na sposobnost stvaranja biofilma i osjetljivost na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma, činitelje virulencije *A. baumannii*, vrlo oskudne, krenulo se i u ovo istraživanje.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je većina ispitivanih sojeva rezistentna na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma, kao i da subminimalne inhibitorne koncentracije ispitivanih antibiotika imaju učinak na sposobnost stvaranja biofilma i osjetljivost na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma u serum rezistentnih ispitivanih sojeva.

Baktericidni učinak seruma jedan je od najvažnijih mehanizama obrane domaćina od infekcije. Poznato je da su invazivni patogeni vrlo često otporni na taj učinak i da je rezistencija na serum važan činitelj virulencije invazivnih bakterija. Točan mehanizam rezistencije bakterija na serum još nije poznat, ali je poznato da uključuje promjenu površine bakterijske stanice koja interferira s aktivacijom i ulogom komplementa. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je većina 95% (65/68) ispitivanih sojeva prema definiranim

kriterijima, rezistentna na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma. Pored toga, svih 17 invazivnih izolata *A. baumannii*, podrijetlom iz krvožilnog sustava, bilo je rezistentno na baktericidnu aktivnost seruma, što je u skladu sa spoznajama o invazivnim patogenim bakterijama i patogenezi nastanka infekcije. Obzirom da nema standardne metode za ocjenu osjetljivosti bakterijskih stanica na serum, razlike u *in vitro* uvjetima mogu dovesti do značajnih razlika u rezultatima usporedivih studija (195). Da je većina *A. baumannii* sojeva rezistentna na serum, pokazali su Garcia i suradnici u ispitivanju provedenom na 18 kliničkih izolata, pri čemu je 16/18 (88,9%) bilo serum-rezistentno (148). Slične rezultate dobila je i skupina turskih autora u kojih je 72,9% (35/48) ispitivanih *A. baumannii* sojeva bilo rezistentno na serum (196). Rezultati ispitivanja učinka različitih koncentracija seruma na sedam sojeva *A. baumannii* tijekom trosatne inkubacije, koje su učinili King i suradnici, ukazuju na < 45% rezistenciju ispitivanih sojeva na baktericidnu aktivnost seruma. U tom je istraživanju 3/7 ispitivanih sojeva bilo rezistentno na baktericidnu aktivnost seruma, definiranu kao postotak preživljenja > 50% bakterija u ispitivanom serumu, u odnosu na kontrolni serum u kojem je komplement inaktiviran utjecajem topline (150). U tom su istraživanju serum osjetljivi sojevi bili definirani kao sojevi s postotkom preživljenja < 20% u odnosu na kontrolu. Slične rezultate zabilježila je i skupina autora iz Slovačke gdje je 62% (31/50) ispitivanih sojeva bilo rezistentno na serum (197). Značajno viši postotak rezistencije na baktericidnu aktivnost seruma u ovom ispitivanju (95% rezistencija na serum), u odnosu na druga istraživanja rezultat je postavljanja vrlo strogih kriterija za definiranje osjetljivosti na serum (≤10% preživjelih stanica), postavljenih radi promatranja učinka subminimalnih inhibitornih koncentracija ispitivanih antibiotika na bakterijske stanice.

Mehanizam rezistencije *A. baumannii* na komponente ljudskog seruma još uvijek nije sasvim jasan. U recentnoj literaturi naglašavase utjecaj BfmS kinaza na stvaranje biofilma, adhezijuna eukariotske stanice i rezistenciju na ljudski serum. Inaktivacijom senzorne kinaze, nastale otpuštanjem proteina vanjske membrane (CarO i OmpA) u *A. baumannii* 17978, pokazaose učinak BfmS senzorne kinaze vezan uz stvaranje biofilma, adheziju na stanice, rezistenciju na baktericidnu aktivnost seruma i antimikrobnu osjetljivost (198). Serinska proteaza PKF, koju su identificirali King i suradnici, također ima ulogu u rezistenciji na serum. Osim toga, odgovorna je i za supresiju stvaranja biofilma u *A. baumannii* (119). Gubitak lipopolisaharida u stijenci bakterijske stanice očituje se rezistencijom *A. baumannii* na kolistin, što dovodi do izmjene stimulacije imunološkog odgovora domaćina (dolazi do smanjenja stvaranja TNFα djelovanjem na NF-kB), ali bez učinka na serumsku rezistenciju.

Gubitak LPS dovodi do značajne izmjene aktivacije imunološkog odgovora domaćina. Stanice postaju osjetljivije na humani antimikrobni peptid LL-37, ali bez utjecaja na serumsku rezistenciju (199).

U literaturi se trenutno mogu naći različiti podaci i mišljenja otome ima li *Acinetobacter baumannii* kapsulu (K antigen) ili površinski (O) antigen ili oboje, što djelomice proizlazi iz činjenice da ponavljajuće gradivne jednice K ili O antigena imaju sličnu strukturu, a za njihovu sintezu je odgovoran sličan enzimski put. U nedavno publiciranoj studiji analize gena Kenyon i sur., eksplicitno ukazuju na prisutnost produkcije kapsularnog polisaharida uz odsutnost gena nužnih za stvaranje površinskih polisaharida (O antigena), pri čemu sami naglašavaju nužnost iscrpne biokemijske potvrde dobivenih rezultata (107). To govori u prilog multifaktorijalnosti fenotipske pojave rezistencije na baktericidnu aktivnost normalnog ljudskog seruma, posredovane nizom činitelja same bakterije (kapsula, LPS, PBP7/8, serinska proteaza, BfmS senzorna kinaza). Osim tih mehanizama, uzgojem *A. baumannii* ATCC 17978 soja u serumu došlo je do značajnog porasta aktivacije regulacijskih sustava za prikupljanje željeza, gena za adheziju na epitelne stanice i unos DNA. Pojačan je i učinak efluks pumpi odgovornih za izbacivanje antibiotika iz stanice. Provjera antimikrobne osjetljivosti sojeva kultiviranih u ljudskom serumu pokazala je značajan porast tolerancije na antibiotike u odnosu na soj uzgojen u LB mediju. To možda objašnjava iznimnu adaptibilnost ove bakterijske vrste i pruža uvid u molekularne osnove uspješne virulencije i mogućnost razvoja rezistencije mikroorganizma na antimikrobne lijekove (200).

Rezultati istraživanja minimalnih inhibitornih koncentracija ispitivanih antibiotika, govore u prilog još uvijek prisutne osjetljivosti ispitivanih sojeva na kolistin iako su u svijetu već opisani rezistentni sojevi i horizontalni prijenos gena. Zabrinjavajuća je činjenica što je od 2009. godine većina (27/44) ispitivanih sojeva rezistentna na imipenem. Podatak o pojavi novog rezistentnog klona u Hrvatskoj već je ranije publiciran (42, 201).

Netradicionalni antibiotici u koncentracijama od ili iznad MIK-a pokazuju baktericidni učinak na *A. baumannii*, sami ili u kombinaciji s drugim antibiotikom. Nasuprot tome, podatci o učincima subminimalnih inhibitornih koncentracija antibiotika, bilo tradicionalnih ili ne, a poznati u drugih bakterijskih vrsta, u literaturi su rijetko zastupljen i za *A. baumannii*.

Subminimalne inhibitorne koncentracije azitromicina i kombinacije ampicilina sa sulbaktamom pokazale su statistički značajan učinak na osjetljivost ispitivanih serum

rezistentnih sojeva na baktericidnu aktivnosti ljudskog seruma. Ostali ispitivani antibiotici (imipenem, rifampicin i kolistin) nisu pokazivali statistički značajnu razliku učinka osjetljivosti na baktericidnu aktivnost seruma. Ti se rezultati razlikuju od rezultata koje je objavila Hostacka i sur. Izlaganjem kliničkih izolata *A. baumannii* iz urotrakta, ona je uočila statistički značajan učinak sub-MIK-a imipenema 1/4, 1/8 i 1/16 MIK-a, a isti je učinak izostao kod kliničkih izolata iz respiratornog trakta (202).

Svi su ispitivani serum osjetljivi sojevi stvarali biofilm. Ti se rezultati razlikuju od rezultata King i suradnika koji su utvrdili da većina serum rezistentnih sojeva stvara veću količinu biofilma, a većina serum osjetljivih sojeva stvara zanemarivu količinu biofilma. Ispitivanje sposobnosti stvaranja biofilma u izolatima *A. baumannii* iz aspirata traheje, koje su proveli Kaliterna i suradnici, pokazalo je da 5/30 pripadnika EU klona I i 28/31 pripadnika EU klona II stvara biofilm. Njihovi rezultati pokazuju da izolati koji pripadaju EU I klonu ne stvaraju biofilm (OD_{570nm}< 0,5) ili tek u niskoj količini (OD_{570nm} 0,5-1), dok većina sojeva pripadnika EU klonu II ima izraženu produkciju biofilma (OD_{570nm}> 1,4). Osim toga, u njihovu istraživanju su pripradnici EU klona II bili multirezistentni i pokazivali isti fenotipski obrazac osjetljivosti samo na kombinaciju ampicilin i sulbaktama te kolistin (203). Njihovi se rezultati razlikuju od drugih istraživanja u kojima nije nađena veza klonske pripadnosti, rezistencije i mjesta izolacije ispitivanih sojeva, ili nije određivana (94, 153, 203). Zaključak da je stvaranje biofilma odlika klona, a ne vrste, proteže se i u drugim istraživanjima, uz zadršku da je to još potrebno dokazati. Rezultati ovog istraživanja govore u prilog činjenice da je sposobnost stvaranja biofilma odlika klona, a ne cijele bakterijske vrste, što je između ostalog potkrijepljeno karakterizacijom SMAL klona koji ne pripada niti jednom od poznatih Europskih klonova (93).

Obzirom su u istraživanju ispitivani učinci sub-MIK-a antibiotika na sojeve *A. baumannii* izabrane iz zbirke sojeva prikupljene u dužem vremenskom periodu, očekivana je njihova genska raznolikost. U ispitivanih izabranih sojeva prikupljenih tijekom 2007. godine, u dendrogramu se vidi njihovo preslagivanje u 3 skupine od kojih većina 12/15 (80%) stvara biofilm. Od svibnja 2011. do srpnja 2012. godine u izabranim sojevima dominiraju 3 klonske skupine u kojima se može vidjeti cirkulacija klonova između JIL-a i kirurških odjela. 14/42 (33%) soja koji dominiraju od 2009. godine na ovamo su inicijalno stvarali biofilm, u odnosu na većinu od 28/42(67%) ispitivana koji nisu. Nasuprot tome, tijekom 2007. godine su cirkulirali sojevi sposobni stvarati biofilm, a koji su osjetljivi na imipenem. Espinal i suradnici su opisali da su sojevi koji ne stvaraju biofilm rezistentniji na karbapeneme od onih

koji nemaju tu mogućnost (94). Rodriguez-Bano i suradnici su također opisali da su sojevi koji stvaraju biofilm osjetljiviji na karbapeneme (153). Nasuprot rezultatima španjolskih autora su rezultati klonalne raspodjele 61 izolata *A. baumannii* porijeklom iz endotrahealnog aspirata koje su dobili Kaliterna i suradnici. Njihovi rezultati ukazuju na znatno više MIK-ove imipenema i njihovu povezanost sa stvaranjem biofilma (203). Rezultati ove studije su u skladu sa rezultatima španjolskih autora.

