Mehanizmi rezistencije na antibiotike u bakterije Acinetobacter baumannii

Skender, Barbara

Undergraduate thesis / Završni rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:805356

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

MEHANIZMI REZISTENCIJE NA ANTIBIOTIKE U BAKTERIJE *ACINETOBACTER BAUMANNII*

MECHANISMS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN BACTERIA *ACINETOBACTER BAUMANNII*

SEMINARSKI RAD

Barbara Skender
Preddiplomski studij biologije
(undergraduate Study of Biology)
Mentor: prof.dr.sc. Jasna Hrenović
Pomoćni mentor: dr.sc. Tomislav Ivanković

Zagreb, 2012.

SADRŽAJ

UVOD 3
OPĆE KARAKTERISTIKE *A. BAUMANNII* 4
MEHANIZMI REZISTENCIJE NA ANTIBIOTIKE U *A. BAUMANNII* 5
Aminoglikozidi 5
ß-laktami 6
Enzimatski mehanizmi 6
Neenzimatski mehanizmi 8
Kinoloni 10
Polimiksini 10
Tetraciklini i glicilciklini 10
KLINIČKE MANIFESTACIJE INFEKCIJA S *A. BAUMANNII* 11
Upala pluća 11
Infekcije krvnog toka 11
Infekcija urinarnog trakta 12
Meningitis 12
MOLEKULARNE TEHNIKE ZA ANALIZU SOJEVA *A. BAUMANNII* 13
Analiza plazmida 13
Ribotipizacija 13
PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) 13
Metode tipizacije bazirane na PCR-u (eng. polymerase chain reaction) 14
AFLP metoda (eng. amplified fragment length polymorphism) 15
MLST metoda (eng. multilocus sequence typing) 15
ZAKLJUČAK 16
LITERATURA 17
SUMMARY 21

UVOD

Bakterije vrste *Acinetobacter baumannii* spadaju među jedne od najproblematičnijih bolničkih patogena. Sve veći broj bolničkih infekcija uzrokovanih sojevima vrste *Acinetobacter baumannii* uzrok je zabrinutosti znanstvenika (Slika 1). Pronađeni su sojevi ove vrste koji su rezistentni na sve do sada poznate antibiotike.

Upravo zbog toga se posebna pažnja počela posvećivati mehanizmima i načinu stvaranja rezistencije kod ovih bakterija.

Rezistentnost na antibiotike uzrok je tome da *A. baumannii* ima sposobnost preživjeti dulje vrijeme u bolničkom okruženju, te samim time ima i više mogućnosti za stvaranje infekcije. *A. baumannii* napada najosjetljivije bolesnike najčešće preko ozljeda na koži i kroz dišne putove.

Najpoznatija infekcija koju ovi organizmi uzrokuju je bolnička upala pluća, iako su u posljednje vrijeme uočene infekcije koje napadaju i središnji živčani sustav, kožu i mekana tkiva, te kosti.

U ovom radu osvrnuti ću se, osim na glavnu temu - mehanizme rezistencije, i na taksonomsku podjelu i biologiju vrste *A. baumannii*, na bolničke manifestacije infekcije, te na metode detekcije bakterije.



Slika 1. Kolnije bakterije *Acinetobacter baumannii* porasle na krvnom agaru (http://www.acinetobacter.org/)

OPĆE KARAKTERISTIKE *A. BAUMANNII*

Godine 1911. nizozemski mikrobiolog Martinus Beijerinck opisao je organizam imena *Micrococcus calcoaceticus.* Tijekom narednih desetljeća nađeni su i opisani slični organizmi koji su 1954. stavljeni u rod *Acinetobacter.* Ovo ime je predloženo da bi se razdvojili pokretni od nepokretnih mikroorganizama unutar roda *Achromobacter* (akinetos,grč.- nepokretno) (Bijernick, 1911)

Službeno je rod *Acinetobacter* priznat 1971. godine. Spada u porodicu *Moraxelacea,* red *Gammaproteobacteria,* koji obuhvaća i rodove *Moraxella, Psychrobacter* i srodne rodove (Rossau i sur., 1991)

Acinetobacter obuhvaća Gram-negativne, strogo aerobne, nepokretne i katalaza pozitivne bakterije sa sadržajem DNA G+C baza od 39% do 47%.

Dobro rastu na čvrstim medijima koji se rutinski koriste u mikrobiološkim laboratorijima. To su npr. ovčiji krvni agar ili tripton-sojin agar koji se inkubiraju na temperaturi od 37°C/24h (Garrity i sur., 2005).

Ove bakterije formiraju glatke, mukoidne, sivo-bijele kolonije (Slika 1). Ponekad kolonije kompleksa *A. calcoaeticus - A. baumannii* nalikuju kolonijama koje formiraju *Enterobacteriae:* kolonije prekonoćnih kultura su promjera 1,5-3 mm. Ali, za razliku od *Enterobacteriae,* kompleks *A. calcoaeticus- A. baumannii* ne raste na McConkey agaru. Istraživanja su pokazala da kolonije koje uzrokuju infekciju rastu u kulturama pri niskom pH, sa jakim dotokom zraka i obogaćenima acetatom ili drugim prikladnim izvorom ugljika (Baumann, 1968).

Vrste roda *Acinetobacter* smatraju se organizmima koji su sveprisutni u okolišu: od vodenih staništa, preko tla, povrća, životinja pa sve do ljudske kože.

