

# Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti u striktno anaerobnih bakterija

---

**Dener, Nina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:436598>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-17**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Nina Dener**

**ISPITIVANJE ANTIMIKROBNE**

**OSJETLJIVOSTI U STRIKTNO**

**ANAEROBNIH BAKTERIJA**

**Završni rad**

**Osijek, 2022.**



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Nina Dener**

**ISPITIVANJE ANTIMIKROBNE**

**OSJETLJIVOSTI U STRIKTNO**

**ANAEROBNIH BAKTERIJA**

**Završni rad**

**Osijek, 2022.**

Rad je ostvaren u: Zavodu za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Klinike za infektologiju KBC Osijek.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Domagoj Drenjančević

Neposredni voditelj: doc. dr. sc. Maja Bogdan

Rad ima 31 list, 7 tablica i 6 slika.

## Zahvala

Zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Domagoju Drenjančeviću na stručnom vodstvu, ustupljenim podacima i nesebičnoj pomoći pri izradi završnog rada.

Zahvaljujem neposrednoj voditeljici doc. dr. sc. Maji Bogdan na trudu, stručnim savjetima i strpljenju prilikom pisanja i izrade rada.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji jer su uvijek bili uz mene i pružili mi razumijevanje i podršku tijekom svakog trenutka školovanja.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Anaerobne bakterije.....	1
1.2. Uzorkovanje i dijagnostika anaerobnih bakterija .....	2
1.3. Najčešći uzročnici infekcija i razvoj rezistencije .....	3
1.4. Metode ispitivanja osjetljivosti bakterija na antibiotike.....	4
2. CILJ RADA .....	6
3. MATERIJAL I METODE .....	7
3.1. Ustroj studije.....	7
3.2. Materijal.....	7
3.3. Metode .....	7
3.4. Metode obrade uzoraka .....	7
3.4.1. Priprema suspenzije za test osjetljivosti.....	8
3.5. Statističke metode.....	9
4. REZULTATI.....	11
4.1. Pregled anaerobnih izolata po rodovima i vrstama .....	14
4.2. Pregled antimikrobne osjetljivosti anaerobnih izolata.....	17
4.3. Pregled antimikrobne osjetljivosti gram-negativnih anaerobnih bakterija.....	17
4.4. Pregled antimikrobne osjetljivosti gram-pozitivnih anaerobnih bakterija .....	19
5. RASPRAVA .....	22
6. ZAKLJUČAK .....	25
7. SAŽETAK .....	26
8. SUMMARY .....	27
9. LITERATURA .....	29
10. ŽIVOTOPIS .....	31

## **POPIS KRATICA:**

ATB ANA – test osjetljivosti za anaerobne bakterije

ESBL (engl. *Extended Spectrum Beta-Lactamases*) – beta-laktamaze proširenog spektra

EUCAST (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) – Europski odbor za testiranje antimikrobne rezistencije

KBC – klinički bolnički centar

MALDI-TOF MS (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass spectrometry*) – masena spektrometrija vremena leta laserom desorbirane i ionizirane matrice

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

MRSA – meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*

SNVS - Schedler Neomycin Vancomycin agar

SSTI (engl. *skin and soft tissue infection*) - infekcija kože i potkožja

VRE – vankomicin rezistentni enterokoki



## 1. UVOD

Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti provodi se s ciljem određivanja prikladnog antibiotika za liječenje određenog pacijenta. U današnje vrijeme dolazi do sve veće nekritične primjene antibiotika, posebno u stanjima gdje se zapravo radi o virusnim infekcijama za koje antibiotici nisu potrebni. Ovakva nekontrolirana primjena antibiotika dovela je do pojave otpornosti bakterija i učinila metode ispitivanja bakterijske osjetljivosti još važnijima. Poznato je kako je nekontrolirana primjena antibiotika uzrokovala pojavu i širenje višestruko otpornih bakterija poput meticilin rezistentnog *Staphylococcus aureus* (MRSA), ESBL sojeva, vankomicin rezistentnih enterokoka (VRE). Zbog navedenih razloga, propisivanje antibiotika treba indicirati nakon dokazivanja bakterijske infekcije i provedenog ispitivanja osjetljivosti (1). Postoji više standardiziranih načina na koje je moguće ispitati osjetljivost bakterija na antibiotike u mikrobiološkom laboratoriju.

### 1.1. Anaerobne bakterije

Glavna karakteristika anaerobnih bakterija je nemogućnost rasta na hranjivim podlogama, ali i ljudskom tijelu u prisutnosti kisika. U velikom broju dio su normalne ljudske mikrobiote i nalaze se uglavnom na sluznicama. Mjesta koja normalno koloniziraju su površina sluznica usne šupljine, crijeva i ženskog genitalnog trakta (2). Anaerobne bakterije koje ne posjeduju katalazu niti superoksid-dismutazu te ne mogu podnijeti koncentraciju kisika veću od 0,50 – 1,00 % pripadaju skupini striktno anaerobnih bakterija, dok anaerobi koji toleriraju koncentraciju kisika do 8,00 % pripadaju skupini aerotolerantnih anaerobnih bakterija (3). Fakultativni anaerobi mogu rasti u prisutnosti, ali i odsutnosti kisika (4). Ukoliko se striktni anaerobi, poput bakterije *Clostridium perfringens*, izlože djelovanju kisika doći će do oštećenja bakterijskog genoma te inaktivacije enzima (5). Za razliku od striktnih, aerotolerantni anaerobi poput roda *Cutibacterium* posjeduju enzime kao što su peroksidaza i superoksid-dismutaza te kisik na njih neće djelovati štetno (5). Anaerobne bakterije koje uzrokuju infekcije kod ljudi mogu biti endogeni uzročnici koji se nalaze kao članovi normalne anaerobne mikrobiote na sluznicama i koži ili egzogeni uzročnici (3). Endogeni anaerobi uzrokuju teške infekcije ako dospiju u unutrašnjost organizma, što se najčešće događa kod zloćudnih tumora, kirurških operacija i trauma (3). Zbog toga se nazivaju oportunističkim patogenima i često uzrokuju razne infekcije u području glave nakon dentalnih zahvata te nakon operacija u trbušnoj šupljini. Anaerobi su skupina bakterija koja može uzrokovati teže

oblike bolesti u ljudi, posebno u slučajevima kada dođe do pojave bakterija u krvi ili drugim primarno sterilnim mjestima poput likvora te ovakva stanja uzrokuju visoku stopu mortaliteta (6). Iako posebno teške infekcije uzrokuju striktno anaerobne bakterije, aerotolerantni anaerobi ipak prednjače u ukupnom broju izazvanih infekcija u ljudi (3). Anaerobi imaju i važnu ulogu kao normalna mikrobiota u crijevima jer adherencijom na sluznični epitel sprječavaju adherenciju drugih bakterija i samim time moguće izazivanje infekcije (3). Još jedna važna uloga je produkcija vitamina K koji je neophodan u procesu koagulacije.