Prema kliničkom porijeklu uzoraka iz kojih su izolirani ispitivani sojevi *A. baumannii*, isti su svrstani u pet skupina. Najzastupljeniji su uzorci vezani uz kožu i potkožje (skupina 1, n=22) među kojima je podjednaka zastupljenost sojeva koji produciraju biofilm u odnosu na one koji tu mogućnost nemaju. Slijede izolati porijeklom iz respiratornog sustava (skupina 2; n=21) sa istom raspodjelom zastupljenosti sojeva koji stvaraju biofilm i onih koji ne kao i u skupini 1, dok izolati vezani uz infekcije kardiovaskulanog sustava (skupina 4; n=17) većinom nemaju sposobnost stvaranja biofilma. Izolati iz likvora (skupina 5; n=4) u polovici slučajeva stvaraju biofilm, dok su izolati porijeklom iz urinarnog sustava (skupina 3; n=4) samo u 25% slučajeva pokazivali sposobnost stvaranja biofilma. U jednoj studiji je uočeno da 44% izoliranih sojeva porijeklom vezano uz infekcije rana ima sposobnost produkcije biofilma (204). U ovom je istraživanju taj postotak iznosio 55% (12/22) gledano u skupini izolata vezanih uz kožu i potkožje, odnosno 35% (12/34) u ukupnoj populaciji ispitivanih sojeva sa sposobnošću stvaranja biofilma. Zastupljenost biofilm producirajućih izolata iz respiratornog sustava također je visoka i iznosi 57% (12/21) u skupini 2, odnosno također 35% (12/34) u ukupno ispitivanoj populaciji. Obzirom da je već opisana važna uloga sposobnost stvaranja biofilma involvirane bakterijske populacije u procesu nastanka kronične infekcija rane, kao i ostalih kroničnih infekcija, ne začuđuje podatak o velikom udjelu ispitivanih sojeva porijeklom s površinskih rana sa evidentnom mogućnosti stvaranja biofilma (131, 205). Korelacija postoji i kod izolata iz respiratornog sustava jer su to većinom porijeklom iz endotrahealnih aspirata u osoba na mehaničkoj ventilaciji, gdje je stvaranje biofilma također povoljno i poželjno svojstvo unutar članova bakterijske populacije, odgovorno za preživljenje i propagaciju vrste. Slična situacija je uočena i u populaciji invazivnih izolata porijeklom iz krvi (skupina 4) i likvora (skupina 5) dok je jedino u sojeva porijeklom iz urotrakta samo 1 (25%) soj stvarao biofilm.

U literaturi je opisana veća sposobnost stvaranja biofilma u kliničkih izolata *A. baumannii* izoliranih iz sputuma u odnosu na izolate iz krvi (206). Prigodom ispitivanja

pokretljivosti, u istih je kliničkih izolata izoliranih iz krvi uočena veća pokretljivost u odnosu na ranije navedene kliničke izolate iz sputuma. Nadalje, u istom istraživanju nije uočena povezanost između MDR fenotipa i produkcije biofilma ispitivanih sojeva, ali je zabilježena najveća produkcija biofilma u kliničkog izolata iz sputuma s MIK-om meropenema 512 mg/l (206).

Uglavnom, dva se svojstva uobičajeno povezuju uz sposobnost stvaranja biofilma bakterija, a to su povećano stvaranje egzopolisaharida i razvoj otpornosti na antibiotike (131). Adhezija stanica i stvaranje biofilma na staklenim površinama svojstva su kliničkih izolata koja se najvjerojatnije povezuju uz sposobnost preživljenja u bolničkom okružju i na medicinskoj opremi, s posljedicom izazivanja infekcija u imunompromitiranih bolesnika. Wroblewska i suradnici su pokušali na 34 klinička izolata pokazati postojanje veze (korelacija) između sposobnosti stvaranja biofilma, genotipa soja, mjesta izolacije, rezistencije na karbapeneme i trajanja hospitalizacije. Povezanost sposobnosti stvaranja biofilma, molekularnog tipa, rezistencije na karbapeneme ili mjesta s kojeg je soj izoliran u bolesnika iz dvije kliničke bolnice nisu uspjeli utvrditi. Uočili su samo činjenicu da je u istog bolesnika iz kronične rane, za mjesec dana, ponovno izoliran *A. baumannii* koji je imao sposobnost stvaranja veće količine biofilma u odnosu na prvi izolat iz iste kronične rane. Rezultati njihova istraživanja nakon šestodnevne inkubacije ispitivanih sojeva u mikrotitar pločicama, kvantifikacije stvaranja biofilma bojanjem kristalvioletom i mjerenjem apsorbancije na 580 nm, uz vrijednosti $\geq$ 2,0 definirane u sojeva s visokom produkcijom biofilma, zabilježene su u 12% njihovih ispitivanih sojeva. Optička gustoća (eng. optical density, OD) od 1,0 do 1,9 zapažena je u 41% sojeva koji su definirani kao „produceri srednjeg stupnja“ i OD $\leq$ 0,9 u 47% niskoproducirajućih sojeva. Rezultati njihovog istraživanja ukazuju da nema korelacije između sposobnosti stvaranja biofilma i molekularnog tipa, karbapenemske rezistencije i mjesta izolacije ispitivanih *A. baumannii* sojeva. Maksimalno stvaranje biofilma uočeno je nakon 24-48 sati inkubacije, ali su visokoproducirajući sojevi pokazali vremensku ovisnost stvaranja biofilma tijekom inkubacije produžene do 6 dana (139). Nasuprot njima, druga skupina autora je ispitavanjem provedenim na 23 MDAB soja uočila značajnu korelaciju između ekspresije PER-1 i stvaranja biofilma odnosno stanične adhezije (134). *A. baumannii* izolati s $bla_{\text{PER-1}}$ genom pokazali su značajno veću sposobnost adhezije na epitelne stanice i stvaranje biofilma u odnosu na izolate bez istog gena (134). Iako je 12 izolata s $bla_{\text{PER-1}}$ genom klonalno povezano, stupanj ekspresije navedenog gena jako je varirao između izolata i pokazao značajnu korelaciju sa sposobnošću

pojedinog izolata da stvara biofilm i adherira na epitelne stanice (134, 207). I drugi su autori u rezultatima svojih istraživanja pokazali povezanost produkcija PER-1 β-laktamaze proširenog spektra uz staničnu adheziju (208). U kohortnoj studiji, koja je u JIL-u uspoređivala klinički ishod bolesnika inficiranih sojevima *A. baumannii* rezistentnih na treću generaciju cefalosporina, pokazana je produkcija PER-1 kao nezavisni indikator loše prognoze konačnog ishoda infekcije (209). Može se pretpostaviti da je to posljedica visoke sposobnosti stvaranja biofilma u sojeva koji nose $bla_{\text{PER-1}}$ gen (134). Poznato je da EDTA, ima učinak na stvaranje biofilma u nekih bakterijskih vrsta kao što su *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. i *Pseudomonas aeruginosa* (142, 210, 211). Čini se da je redukcija broja kolonizirajućih bakterijskih stanica u prisutstvu EDTA rezultat odvajanja stanica biofilma, a ne inhibicije njihovog rasta, što direktno ukazuje na ranije uočen pozitivan učinak ispiranja otopinom s EDTA (134, 142, 210, 211). Costa i sur. su našli pozitivnu korelaciju stupnja bakterijske hidrofobnosti i adhezije na nežive površine (212). Tu je 63% (56/92) ispitivanih klonski nepovezanih sojeva stvaralo biofilm. Izolati vezani uz urinarne infekcije, bakterijemije ili shunt-meningitis češće su stvarali biofilm. Biofilm producirajući sojevi su bili sporadični izolati, osjetljiviji od neproducirajućih na imipenem i ciprofloksacin. Ranija je primjena aminoglikozida povezana s izolacijom biofilm-producirajućih sojeva. Svi klonalno povezani sojevi dijelili su isto svojstvo odnosno sposobnost/nesposobnost stvaranja biofilma, što je ukazivalo da je to odlika klona, a ne vrste i da se ekspresija bitno ne mijenja u različitim uvjetima. Ispitivanjem nepovezanih kliničkih izolata, u > 60% je detektirano stvaranje biofilma, a isti su većinom bili vezani uz infekcije pridruženih materijala (153). Neki su istraživači opisali da su sojevi koji stvaraju biofilm rezistentniji od sojeva koji biofilm ne stvaraju, ali je bilo i upravo suprotnih rezultata, kao i onih da nema razlike u produkciji biofilma između MDR i osjetljivih sojeva *A. baumannii* (94, 95, 134, 153, 204). Obzirom da je biofilm izrazito hidratiziran, produkcija biofilma može spriječiti smrtonosnu dehidraciju, tako služiti kao zaštita od promjena vlažnosti okoline i na taj način pridonijeti mehaničkoj stabilnosti, duljem preživljenju i antimikrobnoj rezistenciji (92, 94, 132).

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da je 38% (26/68) ispitivanih sojeva imalo MIK imipenema >2 mg/L na temelju čega se prema smjernicama EUCAST-a smješteni u kategoriju sojeva umjereno osjetljivih odnosno rezistentnih na imipenem. Polovica (13/26) tih sojeva je inicijalno pokazivala sposobnost stvaranja biofilma, a drugih 50% nije, odnosno 19% (13/68) ukupno ispitivanih sojeva je imalo MIK imipenema > 2 mg/l i pokazivalo sposobnost stvaranja biofilma. Ti se podatci razlikuju od rezultata Kumari i suradnika koji su

dokazali povezanost rezistencije *Acinetobacter* spp. na imipenem uz jaču sposobnosti stvaranja biofilma. Od 65 ispitivanih sojeva u tom istraživanju, 30 je bilo rezistentno na imipenem prema CLSI smjernicama (> 16 mg/l) pri čemu su sedam od tih sojeva bili snažni proizvođači biofilma, 13 blagi, a 10 su slabo stvarali biofilm prema zadanim kriterijima (213). Pozitivna korelacija multiple rezistencije na antibiotike i stvaranja biofilma također je uočena i u drugoj studiji, u kojoj je od ukupno 55 izolata rezistentinih na imipenem u 34 (62%) detektirana sposobnost stvaranja biofilma i to prema određenim rezistotipovima. U istom je istraživanju u 11 ispitivanih sojeva nađen i $bla_{\text{PER-1}}$ gen. Obzirom da je u tom istraživanju od 11 $bla_{\text{PER-1}}$ pozitivnih samo u dva soja detektirana snažna produkcija biofilma, a ostalih 9 su stvarali nisku razinu biofilma uz slabu adhezivnost. Rezultati ove skupine autora, sukladni su rezultatima Sechi i suradnika prema kojima se prisutnost $bla_{\text{PER-1}}$ gen vezuje uz snažniju adheziju stanica i na temelju toga su oni zaključili da je prisutnnost tog gena i PER-1 β–laktamaze, kritičnijje za staničnu adheziju nego za stvaranje biofilma (204, 208). Kim i suradnici su nasuprot tome ukazali na snažnu povezanost između sposobnosti stvaranja biofilma i produkcije PER-1 β–laktamaze(134). Do sličnih zapažanja nedavno je došao i Perez koji je u 116 ispitivanih sojeva *A. baumannii* uočio inverznu pojavu osjetljivosti na meropenem i sposobnosti stvaranja biofilma prema čemu meropenem rezistentni sojevi stvaraju manju količinu biofilma (214).