Prema do sada rađenim istraživanjima, u Europi je postotak kliconoša *A. baumannii* razmjerno nizak. Po tome se da zaključiti da ova vrsta nije tipična sveprisutna vrsta. Podaci prikupljeni istraživanjima ne mogu potvrditi da li je infekcija koju *A. baumannii* uzrokuje potaknuta nekim vanjskim okolišnim čimbenicima. Prirodno stanište *A. baumannii* još nije definirano (Peleg et al. 2008).

MEHANIZMI REZISTENCIJE NA ANTIBIOTIKE U *A. BAUMANNII*

Broj mehanizama rezistencije koji su do sada otkriveni u vrste *A. baumannii* je velik i premašuje broj nađenih mehanizama u ostalih Gram-negativnih patogena.

A. baumannii se brzo može prilagoditi na okolišni stres. Kao dokaz tome je brzo globalno širenje sojeva rezistentnih na ß-laktame, uključujući karbapeneme. Na soju nađenom u Francuskoj (AYE), nakon provedenog sekvencioniranja genoma, nađen je, do sada najveći, 'resistance island'[1] veličine 86 kb (AbaR1). Od 88 otvorenih okvira čitanja[2] (eng. open reading frame-ORF), smatra se da ih je čak 82 podrijetlom iz drugih Gram-negativnih bakterija (npr. *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp. i *Escherichia coli)*. Od 52 gena za rezistentnost, 45 (86.5%) ih se nalazi na AbaR1 'resistance islandu' (Fournier i sur., 2006). Istraživanja ovog genoma ponudila su dokaz genetske 'promiskuitetnosti': prisutan je niz pokretnih genetskih elemenata koji potječu od različitih domaćina. Ti pokretni genski elementi uključuju transpozone, tri integrona klase 1 i 'insertion sequence' (IS) elemente. Zanimljiva je činjenica da ni jedan plazmid nije registriran na AbaR1, a plazmidi koji su pronađenu u AYE soju nemaju u sebi markere za rezistenciju. Slični 'resistance islandi' su detektirani i u drugim sojevima iz iste geografske regije, samo sa manjim brojem kilobaza. Od 22 soja čak 77% je imalo netaknut ORF za ATP-azu i fenotip otporan na antibiotike (Fournier i sur., 2006).

Aminoglikozidi

Aminoglikozidi su antibiotici koji djeluju na način da na različite načine sprečavaju sintezu proteina (http://sharepoint.zvu.hr/katedre/319/Nastavni%20matrijali/IRT%20STUDIJ/pdf.%20za%20studente%20IRT%20-MIKRO/antibiotici.pdf). U sojevima *A. baumannii* prevladavaju geni koji kodiraju enzime koji modificiraju aminoglikozide. Ti geni se nalaze u unutar integrona

[1] Resistance island- genetski lokus unutar kojeg se nalaze geni za rezistenciju (http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457906000505)

[2] Otvoreni okvir čitanja(eng. open frame reading)- slijed nukleotida(dio gena) koji kodira protein(od start do stop kodona) (http://www.scfbio-iitd.res.in/tutorial/orf.html)

klase 1. Mehanizam koji se tu javlja je metilacija[3] 16S rRNA. To onemogućava prianjanje aminoglikozida na ciljano mjesto i na taj način uzrokuje visoku rezistentnost na sve aminoglikozide koji se koriste u medicini (gentamicin, tobramicin, amikacin) (Doi i Arakawa, 2007).

ß-laktami

ß-laktamski antibiotici su skupina baktericidnih antibiotika koji djeluju tako da ometaju sintezu stanične stjenke bakterije (http://sharepoint.zvu.hr/katedre/319/Nastavni%20matrijali/IRT%20STUDIJ/pdf.%20za%20srudente%20IRT%20-MIKRO/antibiotici.pdf). Obuhvaćaju cefalosporine, peniciline, monobaktame i karbapenema. U rezistenciji na ß-laktame postoje dva tipa mehanizama: enzimatski i neenzimatski.

Enzimatski mehanizmi

Od ovog načina rezistencije prevladava enzimatska degradacija pomoću ß-laktamaze. Ali, valja naglasiti da unutar jednog fenotipa postoji više mehanizama koji 'surađuju' te na taj način razvijaju rezistenciju (Bou i sur., 2000). Ono što je jedinstveno za sve sojeve *A. baumannii* je kromosomski kodirana takozvana *Acinetobacter*-proizvedena cefalosporinaza (AmpC cefalosporinaza) (Huyer i sur., 2005). To je enzim iz skupine ß-laktamaza koji djeluje na cefalosporine- antibiotike širokog spektra otporne na penicilazu. Čimbenik koji kontrolira ekspresiju ovog enzima je IS element imena ISAba1 (Heritier i sur., 2008).

U *A. baumannii* su još pronađeni i ß-laktamati širokog spektra (ESBLs), ali detekcija i procjena njihove prave uloge je dosta otežana, pogotovo zbog prisutnosti AmpC (Peleg i sur. 2008).

