

# UTJECAJ SUŠENJA NA SPOSOBNOST STVARANJA BIOFILMA ACINETOBACTER BAUMANNII

---

Ćustić, Toni

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:086435>

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

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



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

TONI ČUSTIĆ

**UTJECAJ SUŠENJA NA SPOSOBNOST STVARANJA BIOFILMA  
ACINETOBACTER BAUMANNII**

ZAVRŠNI RAD

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

TONI ČUSTIĆ

**UTJECAJ SUŠENJA NA SPOSOBNOST STVARANJA BIOFILMA  
ACINETOBACTER BAUMANNII**

ZAVRŠNI RAD

Rijeka, 2022.

## **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin dipl. sanit. ing. na savjetima i pomoći kod istraživanja i izrade završnog rada.

Zahvaljujem obitelji i kolegama koji su mi bili podrška prilikom izrade ovog rada.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin dipl. sanit. ing.

Završni rad obranjen je dana 15. rujna 2022. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin dipl. sanit. ing.
2. Doc. dr. sc. Mateja Ožanič dipl. sanit. ing
3. Izv. prof. dr. sc. Vanja Vasiljev dipl. sanit. ing.

Rad ima 34 stranice, 6 slika, 1 tablicu, 16 grafova i 18 literaturnih navoda.

## SAŽETAK

*Acinetobacter baumannii* predstavlja jako važan patogen u bolničkom okruženju. Pokazao se kao velika opasnost jer je uvelike otporan na antibiotike. Pored toga je važna i mogućnost rasta i postojanja u biofilmu. Preživljava na gotovo svim površinama i u širokom rasponu nepovoljnih uvjeta.

Posljednjih je godina sve više bakterija koje imaju mogućnost stvaranja biofilma i s tim svojstvom razviju i otpornost na djelovanje antibiotika. Bakterijama, biofilm služi kao zaštita od antibiotskog liječenja, dezinficijensa, imunološke obrane domaćina i isušivanja. Zajednice bakterija, biofilm, se stvaraju kad bakterije dođu u nepovoljne uvjete za rast.

Cilj ovog istraživanja je saznati kako isušivanje *Acinetobacteria baumannii* utječe na porast i stvaranje biofilma. Istražuje se preživljavanje i adhezija na plastičnoj podlozi.

Dobiveni rezultati nam daju uvid u sposobnost preživljavanja *A. baumannii* na plastičnoj podlozi bez većih problema. Nakon izlaganja sušenju u periodu od 14 dana pokazao se pad broja bakterija ali i dalje ne dovoljno za zdravstveni značaj, te brojke su i dalje visoke. Acinetobakteri korišteni u ovim ispitivanjima s lakoćom stvaraju biofilmove u kojima lako preživljavaju sušenje. Adheriraju na plastičnu podlogu i tako s međusobnim vezivanjem tvore zajednice biofilma.

Može se zaključiti kako svi korišteni sojevi mogu stvarati biofilm i na taj način preživljavati postupak isušivanja. To dokazuje da je *Acinetobacter baumannii* veliki problem u bolničkim sredinama i ostat će tako sve do pojave novog, uvelike potrebnog, lijeka.

Ključne riječi: *Acinetobacter baumannii*, biofilm, sušenje

## SUMMARY

*Acinetobacter baumannii* is a very important pathogen in the hospital environment. It has proven to be a great danger because it is highly resistant to antibiotics. In addition, the possibility of growth and existence in biofilm is important. It survives on almost all surfaces and in a wide range of adverse conditions.

In recent years, more and more bacteria have the ability to create a biofilm and with this property develops resistance to antibiotics. To bacteria, the biofilm serves as protection against antibiotic treatment, disinfectants, host immune defense, and drying. Bacterial communities, biofilm, are formed when bacteria come under unfavorable conditions for growth.

The aim of this study is to find out how drying of *Acinetobacter baumannii* affects the growth and formation of biofilm. Survival and adhesion to a plastic substrate are investigated.

The obtained results give us an insight into the viability of *A. baumannii* on a plastic surface without major problems. After exposure to drying for a period of 14 days, the number of bacteria decreased, but still not enough for health significance, and those numbers are still high. The acinetobacteria used in these tests easily create biofilms in which they survive drying process. They adhere to the plastic surface and thus interconnect to form a biofilm community.

It can be concluded that all the strains used can form a biofilm and thus survive the drying process. This proves that *Acinetobacter baumannii* is a major problem in hospital environments and will remain so until a new, much needed, drug emerges.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, biofilm, drying

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA .....                                 | 1  |
| 1.1. Karakteristike acinetobaktera .....                                      | 1  |
| 1.1.1. Patogeneza.....  | 2  |
| 1.1.2. Laboratorijska dijagnostika .....                                      | 3  |
| 1.1.3. Identifikacija.....  | 4  |
| 1.1.4. Klinička slika.....  | 4  |
| 1.1.5. Liječenje i sprječavanje nastanka infekcije .....                      | 5  |
| 1.2. Stvaranje biofilma .....   | 6  |
| 1.3. <i>Acinetobacter baumannii</i> .....                                     | 8  |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....  | 11 |
| 3. MATERIJALI I METODE .....  | 12 |
| 3.1. Bakterijski sojevi.....  | 12 |
| 3.2. Hranjive podloge .....   | 12 |
| 3.3. Aparati .....  | 12 |
| 3.4. Sušenje bakterija .....  | 12 |
| 3.5. Metode rada.....   | 13 |
| 4. REZULTATI.....   | 15 |
| 4.1. <i>A. baumannii</i> , soj ATCC 1605 .....                                | 15 |
| 4.2. <i>A. baumannii</i> , soj ATCC 19606 .....                               | 16 |
| 4.3. <i>A. baumannii</i> , soj 771.....                                       | 18 |
| 4.4. <i>A. baumannii</i> , soj 54531.....                                     | 19 |
| 4.5. <i>A. baumannii</i> , soj 56781.....                                     | 21 |
| 4.6. <i>A. baumannii</i> , soj 53154.....                                     | 22 |
| 4.7. <i>A. baumannii</i> , soj 555/214.....                                   | 23 |
| 4.8. Ukupan prikaz rezultata svih korištenih sojeva <i>A. baumannii</i> ..... | 25 |



|                       |    |
|-----------------------|----|
| 5. RASPRAVA.....      | 27 |
| 6. ZAKLJUČAK .....    | 30 |
| 7. LITERATURA.....    | 31 |
| 8. POPIS SLIKA .....  | 33 |
| 9. POPIS TABLICA..... | 33 |
| 10. ŽIVOTOPIS .....   | 34 |

# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

*Acinetobacter* je rod bakterija iz porodice *Moraxellaceae*. To su gram - negativne bakterije koje su kroz prošlost promijenile više od 15 naziva, a njihov utjecaj se počeo više istraživati pred kraj 20.-og stoljeća. Acinetobakteri, najčešće *Acinetobacter baumannii*, uzrokuju moguće probleme u bolnicama i medicinskim ustanovama jer su otporne na razne nepovoljne uvjete. (1)

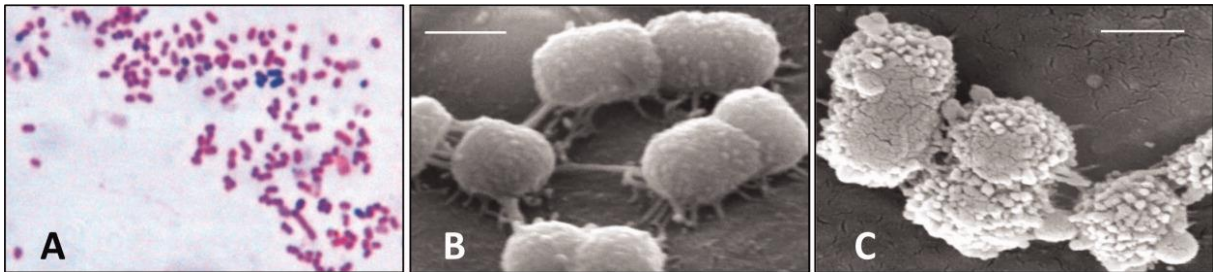
Glavna tema ovog rada je utjecaj isušivanja raznih sojeva bakterije *Acinetobacter baumannii* na stvaranje biofilma. Biofilm predstavlja stvaranje zajednice s drugim mikroorganizmima. Mogućnost stvaranja te zajednice bitna je bakterijska značajka na koju se nailazi na prirodnim i umjetnim površinama. U prirodnom okruženju biofilm predstavlja način života bakterije u kojem mogu imati učinke na poticanje rasta biljki, razgradnju organskih tvari. Pokazali su se korisnim i u fermentaciji hrane, proizvodnji raznih materijala na bio-bazi i sl. Pored korisnih uloga u prirodnom okruženju, biofilmovi predstavljaju veliku prijetnju za javno zdravlje koje je odgovorno za brigu o infekcijama. Oni su uključeni u 65% mikrobnih bolesti i oko 80% kroničnih infekcija povezanih s medicinskim uređajima, površinama i priborom. Pojavljuju na svim površinama bilo to medicinskog porijekla, poput katetera i implantata dojke, sve do predmeta svakodnevne uporabe, poput kontaktnih leća. Bakterijske infekcije biofilmom teško se liječe jer su vrlo otporne na imunološke odgovore i antibiotike. (2)

## 1.1. Karakteristike acinetobaktera

Acinetobakteri su kratki, gram-negativni štapići. Bojanje po Gramu može varirati unutar jedne bakterijske kulture. U stacionarnoj fazi su više u obliku koka dok su u fazi rasta tipično veličine od 1,0 do 1,5  $\mu\text{m}$  širine i od 1,5 do 2,5  $\mu\text{m}$  dužine. Imaju kapsulu i nepokretni su. Svi članovi roda su obligatni aerobi, ne fermentativni, oksidaza negativni i katalaza pozitivni. Oksidaza test služi kao brzi postupak za razlikovanje acinetobaktera od inače sličnih ne fermentativnih bakterija. (1)

*Acinetobacter* tvori glatke blijedožute do sivkastobijele kolonije na čvrstom mediju. Kolonije su sličnih veličina kao i one enterobakterija. Upravo zbog visoke rezistencije na

nepovoljne uvjete, velika većina sojeva može rasti u jednostavnom mineralnom mediju koji sadrži jedan izvor ugljika, dušika i energije. Za znatan broj idealna temperatura rasta je između 20 i 30°C, dok je za *Acinetobacter baumannii* 37°C. (1)



Slika 1. (A), Bojanje po Gramu *Acinetobacter baumannii* u stacionarnoj fazi, prikazani kokoidni i kokobacilarni oblici. (B) i (C), skenirajuća elektronska mikrofotografija sojeva *A. baumannii* AYE i ACICU.

