

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Bojana J. Luković

**Fenotipske i genotipske karakteristike sojeva
Acinetobacter baumannii izolovanih u bolnicama
sekundarnog i tercijarnog nivoa u Republici Srbiji**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE

MEDICAL FACULTY

Bojana J. Luković

**Phenotypic and genotypic characteristics of
Acinetobacter baumannii strains isolated from
secondary and tertiary care hospitals in Serbia**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

Mentor:

Prof. dr Lazar Ranin

Mikrobiolog, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Komisija:

Prof. dr Nataša Vučković Opavski

Mikrobiolog, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Vera Mijač

Mikrobiolog, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Marina Milenković

Mikrobiolog, redovni profesor Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Branislava Kocić

Mikrobiolog, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

Prof. dr Aleksandra Šmitran

Mikrobiolog, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banja Luci

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Zahvalnost i poštovanje izražavam svom mentoru Prof. dr Lazaru Raninu na velikoj pomoći pruženoj u svim fazama izrade ove doktorske disertacije, moralnoj podršci, savetima i sugestijama pri izradi rada.

Zahvaljujem Doc. dr Ini Gajić na pomoći pri izboru teme, stručnim savetima i dragocnim smernicama u sagledavanju principa naučno istraživačkog rada, konkretnoj pomoći nesebično ukazanoj u svim fazama izrade ove doktorske disertacije, stalnom angažmanu, moralnoj podršci i brizi da se rad završi.

Zahvaljujem Dr Ivici Dimkiću na snažnoj podršci, pomoći i usmerenju ka multidisciplinarnom pristupu neophodnom za izradu ove teze.

Zahvaljujem dragim profesorkama, članicama komisije: Prof. dr Nataši Opavski, Prof. dr Marini Milenković, Prof. dr Branislavi Kocić i Prof. dr Aleksandri Šmitran na podršci i savetima koji su pomogli da se rezultati obrađeni u ovoj tezi mogu jasno sagledati.

Zahvaljujem se svojim kolegicama sa specijalizacije: Dr Tatjani Pozder, Dr Aniti Sente Žigmanović, Dr Sanji Zornić i Dr Svetlani Radisavljević na pomoći u prikupljanju bakterijskih izolata i podršci svake vrste.

Hvala mojim roditeljima na razumevanju i bezrezervnoj podršci.

Zahvaljujem se svima koji su doprineli da izrada ove teze bude podstrek za moj budući rad.

Bojana Luković

Fenotipske i genotipske karakteristike sojeva *Acinetobacter baumannii* izolovanih u bolnicama sekundarnog i tercijarnog nivoa u Republici Srbiji

SAŽETAK

Uvod: Poslednjih godina dolazi do dramatičnog porasta rezistencije *Acinetobacter baumannii* na karbapeneme i klonskog širenja karbapenem rezistentnih *A. baumannii* (CRAB) sojeva širom sveta.

Metod: U ovoj studiji analizirani su klinički uzorci pacijenata hospitalizovanih širom Srbije tokom 2018. godine. Kriterijum za uključivanje sojeva u studiju bila je izolacija nerepetitivnih bakterija Acb kompleksa iz kliničkih uzoraka inficiranih pacijenata. *A. baumannii* je identifikovan detekcijom *blaOXA-51* gena. Testiranje osetljivosti na antibiotike izvršeno je disk difuzionom i bujon mikrodilucionom metodom. CRAB izolati su testirani na prisustvo stečenih karbapenemaza (OXA-24, OXA-23, OXA-58, OXA-143, IMP, VIM, GIM, SPM, SIM, NDM, GES i KPC) PCR metodom i Sangerovim sekvenciranjem. Klonska povezanost kliničkih izolata ispitana je PFGE, MLST i WGS metodom.

Rezultati: Od testiranih 280 bakterija Acb kompleksa njih 237 identifikovano je kao *A. baumannii*. Prevalencija CRAB izolata iznosila je 93,7%. Iako su izolati pokazali visoku osetljivost na kolistin (95,7%) i tigeciklin (75,1%), deset sojeva je bilo panrezistentno. Detektovani su sledeći geni koji kodiraju stečene karbapenemaze: *blaOXA-24* (44,2%), *blaOXA-23* (34,5%) i *blaNDM-1* (3,2%). PFGE je definisao šest različitih klastera. MLST analizom CRAB izolatima su dodeljena tri tipa sekvence: ST2, ST492 i ST636. WGS je ukazao na visok stepen genetičke srodnosti testiranih sojeva koji se grupišu u četiri glavna klastera.

Zaključak: Ova studija svedoči o visokoj prevalenciji rezistencije *A. baumannii* na karbapeneme. Ona je rezultat prisustva *blaOXA-72*, *blaOXA-23* i *blaNDM-1* gena među CRAB izolatima i njihove klonske propagacije u bolnicama širom Srbije.

Ključne reči: *Acinetobacter baumannii*, CRAB, *blaOXA-23*, *blaOXA-72*, *blaNDM-1*, ST492, ST636

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

Phenotypic and genotypic characteristics of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from secondary and tertiary care hospitals in Serbia

ABSTRACT

Background: The worldwide emergence and clonal spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) is of great concern.

Methods: Non-redundant clinical samples obtained from hospitalized patients throughout Serbia were included in the multicenter study conducted in 2018. Acb complexes recovered from clinical samples obtained from inpatients with confirmed bacterial infections were further evaluated for the presence of *A. baumannii*. Identification to the species level was done by the detection of the *bla*OXA-51 gene. Susceptibility testing was done by disk diffusion and broth microdilution method. CRAB isolates were tested for the presence of acquired carbapenemases (OXA-24, OXA-23, OXA-58, OXA-143, IMP, VIM, GIM, SPM, SIM, NDM, GES and KPC) by PCR and Sanger sequencing. Clonal relatedness was assessed by PFGE, MLST and WGS.

Results: Overall, *A. baumannii* was identified in 237 out of 280 Acb complex (84.6%). CRAB prevalence was found to be 93.7%. Although susceptibility was high for colistin (95.7%) and tigecycline (75.1%), ten isolates were classified as pandrug-resistant. The following carbapenemases-encoding genes were found: *bla*OXA-24 (44.2%), *bla*OXA-23 (34.5%) and *bla*NDM-1(3.2%). PFGE analysis revealed six different clusters. MLST analysis identified three STs: ST2, ST492 and ST636. WGS suggested high genetic relatedness among the tested isolates belonging to the four clusters.