Integron bla_{VEB-1} kodiran je na kromosomu i identičan je onome koji je pronađen u *Pseudomonas aeruginosa.* Povezan je sa IS26 elementom te to pokazuje moguće podrijetlo i način širenja u *A. baumannii*. Osim njega postoji i bla_{PER-1}, kromosomski ili plazmidno

[3] Metilacija- proces u kojem se na proteine, molekule DNA i slične molekule dodaju metilne grupe te se na taj način mjenja ekspresija gena, ali ne i sam gen.

kodirani integron koji sadrži IS element(ISPa12) koji pojačava njegovu ekspresiju (Grilich i sur., 2002).

Osim ESBLs-a, u *A. baumannii* postoje i ß-laktamati uskog spektra (NSBLs), ali oni nisu toliko važni jer je njihov klinički značaj limitiran drugim čimbenicima rezistencije.

Na ß-laktamate koji imaju karbapenemaznu aktivnost se obraća posebna pažnja. To su ß-laktamati koji uključuju serin oksacilinaze (Amblerova klasa[4] D OXA tip) i metalo-ß-laktamaze (MBL) (Amblerova klasa B). Do sada karbapenemaze Amblerove klase A nisu opisane u *A. baumannii* (Queenan i Bush, 2007).

Prvi identificirani OXA tip enzima sa karbapenemazno-hidroliznom aktivnošću bio je izoliran sa soja *A. baumannii* u nađenog u Edinburghu, Škotska (Paton i sur., 1993). Njega kodira plazmid i prenosiv je. Gen je kasnije sekvencioniran i nazvan bla_{OXA-23}, te on sada pridonosi rezistenciji na karbapenimide na globalnoj razini (Donald i sur., 2000). Osim ovog gena nađena je još nekolicina OXA tipa genskih klastera. Svi oni su kodirani plazmidom te se smatra da se upravo zato rezistentni sojevi toliko jako i brzo šire (Peleg i sur., 2006). Bla_{OXA-51} geni su jedinstveni i prirodno se pojavljuju u *A. baumannii.* Produkt ovog enzima ima veći afinitet za imipeneme nego za meropeneme (Heritier i sur., 2003). Njegova uloga u rezistenciji na karbapeneme je povezana sa prisutnošću ISAba1. U nedostatku ovog elementa *A. baumannii* pokazuje minimalnu osjetljivost na karbapeneme (Turton i sur., 2008).

Provedena su brojna istraživanja na bla_{OXA} genima. Na temelju tih istraživanja doneseni su sljedeći zaključci: prirodni plazmidi sa bla_{OXA} genima pokazuju veću razinu rezistentnosti nego rekombinantni plazmid u sličnim domaćinima (Heritier i sur., 2005), IS elementi su veoma važni čimbenici u stvaranju rezistencije. Oni imaju dvije važne uloge: kodiraju transpozazu- mobilni su i sadrže promotor regije koje vode do pojačane ekspresije determinanti za rezistenciju (Peleg i sur., 2008).

Metalo-ß- laktamaze nisu toliko učestale u *A. baumannii*, ali njihova hidrolitička aktivnost na karbapeneme je izrazito snažna (Poirel i Nordmann, 2006). Ovi enzimi hidroliziraju sve ß- laktamate osim monobaktama. Samo tri MBL grupe su detektirane u vrste *A. baumannii*: imipenemaze (IMP), Verona imipenemaze (VIM) (Lee i sur., 2003) i Seoul imipenemaze (SIM) (Lee i sur., 2005). MBL se najčešće nalaze unutar integrona. U skladu se time, sojevi *A. baumannii* koji imaju integrone su rezistentniji od onih sojeva koji ih nemaju (Gu i sur., 2007). Kada su izolirani, integroni nisu mobilni nego ugrađeni u plazmide ili transpozone koji služe kao genetsko 'vozilo' za širenje rezistencije (Peleg, 2008).

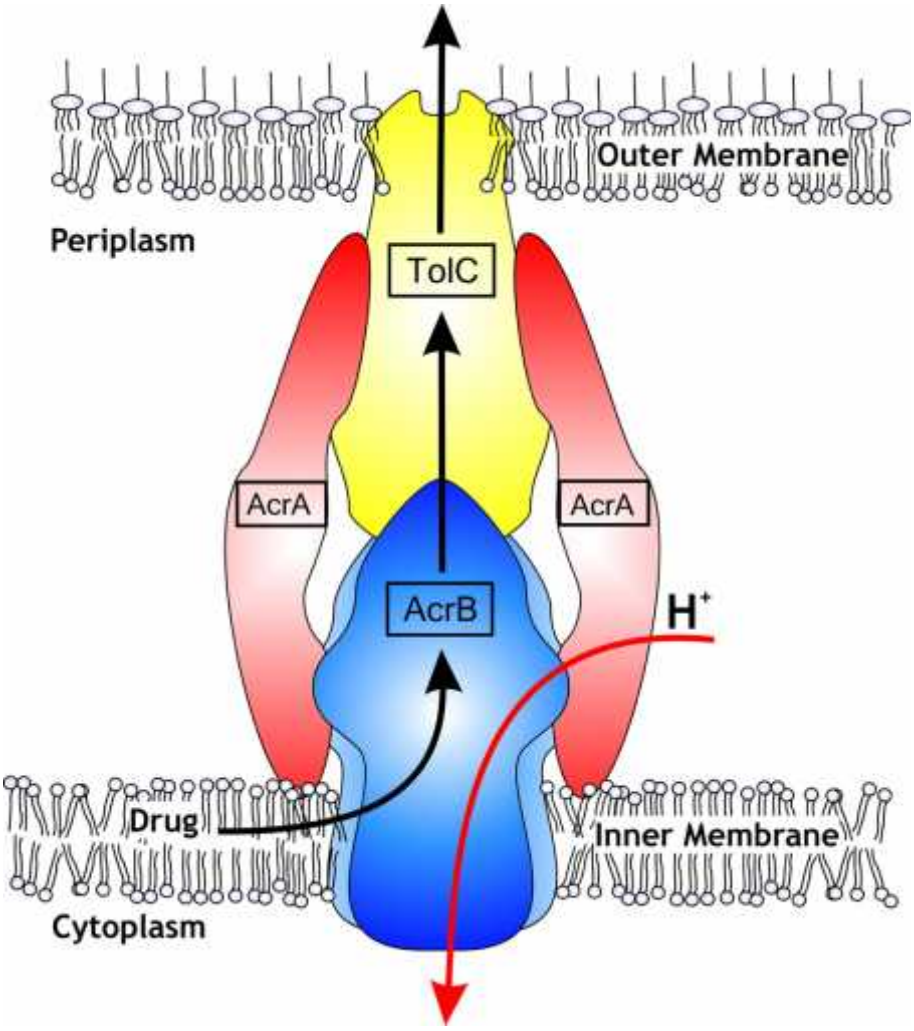
[4] Amblerova klasifikacija- podjela ß-laktamaza u 4 klase(A,B, C, D). Podjela se temelji na homologiji proteina(sličnosti aminokiselina) (Erdeljić, 2012.)