### 1.1.1. Patogeneza

Vrste acinetobaktera dobivaju sve veću važnost kao značajni oportunistički patogeni. U bolničkim uvjetima uključene su u širok raspon infekcija. Najviše problema uzrokuju kod kritično bolesnih pacijenata s oslabljenim imunitetom. Ove infekcije najčešće uključuju upalu pluća, infekcije kože i mekog tkiva, infekcije rana, infekcije mokraćnog sustava, meningitis i infekcije krvotoka. Od svih acinetobaktera, bolničke infekcije i epidemije pripisuju se uglavnom *A. baumannii*. (3)

Acinetobakteri ne predstavljaju problem kao primarne infekcije. Iako se mogu naći u svim segmentima okoliša, za sad ne prikazuju prijetnju. Do infekcija dolazi u bolničkom okruženju gdje preživljavaju rezistentni sojevi koji su nastali upravo nekim invazivnim liječenjima i prekomjernom uporabom antibiotika. (4)

Tablica 1. Neke vrste roda *Acinetobacter* i njihova staništa

| Ime vrste              | Broj genomske vrste | Tip ili soj | Primarno stanište ili izvor |
|------------------------|---------------------|-------------|-----------------------------|
| <i>A. baumannii</i>    | 2                   | ATCC 19606  | Ljudski klinički uzorci     |
| <i>A. beijerinckii</i> | /                   | NIPH 838    | Tlo, voda                   |
| <i>A. bouvetii</i>     | /                   | DSM 14964   | Aktivni mulj                |
| <i>A. guillouiae</i>   | 11                  | ATCC 11171  | Ljudski feces, voda, tlo    |
| <i>A. johnsonii</i>    | 7                   | ATCC 17909  | Ljudska koža, voda, tlo     |
| <i>A. lwoffii</i>      | 8/9                 | ATCC 15309  | Ljudska koža                |
| <i>A. parvus</i>       | /                   | NIPH384     | Ljudi i životinje           |

### 1.1.2. Laboratorijska dijagnostika

Acinetobakteri se najčešće uzgajaju na uobičajenim laboratorijskim podlogama, kao što su hranjivi agar i triptični agar od soje. Definirane su podloge koje se sastoje od mineralne baze, koja u sebi sadrži soli amonijaka ili nitrata, i jedan ili više izvora ugljika. One su ipak korištene samo u posebne svrhe. Za izravnu izolaciju od kliničkih uzoraka korisnije je koristiti selektivni medij koji potiskuje rast drugih mikroorganizama. Selektivni i diferencijalni medij koji sadrži žučne soli, šećere i bromkrezol ljubičastu boju, dostupan je kao Herellea agar (Difco). Ta podloga je nastala dodavanjem različitih antibiotika. (1)

Kod uzoraka iz okoliša, ponajviše u područjima gdje *Acinetobacter* može biti prisutan u samo malom broju, uzgoj u tekućini za obogaćivanje može biti koristan. Uzorci koji su kontaminirani raznim mikroorganizmima mogu se koristiti za inokulaciju tekućeg mineralnog medija koji sadrži jedan izvor ugljika i energije te sol amonijaka ili nitrata kao izvor dušika, s potrebnim pH od 5,5 do 6,0. Potrebno je snažno mućkanje tijekom inkubacije kako bi svi prisutni acinetobakteri mogli prerasti sve pseudomonase. Nakon inkubacije od 24 do 48 sati, medij iz kulture inokuliran je u selektivni medij i kolonije acinetobaktera se dalje identificiraju.

Ova metoda korištena je za izlučivanje *Acinetobacter* iz fekalnih uzoraka i različitih kliničkih i ekoloških uzoraka.

Klinički izolati, koji pripadaju *A. baumannii* rastu na 37 °C, dok neke druge genomske vrste rastu na nižim temperaturama. Preporučena je opća temperatura uzgoja od 30 °C. Može se preporučiti i niža temperatura ili kombinacija temperatura, ovisno o vrsti i podrijetlu uzorka. (1)

### **1.1.3. Identifikacija**

*Acinetobacter* se dijeli na genomske vrste temeljem DNA - DNA srodnosti. Korišteno je nekoliko različitih metoda hibridizacije DNA. To uključuje metodu nitroceluloznog filtera, metodu S1 endonukleaze i metodu kvantitativne bakterijske točkice. Posljednja metoda vjerojatno je najjednostavnija, ali sve te metode su naporne i neprikladne za uporabu u rutinskoj praksi. Fenotipske metode identifikacije za pojedine vrste nisu potpuno pouzdane, a to može biti izvor zabune u mikrobiološkim laboratorijima. Kako bi se izbjegli budući problemi, važno je da osobe koje rade s *Acinetobacter* vrstom jasno navedu metodu identifikacije. (1)

### **1.1.4. Klinička slika**

*Acinetobakter* je izoliran iz različitih vrsta oportunističkih infekcija. One uključuju upalu pluća, sepsu, endokarditis, meningitis, infekciju kože i rana te infekciju mokraćnog sustava. Infekcije se ne razlikuju previše od drugih bolničkih infekcija uzrokovanih gram - negativnim bakterijama. Kao glavna mjesta infekcije su se pokazali donji dišni trakt i mokraćni trakt. (1)

Pravu učestalost bolničkih infekcija uzrokovanih acinetobakterom nije lako procijeniti. Najviše zbog toga što izolacija ovih mikroorganizama iz uzoraka ne mora značiti uzrok infekcije, već može biti posljedica kolonizacije. (1)

Najveće probleme uzrokuju kod osoba s oslabljenim imunim sustavom, pušača, alkoholičara, i ostalih kroničnih bolesnika. Kako je najveći postotak infekcija dišnog sustava zaključuje se da su ugrožene osobe koje koriste respirator u medicinskim ustanovama.

### 1.1.5. Liječenje i sprječavanje nastanka infekcije

Vrlo mali broj antibiotika je pouzdano učinkovit za liječenje težih bolničkih infekcija nastalih bakterijom *Acinetobacter*. (1) Liječenje ozbiljnijih infekcija nastalih acinetobakterom treba obuhvaćati kombiniranu terapiju na temelju laboratorijskih rezultata osjetljivosti. (4) Smrtonosnost infekcija acinetobakterom izazvana je u više od 50% slučajeva. Najzastupljeniji, od acinetobaktera je *Acinetobacter baumannii* koji je odgovoran za 95% infekcija i izbijanja u bolnicama, a slijede ga *A. nosocomialis* i *A. pittii*. (5)

U suzbijanju se koristi kombinacija mjera kako bi se spriječio rast i razvoj te širenje tih mikroorganizama. Potrebna je kontrola okoliša, dekontaminacija opreme, naglasak na pranju ruku i postupcima izolacije pacijenata. Potrebna je i kontrola uporabe antibiotika, osobito u područjima visokog rizika. (1)

Troškovi povezani s suzbijanjem infekcija acinetobakterom mogu biti izrazito velike, a pored toga neke su institucije čak bile prisiljene zatvoriti čitave odjele kako ne bi došlo do daljnjeg širenja bakterije. Stoga postoji velika potreba da se spriječi prijenos acinetobaktera u zdravstvenim ustanovama. Dezinfekcija ruku s dezinficijensima na bazi alkohola i promatranje standardne bolničke prakse uvijek se naglašava.

Smatra se da bi laboratoriji trebali provoditi aktivni nadzor nad pacijentima koji su kolonizirani s rezistentnim acinetobakterom. Moguća ispitivanja novih antibiotskih tvari, od biljaka i drugih prirodnih izvora, koje imaju aktivnost protiv roda *Acinetobacter* od velikog je značaja. (6)

| Antibiotics                   | Resistance of <i>Acinetobacter</i> spp (MDR) |    |
|-------------------------------|--|----|
|                               | n  | %  |
| Amikacin                      | 290  | 92 |
| Amoxicillin + Calvulanic acid | 305  | 97 |
| Piperacillin / Tazobactam     | 290  | 92 |
| Ceftriaxone                   | 302  | 96 |
| Ceftazidime                   | 277  | 88 |
| Gentamicin                    | 261  | 83 |
| Ciprofloxacin                 | 284  | 90 |
| Tobramycin                    | 95   | 30 |
| Imipenem                      | 287  | 91 |
| chloramphenicol               | 290  | 92 |
| Polymixin B                   | -  | -  |
| Salbactam + Cefoperazone      | 284  | 90 |
| Co-trimoxazole                | 290  | 92 |

Slika 2. Tablični prikaz otpornosti rezistentnog *Acinetobacter* na određene antibiotike u ukupnom broju uzoraka n – 315.

## 1.2. Stvaranje biofilma

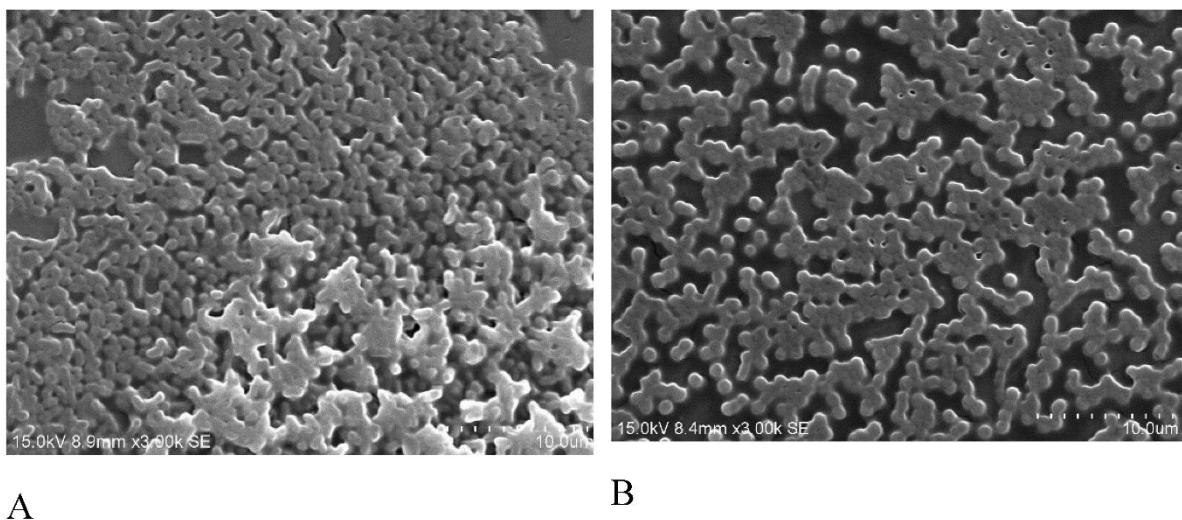
Biofilmovi se sastoje od mikroorganizama koji se pričvršćeni na površinu i omotani u hidratizirani polimer napravljen od polisaharida, proteina i nukleinskih kiselina. Biofilm funkcionira na sličan način kao tkiva. Uz pomoću primitivnog cirkulacijskog sustava za pumpanje tekućina i hranjive tvari kroz kanale u matrici. Život u biofilmu pruža zaštitu bakterijama od napada iz vanjskog svijeta. on predstavlja prepreku protiv prodiranja

antimikrobnih sredstava, kisika i hranjivih tvari. Također omogućuje organizmima da se odupru imunom sustavu domaćina. (6)

Posljednjih godina broj bakterija rezistentnih na antibiotike povezanih s stvaranjem biofilma se uvelike povećao. U tim zajednicama bakterija, biofilmovi daju zaštitu od antibiotskog liječenja, dezinficijensa, imunološke obrane domaćina i isušivanja. Stvaranje biofilma je izazvano suočavanjem bakterija s nepovoljnim uvjetima za rast. (2)

Bakterija započinje vezivanje općim fizio-kemijskim silama supstrata i bakterijske ovojnice. Nakon prvog kontakta, uključuju se specifični ili nespecifični adhezini na staničnoj površini što dovodi do nepovratnog vezivanja koje stvara mikro-kolonije. Vezivanjem i proliferacijom više takvih kolonija nastaju strukture koje počinju proizvoditi izvanstanične polisaharide i druge tvari, te na kraju konačnu građu biofilma. (2)

U slučaju gram-negativnih bakterija adhezija na staničnoj površini može biti uzrokovana fimbrijalnim i ne fimbrijalnim adhezинима, kao i različitim polisaharidima. Fimbrijalni adhezini su proteinska vlakna koja nose važnu ulogu u adheziji bakterija na površini. (2) *Acinetobacter baumannii* ima sposobnost stvaranja biofilma na širokom rasponu površina. To uključuje i abiotičke površine, poput nehrđajućeg čelika i plastike, kao i epitelne stanice domaćina. Razni faktori virulencije uključeni su u prianjanje bakterijskih stanica, međutim plastičnost uočena u genomima *A. baumannii* dovodi do značajnih varijacija u stvaranju biofilмова specifičnih za svaki soj. (7)



Slika 3. Prikaz biofilma *Acinetobacter baumannii* na elektronskom mikroskopu. (A), jaka formacija biofilma; (B), slabija formacija biofilma.