Conclusion: This study revealed extremely high proportions of carbapenem resistance among *A. baumannii* clinical isolates due to the emergence of *bla*OXA-72, *bla*OXA-23, and *bla*NDM-1 genes among CRAB isolates in Serbia and their clonal propagation.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, CRAB, *bla*OXA-23, *bla*OXA-72, *bla*NDM-1, ST492, ST636

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Molecular medicine

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Istorijat bakterija roda <i>Acinetobacter</i>	1
1.2. Taksonomija i klasifikacija bakterija roda <i>Acinetobacter</i>	1
1.3. Identifikacija bakterija roda <i>Acinetobacter</i>	2
1.4. Rasprostranjenost <i>A. baumannii</i>	3
1.4.1. <i>A. baumannii</i> u vanbolničkoj sredini	3
1.4.2. <i>A. baumannii</i> u bolničkoj sredini	3
1.5. Bolničke infekcije izazvane bakterijom <i>A. baumannii</i>	6
1.6. Patogenost i faktori virulencije <i>A. baumannii</i>	6
1.6.1. Proteini spoljašnje membrane (porini)	9
1.6.2. Delovi ćelijskog zida - LPS i kapsula	9
1.6.3. Otpornost na dezinficijense i isušivanje	10
1.6.4. Produkcija biofilma i međubakterijska komunikacija	10
1.6.5. Pile	11
1.6.6. Proteinski sekretorni sistemi	11
1.6.7. Enzimi	11
1.6.8. Sistemi preuzimanja mikroelemenata	12
1.7. Osetljivost <i>A. baumannii</i> na antibiotike	12
1.8. Genska osnova rezistencije <i>A. baumannii</i> na antibiotike	13
1.9. β -laktamaze identifikovane kod vrste <i>A. baumannii</i>	16
1.10. Genska osnova rezistencije <i>A. baumannii</i> na karbapeneme	16
1.10.1. Oksacilinaze	17
1.10.2. Karbapenemaze iz MBL klase	19
1.10.3. Klasa A karbapenemaza po Ambleru kod vrste <i>A. baumannii</i>	20
1.10.4. Molekularna epidemiologija karbapenemaza produkujućih <i>A. baumannii</i> bolničkih izolata u Republici Srbiji	20
1.11. Molekularna tipizacija i populaciona struktura bolničkih izolata <i>A. baumannii</i>	21
1.11.1. PFGE	22
1.11.2. MLST	22
1.11.3. Sekvenciranje celog genoma	23
1.11.4. Populaciona struktura bolničkih izolata <i>A. baumannii</i>	23
1.12. Terapijske opcije za lečenje infekcija izazvanih CRAB sojevima	26
1.13. Vakcine	26
2. Ciljevi istraživanja	28
3. Materijal i metode	29
3.1. Poreklo <i>Acinetobacter spp.</i> bolničkih izolata	29
3.2. Identifikacija <i>A. baumannii</i> i konzervisanje sojeva	29
3.2.1. Izolacija bakterijske DNK	30
3.2.2. Merenje prinosa DNK	30
3.2.3. Prajmeri korišćeni za umnožavanje <i>bla</i> OXA-51 gena koji kodira urođenu OXA-51karbapenemazu	30
3.2.4. Konzervisanje <i>A. baumannii</i> sojeva	32
3.3. Test osetljivosti na antibiotike	32
3.3.1. Disk difuzioni metod antibiograma	32

3.3.2.	Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije.....	33
3.3.3.	Kategorizacija <i>A. baumannii</i> na multirezistentne, ekstenzivno rezistentne i panrezistentne izolate	33
3.4.	Fenotipska detekcija produkcije metalo β -laktamaza primenom imipenem-EDTA kombinovanog disk testa.....	34
3.5.	Detekcija gena koji kodiraju stečene oksacilinaze.....	35
3.5.1.	Prajmeri korišćeni za umnožavanje gena koji kodiraju stečene oksacilinaze.....	35
3.5.2.	Reakcije lančanog umnožavanja za detekciju <i>blaOXA-23</i> , <i>blaOXA-24</i> , <i>blaOXA-58</i> i <i>blaOXA-143</i> gena	35
3.6.	Detekcija gena koji kodiraju metalo β -laktamaze.....	36
3.6.1.	Prajmeri korišćeni za umnožavanje gena koji kodiraju stečene metalo β -laktamaze	36
3.6.2.	Reakcije lančanog umnožavanja za detekciju <i>blaIMP</i> , <i>blaVIM</i> , <i>blaGIM</i> , <i>blaNDM</i> , <i>blaSPM</i> i <i>blaSIM</i> gena	37
3.7.	Detekcija gena koji kodiraju β -laktamaze klase A po Ambleru	38
3.7.1.	Prajmeri korišćeni za umnožavanje gena koji kodiraju β -laktamaze klase A po Ambleru	38
3.7.2.	Reakcije lančanog umnožavanja za detekciju <i>blaTEM</i> , <i>blaSHV</i> , <i>blaVEB</i> , <i>blaPER</i> , <i>blaGES</i> , <i>blaKPC</i> i <i>blaCTX-M</i> gena	39
3.8.	Detekcija insercione sekvence <i>ISAbal</i>	41
3.8.1.	Prajmeri korišćeni za umnožavanje <i>ISAbal</i>	41
3.8.2.	Reakcija lančanog umnožavanja za detekciju <i>ISAbal</i>	42
3.9.	Sekvenciranje <i>blaOXA</i> i <i>blaMBL</i> gena.....	42
3.9.1.	Prečišćavanje PCR produkta.....	43
3.9.2.	Reakcija cikličnog sekvenciranja.....	43
3.9.3.	Precipitacija produkta cikličnog sekvenciranja izopropanolom	44
3.9.4.	Denaturacija	44
3.9.5.	Kapilarna elektroforeza.....	44
3.9.6.	Određivanje genskih varijanti ili alela	45
3.10.	PFGE	45
3.10.1.	Priprema bakterijskih sojeva i formiranje kalupa	45
3.10.2.	Liza ćelija u kalupu i ispiranje gelova	46
3.10.3.	Digestija restrikcionim enzimom i punjenje gela	46
3.10.4.	Gel-elektroforeza u pulsnom polju	46
3.10.5.	Analiza PFGE profila.....	47
3.11.	MLST.....	47
3.11.1.	Umnožavanje sedam visoko konzerviranih gena CRAB izolata metodom PCR ...	47
3.11.2.	Prečišćavanje PCR produkta.....	49
3.11.3.	Reakcija cikličnog sekvenciranja.....	49
3.11.4.	Precipitacija i denaturacija produkta cikličnog sekvenciranja izopropanolom.....	49
3.11.5.	Kapilarna elektroforeza.....	49
3.11.6.	Određivanje tipa sekvence	49
3.12.	Sekvenciranje celog genoma	50
3.13.	Statistička obrada rezultata.....	50
4.	Rezultati.....	51
4.1.	Učestalost izolacije <i>A. baumannii</i> u bolnicama u Republici Srbiji.....	51