Neenzimatski mehanizmi

Ovo je drugi tip mehanizama koji uzrokuju rezistenciju na ß- laktamate. Ti mehanizmi uključuju promjene u vanjskoj membrani proteina (Bou i sur., 2000), multidrug efflux pumpe[5] (Heritier i sur., 2005), te alternacije u afinitetu ili ekspresiji proteina koji se vežu na penicilin (Fernandez-Cuenca i sur.,2003). Malo se toga zna o porinima na vanjskoj membrani *A. baumannii*. Pokazalo se da je gubitak proteina CarO povezan sa rezistencijom na imipeneme i meropeneme. Gubitak CarO porina je posljedica prekida carO gena umetanjem insercijskih elemenata (Mussi i sur.,2005). U sojeva koji su imali epidemijski učinak vanjski membranski proteini djeluju zajedno sa OXA genima ili proteinima koji su osjetljivi na toplinu. No, potrebno je provesti još istraživanja kojima bi se točno razjasnila uloga porina u rezistenciji na antibiotike (Peleg i sur., 2008).

Genom *A. baumannii* kodira široki spektar 'multidrug efflux' sistema (Fournier i sur., 2006). Najbolje proučena je AdeABC pumpa iz porodice resistance-nodulation-division (RND) pumpi (Heritier i sur., 2005). RND pumpama potrebna su dva dodatna proteina da bi mogle normalno obavljati svoju funkciju: membranski fuzijski protein te vanjsko membranski porin (Marchand i sur., 2004). AdeABC pumpa sadrži mjesto za supstrat koji može biti ß-laktamat, aminoglikozid, erirtomicin, klorafenikol, tetraciklin i etidij bromid. AdeABC se sastoji od tri komponente: AdeB je transmembranska struktura, AdeA je unutarnji membranski fuzijski protein, a AdeC formira vanjski membranski porin (Marchand i sur., 2004). AdeABC je kromosomski kodirana i obično je regulirana sa sustavom od dvije komponente (senzor kinaza i pripadajući regulator odgovora). Inaktivacijom transmembranske komponente pumpe dolazi do gubitka funkcije same pumpe i otpornosti na antibiotike (Magnet i sur.,2001). S druge strane, kada se inaktivira gen koji kodira vanjski membranski porin (adeC), pumpa ne gubi svoju funkciju (Slika 2) (Marchand i sur., 2004).

[5] Multidrug efflux pumpe- aktivni proteinski transporteri koji se nalaze u citoplazmatskoj membrani. Veoma su specifične i mogu ispumpati iz stanice široki spektar antibiotika, deterženata i sličnih spojeva.



Slika 2. Građa pumpe iz porodice RND pumpi (http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1369527409000939-gr1.jpg)

Kinoloni

Kinoloni su skupina antibiotika čije se djelovanje temelji na inhibiciji sinteze nukleinskih kiselina (http://sharepoint.zvu.hr/katedre/319/Nastavni%20matrijali/IRT%20STUDIJ/pdf.%20za%20studente%20IRT%20-MIKRO/antibiotici.pdf). U *A. baumannii* su opisane mutacije gena koji kodiraju DNA girazu i topoizomerazu IV (Hamouda i Amyes, 2004). Mutacije utječu na prianjanje na ciljno mjesto. Slično kao i gore navedeni aminoglikozidi, i ovi kinoloni su supstrati na 'multidrug efflux' pumpama uključujući i AdeABC pumpu (Higgins i sur., 2004). Nemogućnost vezivanja kinolona na pumpu dovodi do stvaranja rezistencije na antibiotike (Peleg i sur., 2008).

Polimiksini

Polimiksini djeluju na stanice na način da ometaju funkciju citoplazmatske membrane. Iako postoje različita istraživanja i pokusi, mehanizam rezistencije *A. baumannii* na polimiksine je još uvijek nepoznat (Peleg i sur., 2008).