## **1.2. Uzorkovanje i dijagnostika anaerobnih bakterija**

Dijagnostika anaerobnih bakterija nije jednostavna. Uspjeh izoliranja anaerobnih bakterija iz uzorka ovisi upravo o tome je li uzorak pravilno uzet i dostavljen u laboratorij. Za prijenos uzoraka koriste se posebne transportne podloge koje moraju zadovoljiti specifične uvjete koji pogoduju anaerobnim bakterijama, a to je atmosfera u kojoj kisik ne smije biti prisutan. Za prijenos uzoraka koriste se posebne transportne podloge. Pri uzimanju uzorka ne smije doći do kontaminacije normalnom mikrobiotom te je uzorak najbolje uzeti prije početka primjene antimikrobne terapije. Uzorci poput aspirata uzetih iz dubokih rana i tkiva dobivenih biopsijom pogodni su za anaerobnu analizu (3). Punktat apscesa, primarno sterilne tjelesne tekućine dobivene punkcijom (krv, likvor, pleuralni apsirat), transtrahealni aspirat, bronhoskopski aspirat, uzorci su koji su prihvatljivi za anaerobnu analizu (3). Uzorci poput obrisaka kože, rane, cerviksa, uretre ili iskašljaja su najmanje poželjni u dijagnostici anaerobnih bakterija i trebaju se ograničiti na uzimanje u uvjetima kada druge uzorke nikako nije moguće uzeti (2). Uzorke je potrebno što prije dostaviti u laboratorij, najbolje unutar 2 sata od uzorkovanja na sobnoj temperaturi. Uzorke je potrebno pohraniti u anaerobni transportni medij bez kisika i po mogućnosti uzeti veću količinu uzorka. Komercijalno dostupne podloge za anaerobe su: Stuart, Cary-Blair i Amies transportni medij (7). U polimikrobnim infekcijama jest izuzetno teško izolirati anaerobe na hranjivim podlogama zbog bržeg porasta fakultativno anaerobnih bakterija koje će potom usporiti ili onemogućiti rast anaeroba (3). Za uzgoj anaerobnih bakterija u primjeni su kruta hranilišta poput Columbia agara i Schedler Neomycin Vancomycin (SNVS) agara koji se nakon inokulacije uzoraka stavljaju u posebne lonce za stvaranje anaerobne atmosfere koja se sastoji od vodika, dušika i ugljikovog dioksida. Također se koriste i tekuće podloge poput tioglikolatnog bujona (5). Navedena hranilišta načinjena su od medija koji je bogat hranjivim tvarima što omogućava

rast zahtjevnih anaerobnih bakterija (5). Zbog posebnih uzgojnih karakteristika, kao što su sporo vrijeme generacije i anaerobni atmosferski uvjeti, nužan je drugačiji pristup testiranju osjetljivosti striktno anaerobnih bakterija, pri čemu je metoda prijelomne točke jednostavna i pogodna za izvedbu.

### 1.3. Najčešći uzročnici infekcija i razvoj rezistencije

Najčešći gram-pozitivni sporogeni anaerobni uzročnik kliničkih infekcija je *Clostridium spp.*, posebno vrste *Clostridium difficile*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, dok su *Actinomices* i *Peptostreptococcus* najčešće detektirani gram-pozitivni nesporogeni anaerobi (4). U skupinu gram-negativnih anaeroba ubrajamo rodove *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Veillonella* te *Porphyromonas* (4). S obzirom na mjesto infekcije, *Clostridium spp.* i *Bacteroides spp.* uglavnom potječu iz gastrointestinalnog trakta, dok *Prevotella spp.*, *Fusobacterium spp.* i *Porphyromonas spp.* potječu iz ženskog genitalnog sustava (8). Problem u liječenju infekcija uzrokovanih ovim anaerobnim bakterijama predstavlja razvoj rezistencije na antibiotike koja je rezultat nekritične primjene antibiotika. Rezistencija može dovesti do velikog problema u liječenju anaerobnih infekcija, posebno kod pacijenata s već teškim primarnim bolestima. U posljednjem desetljeću došlo je do sve učestalije pojave bolničkih infekcija uzrokovanih anaerobom *Clostridium difficile*, u najvećoj mjeri kod pacijenata koji duže vrijeme uzimaju velike količine antibiotika (9). Zabilježen je i porast broja izvanbolničkih infekcija kao i smanjeni broj antibiotika na koje *Clostridium difficile* pokazuje osjetljivost (10). Kod pacijenata na jedinicama intenzivne njege zaraza ovim anaerobom može dovesti do teškog stanja, pa čak i smrti. Brojni mehanizmi otpornosti su zapravo odgovorni za razvoj rezistencije na antimikrobne lijekove te je vrsta *Bacteroides fragilis* poznata kao jedna od najotpornijih u skupini anaerobnih bakterija (11). Antimikrobna osjetljivost varira od kontinenata i regija, a posebno je zabilježen velik porast rezistencije u Europi i Aziji te kod bakterijskog roda *Clostridium spp.* i vrste *Bacteroides fragilis* (12). Razvoj rezistencije na antimikrobne lijekove globalni je problem koji se pogoršao s povećanjem broja migracija u svijetu, prekomjernim ili nepotrebnim propisivanjem lijekova za liječenje ljudi, ali i životinja te širenjem bolničkih infekcija među pacijentima i osobljem (13). Porast rezistencije na prve lijekove izbora za liječenje anaerobnih bakterija ukazuje na potrebu za racionalnim propisivanjem antibiotika pacijentima. Isto tako, nužno je upoznati pacijente s važnošću pravilne primjene antibiotske terapije.

#### 1.4. Metode ispitivanja osjetljivosti bakterija na antibiotike

Metode ispitivanja osjetljivosti bakterija na antibiotike mogu biti kvalitativne i kvantitativne (1). Kvalitativna je metoda disk difuzijska metoda kojom se dobiva podatak o promjeru zone inhibicije rasta bakterije oko diska u koji je impregniran antibiotik, dok su kvantitativne metode makrodilucija i mikrodilucija u bujonu te agar dilucija (1).

U disk difuzijskoj se metodi na krutu podlogu inokulira određena količina čiste bakterijske kulture te se potom nanose papirnati diskovi s točno određenom količinom antibiotika (3). Postupak se izvodi u Petrijevoj zdjelici na čvrstoj hranjivoj podlozi – Mueller-Hintonov agar koji može imati dodatak ovčje krvi (14). Za određivanje osjetljivosti gleda se porast bakterijske vrste oko diska s antibiotikom na hranilištu. Ukoliko je bakterija rezistentna na antibiotik, zapaziti ćemo njezin porast oko diska s antibiotikom, a ako je bakterija osjetljiva, porast će izostati u određenoj udaljenosti oko diska (3). Rezultati disk difuzijske metode određuju se na temelju bakterijskog porasta na određenoj udaljenosti od diska i izražavaju se svrstavanjem u kategorije: „S“ (senzitivna ili osjetljiva), „I“ (intermedijarna ili osjetljiva uz povećanu izloženost antibiotiku) i „R“ (rezistentna ili otporna) (3). Prednosti ove metode su jednostavnost, brzo dobivanje rezultata, moguće već 18-24 sata od izolacije i identifikacije bakterijske vrste te mogućnost testiranja osjetljivosti bakterijskog soja na više antibiotika istovremeno (14). Disk difuzijska metoda još uvijek nije preporučljiva metoda za testiranje osjetljivosti anaeroba te su smjernice za primjenu ove metode u izradi. Razlozi su nepreciznost rezultata i odstupanje od rezultata dobivenih agar dilucijom (15). Još jedan oblik difuzijske metode je E-test te se zbog jednostavnosti i brzine izvođenja može koristiti kao zamjena za dilucijske metode (1). Na hranilište se inokulira pripremljena suspenzija bakterijskog soja na koji se potom postavlja plastična ili papirnata trakica E-testa koja je impregnirana gradijentom koncentracije ispitivanog antibiotika (3). Antibiotik će difundirati različito daleko što ovisi o koncentraciji te je nakon toga moguće očitati MIK nakon 18 - 24 sata (3).

Primjenom kvantitativnih metoda dobiva se podatak o minimalnoj inhibitornoj koncentraciji (MIK), odnosno najnižoj koncentraciji antibiotika koja inhibira rast određenog mikroorganizma (15). Dilucijska se metoda može provoditi na krutom mediju ili tekućem mediju - agaru ili bujonu. Kao i za disk difuziju, potrebno je inokulirati određenu količinu bakterijskog soja koji će se potom staviti u dodir s različitim koncentracijama antibiotika te će se određivati MIK. Ova metoda je relativno zahtjevnija zbog čega nije praktična za rutinsku

primjenu u laboratoriju , ali se često koristi pri provođenju nadzornih studija (7). Za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti anaeroba kao referentni standard uzima se agar dilucija (7).

