

# Karakterizacija oksacilin-hidrolizirajućih karbapenemaza u izolatima *Acinetobacter baumannii* iz Bosne i Hercegovine

---

Slačanac, Domagoj

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:180959>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Domagoj Slačanac**

**Karakterizacija oksacilin-hidrolizirajućih karbapenemaza u izolatima  
*Acinetobacter baumannii* iz Bosne i Hercegovine**

**DIPLOMSKI RAD**



Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb-Rebro pod vodstvom prof.dr.sc. Branke Bedenić dr.med., spec. medicinske mikrobiologije i parazitologije i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2017./2018.

## Popis i objašnjenje kratica korištenih u radu:

AMI - amoksisilin

AmpC –  $\beta$ -laktamaza

Apai – restrikcijski enzim

ARI-1 – *Acinetobacter* rezistentan na imipenem

Atb – antibiotik

ATCC – Američka baza sojeva (engl. American Type Culture Collection)

BH - ekstrakt mozga i srca ( engl. brain heart infusion broth)

bla –  $\beta$ -laktamaza gen

bp – parovi baza (engl. base pair)

CarO- protein vanjske membrane *A. baumannii* vezan uz rezistenciju na karbapeneme

CAZ - ceftazidin

CFU – jedinica stvaranja kolonija (engl. colony forming unit)

CHDL – karbapenem hidrolizirajuća beta-laktamaza klase D (engl. carbapenem hydrolizing class D beta-lactamase)

CIP - ciprofloksacin

CLSI - klinički i laboratorijski standardi (engl. **C**linical and **L**aboratory **S**tandards **I**nstitute)

COL - kolistin

CRO – ceftriakson

CTX -  $\beta$ -laktamaza aktivna prema cefotaksimu (engl. active on cefotaxime); cefotaksim

EDTA – etilendiamintetraacetat

ESBL- beta-laktamaze proširenog spektra (engl. extended spectrum beta-lactamase)

FEP - cefepim

GES – Gvajanska beta laktamaza proširenog spektra (engl. Guianan extended spectrum  $\beta$ -lactamase)

GM - gentamicin

ICL – međunarodna klonalna linija (engl. international clonal line)

IMI - imipenem

IMP – imipenemaza

IS<sub>Aba1</sub> - insercijska sekvencija *A. baumannii* 1, (engl. insertion sequence of *A. baumannii*)

IS – insercijska sekvenca

KPC – *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaza (engl. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase)

LGP – niska točka geliranja (engl. low gelling point)

MBL – metalo  $\beta$ -laktamaza

MDR-AB – multiplo rezistentan *A.baumannii*

MEM - meropenem

MH – Müller-Hinton bujon

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

MLST – multilokusna tipizacija sekvenci (engl. multilocus sequence typing)

NDM – New Delhi metalo  $\beta$ -laktamaza

Omp – porin vanjske membrane (engl. outer membrane porin)

OprD- porin vanjske membrane D

PBP – protein koji veže penicilin

PBRT – tipiziranje replikona PCR-om (engl. polymerase chain reaction-based replicon typing)

PCR – lančana reakcija polimerazom

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

PFGE – elektroforeza u pulsirajućem polju

repPCR – PCR s ponavljajućim palindromskim sekvencama

SG – sekvencijska grupa

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

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

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

TIG – tigeciklin

TZP – piperacilin-tazobaktam

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

XbaI – restrikcijska endonukleaza

## SADRŽAJ

1.	Uvod.....	1
1.1.	Mikrobiološke karakteristike <i>A.baumannii</i> .....	1
1.2.	Klasifikacija i svojstva beta-laktamaza.....	2
2.	Hipoteza.....	4
3.	Ciljevi rada.....	4
4.	Materijal i metode.....	5
4.1.	Izolati <i>A.baumannii</i> .....	5
4.2.	Testiranje osjetljivosti na antibiotike.....	5
4.3.	Testovi detekcije beta-laktamaza.....	7
4.4.	Molekularna detekcija gena rezistencije na beta-laktamske antibiotike.....	9
4.5.	Detekcija plazmida.....	10
4.6.	Genotipizacija sojeva.....	11
5.	Rezultati.....	14
6.	Rasprava.....	19
7.	Zaključci.....	21
8.	Zahvale.....	22
9.	Literatura.....	22
10.	Životopis.....	47

## Sažetak

Karakterizacija oksacilin-hidrolizirajućih karbapenemaza u izolatima *Acinetobacter baumannii* iz Bosne i Hercegovine, Domagoj Slačanac

Ovim su diplomskim radom prikazane oksacilinaze prisutne u vrsti *Acinetobacter baumannii* iz kliničkih izolata u Bosni i Hercegovini. Cilj je rada bio utvrditi fenotip rezistencije na antibiotike, tipove karbapenemaza i genotipove izolata *A.baumannii* prikupljenih iz Univerzitetske klinike u Mostaru. Načini na koji vrste roda *Acinetobacter* najčešće stječu rezistenciju na karbapeneme su produkcija  $\beta$ -laktamaza (enzima koji razgrađuju beta laktamski prsten), smanjena permeabilnost ili alteracija u proteinima koji vežu peniciline. Oksacilinaze su enzimi koji hidroliziraju  $\beta$ -laktamske antibiotike. Po Amblerovoj molekularnoj klasifikaciji koja  $\beta$ -laktamaze dijeli u četiri skupine, oksacilinaze pripadaju grupi D. U testiranim izolatima utvrđene oksacilinaze uzrokuju rezistenciju acinetobactera na karbapeneme i uobičajeno se označuju kraticom CHDL. Oksacilinaze roda *Acinetobacter* se dijele u 5 filogenetskih grupa i označuju kraticom OXA: intrinzični enzimi nalik na OXA-51 i stečeni enzimi OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143, OXA-235. Enzimi iz grupe OXA-51  $\beta$ -laktamaza su normalno prisutni u vrsti *A.baumannii* no kada se insercijska sekvenca *ISAb<sub>a</sub>1* nalazi ispred gena dolazi do povećane ekspresije gena za navedenu grupu enzima. Prisutne oksacilinaze su bile intrinzična OXA-51 te plazmidne OXA-23 i OXA-24/40 oksacilinaze. Bosna i Hercegovina je regija sa značajnim geografskim i populacijskim varijacijama te je značajna molekularna karakterizacija i tipiziranje izolata. Time se identificiraju izvori i načini prijenosa sojeva te planiraju buduće strategije kontrole infekcija što je od epidemiološkog značaja. Utvrđeno je da su izolati pozitivni na OXA-24/40 bili klonski srodni.

Ključne riječi: *Acinetobacter*, karbapenemaze, oksacilinaze, rezistencija



## Summary

Characterization of carbapenem-hydrolyzing oxacillinases in *Acinetobacter baumannii* from Bosnia and Herzegovina, Domagoj Slačanac

Oxacillinases from clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Bosnia and Herzegovina are presented in this study. The aim of the study was to determine the resistance phenotype mechanisms of carbapenem resistance and genotypes of *A.baumannii* isolates from the University Clinic in Mostar. Species from the genus *Acinetobacter* are known as causative agents of nosocomial infections among immunocompromised patients as well as among those with severe underlying diseases. Their growing resistance to antibiotics is of great concern. Modes of acquiring resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics are impaired permeability, alteration in penicillin-binding proteins, and  $\beta$ -lactamase mediated resistance, the most common mechanism. Carbapenem-hydrolysing oxacillinases (CHDL) hydrolyse carbapenems and render them inactive. They belong to class D according to Ambler. Oxacillinases of the genus *Acinetobacter* are classified into five phylogenetic groups, the intrinsic OXA-51-like and the acquired enzymes: OXA-23-like , OXA-24/40-like, OXA-58-like, OXA-143-like, and OXA-235-like. The study revealed oxacillinases (the chromosomally and plasmid-encoded OXA-51 and both OXA-23 and OXA-40, respectively) capable of hydrolysing carbapenems, beta-lactam antibiotics that before the advent of treatment with colistin often proved as a last resort in treating infections with this pathogen. Molecular characterization and strain typing are of great epidemiological value because of the importance of tracing the source of resistant strains as well as the possibility to develop targeted infection-control strategies. Isolates producing OXA-24/40 were clonally related.

Key words: *Acinetobacter*, carbapenemases, oxacillinases, resistance

## 1. UVOD

### 1.1. Mikrobiološke karakteristike *A. baumannii*

Današnja taksonomija po 16S rRNA svrstava bakteriju *Acinetobacter baumannii* iz roda *Acinetobacter*, zajedno sa rodovima *Moraxella* i rodovima *Psychrobacter* porodici Moraxellaceae, redu Pseudomonadales, razredu Gammaproteobacteriae i koljenu Proteobacteriae.(1). Radi se o gram-negativnom bacilu koji u stacionarnoj fazi rasta poprima oblik kokobacila, ponekad i kao diplokok, no u literaturi se uglavnom opisuje kao kokobacil. Nefermentirajuća je bakterija i striktni aerob katalaza pozitivan i bez mogućnosti reduciranja nitrata, oksidaza negativan.

Obzirom na temu ovog rada, potrebno je spomenuti morfološke karakteristike stanične stijenke, koja je ciljno mjesto djelovanja  $\beta$ -laktamskih antibiotika, te suvremenu sustavnu klasifikaciju beta-laktamaza (koja uključuje oksacilinaze) koji također djeluju u miljeu stanične stijenke, a ključni su za hidrolizu  $\beta$ -laktamskog prstena.

Stanična stijenka gram-negativnih bakterija građena je od dviju strukturnih jedinica. Na citoplazmatsku membranu se nadovezuje sloj peptidoglikana, a na taj sloj se nadovezuje membrana građena od dvosloja fosfolipida i brojnih proteina koji uglavnom premošćuju cijelu debljinu membrane, a zaslužni su za mehanizme rezistencije vezane uz otežan ulazak antibiotika u periplazmatski prostor ili uz proteine koji djeluju kao kanali za inluks antibiotika (CarO, OprD-like porin, Omp)(2,3,4). Osim smanjene propusnosti vanjske membrane i pojačana aktivnost efluks pumpi može dovesti do smanjene osjetljivosti na karbapeneme. Efluks pumpe se nalaze na citoplazmatskoj membrani i vezane su linker proteinom na porin vanjske membrane. Izbacivanje antibiotika se odvija protiv gradijenta koncentracije i zahtijeva utrošak ATP-a bakterijske stanice (3). Ovi mehanizmi rezistencije neće biti razmatrani u ovom radu.

Ciljno mjesto beta-laktamskih antibiotika je PBP, odnosno penicilin binding protein koji je vezan na transpeptidaze koje sudjeluju u premoštavanju oligopeptidnih izdanaka aminošećernih lanaca u peptidoglikanskom sloju transpeptidaza. Inaktivacijom PBP-a dolazi

do dezintegracije stanične stijenke, a time i smrti bakterijske stanice. Pod djelovanjem beta-laktamskih antibiotika nastaju oblici bakterija bez stijenke i nazivaju se protoplasti u Gram-pozitivnih vrsta i sferoplasti u Gram-negativnih vrsta. Ukoliko bakterija posjeduje vlastite kromosomske ili plazmidno akvirirane enzime koji hidroliziraju beta-laktamski prsten, razvija se rezistencija na beta-laktamske antibiotike. (1,5).

