

# Usporedba disk difuzije i metode prijelomne točke u ispitivanju osjetljivosti striktno anaerobnih bakterija

---

Šajkunović, Ines

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:152:206403>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Ines Šajkunović**

**USPOREDBA DISK DIFUZIJE I  
METODE PRIJELOMNE TOČKE U  
ISPITIVANJU OSJETLJIVOSTI  
STRIKTNO ANAEROBNIH  
BAKTERIJA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2023.**

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

**Ines Šajkunović**

**USPOREDBA DISK DIFUZIJE I**  
**METODE PRIJELOMNE TOČKE U**  
**ISPITIVANJU OSJETLJIVOSTI**  
**STRIKTNO ANAEROBNIH**  
**BAKTERIJA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2023**

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

Mentor rada: doc.dr.sc. Maja Bogdan

Rad ima 33 lista, 10 tablica i 9 slika

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Maji Bogdan na inspiraciji, podjeljenom znanju, podršci i smjernicama prilikom pisanja rada.*

*Posebno zahvaljujem obitelji, prijateljima i svim bližnjima koji su mi bili oslonac tijekom školovanja i svakom trenutku života.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. ANAEROBNE BAKTERIJE .....	1
1.2. LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA ANAEROBNIH BAKTERIJA.....	2
1.3. ANAEROBNE BAKTERIJE KAO UZROČNICI INFEKCIJA.....	3
1.4. ISPITIVANJE ANTIMIKROBNE OSJETLJIVOSTI ANAEROBNIH BAKTERIJA...	4
2. CILJ RADA.....	5
3. MATERIJAL I METODE .....	6
3.1. Ustroj studije.....	6
3.2. Materijal.....	6
3.3. Metode .....	6
3.4. Metode obrade uzoraka .....	7
3.5. Metoda disk difuzije .....	8
3.6. Metoda prijelomne točke .....	9
3.7. Statističke metode.....	13
4. REZULTATI.....	14
5. RASPRAVA .....	23
6. ZAKLJUČAK .....	26
7. SAŽETAK.....	27
8. SUMMARY .....	28
9. LITERATURA.....	30
10. ŽIVOTOPIS .....	33

## **POPIS KRATICA:**

ATB ANA - test za ispitivanje osjetljivosti anaerobnih bakterija

ATM – anaerobni transportni medij

CC – klindamicin

EUCAST - Europski odbor za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

FAA – (engl. *Fastidious Anaerobic Agar*)

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

MEM – meropenem

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

MTR – metronidazol

PRAS – prethodno reducirani i anaerobno steriliziran anaerobni medij (engl. *Pre – Reduced, Anaerobically Sterilized Media*)

SNVS – Schedler Neomycin Vancomycin agar

SOD – Superoksid – dismutaza

TZP –piperacilin/tazobaktam

VA – vankomicin

WGS – sekvenciranje cijelog genoma (engl. *Whole Genome Sequencing*)

### 1. UVOD

Primjerena upotreba antibiotika u zdravstvenom sustavu ostaje izazov. Pouzdane i reproducibilne metode ispitivanja antimikrobne osjetljivosti su potrebne zbog davanja vrijednih informacija koje vode do liječenja pacijenta (1). U posljednje vrijeme klinički laboratoriji su suočeni s činjenicom učestale otpornosti bakterija na antibiotike. Osjetljivost na antibiotike kod anaerobnih bakterija više nije predvidljiva jer su počele razvijati rezistenciju na antibiotike koji su se liječnicima prije činili kao sasvim logičan izbor terapije u svrhu liječenja pacijenta. Zbog toga, laboratoriji se ne mogu osloniti samo na jednu metodu testiranja osjetljivosti, nego na sustav metoda koje se provode u tu svrhu. Izrazito je bitno očuvanje svestranosti i različitih pristupa detekciji otpornosti bakterija na antibiotike kod čestih ili manje čestih patogena. Unatoč potrebi za posebnim ili alternativnim metodama ispitivanja osjetljivosti bakterija, uobičajene metode su dostupne za korištenje u većini laboratorija. Jedna od izrazito korisnih metoda ispitivanja osjetljivosti je molekularno detektiranje gena povezanih sa rezistencijom (2).

#### 1.1. ANAEROBNE BAKTERIJE

Anaerobne bakterije čine fiziološku floru kože i sluznica čovjeka, te svojom kolonizacijom štite određena područja od adherencije drugih bakterija i onemogućuju patološko djelovanje. Posebna karakteristika anaeroba je njihov rast na krutim podlogama bez prisutnosti kisik. Za pojedine anaerobne bakterije izlaganje kisiku može biti pogubno, odnosno one kao takve ne posjeduju enzime katalazu i superoksid-dismutazu (SOD) i nazivaju se striktnim anaerobima. Mogu uzrokovati egzogene i endogene infekcije, te su često polimikrobne. Osim anaerobnih bakterija bolest uzrokuju fakultativno anaerobne i aerobne bakterije. Mehanizam nastanka bolesti koje uzrokuju egzogeni anaerobi je dobro poznat, dok mehanizam nastanka bolesti uzrokovane endogenim anaerobima nije potpuno otkriven. Poznato je da endogeni anaerobi kao oportunisti uzrokuju infekcije ukoliko se nađu u unutrašnjosti organizma (operacije, traume) (3). Infekcije uzrokovane anaerobima potiču od mjesta gdje oni čine normalnu floru i mogu ozbiljno ugroziti život čovjeka. Često uzrokuju infekcije u usnoj, abdominalnoj i intrapelvičnoj šupljini, također mogu uzrokovati bolesti u području glave i vrata (4). Klinički važne anaerobe možemo podjeliti na anaerobne gram-pozitivne sporogene štapiće (*C. tetani*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. difficile*), gram-pozitivne anaerobne koke i nesporogene štapiće (*Actinomyces*,



*Propionibacterium* i *Cutibacterium*, *Lactobacillus*, *Peptococcus*), te gram-negativne anaerobne bakterije (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*) (5).

### 1.2. LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA ANAEROBNIH BAKTERIJA

Laboratorijska dijagnostika anaerobnih patogena je izrazito zahtjevna. Kako bi anaerobi preživjeli transport preporuča se uzeti uzorak u većoj količini ukoliko je moguće ili transportirati na posebnoj podlozi. Budući da su anaerobne infekcije često polimikrobne može se dogoditi da na hranjivim podlogama u anaerobnoj atmosferi brže porastu fakultativne bakterije i dolazi do nemogućnosti izolacije anaeroba. Prilikom uzorkovanja bitno je da se uzorak ne kontaminira fiziološkom florom. Uzorak se odmah transportira u laboratorij uz naznaku da je potrebna anaerobna analiza (3). Prema preporukama za prikupljanje i transport anaeroba:

1. Uzorak se preporuča uzeti prije primjene terapije antibiotikom.
2. Uzorak treba biti uzet s pravog mjesta, odnosno kod infekcije rane ili apscesa je bolje uzeti aspirat ili uzorak tkiva nego uzorak s površine. Kod zatvorenih apscesa najbolje je uzeti aspirat punkcijom.
3. Aspirati i uzorci tkiva su bolji od briseva jer su brisevi porozni i skloni isušivanju.
4. Volumen uzorka koji se preporučuje uzeti je 8-10 ml za uzorak krvi, 1-2 ml aspirata,  $\geq 1$  g tkiva i  $\geq 5$  ml vodenaste ili poluformirane stolice.
5. Umjesto anaerobnog transportnog medija (ATM) preporučljivo je koristiti komercijalno dostupne spremnike bez kisika s prethodno reduciranim i anaerobno steriliziranim anaerobnim medijem (PRAS). Ukoliko ovaj način transporta nije dostupan mogu se koristiti Stuart, Cary-Blair ili Aimes transportni medij.
6. Uzorak treba transportirati na sobnoj temperaturi, nikako u hladnjaku jer pri niskim temperaturama dolazi do povećane difuzije kisika.
7. Uzorak treba transportirati u laboratorij unutar 2 sata (6).

Anaerobne bakterije su izbirljivi mikroorganizmi čija se kultivacija mora odvijati na nutritivno bogatim medijima. Hranilišta koja se koriste za uzgoj anaeroba su Columbia agar, tioglikolatni bujon i Schedler Neomycin Vancomycin (SNVS). Metode koje se koriste za identifikaciju pojedinih anaeroba su raznovrsne i baziraju se na karakteristikama rasta bakterija, morfologiji, osjetljivosti na antibiotike, te biokemijskim i brzim testovima. Početak korištenja molekularnih

metoda poput WGS (sekvenciranje cijelog genoma) i MALDI-TOF MS donio je revolucionarne rezultate u detekciji i identifikaciji anaerobnih bakterija (7).