4.2.	Učestalost rezistencije bolničkih izolata <i>A. baumannii</i> na antibiotike.....	54
4.3.	Prevalencija multirezistentnih, ekstenzivno rezistentnih i panrezistentnih izolata <i>A. baumannii</i> u bolnicama sekundarnog i tercijarnog nivoa u Republici Srbiji.....	56
4.4.	Detekcija gena koji kodiraju β -laktamaze klase A, B i D i njihova distribucija u bolnicama u Republici Srbiji.....	58
4.5.	Detekcija genske sekvence <i>ISAbal</i>	62
4.6.	Fenotipske i genotipske karakteristike sojeva <i>A. baumannii</i> izolovanih iz primarno sterilnih i kolonizovanih regija.....	63
4.7.	Molekularna tipizacija CRAB izolata.....	64
4.7.1.	PFGE analiza.....	64
4.7.2.	MLST analiza.....	64
4.7.3.	Sekvenciranje <i>blaOXA</i> i <i>MBL</i> gena.....	65
4.8.	Sekvenciranje celog genoma.....	67
4.8.1.	Karakteriste sekvenciranih genoma.....	67
4.8.2.	Genetička sličnost sekvenciranih genoma.....	69
4.8.3.	Geni koji kodiraju rezistenciju na antibiotike.....	75
4.8.4.	Geni koji kodiraju faktore virulencije.....	75
5.	Diskusija.....	77
6.	Zaključci.....	89
7.	Literatura.....	90

1. Uvod

1.1. Istorijat bakterija roda *Acinetobacter*

Istorijat roda *Acinetobacter* vezan je za 1911. godinu, u kojoj Holandski mikrobiolog Beijerinck na podlozi sa kalcijum-acetatom iz zemljišta izoluje bakteriju nazvanu *Micrococcus calcoaceticus* (Beijerinck, 1911). U prvoj polovini dvadesetog veka otkrivaju se srodne bakterijske vrste koje dobijaju različite nazive: *Bacterium anitratum*, *Moraxella glucidolytica*, *Neisseria winogradskyi*, *Alcaligenes haemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii* (Henriksen, 1973). Naziv roda *Acinetobacter* (Grčka reč *akinetos* - nepokretan) predlažu Brisou i Prevot 1954. godine, kako bi se razlikovale nepokretne od pokretnih bakterija roda *Achromobacter* (Brisou i Prevot, 1954). Njihov predlog postaje široko prihvaćen tek 1968. godine, nakon obimnog istraživanja koje su sproveli Baumann i saradnici, gde su pokazali da su sve gorenavedene bakterijske vrste pripadnice istog roda *Acinetobacter* (Baumann i sar., 1968). Internacionalni komitet za nomenklaturu bakterija uvrstio je 1971. godine u porodicu *Neisseriaceae*, uz rodove *Neisseria*, *Moraxella* i *Branhamella* i rod *Acinetobacter* sa samo jednom vrstom *Acinetobacter calcoaceticus* (Lessel, 1971).

1.2. Taksonomija i klasifikacija bakterija roda *Acinetobacter*

Danas *Acinetobacter spp.* taksonomski pripada porodici *Moraxellaceae*, redu *Pseudomonadales*, klasi *Gammaproteobacteria* i kolu *Proteobacteria* (Juni E, 2005).

Bakterije roda *Acinetobacter* su striktno aerobne, asporogene i nepokretne. Gram negativni bacili u stacionarnoj fazi rasta poprimaju sferične, kokoidne forme. Raspoređuju se u parovima ili lancima različite dužine. Kako se teško odbojavaju, mogu se pogrešno dijagnostikovati kao Gram pozitivne ili negativne koke. Kultivišu se na standardnim laboratorijskim hranljivim podlogama. Kolonije su najčešće glatke i nepigmentovane, a kod inkapsuliranih sojeva se javljaju mukoidne forme. Nefermentativne su, katalaza pozitivne i oksidaza negativne (Juni E, 2005).

Kako fenotipskim testovima nije bilo moguće precizno diferencirati vrste roda *Acinetobacter*, napredak u razvoju molekularnih tehnika, posebno studija hibridizacije dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) ili DNK-DNK homologije čitavih genoma doveo je i do rasvetljavanja složene taksonomije *Acinetobacter spp.* (Visca i sar., 2011). Trenutno se u rodu *Acinetobacter* nalazi 65 imenovanih vrsta, kao i 13 novootkrivenih vrsta čija imena još uvek nisu zvanično prihvaćena (www.bacterio.net/acinetobacter.html).

Za četiri genetski blisko povezane vrste: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter pittii* i *Acinetobacter nosocomialis*, zbog poteškoća u diferenciranju fenotipskim testovima predložen je zajednički naziv *A. calcoaceticus - baumannii complex* (Acb kompleks) (Visca i sar., 2011; Peleg i sar., 2008). Nedavno su Acb kompleksu ili grupi dodate dve nove vrste *Acinetobacter seifertii* i *Acinetobacter dijkshoorniae* (Vijayakumar i sar., 2019). Pošto kompleks obuhvata pet uzročnika kako bolničkih, tako i vanbolničkih infekcija (*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii* i *A. dijkshoorniae*) ali i saprofitnu vrstu *A. calcoaceticus*, najčešće izolovanu iz zemljišta i vode, u kliničkom radu se nameće potreba

precizne identifikacije ovih bakterija. Značajan napredak u identifikaciji klinički značajnih vrsta *Acinetobacter spp.* nastao je razvojem jednostavnih molekularnih tehnika koje se mogu primeniti u rutinskom radu kliničkih laboratorija (Vijayakumar i sar., 2019).

1.3. Identifikacija bakterija roda *Acinetobacter*

Preliminarna identifikacija do nivoa roda može se izvršiti na osnovu sledećih osobina: Gram-negativni, katalaza-pozitivni, oksidaza-negativni, nepokretni, nefermentujući kokobacili. Vrste izolovane iz kliničkih uzoraka pri inkubaciji na 37°C pokazuju dobar rast na standardnim laboratorijskim podlogama formirajući glatke ili mukoidne krem-bele kolonije promera 1.5- 3 mm, dok vrste koje ne pripadaju Acb kompleksu ne rastu uvek na McConkey agaru ili formiraju sitnije transparentne kolonije. Za razliku od vrsta koje pripadaju Acb kompleksu, *Acinetobacter haemolyticus*, kao i *Acinetobacter* genovrste 6, 13BJ, 14BJ, 15BJ, 16 i 17 dovode do hemolize ovčijih eritrocita prilikom inkubacije na krvnom agaru (Peleg i sar., 2008).