## 1.2. Klasifikacija i svojstva beta-laktamaza

U prošlosti je postojalo nekoliko podjela enzima u nastojanju da se što sustavnije prikažu beta-laktamaze kao enzimi koji razgrađuju iznimno veliku i rastuću grupu antibiotika, ali i grupa enzima čije sastavnice se otkrivaju iz dana u dan. Kao primjer može poslužiti funkcionalna podjela enzima po K. Bush koja se temelji na supstratnom profilu ili osjetljivosti na inhibitore  $\beta$ -laktamaza.(6,7). Obzirom da se radi o enzimima u dinamičnim sustavima kao što su bakterijske stanice te time često podliježu promjenama strukture mutacijama, vidljiv je nedostatak klasifikacija poput ove. Najobjektivniji način za sistematizaciju enzima uveo je Ambler, a temelji se na primarnoj strukturi proteina (aminokiselinski slijed) i predstavlja osnovu današnje klasifikacije.(8,9). Pojedine se mutacije mogu nadovezati na već otkrivene enzime obzirom na strukturno naočigled beznačajne promjene, ali koje fenotipski ponekad utječu na aktivno mjesto mijenjajući osjetljivost čak i na antibiotike zadnje linije terapije (karbapenemi) (10). Ovakav način strukturiranja enzima ima i epidemiološke implikacije jer se podrijetlo pojedinih enzima katkada može i geografski procijeniti, te postaviti određene hipoteze o mogućim razlozima za pojavu određenog oblika rezistencije. Ponajprije je to značajno za vrste roda *Acinetobacter* koje su sveprisutne u okolišu (vidi pogl.1.3.) (11). U nastavku je prikazana molekularna karakterizacija beta-laktamaza po Ambleru koja obuhvaća skupine označene slovima od A do D (A,C i D serinske proteaze i grupa B metalo- $\beta$ -laktamaza) s posebnim naglaskom na klasu D koja obuhvaća oksacilinaze.

### 1.2.1. Klasa A

U *A. baumannii* se radi o plazmidno smještenim  $\beta$ -laktamazama širokog spektra (TEM-1, TEM-2) koje se karakteriziraju kao penicilinaze (brža hidroliza benzilpenicilina od cefaloridina) i o beta-laktamazama proširenog spektra – ESBL (PER-1,PER-2,CTX-M,

GES, VEB, SHV, itd.) s hidrolizom cefalosporina treće generacije, a inhibirane su klavulanskom kiselinom (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19). Od karbapenemaza je iz klase A u *Acinetobacter*-a nedavno opisana KPC beta-laktamaza (20).

#### 1.2.2. Klasa B

Ovi enzimi, kada su prisutni, hidroliziraju sve  $\beta$ -laktamske antibiotike osim monobaktama aztreonama (IMP, VIM, SIM, NDM). Sadrže cink kao kofaktor koji je bitan za proces katalize. Inhibirane su metalnim kelatorima kao što su EDTA, merkaptopropionskom i merkaptosumpornom kiselinom koji vežu cink u aktivnom središtu (21, 22, 23, 24, 25).

#### 1.2.3. Klasa C

Kod vrste *A.baumannii* se radi o urođenoj kromosomskoj AmpC cefalosporinazi (enzim s bržom hidrolizom cefaloridina od benzilpenicilina). Smanjena se osjetljivost na karbapeneme može razviti zbog hiperprodukcije kromosomske AmpC beta-laktamaze (26, 27).

#### 1.2.4. Klasa D

Radi se o najbrojnijoj skupini serinskih proteaza s preko 400 opisanih molekula (28). Označavaju se još i kraticom OXA jer su prvi opisani enzimi imali veću moć hidrolize oksacilina od benzilpenicilina. Inhibirane su NaCl-om (29, 30, 31). Otkrićem je novijih enzima taj naziv tek od povijesnog značaja. Po supstratnom profilu ovi enzimi obuhvaćaju one od uskog spektra (hidroliza penicilina i prve generacije cefalosporina) preko onih koji su stekli mogućnost hidrolize cefalosporina viših generacija (proširenog spektra) pa sve do onih koji su stekli mogućnost hidrolize karbapenema (karbapenem hidrolizirajuće oksacilinaze ili CHDL). CHDL imaju varijabilan stupanj hidrolize karbapenema, a manifestna rezistencija često nastaje uz uključivanje drugih mehanizama kao što je gubitak porina ili efluks. Prva opisana karbapenem hidrolizirajuća  $\beta$ -laktamaza među OXA grupom je OXA-23 (poznata prije i kao ARI-1, *Acinetobacter* rezistentan na imipenem), a do tada se zbog supstratnog profila ova grupa enzima nije smatrala klinički značajnom (32). Dosad je poznato šest podrazreda oksacilinaza koje hidroliziraju karbapeneme u *A.baumannii* – intrinzična OXA-51 i transferabilne OXA-23,

OXA-24/40 (u (ovom podrazredu i OXA-72, 33,34), OXA-58, OXA-143 i OXA-235 (35, 36, 37, , 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45), koje su eksprimirane u maloj količini, ali ukoliko se ispred gena nalazi insercijska sekvenca (IS) tada djeluje promotorski na snažnu ekspresiju OXA-51 i OXA-23 enzima (46). OXA-23 i OXA-58 su plazmidno kodirane i aminokiselinskim slijedom vrlo slične dok je OXA-24/40 kromosomska (47, 48). Izolati pozitivni na OXA-23 i OXA-24/40 grupu imaju visok stupanj rezistencije na karbapeneme (38).

#### 1.2.4.1. Katalitički mehanizam

Klasa D beta-laktamaza, kao i klase A i C, spada u već spomenute serinske proteaze (49). Serin u aktivnom mjestu enzima služi kao nukleofil u enzimskoj katalizi. Dodaje se na karbonilni dio u  $\beta$ -laktamskom prstenu. Intermedijarni adicijski spoj se brzo raspada i tvori acil-enzimski intermedijar (50), a dušikov atom privlači elektrone te se prsten rastvara. Odvajanje enzimskog intermedijara se vrši aktivacijom molekule vode kao nukleofila koja se dodaje na karbonilni atom acil-enzimskog intermedijara te dolazi do oslobađanja serina i hidroliziranog beta-laktamskog antibiotika. Za mnoge inhibitore  $\beta$ -laktamaza (klavulanat, tazobaktam, avibaktam) ključna je mogućnost stvaranja acil-enzimskog intermedijara koji je kasnije rezistentan na katalitičku hidrolizu.

Razlikovna je kategorija ove tri vrste serinskih proteaza aktivno mjesto enzima odnosno način na koji se serinski ostatak aktivira kao nukleofil za acilaciju, a voda za deacilaciju. Za klasu je D  $\beta$ -laktamaza ključan karbamatni anion koji nastaje posttranslacijskom modifikacijom u kojem ugljik(IV)oksid reagira s  $\beta$ -aminom lizina u aktivnom mjestu. Tako formirani karbamatni anion djeluje kao Schiffova baza koja prima proton od serina za acilaciju kao i u naknadnoj reakciji deacetilacije kada prima proton od molekule vode. Kod druge dvije klase enzima, u aktivnom mjestu se kao aktivatori serinskog ostatka kod klase A  $\beta$ -laktamaza glutaminsko-lizinski par aminokiselina, a za klasu C  $\beta$ -laktamaza lizinsko-tirozinski par aminokiselina (38,51,52,53,54,98,99,100,101).

### **1.3. Epidemiologija *A. baumannii***

Metode se molekularne epidemiologije, kao što su PFGE (elektroforeza u pulsirajućem električnom polju), MLST (tipiziranje multilokusnih sekvencija), repPCR koriste u praćenju širenja pojedinih klonova *A.baumannii*. Praćenje se odvija međubolnički, regionalno ali i među državama i kontinentima ovisno o konzistentnosti rezultata pojedine metode. Metode su detaljnije opisane u poglavlju materijali i metode (55,56,57).

## **2. HIPOTEZA**

Pretpostavka je da će izolati *Acinetobacter baumannii* s prisutnim stečenim oksacilinazama imati povećanu rezistenciju na karbapeneme u odnosu na izolate bez stečenih oksacilinaza i da će izolati s istim tipom CHDL biti klonski srodni.

## **3. CILJEVI RADA**

1. Identificirati sojeve kao *A. baumannii*
2. Odrediti fenotip rezistencije na karbapeneme u izolata *Acinetobacter baumannii* iz Bosne i Hercegovine.
3. Odrediti genetsko podrijetlo gena rezistencije, odnosno kromosomsku ili plazmidnu lokaciju gena
4. Odrediti tipove karbapenemaza u izolatima koji pokazuju smanjenu osjetljivost na karbapeneme
5. Odrediti utjecaj hiperprodukcije kromosomske AmpC beta-laktamaze na osjetljivost prema karbapenemima
6. Odrediti genotipove PFGE i MLST metodom

## **4. MATERIJAL I METODE**

### **4.1. Izolati *A.Baumannii***

12 je izolata MDR-AB prikupljeno u Sveučilišnoj kliničkoj bolnici Mostar. Četiri su pojedinačna uzorka sakupljena u razdoblju od srpnja 2011. do studenog 2011. godine. Preostalih su osam uzoraka sakupljeni u razdoblju od studenog 2015. do siječnja 2016. godine. Osam je izolata uzeto od pacijenata sa znakovima infekcije po standardnoj definiciji infekcije (58), a četiri uzorka od koloniziranih pacijenata. O podrijetlu uzoraka vidjeti i tablicu 1. Obrada je sojeva učinjena u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu biologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, KBC Zagreb

### **4.2. Testiranje osjetljivosti na antibiotike**

Osjetljivost je na antibiotike ispitana mikrodilucijom u bujonu i disk-difuzijskom metodom. U kontroli kvalitete korišten je soj *Acinetobacter baumannii* 19606 kao preporučeni kontrolni soj po CLSI (59).

#### 4.2.1. Mikrodilucija u bujonu

Metodom dilucije u bujonu ili agar dilucijskim testom kvantitativno određujemo onu najmanju koncentraciju antibiotika koja inhibira rast ispitivanog bakterijskog soja (MIK).

Agar je dilucijska metoda detaljnije opisana u poglavlju 4.3..

##### 4.2.1.1. Bujonska dilucijska metoda

##### 4.2.1.1.1. Priprema razrijeđenja antibiotika

Dilucijska metoda se izvodi u standardiziranoj podlozi tj. Müller-Hinton bujonu. Dilucija u bujonu obuhvaća makrodiluciju pri čemu se koriste volumeni bujona veći od 1 ml (obično 2 ml) otpipetiranih u epruvete, te mikrodiluciju koja koristi volumene manje od 0.1 ml, a sadržani su u bunarićima mikrotitracijskih pločica. Stock solucije antibiotika se obično priređuju u koncentraciji od 5120 µg/ml. Antibiotik se uvijek razrijeđuje 1:9 (1 ml antibiotika i 9 ml Mueller-Hinton bujona ili nekog drugog bujona). Na taj se način dobiva početna koncentracija od 512 µg/ml. Od te se koncentracije počinje sa serijskim razrijeđenjima. Ako se testiraju rezistentne bakterije kod kojih se očekuju visoki MIK-ovi razrijeđenje se može

prilagoditi tako da se dobije viša početna koncentracija npr. 1024 ili 2048 µg/ml. Potrebno je pripremiti 12 sterilnih epruveta. U prvu se epruvetu pipetira 1 ml bujona i 1 ml antibiotika. U drugu epruvetu pipetiramo 2 ml bujona i 1 ml antibiotika. U treću epruvetu stavljamo 7 ml bujona i 1 ml antibiotika.