Ispitivanje osjetljivosti anaerobnih bakterija provodi se i metodom prijelomne točke (*breakpoint*). Ova je metoda modificirani oblik dilucijske metode u bujonu. U jažicu se prenosi suspenzija koja je prethodno načinjena od određene koncentracije antibiotika i bakterije koju želimo testirati (Slika 1). Koncentracija antibiotika predstavlja „prijelomnu točku“ za određivanje je li bakterija osjetljiva ili otporna. Ukoliko je bakterija osjetljiva na antibiotik u jažici neće doći do zamućenja, odnosno porasta bakterije. Ukoliko je MIK (minimalna inhibitorna koncentracija) manji ili jednak osjetljivosti prijelomne točke, bakterija se smatra osjetljivom na antibiotik. Metoda se primjenjuje u rutinskom radu u laboratoriju.



**Slika 1. Komercijalno dostupan sustav (ATB ANA, Biomerieux, France) za ispitivanje osjetljivosti metodom prijelomne točke (izvor: fotografirala Nina Dener)**

## **2. CILJ RADA**

Cilj rada je prikazati osobitosti testiranja osjetljivosti striktno anaerobnih bakterija na antibiotike i prikazati rezultate testiranja u periodu 18.05.2020. - 18.05.2022. Zavoda za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Klinike za infektologiju KBC Osijek.

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. odrediti udio anaerobnih izolata u ispitivanom periodu
2. ispitati učestalost pojedinih bakterijskih vrsta
3. ispitati antimikrobnu osjetljivost izdvojenih izolata

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

#### **3.1. Ustroj studije**

Istraživanje je ustrojeno kao presječno.

#### **3.2. Materijal**

U istraživanje su uključeni rezultati dobiveni ispitivanjem antimikrobne osjetljivosti striktno anaerobnih izolata izdvojenih iz uzoraka u rutinskom radu u Zavodu za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije u periodu 18.05.2020. - 18.5.2022.

#### **3.3. Metode**

Za potrebe ovog istraživanja korišteni su podaci o izoliranim bakterijama, rezultatima antimikrobne osjetljivosti i uzorcima dobiveni iz arhivske i elektroničke baze podataka Zavoda za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Klinike za infektologiju KBC Osijek.

Za uzgoj anaerobnih bakterija primijenjene su konvencionalne mikrobiološke metode, odnosno uzgoj na krutim hranilištima poput Columbia agara i Schedler Neomycin Vancomycin agara (SNVS agar) u atmosferi s anaerobnim uvjetima.

Identifikacija izolata izvršena je pomoću MALDI-TOF MS (Bruker, Ultraflex) uređaja.

Ispitivanje osjetljivosti izolata provedeno je metodom prijelomne točke (*breakpoint*) pomoću komercijalno dostupnog sustava (ATB ANA, Biomerieux, France), interpretiran prema EUCAST smjernicama.

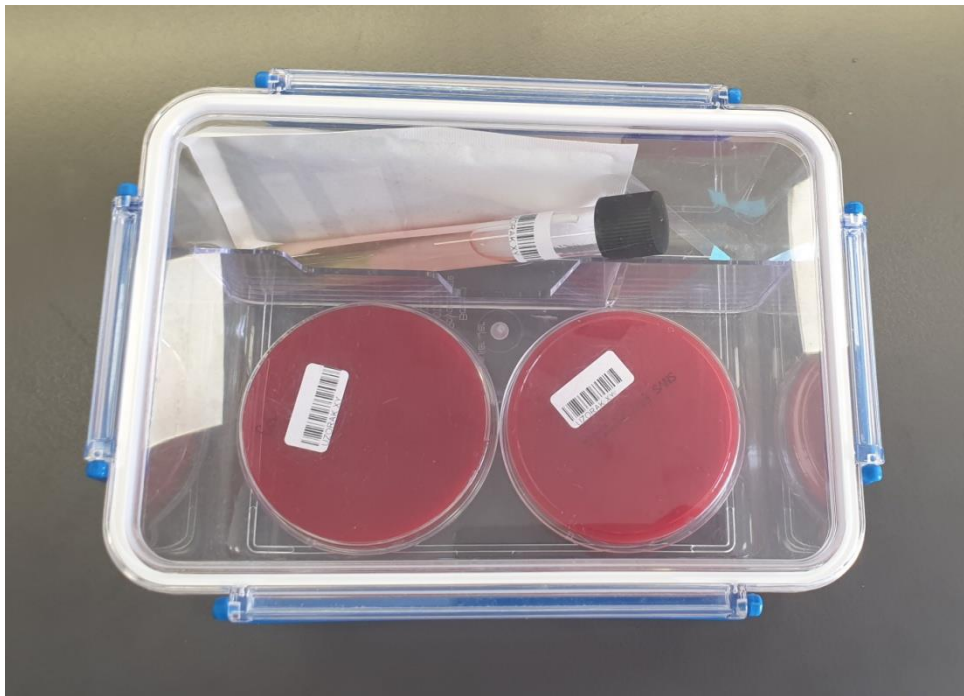
#### **3.4. Metode obrade uzoraka**

Uzorci uzeti iz područja koje karakteristično inficiraju anaerobi (trbušna šupljina, rane) inokulirani su na Columbia i SNVS agar te tioglikolatni bujon. Nakon toga, hranjive podloge stavljene su u lonac za anaerobnu kultivaciju. Uz hranjive podloge u lonac su stavljene i indikator atmosfere (*Anaerobic indicator*, Biomerieux) te generator atmosfere (*Genebox anaerobic gas pack*, Biomerieux). Indikator atmosfere prethodno se namoči vodom. Ukoliko su anaerobni uvjeti zadovoljeni, u loncu će doći do promjene boje indikatora iz plave u bijelu.

Generator atmosfere služi za uklanjanje kisika iz lonca. Idući je korak stavljanje lonca u termostat na inkubaciju na 37 °C tijekom 48 sati. Navedena aparatura prikazana je na Slici 2.

Nakon 48 sati inkubacije, pregledana su prva hranilišta inokulirana uzorkom i od svake makromorfološki različite kolonije izrađen je test aerotolerancije. Također, nakon 48 sati se tioglikolat presađivao na Columbia i SNVS agar. Porasla kolonija je identificirana na uređaju MALDI-TOF MS. Izrađen je test osjetljivosti metodom prijelomne točke (ATB ANA, Biomerieux) i kontrolni test aerotolerancije („*purity plate*“) nakon čega su hranilišta ponovno stavljena u termostat na inkubaciju tijekom 24 sata.

Nakon inkubacije očitani su test osjetljivosti i određen MIK.



**Slika 2. Aparatura potrebna za uzgoj anaerobnih bakterija: lonac za anaerobne uvjete, Columbia agar, SNVS agar, tioglikolatni bujon, indikator atmosfere i generator atmosfere (izvor: fotografirala Nina Dener)**

#### **3.4.1. Priprema suspenzije za test osjetljivosti**

Napravi se suspenzija 3 McF u NaCl 0,85 % mediju te se 200  $\mu$ L suspenzije prebaci u ATB S medij. Nakon otvaranja i označavanja stripa u svaku se jažicu dodalo 135  $\mu$ L iz ATB S medija (Slika 3). Strip s jažicama se potom inkubirao na 37 °C u anaerobnim uvjetima.



Bitno je napraviti i kontrolni test aerotolerancije, odnosno kontrolu čistoće izvedbe testa iz 3 McF medija i ATB S medija na način da se Columbia agar potom izloži anaerobnim uvjetima, a krvni agar aerobnim uvjetima. Kontrolni test aerotolerancije je zadovoljen ukoliko je došlo do porasta bakterija na Columbia agaru, ali ne i na krvnom agaru. Time je potvrđeno kako se radi o anaerobnoj bakteriji.



**Slika 3. Izrada ATB ANA, Biomerieux, France za ispitivanje osjetljivosti anaerobnih bakterija ( izvor: fotografirala Nina Dener)**

#### **3.5. Statističke metode**

Podatci koji su definirani ciljevima istraživanja i rezultati provedenog ispitivanja prikazani su grafički i tabelarno te su obrađeni deskriptivnom statistikom.

Kategorijski podatci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama, a numerički su podatci opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjele koja slijedi normalnu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama intrakvartilnog raspona.