### 1.3. ANAEROBNE BAKTERIJE KAO UZROČNICI INFEKCIJA

Anaerobi čine normalnu floru ljudskog organizma, ali kada se nađu udaljeni sa mjesta gdje se smatraju fiziološkom florom uzrokuju infekcije. Infekcije koje su uzrokovane anaerobnim bakterijama su često rezultat djelovanja više vrsta patogena, ne samo jednog. Imaju tendenciju stvaranja infekcija u šupljinama organizma ili prodiru kroz slojeve tkiva (8). Gnoj koji stvaraju anaerobi ima izrazito neugodan miris. Većina klinički važnih uzročnika anaerobnih infekcija je osjetljivo na penicilin, osim roda *Bacteroides spp.* i nekih vrsta koji pripadaju rodu *Prevotella*. Anaerobne infekcije favoriziraju redukciju opskrbe organizma kisikom, nekrotično tkivo i nizak oksidacijsko – redukcijski potencijal što interferira sa opskrbom tijela sa antibioticima. Najčešći uzročnici respiratornih infekcija su *Prevotella melaninogenica* i *Fusobacterium spp.* Infekcije koje uzrokuju su peroralni apscesi, sinusitis i mastoiditis. Aspiracijom sadržaja oralne šupljine u pluća može nastati nekrotizirajuća upala pluća, apsces pluća ili emfizem. Anaerobi rijetko uzrokuju apsces mozga ili subduralni empijem, ali ukoliko dođe do navedenih infekcija vjerojatnije je da se primarna infekcija iz pluća krvlju proširila na živčani sustav. Anaerobne bakterije su normalna flora gastrointestinalnog trakta, ali ipak ondje mogu uzrokovati infekcije. Najčešći uzročnici intraabdominalnih i zdjeličnih infekcija su *Bacteroides fragilis* i *Clostridium spp.* koji sudjeluju u tvorbi apscesa, te *Prevotella bivia* i *Prevotella disiens* koje često tvore apscese ženskih spolnih organa. Kod infekcija kože i mekog tkiva, anaerobi se često ubrajaju pod sinergijski oblik infekcija (gangrena, celulitis) zbog toga je često teško istaknuti samo jednog uzročnika nastale bolesti (9).

#### **1.4. ISPITIVANJE ANTIMIKROBNE OSJETLJIVOSTI ANAEROBNIH BAKTERIJA**

Primjena laboratorijskih metoda kojima se može odrediti osjetljivost i rezistencija mikroorganizama na određene antibiotike je postala neizbježna zbog davanja odgovarajuće terapije pacijentima. Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti je laboratorijski postupak za identifikaciju specifičnog antibiotskog tretmana koji će djelovati individualno na izlječenje osobe oboljele od određene bakterijske infekcije. Ovaj postupak pomaže u evaluaciji usluga liječenja koje pružaju bolnice, klinike i nacionalni programi za kontrolu i kvalitetu zaraznih bolesti (10). Rezultati ispitivanja antimikrobne osjetljivosti bazirani su najčešće na minimalnoj inhibitornoj koncentraciji (MIK) koja predstavlja najmanju koncentraciju antibiotika koja će zaustaviti rast bakterije. Kvantitativni rezultati mogu se izraziti u mg/L ili kvalitativno (S-osjetljiv, I-intermedijarno osjetljiv i R-rezistentan) (11). Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti anaerobnih bakterija nije česta praksa u mnogim laboratorijima, stoga terapija za infekcije uzrokovane anaerobima ostaje empirijska (12). Najčešće metode koje se koriste u ispitivanju antimikrobne osjetljivosti anaeroba su:

1. **MIKRODILUCIJSKA METODA** - metoda se izvodi u tekućoj podlozi tako da se antibiotik većinom nalazi u nizu dvostrukog razrijeđenja i na podlogu se inokulira ispitivani soj bakterije. Cilj je odrediti minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIK) pojedinih antibiotika.
2. **SEMIKVANTITATIVNA DILUCIJSKA METODA ILI METODA PRIJELOMNE TOČKE** - metodom se ispituju jedna ili dvije koncentracije istog antibiotika ovisno o kriterijima za interpretaciju osjetljivosti
3. **AGAR - DILUCIJSKA METODA** - u ovoj metodi se pripremaju dvostruka razrijeđenja antibiotika, pripremljena razrijeđenja miješaju se sa agarom i stavljaju u Petrijevu zdjelicu, potom slijedi inokulacija ispitivanog mikroorganizma. Anaerobne bakterije se nasaduju na agar u obliku mrlje («spot» tehnika).
4. **E - TEST** - metoda kojom se testira osjetljivost bakterije na jedan antibiotik. Test traka je impregnirana određenom vrstom antibiotika i stavlja se na agar na koji je prethodno inokuliran uzorak. Ukoliko je soj bakterije osjetljiv na antibiotik neće doći do porasta u zoni oko test trake. Ova metoda je verzija difuzijske metode (13).

## 2. CILJ RADA

U periodu (01. 06. 2022. - 31. 05. 2023.) prikupiti podatke o anaerobnim izolatima (sukcesivni izolati u rutinskom laboratorijskom radu) i njihovoj osjetljivosti (istovremeno ispitati osjetljivost izolata metodom disk difuzije i metodom prijelomne točke), te statistički obraditi dobivene podatke.

Cilj je:

1. Ispitati učestalost pojedinih anaerobnih izolata u navedenom periodu
2. Ispitati antimikrobnu osjetljivost izolata metodom disk difuzije
3. Ispitati osjetljivost izolata metodom prijelomne točke
4. Usporediti rezultate osjetljivosti ispitivanja dvijema metodama

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao presječna studija.

#### 3.2. Materijal

U ispitivanje će se uključiti rezultati dobiveni usporednim ispitivanjem antimikrobne osjetljivosti metodom prijelomne točke i disk difuzijskom metodom, striktno anaerobnih izolata izoliranih iz uzoraka u rutinskom radu u Zavodu za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije u periodu 01. 06. 2022. - 31. 05. 2023.

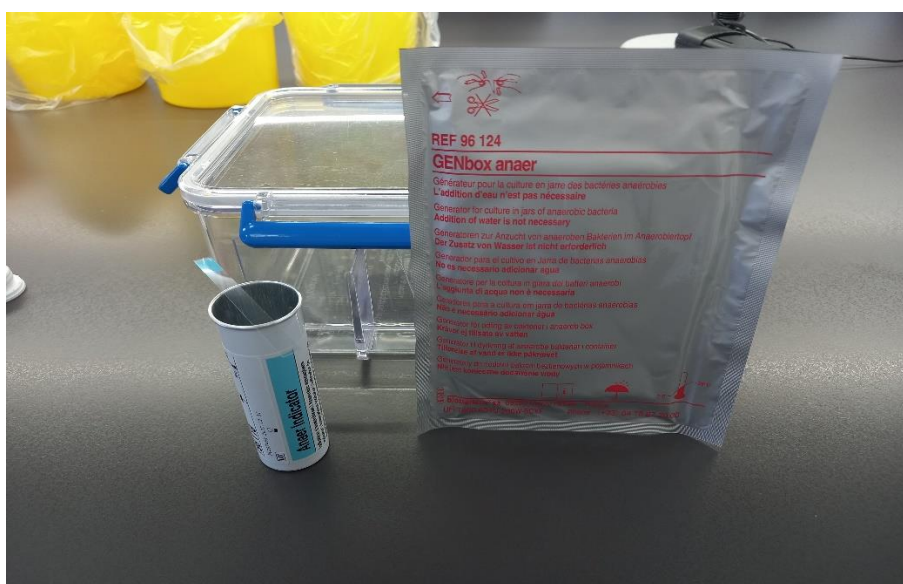
#### 3.3. Metode

Za potrebe ovog presječnog istraživanja biti korišteni podatci o izoliranim bakterijama i usporednim rezultatima ispitivanja antimikrobne osjetljivosti dobiveni iz arhivske i elektronske baze podataka Zavoda za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Klinike za infektologiju KBC-a Osijek.

Za uzgoj anaerobnih bakterija koriste se konvencionalne krute i tekuće podloge u atmosferi sa smanjenim udjelom kisika kao što je Columbia agar i Schedler Neomycin Vancomycin agar (SNVS) agar i prema potrebi tioglikolatni bujon. Identifikacija izolata se provodi pomoću MALDI TOF MS (Bruker, Ultraflex) uređaja. Ispitivanje osjetljivosti izolata za potrebe ovog istraživanja se provodi usporednim ispitivanjem osjetljivosti metodom prijelomne točke (*engl. break point*) pomoću komercijalno dostupnog sustava (ATB ANA, Biomerieux, France) te disk difuzijskom metodom na FAA (*engl. fastidious anaerobic agar*) . Dobiveni rezultati su interpretirani prema EUCAST smjernicama.

### 3.4. Metode obrade uzoraka

Uzorci kod kojih postoji sumnja na anaerobnu infekciju dostavljaju se u laboratorij u transportnom brisu. Nakon prijema u laboratorij uzorak se inokulira na SNVS agar, Columbia agar i tioglikoladni bujon. Kada je uzorak inokuliran na hranjive podloge stavlja se u kutiju za anaerobe, osim uzorka stavlja se indikator anaerobne atmosfere koji je plave boje, potrebno ga je uroniti u vodu i staviti u kutiju. Ukoliko su postignuti anaerobni uvjeti indikator poprima bijelu boju. Uz indikator se stavlja generator atmosfere koji će ukloniti kisik. Kutija se zatvara, stavlja u termostat na 37 °C i nakon 48 sati se otvara kako bi se provjerio porast bakterija. Ukoliko se uoči porast radi se test aerotolerancije tako da se od svih kolonija s obje ploče inokulira na krvni agar, uriselect i Columbia agar. Nakon 24 sata se gleda ponovni porast. Ukoliko je došlo do porasta na zraku bez anaerobnih uvjeta, znači da bakterija nije striktni anaerob kojeg želimo detektirati. Ako bakterija ne raste na zraku radi se identifikacija MALDI-TOF MS. Kada se identificira vrsta bakterije radi se antibiogram metodom disk difuzije i metodom prijelomne točke.