1. epruveta: 1 ml MH + 1ml atb 256 µg/ml
2. epruveta: 3 ml MH + 1ml atb 128 µg/ml
3. epruveta: 7 ml MH + 1 ml atb 64 µg/ml
4. epruveta: 1 ml MH + 1 ml iz 3. epruvete 32 µg/ml
5. epruveta: 3 ml MH + 1 ml iz 3. epruvete 16 µg/ml
6. epruveta: 7 ml MH + 1 ml iz 3. epruvete 8 µg/ml
7. epruveta: 1 ml MH + 1 ml iz 6. epruvete 4 µg/ml
8. epruveta: 3 ml MH + 1 ml iz 6. epruvete 2 µg/ml
9. epruveta: 7 ml MH + 1 ml iz 6. epruvete 1 µg/ml
10. epruveta: 1 ml MH + 1 ml iz 9. epruvete 0.5 µg/ml
11. epruveta: 3 ml MH + 1 ml iz 9. epruvete 0.25 µg/ml

Razrijeđenja antibiotika se ukapavaju pomoću višekanalne mikropipete u okomite stupce u mikrotitar pločicama u količini od 50 µl u svaku jažicu. U zasebnu se epruvetu stavlja samo bujon bez antibiotika radi kontrole rasta soja. U prvi je stupac na mikrotitarskoj pločici stavljena najniža koncentracija antibiotika.

#### 4.2.1.1.2.Priprema inokuluma:

Testirani soj se zasijava u 3 ml Mueller-Hinton bujona i inkubira preko noći na 35 do 37°C. Prekonoćna kultura obično sadržava  $10^9$  do  $10^{10}$  CFU/ml. Ona se zatim razrijeđuje tako da se prenaša 100 µl kulture u 9.9 ml fiziološke otopine pa se dobije razrijeđenje od  $10^8$  CFU/ml koja bi trebalo odgovarati Mc Farland suspenziji 0.5. Od tog razrijeđenja se uzima 100 µl i prenaša u 9.9 ml Mueller-Hinton bujona tako da se dobije veličina inokuluma od  $10^6$  CFU/ml. 50 µl takvog razrijeđenja se zatim nanosi pomoću stepera u



jažice u mikrotitar pločicama u kojima se već nalazi 50 µl razrijeđenja antibiotika tako da se dobije konačna veličina inokuluma od  $5 \times 10^5$  CFU /ml. Budući da u svakoj jažici na 50 µl antibiotika dolazi 50 µl soja, ukapane koncentracije antibiotika se razrijeđuju još na pola. Time se dobivaju konačne koncentracije antibiotika 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 i 0.12 µg/ml. Mikrotitar pločice se zatim inkubiraju 18 do 24 h na 35 do 37°C u termostatu. Mikrodilucijske pločice treba inokulirati unutar 30 min od pripreme inokuluma. Uzorak soja razrijeđenog za kapanje treba dodatno razrijediti 1:100 i 1:1000 i 100 µl od svakog razrijeđenja treba zasijati na krutu podlogu radi provjere veličine inokuluma. Jažica s inokulumom bez antibiotika se supkultivira radi provjere rasta i čistoće kulture. Nakon inokulacije svaka se pločica zatvara sterilnim poklopcem ili samoljepljivom trakom da bi se spriječilo sušenje tokom inkubacije. Pločice se inkubiraju na 35°C 18 do 20 sati uz odgovarajuću vlažnost termostata. Ukoliko je došlo do zamućenja bujona u jažicama to znači da koncentracija antibiotika nije bila dovoljno visoka da spriječi umnožavanje bakterija, što znači da je ispod MIK-a. Ako je bujon ostao bistar to znači da je koncentracija antibiotika dovoljno visoka da spriječi umnožavanje bakterija u jažicama. Da bi odredili MIK testiranog soja moramo pronaći prvu jažicu u nizu u kojoj je bujon ostao bistar. Koncentracija antibiotika u toj jažici odgovara MIK-u testiranog soja. Rezultati su očitavani konkavnim zrcalom koje povećava sliku.

#### 4.2.2. Disk-difuzijska metoda

Suspenzija se testiranog soja nanosi pomoću brisa na površinu Müller-Hinton agara na koji se zatim nanose diskovi s antibioticima pomoću dispnzera ili pincete. Suspenziju soja pripremamo tako da pokupimo bakteriološkom ušicom 3 do 5 kolonija s površine krute hranjive podloge, razmutimo ih u fiziološkoj otopini ( 5ml) i mučkamo uz pomoć vortexa da dobijemo homogenu suspenziju. Gustoću suspenzije podešavamo prema standardnoj Mc Farland suspenziji 0.5 što odgovara veličini inokuluma od  $10^8$  CFU/ml. Antibiotik iz diska difundira po površini agara tako da se stvara gradijent koncentracija i na određenoj udaljenosti od ruba diska ovisno o osjetljivosti soja on prestaje rasti. Promjer inhibicijske zone mjerimo ravnalom i izražavamo ga u milimetrima.

### **4.3. Testovi detekcije beta-laktamaza**

#### **4.3.1. Bujonska dilucijska metoda s NaCl ili kloksacilinom**

Ova je metoda korištena za određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija imipenema i meropenema. Ovoj metodi se pristupilo zbog mogućnosti dodatka kloksacilina (200mg/L) za određivanje aktivnosti kromosomske AmpC- $\beta$ -laktamaze kao i dodatka NaCl-a za određivanje prisutnosti OXA-58. Obje supstance uzrokuju inhibiciju gore navedenih enzima. Razrjeđenja antibiotika se pripreme u nizu epruveta kao i kod dilucijskog testa za osjetljivost bakterija na antibiotike u omjeru 1:9.

Postupak je nanošenja antibiotika ili NaCl kao i nanošenje ispitivanog soja kao i kod opisa testiranja osjetljivosti na antibiotike bujonskom dilucijskom metodom.

Mikrotitarske pločice se zatim inkubiraju na 35 do 37°C u termostatu i sljedeći se dan promatra je li došlo do zamućenja jažica na pločama s određenom koncentracijom antibiotika ili NaCl-a. Najniža koncentracija antibiotika koja je spriječila porast kolonija na ploči se smatra MIK-om testiranog soja za dotični antibiotik.

#### **4.3.2. Testovi detekcije beta-laktamaza proširenog spektra**

##### **4.3.2.1. Dvostruki disk sinergistički test**

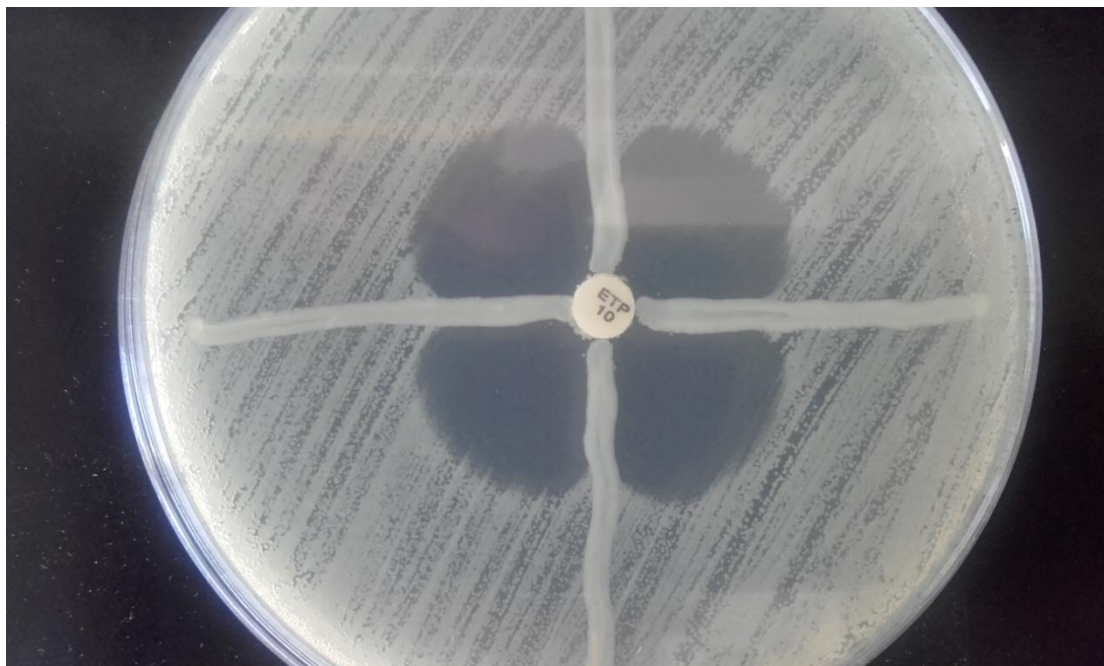
Za testiranje je produkcije beta-laktamaza proširenog spektra kod *A.baumannii* nužan dodatak kloksacilina u MH hranjive podloge u koncentraciji od 200 mg/L. Time se inhibira efekt AmpC beta-laktamaze koja antagonizira efekt klavulanata jer njime nije inhibirana.. Sam test provodimo tako da testirani soj suspendiramo u fiziološkoj otopini na jednaki način kao za antibiogram i sterilnim brisom ga nanesimo na površinu Müller-Hinton agara. U sredinu se stavlja disk koji sadržava amoksicilin kombiniran s klavulanskom kiselinom, a na udaljenost se od 2 do 3 cm stavljaju diskovi ceftazidima (30 $\mu$ g) i cefepima (30 $\mu$ g). Ploče se inkubiraju 18 do 24 h na 37°C i zatim se očitava rezultat. Deformacija inhibicijske zone u smjeru prema centralnom disku označava pozitivan rezultat testa.

##### **4.3.2.2. Metoda kombiniranih diskova**

Na ploču MH agara stavljam diskove ceftazidima, cefotaksima, ceftriaksona i cefepima s i bez dodatka klavulanske kiseline (10mg/ml). Uvećanje inhibicijske zone uz dodatak klavulanske kiseline za najmanje 5 mm u odnosu na kontrolni disk bez klavulanske kiseline označava pozitivan rezultat testa i upućuje na produkciju ESBL.

#### 4.3.3. Modificirani Hodge test

Provodi se za otkrivanje produkcije karbapenemaza. Prekonoćna se kultura referentnog soja *E.coli* ATCC25922 razrjeđuje tako da se postigne optička gustoća koja odgovara McFarland standardu 0.5 što odgovara  $10^8$  CFU/ml. To se razrijeđenje zasijava na MH agar te se stavlja diskovi imipenema ili meropenema. Okomito se na disk povuče testirani soj u obliku crte. Ploča se inkubira preko noći na 37°C. Uvrtanje inhibicijske zone oko diska karbapenema tamo gdje se nalazi crta testiranog soja u obliku lista djeteline upućuje na produkciju karbapenemaze (60).