Razlike kategorijskih varijabli testirane su hi-kvadrat testom. Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na  $\alpha = 0,05$ . Podatci su statistički analizirani upotrebom informatičkog programa SPSS (inačica 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, SAD) i Microsoft Office Excel tabličnog kalkulatora.

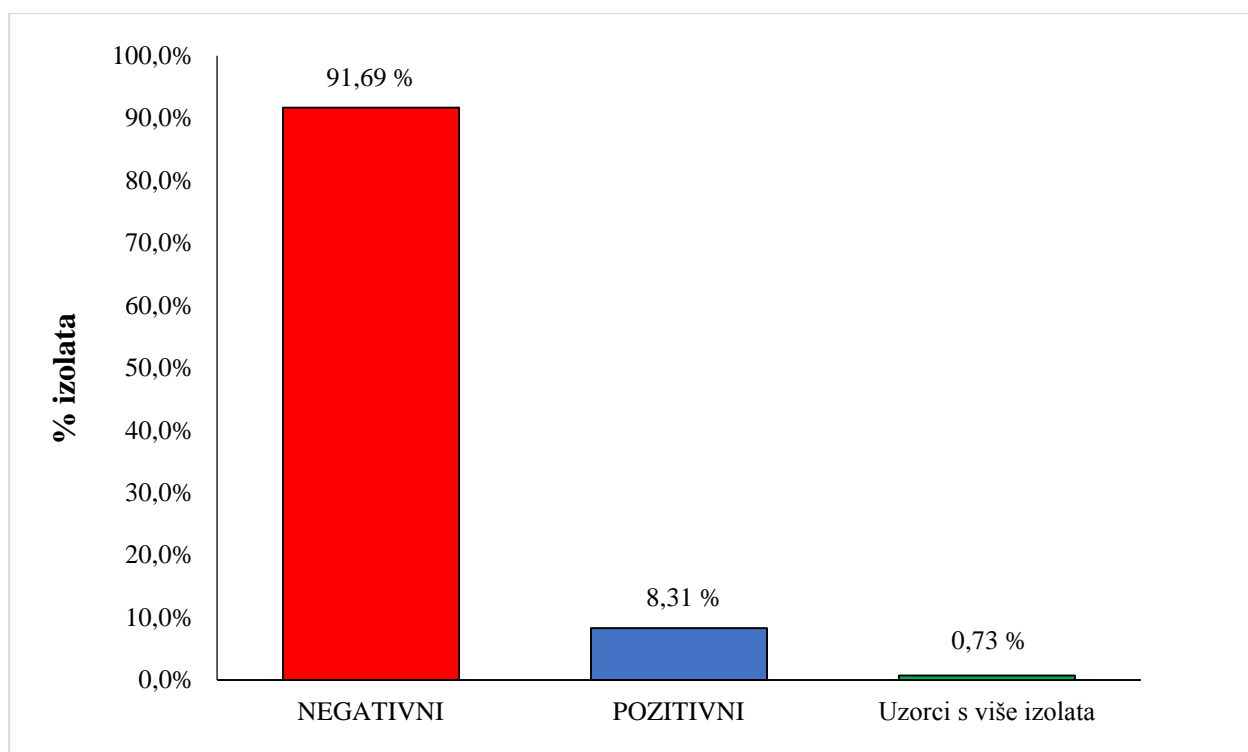
#### 4. REZULTATI

U Zavodu za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Klinike za infektologiju KBC Osijek u periodu od 18. svibnja 2020. godine do 18. svibnja 2022. godine obrađeno je 6693 uzoraka sa zahtjevom za anaerobnu analizu. Obrađena su 4343 (64,89 %) uzorka hemokultura i likvora, što ih čini najčešćom vrstom uzorka sa zahtjevom za anaerobnu obradu, dok su na drugom mjestu uzorci kože i potkožja s ukupnim brojem uzoraka 1091 (16,30 %) (hi-kvadrat test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 1).

**Tablica 1. Pregled rezultata izvršenih pretraga**

UZORAK	REZULTAT PRETRAGE	N*	%	P†
<b>Koža i potkožje (SSTI)</b>	ukupno testiranih uzoraka	1091	16,30 %	< 0,001
	negativno	927	84,97 %	
	pozitivno	164	15,03 %	
<b>Hemokultura i likvor</b>	ukupno testiranih uzoraka	4343	64,89 %	
	negativno	4081	93,97 %	
	pozitivno	262	6,03 %	
<b>Intraoperativni uzorci</b>	ukupno testiranih uzoraka	659	9,85 %	
	negativno	572	86,80 %	
	pozitivno	87	13,20 %	
<b>Punktati</b>	ukupno testiranih uzoraka	563	8,41 %	
	negativno	526	93,43 %	
	pozitivno	37	6,57 %	
<b>Ostalo</b>	ukupno testiranih uzoraka	37	0,55 %	
	negativno	31	83,78 %	
	pozitivno	6	16,22 %	
<b>UKUPNO</b>		6693	100 %	

\*Broj uzoraka, †hi-kvadrat test ( $\chi^2$ )



**Slika 4. Rezultati izolacije nakon anaerobne inkubacije**

Od 6693 obrađena uzorka sa zahtjevom za anaerobnu analizu, ukupno pozitivnih anaerobnih uzoraka bilo je 556. Iz 556 (8,31 %) uzoraka nakon anaerobne inkubacije izdvojeno je i identificirano ukupno 605 (331 fakultativno i 274 striktno anaerobnih) izolata (Slika 4). Izolirana su 274 striktno anaerobna izolata, što ukazuje na incidenciju striktno anaerobnih bakterija od 4,09 %.

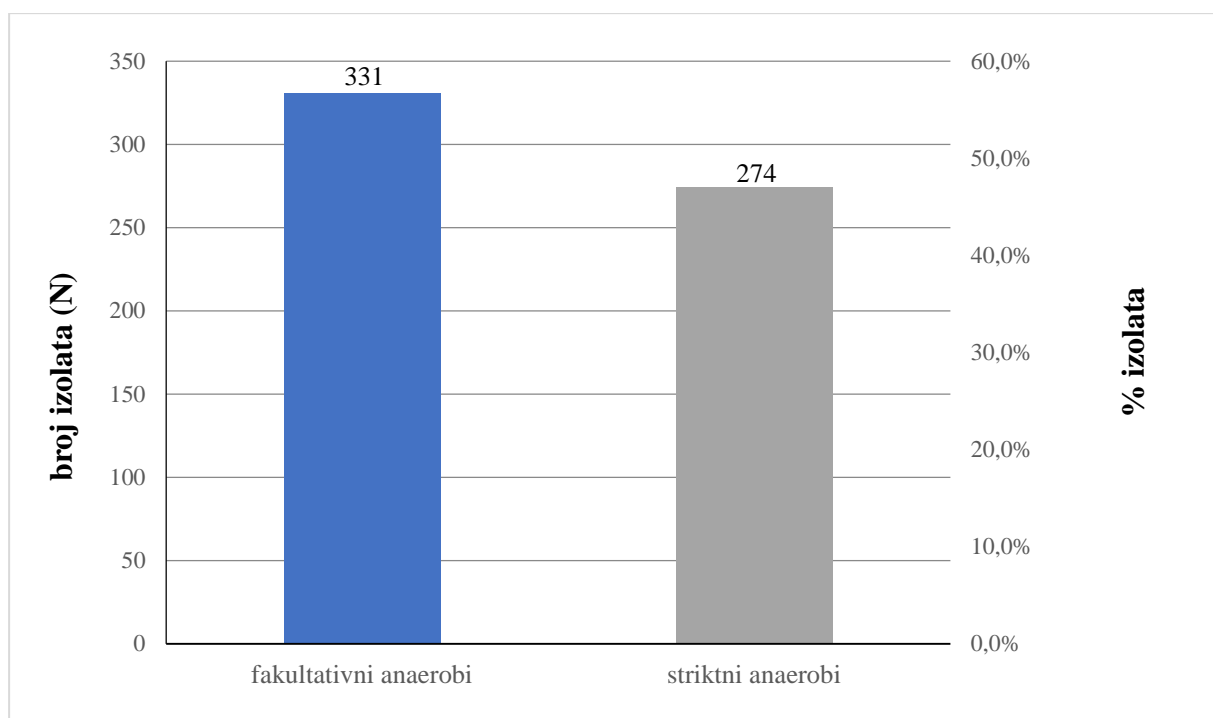
283 (46,78 %) izolata izolirano je iz uzoraka hemokultura i likvora, od čega je bilo 276 (45,61 %) fakultativno anaerobnih bakterija, što je ujedno i najveći broj izoliranih fakultativnih anaeroba, dok je striktno anaerobnih bakterija bilo samo 7 (1,16 %). Iz uzoraka kože i potkožja izolirano je 175 (28,93 %) anaerobnih bakterija, od čega 16 (2,64 %) fakultativnih anaeroba te 159 (26,28 %) striktnih anaeroba, što predstavlja najveći broj izoliranih striktnih anaeroba iz obrađenih uzoraka. Gotovo svi izolati iz intraoperativnih uzoraka, njih 94 od 99 su striktni anaerobi (hi-kvadrat test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 2).