### 1.3. *Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter baumannii* je postao jedan od najuspješnijih patogena u zdravstvenom sustavu zbog svoje nevjerojatne sposobnosti stjecanja antimikrobne rezistencije. Nekoliko sojeva *A. baumannii* visoko su rezistentni na većinu klinički dostupnih antibiotika. Ova bakterija ima niz mehanizama rezistencije, uključujući  $\beta$ -laktamaze, enzime koji modificiraju aminoglikozide, efflux pumpe i modifikacije ciljnih mjesta. Kod kombinacije od nekoliko ovih mehanizama rezistencije postupno se smanjuje broj antibiotika dostupnih za liječenje infekcija u kliničkoj praksi.(8)

Saznanje da *A. baumannii* može stvarati biofilm u bolničkim uvjetima, tako što mijenja ekspresiju različitih proteina, dovodi do raznih pitanja. Osim zdravstvenih ustanova to mu uspijeva i unutar domaćina, što dovodi do kroničnih infekcija. Upravo zbog te mogućnosti je otporan na antimikrobne lijekove, deterdžente, dezinficijense i isušivanje. (2)

SZO je proglasila da je *A. baumannii* jedan od najozbiljnijih organizama iz skupine ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i vrsta *Enterobacter*) koji izrazito učinkovito izbjegavaju djelovanje antibakterijskih lijekova.(8)

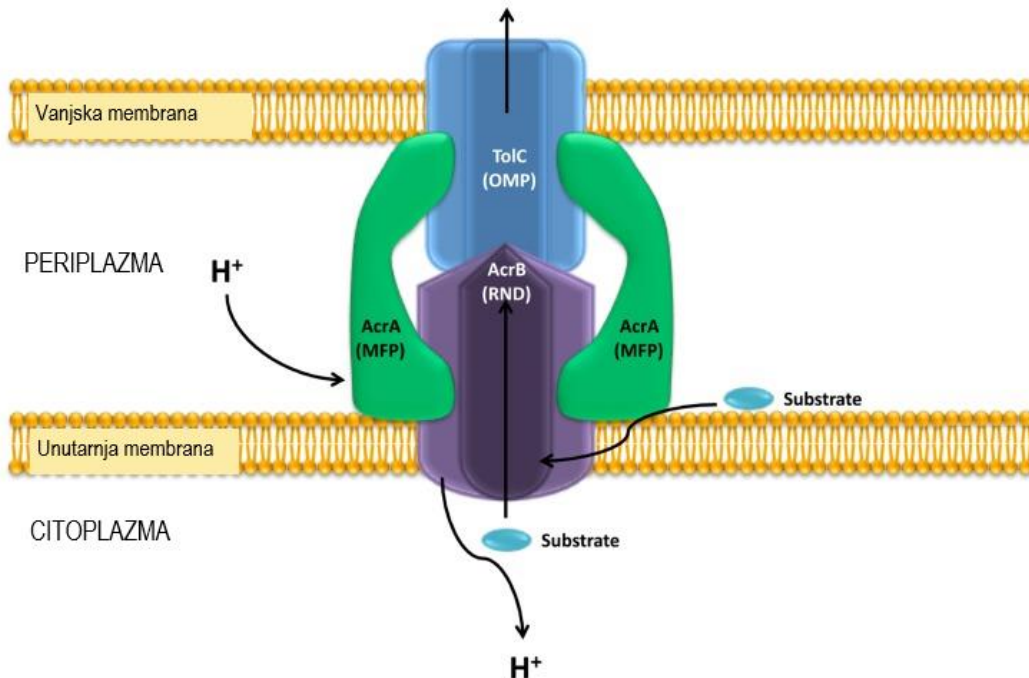
Prvi testovi identifikacije vrsta *Acinetobacter* su temeljeni na njihovom biokemijskom profilu. Korištenje molekularnih metoda kao što je DNA - DNA hibridizacija se pokazalo korisno. Metoda je korištena za utvrđivanje identiteta najmanje 33 različite vrste acinetobaktera. Među tim vrstama osim *Acinetobacter baumannii* se nalazi, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter* genske vrste 3 i *Acinetobacter* genske vrste 13TU. Ove vrste dijele fenotipske karakteristike zbog kojih ih je teško razlikovati. Iz tog razloga su, gore spomenuti, grupirani u *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (ACB) kompleks. (9)

Najbolje opisan faktor virulencije *Acinetobacter baumannii* do sada je OmpA proteinska domena. To je protein koji se nalazi na vanjskoj membrani mnogih gram-negativnih bakterija. Protein OmpA pridonosi sposobnosti *A. baumannii* da opstane i raste u ljudskom serumu. Međutim, OmpA nije jedini faktor koji pridonosi serumskoj rezistenciji, jer različiti sojevi, od kojih svi sadrže gene OmpA, imaju značajno različite sposobnosti preživljavanja u ljudskom serumu. U okolišu ovaj protein može olakšati postojanost i preživljavanje acinetobaktera pomažući kod stvaranja biofilma. Zbog višestrukih funkcija u patogenezi, OmpA domena može biti privlačna meta za razvoj novih strategija liječenja i prevencije

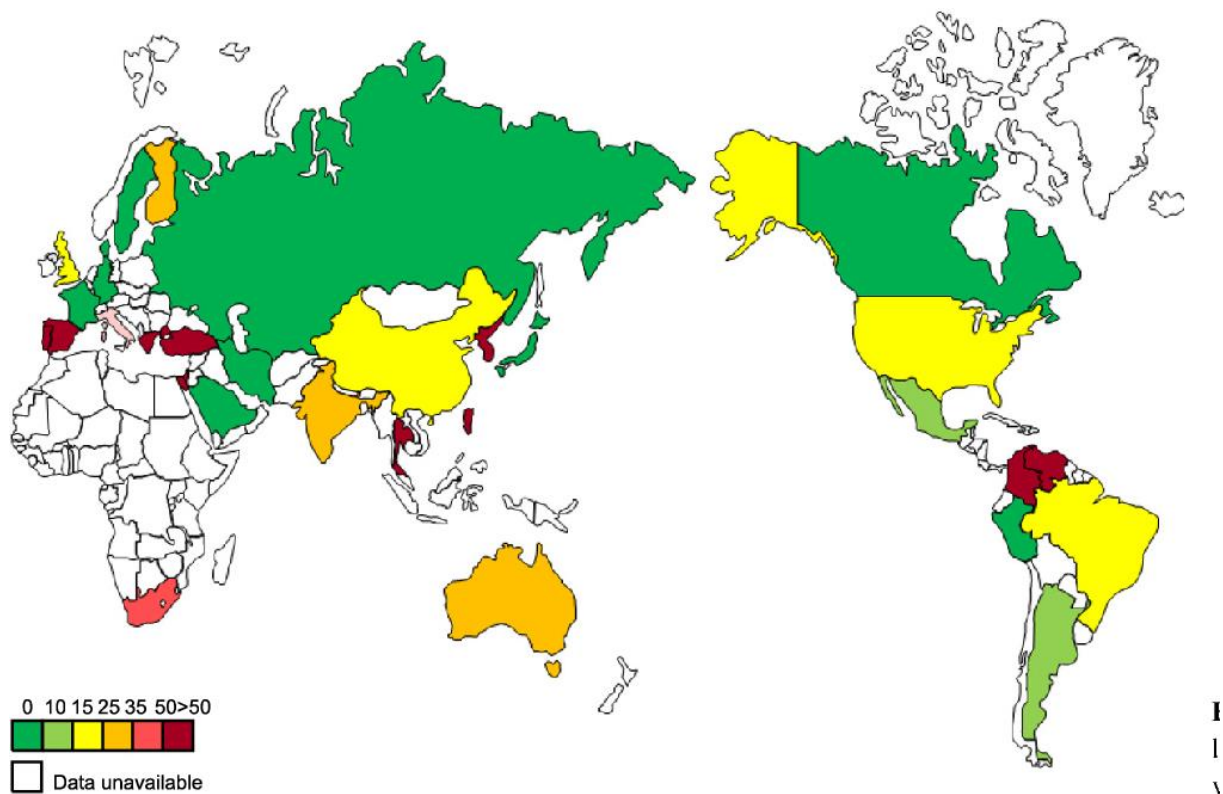
infekcija nastalih *A. baumannii*. Također, uz sve gore navedeno, ima ulogu u prianjanju i invaziji epitelih stanica kod ljudi. Može pridonijeti širenju bakterije tijekom infekcije. (10)

Efflux pumpa je mehanizam koji se većinom pojavljuje u svim stanicama i ima fiziološku ulogu. U stanici prokariota kao glavnu funkciju ima uklanjanje metaboličkih produkata i toksina. Izvanredno, taj mehanizam uklanja korištene antibiotike iz stanice u terapiji infekcija. Geni i proteini pumpe prisutni su u svim organizmima. Nekoliko je studija pokazalo da efflux pumpe u bakterijama mogu ostvariti smanjenu osjetljivost na antibiotike. Ipak, takvo smanjenje ne utječe trajno na razinu rezistencije na antibiotike.