Slika 1. Modificirani Hodge test

##### 4.3.3.1. Kombinirani disk test za detekciju KPC i MBL

Za ovaj je test potrebno na zasijani MH agar postaviti diskove imipenema i meropenema, po četiri diska na svaku ploču, bez i sa dodatkom 3-aminofenilboronične kiseline za detekciju produkcije KPC te isto ponoviti za detekciju

MBL, ali umjesto kapanja 3-aminofenilboronične kiseline treba nakapati EDTA. Za detekciju je oba enzima potrebno nakapati EDTA i 3-aminofenilboroničnu kiselinu na drugi par diskova gore navedenih antibiotika (61).

#### **4.4. Molekularna detekcija gena rezistencije na β-laktamske antibiotike**

Za određivanje je gena koji su odgovorni za produkciju određene beta-laktamaze korištena metoda PCR-a (lančana reakcija polimerazom, engl. polymerase chain reaction). Određivanju je gena rezistencije pristupljeno korištenjem početnica (primera) u daljnjem tekstu navedenih enzima. Testirana je produkcija β-laktamaza širokog i proširenog spektra (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>PER</sub>) (62, 63,64,65,66) kao i grupe A β-laktamaza (*bla*<sub>KPC</sub>)(67), grupe B metalo-β-laktamaza (*bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>,*bla*<sub>NDM</sub>)(68) te geni za karbapenem hidrolizirajuće beta-laktamaze iz grupe D – CHDL (*bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-40-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, *bla*<sub>OXA-143-like</sub>)(69). Dodatno je učinjen i PCR-mapping kako bi se otkrila eventualna prisutnost insercijske sekvencije IS*Aba*1 koja je odgovorna za jaču ekspresiju *bla*<sub>OXA51-like</sub> gena. U metodi PCR mapping za određivanje položaja insercijske sekvence koristili smo početnice za IS*Aba*1 u kombinaciji s forward i reverse početnicama za *bla*<sub>OXA51</sub> gen i za *bla*<sub>OXA23</sub> gen (70).

Pri izvođenju PCR-a korišteni su referentni sojevi pozitivni na SHV-1, SHV-2, TEM-1, CTX-M-15, IMP-1, VIM-1, KPC-2, OXA-23, OXA-40, OXA-58 i OXA-143 β-laktamaze.

##### **4.4.1. Provedba PCR-a**

Master mix za PCR je pripreman u volumenu od 50 μl (25μl master mix-(Roche), 20μl vode, 1μl svake početnice i 3 μl DNA uzorka. Uvjeti su amplifikacije ovisili o korištenim početnicama (71, 72, 73).

#### **4.5. Detekcija plazmida**

Za otkrivanje prenosivosti gena rezistencije na karbapeneme upotrijebljena je metoda konjugacije u bujonu s *E.coli* J65 rezistentnom na natrijev azid (74). Transkonjuganti su selekcionirani na podlozi koja sadržava imipenem (10mg/L) i natrijev azid (100mg/L). S

obzirom da konjugacija teško uspijeva u nefermentativnih bakterija prijenos rezistencije na imipenem je testiran i metodom transformacije. U slučaju pozitivnosti testa plazmidi su ekstrahirani Quiagen mini kit-om po uputama proizvođača te potom podvrgnuti pokušaju transformacije referentnim sojem *A.baumannii* ATCC 19606 (75). Metoda je PCR tipiziranja replikona (PBRT) odabrana za tipiziranje plazmida koji nose gene rezistencije na karbapeneme kod *A.baumannii* (76). U pododlomku je 4.5.1. detaljno opisan postupak testa konjugacije.

#### 4.5.1. Test konjugacije

Pri provedbi se testa prvi dan zasijava donor i recipijent soj, svaki posebno u 5 ml tripton soja ili Brain-Heart infuzijskog bujona i inkubira preko noći na 37°C uz tresenje. Drugi se dan u 5 ml bujona zasijava 100 µl soja recipijenta i 50 µl donorskog soja u istu epruvetu i inkubira stacionarno na 37°C. Hranjive se podloge pripremaju jedan dan prije pokusa i drže se na +4°C. Hranjive su podloge korištene u testu Mc Conkey agar s dodatkom meropenema (10mg/L), Mc Conkey agar s dodatkom natrijevog azida - 100 mg/L, Kombinirana ploča-meropenem (10mg/L) i Na azid (128 mg/L). Meropenem treba pustiti da se sam otopi bez dodavanja natrijeve lužine. Na azid se otapa u vodi. Treći se dan razrjeđuje soj donor do 10<sup>-8</sup> (100 µl prekončne kulture + 9.99 ml fiziološke otopine, to je 10<sup>-2</sup>) od toga 100 µl razrijeđenja + 9.9 ml fiziološke otopine, to je 10<sup>-4</sup>, itd do 10<sup>-8</sup>. Na isti se način razrjeđuje i mating mixture (donor + recipijent) do 10<sup>-4</sup>. Donor se zasijava u razrijeđenju 10<sup>-6</sup> i 10<sup>-8</sup> na podlogu s ceftazidimom i nerazrijeđena kultura na podlogu s natrijevim azidom. Mating se mixture (mješavina donora i recipijenta) zasijava kao nerazrijeđena prekončna kultura te razrijeđenja 10<sup>-2</sup> i 10<sup>-4</sup> na podlogu meropenem + Na azid. Razrijeđenje se od 10<sup>-8</sup> zasijava posebno na podlogu s meropenemom i na podlogu s natrijevim azidom da se utvrdi jesu li se donor i recipijent dobro umnožili. Recipijent se zasijava u razrijeđenju od 10<sup>-6</sup> i 10<sup>-8</sup> na podlogu s natrijevim azidom i kao nerazrijeđena kultura na podlogu s meropenemom. Donor ne bi smio porasti na podlozi s Na azidom, a recipijent na podlozi s meropenemom. Zatim se broje kolonije. Frekvencija se konjugacije računa tako da se broj stanica traskonjuganta koji

je porastao na kombiniranoj ploči dijeli sa brojem stanica donora na ploči s meropenemom. Transkonjugantima se testira osjetljivost na ne  $\beta$ -laktamske antibiotike (tetraciklin, kloramfenikol, gentamicin, kotrimoksazol). Recipijent je laktoza pozitivan i rezistentan na natrijev azid. Transkonjugant može pokupiti gen za razgradnju laktoze od donora i biti laktoza pozitivan tako da se provodi biokemijska potvrda soja. Transkonugant je *E. coli* pa mora biti indol pozitivan za razliku od donora.

#### 4.5.2. Test transformacije

Za pokus je transformacije ekstrahiran plazmid pomoću Qiagen mini kit-a. Plazmid je prenešen u suspenziju *A.baumannii* 16909 soja koji je prethodno tretiran kalcijevim kloridom kako bi mogao primiti plazmid. Transformanti su selekcionirani na podlozi koja sadržava imipenem(10mg/L)(77).

### 4.6. Genotipizacija sojeva

Za genotipizaciju su sojeva u ovom radu korištene metode rep-PCR (PCR s ponavljajućim palindromskim sekvencama) za 10 izolata (1, 2, 4, 5, 17, 41, 42, 43, 44, i 45) i PFGE (elektroforeza u pulsnom električnom polju) za 11 izolata (1, 2, 4, 5, 11, 17, 41, 42, 43, 44 i 45). Sekvencijske su grupe *A.baumannii* (SG 1-3) određene metodom po Turtonu et.al. i označene kao međunarodne klonalne linije (ICL I-III).(68). Sedam je izolata (1, 2, 41, 42, 43, 44 i 45) tipizirano i MLST metodom po protokolu dostupnom na internetskoj stranici Pasteurovog instituta (78).

#### 4.6.1. Metoda PFGE

Elektroforezom u pulsnom električnom polju se primjenom izmjenične struje elektroforezom u agaroznom gelu razdvaja bakterijska DNA. Značajno je za ovu metodu precizno razdvajanje bakterijske DNA po veličini koja je prethodno pocijepana restrikcijским enzimima specifičnim za vrstu, nakon što je stanica lizirana i DNA izolirana. Naknadno se fragmenti boje etidijevim bromidom i vizualiziraju pod UV lampom. Kao kontrole se koriste DNA ladderi poznatih veličina fragmenata. U nastavku je prikazana izvedba genotipizacije sojeva PFGE-om (79, 80, 81).

4.6.1.1. Izdvajanje kromosomske DNA iz pripremljenih bakterijskih sojeva: Od prekonoćne se kulture *A.baumannii* na krvnom agaru mikrobiološkom ušicom pokupi 2-3 kolonije te razmuti u 5mL BH ekstrakta. Zatim se vrši inkubacija u vodenoj kupelji pri 37°C do kasne logaritamske faze rasta ( $10^9$  na 9 CFU/mL). 0,7 mL se prekonoćne suspenzije stanica centrifugira na 10000 okretaja u 1,5mL kivetama. Time se stanice peletiraju, a supernatant se odbaci te se ispeletirane stanice isperu s 1 mL pufera (0,1 M TrisCl; 0,1 M NaCl; 0,1 M EDTA pH 8 ). Postupak se ponavlja za svaki soj.

#### 4.6.1.2. Uklapanje u agarozu

Pripremljene isprane stanice iz prethodnog odlomka se resuspendiraju u 300  $\mu$ L EC pufera. Pripremljena suspenzija se zagrijava na 45°C te se dodaje 10  $\mu$ L lizozima. Kratko se izmiješa vibromikserom i doda 300  $\mu$ L 1,7 % LGP agaroze (low gelling agarose, agarozna koja skrtnjava pri niskim temp.) u EC puferu na 56°C. Kratko se homogenizira i uklopi u kalupe za formiranje agaroznih blokova zapremnine 100  $\mu$ L. Nakon što se skrtnu blokovi se inkubiraju 1 sat na 37° C potpuno uronjeni u 3 mL ESP pufera (sadrži EDTA, Na laurilsarkozin i proteinazu K) da se stanične stijenke liziraju. Zatim se ista količina pufera zamijeni TE puferom te se blokovi drže još 1 sat na 55°C. Pri završetku se inkubacije agarozni blokovi tri puta ispiru u 3 mL svježeg priređenog TE pufera. Završno se ispiru tri puta s 5mL destilirane vode po 30 minuta na 4°C. Čuvaju se na 4° C do cijepanja restriktivnim endonukleazama (do nekoliko mjeseci uz učestalo ispiranje u TE puferu).

#### 4.6.1.3. Cijepanje restriktivnim endonukleazom XbaI

Prije postupka cijepanja DNA restriktivnim enzimom potrebno je agarozne blokove s kromosomskom DNA još dva puta ispirati u TE puferu, a zatim se 4 puta ispiru u destiliranoj vodi pri temperaturi od 4°C, 30 minuta po svakom ispiranju. Nakon toga se blokovi tijekom 30 minuta uravnoteže u 300  $\mu$ L restriktivnog pufera. Intaktna se kromosomska DNA cijepa u mikrokiveti volumena 200  $\mu$ L restriktivnim enzimom Apa-I (enzimi restriktivne endonukleaze koje „rijetko“ cijepaju, Sigma, St. Louis USA ). Smjesa za cijepanje sadrži 2  $\mu$ L (10 jed.enzima na 1  $\mu$ L) enzima Apa-I, 20  $\mu$ L pufera i restriktivne enzime, 178  $\mu$ L vode.