**Tablica 2. Podjela izoliranih vrsta s obzirom na metaboličke potrebe za kisikom iz pozitivnih uzoraka**

<b>UZORAK</b>		<b>N*</b>	<b>%</b>	<b>P†</b>
<b>Koža i potkožje (SSTI)</b>	<b>Ukupno izolata</b>	<b>175</b>	<b>28,93 %</b>	< 0,001
	Fakultativni anaerobi	16	2,64 %	
	Striktni anaerobi	159	26,28 %	
<b>Hemokultura i likvor</b>	<b>Ukupno izolata</b>	<b>283</b>	<b>46,78 %</b>	
	Fakultativni anaerobi	276	45,62 %	
	Striktni anaerobi	7	1,16 %	
<b>Intraoperativni uzorci</b>	<b>Ukupno izolata</b>	<b>99</b>	<b>16,36 %</b>	
	Fakultativni anaerobi	5	0,83 %	
	Striktni anaerobi	94	15,54 %	
<b>Punktati</b>	<b>Ukupno izolata</b>	<b>42</b>	<b>6,94 %</b>	
	Fakultativni anaerobi	31	5,12 %	
	Striktni anaerobi	11	1,82 %	
<b>Ostalo</b>	<b>Ukupno izolata</b>	<b>6</b>	<b>0,99 %</b>	
	Fakultativni anaerobi	3	0,50 %	
	Striktni anaerobi	3	0,50 %	
<b>Ukupno</b>		<b>605</b>	<b>100 %</b>	

\*Broj uzoraka, †hi-kvadrat test ( $\chi^2$ )

Iz dobivenih podataka vidljiv je odnos između izoliranih fakultativno anaerobnih bakterija i striktno anaerobnih bakterija (Slika 5).



**Slika 5. Ukupan broj izolata identificiranih tijekom anaerobne obrade**

#### **4.1. Pregled anaerobnih izolata po rodovima i vrstama**

Rod *Bacteroides spp.* sa 130 izolata (47,45 %) prevladava među izoliranim rodovima. Rod *Prevotella spp.* iz uzoraka je izoliran 89 puta (32,48 %) te je drugi najčešći uzročnik od izoliranih anaerobnih bakterija u ispitivanom periodu (Tablica 3). Ova dva roda ubrajamo u gram-negativne bakterije koje su prema dobivenim podacima iz Tablice 3 u velikoj mjeri češći uzročnici infekcija u ljudi nego gram-pozitivne bakterije.

Tablica 3. Pregled anaerobnih izolata po rodovima u dvogodišnjem periodu

<i>ROD</i>	<i>N*</i>	<i>(%)</i>
<i>Actinomyces</i>	1	0,36 %
<i>Anaerococcus</i>	2	0,73 %
<i>Bacteroides</i>	<b>130</b>	<b>47,45 %</b>
<i>Bifidobacterium</i>	1	0,36 %
<i>Clostridium</i>	6	2,19 %
<i>Cutibacterium</i>	10	3,65 %
<i>Fusobacterium</i>	18	6,57 %
<i>Parabacteroides</i>	2	0,73 %
<i>Peptoniphilus</i>	8	2,92 %
<i>Peptostreptococcus</i>	1	0,36 %
<i>Porphyrromonas</i>	5	1,82 %
<i>Prevotella</i>	<b>89</b>	<b>32,48 %</b>
<i>Veillonella</i>	1	0,36 %
<b>UKUPNO</b>	<b>274</b>	<b>100 %</b>

\*broj izolata

Vrsta *Bacteroides fragilis* sa 71 izolatom najčešći je uzročnik infekcija u ljudi od anaerobnih bakterija. Slijede ga vrste *Bacteroides thetaiotaomicron* te *Prevotella denticola*, *Prevotella bivia* i *Prevotella buccae* (Slika 6).



**Slika 6. Izolirane anaerobne vrste bakterija u periodu 18.5.2020. – 18.5.2022.**



#### 4.2. Pregled antimikrobne osjetljivosti anaerobnih izolata

Anaerobnim gram-negativnim izolatima testirana je antimikrobna osjetljivost na sljedeće antibiotike: penicilin, amoksicilin, amoksicilin + klavulanska kiselina, piperacilin + tazobaktam, klindamicin, imipenem i metronidazol, a gram-pozitivnim izolatima testirana je osjetljivost i na vankomicin. Antimikrobna osjetljivost ispitana je za ukupno 258 klinički značajnih izolata.

#### 4.3. Pregled antimikrobne osjetljivosti gram-negativnih anaerobnih bakterija

U ispitivanom periodu bilo je 232 gram-negativnih anaeroba kojima je određena osjetljivost. Rodovi gram-negativnih anaerobnih bakterija kojima je testirana osjetljivost su: *Bacteroides spp.*, *Parabacteroides spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.*, *Porphyromonas spp.* te vrsta *Alloprevotella rava*. Značajniji udio u ispitivanju osjetljivosti zauzimaju rodovi *Bacteroides spp.* i *Prevotella spp.*, a slijede ih rodovi *Fusobacterium spp.* i *Porphyromonas spp.* (Tablica 4).

Iz roda *Parabacteroides spp.* testirana su dva uzročnika te je jedan osjetljiv na klindamicin, piperacilin + tazobaktam, imipenem i metronidazol, a otporan na penicilin, amoksicilin i amoksicilin + klavulansku kiselinu. Drugi izolat osjetljiv je samo na imipenem i metronidazol, dok je na ostale testirane antibiotike otporan.

*Alloprevotella rava*, koja je izolirana samo u jednom slučaju, rezistentna je jedino na klindamicin, a osjetljiva na ostale testirane antibiotike.