**Slika 1. Dio opreme za uzgoj anaerobnih bakterija: lonac za postizanje anaerobnih uvjeta, indikator i generator anaerobne atmosfere ( izvor: fotografirala Ines Šajkunović)**

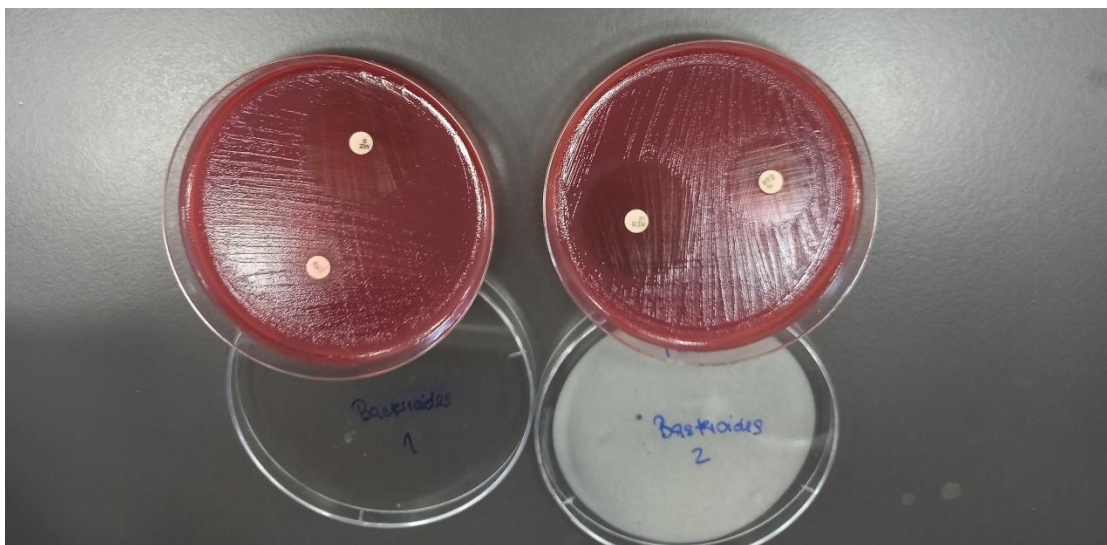
### 3.5. Metoda disk difuzije

Metoda disk difuzije je jedna od najstarijih metoda ispitivanja osjetljivosti bakterija na antibiotike u kliničkim laboratorijima. Prikladna je za testiranje velikog broja patogena, čak onih koji zahtjevaju posebne uvjete rasta. Može se nazvati svestranom metodom zbog širokog raspona testiranja različitih mikroorganizama i zahtjeva korištenje malog broja opreme (14). Osim što se odlikuje jednostavnošću, ovom metodom se može ispitati veći broj antibiotika u isto vrijeme (15). Metoda se izvodi na FAA agaru na koji se nanosi bakterijska kultura, a potom na nasadenu kulturu se stavljaju diskovi različitih antibiotika (14). Nakon inkubacije koja se odvija preko noći nastaju zone inhibicije oko diskova antibiotika čija je doza dovoljno visoka da zaustavi rast bakterije. Mjerenjem zone inhibicije dobivaju se kvantitativni rezultati pomoću kojih bakterijski izolat ubrajamo u skupinu osjetljivog, umjereno osjetljivog ili rezistentnog (16). Testiranje osjetljivosti bakterija na antibiotike ovom metodom ovisi o mnogim faktorima poput vremena inkubacije, temperature, vrsti i pH vrijednosti hranilišta, načinu pohrane i starosti antibiotika (15).

#### POSTUPAK:

1. FAA agar ( s dodatkom 5 % mehanički defibrinirane krvi konja ) potrebno je osušiti na 20 – 25 °C preko noći ili na 35 °C u termostatu otklopljene 15 minuta.
2. Izvaditi diskove penicilina (P-1U), piperacilin – tazobaktama (TZP 30-6 µg) , klindamicina (CC 2 µg), metronidazola (MTR 5 µg), meropenema ( MEM 10 µg) i vankomicina (VA 5 µg) da postignu sobnu temperaturu.
3. U sterilnoj fiziološkoj otopini koncentracije 0,85 % napraviti suspenziju bakterija gustoće 1 McFarlanda (prihvatljive su koncentracije u rasponu 0,9-1,1 McFarlanda)
4. Unutar 15 minuta od pripreme suspenzije inokulirati površinu FAA agara.
5. Unutar 15 minuta od inokulacije hranilišta na površinu agara je potrebno nanijeti diskove antibiotika, ali najviše 3 diska po ploči promjera 90 mm.
6. Unutar 15 minuta od aplikacije diskova na površinu agara, hranjive ploče staviti u posudu ili lonac u kojima će se odvijati inkubacija u anaerobnim uvjetima. U posudu ili lonac je potrebno umetnuti indikator i generator anaerobne atmosfere. Hranjive ploče sa uzorcima se inkubiraju na 35 – 37 °C stupnjeva 16 – 20 sati.
7. Nakon inkubacije očitavaju se zone inhibicije tako da se poklopac ploče otkloni i ploča se okrene prema svjetlu. Zone se očitavaju golim okom pomoću kalipera ili ravnala.

Rezultati se mogu interpretirati prema tri kategorije: S (osjetljiv), I (umjereno osjetljiv) i R (rezistentan) ovisno o vrsti bakterije i antibiotika na koji testiramo bakteriju.



**Slika 2. Porast roda *Bacteroides spp.* na FAA (engl. *fastidious anaerobic agar*) sa zonama inhibicije ( izvor: fotografirala Ines Šajkunović)**

Definirane zone inhibicije po antibioticima za *Bacteroides spp.* su:

piperacilin/ tazobaktam  $S \geq 24$  i  $R < 24$ , imipenem  $S \geq 29$  i  $R < 29$ , meropenem  $S \geq 28$  i  $R < 28$ , klindamicin  $S \geq 10$  i  $R < 10$ , metronidazol  $S \geq 25$  i  $R < 25$

#### **3.6. Metoda prijelomne točke**

Metoda prijelomne točke je sastavni dio moderne laboratorijske prakse kojom se određuje osjetljivost bakterija na antibiotike (17). Pojam „prijelomna točka“ može biti zbunjujuć jer se može odnositi na mikrobiološke, kliničke ili farmakokinetičke podatke. U mikrobiologiji „prijelomna točka“ se odnosi na MIK (minimalna inhibitorna koncentracija), odnosno koncentraciju antibiotika koja zaustavlja rast bakterije (3). Ova metoda je modificirana dilucijska metoda gdje se u jažicama nalaze razrijeđenja antibiotika u veoma uskom rasponu oko MIK-a (1). Ako je određena bakterija osjetljiva na antibiotik neće doći do zamućenja u jažici, odnosno tekućina će ostati bistra. Međutim, ukoliko je bakterija rezistentna na ispitivani antibiotik u jažici će nastati zamućenje.



## POSTUPAK:

1. Staviti test traku u inkubacijsku posudicu označenu brojem uzorka.
2. Otvoriti ampulu API® 20A ili API® NaCl 0,85 % i napraviti suspenziju bakterija gustoće 3 McFarlanda.
3. Premjestiti 200 µL suspenzije u novootvorenu ampulu ATB S Medium i homogenizirati pomoću pipete bez stvaranja mjehurića u mediju.
4. Pipetom staviti 135 µL ATB S Medium u svaku tubicu.
5. Inkubirati anaerobno 24-48 sati na  $36 \pm 2$  °C

## INTERPRETACIJA REZULTATA

**Tablica 1. Interpretacija rezultata za antibiotike ispitivane u 2 koncentracije**

IZGLED JAŽICA		REZULTATI		INTERPRETACIJA	
c*	C†	c*	C†	Soj je:	
Prozirno	Prozirno	-‡	-	S	OSJETLJIV
Zamućen	Prozirno	+§	-	I	INTERMEDIJARNO OSJETLJIV
Zamućen	Zamućen	+	+	R	REZISTENTAN

\* manja koncentracija antibiotika, † veća koncentracija antibiotika, ‡ prozirno, § zamućeno

**Tablica 2. Interpretacija rezultata za antibiotike ispitivane u 1 koncentraciji**

IZGLED JAŽICA	REZULTATI	Soj je:	
Prozirno	-*	S	OSJETLJIV
Zamućeno	+†	R	REZISTENTAN

\*prozirno, † zamućeno




**Slika 3. ATB ANA, Biomerieux, France za ispitivanje osjetljivosti anaerobnih bakterija metodom prijelomne točke (izvor: fotografirala Ines Šajkunović)**