Efflux transporter hvata željene supstrate iz fosfolipidnog dvosloja unutarnje membrane ili citoplazme, a nakon toga ih transportira u izvanstanični medij. Efflux pumpa igra važnu ulogu u antimikrobnoj otpornosti *A. baumannii*. Ti mehanizmi mogu biti specifični za jednu podlogu ili mogu transportirati niz različitih spojeva. Tako mogu izbacivati i antibiotike različitih kemijskih klasa. (11)



Slika 4. Građa i mehanizam rada efflux pumpe



Slika 5. *Acinetobacter* izoliran iz kliničkih uzoraka rezistentan na karbapeneme

*A. baumannii* se u Hrvatskoj pojavila 2002. godine. Otkrilo se da ova bakterija brzo razvija otpornost na različite antibiotike. Problem predstavlja njena sposobnost na dugotrajno preživljavanje izvan čovjeka ili životinja i to u nepovoljnim uvjetima. Klinički izolati *A. baumannii* u Hrvatskoj su vrlo otporni na antibiotike, čak i na karbapenemsku skupinu. Karbapenemi su antibiotici visoke učinkovitosti koji se koriste za liječenje infekcija uzrokovanih multirezistentnim bakterijama. Iz tog razloga je *A. baumannii*, prema procjeni Svjetske zdravstvene organizacije, na vrhu popisa patogena. Prioritet je razviti nove antibiotike kako bi se mogle bolje liječiti infekcije. (12)

„Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Služba za mikrobiologiju, sudjeluje u projektu Hrvatske zaklade za znanost Prirodno stanište klinički značajnih *Acinetobacter baumannii* koji se provodi radi šireg praćenja i epidemioloških istraživanja utjecaja otpada iz okoliša (npr. otpadnih voda) na rasprostranjivanje bakterije *A. baumannii* koja je višestruko otporna na lijekove.“ (12)

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je saznati kako i koliko isušivanje, sedam različitih sojeva, bakterije *Acinetobacter baumannii* utječe na njezin porast i stvaranje biofilma. Istražuje se preživljavanje i adhezija na plastičnoj podlozi. Bakterija je promatrana kroz vrijeme isušivanja od 14 dana.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Bakterijski sojevi**

U pokusima je korišteno 7 sojeva bakterije *Acinetobacter baumannii*. Korišteni sojevi su: ATCC 1605, 19606, 771, 54531, 56781, 53154, 555/214. Bakterije su čuvane u 10% glicerol bujonu na -80°C. Za kultivaciju je korišten Muller Hinton agar.

#### **3.2. Hranjive podloge**

- Mueller Hinton agar

Mueller i Hinton razvili su 1941. MH agar za izolaciju patogenih vrsta *Neisseria*. To je neselektivna i nediferencijalna podloga . To znači da će gotovo svi organizmi rasti na njemu. Sastoji se od:

- 2,00 g goveđeg ekstrakta
- 17,50 g kiselog hidroizolata kazeina
- 1,50 g škroba
- 17,00 g agara
- 1000 ml destilirane vode (13)

#### **3.3. Aparati**

- UV-VIS Eppendorf BioPhotometer

#### **3.4. Sušenje bakterija**

Bakterije su s podloge prenesene u sterilnu vodu u kojoj su otopljene i izmjerena im je gustoća fotometrom kako bi dobili jednake koncentracije kod svih sedam sojeva bakterije *Acinetobacter baumannii*.

Nakon toga, korištenjem prethodno pripremljenih uzoraka, na mikrotitar pločice nakapane su kapi od 20  $\mu$ l te su stavljene na sušenje u komoru za sterilni rad sa strujanjem zraka. Nakon jednog sata, pločice sa suhim bakterijama su prebačene na čuvanje na 35 °C.

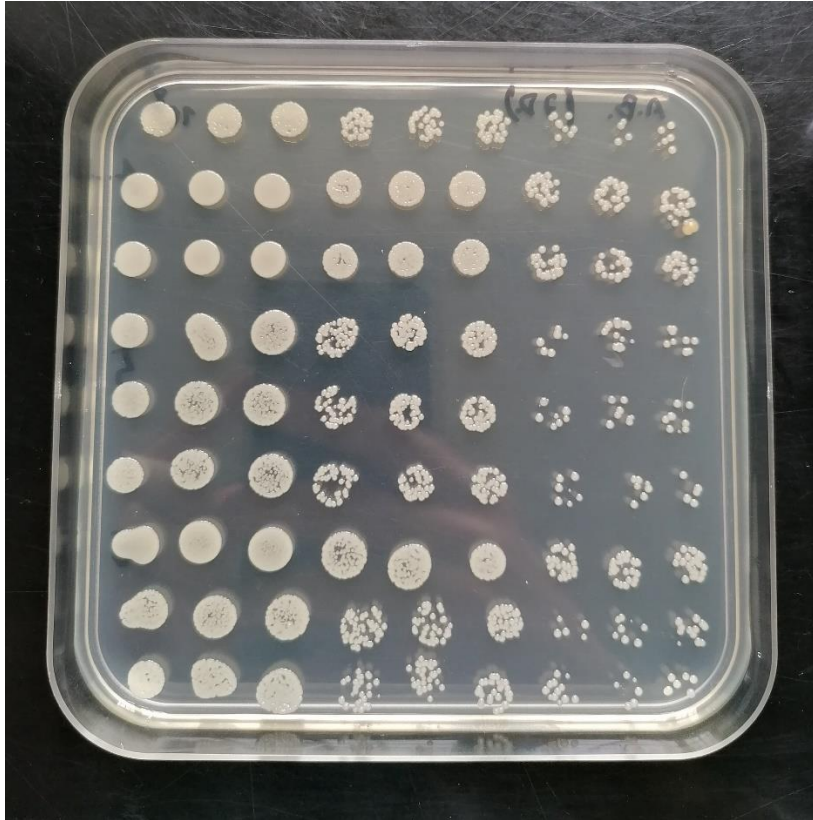
### 3.5. Metode rada

Suhe bakterije se uzimaju za provođenje postupka nakon 3, 7 i 14 dana. Postupak se provodi rehidracijom bakterija i njihovim stavljanjem na agar kako bi se provjerilo preživljavanje i stvaranje biofilma.

Prvi dio postupka se vršio tako da bi prvotno išla rehidracija s 200  $\mu$ l sterilne vodovodne vode. Rađena su po četiri razrijeđenja za svaku bakteriju kako bi se dobio bolji prikaz rezultata. Nakon toga ide nakapavanje na podlogu (kapi od 10  $\mu$ l). Podloge idu na inkubaciju 24 sata na 37 °C. Nakon toga slijedi očitavanje broja bakterijskih kolonija na podlogama i zabilježavanje rezultata.

Drugi dio pokusa je rađen tako da bi se suhe bakterije rehidrirale, nakon 3, 7 i 14 dana, ali umjesto prvotnog nakapavanja na podlogu, ostavljene su da adheriraju 24 sata na 35 °C. Nakon adhezije bakterije su ispirane fiziološkom otopinom kako bi se uklonile nečistoće. U takve ispirane jažice s bakterijama ubačeno je po 200  $\mu$ l fiziološke otopine i stavljeno na jednu minutu u ultrazvučnu kadu. Taj postupak se radi kako bi došlo do odvajanja svih bakterija koje su se slijepile na plastiku. Nakon tog postupka slijede 2 razrijeđenja i nakapavanje na podlogu (kapi od 10  $\mu$ l). Inkubacija 24 sata na 37 °C.

Nakon brojanja poraslih kolonija sve vrijednosti su zapisane i u krajnjim rezultatima su uzimane srednje vrijednosti kako bi rezultat bio što reprezentativniji.

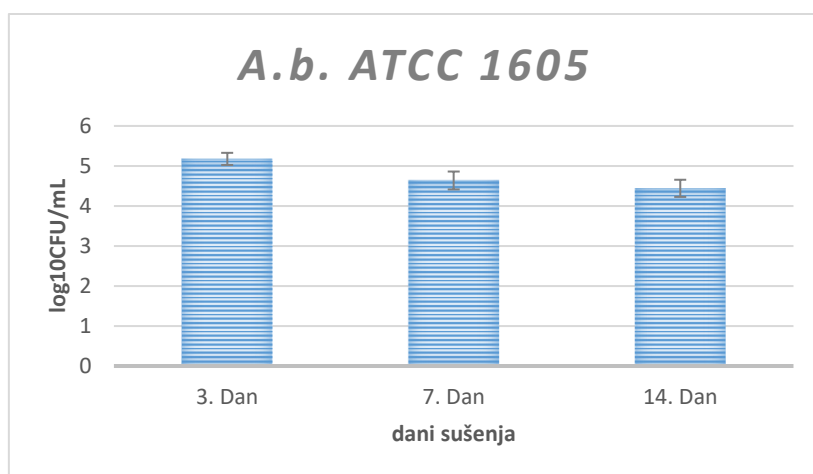


Slika 6. Porast *Acinetobacter baumannii* na MH agaru

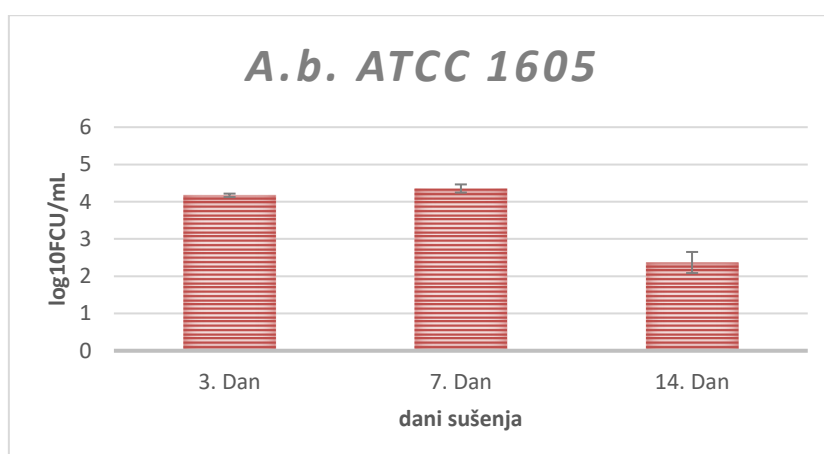
## 4. REZULTATI

Praćen je utjecaj sušenja na sposobnost preživljavanja i adhezije sedam sojeva *Acinetobacter baumannii*. Rehidrirane bakterije su nakapavane na čvrsti Mueller hinton agar. Nasađivanje na podloge je provođeno nakon 3, 7 i 14 dana kako bi se dobili kontinuirani rezultati utjecaja sušenja.

### 4.1. *A. baumannii*, soj ATCC 1605



**Graf 1.** Prikaz broja preživjelih bakterija nakon trećeg, sedmog i četrnaestog dana sušenja. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti ± standardna devijacija.

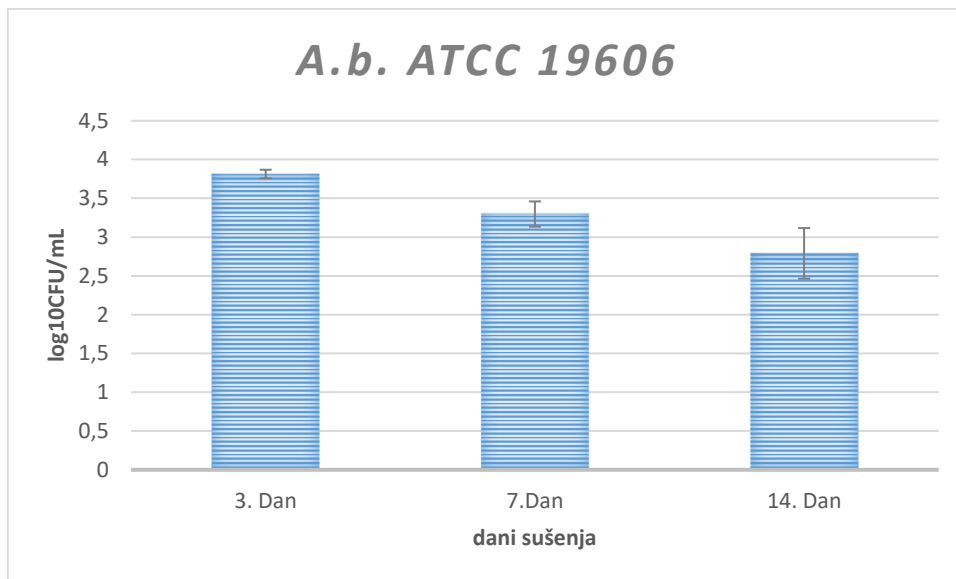


**Graf 2.** Prikaz broja preživjelih bakterija nakon tri, sedam i četrnaest dana sušenja i adhezije 24 sata. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti ± standardna devijacija.