Statistički značajna redukcija sposobnosti stvaranja biofilma ispitivanih sojeva s MIK-om imipenema > 2 mg/l opažena je upravo u skupini biofilm producirajućih sojeva i to samo pri 1/2 MIK-a imipenema, što još uvijek govori u prilog *in vivo* sposobnosti redukcije i izazivanja učinka antibiotika neovisno o „interpretacijskom“ smanjenju/ gubitku sposobnosti učinka inkriminiranog antibiotika *in vitro.*

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da subminimalne inhibitorne koncentracije antibiotika imaju učinak na sposobnost stvaranja biofilma. U ispitivanih sojeva koji stvaraju biofilm došlo je do inhibicije (supresije) njegove produkcije za neke od ispitivanih antibiotika. Uočen učinak je statistički značajan za subminimalne inhibitorne koncentracije imipenema, azitromicina, rifampicina i kolistina. Ampicilin/sulbaktam nije pokazivao statistički značajnu sposobnost redukcije stvaranja biofilma.

Pour i sur su proučavali učinak 1/2 i 1/4 MIK-a kolistina na umjetno izazvanu adheziju šest izabranih *A. baumannii* sojeva na urinarne katetere. U sub-MIK-u antibiotika sojevi su uzgajani 24 sata pri 30°C. Isprani kateteri su potom rolani po površini LB agara i nakon

inkubacije 24 sata izbrojan je broj poraslih kolonija. U ukupno 50 ispitivanih sojeva, detektirali su veću adheziju na polipropilen u odnosu na staklo. U šest izdvojenih sojeva u daljnjem je postupku određena njihova osjetljivost na kolistin, uz zamjećenu 33% rezistenciju na karbapeneme. Izlaganjem šest izdvojenih sojeva 1/2 i 1/4 x MIK-a kolistina došlo je do značajne redukcije adhezivne sposobnost sojeva pri čemu 1/2 MIK-a kolistina ima izraženiji učinak (183). Također su utvrdili da sojevi s najjačom adhezijom mogu stvarati biofilm i u statičkim kao i u dinamičkim uvjetima, što bakterijama direktno omogućuje uspješnu perzistenciju u medicinskom okružju gdje su bakterije neprestano izložene snagama strujanja tekućine poput onih prisutnih u urinarnom kateteru. Osim toga, uočili su da temperatura, pH i koncentracija soli također utječu na stvaranje biofilma. Smatra se da je stvaranje lektina također važan čimbenik u adheziji i patogenezi bakterijskih stavica, a lektin je detektiran u svih šest izabranih sojeva izloženih učinku sub-MK-a kolistina.

U ovom istraživanju nije uočena statistički značajna sposobnost stvaranja biofilma u različitim sub-MIK koncentracijama antibiotika koju su 2009. opisali Nucleo i suradnici. Ta je grupa talijanskih autora u dobro definiranom SMAL klonu, uspjela izazvati indukciju stvaranja biofilma u sub-MIK-u imipenema, u biofilm negativnih sojeva. Pritom je također uočeno da prigodom detekcije stvaranja biofilma na abiotičkim površinama (polistirenske mikrotitar pločice), značajnu ulogu ima medij koji se koristi kao i temperatura. Tako je površinska adhezija vrlo slaba u hranjivom Luria-Bertani (LB) bujonu pri 30°C odnosno 37°C. Nasuprot tome, u razrijeđenom LB bujonu (1/4) stvaranje je bilo stimulirano, ali samo pri 30°C. Glukozni je bujon (M9Glu/sup) stimulirao adheziju pri obje temperature, dok je glukozni medij s dodatkom saharoze (M9 Suc/sup) rezultirao znatno nižom stimulacijom adhezije (93). Površinska adhezija *A. baumanni* sojeva u M9Glu/sup posredovana je stvaranjem celuloze, a stvara se kao ekstracelularni polisaharid u mnogo bakterija (93, 215-218). Celuloza, kao i drugi ekstracelularni polisaharidi štite bakterijsku stanicu od okolišnog stresa poput isušivanja i oksidativnog stresa (H_2O_2) (215, 219). Rezultati Nucleo i sur. direktno govore u prilog tome da izlaganje sojeva subminimalnim inhibitornim koncentracijama imipenema stimulira unos željeza i pojačano stvaranje adhezivnih čimbenika i time dolazi do stvaranja biofilma (93).

Prigodom analize učinka subminimalnih inhibitornih koncntracija ispitivanih antibiotika na osjetljivost na baktericidnu aktivnost seruma u ovisnosti o porijeklu ispitivanog soja i pripadnosti jednoj od formiranih skupina, uočen je statistički značajan učinak u skupini 2,

odnosno u izolatima porijeklom iz respiratornog sustava za kombinaciju ampicilin/sulbaktam u sve 4 ispitivane sub-MIK koncentracije, kao i za azitromicin uskupini BSI izolata samo kod najvećeg sub-MIK–a. Rifampicin i kolistin nisu pokazali statistički značajan učinak na ispitivana svojstva. Imipenem također nije pokazivao učinak na osjetljivost na baktericidnu aktivnost seruma u ispitivanim koncentracijama i skupinama, a opažena frekvancija učinka na sposobnost stvaranja biofilma nije statistički značajna. Jedini statistički značajan učinak na sposobnost stvaranja biofilma ispitivanih sojeva razvrstanih po skupinama pokazivao je azitromicin u 1/4 i 1/16 koncentracije MIK-a za skupinu 1, te 1/2 i 1/4 MIK-a u skupini 2 i 1/4 MIK-a u skupini 4. Iz ovoga bi se moglo zaključiti da je ampicilin/sulbaktam dobar izbor u liječenju respiratornih infekcija/kolonizacija radi svog učinka na osjetljivost na baktericidnu aktivnost seruma, a azitromicin vjerojatno zbog svoje sposobnosti imunomodulacije i učinka i na sposobnost stvaranja biofilma i na osjetljivost na baktericidnu aktivnost seruma, svakako dobar terapijski izbor odnosno dodatak u kombiniranoj terapiji prigodom liječenja infekcija vezanih uz acinetobakter.

Obzirom na različitu sposobnost indukcije stvaranja biofilma, bilo bi zanimljivo proučiti eventualnu sposobnost indukcije stvaranja biofilma u *A. baumannii* u koncentracijama 1/2 < x >1 MIK što je već opisano u drugih vrsta. Poseban je značaj toga što su te subminimalne inhibitorne koncentracije vrlo često prisutne *in vivo* tijekom antibiotskog liječenja, a farmakokinetski i farmakodinamički učinci samog lijeka koriste se upravo u svrhu postizanja što bolje suradljivosti bolesnika, smanjenja troškova liječenja, kao i korištenja neuobičajenih kombinacija u svrhu postizanja izlječenja. Zasigurno slijede nove studije iz ovog područja, jer je skrb o imunokompromitiranim bolesnicima, ciljnoj populaciji ovog oportunističkog nozokomijalnog patogena, postala veliko financijsko i tehičko opterećenje ustanova vezanih uz zdravstvenu skrb radiučestale diseminacije i kolonizacije bakterije i upravo teškog, a ponekad nemogućeg (iz)lječenja oboljelog.

Infekcije multiplorezistentnim sojevima acinetobaktera vezane su uz mortalitet bolesnika od 19 do 54%, ali je sama stopa smrtnosti vezana uz težinu osnovne bolesti (220, 221). Nedostatak konsenzusa o pripisivom mortalitetu *A. baumannii* nastaje zbog teškoće razlučivanja kolonizacije od infekcije uzrokovane ovom bakterijskom vrstom i, povrh svega, ograničeno je našim manjkavim znanjem o patogenezi same infekcije. Osim navedenog, uslijed sve veće otpornosti na antibiotike, infekcije uzrokovane ovom vrstom postaju ozbiljan i zahtjevan terapijski problem. Bolesnici, bilo kolonizirani ili inficirani sojevima *A.*

baumannii pokazuju tendenciju za lošiji konačni ishod. Nove spoznaje o patogenezi bakterijske infekcije kao i o mogućim novim terapijskim opcijama, hvalevrijedan su pokušaj osvjetljavanja problematike ovog emergentnog patogena ili su ipak samo vrsta požarnih mjera prije kraha antimikrobne terapije. U svakom slučaju nove spoznaje, nastale kao rezultat ovog istraživanja, o pozitivnom učinku netradicionalnih lijekova (azitromicina i rifampicina) trebale bi naći svoje mjesto u kliničkoj praksi i primjenu u liječenju infekcija uzrokovanih multiplorezistentnnim *A. baumannii*.

7.0. ZAKLJUČCI

Na temelju izloženih rezultata istraživanja mogu se izvesti slijedeći zaključci:

1. Većina ispitivanih sojeva rezistentna je na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma
2. Svi ispitivani *A. baumannii* sojevi, podrijetlom iz kadiovaskularnog sustava, bili su rezistentni na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma
3. Subminimalne inhibitorne koncentracije imipenema, azitromicina, rifampicina i kolistina suprimiraju stvaranje biofilma u ispitivanih biofilm pozitivnih sojeva
4. Subminimalne inhibitorne koncentracije ampicilin/sulbaktama nisu pokazale statistički značajan učinak supresije stvaranja biofilma
5. Ispitivani antibiotici nisu pokazali statistički značajnu sposobnost indukcije stvaranja biofilma u biofilm negativnih sojeva
6. Subminimalne inhibitorne koncentracije azitromicina i ampicilin/sulbaktama imaju učinak na osjetljivost ispitivanih serum rezistentnih sojeva na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma
7. Subminimalne inhibitorne koncentracije imipenema, rifampicina i kolistina nisu imale statistički značajan učinak na osjetljivost ispitivanih sojeva na baktericidnu aktivnost seruma

8.0. SAŽETAK

Cilj istraživanja: *Acinetobacter baumannii* je jedan od vodećih uzročnika oportunističkih infekcija vezanih uz zdravstvenu skrb. Činitelji virulencije nisu još dovoljno poznati, a obzirom na brzu propagaciju u bolničkom okružju i brzo stjecanje mehanizama rezistencije, predstavlja veliki zdravstveni problem. Cilj istraživanja bio je utvrditi učinak subminimalnih inhibitornih koncnetracija imipenema, ampicilin/sulbaktama, azitromicina, rifampicina i kolistina na sposobnost stvaranja biofilma i osjetljivost na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma kliničkih izolata *A. baumannii*

Materijal i metode:Iz zbirke kliničkih izolata *A. baumannii,* na temelju sposobnosti stvaranja biofilma u mikrotitar pločici, formirane su 2 ispitivane skupine s po 34 ispitivana soja kojima, je utvrđena osjetljivost na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma. Sojevima su određene minimalne inhibitorne koncentracije imipenema, ampicilin/sulbaktama, azitromicina, rifampicina i kolistina. Zatim su ispitivani sojevi tijekom 18-24 sata izlagani 1/2, 1/4, 1/8 i 1/16 ispitanog MIK-a. Nakon izlaganja sub-MIK-u antibiotika, ponovno je u prema istim kriterijima u mikrotitar pločici određena sposobnost stvaranja biofilma, kao i brojanjem poraslih bakterijskih kolonija na površini Mueller Hinton agara, određen postotak preživljenja bakterijskih stanica nakon izlaganja normalnom i toplinom inaktiviranom ljudskom serumu.