Tetraciklini i glicilciklini

Tetraciklini i glicilciklini djeluju, baš kao i aminoglikozidi na sprečavanje sinteze proteina (http://sharepoint.zvu.hr/katedre/319/Nastavni%20matrijali/IRT%20STUDIJ/pdf.%20za%20studente%20IRT%20-MIKRO/antibiotici.pdf). Rezistentnost na tetracikline i njihove derivate može biti posredovana ribosomalnom zaštitom (Fluit i sur., 2005). Transpozon u suradnji sa IS elementom uzrokuje rezistentnost na tetraciklin (Ribera i sur., 2003). Ribosomalna zaštita je posredovana *tet* genima (Ribeira i sur., 2003). Osim toga rezistentnost se i stvara onemogućavanjem prianjanja tigeciklina na AdeABC pumpu (Magnet i sur., 2003).

KLINIČKE MANIFESTACIJE INFEKCIJA S *A. BAUMANNII*

Iako je dosta teško pomoću današnjih metoda sa sigurnošću odrediti koje bolesti uzrokuje ova bakterijska vrsta, neke od njih su poznate.

Upala pluća

- **dobivena u bolnici**

U studijama provedenim u Sjedinjenim američkim državama pokazalo se da je između 5 i 10% slučajeva upale pluća kod pacijenata na intenzivnoj njezi uzrokovano *A. baumannii* (Gaynes i Edwards, 2005). Vrlo je vjerojatno da je u određenim institucijama taj broj i veći. Obično pacijenti koji imaju infekciju *A. baumannii* ostaju duže na intenzivnoj njezi (Garnacho – Montero i sur., 2005).

- **dobivena u interakciji s okolinom**

Ova bolest je najčešća tijekom kišne sezone u tropskim područjima i to među osobama koje imaju povijest ovisnosti o alkoholu (Anstey i sur., 2002). Ponekad se osobe s ovakvom upalom pluća moraju primiti u bolnicu na jedinicu intenzivne njege. Karakterizira ju nepredvidljiv klinički tijek, infekcija sekundarnog krvnog toka i smrtnost u 40 do 60% slučajeva (Leung i sur., 2006).

Infekcije krvnog toka

U velikoj studiji bolničkih infekcija krvnog toka u Sjedinjenim državama (1995. – 2002.), *A. baumannii* je 10. najčešći agens, odgovoran za 1.3% svih mikrobnih bolničkih infekcija krvnog toka (0.6 infekcija na 10000 primljenih) (Wisplinghoff i sur., 2004). Smrtnost infekcija krvnog toka *A. baumannii* kod osoba na intenzivnoj njezi se kreće od 34% do 43.4% i po tome je infekcija krvnog toka *A. baumannii* treća najveća po smrtnosti. *A. baumannii* infekcije se najkasnije pojavljuju tijekom hospitalizacije (26 dana nakon primitka na hospitalizaciju) (Wisplinghoff i sur., 2004).

Infekcija urinarnog trakta

A. baumannii ponekad uzrokuje i infekciju urinarnog trakta (UTI). Prema jednoj studiji ova bakterija je odgovorna za 1.6% UTI-ja na intenzivnoj njezi (Gaynes i Edwards, 2005). Tipično je ova infekcija povezana sa infekcijom uzrokovanom kateterom ili kolonizacijom (Peleg i sur., 2008).

Meningitis

Mikrobiološka epidemiologija bolničkog meningitisa uključuje Gram-negativne patogene pa nije iznenađujuće da *A .baumannii* koja je otporna na niz lijekova spada među takve uzročnike. Smrtnost uzrokovana infekcijom s *A. baumannii* se javlja u do 70% slučajeva (Metan i sur., 2007).

MOLEKULARNE TEHNIKE ZA ANALIZU SOJEVA *A. BAUMANNII*

Za kontrolu širenja *A. baumannii* u bolnicama, potrebno je identificirati potencijalne spremnike organizama i načine prijenosa. Kako bi se provela identifikacija potrebno je napraviti usporedbu izolata kod podvrsta i u nastavku je pregled tehnika koje se time bave (Peleg i sur., 2008).

Analiza plazmida

Većina vrsta *Acinetobactera* sadrži urođene plazmide. Ova metoda je uspješna u analizi sojeva *A. baumannii*. Pri analizi rezultata dobivenih ovom metodom mora se u obzir uzeti činjenica da se plazmidi vrlo lako prenose između bakterija te da se, zbog njihove mobilnosti, vrlo lako mogu izgubiti ili dobiti (Peleg i sur., 2008).

Ribotipizacija

Razvijena je primarno za identifikaciju acinetobaktera, posebice tragova *A. baumannii* kompleksa, na razini vrste (Gerner – Smidt, 1992). Ova metoda koristi enzime EcoRI, ClaI i SalI za restrikciju čiste kromosomalne DNA, nakon čega slijedi elektroforeza, blotting i hibridizacija cDNA sondom označenom s digoksigenin-11-UTP-om i dobivenom od rRNA *E. coli* (Griffith i sur., 2006). Ova metoda daje rezultate vrlo brzo, ali je veoma skupa i zahtjeva specijalnu opremu koja postoji u samo nekoliko laboratorija u svijetu (Peleg i sur., 2008).