**ATB™ ANA EU (08)**      **REF 14 268**

Origine / Source / Herkunft / Origen / Origem / Προέλευση /  
Pochodzenie / Eredet / Zdroj / Allikas / Saltinis / Avots / Kaynak :

	c	C	R / I / S	c C mg / l
0	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		
PEN	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		0.25 - 0.5
AMOGN	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		0.5 - 2
AMOGP	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		4 - 8
AMC	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		4/2 - 8/2
TICGN	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		16
PICGN	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		16
TICGP	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		8 - 16
TCC	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		8/2 - 16/2
PICGP	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		8 - 16
TZP	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		8/4 - 16/4
IMI	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		2 - 8
CXT	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		32
CLI	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		4
MXF	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		1 - 2
VAN	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		4 - 8
RFA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		4 - 16
CMP	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		8
MTR	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		4

Note / Anmerkung / Nota / Σημείωση / Uwagi / Megjegyzés /  
Poznámka / Märkused / Pastaba / Piezīme / Not :

**BIOMÉRIEUX** 

15329 A Brand, 20JUN2018  
Imprimé en France /  
Printed in France

**Slika 4. Prikaz radnog listića (ATB ANA, Biomerieux, France) na kojem su navedene manje i veće koncentracije antibiotika koji se testiraju ovom metodom (izvor: fotografirala Ines Šajkunović)**

#### 3.7. Statističke metode

Podatci definirani ciljevima istraživanja kao i rezultati provedenog ispitivanja prikazani su grafički i tabelarno, te obrađeni deskriptivnom statistikom. Kategorijski podatci su predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama, a numerički podatci su opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju normalne raspodjele. Ostali numerički podatci koji nemaju normalnu raspodjelu, su opisani medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Pri usporedbi dviju metoda razlike raspodjele kategorijskih varijabli su testirane Hi-kvadrat testom ili Fischerovim egzaktnim testom. Razlike raspodjela numeričkih varijabli između dvije nezavisne skupine su testirane Studentovim - t testom ili Mann Whitneyevim U testom. Sve  $p$  vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti je podešena na  $\alpha=0,05$ . Podatci će biti statistički analizirani upotrebom informatičkog programa RStudio i Microsoft Office Excel tabličnog kalkulator.

#### 4. REZULTATI

U periodu od 01. lipnja 2022. do 31. svibnja 2023. godine u Zavodu za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Klinike za infektologiju KBC Osijek obrađeno je 7252 izolata aerobnom i anaerobnom analizom. U anaerobnoj kultivaciji ukupno je detektirano 511 (7,05 %) izolata od kojih je 150 (29,35 %) striktno anaerobnih bakterija što čini ukupnu učestalost od 2,07 %.

Disitribucija detektiranih anaerobnih izolata po rodovima i vrstama prikazana je u Tablici 3.

Tablica 3. Prikaz izoliranih striktno anaerobnih bakterija po rodovima i vrstama

IZOLAT	Broj (n)	Udio (%)
<b>BACTEROIDES</b>	73	48,67 %
<i>B. fragilis</i>	39	
<i>B. ovatus</i>	14	
<i>B. species</i>	1	
<i>B. vulgatus</i>	3	
<i>B. thetaiotaomicron</i>	11	
<i>B. stercoris</i>	2	
<i>B. distasonis</i>	1	
<i>P. distasonis</i>	2	
<b>PREVOTELLA</b>	44	29,33 %
<i>P. bivia</i>	8	
<i>P. melaninogenica</i>	2	
<i>P. oris</i>	3	
<i>P. species</i>	8	
<i>P. denticola</i>	10	
<i>P. intermedia</i>	2	
<i>P. buccae</i>	5	
<i>P. disiens</i>	4	
<i>P. baroniae</i>	1	
<i>P. timonensis</i>	1	
<b>FUSOBACTERIUM</b>	10	6,68 %
<i>F. nucleatum</i>	9	
<i>F. periodonticum</i>	1	
<b>CUTIBACTERIUM</b>	8	5,33 %
<i>C. acnes</i>	7	
<i>C. granulosum</i>	1	
<b>CLOSTRIDIUM</b>	3	2%
<i>C. perfringens</i>	3	
<b>CLOSTRIDIODES</b>	1	0,67 %
<i>C. difficile</i>	1	
<b>DIALISTER</b>	1	0,67 %
<i>D. pneumosintes</i>	1	
<b>FINEGOLDIA</b>	5	3,33 %
<i>F. magna</i>	5	
<b>PEPTINOPHILUS</b>	2	1,33 %
<i>Peptoniphilus spp.</i>	2	
<b>PORPHYROMONAS</b>	1	0,67 %
<i>P. asaccharolytica</i>	1	
<b>VEILLONELLA</b>	2	1,33 %
<i>V. atipica</i>	1	
<i>V. dispar</i>	1	
<b>UKUPNO</b>	<b>150</b>	<b>100%</b>

Antimikrobna osjetljivost semikvantitativnom metodom prijelomne točke i metodom disk difuzije ispitana je na ukupno 114 izolata. Njihova distribucija je prikazana u Tablici 4.

**Tablica 4. Pregled anaerobnih izolata testiranih metodom prijelomne točke i metodom disk difuzije**

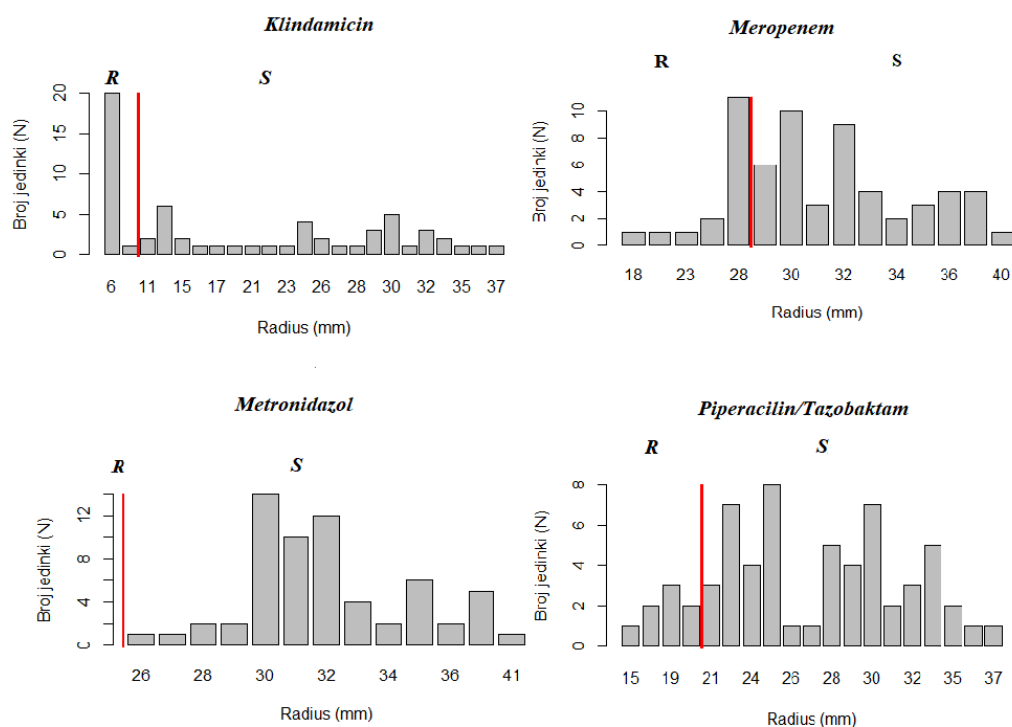
<b>IZOLAT</b>	<b>Broj (n)</b>	<b>Udio (%)</b>
<i>Bacteroides</i> spp.	61	53,51%
<i>Prevotella</i> spp.	37	32,46%
<i>Fusobacterium</i> spp.	6	5,26 %
<i>Cutibacterium</i> spp.	6	5,26 %
<i>Clostridium</i> spp.	4	3,51 %
<b>UKUPNO</b>	<b>114</b>	<b>100%</b>

Rezultati dobiveni usporednim ispitivanjem osjetljivosti metodom disk difuzije i metodom prijelomne točke za rod *Bacteroides*, *Parabacteroides* i *Phocaeicola* prikazani su u Tablici 5.

**Tablica 5. Prikaz rezultata usporednog ispitivanja osjetljivosti na antibiotike**

BACTEROIDES	Metoda disk difuzije		Metoda prijelomne točke		p-vrijednost
	Osjetljivi	Rezistentni	Osjetljivi	Rezistentni	
<b>Piperacilin/tazobaktam</b>	55 (90%)	6 (10%)	55 (90%)	6 (10%)	> 0.05
<b>Klindamicin</b>	42 (69%)	19 (31%)	43 (70%)	18 (30%)	< 0.05
<b>Karbapenemi</b>	57 (93%)	4 (7%)	58 (95%)	3 (5%)	> 0.05
<b>Metronidazol</b>	61 (100%)	0 (0%)	61(100%)	0 (0%)	> 0.05

Distribucija izmjerenih zona inhibicije pripadnika roda *Bacteroides* spp. i pripadajuća interpretacija osjetljivosti metodom disk difuzije prikazana je na Slici 5.