Rezultati: 65/68 ispitivanih sojeva *A. baumannii* rezistentno je na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma. Sub-MIK-e imipenema i azitromicina su imale statistički značajan učinak na supresiju stvaranja biofilma u 34 biofilm producirajuća soja pri sve četiri ispitivane koncentracije ispod MIK-a. U ispitivanoj je skupini postignut statistički značajan učinak rifampicina u 1/2 i 1/4 MIK-a, za kolistin, učinak je značajan pri 1/2 i 1/8 MIK-a. Statistički značajan učinak ispitivanja osjetljivost ispitivanih sojeva prema baktericidnoj aktivnosti ljudskog seruma je postignut za ampicilin/sulbaktam i azitromicin u sve četiri ispitivane koncentracije ispod MIK-a.

Zaključak: Sub-MIK azitromicina ima učinak na oba ispitivana svojstva, supresiju stvaranja biofilma i osjetljivost na baktericidnu aktivnost seruma. Stvaranje biofilma suprimiraju imipenem, rifampicin i kolistin, a pored azitromicina, samo ampicilin/sulbaktam ima učinak na osjetljivost prema baktericidnoj aktivnosti seruma. Ispitivani antibiotici nisu pokazali sposobnost indukcije stvaranja biofilma u ispitivanih *A. baumannii* sojeva.

Ključne riječi: *Acinetobacter baumannii*, biofilm, serumska rezistencija, subminimalna inhibitorna koncentracija antibiotika

9.0. SUMMARY

***In vitro* effect of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics onto biofilm production and sensitivity of human serum bactericidal activity in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates.**

Objectives: *Acinetobacter baumannii* is one of the main causers of opportunistic nosocomial infections. Regarding its ability of rapid dissemination in hospital enviorment and acquiring mechanisms of antimicrobial resistance, it represents global healthcare-associated problem. Its virulence factors and resistance mehanisms, due to which it can rapidly colonise and infect patients, are still underestimated and poorly understood. The aim of this study was to evaluate *in vitro* effect of subminimal inhibitory concentrations of imipenem, ampicilin/sulbactam, azithromycin, rifampicin and colistin onto the ability of biofilm formation and sensitivity to bactericidal activity of human serum of clinical *A. baumannii* isolates.

Material and methods: From the collection of *A. baumannii* isolates, based on microtiter biofilm formation assay, two groups were formed: one group containing 34 *A. baumannii* biofilm positive, and another with 34 biofilm negative isolates.Serum bactericidal tests were performed and serum sensitivity was detected by colony count after exposure to undiluted human serum for two hours. Serum sensitive isolates were the ones with viabile cell count <10% in comparison to control. MICs for imipenem, ampicilin/sulbactam, azithromycin, rifampicin and colistin were detected and after 18-24 hour exposition of isolates to antibiotic concentrations ½, ¼, ⅛ i $^{1}/_{16}$ of MIC, the microtiter biofilm formation assay and serume bactericidal tests again conducted to determine effect of antibiotic subMICs onto these two virulence determinants.

Results: Sixty-five of sixty-eight tested strains accounted for resistant to human serum. All tested imipenem and azithtromycin subMICs exhibited statistically significant suppression of biofilm formation in biofilm positive strains. The effect of rifampicin was statistically significant in biofilm formation at ½ and ¼ of MIC, as well as for colistin at ½ and ⅛ of MIC. Statistically significant effect of sensitivity to human serum bactericidal effect was detected for ampicilin/sulbactam and azithromycin at all four tested concentrations bellow MIC.

Conclusion: Azithromycin exhibited the best effect among tested antibiotics. It suppressed biofilm formation and had serum bactericidal activity enhanced. Biofilm formation was impaired when medium containing ampicilin/sulbactam was used. Nontheless, rifampicin, imipenem and colistin also exhibited significantly different biofilm formation production

suppression. Ampicilin/sulbactam also established effect on serum resistance. Ability to induce biofilm formation was not detected.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, biofilm, serum resistance, subminimal inhibitory concentration of antibiotic.

10.0. LITERATURA

1. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii: mechanisms of virulence and resistance. International journal of antimicrobial agents. 2010;35(3):219-26. Epub 2010/01/06.

2. Towner KJ. Acinetobacter: an old friend, but a new enemy. The Journal of hospital infection. 2009;73(4):355-63. Epub 2009/08/25.

3. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clinical microbiology reviews. 1996;9(2):148-65. Epub 1996/04/01.

4. Hawkey P, Bergogne-Berezin E. Acinetobacter spp. In: Hawkey P, Gillespie S, editors. Principles and practice of clinical bacteriology. 2nd ed. Chichester: Wiley; 2006. p. 231-44.

5. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2007;51(10):3471-84. Epub 2007/07/25.

6. Gerner-Smidt P. Ribotyping of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex. Journal of clinical microbiology. 1992;30(10):2680-5. Epub 1992/10/01.

7. Espinal P, Roca I, Vila J. Clinical impact and molecular basis of antimicrobial resistance in non-baumannii Acinetobacter. Future microbiology. 2011;6(5):495-511. Epub 2011/05/19.

8. Roca I, Espinal P, Vila-Farres X, Vila J. The Acinetobacter baumannii Oxymoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace. Frontiers in microbiology. 2012;3:148. Epub 2012/04/27.

9. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen. Clinical microbiology reviews. 2008;21(3):538-82. Epub 2008/07/16.

10. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. BMC infectious diseases. 2006;6:130. Epub 2006/08/18.

11. Webster C, Towner KJ, Humphreys H. Survival of Acinetobacter on three clinically related inanimate surfaces. Infection control and hospital epidemiology. 2000;21(4):246. Epub 2000/04/27.

12. Lopez-Rojas R, Smani Y, Pachon J. Treating multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infection by blocking its virulence factors. Expert review of anti-infective therapy. 2013;11(3):231-3. Epub 2013/03/06.

13. Braun G. Virulence mechanisms of Acinetobacter. In: Bergogne-Berezin E, Friedman H, Bendinelli M, editors. Acinetobacter Biology and Pathogenesis. New York, USA: Springer Science+ Busines Media; 2010. p. 145-54.

14. Jawad A, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. Exceptional desiccation tolerance of Acinetobacter radioresistens. The Journal of hospital infection. 1998;39(3):235-40. Epub 1998/08/12.

15. Catalano M, Quelle LS, Jeric PE, Di Martino A, Maimone SM. Survival of Acinetobacter baumannii on bed rails during an outbreak and during sporadic cases. The Journal of hospital infection. 1999;42(1):27-35. Epub 1999/06/11.

16. Cerqueira GM, Peleg AY. Insights into Acinetobacter baumannii pathogenicity. IUBMB life. 2011;63(12):1055-60. Epub 2011/10/13.

17. Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. Survival of Acinetobacter baumannii on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. Journal of clinical microbiology. 1998;36(7):1938-41. Epub 1998/07/03.

18. Musa EK, Desai N, Casewell MW. The survival of Acinetobacter calcoaceticus inoculated on fingertips and on formica. The Journal of hospital infection. 1990;15(3):219-27. Epub 1990/04/01.

19. Wendt C, Dietze B, Dietz E, Ruden H. Survival of Acinetobacter baumannii on dry surfaces. Journal of clinical microbiology. 1997;35(6):1394-7. Epub 1997/06/01.

20. Getchell-White SI, Donowitz LG, Groschel DH. The inanimate environment of an intensive care unit as a potential source of nosocomial bacteria: evidence for long survival of Acinetobacter calcoaceticus. Infection control and hospital epidemiology. 1989;10(9):402-7. Epub 1989/09/01.

21. Lopez M, Blasco L, Gato E, Perez A, Fernandez-Garcia L, Martinez-Martinez L, et al. Response to Bile Salts in Clinical Strains of Acinetobacter baumannii Lacking the AdeABC Efflux Pump: Virulence Associated with Quorum Sensing. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2017;7:143. Epub 2017/05/26.

22. Berlau J, Aucken H, Malnick H, Pitt T. Distribution of Acinetobacter species on skin of healthy humans. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 1999;18(3):179-83. Epub 1999/06/05.

23. Al-Khoja MS, Darrell JH. The skin as the source of Acinetobacter and Moraxella species occurring in blood cultures. Journal of clinical pathology. 1979;32(5):497-9. Epub 1979/05/01.

24. Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of Acinetobacter. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2005;11(11):868-73. Epub 2005/10/12.

25. La Scola B, Raoult D. Acinetobacter baumannii in human body louse. Emerging infectious diseases. 2004;10(9):1671-3. Epub 2004/10/23.

26. Houhamdi L, Raoult D. Experimental infection of human body lice with Acinetobacter baumannii. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2006;74(4):526-31. Epub 2006/04/12.

27. Hrenovic J, Goic-Barisic I, Kazazic S, Kovacic A, Ganjto M, Tonkic M. Carbapenem-resistant isolates of Acinetobacter baumannii in a municipal wastewater treatment plant, Croatia, 2014. Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2016;21(15). Epub 2016/04/23.

28. Goic-Barisic I, Seruga Music M, Kovacic A, Tonkic M, Hrenovic J. Pan Drug-Resistant Environmental Isolate of Acinetobacter baumannii from Croatia. Microb Drug Resist. 2017;23(4):494-6. Epub 2016/10/30.

29. Larson E. A decade of nosocomial Acinetobacter. American journal of infection control. 1984;12(1):14-8. Epub 1984/02/01.

30. Vaque J, Rossello J, Arribas JL. Prevalence of nosocomial infections in Spain: EPINE study 1990-1997. EPINE Working Group. The Journal of hospital infection. 1999;43 Suppl:S105-11. Epub 2000/02/05.

31. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin MH, et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. Jama. 1995;274(8):639-44. Epub 1995/08/23.

32. Abbott I, Cerqueira GM, Bhuiyan S, Peleg AY. Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies. Expert review of anti-infective therapy. 2013;11(4):395-409. Epub 2013/04/10.

33. Point Prevalence survey of healthcare associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. [database on the Internet]. ECDC. 2013.

34. Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P, Janssen P, Kaufmann ME, Garaizar J, et al. Comparison of outbreak and nonoutbreak Acinetobacter baumannii strains by genotypic and phenotypic methods. Journal of clinical microbiology. 1996;34(6):1519-25. Epub 1996/06/01.
35. van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden T, Bakker N, Paauw A, van den Broek P, et al. Identification of a new geographically widespread multiresistant Acinetobacter baumannii clone from European hospitals. Research in microbiology. 2004;155(2):105-12. Epub 2004/03/03.
36. Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S. The population structure of Acinetobacter baumannii: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. PloS one. 2010;5(4):e10034. Epub 2010/04/13.
37. Giannouli M, Tomasone F, Agodi A, Vahaboglu H, Daoud Z, Triassi M, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii strains in intensive care units of multiple Mediterranean hospitals. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2009;63(4):828-30. Epub 2009/02/19.
38. Towner KJ, Levi K, Vlassiadi M. Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of Acinetobacter baumannii in Europe. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2008;14(2):161-7. Epub 2007/12/21.
39. Da Silva G, Dijkshoorn L, van der Reijden T, van Strijen B, Duarte A. Identification of widespread, closely related Acinetobacter baumannii isolates in Portugal as a subgroup of European clone II. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2007;13(2):190-5. Epub 2007/03/03.
40. Nemec A, Dijkshoorn L, van der Reijden TJ. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant Acinetobacter baumannii strains in the Czech Republic. Journal of medical microbiology. 2004;53(Pt 2):147-53. Epub 2004/01/20.
41. Franolic-Kukina I, Bedenic B, Budimir A, Herljevic Z, Vranes J, Higgins PG. Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-72-positive Acinetobacter baumannii in a Croatian university hospital. International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases. 2011;15(10):e706-9. Epub 2011/07/30.
42. Goic-Barisic I, Towner KJ, Kovacic A, Sisko-Kraljevic K, Tonkic M, Novak A, et al. Outbreak in Croatia caused by a new carbapenem-resistant clone of Acinetobacter baumannii producing OXA-72 carbapenemase. The Journal of hospital infection. 2011;77(4):368-9. Epub 2011/02/15.