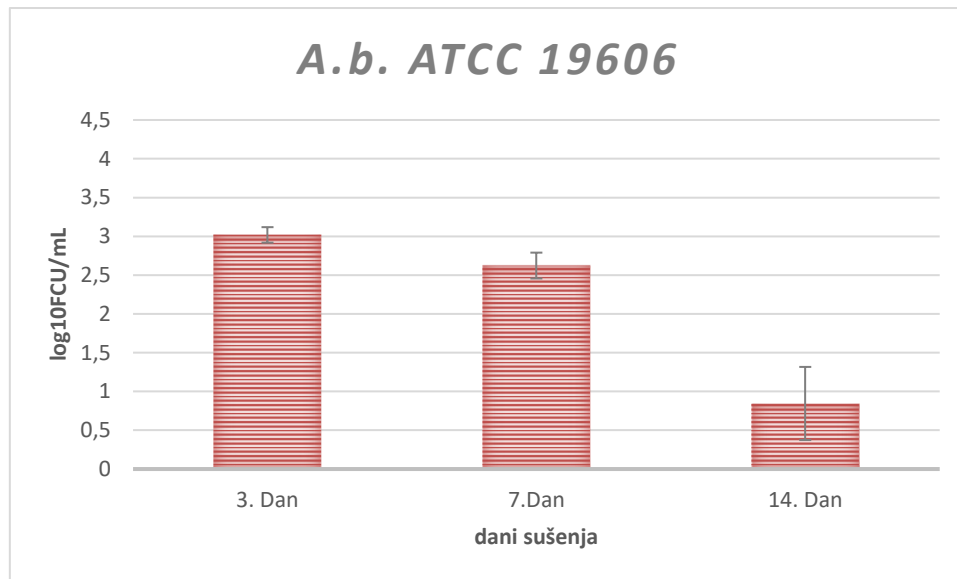


Na grafu 1. je vidljiv pad broja bakterija u periodu od 14 dana. Soju ATCC 1605 polako opada broj preživjelih bakterija sušenjem na plastičnoj podlozi. Iako se vidi razlika u broju, nije toliko značajna. Kod gafa 2. vidimo malo veći pad ako se usporede rezultati nakon 3 i 14 dana sušenja. Na grafu su prikazani rezultati adheriranih bakterija što nam govori da vrlo lako adheriraju i preživljavaju na plastičnoj podlozi.

#### 4.2. *A. baumannii*, soj ATCC 19606



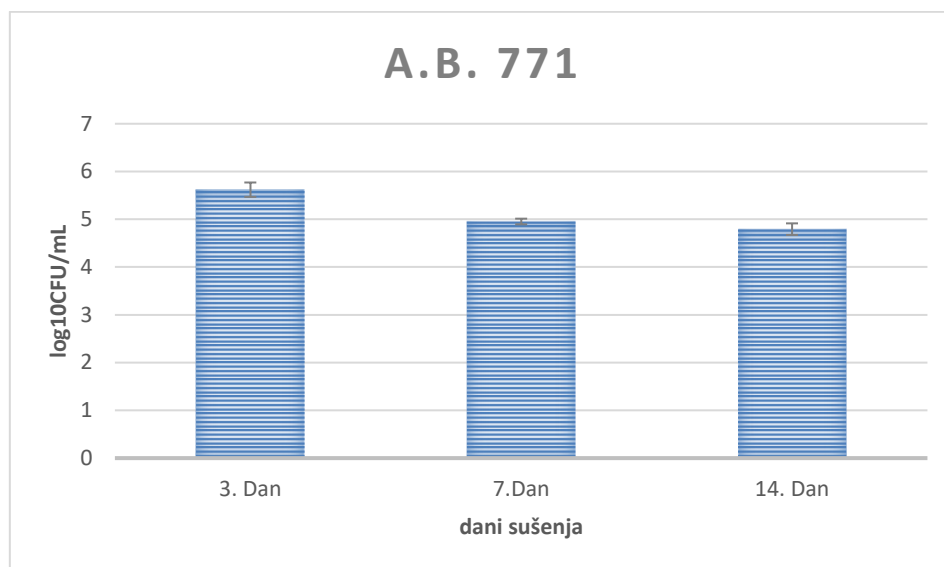
**Graf 3.** Prikaz broja preživjelih bakterija nakon trećeg, sedmog i četrnaestog dana sušenja. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija.



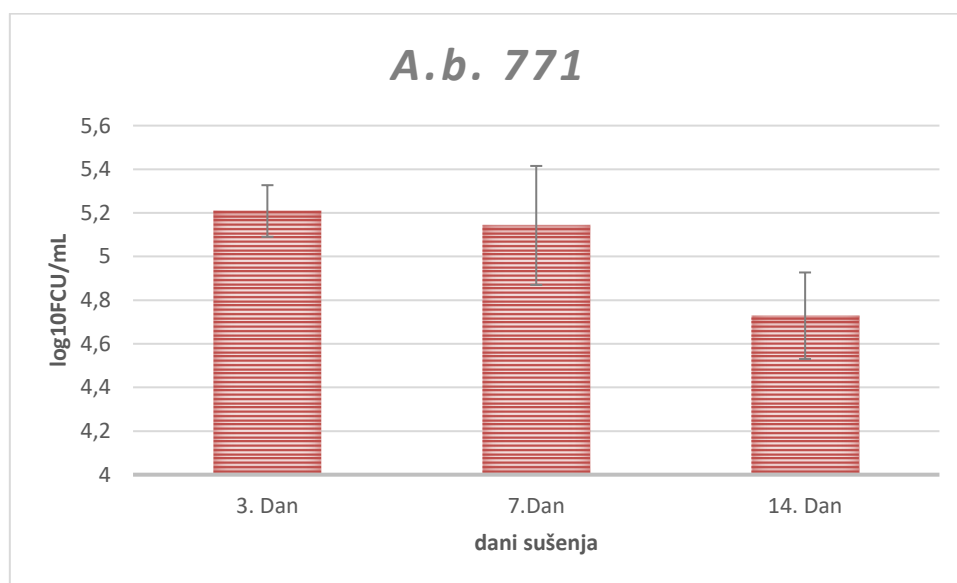
**Graf 4.** Prikaz broja preživjelih bakterija nakon tri, sedam i četrnaest dana sušenja i adhezije 24 sata. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija.

Na grafu 3. i 4. primjetan je pad broja bakterija soja ATCC 19606. Kod rezultata na grafu 3. vidimo postepen pad broja bakterija kako prolazi period od 14 dana. Dok je kod grafa 4. prikazan broj bakterija koje su preživjele adherirane na plastičnoj površini. Na 14. danu se vidi značajniji pad bakterijskih kolonija.

### 4.3. *A. baumannii*, soj 771



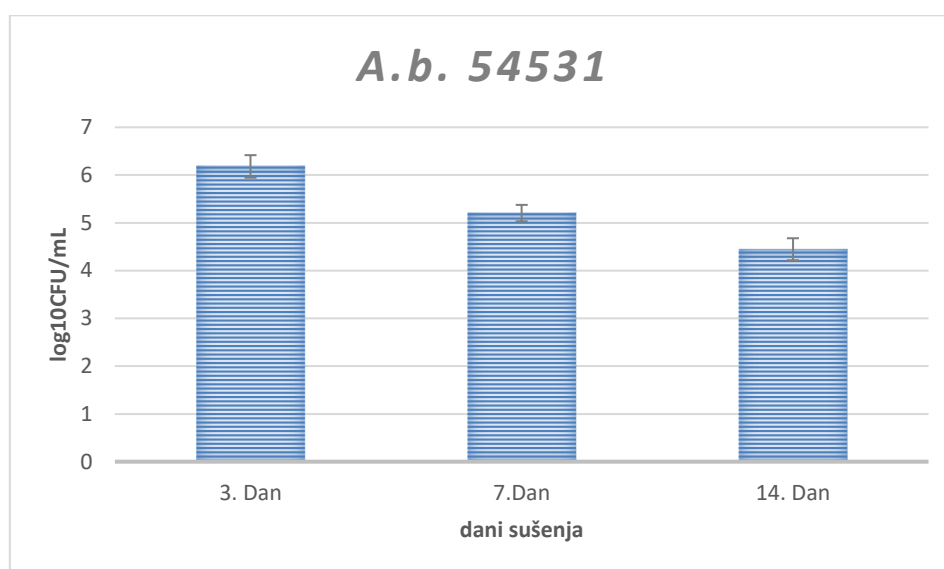
**Graf 5.** Prikaz broja preživjelih bakterija nakon trećeg, sedmog i četrnaestog dana sušenja. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija.



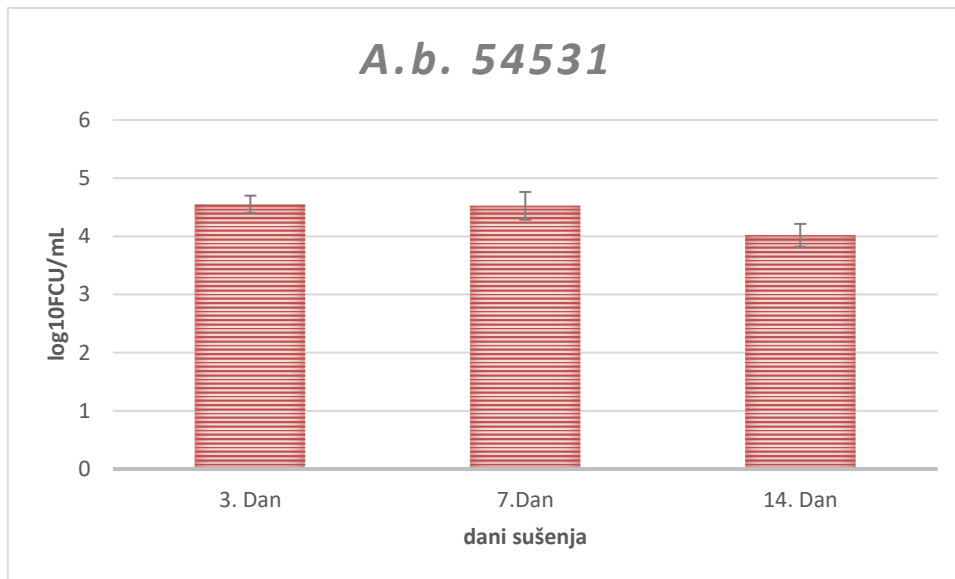
**Graf 6.** Prikaz broja preživjelih bakterija nakon tri, sedam i četrnaest dana sušenja i adhezije 24 sata. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija.