**Slika 5. Zone inhibicije i osjetljivost *Bacteroides* spp. na antibiotike (izvor: izradila Ines Šajkunović)**

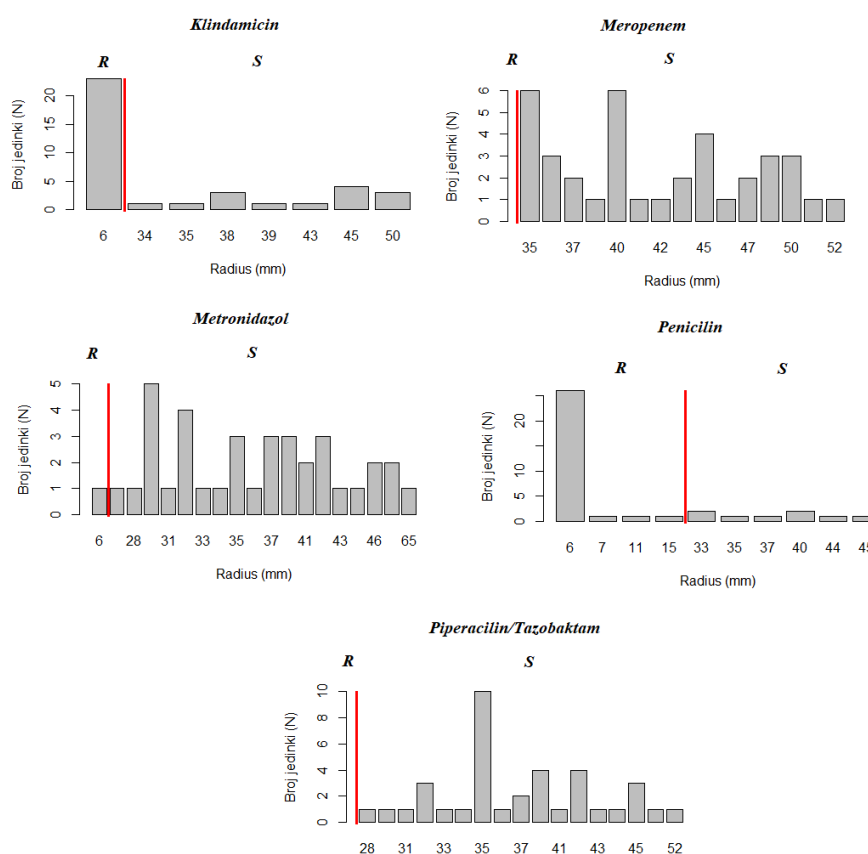


Rezultati usporednog ispitivanja antimikrobne osjetljivosti izolata iz roda *Prevotella* prikazani su u Tablici 6.

**Tablica 6. Rezultati usporednog ispitivanja osjetljivosti rod *Prevotella* spp.**

PREVOTELLA	<i>Metoda disk difuzije</i>		<i>Metoda prijelomne točke</i>		<i>p-vrijednost</i>
	Osjetljivi	Rezistentni	Osjetljivi	Rezistentni	
<b>Penicilin</b>	8 (22%)	29 (78%)	8 (22%)	29 (78%)	> 0.05
<b>Piperacilin/Tazobaktam</b>	37 (100%)	0 (0%)	37(100%)	0 (0%)	> 0.05
<b>Klindamicin</b>	14 (38%)	23 (62%)	15 (41%)	22 (59%)	> 0.05
<b>Karbapenemi</b>	37 (100%)	0 (0%)	37(100%)	0 (0%)	> 0.05
<b>Metronidazol</b>	36 (97%)	1 (3%)	36 (97%)	1 (3%)	> 0.05

Distribucija izmjerenih zona inhibicije pripadnika roda *Prevotella* i pripadajuća interpretacija osjetljivosti metodom disk difuzije prikazana je na Slici 6.



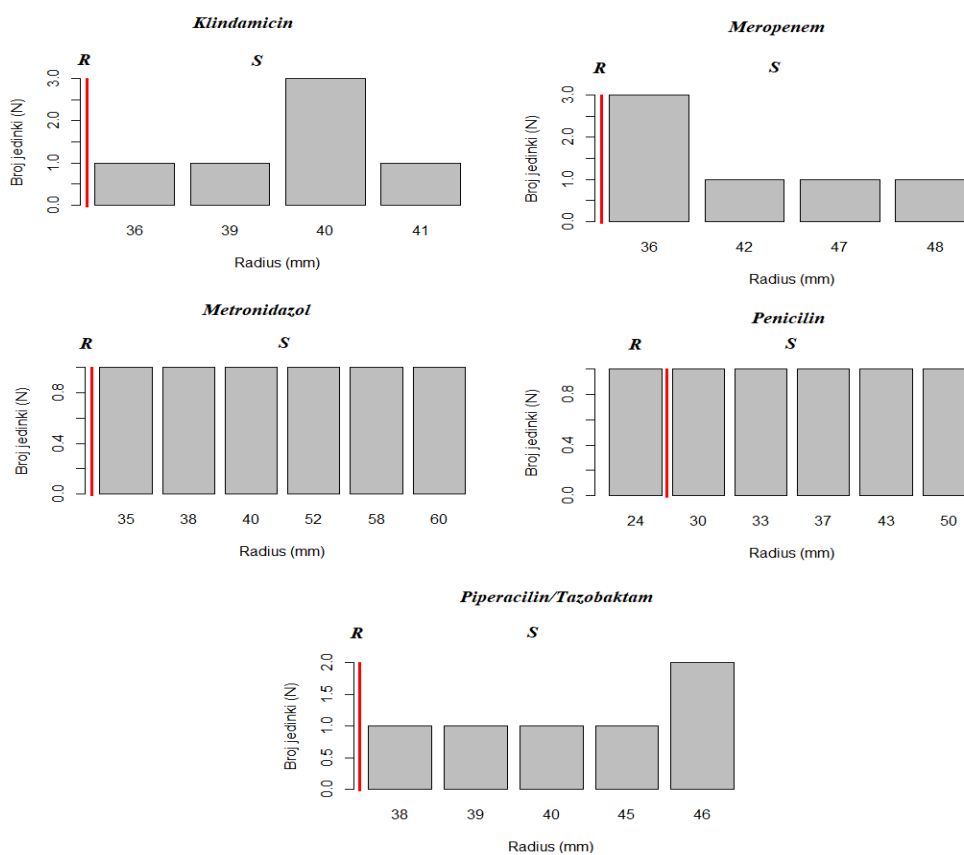
**Slika 6. Prikaz osjetljivosti roda *Prevotella* na antibiotike (izvor: izradila Ines Šajkunović)**

Rezultati usporednog ispitivanja antimikrobne osjetljivosti *Fusobacterium spp.* prikazani su u Tablici 7.

**Tablica 7. Prikaz rezultata usporednim ispitivanjem osjetljivosti na antibiotike za rod *Fusobacterium spp.***

FUSOBACTERIUM	Metoda disk difuzije		Metoda prijelomne točke		p-vrijednost
	Osjetljivi	Rezistentni	Osjetljivi	Rezistentni	
<b>Penicilin</b>	4 (67%)	2 (33%)	5 (83%)	1 (17%)	<b>&lt; 0.05</b>
<b>Piperacilin/Tazobaktam</b>	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	> 0.05
<b>Klindamicin</b>	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	> 0.05
<b>Karbapenemi</b>	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	> 0.05
<b>Metronidazol</b>	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	> 0.05

Distribucija izmjerenih zona inhibicije pripadnika roda *Fusobacterium spp.* i pripadajuća interpretacija osjetljivosti metodom disk difuzije prikazana je na Slici 7.



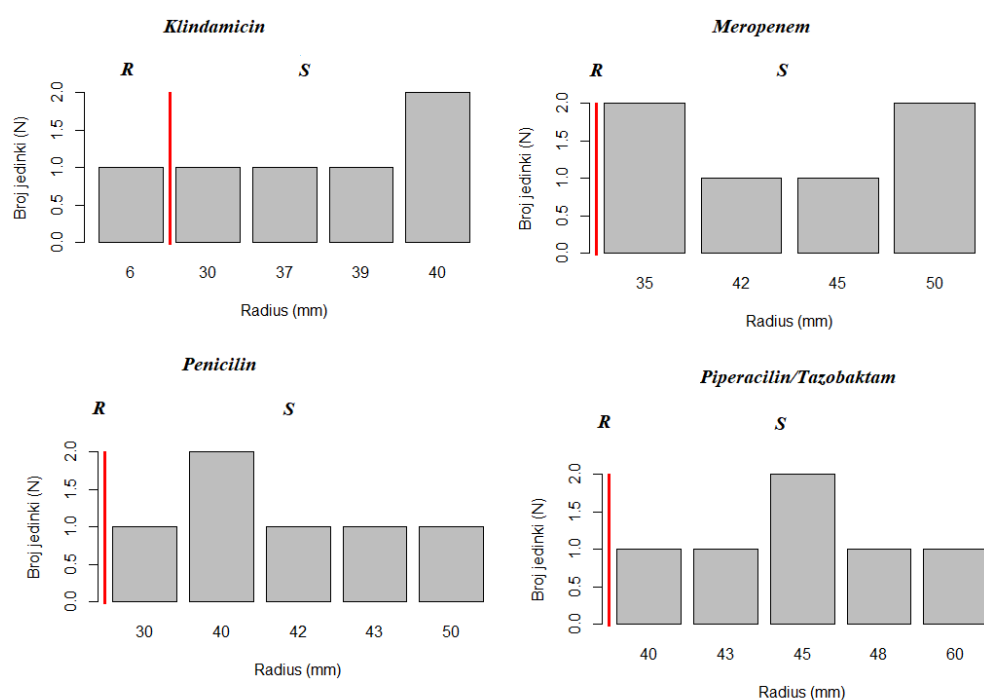
**Slika 7. Prikaz osjetljivosti roda *Fusobacterium spp.* na antibiotike (izvor: izradila Ines Šajkunović)**

Rezultati usporednog ispitivanja antimikrobne osjetljivosti *Cutibacterium* spp. prikazani su u Tablici 8.