Nema pojedinačnog metaboličkog testa kojim se može razlikovati *Acinetobacter spp.* od ostalih nefermentujućih Gram negativnih bakterija. Jednostavnim fenotipskim testovima koji se koriste u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici ne mogu se razlikovati ni sve genovrste unutar roda *Acinetobacter*. Složenu identifikacionu paletu od 28 fenotipskih testova predložili su 1986. godine Bouvet i Grimont (Bouvet i Grimont, 1986), a 1987. godine su istu pojednostavili na manji broj testova: sposobnost rasta na 37°, 41° i 44°C, sposobnost fermentacije glukoze, hidrolize želatina i asimilacije 14 različitih izvora ugljenika (Bouvet i Grimont, 1987). Pojednostavljenom paletom testova identifikovano je 95,6% od 136 *Acinetobacter* izolata uzorkovanih sa kože čoveka (Seifert i sar., 1997). Ipak, ovako dizajniranom šemom se teško diferenciraju vrste unutar samog Acb kompleksa, kao i novootkrivene genovrste, a sama paleta testova je zahtevna za izvođenje u rutinskom radu pa se zadržala samo u pojedinim referentnim laboratorijama. Dijagnostičke laboratorije se opredeljuju za mnogo bržu fenotipsku identifikaciju i/ili testiranje osetljivosti izolata na antibiotike u komercijalnim automatizovanim ili poluautomatizovanim sistemima kao što su API 20NE, Vitek 2, Phoenix i MicroScan WalkAway. Ovakvi sistemi zbog limitirane baze podataka, kao i metaboličkih supstrata koji nisu dizajnirani samo za identifikaciju acinetobaktera takođe pokazuju ograničenja u identifikaciji vrsta. Poseban problem je razlikovanje klinički značajnih vrsta Acb kompleksa koje se najčešće identifikuju kao *A. baumannii* (Peleg i sar., 2008).

Molekularne metode pokazuju mnogo veću preciznost u razlikovanju vrsta roda *Acinetobacter*. Zlatni standard u molekularnoj dijagnostici su decenijama unazad bile metode DNK-DNK hibridizacije, odnosno homologije ili poređenja čitavih bakterijskih genoma, rezervisane za retke referentne laboratorije. Zbog komplikovanog izvođenja danas se češće koriste metode bazirane na sekvenciranju čitavih genoma, ili pojedinačnih DNK sekvenci, poput 16S subjediničice ribozomalne ribonukleinske kiseline (16S rRNK) ili gena koji kodira β -subjediničicu RNK polimeraze, *rpoB* gena. Sekvenciranje 16S rRNK pokazalo se pouzdanim za identifikaciju roda *Acinetobacter*, dok je sekvenciranje *rpoB* gena visoko diskriminativna tehnika za identifikaciju vrsta acinetobaktera. Za identifikaciju vrste *A. baumannii* kao pouzdan marker pokazao se gen koji kodira β -laktamazu - oksacilinazu OXA-51 (engl. β -lactamase - oxacillinase OXA-51 gene, *bla*OXA-51), karbapenemazu urođeno prisutnu kod vrste *A. baumannii* (Vijayakumar i sar., 2019).

1.4. Rasprostranjenost *A. baumannii*

1.4.1. *A. baumannii* u vanbolničkoj sredini

A. baumannii je ubikvitarna bakterija. Može kolonizovati kako živu, tako i neživu sredinu. Izolovan je iz tla natopljenog naftnim derivatima, zemljišta u baštama, stajskog đubriva, sa povrtarskih kultura, iz uzgajališta škampa i riba, svežeg mesa, mleka i sira, kanalskih otpadnih voda, sa mobilijara u parkovima (Eveillard i sar., 2013; Hrenovic i sar., 2016; Rafei i sar., 2015).

Kako je *A. baumannii* jedan od najčešćih mikroorganizama izolovanih iz traumatskih rana osoba koje su preživele prirodne katastrofe poput zemljotresa ili cunamija, kao i otvorenih rana vojnika u područjima zahvaćenim ratnim sukobima, postavljene su pretpostavke da je izvor infekcije bilo zemljište ili vodena sredina. Vremenom su istraživanja pokazala da su rane kontaminirane prilikom pružanja pomoći na terenu ili u privremenim bolnicama (Dijkshoorn i sar., 2005; Eveillard i sar., 2013).

A. baumannii retko kolonizuje zdrave osobe u vanbolničkoj sredini. Studije sprovedene u Evropi pokazale su nisku prevalenciju kolonizacije kože (0,5% - 3%), dok je procenat nešto viši u vlažnim tropskim područjima, poput Hong Konga (4%) (Berlau i sar., 1999; Chu i sar., 1999.; Seifert i sar., 1997). Niska prevalencija fekalnog kliconoštva *A. baumannii* (0,9%) zabeležena je kod zdravih osoba iz Velike Britanije i Holandije (Dijkshoorn i sar., 2005).

Osim humane populacije, *A. baumannii* kolonizuje i životinje. U studiji sprovedenoj u Škotskoj nađena je niska prevalencija (1,2%) kolonizacije kože i sluznica zdravih životinja (krava i svinja) porekla sa različitih farmi, a namenjenih za ishranu ljudi (Hamouda i sar., 2011). U Libanu je nađena nešto veća prevalencija (8%) kolonizacije oralne i rektalne sluznice različitih domaćih i divljih životinja koje nisu imale prethodni kontakt sa veterinarskim klinikama (Rafei i sar., 2015).

1.4.2. *A. baumannii* u bolničkoj sredini

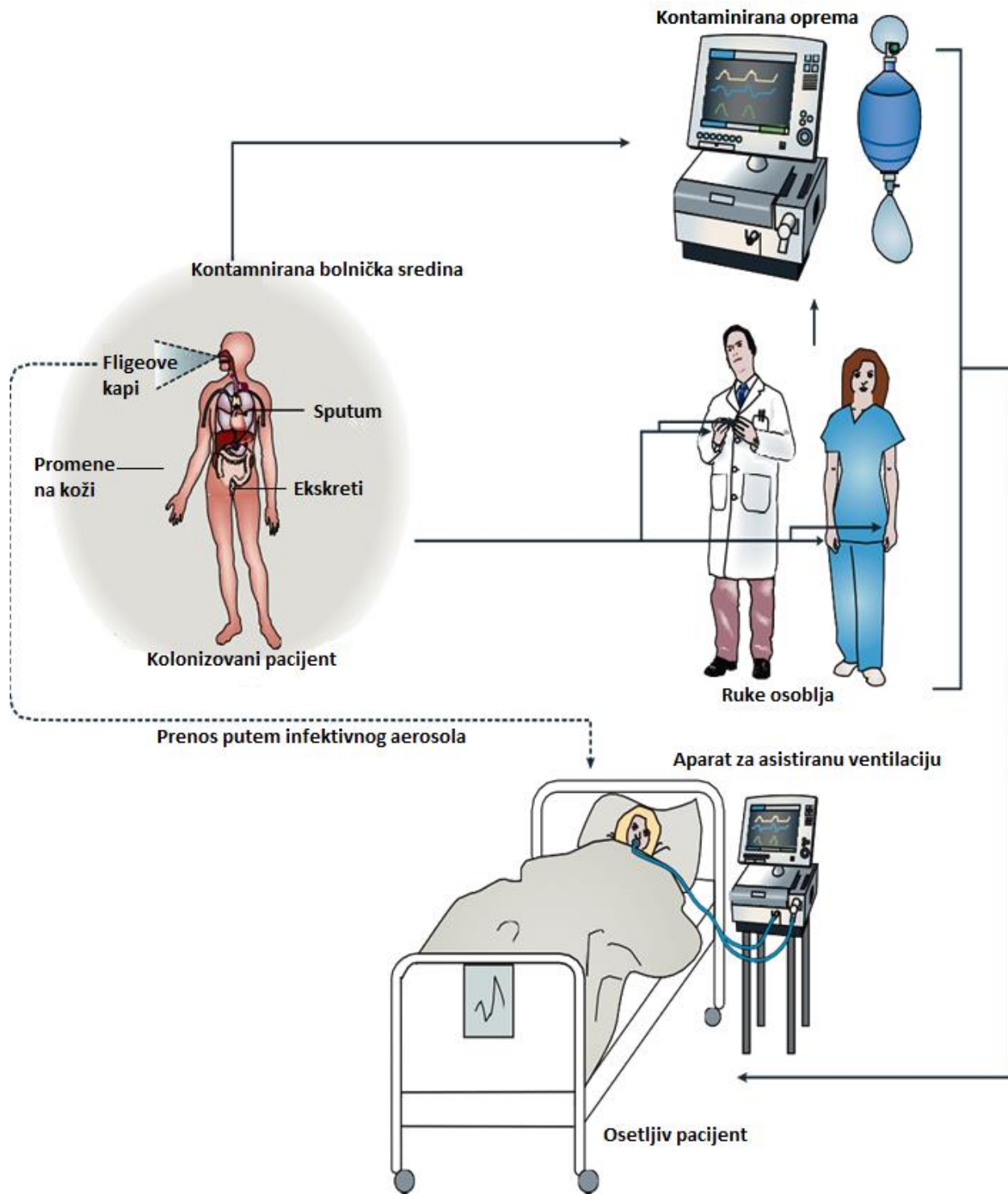
A. baumannii je tipičan nozokomijalni patogen čija pojava u bolnici pokazuje endemski ili epidemijski karakter (Dijkshoorn i sar., 2005). Epidemijski soj u bolničku sredinu najčešće dospeva sa kolonizovanim pacijentom, sa koga se dalje širi na ostale pacijente, osoblje ili neživu sredinu (Slika 1).