Na grafu 5. i 6. vidljiv je prikaz rezultata dobivenih za soj 771. Rezultati na grafu 5. prikazuju blagi pad broja bakterija po CFU. Ovaj soj se pokazao jako oporan na sušenje što je vidljivo po visokom porastu na stupcu koji označava 14. dan. U odnosu na predhodni graf, graf 6. pokazuje malo veći pad broja bakterija nakon adhezije. Taj broj je i dalje visok što se moglo vidjeti po gustoći rasta bakterijskih kolonija na podlozi.

#### 4.4. *A. baumannii*, soj 54531



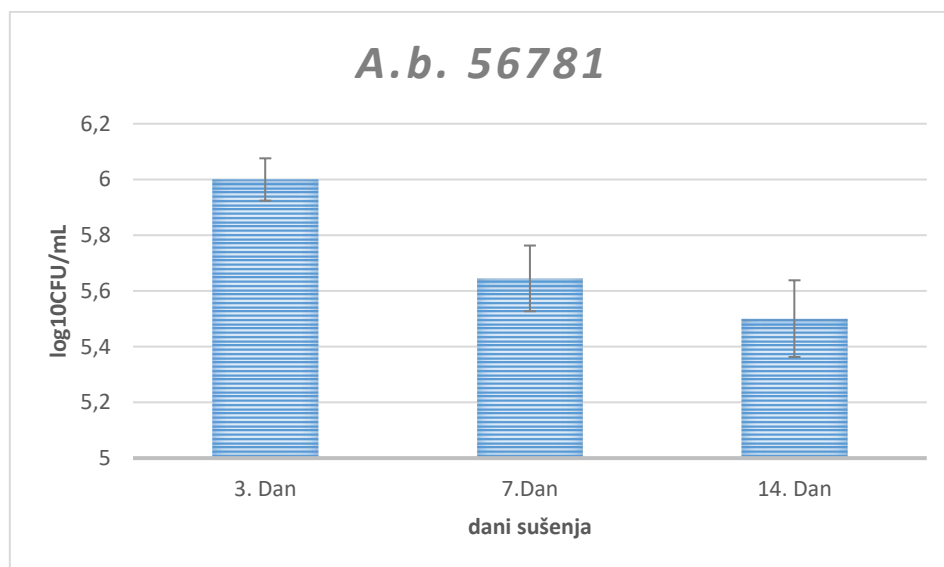
**Graf 7.** Prikaz broja preživjelih bakterija nakon trećeg, sedmog i četrnaestog dana sušenja. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija.



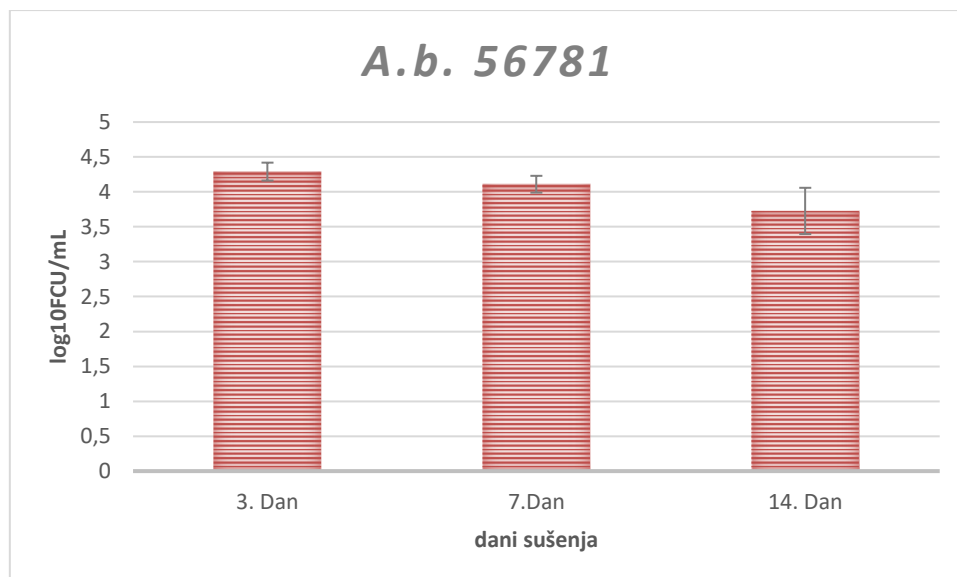
**Graf 8.** Prikaz broja preživjelih bakterija nakon tri, sedam i četrnaest dana sušenja i adhezije 24 sata. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija.

Na grafu 7. vidljiv je ravnomjeren pad broja bakterija u periodu od 14 dana. Soju 54531 postepeno opada broj preživjelih bakterija sušenjem na plastičnoj podlozi. Kod rezultata na grafu 8. vidljiv je minimalan pad broja preživjelih acinetobaktera. Ovaj prikaz nam daje uvid kako ovaj soj ima veliku tendenciju vezivanja na podlogu i tako preživljava sušenje.

#### 4.5. *A. baumannii*, soj 56781



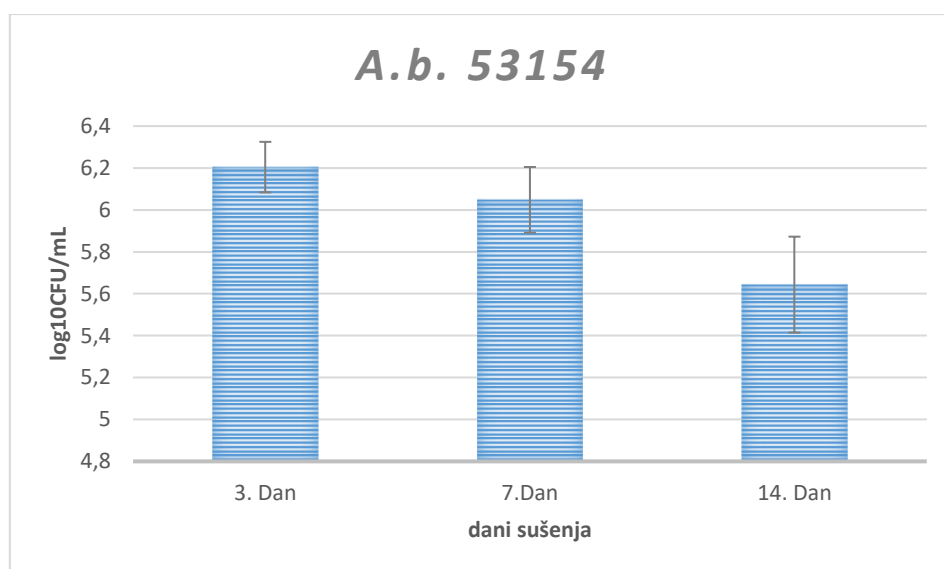
**Graf 9.** Prikaz broja preživjelih bakterija nakon trećeg, sedmog i četrnaestog dana sušenja. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti ± standardna devijacija.



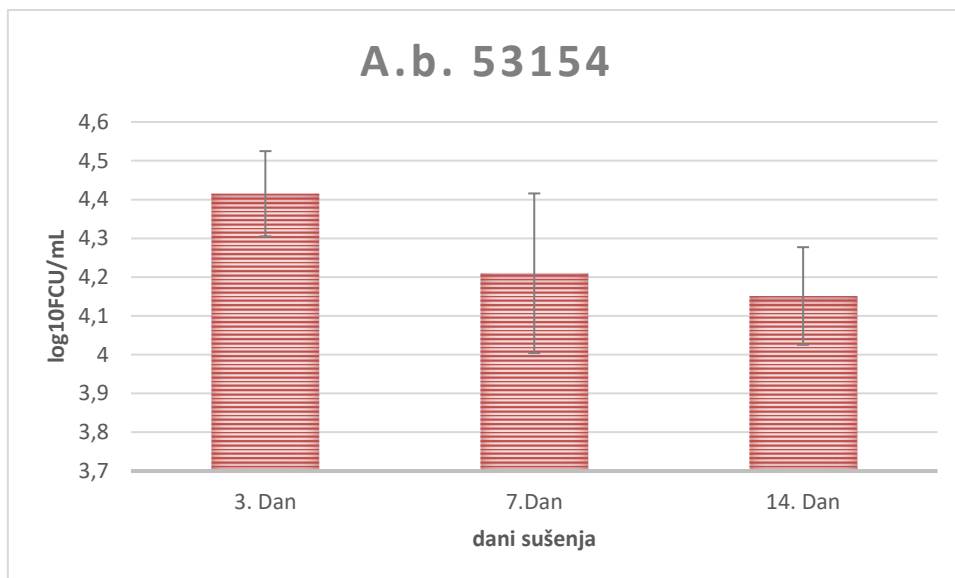
**Graf 10.** Prikaz broja preživjelih bakterija nakon tri, sedam i četrnaest dana sušenja i adhezije 24 sata. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti ± standardna devijacija.

Kod primjera soja 56781 na grafu 9. vidljiv je veći pad u periodu od 14 dana. Iako preživljava, uočljiv je veliki pad broja bakterija. Na grafu 10. ipak su vidljivi različiti konačni rezultati. U usporedbi ova dva grafa uočljivo je kako ovaj soj bolje preživljava nakon adhezije na plastičnoj podlozi.

#### 4.6. *A. baumannii*, soj 53154



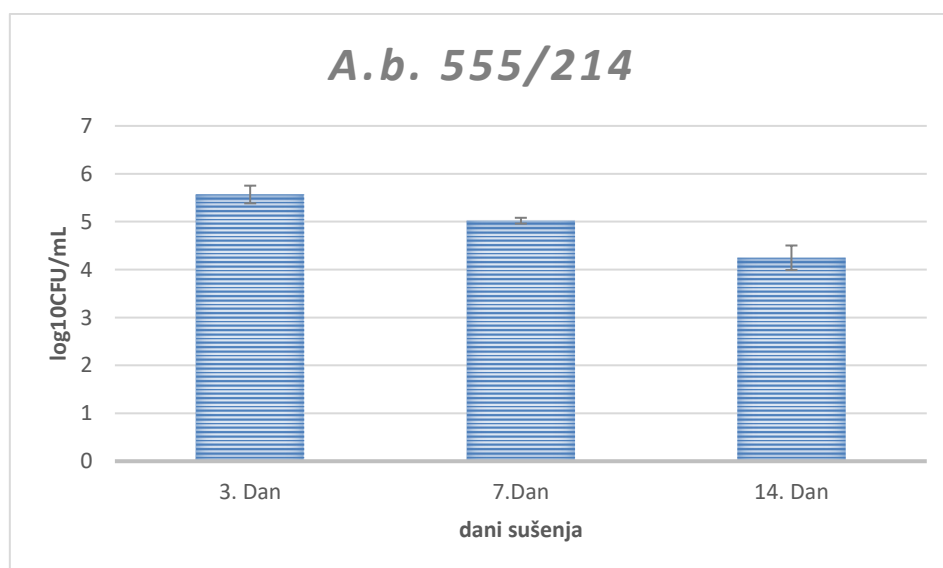
**Graf 11.** Prikaz broja preživjelih bakterija nakon trećeg, sedmog i četrnaestog dana sušenja. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti ± standardna devijacija.