Tablica 4. Prikaz antimikrobne osjetljivosti najčešćih gram-negativnih anaeroba

<b>IZOLAT (broj testiranih) I ANTIBIOTIK</b>	<b>S* (%)</b>	<b>I† (%)</b>	<b>R‡ (%)</b>
<b><i>Bacteroides spp. (126)</i></b>			
penicilin	3,17	0,00	96,83
amoksicilin	4,76	0,00	95,24
amoksicilin+klavulanska kis.	69,05	3,17	27,78
piperacilin+tazobaktam	83,33	5,56	11,11
klindamicin	59,52	0,00	40,48
imipenem	98,41	1,59	0,00
metronidazol	99,21	0,00	0,79
<b><i>Prevotella spp. (83)</i></b>			
penicilin	28,92	1,20	69,88
amoksicilin	33,73	1,20	65,06
amoksicilin+klavulanska kis.	97,59	0,00	2,41
piperacilin+tazobaktam	100,00	0,00	0,00
klindamicin	28,92	0,00	71,08
imipenem	100,00	0,00	0,00
metronidazol	95,18	0,00	4,82
<b><i>Fusobacterium spp. (16)</i></b>			
penicilin	81,25	6,25	12,50
amoksicilin	87,50	0,00	12,50
amoksicilin+klavulanska kis.	100,00	0,00	0,00
piperacilin+tazobaktam	100,00	0,00	0,00
klindamicin	93,75	0,00	6,25
imipenem	100,00	0,00	0,00
metronidazol	100,00	0,00	0,00
<b><i>Porphyromonas spp. (5)</i></b>			
penicilin	60,00	0,00	40,00
amoksicilin	60,00	0,00	40,00
amoksicilin+klavulanska kis.	100,00	0,00	0,00
piperacilin+tazobaktam	100,00	0,00	0,00
klindamicin	80,00	0,00	20,00
imipenem	100,00	0,00	0,00
metronidazol	100,00	0,00	0,00

\*osjetljiv, †osjetljiv uz povećanu izloženost, ‡otporan

Gram-negativne anaerobne bakterije pokazuju osjetljivost na metronidazol, osim jednog izoliranog uzročnika iz roda *Bacteroides spp.* i četiri izolirana uzročnika iz roda *Prevotella spp.* Uglavnom su osjetljive na amoksicilin + klavulansku kiselinu te piperacilin + tazobaktam. Svi izolirani gram-negativni anaerobni uzročnici osjetljivi su na imipenem, dok dva izolata iz roda *Bacteroides spp.* pokazuju osjetljivost uz povećanu izloženost antibiotiku. (Tablica 5).

**Tablica 5. Prikaz osjetljivosti gram-negativnih anaeroba na antimikrobne kemoterapeutike**

	<b>S*</b> N (%)	<b>I†</b> N (%)	<b>R‡</b> N (%)
<b>penicilin</b>	44 (18,97)	2 (0,86)	186 (80,17)
<b>amoksicilin</b>	51 (21,98)	1 (0,43)	180 (77,59)
<b>amoksicilin+ klavulanska kis.</b>	189 (81,47)	4 (1,72)	39 (16,81)
<b>piperacilin+ tazobaktam</b>	210 (90,52)	7 (3,02)	15 (6,47)
<b>klindamicin</b>	119 (51,29)	0 (0,00)	113 (48,71)
<b>imipenem</b>	230 (99,14)	2 (0,86)	0 (0,00)
<b>metronidazol</b>	227 (97,84)	0 (0,00)	5 (2,16)

\*osjetljiv, †osjetljiv uz povećanu izloženost, ‡otporan

#### 4.4. Pregled antimikrobne osjetljivosti gram-pozitivnih anaerobnih bakterija

U ispitivanom periodu bilo je 26 gram-pozitivnih anaerobnih bakterija kojima je ispitana osjetljivost. Rodovi gram-pozitivnih anaerobnih bakterija kojima je testirana osjetljivost su: *Clostridium spp.*, *Cutibacterium spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Peptoniphilus spp.* te vrste *Actinomyces meyeri*, *Anaerococcus vaginalis* i *Bifidiobacterium breve*.

Značajniji udio u testiranju antimikrobne osjetljivosti zauzimaju rodovi *Cutibacterium spp.*, *Peptoniphilus spp.* i *Clostridium spp.* (Tablica 6).

*Actinomyces meyeri* i *Bifidiobacterium breve* su osjetljivi na sve testirane antibiotike osim na metronidazol.

*Anaerococcus vaginalis* osjetljiv je na sve testirane antibiotike.

Tablica 6. Prikaz antimikrobne osjetljivosti najčešćih gram-pozitivnih anaeroba

IZOLAT (broj testiranih) I ANTIBIOTIK	S* (%)	I† (%)	R‡ (%)
<b><i>Clostridium spp. (6)</i></b>			
penicilin	66,67	0,00	33,33
amoksisilin	66,67	0,00	33,33
amoksisilin+klavulanska kis.	100,00	0,00	0,00
piperacilin+tazobaktam	100,00	0,00	0,00
klindamicin	83,33	0,00	16,67
imipenem	100,00	0,00	0,00
metronidazol	100,00	0,00	0,00
vankomicin	66,66	16,67	16,67
<b><i>Cutibacterium spp. (8)</i></b>			
penicilin	100,00	0,00	0,00
amoksisilin	100,00	0,00	0,00
amoksisilin+klavulanska kis.	100,00	0,00	0,00
piperacilin+tazobaktam	100,00	0,00	0,00
klindamicin	75,00	0,00	25,00
imipenem	100,00	0,00	0,00
metronidazol	0,00	0,00	100,00
vankomicin	100,00	0,00	0,00
<b><i>Peptoniphilus spp. (8)</i></b>			
penicilin	75,00	0,00	25,00
amoksisilin	100,00	0,00	0,00
amoksisilin+klavulanska kis.	100,00	0,00	0,00
piperacilin+tazobaktam	100,00	0,00	0,00
klindamicin	75,00	0,00	25,00
imipenem	100,00	0,00	0,00
metronidazol	100,00	0,00	0,00
vankomicin	100,00	0,00	0,00

\*osjetljiv, †osjetljiv uz povećanu izloženost, ‡otporan

Svi ispitivani izolati pokazuju osjetljivost na amoksisilin + klavulansku kiselinu, piperacilin + tazobaktam te imipenem (Tablica 7) .

**Tablica 7. Prikaz osjetljivosti gram-pozitivnih anaeroba na antimikrobne kemoterapeutike**

	<b>S*</b> N (%)	<b>I†</b> N (%)	<b>R‡</b> N (%)
<b>penicilin</b>	22 (84,62)	1 (3,85)	3 (11,54)
<b>amoksicilin</b>	24 (92,31)	0 (0,00)	2 (7,69)
<b>amoksicilin+ klavulanska kis.</b>	26 (100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
<b>piperacilin+ tazobaktam</b>	26 (100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
<b>klindamicin</b>	21 (80,77)	0 (0,00)	5 (19,23)
<b>imipenem</b>	26 (100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
<b>metronidazol</b>	16 (61,54)	0 (0,00)	10 (38,46)
<b>vankomicin</b>	24 (92,31)	1 (3,85)	1 (3,85)

\*osjetljiv, †osjetljiv uz povećanu izloženost, ‡otporan

## 5. RASPRAVA

Analizom dobivenih podataka može se zaključiti kako su rezultati dobiveni ispitivanjem antimikrobne osjetljivosti striktno anaerobnih izolata izdvojenih iz uzoraka u rutinskom radu Zavoda za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Klinike za infektologiju KBC Osijek očekivani i pokazuju sličnost s već provedenim istraživanjima o ovoj temi u Hrvatskoj i nekim zemljama svijeta (16, 17, 18).

U istraživanju su analizirani podatci prikupljeni u periodu od 18. svibnja 2020. godine do 18. svibnja 2022. godine u kojem je obrađeno 6693 uzoraka sa zahtjevom za anaerobnu analizu, od čega je iz 556 (8,31 %) nakon anaerobne inkubacije izdvojeno i identificirano ukupno 605 (331 fakultativno i 274 striktno anaerobnih) izolata. 274 izolata striktno anaerobnih bakterija u ovome istraživanju ukazuje na incidenciju od 4,09 %.

Patogeni su u najvećoj mjeri izolirani iz uzoraka hemokultura i likvora (46,78 %), potom iz uzoraka kože i potkožja (28,93 %) te intraoperativnih uzoraka (16,36 %). Navedeni podatci slični su rezultatima prethodnih istraživanja, gdje je najveći broj patogena također izoliran iz uzoraka hemokultura (60,30 %) u istraživanju koje je provedeno u bolničkoj ustanovi u Maleziji, kao i u istraživanju provedenom u Kanadi gdje je 55,30 % anaeroba izolirano iz uzoraka hemokultura (16, 17). Slijede ih uzorci kože i tkiva te razni punktati (17). Budući da je uzoraka hemokultura i likvora bilo najviše u ovome istraživanju, sukladno tome je i detektiran velik broj pozitivnih kultura u kojoj dominiraju fakultativno anaerobne bakterije. Najviše striktnih anaeroba izolirano je iz uzoraka kože i potkožja te intraoperativnih uzoraka, ali broj izoliranih fakultativnih anaeroba ipak prednjači u ukupnom broju anaerobnih izolata.