Put prenosa sa kolonizovanog na ostale pacijente ili bolničku sredinu može biti direktnim kontaktom sa infektivnim aerosolom, promenama na koži ili ekskretima, ali je daleko češći prenos rukama zaposlenih u bolnici (Dijkshoorn i sar., 2005).

A. baumannii u značajnom procentu kolonizuje sluzokože respiratornog i gastrointestinalnog trakta hospitalizovanih. Corbella i saradnici pokazali su da prevalencija fekalnog kliconoštva već u prvoj nedelji boravka pacijenata u jedinicama intenzivne nege dostiže 71% (Corbella i sar., 1996). Jednogodišnja španska studija pokazala je visok procenat kolonizacije sluzokože respiratornog trakta (71%) hospitalizovanih u jedinicama intenzivne nege (Cisneros i sar., 1996). Visoka prevalencija nosilaštva *A. baumannii* na koži i sluzokožama sestara i lekara zabeležena je u hirurškim (30%) i neonatološkim (28,57%) jedinicama intenzivne nege (Hershan i sar., 2014).

Neživa sredina može postati značajan sekundarni rezervoar infekcije u bolnici. Epidemijski sojevi *A. baumannii* izolovani su sa bolesničkih kreveta, dušeka, jastuka, stolova i stolica, lavaboa, zatim iz ventilacionih sistema, sa tastatura, kao i sa različite medicinske opreme (laringoskopi, respiratori, infuzioni sistemi, stetoskopi, skeneri) (van den Broek i sar., 2006). Dokumentovana je sposobnost *A. baumannii* da preživi isušivanje i opstane na suvim površinama. U nemačkoj studiji medijana preživljavanja na staklu za 39 definisanih epidemijskih bolničkih sojeva bila je 27,2 dana (Jawad i sar., 1998).

Napredak u otkrivanju i praćenju populacione strukture epidemijskih sojeva metodama molekularne epidemiologije doveo je do zaključka da su bolnički izolati *A. baumannii* najčešće multirezistentni (eng. *multidrug resistant*, MDR). Zbog uspešnog preživljavanja i efikasne kolonizacije brojnih površina pod različitim uslovima, rezistencije na pojedine dezinficijense i antibiotike, *A. baumannii* se poslednjih godina ubraja u tzv. preteće patogene (engl. *emerging pathogen*) (Peleg i sar., 2008).



Slika 1: Transmisija *A. baumannii* u bolničkoj sredini

(preuzeto i modificovano iz Dijkshoorn i sar., 2005)

1.5. Bolničke infekcije izazvane bakterijom *A. baumannii*

A. baumannii je uzročnik infekcija kože i mekih tkiva, rana, urinarnih infekcija i sekundarnog meningitisa, kao i bakterijemije/sepse i pneumonije povezane sa asistiranom ventilacijom (engl. *ventilator-associated pneumonia*, VAP) (Dijkshoorn i sar., 2005).

U bolničkoj sredini, odeljenja sa najvećim rizikom za razvoj infekcija izazvanih bakterijom *A. baumannii* su jedinice intenzivne nege. Infekcije su češće kod pacijenata oslabljenog imuniteta, sa hroničnim bolestima i malignitetima ili kod prevremeno rođene dece. U riziku su i pacijenati sa značajnim traumatskim povredama ili opekotinama, osobe podvrgnute hiruškim i invazivnim procedurama, sa aplikovanim kateterima ili tubusima. U faktore rizika spadaju i prethodne hospitalizacije, dugotrajan boravak u bolnici i primena empirijske antibiotske terapije (Dijkshoorn i sar., 2005; Visca i sar., 2011).

A. baumannii se najčešće izoluje iz respiratornog trakta i uzoraka rana, a zatim slede uzorci krvi, urina i likvora (Rosales-Reyes i sar., 2017; Wang i sar., 2015).

U jedinicama intenzivne nege najčešće kliničke manifestacije su pneumonija povezana sa asistiranom ventilacijom i sepsa (Dijkshoorn i sar., 2005), koje sa sobom nose visoku stopu mortaliteta (34-63,3%) (Cisneros i sar., 1996; Čiginskienė i sar., 2019).

Infekcije rana najčešće su povezane sa ozbiljnim opekotinama ili traumom (Visca i sar., 2011). Takođe su opisane infekcije ratnih rana nastale tokom zbrinjavanja na terenu u vojnim bolnicama (Scott i sar., 2007).