**Graf 12.** Prikaz broja preživjelih bakterija nakon tri, sedam i četrnaest dana sušenja i adhezije 24 sata. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija.

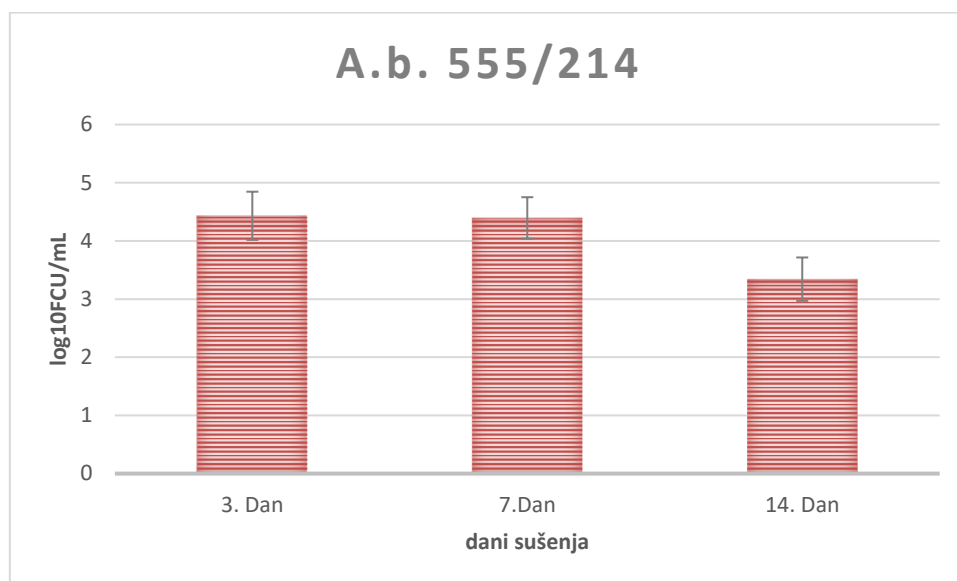
Na primjeru soja 53154 u oba grafa, graf 11. i 12., vidljiv je postupan pad broja bakterija. Na trećem danu su vidljivi visoki brojevi bakterija po CFU koji opadaju do 14. dana.

#### 4.7. *A. baumannii*, soj 555/214



**Graf 13.** Prikaz broja preživjelih bakterija nakon trećeg, sedmog i četrnaestog dana sušenja. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija.

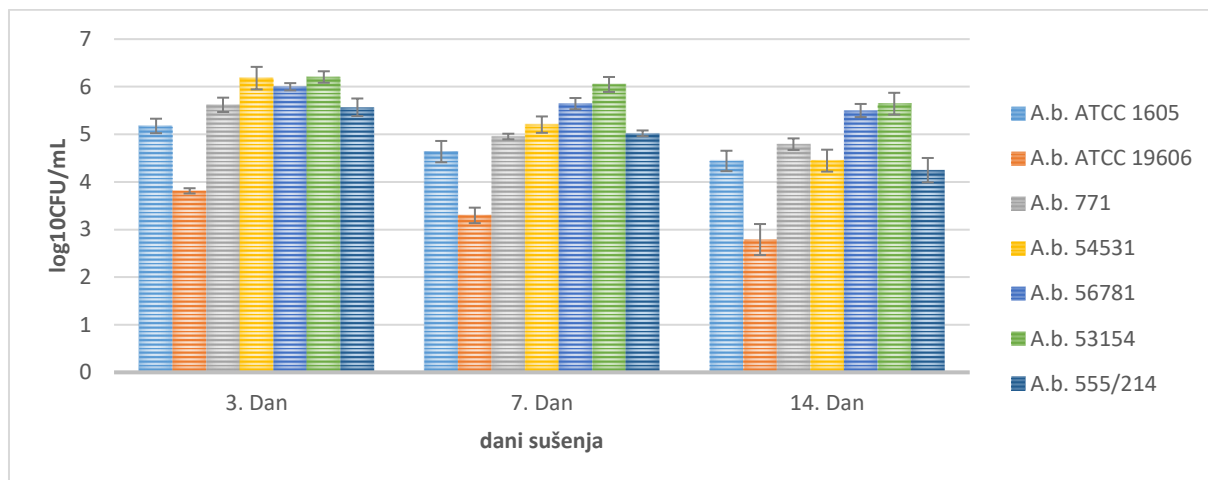




**Graf 14.** Prikaz broja preživjelih bakterija nakon tri, sedam i četrnaest dana sušenja i adhezije 24 sata. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija.

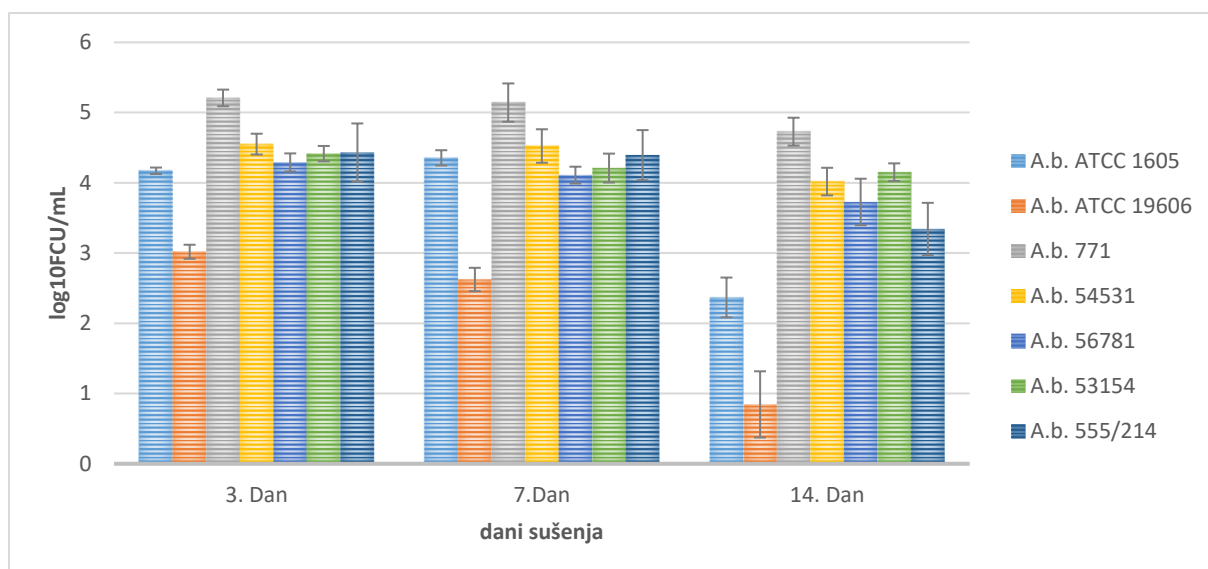
Na grafu 13. i 14. su prikazani rezultati porasta soja 555/214. Graf 13. daje uvid u stanje broja preživjelih bakterija u periodu od 14 dana. Vidljiv je pad broja bakterija kako dani sušenja prolaze. U slučaju rezultata na grafu 14. vidi se da je bakterija dosta otporna na isušivanje nakon adhezije na plastičnu podlogu.

#### 4.8. Ukupan prikaz rezultata svih korištenih sojeva *A. baumannii*



**Graf 15.** Prikaz broja preživjelih bakterija nakon trećeg, sedmog i četrnaestog dana sušenja, za sve korištene sojeve. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija.

Graf 15. daje uvid u ukupan broj preživjelih bakterija *Acinetobacter baumannii* u periodu od 14 dana. Na grafu je vidljiv otprilike sličan broj bakterija za sve sojeve osim kod soja ATCC 19606. Po podacima je od starta vidljiv slabiji porast tog soja što je bilo uočljivo i na podlogama. Ovi podatci daju na znanje kako je *A. baumannii* izrazito otporna na sušenje jer i nakon 14. dana ne vidi se preveliki pad broja bakterija koji bi imao zdravstveni značaj.



**Graf 16.** Prikaz broja preživjelih bakterija nakon tri, sedam i četrnaest dana sušenja i adhezije 24 sata, za sve korištene sojeve. Na grafu su prikazane srednje logaritamske vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija.

Na grafu 16. su prikazani podatci o broju preživjelih bakterija adheriranih na plastičnoj podlozi. Po broju bakterija se uočava isticanje soja 771 koji je pokazao veliku otpornost i mogućnost adhezije što je bilo vidljivo kod očitavanja porasta ovih bakterija na podlozi. Dok je suprotnost od njega soj ATCC 19606 koji je imao slabi porast od starta i jako slab porast nakon 14. dana u usporedbi sa svim ostalim sojevima.

## 5. RASPRAVA

Rod bakterija *Acinetobacter* ima više različitih vrsta, ali *A. baumannii* ima najvažniji poznati klinički značaj. Acinetobakter se može naći u tlu i vodi. Kod pacijenata se često uzgaja iz urina, sline, respiratornih sekreta i otvorenih rana. Uobičajeno ovaj rod bakterija ima nisku virulenciju, ali je sve važniji jer izazva infekcije kod imunokompromitiranih pacijenata. Kako većina infekcija acinetobakterima ima tendenciju grupnim izbijanjima potrebna je izrazito velika pažnja kod izolacije ove bakterije.

Čimbenici rizika za infekciju bakterijom *Acinetobacter* su: boravak na odjelu intenzivne njege, dugotrajno izlaganje antibioticima, umjetna mehanička ventilacija, upotreba centralnog venskog katetera i hemodijaliza.

Iz navedenog se vidi da *Acinetobacter* uzrokuje najveće probleme u bolničkim sredinama. Stoga je važno pripaziti na gore navedene rizike i pokušati ih izbjeći što je više moguće. (14)

*Acinetobacter baumannii* pojavio se 1980 – ih godina kao problematičan patogen. Došlo je do porasta virulencije i poteškoće u liječenju zbog rezistencije na lijekove. Već tada su počeli biti jedan od najvažnijih prijetnji ljudskom zdravlju. Stjecanje rezistencije na karbapeneme, koji predstavljaju glavne antimikrobne lijekove za liječenje multirezistentnih infekcija, povećava se među sojevima *A. baumannii*. To dovodi do dodatnog otežavanja problema bolničkih infekcija. Razlog tome je izuzetna genetska plastičnost koja rezultira sposobnošću rezistencije na antimikrobne lijekove. (15)

Polimiksini su vrsta antibiotika otkrivena 1950-ih i napuštena 1980-ih zbog toksičnosti. Trenutno se koriste kao lijekovi prve linije protiv karbapenem otpornih *A. baumannii* (CRAB). Polimiksini imaju snažno in vitro djelovanje protiv *A. baumannii* ali pate od nedostatka klinički relevantnih granica osjetljivosti. Pored toga mogu dovesti i do ozbiljnih nuspojava poput nefrotoksičnosti i neurotoksičnosti. Terapije na bazi polimiksina daleko su od sigurnih i učinkovitih za liječenje ovih bolničkih infekcija.