43. Odbor za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2011.godini. AMZH Zagreb 2012.

44. Odbor za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2014.godini. AMZH, Zagreb 2015.

45. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. The Journal of infectious diseases. 2008;197(8):1079-81. Epub 2008/04/19.

46. Rello J. Acinetobacter baumannii infections in the ICU: customization is the key. Chest. 1999;115(5):1226-9. Epub 1999/05/20.

47. Playford EG, Craig JC, Iredell JR. Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii in intensive care unit patients: risk factors for acquisition, infection and their consequences. The Journal of hospital infection. 2007;65(3):204-11. Epub 2007/01/27.

48. 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. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2006;12(6):597-8. Epub 2006/05/17.

49. Antunes LC, Visca P, Towner KJ. Acinetobacter baumannii: evolution of a global pathogen. Pathogens and disease. 2014;71(3):292-301. Epub 2014/01/01.

50. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. Nature reviews Microbiology. 2007;5(12):939-51. Epub 2007/11/17.

51. Struelens MJ, Carlier E, Maes N, Serruys E, Quint WG, van Belkum A. Nosocomial colonization and infection with multiresistant Acinetobacter baumannii: outbreak delineation using DNA macrorestriction analysis and PCR-fingerprinting. The Journal of hospital infection. 1993;25(1):15-32. Epub 1993/09/01.

52. Luna CM, Aruj PK. Nosocomial Acinetobacter pneumonia. Respirology. 2007;12(6):787-91. Epub 2007/11/08.

53. Fagon JY, Chastre J, Domart Y, Trouillet JL, Pierre J, Darne C, et al. Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation. Prospective analysis of 52 episodes with use of a protected specimen brush and quantitative culture techniques. The American review of respiratory disease. 1989;139(4):877-84. Epub 1989/04/01.

54. Fagon JY, Chastre J, Hance AJ, Montravers P, Novara A, Gibert C. Nosocomial pneumonia in ventilated patients: a cohort study evaluating attributable mortality and hospital stay. The American journal of medicine. 1993;94(3):281-8. Epub 1993/03/01.

55. Garcia-Garmendia JL, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J, Jimenez-Jimenez FJ, Monterrubio-Villar J, Gili-Miner M. Mortality and the increase in length of stay attributable to the acquisition of Acinetobacter in critically ill patients. Critical care medicine. 1999;27(9):1794-9. Epub 1999/10/03.

56. Wisplinghoff H, Edmond MB, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP, Seifert H. Nosocomial bloodstream infections caused by Acinetobacter species in United States hospitals: clinical features, molecular epidemiology, and antimicrobial susceptibility. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2000;31(3):690-7. Epub 2000/10/06.

57. Thom KA, Hsiao WW, Harris AD, Stine OC, Rasko DA, Johnson JK. Patients with Acinetobacter baumannii bloodstream infections are colonized in the gastrointestinal tract with identical strains. American journal of infection control. 2010;38(9):751-3. Epub 2010/06/24.

58. Lai SW, Ng KC, Yu WL, Liu CS, Lai MM, Lin CC. Acinetobacter baumannii bloodstream infection: clinical features and antimicrobial susceptibilities of isolates. The Kaohsiung journal of medical sciences. 1999;15(7):406-13. Epub 1999/08/31.

59. Seifert H, Strate A, Pulverer G. Nosocomial bacteremia due to Acinetobacter baumannii. Clinical features, epidemiology, and predictors of mortality. Medicine. 1995;74(6):340-9. Epub 1995/11/01.

60. Cisneros JM, Reyes MJ, Pachon J, Becerril B, Caballero FJ, Garcia-Garmendia JL, et al. Bacteremia due to Acinetobacter baumannii: epidemiology, clinical findings, and prognostic features. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 1996;22(6):1026-32. Epub 1996/06/01.

61. Weinbren MJ, Johnson AP, Kaufmann ME, Livermore DM. Acinetobacter spp. isolates with reduced susceptibilities to carbapenems in a UK burns unit. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 1998;41(5):574-6. Epub 1998/06/18.

62. Cisneros JM, Rodriguez-Bano J. Nosocomial bacteremia due to Acinetobacter baumannii: epidemiology, clinical features and treatment. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2002;8(11):687-93. Epub 2002/11/26.

63. Seifert H, Baginski R, Schulze A, Pulverer G. The distribution of Acinetobacter species in clinical culture materials. Zentralblatt fur Bakteriologie : international journal of medical microbiology. 1993;279(4):544-52. Epub 1993/11/01.

64. Chen HP, Chen TL, Lai CH, Fung CP, Wong WW, Yu KW, et al. Predictors of mortality in Acinetobacter baumannii bacteremia. Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi. 2005;38(2):127-36. Epub 2005/04/22.

65. Poutanen SM, Louie M, Simor AE. Risk factors, clinical features and outcome of Acinetobacter bacteremia in adults. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 1997;16(10):737-40. Epub 1997/12/24.

66. Ozdemir H, Kendirli T, Ergun H, Ciftci E, Tapisiz A, Guriz H, et al. Nosocomial infections due to Acinetobacter baumannii in a pediatric intensive care unit in Turkey. The Turkish journal of pediatrics. 2011;53(3):255-60. Epub 2011/10/11.

67. Gervich DH, Grout CS. An outbreak of nosocomial Acinetobacter infections from humidifiers. American journal of infection control. 1985;13(5):210-5. Epub 1985/10/01.

68. Santucci SG, Gobara S, Santos CR, Fontana C, Levin AS. Infections in a burn intensive care unit: experience of seven years. The Journal of hospital infection. 2003;53(1):6-13. Epub 2002/12/24.

69. Oncul O, Keskin O, Acar HV, Kucukardali Y, Evrenkaya R, Atasoyu EM, et al. Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. The Journal of hospital infection. 2002;51(1):47-51. Epub 2002/05/16.

70. Maegele M, Gregor S, Steinhausen E, Bouillon B, Heiss MM, Perbix W, et al. The long-distance tertiary air transfer and care of tsunami victims: injury pattern and microbiological and psychological aspects. Critical care medicine. 2005;33(5):1136-40. Epub 2005/05/14.

71. Tong MJ. Septic complications of war wounds. Jama. 1972;219(8):1044-7. Epub 1972/02/21.

72. Kucisec-Tepes N, Bejuk D, Kosuta D. [Characteristics of war wound infection]. Acta medica Croatica : casopis Hravatske akademije medicinskih znanosti. 2006;60(4):353-63. Epub 2006/10/20. Osobitosti infekcije ratne ozljede.

73. Kalenic S, Zele-Starcevic L, Jarza-Davila N, Jandrlic M. [Infections in war injuries]. Lijecnicki vjesnik. 1991;113(7-8):233-5. Epub 1991/07/01. Infekcije ratnih ozljeda.

74. Davis KA, Moran KA, McAllister CK, Gray PJ. Multidrug-resistant Acinetobacter extremity infections in soldiers. Emerging infectious diseases. 2005;11(8):1218-24. Epub 2005/08/17.

75. Hawley JS, Murray CK, Griffith ME, McElmeel ML, Fulcher LC, Hospenthal DR, et al. Susceptibility of acinetobacter strains isolated from deployed U.S. military personnel. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2007;51(1):376-8. Epub 2006/10/18.

76. Jones A, Morgan D, Walsh A, Turton J, Livermore D, Pitt T, et al. Importation of multidrug-resistant Acinetobacter spp infections with casualties from Iraq. The Lancet Infectious diseases. 2006;6(6):317-8. Epub 2006/05/27.

77. Valentine KP, Viacheslav KM. Bacterial flora of combat wounds from eastern Ukraine and time-specified changes of bacterial recovery during treatment in Ukrainian military hospital. BMC research notes. 2017;10(1):152. Epub 2017/04/09.

78. Scott P, Deye G, Srinivasan A, Murray C, Moran K, Hulten E, et al. An outbreak of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii-calcoaceticus complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2007;44(12):1577-84. Epub 2007/05/23.

79. Guerrero DM, Perez F, Conger NG, Solomkin JS, Adams MD, Rather PN, et al. Acinetobacter baumannii-associated skin and soft tissue infections: recognizing a broadening spectrum of disease. Surgical infections. 2010;11(1):49-57. Epub 2009/10/01.

80. Siegman-Igra Y, Bar-Yosef S, Gorea A, Avram J. Nosocomial acinetobacter meningitis secondary to invasive procedures: report of 25 cases and review. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 1993;17(5):843-9. Epub 1993/11/01.

81. Berk SL, McCabe WR. Meningitis caused by Acinetobacter calcoaceticus var anitratus. A specific hazard in neurosurgical patients. Archives of neurology. 1981;38(2):95-8. Epub 1981/02/01.

82. Bergogne-Berezin E. The Increasing Role of Acinetobacter Species As Nosocomial Pathogens. Current infectious disease reports. 2001;3(5):440-4. Epub 2001/09/18.

83. Gradon JD, Chapnick EK, Lutwick LI. Infective endocarditis of a native valve due to Acinetobacter: case report and review. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 1992;14(5):1145-8. Epub 1992/05/01.

84. Lye WC, Lee EJ, Ang KK. Acinetobacter peritonitis in patients on CAPD: characteristics and outcome. Advances in peritoneal dialysis Conference on Peritoneal Dialysis. 1991;7:176-9. Epub 1991/01/01.

85. Gunjaca I, Francetic I. Prevalence and clinical outcome of spontaneous bacterial peritonitis in hospitalized patients with liver cirrhosis: a prospective observational study in central part of Croatia. Acta clinica Croatica. 2010;49(1):11-8. Epub 2010/07/20.

86. Roy R, Panigrahi P, Malathi J, Pal SS, Nandi K, Patil A, et al. Endophthalmitis caused by Acinetobacter baumanni: a case series. Eye (Lond). 2013;27(3):450-2. Epub 2013/01/12.

87. Carvalho VC, Oliveira PR, Dal-Paz K, Paula AP, Felix Cda S, Lima AL. Gram-negative osteomyelitis: clinical and microbiological profile. The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases. 2012;16(1):63-7. Epub 2012/02/24.

88. Harding CM, Tracy EN, Carruthers MD, Rather PN, Actis LA, Munson RS, Jr. Acinetobacter baumannii strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. mBio. 2013;4(4). Epub 2013/08/08.

89. Henrichsen J, Blom J. Correlation between twitching motility and possession of polar fimbriae in Acinetobacter calcoaceticus. Acta pathologica et microbiologica Scandinavica Section B, Microbiology. 1975;83(2):103-15. Epub 1975/04/01.

90. Mattick JS. Type IV pili and twitching motility. Annual review of microbiology. 2002;56:289-314. Epub 2002/07/27.

91. Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. Genetic analysis of surface motility in Acinetobacter baumannii. Microbiology. 2011;157(Pt 9):2534-44. Epub 2011/06/28.

92. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by Acinetobacter baumannii: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. Microbiology. 2003;149(Pt 12):3473-84. Epub 2003/12/10.

93. Nucleo E, Steffanoni L, Fugazza G, Migliavacca R, Giacobone E, Navarra A, et al. Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug-resistant clinical isolate of Acinetobacter baumannii. BMC microbiology. 2009;9:270. Epub 2009/12/24.

94. Espinal P, Marti S, Vila J. Effect of biofilm formation on the survival of Acinetobacter baumannii on dry surfaces. The Journal of hospital infection. 2012;80(1):56-60. Epub 2011/10/07.

95. de Breij A, Dijkshoorn L, Lagendijk E, van der Meer J, Koster A, Bloemberg G, et al. Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of Acinetobacter baumannii? PloS one. 2010;5(5):e10732. Epub 2010/05/28.
96. de Breij A, Gaddy J, van der Meer J, Koning R, Koster A, van den Broek P, et al. CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of Acinetobacter baumannii ATCC19606(T) to human airway epithelial cells and their inflammatory response. Research in microbiology. 2009;160(3):213-8. Epub 2009/06/17.
97. Ishikawa M, Nakatani H, Hori K. AtaA, a new member of the trimeric autotransporter adhesins from Acinetobacter sp. Tol 5 mediating high adhesiveness to various abiotic surfaces. PloS one. 2012;7(11):e48830. Epub 2012/11/17.
98. Girard V, Mourez M. Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: structural and functional features. Research in microbiology. 2006;157(5):407-16. Epub 2006/05/27.
99. Leduc I, Olsen B, Elkins C. Localization of the domains of the Haemophilus ducreyi trimeric autotransporter DsrA involved in serum resistance and binding to the extracellular matrix proteins fibronectin and vitronectin. Infection and immunity. 2009;77(2):657-66. Epub 2008/11/19.
100. Smani Y, McConnell MJ, Pachon J. Role of fibronectin in the adhesion of Acinetobacter baumannii to host cells. PloS one. 2012;7(4):e33073. Epub 2012/04/20.
101. Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The Acinetobacter baumannii 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. Infection and immunity. 2009;77(8):3150-60. Epub 2009/05/28.
102. Gaddy JA, Actis LA. Regulation of Acinetobacter baumannii biofilm formation. Future microbiology. 2009;4(3):273-8. Epub 2009/03/31.
103. Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, et al. Outer membrane protein 38 of Acinetobacter baumannii localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. Cellular microbiology. 2005;7(8):1127-38. Epub 2005/07/13.
104. Kim SW, Choi CH, Moon DC, Jin JS, Lee JH, Shin JH, et al. Serum resistance of Acinetobacter baumannii through the binding of factor H to outer membrane proteins. FEMS microbiology letters. 2009;301(2):224-31. Epub 2009/11/03.
105. Choi CH, Lee JS, Lee YC, Park TI, Lee JC. Acinetobacter baumannii invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. BMC microbiology. 2008;8:216. Epub 2008/12/11.

106. Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari AA. Identification and characterization of an Acinetobacter baumannii biofilm-associated protein. Journal of bacteriology. 2008;190(3):1036-44. Epub 2007/11/21.

107. Kenyon JJ, Hall RM. Variation in the complex carbohydrate biosynthesis loci of Acinetobacter baumannii genomes. PloS one. 2013;8(4):e62160. Epub 2013/04/25.

108. Russo TA, Luke NR, Beanan JM, Olson R, Sauberan SL, MacDonald U, et al. The K1 capsular polysaccharide of Acinetobacter baumannii strain 307-0294 is a major virulence factor. Infection and immunity. 2010;78(9):3993-4000. Epub 2010/07/21.

109. Choi AH, Slamti L, Avci FY, Pier GB, Maira-Litran T. The pgaABCD locus of Acinetobacter baumannii encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. Journal of bacteriology. 2009;191(19):5953-63. Epub 2009/07/28.

110. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Gotz F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in Staphylococcus aureus and is required for biofilm formation. Infection and immunity. 1999;67(10):5427-33. Epub 1999/09/25.

111. Leone S, Sturiale L, Pessione E, Mazzoli R, Giunta C, Lanzetta R, et al. Detailed characterization of the lipid A fraction from the nonpathogen Acinetobacter radioresistens strain S13. Journal of lipid research. 2007;48(5):1045-51. Epub 2007/02/03.

112. Kwon SO, Gho YS, Lee JC, Kim SI. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical Acinetobacter baumannii isolate. FEMS microbiology letters. 2009;297(2):150-6. Epub 2009/06/25.

113. McConnell MJ, Rumbo C, Bou G, Pachon J. Outer membrane vesicles as an acellular vaccine against Acinetobacter baumannii. Vaccine. 2011;29(34):5705-10. Epub 2011/06/18.

114. Rumbo C, Fernandez-Moreira E, Merino M, Poza M, Mendez JA, Soares NC, et al. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in Acinetobacter baumannii. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2011;55(7):3084-90. Epub 2011/04/27.

115. Jin JS, Kwon SO, Moon DC, Gurung M, Lee JH, Kim SI, et al. Acinetobacter baumannii secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. PloS one. 2011;6(2):e17027. Epub 2011/03/10.

116. McKean SC, Davies JK, Moore RJ. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of Corynebacterium pseudotuberculosis, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. Microbiology. 2007;153(Pt 7):2203-11. Epub 2007/06/30.

117. Jacobs AC, Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S, et al. Inactivation of phospholipase D diminishes Acinetobacter baumannii pathogenesis. Infection and immunity. 2010;78(5):1952-62. Epub 2010/03/03.

118. Camarena L, Bruno V, Euskirchen G, Poggio S, Snyder M. Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. PLoS pathogens. 2010;6(4):e1000834. Epub 2010/04/07.

119. King LB, Pangburn MK, McDaniel LS. Serine protease PKF of Acinetobacter baumannii results in serum resistance and suppression of biofilm formation. The Journal of infectious diseases. 2013;207(7):1128-34. Epub 2013/01/11.

120. Meberg BM, Paulson AL, Priyadarshini R, Young KD. Endopeptidase penicillin-binding proteins 4 and 7 play auxiliary roles in determining uniform morphology of Escherichia coli. Journal of bacteriology. 2004;186(24):8326-36. Epub 2004/12/04.

121. Priyadarshini R, de Pedro MA, Young KD. Role of peptidoglycan amidases in the development and morphology of the division septum in Escherichia coli. Journal of bacteriology. 2007;189(14):5334-47. Epub 2007/05/08.

122. Russo TA, MacDonald U, Beanan JM, Olson R, MacDonald IJ, Sauberan SL, et al. Penicillin-binding protein 7/8 contributes to the survival of Acinetobacter baumannii in vitro and in vivo. The Journal of infectious diseases. 2009;199(4):513-21. Epub 2009/01/16.

123. Nothaft H, Szymanski CM. Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. Nature reviews Microbiology. 2010;8(11):765-78. Epub 2010/10/16.

124. Dorsey CW, Tolmasky ME, Crosa JH, Actis LA. Genetic organization of an Acinetobacter baumannii chromosomal region harbouring genes related to siderophore biosynthesis and transport. Microbiology. 2003;149(Pt 5):1227-38. Epub 2003/05/02.

125. Goel VK, Kapil A. Monoclonal antibodies against the iron regulated outer membrane Proteins of Acinetobacter baumannii are bactericidal. BMC microbiology. 2001;1:16. Epub 2001/09/05.

126. Zimbler DL, Penwell WF, Gaddy JA, Menke SM, Tomaras AP, Connerly PL, et al. Iron acquisition functions expressed by the human pathogen Acinetobacter baumannii. Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine. 2009;22(1):23-32. Epub 2009/01/09.

127. Mihara K, Tanabe T, Yamakawa Y, Funahashi T, Nakao H, Narimatsu S, et al. Identification and transcriptional organization of a gene cluster involved in biosynthesis and transport of acinetobactin, a siderophore produced by Acinetobacter baumannii ATCC 19606T. Microbiology. 2004;150(Pt 8):2587-97. Epub 2004/08/04.

128. Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ, Salmond GP. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. FEMS microbiology reviews. 2001;25(4):365-404. Epub 2001/08/29.
129. Gonzalez RH, Dijkshoorn L, Van den Barselaar M, Nudel C. Quorum sensing signal profile of Acinetobacter strains from nosocomial and environmental sources. Revista Argentina de microbiologia. 2009;41(2):73-8. Epub 2009/07/25.
130. Gonzalez RH, Nusblat A, Nudel BC. Detection and characterization of quorum sensing signal molecules in Acinetobacter strains. Microbiological research. 2001;155(4):271-7. Epub 2001/04/12.
131. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999;284(5418):1318-22. Epub 1999/05/21.
132. Vidal R, Dominguez M, Urrutia H, Bello H, Gonzalez G, Garcia A, et al. Biofilm formation by Acinetobacter baumannii. Microbios. 1996;86(346):49-58. Epub 1996/01/01.
133. Siroy A, Cosette P, Seyer D, Lemaitre-Guillier C, Vallenet D, Van Dorsselaer A, et al. Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug-resistant Acinetobacter baumannii strain and a reference strain. Journal of proteome research. 2006;5(12):3385-98. Epub 2006/12/02.
134. Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of Acinetobacter baumannii to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2008;14(1):49-54. Epub 2007/11/17.
135. Lee JC, Koerten H, van den Broek P, Beekhuizen H, Wolterbeek R, van den Barselaar M, et al. Adherence of Acinetobacter baumannii strains to human bronchial epithelial cells. Research in microbiology. 2006;157(4):360-6. Epub 2005/12/06.
136. Marti S, Rodriguez-Bano J, Catel-Ferreira M, Jouenne T, Vila J, Seifert H, et al. Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by Acinetobacter species. BMC research notes. 2011;4:5. Epub 2011/01/13.
137. Greene C, Wu J, Rickard AH, Xi C. Evaluation of the ability of Acinetobacter baumannii to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces. Letters in applied microbiology. 2016;63(4):233-9. Epub 2016/08/02.
138. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical microbiology reviews. 2002;15(2):167-93. Epub 2002/04/05.
139. Wroblewska MM, Sawicka-Grzelak A, Marchel H, Luczak M, Sivan A. Biofilm production by clinical strains of Acinetobacter baumannii isolated from patients hospitalized

in two tertiary care hospitals. FEMS immunology and medical microbiology. 2008;53(1):140-4. Epub 2008/04/11.

140. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerging infectious diseases. 2002;8(9):881-90. Epub 2002/08/27.

141. Tomaras AP, Flagler MJ, Dorsey CW, Gaddy JA, Actis LA. Characterization of a two-component regulatory system from Acinetobacter baumannii that controls biofilm formation and cellular morphology. Microbiology. 2008;154(Pt 11):3398-409. Epub 2008/10/30.

142. Banin E, Brady KM, Greenberg EP. Chelator-induced dispersal and killing of Pseudomonas aeruginosa cells in a biofilm. Applied and environmental microbiology. 2006;72(3):2064-9. Epub 2006/03/07.

143. Johnson M, Cockayne A, Morrissey JA. Iron-regulated biofilm formation in Staphylococcus aureus Newman requires ica and the secreted protein Emp. Infection and immunity. 2008;76(4):1756-65. Epub 2008/02/13.