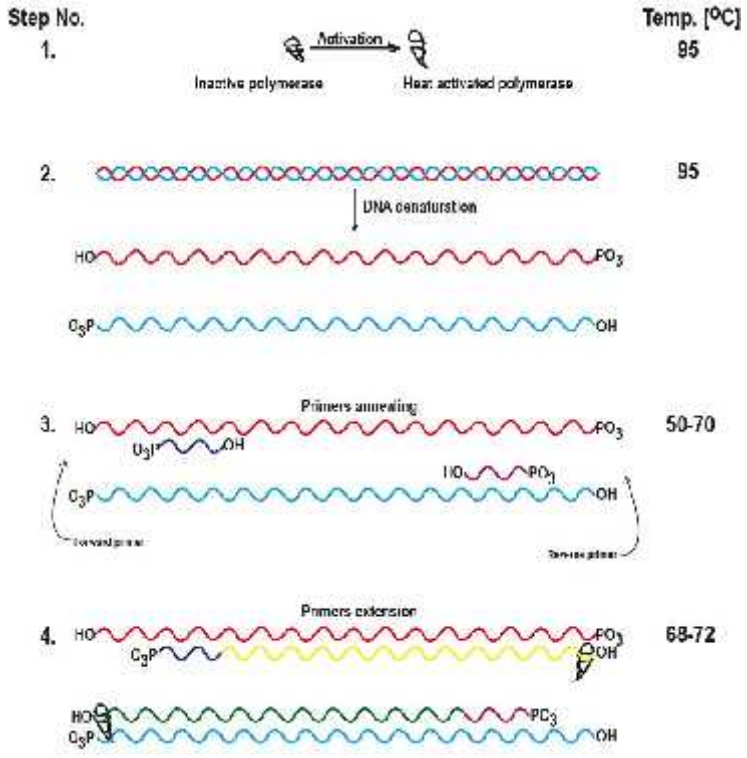
PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis)

Ovo je metoda koja se najčešće koristi. Velike DNA molekule se odvajaju pomoću električnog polja koje periodično mijenja smjer unutar gela. Intaktna kromosomska DNA se cijepa pomoću restrikcijskih enzima ApaI i SmaI (Bou i sur., 2000). Dobiveni kromosomski fragmenti se razdvajaju elektroforezom i profili otisaka se uspoređuju vizualno ili koristeći

posebne računalne programe koji omogućuju spremanje profila otisaka u bazu podataka. Standardizacija protokola bi omogućila rano otkrivanje početka infekcije (epidemije) pogotovo ako su slučajevi geografski razdvojeni (Peleg i sur., 2008)

Metode tipizacije bazirane na PCR-u (eng. polymerase chain reaction)

PCR je metoda pomoću koje se kratki fragmenti DNA umnožavaju u veliki broj identičnih kopija uz pomoć enzima DNA polimeraze (Slika 3). Ove metode tipizacije su relativno jednostavne, brze i nisu skupe, te omogućavaju grupiranja *A. baumannii* sojeva sa različitom genotipskom povezanošću. Ipak, uspješnost ove metode ne može se mjeriti sa uspješnošću PFGE metode. Analiza sojeva PCR-om korisna je za male, lokalne - analize, ali nije toliko prikladna za uspoređivanje sojeva koji uzrokuju epidemije na globalnoj razini (Peleg i sur., 2008).



Slika 3. Način djelovanja PCR-a (http://bio-ggs.blogspot.pt/2011/01/ggs-live-polymerase-chain-reaction-pcr.html)

AFLP metoda (eng. amplified fragment length polymorphism)

Ovo je metoda koja analizira raznolikost duljina fragmenata DNA koji su dobiveni umnožavanjem PCR-om. DNA se prvo cijepa restrikcijskim enzimom, a zatim se određeni fragmenti umnožavaju, te tek nakon toga slijedi analiza. Ovo je veoma korisno oruđe u određivanju srodnosti, te je veoma pogodna za klasifikaciju *Acinetobacter* sojeva na razini podvrste (Peleg i sur., 2008).

MLST metoda (eng. multilocus sequence typing)

MLST se koristi za tipiziranje višestrukih lokusa. Pomoću ove metode se direktno mjere varijacije u DNA sekvencama, te se karakteriziraju sojevi pomoću njegovih jedinstvenih profila alela. Ova metoda se dosada koristi za tipizaciju samo nekoliko sojeva *A. baumannii* većinom iz španjolskih i njemačkih bolnica (Peleg i sur., 2008). Jedna od varijacije ove metode koja se koristi je PCR-ESI-MS. PCR- ESI- MS ujedinjuje PCR sa ionizacijom i masenom spektrometrijom te omogućuje konkretniju detekciju sojeva *Acinetobactera*. U prilog ovoj metodi ide činjenica da je relativno brza (traje samo 4 sata) (Peleg i sur., 2008).

ZAKLJUČAK

S obzirom da su prokariotske stanice veoma sposobne i prilagodljive, bilo je potrebno samo dvadesetak godina, od početka aktivne upotrebe antibiotika, da bi bakterije počele pokazivati prve znakove rezistentnosti na njih. Mehanizmi rezistencije su različiti: od transpozona i integrona pa sve do efflux pumpi. Te mehanizme razvila je i bakterija *Acinetobacter baumannii*, koja trenutno izaziva veliku zabrinutost među svjetskim znanstvenicima. U zaključak ne stavljajte literaturu

Najčešći izvori epidemija su upravo bolnice. Zbog prekomjerne i učestale upotrebe antibiotika i dezinfekcijskih sredstava, mikroorganizmi koji se nalaze u bolnicama imaju veće šanse za razvoj rezistencije. Samim time, farmaceutske tvrtke razvijaju snažnije i jače lijekove širokog spektra koji su sposobni uništiti te organizme.