Inkubacija traje tri sata uz lagano miješanje od 15 okretaja u minuti i temperaturi od 25° C. Nakon toga se blokovi, koji sadrže pocijepanu DNA, ulože u jažice gela 1 % - tne agaroze za elektroforezu u pulsnom el. polju i preliju s 0,7 % LGP agarozom.

#### 4.6.1.4. Elektroforeza fragmenata DNA u pulsnom el.polju

Elektroforeza je u gelu pod utjecajem izmjeničnog električnog polja izvedena u aparatu CHEFF- Dr III system (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

1 %-tni agarozni gel u TBE puferu (s dodatkom tiouree 50 mmol/dm<sup>3</sup>) služio je kao podloga za razdvajanje kromosomskih DNA fragmenata. U jažicama su gela smješteni blokovi kromosomske DNA i blokovi s molekularnim standardom (lambda konkatameri). Blokovi su impregnirani 0,6% agarozom na 50°C. Gel je s impregniranim blokovima agaroze postavljen u pufer i uravnotežen na sobnu temperaturu 5 min prije početka elektroforeze. Trajanje je elektroforeze *A.baumannii* 21 sat, u početku je vrijeme pulsiranja 1 sekunda, završno 20 sekundi, jakost el. polja 6 V/cm, kut pulsiranja 120°C, temperatura 14°C. Pri završetku se pristupi bojenju gelova u otopini etidijevog bromida konc. 1µg/mL 30 minuta s 20min intervalima odbojavanja u destiliranoj vodi. Vizualizirani su pod UV svjetlom od 256 nm uz narančasti filter te fotografirani, a fotografije su pohranjene komp. programom GelCompar (Applied Maths, Ghent, Belgija). Istim su računalnim programom izrađeni dendrogrami testiranih sojeva (vidjeti u pogl. rezultati) (82, 83).

#### 4.6.2. Metoda rep-PCR

Molekularno se tipiziranje metodom rep-PCR provodi izolacijom DNA Ultra-Clean microbial DNA isolation kit-om (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) po uputama proizvođača. Koncentracija se DNA drži između 25 i 30 ng/L, a amplifikacija DNA Bacterial fingerprinting kit-om (Bacterial barcodes, bioMerieux, Athens,GA, USA) također po uputama proizvođača. Podatci su obrađeni DiversiLab softverskim paketom. Kao klon se definiraju sojevi s graničnom vrijednosti podudarnosti od 97% (84).

#### 4.6.3. Metoda MLST



Metoda se bazira na amplifikaciji DNA sekvenci kromosomskih (housekeeping) gena. Ti geni kodiraju proteine koji imaju vitalnu funkciju za bakterijsku stanicu te su nužno prisutni u svakoj bakterijskoj stanici određene vrste. Svaki genetski fragment posjeduje različite sekvence za različite alele i time se definira sekvencijski tip. Sekvencira se sedam genskih lokusa, ukoliko je sekvenca različita smatra se drugim alelom. Budući da se radi o metodi sekvenciranja među fragmentima nema razlike u elektroforetskoj pokretljivosti. Odlična je metoda za komparaciju između laboratorija (identifikacija preko MLST web stranice)(78, 85, 86)

## **5. REZULTATI**

### **5.1. Osjetljivost na antibiotike**

Rezultati su testiranja osjetljivosti sojeva prikazani u tablici 1. po MIK 50 prijelomnim točkama po CLSI (59). Svi su sojevi osim sojeva 11 i 45 rezistentni na treću generaciju cefalosporina (CTX, CAZ, CRO), cefepim, kombinaciju piperacilina i tazobaktama, imipenem, meropenem, gentamicin i ciprofloksacin te su osjetljivi na kolistin. Samo je jedan soj bio osjetljiv na tigeciklin (tablica 1). Time su svi sojevi osim sojeva 11 i 45 opisani kao multiplo rezistentni sojevi (87).

### **5.2. Detekcija $\beta$ -laktamaza**

Bujonska dilucijska metoda s dodatkom NaCl i kloksacilina nije dovela do spuštanja vrijednosti MIK-a na imipenem i meropenem ni kod jednog ispitivanog soja. Ovaj rezultat ukazuje kako nema prisutnosti kromosomske OXA-58 niti hiperprodukcije kromosomske amp-C beta-laktamaze.

Rezultat dvostrukog disk sinergističkog testa s klavulanskom kiselinom nije ni kod jednog soja bio pozitivan. Takav rezultat testa ukazuje kako nema produkcije  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra u navedenim izolatima.

Kombinirani je disk test s EDTA bio pozitivan kod svih sojeva. Time je postavljena sumnja na produkciju klase B metalo- $\beta$ -laktamaza.

### 5.3. Molekularna detekcija gena rezistencije

Korištenjem metode lančane reakcije polimeraze za *bla*<sub>OXA</sub> gene, utvrđeno je da je u svim ispitanim sojevima prisutan *bla*<sub>OXA51-like</sub> gen, što je konzistentno s već spomenutom činjenicom kako je taj gen intrinzično prisutan u vrsti *A. baumannii*. Kod sojeva je 11 i 45 potvrđena prisutnost insercijske sekvence IS*Aba*1 neposredno prije OXA-51 gena što se smatra razlogom njihove povećane rezistencije na karbapeneme (68).

Detaljan je prikaz ostalih CHDL-a prikazan u tablici 1. Od ostalih je CHDL-a potvrđena prisutnost *bla*<sub>OXA23-like</sub> gena kod sojeva 1 i 5. 11 je sojeva bilo pozitivno na *bla*<sub>OXA-40-like</sub> gen. Kod soja 41 je sekvenciranjem *bla*<sub>OXA-40</sub> produkta utvrđen *bla*<sub>OXA-72-like</sub> gen koji je alelska varijanta *bla*<sub>OXA-40</sub> gena.

Geni za metalo-β-laktamaze (sojevi s pozitivnim kombiniranim disk testom s EDTA) i geni za beta-laktamaze proširenog spektra (sojevi s pozitivnim dvostrukim disk sinergističkim testom) nisu bili potvrđeni u testiranim sojevima (58).

### 5.4. Detekcija plazmida

Test konjugacije ni kod jednog pokušaja nije doveo do transfera rezistencije na imipenem donorskom soju *E. coli* kao ni testom transformacije s *A. baumannii* ATCC 19606. PBRT metoda za tipiziranje plazmida se pokazala pozitivnom samo kod soja 41 s produkcijom OXA-23 beta-laktamaze, a plazmid odgovara grupi 6 s genom za aci6 replikazu koja se inače nalazi na pACICU2 plazmidu (75).

### 5.5. Genotipizacija

Metodama su PFGE i rep-PCR-a opisana dva klastera s OXA-40 pozitivnim izolatima, jedan iz 2011. godine s izolatima 1, 2, 4 i 5; a drugi s kraja 2015. Godine s izolatima 42,43 i 44 (slike 2.a i 3). Izolat 17 iz 2015. pokazuje jedinstveni rep-PCR profil (slika 2.a). Po PFGE-u četiri su izolata (sojevi 11, 17, 41, 45) izdvojena kao genomski distinktna.

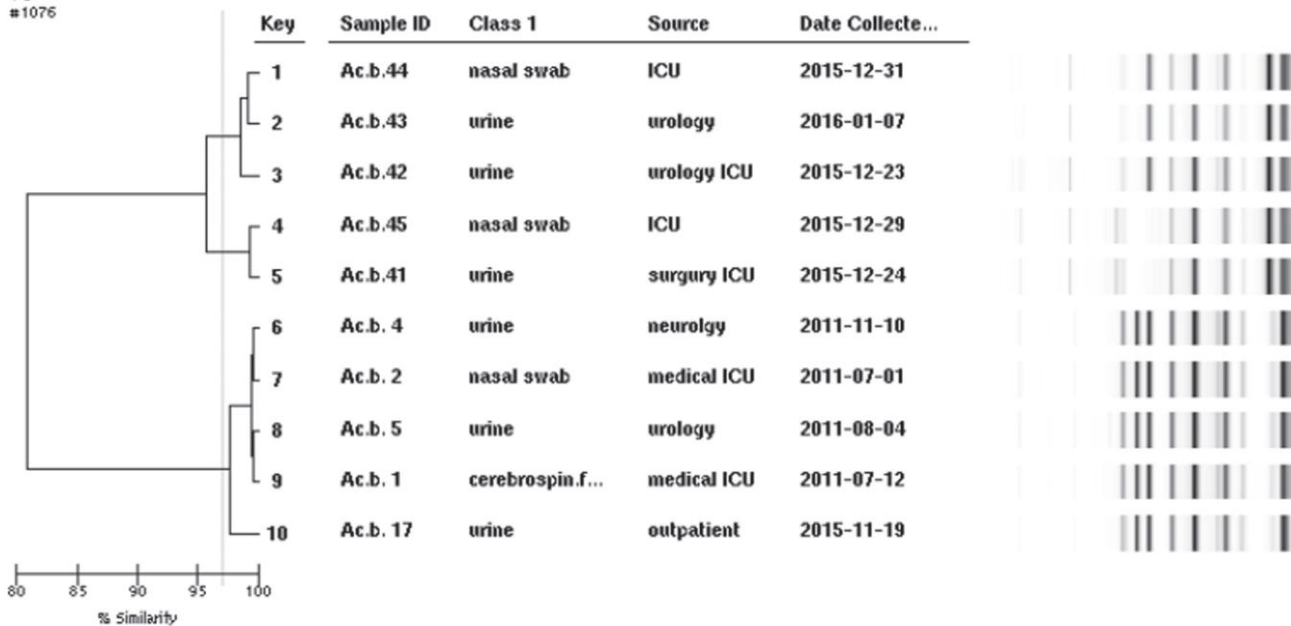
Svi izolati pripadaju IC I klonu (sekvencijske grupe 2). Međunarodni se klon I povezuje s prisutnošću bla<sub>OXA-72</sub> gena te su rezultati uspoređeni s izolatima iz studije s epidemijom s dokazanim OXA-72-pozitivnim sojevima *A.baumannii* u Zagrebu. (88). Usporedba je pokazala 97%-tnu sličnost sojeva u ovom radu sa sojevima iz 2011. g. (slika 2.b).

Metodom je MLST-a određena pripadnost sojeva 1 i 2 iz 2011. godine sekvencijskom tipu ST642 te pet sojeva iz 2015. godine (sojevi 41, 42, 43, 44 i 45) sekvencijskom tipu ST636.