**Tablica 8. Prikaz rezultata usporednim ispitivanjem osjetljivosti na antibiotike za rod *Cutibacterium* spp.**

CUTIBACTERIUM	Metoda disk difuzije		Metoda prijelomne točke		p-vrijednost
	Osjetljivi	Rezistentni	Osjetljivi	Rezistentni	
<b>Penicilin</b>	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	> 0.05
<b>Piperacilin/Tazobaktam</b>	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	> 0.05
<b>Klindamicin</b>	5 (83%)	1 (17%)	5 (83%)	1 (17%)	> 0.05
<b>Karbapenemi</b>	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	> 0.05
<b>Metronidazol</b>	6 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	> 0.05

Distribucija izmjerenih zona inhibicije *Cutibacterium* spp. i pripadajuća interpretacija osjetljivosti metodom disk difuzije prikazana je na Slici 8.



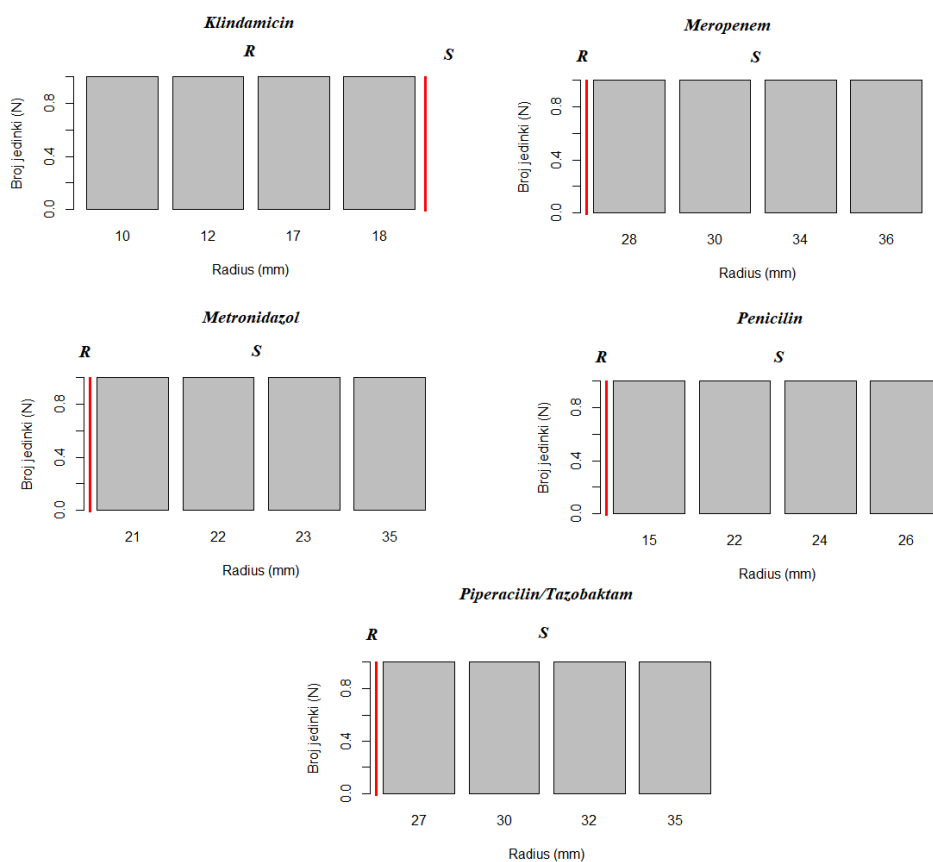
**Slika 8. Prikaz osjetljivosti roda *Cutibacterium* spp. na antibiotike (izvor: izradila Ines Šajkunović)**

Rezultati usporednog ispitivanja antimikrobne osjetljivosti klostridija prikazani su u Tablici 9.

**Tablica 9. Prikaz rezultata usporednog ispitivanja osjetljivosti *Clostridium spp.* na antibiotike**

CLOSTRIDIUM	Metoda disk difuzije		Metoda prijelomne točke		p-vrijednost
	Osjetljivi	Rezistentni	Osjetljivi	Rezistentni	
<b>Penicilin</b>	3 (75%)	1 (25%)	3 (75%)	1 (25%)	> 0.05
<b>Piperacilin/Tazobaktam</b>	4 (100%)	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	> 0.05
<b>Klindamicin</b>	0 (0%)	4 (100%)	2 (50%)	2 (50%)	< 0.05
<b>Karbapenemi</b>	4 (100%)	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	> 0.05
<b>Metronidazol</b>	4 (100%)	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	> 0.05

Distribucija izmjerenih zona inhibicije *Clostridium spp.* i pripadajuća interpretacija osjetljivosti metodom disk difuzije prikazana je na Slici 9.



**Slika 9. Prikaz osjetljivosti roda *Clostridium spp.* na antibiotike (izvor: izradila Ines Šajkunović)**

Zbirni rezultati ispitivanja osjetljivosti izoliranih anaeroba metodom prijelomne točke i metodom disk difuzije na klindamicin, metronidazol, piperacilin-tazobaktam i karbapeneme (imipenem metodom prijelomne točke, odnosno meropenem metodom disk difuzije) prikazani su u Tablici 10.

**Tablica 10. Prikaz rezultata usporednim ispitivanjem striktno anaerobnih izolata na antibiotike**

ANTIBIOTIK	METODA DISK DIFUZIJE		METODA PRIJELOMNE TOČKE		<i>p-vrijednost</i>
	<i>Osjetljivi</i>	<i>Rezistentni</i>	<i>Osjetljivi</i>	<i>Rezistentni</i>	
<b>PENICILIN</b>	21 (39,62 %)	32 (60,38 %)	22 (41,51 %)	31 (58,49 %)	> 0,05
<b>PIPERACILIN/TAZO-BAKTAM</b>	108 (94,74 %)	6 (5,26%)	108 (94,74 %)	6 (5,26 %)	> 0,05
<b>KLINDAMICIN</b>	67 (58,77 %)	47 (41,23 %)	71 (62,28 %)	43 (37,72 %)	> 0,05
<b>KARBAPENEMI</b>	110 (96,49 %)	4 (3,51 %)	111 (97,37 %)	3 (2,63 %)	> 0,05
<b>METRONIDAZOL</b>	107 (93,86 %)	7 (6,14 %)	107 (93,86 %)	7 (6,14 %)	> 0,05

## 5. RASPRAVA

Anaerobne bakterije povezane su s bolničkim okruženjem kao važan uzrok morbiditeta, zbog čega je bitno znati epidemiologiju i prevalenciju uključenih vrsta. Analizom podataka prikupljenih tijekom zadanog perioda može se primjetiti sličnost sa rezultatima dobivenim već prije provedenim istraživanjima u Hrvatskoj i šire (19). Detektiranih 150 striktno anaerobnih izolata pokazuje incidenciju od 2,07 %.

Prema rezultatima dvanaestogodišnjeg istraživanja provedenog u Red Army i Naval medicinskim centrima najčešći izolati kod djece i odraslih ubrajaju se u anaerobne gram negativne bacile *Bacteroides*, *Prevotella* i *Porphyromonas* koji čine 43 %, anaerobne gram pozitivne koke koji čine 26 %, *Clostridium spp.* 7 % i *Fusobacterium spp.* 5 %. Osim toga, Vrste anaeroba koje su najčešće izolirane u prije navedenom istraživanju kod kliničkih infekcija su: gram - negativni štapići (*Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Bilophila* i *Sutterella*), gram - pozitivni koki (najčešće *Peptostreptococcus*), gram – pozitivni sporogeni štapići (*Clostridium*) i nesporogeni anaerobi (*Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*), te gram – negativni koki (najčešće *Veillonella*). Otprilike 95 % anaeroba izoliranih iz kliničkih infekcija pripada navedenim rodovima (27). Usporedimo li incidenciju anaerobnih izolata koji uzrokuju najviše anaerobnih infekcija iz dvanaestogodišnjeg istraživanja s ovim istraživanjem možemo uvidjeti korelaciju.