Kako spriječiti daljnje stvaranje rezistencije i prodor epidemija? Kao prvo, važno je za liječnike da pažljivo biraju u kojim slučajevima će propisati određene antibiotike. Isto tako, od iznimne je važnosti da se antibiotici širokog spektra pažljivo koriste i propisuju samo ako je jako teško identificirati organizam-uzročnik rezistencije. Potrebno je i paziti na dozu antibiotika i na pravilno uzimanje lijekova. Pri tome se misli da se antibiotici moraju uzimati do kraja propisane terapije, a ne prestati uzimati čim se simptomi povuku.

U novije vrijeme započeta su intenzivna istraživanja na novim, još učinkovitijim, antibioticima širokog spektra izoliranim iz biljaka i životinja. Isto tako, velika nada polaže se u razvoj lijekova koji bi zapravo bile komplementarne DNA kiseline koje bi se vezale na virulentne gene patogena te na taj način onemogućile transkripciju.

LITERATURA

1. Anstey N. M., Currie B. J., Hassell M., Palmer D., Dwyer B., Seifert H. 2002. Community-acquired bacteremic *Acinetobacter* pneumonia in tropical Australia is caused by diverse strains of *Acinetobacter baumannii*, with carriage in the throat in at-risk groups. J. Clin. Microbiol. 40:685–686.
2. Baumann P. 1968. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. J. Bacteriol. 96:39–42.
3. Beijerinck, M. 1911. Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. Versl. Koninklijke Akad.Wetensch. Amsterdam 19:1092–1103.
4. Bou G., Cervero G., Dominguez M. A., Quereda C., Martinez-Beltran J.. 2000. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. J. Clin. Microbiol. 38:3299–3305
5. Bou G., Cervero G., Dominguez M. A., Quereda C., Martinez-Beltran J.. 2000. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Clin. Microbiol. Infect. 6:635–643.
6. Doi Y., Arakawa Y.. 2007. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. Clin. Infect. Dis. 45:88–94.
7. Donald H. M., Scaife W., Amyes S. G., H. K. Young. 2000. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. Antimicrob. Agents Chemother. 44:196–199.
8. Erdeljić V., 2012. Utjecaj primjenjene antimikrobne terapije na selekciju mikroorganizama koji produciraju beta-laktamaze proširenog spektra (AmpC i ESBL) i ishod lječenja bolesnika. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet Sveučilišta u zagrebu, p. 146.
9. Fernandez-Cuenca F., Martinez-Martinez L., Conejo M. C., Ayala J. A., Perea E. J., Pascual A. 2003. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 51:565–574.

10. Fluit A. C., Florijn A., Verhoef J., Milatovic D. 2005. Presence of tetracycline resistance determinants and susceptibility to tigecycline and minocycline. Antimicrob. Agents Chemother. 49:1636–1638.

11. Fournier P. E., Vallenet D., Barbe V., Audic S., Ogata H., Poirel L., Richet H., Robert C., Mangenot S., Abergel C., Nordmann P., Weissenbach J., Raoult D., Claverie J. M. 2006. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. PLoS Genet. 2:e7.

12. Garnacho-Montero J., Ortiz-Leyba C., Fernandez-Hinojosa E., Aldabo- Pallas T., Cayuela A., Marquez-Vacaro J. A., Garcia-Curiel A., Jimenez-Jimenez F. J.. 2005. *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. Intensive Care Med. 31:649–655.

13. Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., 2005. Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 2, Part B. Springer, New York, p. 425-437

14. Gaynes R., Edwards J. R. 2005. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clin. Infect. Dis. 41:848–854.

15. Gerner-Smidt P. 1992. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. J. Clin.Microbiol. 30:2680–2685.

16. Girlich D., Naas T., Leelaporn A., Poirel L., Fennewald M., Nordmann P. 2002. Nosocomial spread of the integron-located veb-1-like cassette encoding an extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. Clin. Infect. Dis. 34:603–611.

17. Griffith M. E., Ceremuga J. M., Ellis M. W., Guymon C. H., Hospenthal D. R., Murray C. K. 2006. *Acinetobacter* skin colonization of US army soldiers. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 27:659–661.

18. Gu B., Tong M., Zhao W., Liu G., Ning M., Pan S., Zhao W. 2007. Prevalence and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China. J. Clin. Microbiol. 45:241–243.

19. Hamouda A., Amyes S. G. 2004. Novel gyrA and parC point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. J. Antimicrob. Chemother. 54:695–696.

20. Heritier C., Poirel L., Aubert D., Nordmann P. 2003. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 47:268–273.

21. Heritier C., Poirel L., Lambert T., Nordmann P. 2005. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 49:3198–3202

22. Heritier C., Poirel L., Nordmann P.. 2006. Cephalosporinase overexpression resulting from insertion of IS*Aba1* in *Acinetobacter baumannii*. Clin. Microbiol. Infect. 12:123–130.

23. Higgins P. G., Wisplinghoff H., Stefanik D., Seifert H. 2004. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of adeB mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 54:821–823.