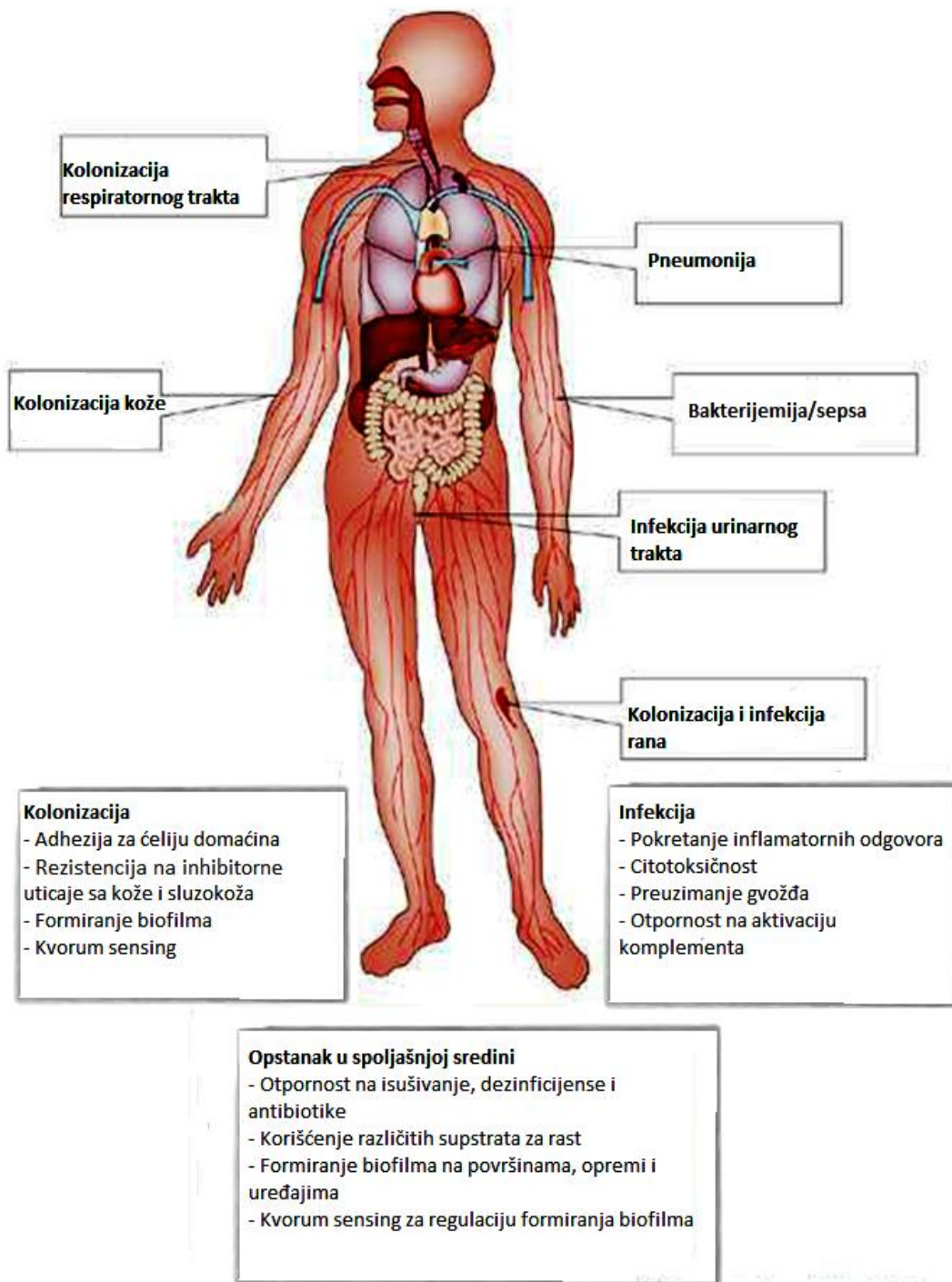
Pacijenti sa plasiranim urinarnim kateterom razvijaju infekcije mokraćnog sistema, koje češće prate dugotrajne hospitalizacije pacijenata na odeljenjima van jedinica intenzivne nege, poput rehabilitacionih centara i najčešće su benignog toka (Dijkshoorn i sar., 2005).

Karakteristična klinička manifestacija kod pacijenata operisanih na odeljenjima neurohirurgije jeste meningitis povezan sa ugradnjom cerebro-spinalnog šanta (Siegman-Igra i sar., 1993).

Analiza sedamnaest mečovanih kohortnih i studija slučajeva i kontrola pokazala je značajan porast atributivnog mortaliteta (7,8-43%) kod pacijenata inficiranih *A. baumannii* (Falagas i sar., 2006; Falagas i sar. 2007).

1.6. Patogenost i faktori virulencije *A. baumannii*

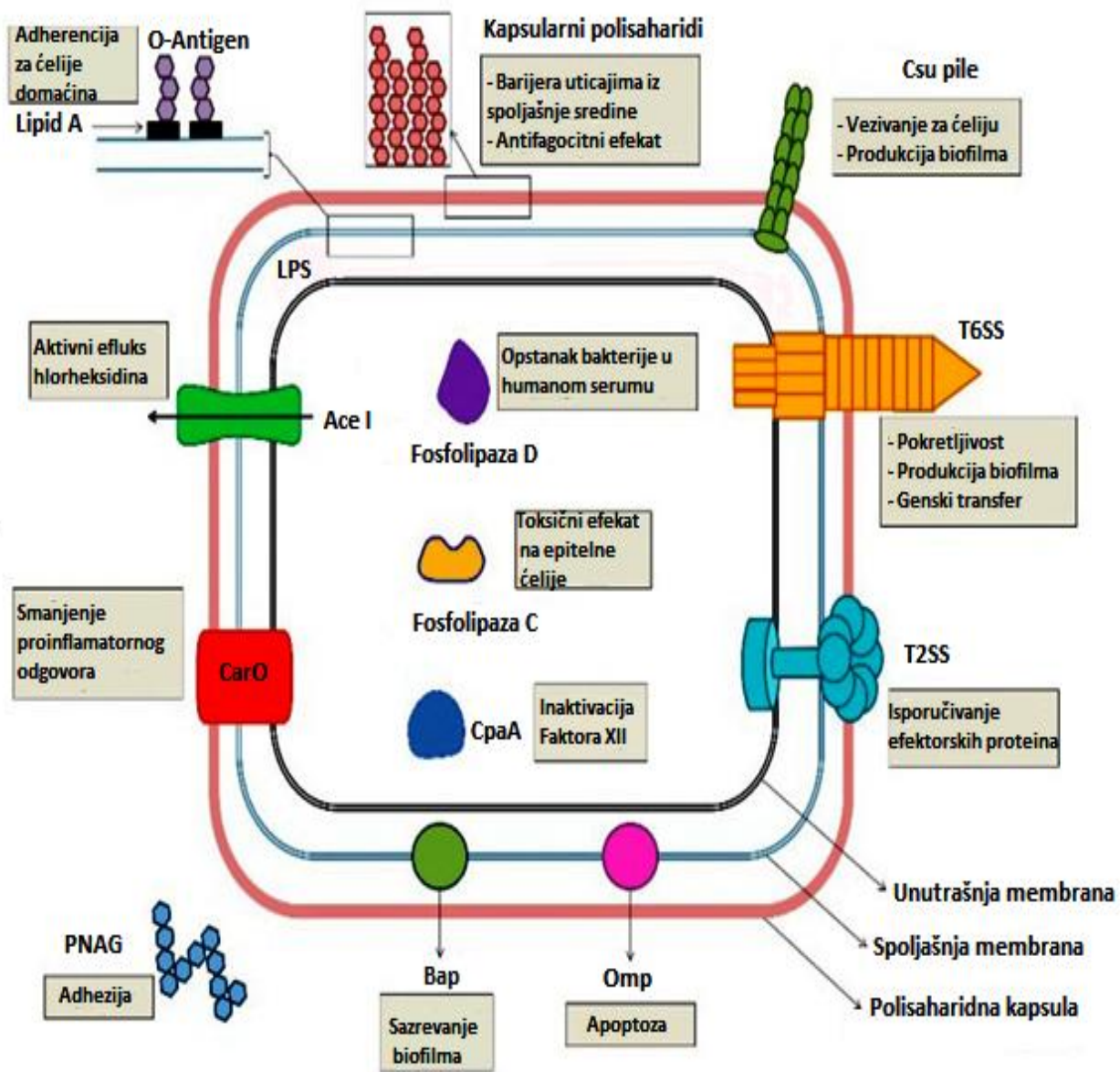
A. baumannii je godinama tretiran kao bakterija sa izrazito niskim patogenim potencijalom, a njegova izolacija iz kliničkog materijala je uglavnom tumačena kao kontaminacija. Ipak, opstanak *A. baumannii* u bolničkoj sredini i kolonizacija osetljivih pacijenata može dovesti do razvoja infekcija sa nepovoljnom prognozom (Slika 2).