144. Niu C, Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from Acinetobacter baumannii. Journal of bacteriology. 2008;190(9):3386-92. Epub 2008/02/19.

145. Hoe NP, Nakashima K, Lukomski S, Grigsby D, Liu M, Kordari P, et al. Rapid selection of complement-inhibiting protein variants in group A Streptococcus epidemic waves. Nature medicine. 1999;5(8):924-9. Epub 1999/07/30.

146. Park SY, Shin YP, Kim CH, Park HJ, Seong YS, Kim BS, et al. Immune evasion of Enterococcus faecalis by an extracellular gelatinase that cleaves C3 and iC3b. J Immunol. 2008;181(9):6328-36. Epub 2008/10/23.

147. Lindahl G, Sjobring U, Johnsson E. Human complement regulators: a major target for pathogenic microorganisms. Current opinion in immunology. 2000;12(1):44-51. Epub 2000/02/19.

148. Garcia A, Solar H, Gonzalez C, Zemelman R. Effect of EDTA on the resistance of clinical isolates of Acinetobacter baumannii to the bactericidal activity of normal human serum. Journal of medical microbiology. 2000;49(11):1047-50. Epub 2000/11/10.

149. Obana Y. Pathogenic significance of Acinetobacter calcoaceticus: analysis of experimental infection in mice. Microbiology and immunology. 1986;30(7):645-57. Epub 1986/01/01.

150. King LB, Swiatlo E, Swiatlo A, McDaniel LS. Serum resistance and biofilm formation in clinical isolates of Acinetobacter baumannii. FEMS immunology and medical microbiology. 2009;55(3):414-21. Epub 2009/02/18.

151. Bresser P, van Alphen L, Habets FJ, Hart AA, Dankert J, Jansen HM, et al. Persisting Haemophilus influenzae strains induce lower levels of interleukin-6 and interleukin-8 in H292 lung epithelial cells than nonpersisting strains. The European respiratory journal. 1997;10(10):2319-26. Epub 1997/12/05.

152. Li J, Nation RL, Owen RJ, Wong S, Spelman D, Franklin C. Antibiograms of multidrug-resistant clinical Acinetobacter baumannii: promising therapeutic options for treatment of infection with colistin-resistant strains. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2007;45(5):594-8. Epub 2007/08/09.

153. Rodriguez-Bano J, Marti S, Soto S, Fernandez-Cuenca F, Cisneros JM, Pachon J, et al. Biofilm formation in Acinetobacter baumannii: associated features and clinical implications. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2008;14(3):276-8. Epub 2008/01/15.

154. Timurkaynak F, Can F, Azap OK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SO. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii isolated from intensive care units. International journal of antimicrobial agents. 2006;27(3):224-8. Epub 2006/02/09.

155. Appleman MD, Belzberg H, Citron DM, Heseltine PN, Yellin AE, Murray J, et al. In vitro activities of nontraditional antimicrobials against multiresistant Acinetobacter baumannii strains isolated in an intensive care unit outbreak. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2000;44(4):1035-40. Epub 2000/03/18.

156. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2001;48 Suppl 1:5-16. Epub 2001/06/23.

157. Kaplan JB. Antibiotic-induced biofilm formation. The International journal of artificial organs. 2011;34(9):737-51. Epub 2011/11/19.

158. Davies J, Spiegelman GB, Yim G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. Current opinion in microbiology. 2006;9(5):445-53. Epub 2006/09/01.

159. Odenholt I. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. International journal of antimicrobial agents. 2001;17(1):1-8. Epub 2001/01/04.

160. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in microbiology. 2001;9(1):34-9. Epub 2001/02/13.

161. Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. Penetration of antibiotics through Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2010;65(9):1955-8. Epub 2010/07/10.

162. Borriello G, Werner E, Roe F, Kim AM, Ehrlich GD, Stewart PS. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of Pseudomonas aeruginosa in biofilms. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004;48(7):2659-64. Epub 2004/06/25.
163. Lewis K. Persister cells. Annual review of microbiology. 2010;64:357-72. Epub 2010/06/10.
164. Neut D, van der Mei HC, Bulstra SK, Busscher HJ. The role of small-colony variants in failure to diagnose and treat biofilm infections in orthopedics. Acta orthopaedica. 2007;78(3):299-308. Epub 2007/07/06.
165. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. Trends in microbiology. 2005;13(1):34-40. Epub 2005/01/11.
166. Vidal R, Dominguez M, Urrutia H, Bello H, Garcia A, Gonzalez G, et al. Effect of imipenem and sulbactam on sessile cells of Acinetobacter baumannii growing in biofilm. Microbios. 1997;91(367):79-87. Epub 1997/01/01.
167. Calabrese EJ, Baldwin LA. Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology. Trends in pharmacological sciences. 2001;22(6):285-91. Epub 2001/06/08.
168. Kendig EL, Le HH, Belcher SM. Defining hormesis: evaluation of a complex concentration response phenomenon. International journal of toxicology. 2010;29(3):235-46. Epub 2010/05/08.
169. Washington JA, 2nd. The effects and significance of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics. Reviews of infectious diseases. 1979;1(5):781-6. Epub 1979/09/01.
170. Lorian V. Medical relevance of low concentrations of antibiotics. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 1993;31 Suppl D:137-48. Epub 1993/05/01.
171. Gerber M, Walch C, Loffler B, Tischendorf K, Reischl U, Ackermann G. Effect of sub-MIC concentrations of metronidazole, vancomycin, clindamycin and linezolid on toxin gene transcription and production in Clostridium difficile. Journal of medical microbiology. 2008;57(Pt 6):776-83. Epub 2008/05/16.
172. Deneve C, Bouttier S, Dupuy B, Barbut F, Collignon A, Janoir C. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on colonization factor expression by moxifloxacin-susceptible and moxifloxacin-resistant Clostridium difficile strains. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2009;53(12):5155-62. Epub 2009/10/07.
173. Stanton TB, Humphrey SB, Sharma VK, Zuerner RL. Collateral effects of antibiotics: carbadox and metronidazole induce VSH-1 and facilitate gene transfer among Brachyspira

hyodysenteriae strains. Applied and environmental microbiology. 2008;74(10):2950-6. Epub 2008/03/25.

174. Ichimiya T, Takeoka K, Hiramatsu K, Hirai K, Yamasaki T, Nasu M. The influence of azithromycin on the biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa in vitro. Chemotherapy. 1996;42(3):186-91. Epub 1996/05/01.

175. Wagner T, Soong G, Sokol S, Saiman L, Prince A. Effects of azithromycin on clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa from cystic fibrosis patients. Chest. 2005;128(2):912-9. Epub 2005/08/16.

176. Hoiby N. Antibiotic therapy for chronic infection of pseudomonas in the lung. Annual review of medicine. 1993;44:1-10. Epub 1993/01/01.

177. Clement A, Tamalet A, Leroux E, Ravilly S, Fauroux B, Jais JP. Long term effects of azithromycin in patients with cystic fibrosis: A double blind, placebo controlled trial. Thorax. 2006;61(10):895-902. Epub 2006/07/01.

178. Saiman L, Marshall BC, Mayer-Hamblett N, Burns JL, Quittner AL, Cibene DA, et al. Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with Pseudomonas aeruginosa: a randomized controlled trial. Jama. 2003;290(13):1749-56. Epub 2003/10/02.

179. Favre-Bonte S, Kohler T, Van Delden C. Biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa: role of the C4-HSL cell-to-cell signal and inhibition by azithromycin. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2003;52(4):598-604. Epub 2003/09/03.

180. Nagino K, Kobayashi H. Influence of macrolides on mucoid alginate biosynthetic enzyme from Pseudomonas aeruginosa. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 1997;3(4):432-9. Epub 1997/08/01.

181. Tateda K, Comte R, Pechere JC, Kohler T, Yamaguchi K, Van Delden C. Azithromycin inhibits quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2001;45(6):1930-3. Epub 2001/05/17.

182. Otto MP, Martin E, Badiou C, Lebrun S, Bes M, Vandenesch F, et al. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2013;68(7):1524-32. Epub 2013/03/20.

183. Pour NK, Dusane DH, Dhakephalkar PK, Zamin FR, Zinjarde SS, Chopade BA. Biofilm formation by Acinetobacter baumannii strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. FEMS immunology and medical microbiology. 2011;62(3):328-38. Epub 2011/05/17.

184. Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. Nature. 2005;436(7054):1171-5. Epub 2005/08/27.

185. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. Current topics in microbiology and immunology. 2008;322:107-31. Epub 2008/05/06.

186. Schadow KH, Simpson WA, Christensen GD. Characteristics of adherence to plastic tissue culture plates of coagulase-negative staphylococci exposed to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. The Journal of infectious diseases. 1988;157(1):71-7. Epub 1988/01/01.

187. Tateda K, Hirakata Y, Furuya N, Ohno A, Yamaguchi K. Effects of sub-MICs of erythromycin and other macrolide antibiotics on serum sensitivity of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1993;37(4):675-80. Epub 1993/04/01.

188. Drenjancevic D, Vranes J, Bedenic B, Sakic-Zdravcevic K. In vitro effect of subinhibitory concentrations of ceftazidime and meropenem on the serum sensitivity of Pseudomonas aeruginosa strains. Collegium antropologicum. 2007;31(1):221-5. Epub 2007/06/30.

189. Fonseca AP, Extremina C, Fonseca AF, Sousa JC. Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on Pseudomonas aeruginosa. Journal of medical microbiology. 2004;53(Pt 9):903-10. Epub 2004/08/18.

190. Schiller NL, Hatch RA. The serum sensitivity, colonial morphology, serogroup specificity, and outer membrane protein of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from several clinical sites. Diagnostic microbiology and infectious disease. 1983;1(2):145-57. Epub 1983/06/01.

191. 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.

192. European Committee on Antimirobial Susceptibility Testing. Breakpoint table for interpretation of MICs and zone diameters. Verison 2.0 January 2012. Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_document/Eucast_breakpoints_v2.0.xls.

193. Braga PC, Dal Sasso M, Maci S. Cefodizime: effects of sub-inhibitory concentrations on adhesiveness and bacterial morphology of Staphylococcus aureus and Escherichia coli:

comparison with cefotaxime and ceftriaxone. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 1997;39(1):79-84. Epub 1997/01/01.

194. M. K. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. In: N. W, A. J, editors. Molecular bacteriology Protocols and clinical applications 1st ed. New York:: Humana Press Inc. Totowa; 1998. p. 33-51.

195. DeMatteo CS, Hammer MC, Baltch AL, Smith RP, Sutphen NT, Michelsen PB. Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa to serum bactericidal activity. A comparison of three methods with clinical correlations. The Journal of laboratory and clinical medicine. 1981;98(4):511-8. Epub 1981/10/01.

196. Cevahir N, Kaleli I, Demir M, Yildirim U, Cevik E, Gurbuz M. [Investigation of serum resistance for Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii strains]. Mikrobiyoloji bulteni. 2006;40(3):251-5. Epub 2006/09/28. Pseudomonas aeruginosa ve Acinetobacter baumannii suslarinda serum direncinin arastirilmasi.

197. Hostacka A, Klokocnikova L. Characteristics of clinical Acinetobacter spp. strains. Folia microbiologica. 2002;47(5):579-82. Epub 2002/12/31.

198. Liou ML, Soo PC, Ling SR, Kuo HY, Tang CY, Chang KC. The sensor kinase BfmS mediates virulence in Acinetobacter baumannii. Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi. 2014;47(4):275-81. Epub 2013/03/05.