24. Hujer K. M., Hamza N. S., Hujer A. M., Perez F., Helfand M. S., Bethel C. R., Thomson J. M., Anderson V. E., Barlow M., Rice L. B., Tenover F. C., Bonomo R. A.. 2005. Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: defining a unique family of class C enzymes. Antimicrob. Agents Chemother. 49:2941–2948.

25. Lee K., Lee W. G., Uh Y., Ha G. Y., Cho J., Chong Y. 2003. VIM- and IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. Emerg. Infect. Dis. 9:868–871.

26. Lee K., Yong D., Yum J. H., Lim Y. S., Bolmstrom A., Qwarnstrom A., Karlsson A., Chong Y. 2005. Evaluation of Etest MBL for detection of *bla*IMP-1 and *bla*VIM-2 allele-positive clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J. Clin. Microbiol. 43:942–944.

27. Leung W. S., Chu C. M., Tsang K. Y., Lo F. H., Lo K. F., Ho P. L. 2006. Fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. Chest 129:102–109.

28. Magnet S., Courvalin P., Lambert T. 2001. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. Antimicrob. Agents Chemother. 45:3375–3380.

29. Marchand I., Damier-Piolle L., Courvalin P., Lambert T. 2004. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. Antimicrob. Agents Chemother. 48:3298–3304.

30. Metan G., Alp E., Aygen B., Sumerkan B. 2007. *Acinetobacter baumannii* meningitis in post-neurosurgical patients: clinical outcome and impact of carbapenem resistance. J. Antimicrob. Chemother. 60:197–199.

31. Mussi M. A., Limansky A. S., Viale A. M. 2005. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins. Antimicrob. Agents Chemother. 49:1432–1440.

32. Paton R., Miles R. S., Hood J., Amyes S. G. B. 1993. ARI-1: β-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Int. J. Antimicrob. Agents 2:81–88.

33. Peleg A. Y., Bell J. M., Hofmeyr A., Wiese P. 2006. Inter-country transfer of gram-negative organisms carrying the VIM-4 and OXA-58 carbapenem-hydrolysing enzymes. J. Antimicrob. Chemother. 57:794–795.

34. Peleg A. Y., Seifert H., Paterson D.L. 2008. *Acinetobacter baumannii:* Emergence of a Successful Pathogen. Clin Microbiol Rev. 21, 538-582.

35. Poirel L., Nordmann P. 2006. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin. Microbiol. Infect. 12:826–836.

36. Queenan A. M., Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile betalactamases. Clin. Microbiol. Rev. 20:440–458.

37. Ribera A., Roca I., Ruiz J., Gibert I., Vila J. 2003. Partial characterization of a transposon containing the *tet*(A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 52:477–480.

38. Ribera A., Ruiz J., Vila J. 2003. Presence of the Tet M determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 47:2310–2312.

39. Rossau R., Van Landschoot A., Gillis M., De Ley J. 1991. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accomodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. Int. J. Syst. Bacteriol. 41:310–319.

40. Turton J. F., Ward M. E., Woodford N., Kaufmann M. E., Pike R., Livermore D. M., Pitt T. L. 2006. The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol. Lett. 258:72–77.

41. Wisplinghoff H., Bischoff T., Tallent S. M., Seifert H., Wenzel R. P., Edmond M. B. 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals:analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin. Infect. Dis. 39:309–317.

42. http://sharepoint.zvu.hr/katedre/319/Nastavni%20matrijali/IRT%20STUDIJ/pdf.%20za%20srudente%20IRT%20-MIKRO/antibiotici.pdf

43. http://www.scfbio-iitd.res.in/tutorial/orf.html

44. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457906000505

SAŽETAK

Acinetobacter baumannii su gram negativne, katalaza pozitivne i strogo aerobne bakterije koje su razvile visoku rezistenciju na gotovo sve grupe antibiotika. Imaju veliku sposobnost brze prilagodbe na okolišni stres, te upravo stoga i predstavljaju sve veću prijetnju. Mehanizmi rezistencije se većinom temelje na pokretnim genskim elementima: transpozonima, integronima i 'insertion sequence' elementima. Oni pomažu u stvaranju rezistencije na sljedeće antibiotike: aminoglikozide, ß-laktame, kinolone, polimiksine, tetracikline i glicilcikline.

Osim ovih mehanizama, u radu su opisane i molekularne metode analize i detekcije sojeva *A. baumannii* (analiza plazmida, ribotipizacija, metode temeljene na PCR-u, PFGE, AFLP i MLST metoda), te kliničke manifestacije infekcija sa gore navedenom bakterijom (upala pluća, infekcije krvnog toka i urinarnog trakta, meningitis).

SUMMARY

Acinetobacter baumannii are gram-negative, catalase-positive and strictly aerobic bacteria who have developed high resistance on almost every type of antibiotic. They have high ability for adaption on enviromental stress and, because of this, they present big threat in health institutions. Resistance mechanisms are mostly based on mobile genetic elements: transposons, integrons and insertion sequence elements. They are helping in creation of resistance at different types of antibiotics: aminoglycosides, ß-lactams, quinolones, polymyxins, tetracyclines and glycylcyclines.

Except this mechanisms, in this work are described methods for moleclar analysis and detection of *A.baumannii* strains (plasmid analysis, ribotyping, PCR-based typing methods, PFGE, AFLP and MLST). Also, there is short reference to clinical manifestations of *A.baumannii* infections.