Slika 2: *A. baumannii* u bolničkoj sredini - od kolonizacije do infekcije

(preuzeto i modifikovano iz Dijkshoorn i sar., 2005)

Uz skromne nutritivne zahteve, *A. baumannii* poseduje brojne faktore virulencije zahvaljujući kojima uspešno opstaje u bolničkoj sredini i izaziva infekcije kod osetljivog domaćina (Slika 3).



Slika 3: Faktori virulencije *A. baumannii*.

(preuzeto i modifikovano iz Ayoub Moubareck i Hammoudi Halat, 2020)

Faktore virulencije *A. baumannii* možemo podeliti na strukturne: kapsula, lipopolisaharid (LPS), proteini spoljašnje membrane, makromolekulski transportni sistemi, pile i sekretorne: enzimi, signalni molekuli i helatori jona metala. Funkcije jednih i drugih se često prepliću dok omogućavaju *A. baumannii* da uspešno kolonizuje i inficira tkiva domaćina.

1.6.1. Proteini spoljašnje membrane (porini)

Proteini spoljašnje membrane (engl. *outer membrane proteins*, OMP) su značajni faktori virulencije. Među njima se posebno ističe protein A (AbOmpA) od 38kDa koji pored transportne funkcije porina ima i ulogu u vezivanju bakterije za ćeliju domaćina i pokretanju apoptoze ćelije, zatim u opstanku bakterija u cirkulaciji i formiranju biofilma (Ayoub Moubareck i Hammoudi Halat, 2020). AbOmpA se po vezivanju za ćeliju domaćina translocira u mitohondrije i nukleus i indukuje apoptozu ćelije (Choi i sar., 2008). Pored toga AbOmpA ima sposobnost vezivanja H faktora za površinu *A. baumannii* (H faktor - važan regulator alternativnog puta aktivacije komplementa), čime bakterija izbegava lizu komplementom i opstaje u cirkulaciji pacijenata sa bakterijemijom (Kim i sar., 2009). Druga dva OMP (OMP 33-36kDa i CarO) povezana su sa rezistencijom *A. baumannii* na karbapeneme. OMP 33-36kDa, porin za transport vode, takođe učestvuje i u adheziji za ćelije domaćina, invaziji ćelije i indukciji apoptoze. CarO smanjuje proinflamatorni odgovor domaćina i omogućava opstanak i proliferaciju *A. baumannii* (Ayoub Moubareck i Hammoudi Halat, 2020).

1.6.2. Delovi ćelijskog zida - LPS i kapsula

O-polisaharidna komponenta LPS-a zajedno sa pilima učestvuje u prvom koraku kolonizacije, odnosno u adheziji za ćeliju domaćina. Lipidna komponenta LPS-a je endotoksin i snažan imunomodulator. Na animalnom modelu mišje pneumonije pokazano je da LPS *A. baumannii* u organizmu domaćina pokreće urođeni imunski odgovor vezujući se za receptor sličan Toll-u 4 (engl. *Toll-like receptor*, TLR) na fagocitima i CD14 receptor eksprimiran na monocitima, makrofagima i granulocitima što za posledicu ima oslobađanje faktora nekroze tumora α (engl. *tumour necrosis factor alpha*, TNF- α) i interleukina 6 (engl. *interleukin 6*, IL-6) i influks bronhoalveolarnih makrofaga u tkivo pluća. Makrofagi fagocituju bakterijske ćelije u tkivu i znatno redukuju njihov broj (Knapp i sar., 2006). Eksperimenti sa humanim monocitima pokazali su da je LPS kliničkih izolata *A. baumannii* jednako potentan endotoksin kao i endotoksin *Escherichiae coli* (Erridge i sar., 2006). LPS ima i ulogu u opstanku bakterije u cirkulaciji čineći je rezistentnom na sistem komplementa humanog seruma (Ayoub Moubareck i Hammoudi Halat, 2020).

Osim LPS-a, glavni strukturni faktor virulencije inkapsuliranih sojeva *A. baumannii* je kapsula na površini bakterijske ćelije. Pored uloge u adheziji za ćeliju domaćina, kapsularni polisaharidi važni su za formiranje biofilma, ali i za zaštitu od različitih negativnih uticaja iz spoljašnje sredine (isušivanja, dezinficijenas, antibiotika), kao i za opstanak bakterije u organizmu čoveka tokom infekcije (antifagocitno dejstvo i rezistencija na sistem komplementa humanog seruma) (Ayoub Moubareck i Hammoudi Halat, 2020; Lee i sar., 2017). Rezistencija na brojne antibiotike, kao i na odbrambene mehanizme sa kože, sluzokoža i iz seruma

hospitalizovanih pacijenata doprinose opstanku *A. baumannii* u osetljivom domaćinu (Dijkshoorn i sar., 2005).

1.6.3. Otpornost na dezinficijense i isušivanje

Otpornost na dezinficijense i isušivanje doprinosi uspešnoj kolonizaciji i preživljavanju na medicinskim aparatima, implantatima, kateterima, tubusima, protezama i različitim površinama (Dijkshoorn i sar., 2005). Kako je otporan na isušivanje *A. baumannii* može da preživi na suvim neživim površinama i do 100 dana. Ovu sposobnost poseduje zahvaljujući kapsularnim polisaharidima, ali i samoj spoljašnjoj membrani. *A. baumannii* poseduje hlorheksidin efluksni protein (Ace I) kojim aktivno ispumpava hlorheksidin iz svoje ćelije i time mu onemogućava da deluje toksično na membranu bakterijske ćelije. Zanimljivo je da etanol pospešuje rast i virulenciju *A. baumannii*, pa tako njegovo prisustvo u serumu alkoholisanih pacijenata remeti fagocitozu bakterijskih ćelija (Ayoub Moubareck i Hammoudi Halat, 2020).