Razni novi lijekovi se koriste u istraživanjima nad rezistentnim sojevima *Acinetobacter baumannii*, ali niti jednom još nije sa sigurnošću potvrđena djelotvornost. Cefiderocol će vjerojatno biti prvi od novijih lijekova korištenih protiv CRAB-a. Njegova in vitro učinkovitost protiv različitih sojeva daje mnogo nade. (16)

Stvaranje biofilma postalo je glavno obilježje patogeneze za *A. baumannii* koji čini organizam otpornim na više lijekova. Većina *A. baumannii* ima pile koji utječu na ekspresiju gena i omogućuju izgradnju zaštitne kapsule kao odgovor na antibiotike. Mnogi izvještaji govore da quorum sensing igra važnu ulogu u stvaranju biofilma kod acinetobaktera. To je način komunikacije među bakterijama radi održavanja gustoće naseljenosti, obično proizvodnjom signalnih molekula. Te molekule su spojevi slični hormonima, koji su odgovorni za regulaciju pokretljivosti, stvaranje biofilma i druge karakteristike. (17)

Kao što je već istaknuto, sposobnost *A. baumannii* da raste kao biofilm predstavlja važan faktor virulencije. Podatci govore da može zadržati ili čak povećati svoj kapacitet za formiranje biofilma ako se rehidrira nakon 60 dana sušenja. Uočena je i brza prilagodba na temperaturni pomak i na dostupnost hranjivih tvari. U drugim studijama, biofilmovi koje je formirao multi rezistentni *A. baumannii* pokazali su znatno veliku otpornost na isušivanje i djelovanje uobičajenih dezinficijensa, kao što su etanol, klorid i klorheksidin. Treba napomenuti da sojevi ove bakterije koji izazivaju infekcije pokazuju značajno veći potencijal proizvodnje biofilma u usporedbi s onima koji potječu s koloniziranih mjesta. U istraživanju je otkriveno da sojevi koji imaju sposobnost proizvodnje biofilma, koloniziraju respiratorni trakt dulje vrijeme od onih koji ne mogu formirati biofilm. Tijekom kolonizacije pokazali su značajno društveno ponašanje promičući kolonizaciju s drugim vrstama bakterija, najviše *S. aureus*. Interakcija i povezivanje *A. baumannii* s drugim bakterijskim vrstama mogla bi uistinu rezultirati povećanom patogenosti. (2)

Većina studija o *A. baumannii* fokusira se na kliničke značajke, a rijetko koja istraživanja govore o mikrobiološkim karakteristikama koje se koriste za napredovanje ovog mikroorganizma od žarišne do infekcije krvotoka. Većina studija uzima na usporedbu sojeve otporne na karbapenem. U ovom istraživanju (18) se izolati rezistentni na karbapenem ne razlikuju značajno gledajući odnos između bakterijskih pneumonia i ne bakterijskih pneumonia. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da pacijenti koji su podvrgnuti operaciji mogu lakše razviti bakterijsku pneumoniju u usporedbi s kontrolnom skupinom (ne operirani). To može biti uzrokovano mehaničkom ventilacijom, zaostalim učincima anestetika ili nedovoljnim kašljem, koju su stekli kirurški pacijenti. Ti problemi rezultiraju kolonizacijom određenih sojeva acinetobaktera koji zahvaćaju pluća. Potreban je rani nadzor i uklanjanje tih kolonija kako bi došlo do lakšeg i bržeg ozdravljenja pacijenta. (18)

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da *Acinetobacter baumannii* nema problem kod preživljavanja na plastičnoj podlozi. Otporan je na utjecaj sušenja tako da tvori biofilm i zaštititi

se od tog vanjskog, nepovoljnog, uvjeta. Kroz 14 dana testiranja acinetobakter je pokazao blagi pad u broju preživjelih bakterija. Svih sedam sojeva je preživilo i opstalo adheriranjem na podlogu. Takvi rezultati su se mogli i očekivati jer su za uzorke uzeti sojevi iz kliničkih sredina, koji su značajno otporni.

Zaključno se može shvatiti da je *Acinetobacter baumannii* izrazito otporna bakterija koja će i dalje praviti probleme. Najviše tih problema je u bolničkoj sredini i kod imunokompromitiranih osoba. Kako nema specifičnog lijeka, potrebno je redovno čišćenje, dezinfekcija i sterilizacija površina i uređaja da bi spriječili infekcije ovom bakterijom. Uz sve to treba konstantno provoditi kontrolu površina na postojanje ove rezistentne bakterije.

## 6. ZAKLJUČAK

Svih sedam sojeva *A. baumannii* korištenih u ovom istraživanju su pokazali otpornost na isušivanje u periodu od 14 dana. Najveću otpornost je pokazao soj 771 koji u adheriranom obliku preživljava bez značajnog pada broja bakterija. Najmanju mogućnost preživljavanja u biofilmu je pokazao soj ATCC 19606, koji je imao najveći pad broja bakterija u odnosu na druge korištene sojeve.

Korišteni izolati lako adheriraju na plastičnu podlogu i tako razvijaju bolju otpornost na vanjski utjecaj, u ovom slučaju sušenje. Sušenje na 35 °C se nije pokazalo korisnim u smislu uništavanja biofilma kod ovih bakterija.

## 7. LITERATURA

1. E Bergogne-Bérézin, K J Towner. Affiliations expand, *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features, DOI: 10.1128/CMR.9.2.148
2. Arianna Pompilio, Daniela Scribano, Meysam Sarshar, et al. Hold together in a biofilm: The *Acinetobacter baumannii* way
3. Paolo Visca, Harald Seifert, Kevin J Towner. *Acinetobacter* infection--an emerging threat to human health, DOI: 10.1002/iub.534
4. Michael A Olu-Taiwo, Japheth A Opintan, Francis Samuel Codjoe, Akua Obeng Forson. Metallo-Beta-Lactamase-Producing *Acinetobacter* spp. from Clinical Isolates at a Tertiary Care Hospital in Ghana, DOI: 10.1155/2020/3852419
5. Agnese Lupo, Marisa Haenni, Jean-Yves Madec. Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0007-2017
6. Hamuel James Doughari, Patrick Alois Ndakidemi, Izanne Susan Human, Spinney Benade. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview, DOI: 10.1264/jsme2.me10179
7. Jennifer M Colquhoun, Philip N Rather. Insights Into Mechanisms of Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* and Implications for Uropathogenesis, DOI: 10.3389/fcimb.2020.00253
8. Chang-Ro Lee, Jung Hun Lee, Moonhee Park, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options, DOI: 10.3389/fcimb.2017.00055
9. Rosalino Vázquez-López, Sandra Georgina Solano-Gálvez, Juan José Juárez Vignon-Whaley, et al. *Acinetobacter baumannii* Resistance: A Real Challenge for Clinicians, DOI: 10.3390/antibiotics9040205
10. Michael J McConnell, Luis Actis, Jerónimo Pachón. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models, DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x
11. Seyyed Naser Abdi, Reza Ghotaslou, Khudaverdi Ganbarov, et al. *Acinetobacter baumannii* Efflux Pumps and Antibiotic Resistance, DOI: 10.2147/IDR.S228089



12. Pristupljeno u rujnu 2021. godine: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/acinetobacter-baumannii-bakterija-visestruko-otporna-na-lijekove/>
13. Pristupljeno u rujnu 2021. godine: <https://microbiologyinfo.com/mueller-hinton-agar-mha-composition-principle-uses-and-preparation/>
14. Mark F. Brady, Zohaib Jamal, Najwa Pervin. Acinetobacter, Bookshelf ID: NBK430784
15. Maria Soledad Ramirez, Robert A Bonomo, Marcelo E Tolmasky. Carbapenemases: Transforming Acinetobacter baumannii into a Yet More Dangerous Menace, DOI: 10.3390/biom10050720
16. Burcu Isler, Yohei Doi, Robert A Bonomo, David L Paterson. New Treatment Options against Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii Infections, DOI: 10.1128/AAC.01110-18
17. Carole Ayoub Moubareck, Dalal Hammoudi Halat. Insights into Acinetobacter baumannii: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen, DOI: 10.3390/antibiotics9030119
18. Yunfang Tan, Kai Zhou, Xiang Tang, et al. Bacteremic and non-bacteremic pneumonia caused by Acinetobacter baumannii in ICUs of South China: A Clinical and Microbiological Study, DOI: 10.1038/s41598-017-13148-y

## 8. POPIS SLIKA

Slika 1. (A), Bojanje po Gramu *Acinetobacter baumannii* u stacionarnoj fazi, prikazani kokoidni i kokobacilarni oblici. (B) i (C), skenirajuća elektronska mikrofotografija sojeva A. baumannii AYE i ACICU, <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iub.534>, pristupljeno u rujnu 2021. godine

Slika 2. Tablični prikaz otpornosti rezistentnog *Acinetobacter* na određene antibiotike u ukupnom broju uzoraka n – 315. [https://www.researchgate.net/figure/Antibiotic-resistance-pattern-of-Acinetobacter-baumannii-total-315\\_tbl1\\_295546193](https://www.researchgate.net/figure/Antibiotic-resistance-pattern-of-Acinetobacter-baumannii-total-315_tbl1_295546193), pristupljeno u rujnu 2021. godine

Slika 3. Prikaz biofilma *Acinetobacter baumannii* na elektronskom mikroskopu. (A), jaka formacija biofilma; (B), slabija formacija biofilma. <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/10/1849>, pristupljeno u rujnu 2021. godine

Slika 4. Građa i mehanizam rada efflux pumpe. [https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-an-RND-efflux-pump-The-figure-shows-a-scheme-of-the-structure-of-the-E\\_fig1\\_235406575](https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-an-RND-efflux-pump-The-figure-shows-a-scheme-of-the-structure-of-the-E_fig1_235406575) pristupljeno u rujnu 2021. godine

Slika 5. *Acinetobacter* izoliran iz kliničkih uzoraka rezistentan na karbapeneme. <https://www.semanticscholar.org/paper/Carbapenem-Resistant-Acinetobacter-baumannii-Bae-Jeong/2ae630654c5aa7684a414bd137b44f5bdd6a3a7b> DOI: 10.1128/AAC.01464-06, pristupljeno u rujnu 2021. godine

Slika 6. Porast *Acinetobacter baumannii* na MH agaru. Fotografija: Toni Ćustić

## 9. POPIS TABLICA

Tablica 1. Neke vrste roda *Acinetobacter* i njihova staništa. <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iub.534>, pristupljeno u rujnu 2021. godine

## **10. ŽIVOTOPIS**

Ime i prezime: Toni Ćustić

Datum rođenja: 11.09.1998.

Ime oca i majke: Siniša i Jagoda

Mjesto rođenja: Zadar, Hrvatska

Adresa: Vukovarska ulica 35 Murvica, Poličnik

E-mail: toni.custic1@gmail.com

Školovanje:

2005. – 2013. Osnovna škola Smiljevac, Zadar

2013. – 2017. Medicinska škola Ante Kuzmanića, Zadar, Sanitarni tehničar

2017. – 2022. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Preddiplomski studij sanitarnog inženjerstva