Najveći dio izolata pripada rodu *Bacteroides* (47,33 %), što pokazuje sličnost istraživanju provedenom u sveučilišnoj bolnici u Belgiji gdje najveći broj izolata pripada rodu *Bacteroides* (61 %), također istraživanje u Tertiary bolnici dalo je jednake rezultate sa vodećim postotkom *Bacteroidesa* od 19,9 % (20).

Drugi najčešći postatak izolata pripada rodu *Prevotella* (29,33 %). Usporedno rezultatima istraživanja provedenog u bolnici San Juan de Dios u Španjolskoj može se primjetiti da je drugi po redu najčešći izolat rod *Clostridium* (9,5 %) (19). Također, istraživanje provedeno u sveučilišnoj bolnici u Mađarskoj pokazuje iste rezultate za rod *Clostridium* sa postotkom od 22,5 % (21). Ostali rodovi anaeroba *Fusobacterium* (5,26 %) i *Cutibacterium* (5,26 %) izolirani su u znatno manjem postotku što je sukladno rezultatima prije navedenih istraživanja (21).

Prema smjernicama EUCAST-a 2022. godine su definirana hranilišta i zone inhibicije za ispitivanje osjetljivosti anaerobnih bakterija metodom disk difuzije (14). Do tada su bile definirane vrijednosti MIK-a za gram-pozitivne i gram-negativne anaerobne bakterije temeljem kojih se interpretirala detektirana antimikrobna osjetljivost. Koncentracije

piperacilin/tazobaktama, metronidazola i imipenema u komercijalno dostupnom testu za ispitivanje osjetljivosti (ATB ANA BioMerieux, France) odgovaraju definiranim vrijednostima MIK-a. Metodom prijelomne točke se rezistencija odnosno porast bakterija detektira u vidu zamućenja jažice odnosno osjetljivost kao izostanak zamućenja i samim time porasta bakterija u kategoriju osjetljivog što se jasno može uočiti u rezultatima ovog istraživanja jer nije uočena statistički značajna razlika u ispitivanju osjetljivosti dvijema metodama za piperacilin/tazobaktam, metronidazol i imipenem. Iznimka je klindamicin kod kojeg koncentracija antibiotika u jažici za ispitivanje metodom prijelomne točke odgovara kriterijima za interpretaciju osjetljivosti *Bacteroides spp.*, *Parabacteroides* i *Phocaeicola spp.* Za ostale anaerobne rodove i vrste implementirana koncentracija je „previsoka“ i ukoliko se o navedenom ne vodi računa, izolat se može proglasiti „lažno osjetljivim“, a isti to u stvarnosti nije. Rezultati ovog istraživanja osjetljivosti za *Clostridium spp.* jasno ukazuju na navedeno jer je metodom prijelomne točke 50% izolata svrstano u kategoriju „S“, a u suštini su rezistentni na klindamicin (Tablica 9). Osim toga, kod očitavanja osjetljivosti metodom disk difuzije, zone inhibicije je potrebno pažljivo pregledati na prisutnost „satelitnih kolonija“ koje mogu predstavljati početak razvoja rezistencije što je u EUCAST-u posebno naglašeno pri očitavanju osjetljivosti na klindamicin. U ovom istraživanju navedeno je upravo uočeno u ispitivanju osjetljivosti pripadnika roda *Bacteroides spp.* na klindamicin i uočena razlika je statistički značajna (Tablica 5). Nadalje, ukoliko se u laboratoriju koriste komercijalno dostupni testovi, važno je voditi računa o implementiranim koncentracijama antibiotika, odnosno o sukladnosti preporuka i smjernica za interpretaciju osjetljivosti bakterija koje se primjenjuju u određenom laboratoriju. Osim toga, iznimno je važno voditi računa o tehnici izvođenja testa osjetljivosti. Prigodom izvedbe, važno je napraviti „purity plate“ odnosno kontrolu izrade samog testa. Ukoliko se u kontroli pojavi porast u aerobnoj kulturi to dovodi u pitanje izvedbu samog testa i potrebno ga je ponoviti. Usporednim ispitivanjem osjetljivosti striktnih anaeroba metodom disk difuzije i metodom prijelomne točke možemo primjetiti izrazitu sličnost u dobivenim rezultatima. Ispitivanje osjetljivosti izolata na penicilin pokazalo je gotovo jednak broj osjetljivih i rezistentnih što je dokaz njegove smanjene efektivnosti u ovom slučaju. Također, ovakav slučaj potvrđen je dvama drugim istraživanjima u Koreji i Belgiji (22, 23). Statistički značajna razlika u ispitivanju osjetljivosti na penicilin dvjema metodama uočena je za *Fusobacterium spp.* Ista je vjerojatno rezultat toga što su zone inhibicije definirane za *Fusobacterium necrophorum*, a u ovom istraživanju su izolirani *F. nucleatum* i *F. periodonticum* za koje prema EUCAST-u nema definiranih zona (14). Osim toga, zona inhibicije svrstana u kategoriju rezistentnog izolata

(„R”) iznosi 24 mm što je na samoj granici interpretativnog kriterija za osjetljive izolate. Osim penicilina, striktno anaerobni izolati pokazali su rezistenciju na klindamicin. Istraživanje provedeno u Francuskoj potvrdilo je rezultate ovog istraživanja. Štoviše, dokazali su da je 90-ih godina prošlog stoljeća rezistencija na klindamicin kod roda *Bacteroides spp.* bila manja od 10 %, no tijekom perioda od 20 godina porasla je na 35 % što je izrazito značajan porast (24). Piperacilin/tazobaktam, karbapenemi i metronidazol su za razliku od prethodnih antibiotika pokazali izrazitu efektivnost, što dokazuje prevalenciju većeg broja osjetljivih nego rezistentnih izolata u obje metode. Karbapenemi su jedna od najefektivnijih skupina antibiotika za liječenje anaerobnih infekcija, osobito infekcije uzrokovane rodom *Bacteroides spp.* Međutim, dokazano je pojavljivanje rezistencije *B. fragilis* na ovu vrstu antibiotika zbog prevelike upotrebe i dodatnog razvijanja mehanizma rezistencije kod ove vrste bakterije (25). Iako postoje dokazi rezistencije karbapenemi, metronidazol i piperacilin/tazobaktam su i dalje antibiotici izbora za liječenje anaerobnih infekcija. Također, istraživanje provedeno na 119 uzoraka anaerobnih izolata potvrdilo je da beta-laktaminski antibiotici i metronidazol od svih testiranih antibiotika pokazuju najveću antimikrobnu učinkovitost (26). Zaključno, iako postoje dokazi rezistencije karbapenemi, metronidazol i piperacilin/tazobaktam su i dalje antibiotici izbora za liječenje anaerobnih infekcija.



## 6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- U provedenom istraživanju u anaerobnoj kultivaciji ukupno je detektirano 511 (7,05 %) izolata od kojih je 150 (29,35 %) striktno anaerobnih bakterija
- Incidencija striktno anaerobnih bakterija je 2,07 %
- U provedenom istraživanju najčešće je zastupljen rod *Bacteroides spp.* sa 61 (53,51 %) izolatom, dok najmanji broj uzoraka pripada rodu *Clostridium spp.* sa 4 (3,51 %) izolata
- Usporednim ispitivanjem osjetljivosti dvjema metodama za *Cutibacterium spp.* i *Prevotella spp.* nije uočena razlika u dobivenim rezultatima
- Statistički značajna razlika u ispitivanju osjetljivosti uočena je za penicilin kod pripadnika roda *Fusobacterium spp.*
- U izvođenju testa osjetljivosti semikvantitativnom metodom prijelomne točke iznimno je važno pridržavati se odgovarajućih kriterija za interpretaciju osjetljivosti za rod/vrstu.
- Ispitivanjem osjetljivosti metodom disk difuzije i metodom prijelomne točke može se zaključiti da najveću djelotvornost na anaerobne izolate imaju piperacilin/tazobaktam, karbapenemi i metronidazol, dok najmanju djelotvornost imaju penicilin i klindamicin

## 7. SAŽETAK

**CILJ ISTRAŽIVANJA:** Svrha ovog istraživanja bila je ispitati učestalost pojedinih anaerobnih izolata u navedenom periodu, ispitati antimikrobnu osjetljivost izolata metodama disk difuzije i prijelomne točke, te usporediti rezultate dviju metoda.

**NACRT STUDIJE:** Presječna studija.

**MATERIJAL I METODE:** U istraživanju su analizirani rezultati dobiveni usporednim ispitivanjem antimikrobne osjetljivosti metodom prijelomne točke i disk difuzijskom metodom, striktno anaerobnih izolata izoliranih iz uzoraka u rutinskom radu u Zavodu za kliničku podloge kao što su Columbia agar i Schedler Neomycin Vancomycin agar (SNVS) agar i prema potrebi tioglikoladni bujon. Identifikacija izolata provodila se pomoću MALDI TOF MS (Bruker, Ultraflex) uređaja. Ispitivanje osjetljivosti izolata provedeno je metodom prijelomne točke (eng. *break point*) pomoću komercijalno dostupnog sustava (ATB ANA, Biomerieux, France) te disk difuzijskom metodom na FAA (engl. *fastidious anaerobic agar*).