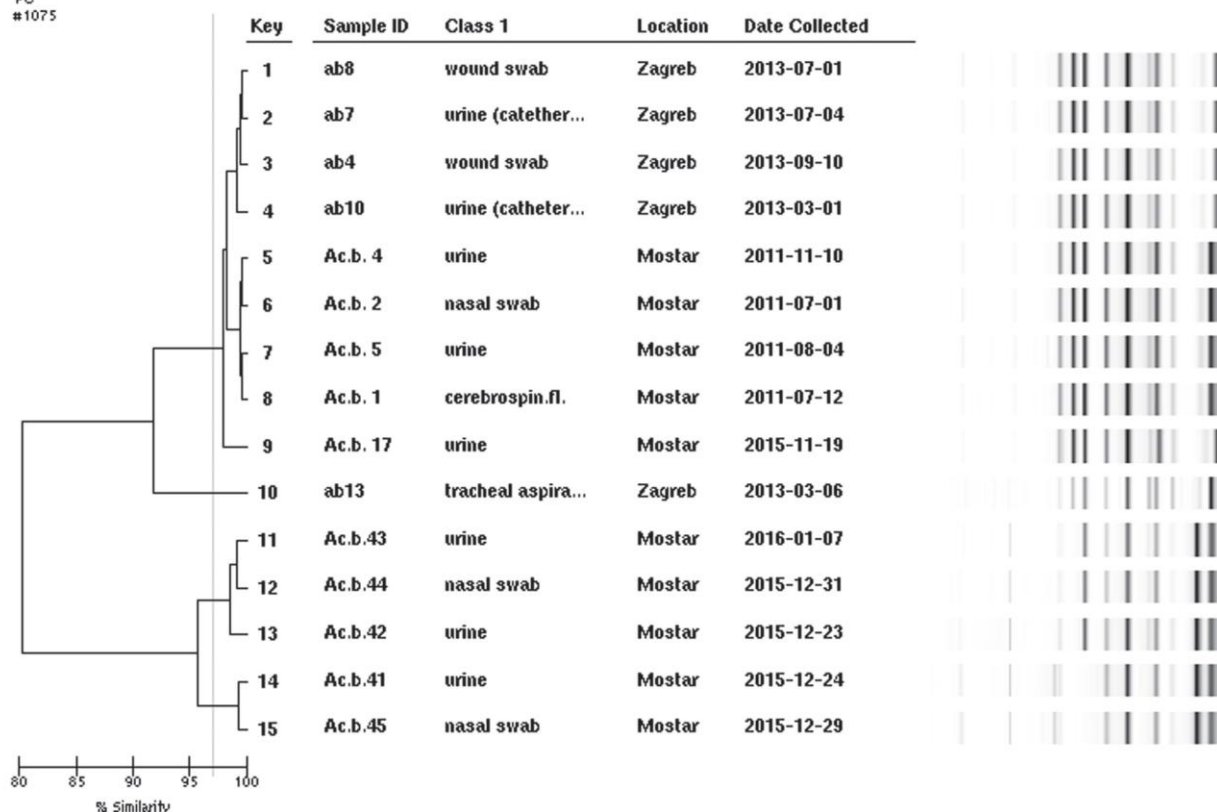
Tablica 1. Osjetljivost na antibiotike, vrste prisutnih  $\beta$ -laktamaza i genotipovi sojeva.

Broj soja	Datum izolacije uzročnika	Dijagnoza	Bolnički odjel	Uzorak	TZP	CAZ	CTX	CRO	FEP	IMI	MEM	SAM	GM	AMI	CIP	COL	TIG	Prisutne beta-laktamaze	Rep-PCR, PFGE cluster, ST
1 (492948)	12.07.2011.	Politrauma	Kirurška JIL	Likvor	8	>128	>128	>128	32	16	64	16	32	4	64	0,25	1	OXA-40, ISAba1-OXA-51	I, A, ST 642
2 (485559)	01.07.2011.	Politrauma	Kirurška JIL	Bris nosa	>128	>128	>128	>128	64	>128	64	32	>128	64	64	0,25	1	OXA-40, ISAba1-OXA-51	I, A, ST 642
4 (571785)	10.11.2011.	Cerebrovaskularni infarkt	Neurologija	Urin	64	>128	>128	>128	32	32	64	8	32	64	64	0,5	2	OXA-40, ISAba1-OXA-51	I, A
5 (506609)	04.08.2011.	Karcinom mokraćnog mjehura	Urologija	Urin	64	>128	>128	>128	32	16	128	4	64	32	>128	0,25	1	OXA-40, ISAba1-OXA-51	I, A
11 (735411)	10.11.2015.	ND	Izvanbolnički	Urin	32	>128	>128	>128	32	8	8	4	>128	8	>128	0,5	1	ISAba1-OXA-51	ND, S
17 (796920)	19.11.2015.	ND	Izvanbolnički	Urin	>128	>128	>128	>128	32	32	128	8	32	4	64	0,25	0,5	OXA-40, ISAba1-OXA-51	S, S
28 (805201)	24.11.2015.	Haematoma intracerebri	JIL	Tubus	32	>128	>128	>128	32	32	64	4	4	8	32	1	0,5	OXA-40, ISAba1-OXA-51	NT
41 (827823)	24.12.2015.	politrauma	Kirurška JIL	Urin	>128	>128	>128	>128	16	32	16	8	>128	64	>128	0,25	1	ISAba1-OXA-23, ISAba-OXA-51	II, S, ST636
42 (828134)	23.12.2015.	Karcinom mokraćnog mjehura	Urološka JIL	Urin	>128	>128	>128	>128	64	32	32	32	>128	64	>128	0,12	0,25	OXA-40, ISAba1-OXA-51	II, B, ST636
43 (836524)	07.01.2016.	Karcinom prostate	Urologija	Urin	>128	>128	>128	>128	64	>128	>128	16	>128	64	>128	0,25	2	OXA-40, ISAba1-OXA-51	II, B, ST636
44 (833836)	31.12.2015.	Koma, pneumonia lat. dex.	JIL	Bris nosa	>128	>128	>128	>128	16	>128	>128	16	>128	>128	>128	0,12	4	OXA-40, ISAba1-OXA-51	II, B, ST636
45 (833828)	29.12.2015.	Coma cerebri, insuf. renalis	JIL	Bris nosa	32	>128	>128	>128	16	0,5	1	4	4	8	>128	0,25	1	ISAba1-OXA-51	II, B, ST636

Diversilab v3.6  
PC  
#1076



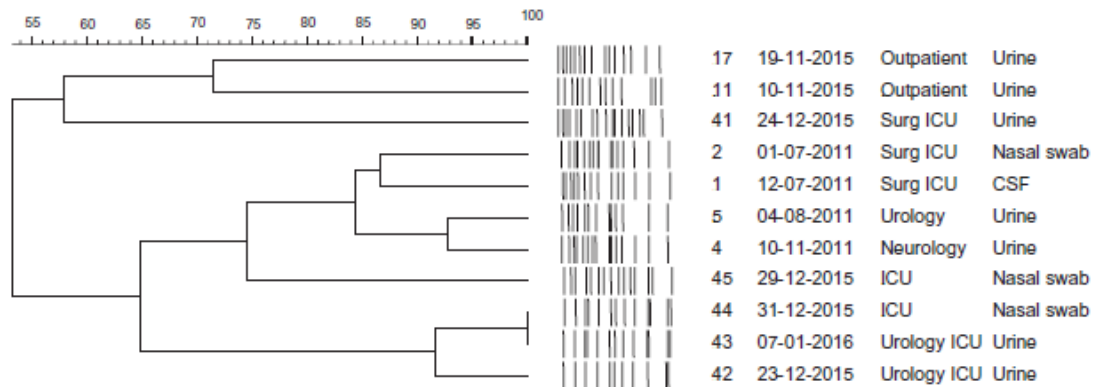
Diversilab v3.6  
PC  
#1075



Slika 2.a. rep-PCR dendrogram deset reprezentativnih izolata. Prikazane su vrste uzoraka, bolnički odjel i datum prikupljanja. Granična je vrijednost od 97% sličnosti među izolatima uzeta kao definicija klona. Vidljiva je prisutnost dva klastera. 2.b. Usporedba rep-PCR profila izolata iz Mostara s onima iz Zagreba (88)

Dice (Opt:3.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
PFGE01

PFGE01



Slika 3. PFGE dendrogram 11 *A.baumannii* izolata iz dva vremenska razdoblja. Vrijednost je od 80% sličnosti uzeta kao definicija klona. Prikazani su datumi prikupljanja, bolnički odjeli i vrste uzoraka. Vidljiva je prisutnost dva klastera.

## 6. RASPRAVA

Rezistencija se *A.baumannii* na karbapeneme dosada povezivala na pojačanu ekspresiju intrinzične OXA-51  $\beta$ -laktamaze postojanjem insercijske sekvencije IS $Aba1$  ispred spomenutog gena.(89,68). U ovom je radu osim spomenutog mehanizma rezistencije utvrđena prisutnost karbapenem hidrolizirajuće klase D  $\beta$ -laktamaza (CHDL). Radi se o OXA-23 te o OXA-72 (alelska varijanta OXA-40 grupe enzima)  $\beta$ -laktamazama (33,34,47,48).

OXA-23 nađena je u samo 1 izolatu. U svijetu je prvi put opisana 1993. godine u Ujedinjenom Kraljevstvu (90). Grupa je prethodno opisana u u susjednoj Republici Hrvatskoj multicentričnom studijom 2009-2010.(91) te u studiji prevalencije karbapenem rezistentnih *A.baumannii* u staračkom domu u Zagrebu (88).

Nađena OXA-72 beta-laktamaza pokazuje visok stupanj aktivnosti prema karbapenemima. Isti je tip enzima nađen i u izolatima gore spomenute studije prevalencije karbapenem rezistentnih *A.baumannii* u staračkom domu u Zagrebu te u dvije kliničke bolnice u Hrvatskoj (88,92,93).

Utvrđeno je da jedini izolat s plazmidno smještenim bla<sub>OXA-23</sub> genom pokazuje slabiju rezistenciju na karbapeneme u usporedbi sa sojevima s bla<sub>OXA-40-like</sub> genima.

Genotipskim je analizama utvrđeno postojanje dviju klonalnih grupa OXA-40-like pozitivnih izolata. Jedna su grupa izolati iz 2011. Godine, a druga oni iz 2015. i 2016. Godine. Objašnjenje ovakve genetske sličnosti se može naći u kratkom vremenskom razdoblju prikupljanja uzoraka gdje je moglo doći do ukrižene infekcije/kolonizacije. Nadalje, izolati s prisutnošću OXA-72 beta-laktamaze prikupljeni 2011. godine pokazuju genotipsko grupiranje sa sojevima u staračkim domu u Zagrebu prikupljenima 2012. godine (88). Uspjeh proširenosti ovog klona nije jasan, kao ni mogući transfer između pacijenata. Također nije razjašnjena mogućnost okolišnog izvora sojeva obzirom na veliku otpornost *A.baumannii* na okolišne čimbenike. Obzirom na nedostatak epidemioloških podataka, moguć je i neovisan nastanak klonova iz 2011. godine.

Zlatnim se standardom za genotipizaciju *A.baumannii* smatra metoda PFGE. Primjer su bolje diferencijacije sojeva PFGE-om u odnosu na rep-PCR sojevi 41( s potvrđenim inc.6 plazmidom po PBRT) i 45, koji su PFGE metodom razvrstani kao zasebni sojevi. Metoda rep-PCR sparuje navedene sojeve te je u tom pogledu manje diskriminatorna. Rezultati se metode PFGE s druge strane ne mogu dobro uspoređivati obzirom na tehničku izvedbu. Bez obzira na spomenute nedostatke obje su metode pokazale dobru korelaciju rezultata tipizacije s genima za karbapenemaze. Metoda je rep-PCR kao i metoda MLST bolje primjenjiva u istraživanju međunarodnog širenja klonova kao i za interlaboratorijsku usporedbu, a metoda je PFGR idealna za praćenje epidemija svakog pojedinačnog centra.