199. Moffatt JH, Harper M, Mansell A, Crane B, Fitzsimons TC, Nation RL, et al. Lipopolysaccharide-deficient Acinetobacter baumannii shows altered signaling through host Toll-like receptors and increased susceptibility to the host antimicrobial peptide LL-37. Infection and immunity. 2013;81(3):684-9. Epub 2012/12/20.

200. Jacobs AC, Sayood K, Olmsted SB, Blanchard CE, Hinrichs S, Russell D, et al. Characterization of the Acinetobacter baumannii growth phase-dependent and serum responsive transcriptomes. FEMS immunology and medical microbiology. 2012;64(3):403-12. Epub 2012/01/04.

201. Goic-Barisic I. Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii (MRAB)-ten years after the onset of these isolates in Croatia. Croatian Journal of Infection. 2012;32(2):67-70.

202. Hostacka A. [Sensitivity to blood bactericidal activity and hydrophobicity of Acinetobacter baumannii after treatment with imipenem]. Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie : casopis Spolecnosti pro epidemiologii a mikrobiologii Ceske lekarske spolecnosti JE Purkyne. 1999;48(2):67-70. Epub 1999/06/01. Citlivost' na baktericidny ucinok sera a hydrofobicita Acinetobacter baumannii po ucinku imipenemu.

203. Kaliterna V, Goic-Barisic I. The ability of biofilm formation in clinical isolates of Acinetobacter baumannii belonging to two different European clones causing outbreaks in the Split University Hospital, Croatia. J Chemother. 2013;25(1):60-2. Epub 2013/02/26.
204. Rao RS, Karthika RU, Singh SP, Shashikala P, Kanungo R, Jayachandran S, et al. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of Acinetobacter baumannii. Indian journal of medical microbiology. 2008;26(4):333-7. Epub 2008/11/01.
205. Sanchez CJ, Jr., Mende K, Beckius ML, Akers KS, Romano DR, Wenke JC, et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. BMC infectious diseases. 2013;13:47. Epub 2013/01/30.
206. Vijayakumar S, Rajenderan S, Laishram S, Anandan S, Balaji V, Biswas I. Biofilm Formation and Motility Depend on the Nature of the Acinetobacter baumannii Clinical Isolates. Frontiers in public health. 2016;4:105. Epub 2016/06/03.
207. Lim YM, Shin KS, Kim J. Distinct antimicrobial resistance patterns and antimicrobial resistance-harboring genes according to genomic species of Acinetobacter isolates. Journal of clinical microbiology. 2007;45(3):902-5. Epub 2006/12/29.
208. Sechi LA, Karadenizli A, Deriu A, Zanetti S, Kolayli F, Balikci E, et al. PER-1 type beta-lactamase production in Acinetobacter baumannii is related to cell adhesion. Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research. 2004;10(6):BR180-4. Epub 2004/06/03.
209. Vahaboglu H, Coskunkan F, Tansel O, Ozturk R, Sahin N, Koksal I, et al. Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type)-producing Acinetobacter spp. and Pseudomonas aeruginosa strains. Journal of medical microbiology. 2001;50(7):642-5. Epub 2001/07/11.
210. Raad I, Hachem R, Tcholakian RK, Sherertz R. Efficacy of minocycline and EDTA lock solution in preventing catheter-related bacteremia, septic phlebitis, and endocarditis in rabbits. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2002;46(2):327-32. Epub 2002/01/18.
211. Raad I, Chatzinikolaou I, Chaiban G, Hanna H, Hachem R, Dvorak T, et al. In vitro and ex vivo activities of minocycline and EDTA against microorganisms embedded in biofilm on catheter surfaces. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2003;47(11):3580-5. Epub 2003/10/25.
212. Costa GF, Tognim MC, Cardoso CL, Carrara-Marrone FE, Garcia LB. Preliminary evaluation of adherence on abiotic and cellular surfaces of Acinetobacter baumannii strains isolated from catheter tips. The Brazilian journal of infectious diseases : an official

publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases. 2006;10(5):346-51. Epub 2007/02/13.

213. Kumari AMS, Routray A, Yadav D. Imipenem resistance and biofilm production in Acinetobacter. Drug Invention Today. 2013;5:256-8.

214. Perez LR. Acinetobacter baumannii displays inverse relationship between meropenem resistance and biofilm production. J Chemother. 2014:1973947813Y0000000159. Epub 2014/03/14.

215. Gualdi L, Tagliabue L, Bertagnoli S, Ierano T, De Castro C, Landini P. Cellulose modulates biofilm formation by counteracting curli-mediated colonization of solid surfaces in Escherichia coli. Microbiology. 2008;154(Pt 7):2017-24. Epub 2008/07/05.

216. Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Romling U. The multicellular morphotypes of Salmonella typhimurium and Escherichia coli produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. Molecular microbiology. 2001;39(6):1452-63. Epub 2001/03/22.

217. Solano C, Garcia B, Valle J, Berasain C, Ghigo JM, Gamazo C, et al. Genetic analysis of Salmonella enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. Molecular microbiology. 2002;43(3):793-808. Epub 2002/04/04.

218. Spiers AJ, Bohannon J, Gehrig SM, Rainey PB. Biofilm formation at the air-liquid interface by the Pseudomonas fluorescens SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. Molecular microbiology. 2003;50(1):15-27. Epub 2003/09/26.

219. Gibson DL, White AP, Snyder SD, Martin S, Heiss C, Azadi P, et al. Salmonella produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. Journal of bacteriology. 2006;188(22):7722-30. Epub 2006/11/03.

220. Liao CH, Sheng WH, Chen YC, Hung CC, Wang JT, Chang SC. Predictive value of the serum bactericidal test for mortality in patients infected with multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. The Journal of infection. 2007;55(2):149-57. Epub 2007/03/23.

221. Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2005;41(6):848-54. Epub 2005/08/19.

11.0. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:	Maja Bogdan
Akademski naslov:	doktor medicine
Ustanova zaposlenja:	Zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, F. Krežme 1, 31000 Osijek
E-mail:	maja.bogdan7@gmail.com
Adresa stanovanja:	Kralja Zvonimira 19 b, 31216 Antunovac; 031 278 393; 091 521 05 01
Datum rođenja:	7. lipnja 1976. godine
Bračno stanje:	Udana
Zaposlenje:	Specijalist medicinske mikrobiologije s parazitologijom, voditelj odjela za ostale bakterijske infekcije u Službi za mikrobiologiju pri Zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije

Školovanje:

1990-1994	Tehnološka škola Osijek
1994-2001	Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Studij medicine u Osijeku
2003	Položila državni ispit
2003-	Znanstveni poslijediplomski studij iz područja biomedicine i zdravstva, Medicinski fakultet Sveučilišta J.J.Strossmayera u Osijeku
2006-2007	Stručni poslijediplomski ispit iz mikrobiologije s parazitologijom, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
2009	Položila specijalistički ispit

Zaposlenje:

2002-2003	Liječnik pripravnik u Općoj bolnici Vukovar
2003-	Liječnik u Službi za mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije
2012-	Vanjski suradnik u Medicinskoj školi Osijek
2015-	Naslovni asistent pri Katedri za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera Osijek

12.0. PRILOZI

PRILOG 1: Obrazloženje istraživanja za potencijalnog dobrovoljnog davatelja krvi

PRILOG 2: Izjava o suglasnosti

PRILOG 1:

Obrazloženje istraživanja za potencijalnog dobrovoljnog davatelja krvi

Istraživanje naslovljeno „Učinak subminimalnih inhibitornih koncentracija antibiotika na sposobnost stvaranja biofilma i osjetljivost na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma kliničkih izolata *Acinetobacter baumannii* u *in vitro* uvjetima“ provodi Maja Bogdan dr.med. spec.med. mikrobiologije sa parazitologijom, pri Službi za mikrobiologiju ZZJZ Osječko-baranjske županije u svrhu izrade svoje doktorske disertacije.

Acinetobacter baumannii je široko rasprostranjena bakterija posebice u bolničkom okruženju gdje učestalo kolonizira bolesnike i izaziva infekcije različitih organskih sustava. Činitelji virulencije same bakterije nisu još sasvim poznati. Smatra se da stvaranjem biofilma i otpornošću na ljudski serum bakterije uspješno izbjegavaju ubijanje pomoću antibiotika i time postaju veliki terapijski problem.

U istraživanju će se uzorak seruma miješati u jednakoj količini sa suspenzijom bakterija i brojanjem poraslih kolonija na površini hranjive podloge za uzgoj bakterija, odrediti će se učinak seruma tj. sposobnost ubijanja bakterija. Ispitivanje serumske aktivnosti će se izvršiti u laboratorijskim eksperimentalnim uvjetima bez i nakon djelovanja nižih koncentracija antibiotika koje su uobičajene u krvi tijekom liječenja antibioticima.

Za potrebe ovog istraživanja u 3 navrata s razmakom od 30 dana uzeti će Vam se uzorak krvi (5 ml) iz kubitalne vene, centifugirati, odvojiti serum i pohraniti u ledenicu na -80°C do provođenja testa. Uzorak se neće koristiti u niti jednu drugu svrhu osim za potrebe provođenja ispitivanja osjetljivosti na baktericidnu aktivnost seruma u navedenom istraživanju. Ostatak uzorka nakon završenog istraživanja će se uništiti.

Unaprijed zahvaljujem na Vašem sudjelovanju u predloženom istraživanju, koje će znatno pridonijeti medicinskoj znanosti .

U slučaju potrebe dodatnih informacija o samom istraživanju te potrebe dodatnog razjašnjenja slobodno se obratite na broj telefona: 031 225 762 ili na e-mail maja.bogdan@email.t-com ili maja.bogdan7@gmail.com.

VODITELJ ISTRAŽIVANJA
Maja Bogdan, dr.med.
spec.med.mikrobiologije s parazitologijom

PRILOG 2:

IZJAVA O SUGLASNOSTI

(pismena privola dobrovoljnog davatelja uzorka krvi za sudjelovanje u istraživanju)

Ovim putem ja .....(IME I PREZIME TISKANIM SLOVIMA) pristajem na dobrovoljno davanje uzoraka krvi u prijamnoj ambulanti Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, za potrebe ispitivanja baktericidne aktivnosti seruma koje u svrhu izrade svoje doktorske disertacije provodi Maja Bogdan, dr.med. pod naslovom „Učinak subminimalnih inhibitornih koncentracija antibiotika na sposobnost stvaranja biofilma i osjetljivost na baktericidnu aktivnost ljudskog seruma kliničkih izolata *Acinetobacter baumannii* u *in vitro* uvjetima".
Imao/la sam dovoljno vremena pročitati i razumjeti sve informacije za navedeno istraživanje. Na sva moja pitanja jasno mi je odgovoreno. Pristajem na pohranu i obradu mojih uzoraka seruma za potrebe istraživanja. Jasno mi je da se iz navedenog istraživanja mogu povući u svakom trenutku bez bojazni o eventualnoj manjkavosti buduće zdravstvene skrbi.
Svojim potpisom i u svojoj slobodnoj volji dajem pristanak na sudjelovanje u istraživanju.

Vlastoručni potpis ispitanika

.....
Kontakt telefon
.....
Datum
.....

VODITELJ ISTRAŽIVANJA
Maja Bogdan dr.med
spec. med.mikrobiologije s parazitologijom