**REZULTATI:** Od ukupno 511 (7,05 %) anaerobnih izolata 150 (29,35 %) su bile striktno anaerobne bakterije. Incidencija striktno anaerobnih bakterija bila je 2,07 %. Istraživanje se provodilo na 114 uzoraka od kojih je rod *Bacteroides spp.* najčešći sa 61 (53,51 %) izolatom, dok najmanji broj uzoraka pripada rodu *Clostridium spp.* sa 4 (3,51 %) izolata. Ispitivanjem osjetljivosti metodom disk difuzije i metodom prijelomne točke moglo se zaključiti da najveću djelotvornost na anaerobne izolate imaju tazobaktam/piperacilin, karbapenemi i metronidazol, dok najmanju djelotvornost imaju penicilin i klindamicin.

**ZAKLJUČAK:** Rezultati ovog istraživanja pokazuju važnost antimikrobnog ispitivanja osjetljivosti i pridržavanja odgovarajućih kriterija za interpretaciju. Ono omogućuje pravilan odabir antibiotika za liječenje infekcije, smanjuje rizik od antibiotske rezistencije, te osigurava personalizirano i učinkovito liječenje pacijenata.

**KLJUČNE RIJEČI:** Anaerobne bakterije, disk difuzija, prijelomna točka, antimikrobna osjetljivost.

## 8. SUMMARY

### EVALUATION OF DISK DIFFUSION AND BREAK-POINT METHOD FOR SUSCEPTIBILITY TESTING OF STRICTLY ANAEROBIC BACTERIA

**OBJECTIVES:** The aim of this study to determine frequency of specific anaerobic isolates during the specified period, assess the antimicrobial susceptibility of the isolates using disk diffusion and breakpoint method, and compare the results between the two methods.

**STUDY DESIGN:** Cross-sectional study.

**MATERIAL AND METHODS:** This study analysed results obtained by comparing antimicrobial susceptibility testing using the breakpoint method and the disk diffusion method for strictly anaerobic isolates from samples collected during routine work at the Institute for clinical microbiology and hospital infections at Clinical hospital centre Osijek from June 1, 2022, to May 31, 2023. Culture media, such as Columbia agar and Schaedler Neomycin Vancomycin agar (SNVS), were used for cultivation of anaerobic bacteria, along with thioglycolate broth as needed. The identification of isolates was performed using a MALDI-TOF MS (Bruker, Ultraflex) device. Susceptibility testing of isolates was performed using breakpoint method with a commercially available system (ATB ANA, Biomerieux, France) and the disk diffusion method on fastidious anaerobic agar (FAA).

**RESULTS:** Out of a total of 511 (7.05 %) anaerobic isolates, 150 (29.35 %) were strictly anaerobic bacteria. The incidence of strictly anaerobic bacteria was 2.07 %. The study included 114 samples, with the *Bacteroides* spp. genus being most common, accounting for 61 (51.51 %) isolates, while the *Clostridium* spp. genus had the lowest number of samples, with 4 (3.51 %) isolates. Susceptibility testing using the disk diffusion and breakpoint method indicated that the most effective treatments for anaerobic isolates were tazobactam/piperacilin, carbapenems and metronidazole, while penicilin and clindamycin showed the least effectiveness.

**CONCLUSION:** The results of this study demonstrate the importance of antimicrobial susceptibility testing and adherence to appropriate interpretation criteria. It enables the proper selection of antibiotics for infection treatment, reduces the risk of antibiotic resistance and ensures personalized and effective patient care.

**KEYWORDS:** anaerobic bacteria, disk diffusion, breakpoint, antimicrobial susceptibility.

**9. LITERATURA**

1. Kuper KM, Boles DM, Mohr JF, Wanger A. Antimicrobial susceptibility testing: a primer for clinicians. *Pharmacotherapy*. 2009;29(11):1326-43.
2. Jorgensen J, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: Special Needs for Fastidious Organisms and Difficult-to-Detect Resistance Mechanisms. *Clinical Infectious Diseases*. 2000;30:799–808.
3. Kalenić S, i sur. *Medicinska mikrobiologija*. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
4. Brook I, Long S. Anaerobic Bacteria: Classification, Normal Flora, and Clinical Concepts. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. Elsevier. 2018;5:987-995.
5. Noor A, Khetarpal S. *Anaerobic Infections*. 2022.
6. 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
7. Gajdacs M, Spengler G, Urban E. Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria: Rubik's Cube of Clinical Microbiology? 2017;6(4):25
8. Cobo F. Antimicrobial Susceptibility and Clinical Findings of Anaerobic Bacteria. *Antibiotics*. 2022; 11(3):351.
9. Carroll KC, Hobden JA, Miller S, i sur. *Jawetz Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. 27. izd. New York: Mcgraw-Hill Education; 2016.
10. Bayot M, Bragg B. *Antimicrobial Susceptibility Testing*. 2020.
11. Medscape. Antimicrobial Susceptibility. 2022. Dostupno na adresi: <https://emedicine.medscape.com/article/2103786-overview#showall>. Datum pristupa: 10.07.2023.
12. Sood A, Ray P, Angrup A. Antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: in routine and research. *Anaerobe*. 2022;75:102559.
13. Mlinarić-Galinović G, Ramljak-Šešo M. *Specijalna medicinska mikrobiologija i parazitologija*. Udžbenik Visoke zdravstvene škole. Zagreb: Merkur A.B.D; 2003.
14. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST disk diffusion method. Dostupno na adresi: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/2023\\_manuals/Manual\\_v\\_11.0\\_EUCAST\\_Disk\\_Test\\_2023.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2023_manuals/Manual_v_11.0_EUCAST_Disk_Test_2023.pdf). Datum pristupa: 12.07.2023.

15. 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.
16. Poslon, D. (2022). Antimikrobna rezistencija i višestrukorezistentne bakterije. Diplomski rad. Sveučilište u Rijeci. Medicinski fakultet. Dostupno na adresi: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:853000>. Datum pristupa: 22.08.2023.
17. Gajic I, Kabic J, Kekic D, Jovicevic M, Milenkovic M, Mitic Culafic D, i sur. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods. *Antibiotics*. 2022;11(4):427.
18. Turnidge J, Paterson DL. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(3):391-408.
19. Alpizar S, Bernal L. Epidemiology of anaerobic bacteria isolated in clinical samples at San Juan de Dios Hospital, San José, Costa Rica, during the 2014, 2015 and 2016 triennium. *Rev. costarric. salud pública*.2018;27:82-92.
20. L. Blairon Y, De Gheldre B, Delaere A, Sonet A, Glupczynski Y. A 62-month retrospective epidemiological survey of anaerobic bacteraemia in a university hospital. *Clin. Microbiol. Infect.: Off. Pub. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2006;12:527-532.
21. Kovács K, Nyul A, Lutz Z, Mestyán G, Gajdács M, Urbán E, i sud. Incidence and Clinical Characteristics of Anaerobic Bacteremia at a University Hospital in Hungary: A 5-Year Retrospective Observational Study. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(10):1326.
22. Byun J.H., Kim M, Lee Y, Lee K. Antimicrobial Susceptibility Patterns of Anaerobic Bacterial Clinical Isolates From 2014 to 2016, Including Recently Named or Renamed Species. *Ann. Lab. Med*. 2019;39:190-199.
23. Wybo I, Van den Bossche D, Soetens O, Vekens E, Vandoorslaer K, Claeys G, i sur. Fourth Belgian multicentre survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *J. Antimicrob. Chemother*. 2014; 69:155-161.
24. Reissier S, Penven M, Guérin F, Cattoir V. Recent Trends in Antimicrobial Resistance among Anaerobic Clinical Isolates. *Microorganisms*. 2023;11(6):1474
25. Yekani M, Ahangarzadeh Rezaee M, Beheshtirouy S, Banazadeh Baghi H, Bazmani A, Farzinazar A, i sur. Carbapenem resistance in *Bacteroides fragilis*: A review of molecular mechanisms. *Anaerobe*. 2022;76,102606.

26. Gaetti-Jardim Júnior E, Landucci LF, Lins SA, Vieira EM, de Oliveira SR. Susceptibility of strict and facultative anaerobes Isolated from endodontic infections to metronidazole and beta-lactams. *J Appl Oral Sci.* 2007;15(6):539-545.
27. Brook I. *Anaerobic Infections: Diagnosis and Management.* 1. izd. Washington, D.C.:CRC Press;2016.

## 10. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODATCI:

Ime i prezime: Ines Šajkunović

Datum rođenja: 25. 10. 1995.

Mjesto rođenja: Osijek, Republika Hrvatska

Adresa: Zelena 36a, Brijesće, Osijek

E-mail: ines.sajkunovic@gmail.com

Telefon: 095 585 9060

### OBRAZOVANJE:

2021. – 2023. Medicinski fakultet Osijek

Sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2015. – 2017. Medicinski Fakultet Osijek

Sveučilišni prijediplomski studij Medicinsko laborarotijska dijagnostika

2010. – 2014. Medicinska škola Osijek

2002. – 2010. OŠ Vladimir Nazor Čepin