Nadalje, obzirom na pripadnost međunarodnim klonovima svi su sojevi pripali klasi IC I (94,95).

Što se tiče sevencijskih tipova, tipu ST642 određeni su sojevi 1 i 2 iz 2011. godine s prisutnošću OXA-40 β-laktamaze. Svi izolati iz 2015. godine pripadaju tipu ST636 što upućuje na prisustvo nove klonalne linije. Čak su i sojevi pozitivni na OXA-40 β-laktamazu pripadali drugom sekvencijskom tipu što ukazuje na pripadnost drugoj populacijskoj skupini bakterija bez obzira na genski profil rezistencije.

Iz perspektive podrijetla uzoraka multiplo rezistentnih *A.baumannii* uočljivo je kako većina uzoraka potječe s bolničkih odjela te očekivano više onih vezanih uz invazivnije terapijske zahvate (tablica 1). Značajan je i potencijalno zabrinjavajuć podatak o izvanbolničkom podrijetlu MDR-*A.baumannii* (96).

Ispitivanjem metalo- $\beta$ -laktamaza dvostrukim disk testom s EDTA došlo je do lažno pozitivnih rezultata. Budući da niti kod jednog soja nije pronađena  $\beta$ -laktamaza klase B pozitivnost testova se objašnjava inaktivacijom oksacilinaza EDTA-om i time proširivanjem inhibicijske zone oko diskova (97).

Uzorci iz Bosne i Hercegovine, epidemiološki značajnog područja s velikim protokom i miješanjem populacije, zanimljivi su za proučavanje multirezistentnih bakterijskih sojeva. Kao mjere koje bi pomogle sprječavanju daljnjeg širenja *A.baumannii*, iznimno važnog bolničkog patogena, smatraju se bolja organizacija i primjena bolničke higijene te programi praćenja antibiotske rezistencije kao i restriktivnije korištenje antibiotika (102).



## 7. ZAKLJUČCI

1. Utvrđena je pojava OXA-23 i OXA-40 karbapenem hidrolizirajućih oksacilinaza, prvi puta u izolatima iz Bosne i Hercegovine
2. Multiplo rezistentni sojevi u ovom radu se povezuju s posjedovanjem gena za OXA-23 ili OXA-40-like beta-laktamaze.
3. Sojevi koji su imali samo kromosomski genom za OXA-51 beta-laktamazu i insercijsku sekvencu IS*Aba*1 ispred gena nisu pokazali fenotip multiplo rezistentnog *A.baumannii*.
4. OXA-40 pozitivni izolati su bili genetski srodni, a također su pokazivali srodnost i s OXA-40 pozitivnim izolatima iz Hrvatske.

## **8. ZAHVALE**

Zahvaljujem prof.dr.sc. Branki Bedenić na nesebičnom trudu omogućujući mi praktičan i znanstveni rad u mikrobiološkom laboratoriju zadnje tri godine mog školovanja na Medicinskom fakultetu. Također joj zahvaljujem na pruženoj pomoći i podršci oko diplomskog rada.

Zahvaljujem ing. Stjepanu Katiću na pomoći i podršci.

Zahvaljujem svojim roditeljima, Ani i Dariju, bez čije emocionalne, moralne i financijske podrške moj entuzijizam za izvannastavni laboratorijski rad možda ne bi uspio zaživjeti.

## 9. LITERATURA

1. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9:148-65.
2. Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 868-73.
3. Vila J, Marti S, Sanchez-Cespedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2007; 59: 1210-5.
4. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. 2010. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. Int J Med Microbiol 300:371–379. doi:10.1016/j.ijmm.2010.04.005.
5. Livermore D, Woodford N. The  $\beta$ -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Trends in Microbiology 2006; 14:413-420.
6. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:1211-33.
7. Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. Clin Infect Dis 1997; 24 (Supl.1): 19-45.
8. Ambler PR, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M i sur. A standard numbering scheme for the class A  $\beta$ -lactamases. Biochem J 1991; 276: 269-70.
9. Ambler RP. The structure of  $\beta$ -lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1980; 289: 321-31.
10. Durante-Mangoni, E., Utili, R., Zarilli, R., Combination therapy in severe *Acinetobacter baumannii* infections: an update on the evidence to date. Future Microbiol 9 2014. (6), 773–789.

11. Larson EL. Persistent carriage of gram-negative bacteria on hands. *Am J Infect Control* 1981;9:112-9
12. Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS ONE* 2010;5(4): e10034 doi:10.1371.
13. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microb Infect* 2006; 12: 826-36.
14. Bedenić B, Randegger C, Stobberingh E, Haechler H. Molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains, isolated in Zagreb, Croatia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20:505-508.
15. Ambler PR, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M i sur. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J* 1991; 276: 269-70.
16. Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G i sur. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2265-9.
17. Naas T, Coignard B, Carbonne A i sur. VEB-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1214-22.
18. Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, Degheldre Y, Glupczynski Y, Nordmann P. Emergence of PER and VEB extended-spectrum beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:178-82.
19. Jacoby GA.  $\beta$ -Lactamase nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:1123-1129.

20. Robledo Ie, E.E. Aquino, M.I. Sante, J.L. Santana, D.M. Oterko, C.F. Leon, and G.J. Vazqueiz. 2010. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 43:1354-1357
21. Cornaglia G, M. L. Riccio, A. Mazzariol, A, Lauretti L, Fontana R, Rossolini GM. Appearance of IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase in Europe. *Lancet* 1999. 353:899-900.
22. Hrabak J., M. Stolobova, V. Studentova, M. Fridrichova, E. Chudackova, and H. Zemlickova. 2012. NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient repatriated to the Czech Republic from Egypt, July 2011. *Euro. Surveill.*
23. Perilli M., C. Pelegrini, G. Calenza, B. Segatore, and G. Amicosante. 2011. First report from Italy of *bla*<sub>VIM-1</sub> and *bla*<sub>TEM-1</sub> genes in *Pseudomonas putida* and *Acinetobacter baumannii* isolated from wastewater. *J. Chemother.* 23:181-2
24. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, et al. Convenient test for screening metallo- $\beta$ -lactamase producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000;38:40–3.
25. Lee, K., Jum, J.H., Yong, D., Lee, H.M., Kim, H.D., Docquier, J.D., Rossolini, G.M., Chong, Y., 2005. Novel acquired metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*(SIM-1) in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4485–4491.
26. Gallant CV, Daniels C, Leung JM i sur. Common  $\beta$ -lactamases inhibit bacterial biofilm formation. *Mol Microbiol* 2005 ; 58: 1012-24.
27. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$  - lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1211-33.
28. Brown, S., Amyes, S., 2006. OXA  $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter*: the story so far. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 1–3.

29. Fisher J.F., Meroueh S.O., Mobashery S. Bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics: Compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem. Rev.* 2005;105:395–424. doi: 10.1021/cr030102i.
30. Walther-Rasmussen J., Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* . 2006;57:373–383.
31. Heritier C, Poirel L, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D, Nordmann P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4174-9.
32. Paton R., Miles R.S., Hood J., Amyes S.G. ARI 1:  $\beta$ -Lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 1993;2:81–87. doi: 10.1016/0924-8579(93)90045-7.
33. Lu, P., Doumith, M., Livermore, D.M., Chen, T.P., Woodford, N., 2009. Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 641–647.
34. Werneck, J.S., Picao, R.C., Carvalhaes, C.G., Cardoso, J.P., Gales, A., 2011. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. *J. Antimicrob. Chemother.* 66 (2), 452–454.
35. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:24–38.
36. OXA-type  $\beta$ -Lactamases. [(accessed on 30 June 2014)]. Available online: <http://www.lahey.org/Studies/other.asp>.
37. Franolić-Kukina I, Bedenić B, Budimir A, Herljević Z, Vraneš J, Higgins P. Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-72 positive *Acinetobacter baumannii* in a Croatian university hospital. *International Journal of Infectious Diseases* 2011;15:e706-e709.
38. Higgins PG, Perez-Llarena FJ, Zander E, Fernandez A, Bou G, Seifert H. 2013. OXA-235, a novel class D  $\beta$ -lactamase involved in resistance to carbapenems in

- Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 57:2121–2126.  
doi:10.1128/AAC.02413-12.
39. Higgins, P., Poirel, L., Lehmann, M., Nordmann, P., Seifert, H., 2009. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 53 (12), 5035–5038.
40. Nuno T. Antunes<sup>\*</sup> and Jed F. Fisher. Acquired Class D  $\beta$ -Lactamases, Antibiotics (Basel). 2014 Sep; 3(3): 398–434. Published online 2014 Aug 21. doi: 10.3390/antibiotics3030398
41. Barnaud, G., Zihoune, N., Ricard, J.D., Hippeaux, M.C., Eveillard, M., Dreyfuss, D., Branger, C., 2010. Two sequential outbreaks caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 and OXA-72 oxacillinase in an intensive care unit in France. J. Hosp. Infect. 76, 358–360.
42. Coelho, J.M., Turton, J.F., Kaufmann, M.E., Glover, J., Woodford, N., Warner, M., Palepou, M.F., Pike, R., Pittm, T.L., 2006b. Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. J. Clin. Microbiol. 44 (10), 3623–3627.
43. Correa, A., Del Campo, R., Escandón-Vargas, K., Perenguez, M., Rodríguez-Baños, M., Hernández-Gómez, C., Pallares, C., Perez, F., Arias, C.A., Cantón, R., Villegas, M.V., 2017 Jun 1. Distinct genetic diversity of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Colombian hospitals. Microb. Drug Resist. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2016.0190>.
44. Dortet, L., Bonnin, R.A., Girlich, D., Imanci, D., Bernabeu, S., Fortineau, N., Naas, T., 2015. Whole genome sequence of a European clone II and OXA-72 producing *Acinetobacter baumannii* strain from Serbia. Genome Announc. 3 (6) (3190–15).
45. Lee, K., Kim, M.N., Choi, T.Y., Cho, S.E., Lee, S., Whang, D.H., Yong, D., Chong, Y., Woodford, N., Livermore, D.M., KONSAR Group, 2009. Wide dissemination of OXA type carbapenemases in clinical *Acinetobacter spp.* Isolates from South Korea. Int. J. Antimicrob. Agents 33, 520.