Rod *Bacteroides spp.* najčešće je izolirani rod, a slijede ga *Prevotella spp.*, *Fusobacterium spp.* i *Porphyromonas spp.* U ovome istraživanju opažena je dominacija gram-negativnih anaerobnih bakterija kao uzročnika infekcija, što je sukladno rezultatima istraživanja provedenog u KBC Split (18). Najčešće izolirana vrsta je *Bacteroides fragilis* sa 71 izolatom, koji je zabilježen u prijašnjim istraživanjima kao najčešći striktno anaerobni uzročnik, upravo zbog brojnih mehanizama otpornosti poput polisaharidne kapsule, lipopolisaharida i različitih enzima koje posjeduje, a kojima može uzrokovati oštećenje tkiva (19). Također je opisan kao najčešći uzročnik i u istraživanju provedenom u KBC Split, ali i u istraživanju provedenom u bolničkoj ustanovi u Indiji (18, 19). Rod *Prevotella spp.* također je jedan od češće izoliranih u nedavno provedenim istraživanjima (19).

Rezultati pokazuju kako je gram-pozitivnih anaerobnih uzročnika infekcija izolirano znatno manje nego gram-negativnih. Najčešće su izolirani rodovi *Cutibacterium spp.* i *Peptoniphilus spp.*, oba s 8 izolata, te rod *Clostridium spp.* sa 6 izolata.

Rezultati antimikrobne osjetljivosti pokazuju dosad već zabilježene podatke o osjetljivosti i rezistenciji pojedinih anaerobnih bakterijskih rodova. Tako su 122 (96,80 %) izolata iz roda *Bacteroides spp.* rezistentna na penicilin, što odgovara podacima zabilježenim u istraživanju provedenom u KBC Split, gdje je također prisutna rezistencija u rodu *Bacteroides spp.* i iznosi 97,10 % (18). Ostatak ispitanih rodova gram-negativnih anaerobnih bakterija također u velikom broju pokazuje otpornost na penicilin, ali i na amoksicilin. Bitno je naglasiti, kako su svi ispitani gram-negativni anaerobni izolati osjetljivi na imipenem (dva izolata pokazuju osjetljivost uz povećanu izloženost antibiotiku), dok je na metronidazol osjetljivo 227 izolata (97,84 %). Iako u ovome istraživanju niti jedan izolat iz roda *Bacteroides spp.* nije pokazao rezistenciju na karbapeneme, odnosno imipenem, takav slučaj zabilježen je u KBC Osijek 2013. godine, kada je izoliran iz uzorka hemokulture, kod pacijenta s urinarnim kateterom koji je prethodno radi detektiranog ESBL soja liječen karbapenemom (20). Ipak, još uvijek su rijetki slučajevi izoliranja na karbapeneme rezistentnih vrsta iz roda *Bacteroides spp.* (20). Gram-negativne anaerobne bakterije pokazuju dobru osjetljivost na amoksicilin + klavulansku kiselinu te piperacilin + tazobaktam, osim nekoliko izolata iz roda *Bacteroides spp.* s nešto većim postotkom nego u navedenom istraživanju (18).

Gram-pozitivne anaerobne bakterije u velikoj mjeri pokazuju osjetljivost na ispitivane antibiotike. U rezultatima je dobiven podatak o nešto većoj rezistenciji na metronidazol iz razloga što je testirana vrsta iz roda *Cutibacterium spp.* koja je intrizično rezistentna na metronidazol, te je otpornost na ovaj lijek očekivana nakon ispitivanja antimikrobne osjetljivosti. *Actinomyces meyeri* i *Bifidiobacterium breve* također su rezistentni na metronidazol. Svi ostali testirani gram-pozitivni uzročnici anaerobnih infekcija pokazuju osjetljivost na metronidazol.

Rezultati ovoga istraživanja pokazuju sukladnost s rezultatima o rezistenciji u Republici Hrvatskoj, koje svake godine objavljuje Akademija medicinskih znanosti Hrvatske. Podatci iz 2020. godine pokazuju dobru osjetljivost gram-negativnih anaerobnih bakterija na metronidazol, rezistentno je 15,00 % izolata od 493 ispitanih, te u velikoj mjeri pokazuju rezistenciju na penicilin, 84,00 % rezistentnih od 494 ispitanih (21). Gram-pozitivni anaerobi

na ispitivane antibiotike pokazuju očekivanu osjetljivost, osim na metronidazol, gdje je rezistentno 49,00 % izolata od 449 ispitanih što se vjerojatno može pripisati *Cutibacterium spp.* kao predominantno detektiranom izolatu s već ranije opisanom intrizičnom rezistencijom (21).

Rezultati ispitivanja antimikrobne osjetljivosti te zabilježena osjetljivost gram-negativnih izolata na metronidazol i dalje ukazuje da isti zauzima mjesto kao prvi lijek izbora za liječenje infekcija uzrokovanih anaerobnim bakterijama.

Može se zaključiti kako je metronidazol važan antimikrobni lijek na koji još uvijek nije razvijena rezistencija, te ga je iz toga razloga potrebno ciljano i opravdano primjenjivati u liječenju.



## 6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata proizlaze sljedeći zaključci:

- Od ukupno 6693 uzoraka sa zahtjevom za anaerobnu analizu, njih 556 bilo je pozitivno nakon anaerobne inkubacije
- Iz 556 (8,31 %) pozitivnih uzoraka nakon anaerobne inkubacije izdvojeno je i identificirano ukupno 605 izolata, od čega je 274 striktnih anaeroba, a 332 fakultativnih anaeroba
- Incidencija striktno anaerobnih bakterija je 4,09 %
- Najveći broj patogena, 283 (46,78 %) izolata, izolirano je iz uzoraka hemokultura i likvora
- Iz uzoraka kože i potkožja izoliran je najveći broj striktnih anaeroba, njih 159 (26,28 %)
- Iz uzoraka hemokultura i likvora izoliran je najveći broj fakultativnih anaeroba, njih 276 (45,62 %)
- Rod *Bacteroides spp.* sa 130 (47,45 %) izolata prevladava među izoliranim rodovima
- Rod *Prevotella spp.* sa 89 (32,48 %) izolata drugi je najčešći uzročnik od izoliranih anaerobnih bakterija
- *Bacteroides fragilis* sa 71 izolatom najčešće je izolirana vrsta
- Gram-negativni anaerobi pokazuju otpornost na penicilin u 186 (80,17 %) izolata te osjetljivost na metronidazol u 227 (97,84 %) izolata
- Gram-pozitivni anaerobi pokazuju osjetljivost na ispitivane antibiotike u velikom postotku, od 61,54 % do 100,00 %

## 7. SAŽETAK

**CILJ ISTRAŽIVANJA:** Svrha ovog istraživanja bila je odrediti udio anaerobnih izolata u ispitivanom periodu te ispitati učestalost pojedinih bakterijskih vrsta i antimikrobnu osjetljivost izdvojenih izolata.

**NACRT STUDIJE:** Presječna studija.

**MATERIJAL I METODE:** U istraživanju su analizirani rezultati dobiveni ispitivanjem antimikrobne osjetljivosti striktno anaerobnih izolata izdvojenih iz uzoraka u rutinskom radu Zavoda za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije, KBC-a Osijek u periodu od 18.05.2020. do 18.05.2022. Za uzgoj anaerobnih bakterija korištena su kruta hranilišta Columbia i SNVS agar, u atmosferi s anaerobnim uvjetima. Identifikacija izolata izvršena je pomoću MALDI-TOF MS (Bruker, Ultraflex) uređaja. Ispitivanje osjetljivosti izolata provedeno je metodom prijelomne točke - komercijalno dostupnim testom (ATB ANA).