46. Esther Zander, Harald Seifert, Paul G. Higgins, *Antimicrob Agents Chemother.* Effects of Saline, an Ambient Acidic Environment, and Sodium Salicylate on OXA-Mediated Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*, 2016 May 23;60(6):3415-8. doi: 10.1128/AAC.03010-15. Print 2016 Jun
47. Brown S, Amyes S. OXA  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:1-3.
48. Pournaras, S., Markogiannakis, A., Ikonomidis, A., Kondyli, L., Bethimouti, K., Maniatis, A.N., Legakis, N.J., Tsakris, A., 2006. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 557–561.
49. Massova I., Mobashery S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998;42:1–17.
50. Fisher J.F., Mobashery S. Three decades of the class a  $\beta$ -lactamase acyl-enzyme. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2009;10:401–407. doi: 10.2174/138920309789351967.
51. Golemi D., Maveyraud L., Vakulenko S., Samama J.P., Mobashery S. Critical involvement of a carbamylated lysine in catalytic function of class D  $\beta$ -lactamases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001;98:14280–14285. doi: 10.1073/pnas.241442898.
52. Maveyraud L., Golemi D., Kotra L.P., Tranier S., Vakulenko S., Mobashery S., Samama J.P. Insights into class D  $\beta$ -lactamases are revealed by the crystal structure of the OXA-10 enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure.* 2000;8:1289–1298. doi: 10.1016/S0969-2126(00)00534-7.
53. Maveyraud L., Golemi-Kotra D., Ishiwata A., Meroueh O., Mobashery S., Samama J.P. High-resolution X-ray structure of an acyl-enzyme species for the class D OXA-10  $\beta$ -lactamase. *J. Am. Chem. Soc.* 2002



54. Smith C.A., Antunes N.T., Toth M., Vakulenko S.B. The crystal structure of the carbapenemase OXA-58 from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014;58:2135–2143. doi: 10.1128/AAC.01983-13.
55. Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis* 2006;42:692-9.
56. Villegas, M. V., and A. I. Hartstein. *Acinetobacter* outbreaks, 1977– 2000. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2003;24:284–295.
57. Gouby A, Carles-Nurit MJ, Bouziges N, Bourg G, Mesnard R, Bouvet PJ. Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of hospital outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microb* 1992; 30:1588-1591.
58. Horan, T.C., Andrus, M., Dudeck, M.A., 2008. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am. J. Infect. Control* 36, 309–332.
59. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 24th Informational Supplement. M100-S24 Clinical and Laboratory Standards Institute, Supplement M100S Wayne, PA
60. Lee, K., Lim, Y.S., Yong, D., Yum, J.H., Chong, Y., 2003. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA-double- disk synergy test for differentiating metallo- $\beta$ -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *J. Clin. Microbiol.* 41, 4623–4629. Lee, K., Jum, J.H., Yong
61. Pasteran, F., Mendez, T., Guerriero, L., Rapoport, M., Corso, A., 2009. A sensitive screening test for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 47 (6), 1631–1639.
62. Nüesch-Inderbilen, M.T., Hächler, H., Kayser, F.H., 1996. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV  $\beta$ -lactamases in clinical isolates by a

molecular genetic method, and comparison with the E test. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15

63. Arlet, G., Brami, G., Decre, D., Flippo, A., Gaillot, O., Lagrange, P.H., 1995. Molecular characterization by PCR restriction fragment polymorphism of TEM  $\beta$ -lactamases. FEMS Microbiol. Lett. 134 (2–3), 203–208.
64. Woodford, N., Ward, M.E., Kaufmann, M.E., Turton, J., Fagan, E.J., James, D., Johnson, A.P., Pike, R., Warner, M., Cheasty, T., Pearson, A., Harry, S., Leach, J.B., Loughrey, A., Lowes, J.A., Warren, R.E., Livermore, D.M., 2004. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the UK. J. Antimicrob. Chemother. 54 (4), 735–743.
65. Pagani, L., Mantengoli, E., Migliavacca, R., Nucleo, E., Pollini, S., Spalla, M., Daturi, R., Romero, E., Rossolini, G.M., 2004. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in northern Italy. J. Clin. Microbiol. 42, 2523–2529.
66. Bonnin, R.A., Nordmann, P., Potron, A., Lecuyer, H., Zahar, J.R., Poirel, L., 2011. Carbapenemhydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 349–354.
67. Robledo, I.E., Aquino, E.E., Sante, M.I., Santana, J.L., Oterko, D.M., Leon, C.F., Vazquez, G.J., 2010. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp in Puerto Rico. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 1354–1357.
68. Poirel, L., Walsh, T.R., Cuveiller, V., Nordman, P., 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemases genes. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 70, 119–125.
69. Woodford, N., Ellington, M.J., Coelho, J.M., Turton, J.F., Ward, M.E., Brown, S., Amyes, S.G., Livermore, D.M., 2006. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases. Int. J. Antimicrob. Agents 27, 351–353

70. Turton, J.F., Ward, M.E., Woodford, N., Kaufmann, M.E., Pike, R., Livermore, D.M., Pitt, T.L., 2006. The role of IS*Aba*1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*, FEMS Microbiol. Lett. 258, 72–77.
71. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S i sur. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp ., Int J Antimicrob Agents 2006; 27:351-353.
72. Sykes RB, Matthew M. Detection, assay and immunology of beta-lactamases. U: Hamilton-Miller JMT, Smith JT, ur, Beta-lactamases. London: Academic Press, 1979:17-49.
73. Turton, J.F., Gabriel, S.N., Valderrey, C., Kaufmann, M.E., Pitt, T.L., 2007. Use of sequence based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. Clin. Microbiol. Infect. 13, 807–815.
74. Elwel, L.P., Falkow, S., 1986. The characterization of R plasmids and the detection of plasmid-specified genes. In: Lorian, V. (Ed.), Antibiotics in Laboratory Medicine, 2nd ed. Williams and Wilkins, New York, pp. 683–694.
75. Choi, K.H., Kumar, A., Schweizer, H.P., 2006. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. J. Microbiol. Methods 64, 391–397.
76. Bertini, A., Poirel, L., Mugnier, P., Villa, J., Nordmann, P., Caratoli, A., 2010. Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 4168–4177.
77. Elwel, Falkow, 1986, Antibiotics in Laboratory Medicine
78. <https://pubmlst.org/abaumannii/> [pristupljeno: 5.4.2018.]
79. PFGE Typing Protocol Recommended by ARPAC for *Acinetobacter baumannii*  
[www.abdn.ac.uk/arpac/](http://www.abdn.ac.uk/arpac/)

80. Gouby A, Carles-Nurit MJ, Bouziges N, Bourg G, Mesnard R, Bouvet PJ. Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of hospital outbreak of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microb 1992; 30:1588-1591.
81. Marcos MA, Jimenez de Anta MT, Vila J. Correlation of six methods for typing nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Med Microbiol 1995; 42:328-335.
82. Tenover, F., Arbeit, R., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminthan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33, 2233–2239.
83. Kaufman, M.E., 1998. Pulsed-field gel electrophoresis. In: Woodfor, N., Johnsons, A. (Eds.), Molecular bacteriology. Protocols and clinical applications, 1st edn. 33-51 Humana Press Inc. Totowa, New York.
84. Healy, M.J., Huong, J., Bittner, M., Lising, M., Frye, S., Raza, S., Schrock, R., Manry, J., Renwick, A., Nieto, R., Wood, C., Versalovic, J., Lupski, J.R., 2005. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. J. Clin. Microbiol. 43, 199–207.
85. Diancourt L, Passet V, Nemeč A, Dijkshoorn L, Brisse S., The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. PLoS One. 2010 Apr 7;5(4):e10034. doi: 10.1371/journal.pone.0010034.
86. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2005 Sep;43(9):4382-90.
87. Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Alagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson,

- D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, V., Vatsopoulos, M.J.A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281.
88. Bedenić, B., Bader, N., Godić-Torkar, K., Vranić-Ladavac, M., Luxner, J., Veir, Z., Grisold, A.J., Zarfel, G., 2015. Nursing home as reservoir of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microb. Drug Resist.* 21 (3), 270–278.
89. Ibrahimagić, A., Kamberović, F., Uzunović, S., Bedenić, B., Idrizović, E., 2017. Molecular characteristics and antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii*  $\beta$ -lactamase producing isolates, a predominance of intrinsic blaOXA-51 and detection of TEM and CTX-M genes. *Turk J. Med. Sci.* 18 (47(2)), 715–720.
90. Bergogne-Berezin E., Towner K.J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996;9:148–165.
91. Vranić-Ladavac, M., Bedenić, B., Minandri, F., Ištok, M., Frančula-Zaninović, S., Ladavac, R., Visca, P., 2014. Carbapenem-resistance and acquired class D carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* from Croatia 2009–2010. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 471–478.
92. Goić-Barišić, I., Towner, K.J., Kovačić, A., Šiško-Kraljević, K., Tonkić, M., Novak, A., Punda-Polić, V., 2011. Outbreak in Croatia caused by a new carbapenem-resistant clone of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-72 carbapenemase. *J. Hosp. Infect.* 77 (4), 368–369.
93. Franolić-Kukina, I., Bedenić, B., Budimir, A., Herljević, Z., Vraneš, J., Higgins, P., 2011. Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-72 positive *Acinetobacter baumannii* in a Croatian university hospital. *Int. J. Infect. Dis.* 15, e706–e709.
94. Healy, M.J., Huong, J., Bittner, M., Lising, M., Frye, S., Raza, S., Schrock, R., Manry, J., Renwick, A., Nieto, R., Wood, C., Versalovic, J., Lupski, J.R., 2005.

- Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *J. Clin. Microbiol.* 43, 199–207.
95. Nemeč, A., Krizová, L., Maixnerová, M., Diancourt, L., van der Reijden, T.J., Bricse, S., van den Broek, P., Dijkshoorn, L., 2008. Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 484–489.
96. Jasna Hrenovic, Goran Durn, Ivana Goic-Barisic, Ana Kovacic. Occurrence of an Environmental *Acinetobacter baumannii* Strain Similar to a Clinical Isolate in Paleosol from Croatia. *Appl Environ Microbiol.* 2014 May; 80(9): 2860–2866.
97. Vilalon, P., Valdezete, S., Medina-Pascual, M.J., Curasco, G., Vindel, A., Saez-Nieto, J.A., 2011. Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolyzing oxacillinase and metallo-beta-lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 550–553.
98. Golemi D., Maveyraud L., Vakulenko S., Samama J.P., Mobashery S. Critical involvement of a carbamylated lysine in catalytic function of class D  $\beta$ -lactamases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001;98:14280–14285. doi: 10.1073/pnas.241442898.
99. Maveyraud L., Golemi D., Kotra L.P., Tranier S., Vakulenko S., Mobashery S., Samama J.P. Insights into class D  $\beta$ -lactamases are revealed by the crystal structure of the OXA-10 enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure.* 2000;8:1289–1298. doi: 10.1016/S0969-2126(00)00534-7.
100. Maveyraud L., Golemi-Kotra D., Ishiwata A., Meroueh O., Mobashery S., Samama J.P. High-resolution X-ray structure of an acyl-enzyme species for the class D OXA-10  $\beta$ -lactamase. *J. Am. Chem. Soc.* 2002;124:2461–2465. doi: 10.1021/ja016736t.

101. Smith C.A., Antunes N.T., Toth M., Vakulenko S.B. The crystal structure of the carbapenemase OXA-58 from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014;58:2135–2143. doi: 10.1128/AAC.01983-13.
102. Bedenić B i sur. Arrival of carbapenem-hydrolyzing-oxacillinases in *Acinetobacter baumannii* in Bosnia and Herzegovina. *Infect Genet Evol.* 2018 Mar;58:192-198. doi: 10.1016/j.meegid.2017.12.021. Epub 2017 Dec 22.

## **10. ŽIVOTOPIS**

Rođen sam 1. kolovoza 1993. godine u Osijeku. Osnovnu sam školu završio u Belišću, a opću gimnaziju u Valpovu 2012. godine. Od 2008. do 2012. godine volonterski sam uključen u rad Udruge za djecu i mlade s poteškoćama u razvoju „Zvono“ u Belišću. 2012. godine sam upisao studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.