**REZULTATI:** Obradeno je 6693 uzoraka sa zahtjevom za anaerobnu analizu, a 556 uzoraka bilo je pozitivno nakon anaerobne inkubacije. Najveći broj patogena, 283 (46,78 %) izolata, izolirano je iz uzoraka hemokultura i likvora. Najviše striktnih anaeroba izolirano je iz uzoraka kože i potkožja te intraoperativnih uzoraka. Rod *Bacteroides spp.* sa 130 (47,45 %) izolata prevladava među izoliranim rodovima. *Bacteroides fragilis* sa 71 izolatom najčešće je izolirana vrsta. Gram-negativni anaerobi pokazuju otpornost na penicilin u 186 (80,17 %) izolata te osjetljivost na metronidazol u 227 (97,84 %) izolata. Gram-pozitivni anaerobi pokazuju osjetljivost na ispitivane antibiotike u velikom postotku, od 61,54 % do 100,00 %.

**ZAKLJUČAK:** Rezultati ovog istraživanja pokazuju važnost ispitivanja antimikrobne osjetljivosti u svakodnevnoj laboratorijskoj praksi kao i važnost praćenja antimikrobne rezistencije. Metronidazol je prvi lijek izbora za liječenje infekcija uzrokovanih anaerobima.

**KLJUČNE RIJEČI:** anaerobne bakterije, ispitivanje antimikrobne osjetljivosti, osjetljivost, rezistencija

## 8. SUMMARY

### ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF STRICTLY ANAEROBIC BACTERIA

**OBJECTIVES:** The aim of this study was to determine the proportion of anaerobic isolates in the examined period, as well as to examine the frequency of individual bacterial species and to test the antimicrobial susceptibility of isolated anaerobic bacteria.

**STUDY DESIGN:** A cross-sectional study.

**MATERIAL AND METHODS:** This study analysed the results collected by testing the antimicrobial susceptibility of strictly anaerobic isolates obtained from clinical specimens in routine work at the Institute for clinical microbiology and hospital infections at Clinical hospital centre Osijek from May 18<sup>th</sup>, 2020 until May 18<sup>th</sup>, 2022. Solid media, like Columbia and SNVS agar were used for cultivation of anaerobic bacteria, in an atmosphere with anaerobic conditions. The identification of isolates was performed using a MALDI-TOF MS (Bruker, Ultraflex) device. Antibiotic susceptibility measurements were performed by the breakpoint method - commercially available test (ATB AN System).

**RESULTS:** There were 6693 samples with a request for anaerobic analysis and 556 samples were positive after anaerobic incubation. The largest number of pathogens, 283 (46,78 %), were isolated from blood cultures and cerebrospinal fluid. Strict anaerobes were mostly isolated from the skin, subcutaneous and intraoperative samples. Among the isolated genera, genus *Bacteroides spp.* with 130 (47,45 %) isolates is the most dominant. The most frequently isolated species is *Bacteroides fragilis* with 71 isolates. There are 186 (80,17 %) isolates of gram-negative anaerobes that are showing resistance to penicillin and 227 (97,84 %) isolates that are susceptible to metronidazole. Gram-positive anaerobes are susceptible to the tested antibiotics in a high percentage from 61,54 % to 100,00 %.

**CONCLUSION:** The results of this research show the importance of antimicrobial susceptibility testing in everyday laboratory practice, as well as the importance of monitoring antimicrobial resistance. Metronidazole is the first-line treatment for infections caused by anaerobes.

**KEY WORDS:** anaerobic bacteria, antimicrobial susceptibility testing, susceptibility, resistance

**9. LITERATURA**

1. Beader N, Bedenić B, Budimir A. Klinička mikrobiologija – odabrana poglavlja. Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
2. Cornaglia G, Courcol R, Herrmann JL, Kahlmeter G, Peigue-Lafeuille H, Vila J, ur. European Manual of Clinical Microbiology. 1.izd. Basel: ESCMID; 2012.
3. Kalenić S, i sur. Medicinska mikrobiologija. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
4. Noor A, Khetarpal S. Anaerobic Infections. 2022.
5. Gajdacs M, Spengler G, Urban E. Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria: Rubik's Cube of Clinical Microbiology? 2017;6(4):25
6. Cobo F, Borrego J, Gómez E, Casanovas I, Calatrava E, Foronda C, i sur. Clinical Findings and Antimicrobial Susceptibility of Anaerobic Bacteria Isolated in Bloodstream Infections. 2020;9(6):345-7
7. Nagy E, Boyanova L, Justensen US, ESCMID Study Group of Anaerobic Infections. How to isolate, identify and determine antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in routine laboratories. 2018;24(11):1139-1148
8. Gajdacs M, Urban E. Relevance of anaerobic bacteremia in adult patients: A never-ending story? 2020;10(2):64-75.
9. Czepiel J, Drozd M, Pituch H, Kuijper EJ, Perucki W, Mielimonka A, i sur. Clostridium difficile infection: review. 2019;38(7):1211-1221.
10. Sholeh M, Krutova M, Forouzes M, Mironov S, Sadeghifard N, Molaeipour L, i sur. Antimicrobial resistance in Clostridioides (Clostridium) difficile derived from humans: a systematic review and meta-analysis. 2020;9(1):158.
11. Jasemi S, Emaneini M, Ahmadinejad Z, Fazeli MS, Sechi LA, Sadeghpour Heravi F, i sur. Antibiotic resistance pattern of Bacteroides fragilis isolated from clinical and colorectal specimens. 2021;20(1):27.
12. Cooley L, Teng J. Anaerobic resistance: should we be worried? 2019;32(6):523-530.
13. Brinkac L, Voorhies A, Gomez A, Nelson KE. The Threat of Antimicrobial Resistance on the Human Microbiome. 2017;74(4):1001-1008.
14. Bubonja M, Mesarić M, Miše A, Jakovac M, Abram M. Utjecaj različitih čimbenika na rezultate testiranja osjetljivosti bakterija disk difuzijskom metodom. Medicina 2008;44(3-4):280-284.

15. Schuetz AN. Antimicrobial resistance and susceptibility testing of anaerobic bacteria. 2014;59(5):698-705.
16. Nurhafiza I, Zubaidah AW, Syafinaz AN, Rosni I. Susceptibility patterns of anaerobes isolated from clinical specimens in tertiary Hospital, Malaysia. 2020;42(2):245-252.
17. Forbes JD, Kus JV, Patel SN. Antimicrobial susceptibility profiles of invasive isolates of anaerobic bacteria from a large Canadian reference laboratory: 2012-2019. Elsevier 2021.
18. Novak A, Rubic Z, Dogas V, Goic-Barisic I, Radic M, Tonkic M. Antimicrobial susceptibility of clinically isolated anaerobic bacteria in a University Hospital Centre Split, Croatia in 2013. 2015;31:31-6.
19. Shenoy PA, Vishwanath S, Gawda A, Shetty S, Anegundi R, Varma M, i sur. Anaerobic Bacteria in Clinical Specimens – Frequent, But a Neglected Lot: A Five Year Experience at a Tertiary Care Hospital. 2017;11(7):DC44-DC48.
20. Bogdan M, Perić LJ, Ordog K, Vuković D, Urban E, Soki J. The first characterized carbapenem-resistant *Bacteroides fragilis* strain from Croatia and the case study for it. 2018. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. DOI:10.1556/030.65.2018.024.
21. Hrvatsko društvo za kliničku mikrobiologiju. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2020.g. 2020. Dostupno na adresi:<https://www.hdkm.hr/amr-u-hrvatskoj/> . Datum pristupa: 05.07.2022.

## 10. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODATCI:

Ime i prezime: Nina Dener

Datum rođenja: 29. 11. 2000.

Mjesto rođenja: Osijek, Republika Hrvatska

Adresa: Lađarska 10, Osijek

E-mail: ninadener@gmail.com

Telefon: 095 509 5666

### OBRAZOVANJE:

2019. – 2022. Medicinski fakultet Osijek

Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2015. – 2019. II. gimnazija Osijek

2007. – 2015. Osnovna škola Ljudevita Gaja Osijek