1.6.4. Produkcija biofilma i međubakterijska komunikacija

A. baumannii poseduje sposobnost da adheriše i formira biofilm na različitim veštačkim podlogama poput plastike i stakla. Produkcija biofilma je posebno izražena na dodirnim površinama tečnosti i vazduha, poput onih na endotrahealnim tubusima ili intravaskularnim kateterima. Uronjene u ekstracelularni matriks zajednice bakterijskih ćelija otporne su na isušivanje, antibiotike i ćelije imunskog sistema domaćina. U samoj strukturi biofilma elektronska i fluorescentna mikroskopija pokazala je prisustvo egzopolisaharida i pila *A. baumannii* (Tomaras i sar., 2003). Čsu pile, osim uloge u vezivanju bakterije za ćeliju domaćina učestvuju i u produkciji biofilma. Pile tipa IV su takođe nađene u sastavu biofilma. U nepovoljnim uslovima *A. baumannii* sintetiše protein povezan sa produkcijom biofilma (engl. *biofilm-associated protein*, Bap) koji ima ulogu u izgradnji i sazrevanju matriksa biofilma. U istim uslovima *A. baumannii* sintetiše i drugu važnu komponentu biofilma, egzopolisaharid poli- β -1,6-N-acetilglikozamin (engl. *poly- β -1,6-N-acetylglucosamine*, PNAG). PNAG osim uloge u produkciji biofilma učestvuje i u adheziji bakterijske ćelije (Ayoub Moubareck i Hammoudi Halat, 2020).

"Kvorum sensing" (engl. *quorum sensing*) ili komunikacija samih bakterijskih ćelija unutar biofilma, različitim signalnim molekulima ima regulatornu ulogu u nastanku i održavanju biofilma, sve do njegovog sazrevanja (González i sar., 2001). Signalni molekuli su poznati i kao autoinduseri (engl. *autoinducer*). Kod vrste *A. baumannii* u međucelijskoj komunikaciji unutar biofilma učestvuju AbaI indjuser koji produkuje signalne molekule, acilhomoserin laktone (engl. *acylhomoserin lactone*, AHL) koji se vezuju za receptorni protein AbaR, nakon čega se mehanizmom pozitivne povratne sprege produkuje još više AHL molekula, što dovodi do regulacije formiranja biofilma.

1.6.5. Pile

Prvi korak u kolonizaciji osetljivog domaćina je vezivanje bakterije za ciljne ćelije. U *in vitro* modelu na humanim bronhijalnim epitelnim ćelijama ispitivana je adherencija sporadičnih i epidemijskih sojeva *A. baumannii*, pripadnika Evropskog klona I i II (engl. *European clone*, EC). Elektronskom mikroskopijom uočeno je da bakterijski sojevi ekspiriraju pilama posredovan mehanizam adherencije, kao i da ih i same epitelne ćelije okružuju svojim protruzijama; da nema kvantitativne razlike u adherenciji između sporadičnih i epidemijskih sojeva, ali da pripadnici EC II poseduju veći kapacitet vezivanja za epitelne ćelije u odnosu na sojeve iz EC I (Lee i sar., 2006). Već je pomenuto da Csu pile imaju ulogu u adheziji *A. baumannii* i produkciji biofilma. *A. baumannii* nema flagelu i tradicionalno se ubraja u nepokretne bakterije, premda je opisana posebna vrsta kretanja - kretanje u vidu trzaja (engl. *twitching motility*) koja je uslovljena prisustvom pila tipa IV. Kombinacijom ekstenzije i retrakcije *A. baumannii* se kreće po neživim površinama u bolnici, ali i po organizmu domaćina. Pile tipa IV učestvuju i u formiranju biofilma i u horizontalnom genskom transferu.

1.6.6. Proteinski sekretorni sistemi

A. baumannii poseduje nekoliko sekretornih sistema, mutliproteinskih kompleksa, kojima sekretuje proteine iz periplazmatskog u ekstracelularni prostor. Sekretorni sistem tip II (engl. *type II secretion system*, T2SS) je transporter za: lipaze (LipA i LipH) koje će razgraditi lipide ćelija domaćina i takođe za Zn-zavisne metalopeptidaze (CpaA) koje će razgraditi fibrinogen i faktor V i poremetiti proces koagulacije u organizmu domaćina. Sekretorni sistem tip VI (engl. *type VI secretion system*, T6SS) učestvuje u procesu kolonizacije domaćina, eliminaciji kompetitivnih patogena poput *Escherichiae coli* i doprinosi horizontalnom transferu gena rezistencije. Druge bakterijske vrste eliminiše kontaktno zavisnim mehanizmom, tako što proteinske toksine (nukleaze, hidrolaze peptidoglikana, toksine ćelijskih membrana) direktno injektira u ciljnu ćeliju. Klinički sojevi *A. baumannii* sa aktivnim T6SS se češće izoluju kod imunokompromitovanih pacijenata što govori o mogućoj eliminaciji kompetitivnih patogena. Sekretorni sistem tip V - autotransporter Ata (engl. *type V system autotransporter* Ata) učestvuje u adheziji bakterije za komponente ekstracelularnog matriksa poput kolagena i u formiranju biofilma (Ayoub Moubareck i Hammoudi Halat, 2020; Lee i sar., 2017).

1.6.7. Enzimi

Fosfolipaze su enzimi koji hidrolizuju fosfolipide membrana humanih ćelija. Fosfolipazom C *A. baumannii* deluje citotoksično razlažući fosfolipide membrane ćelija domaćina, dok mu fosfolipaza D omogućava opstanak u serumu. Nedavno je opisana i CpaA proteaza koja inaktivacijom faktora XII remeti proces koagulacije i promovise stvaranje intravaskularnih koaguluma i diseminaciju *A. baumannii* (Ayoub Moubareck i Hammoudi Halat, 2020). Fosfolipaze zajedno sa proteazama i AbOmpA *A. baumannii* isporučuje u citoplazmu ćelija domaćina i unutar vezikula spoljašnje membrane (engl. *outer membrane vesicles*, OMV). Pokazano je da OMV učestvuju i u horizontalnom transferu gena koji kodiraju rezistenciju na antibiotike (Lee i sar., 2017).

1.6.8. Sistemi preuzimanja mikroelemenata

Klinički izolati *A. baumannii* razvili su sposobnost da preuzmu jone gvožđa, cinka i mangana iz organizma domaćina. U procesu preuzimanja gvožđa učestvuju različiti Fe - zavisni OMP, kao i brojne siderofore (molekuli helatori gvožđa visokog afiniteta), poput acinetobaktina (engl. *acinetobactin*) i angvibaktina (engl. *anguibactin*) koje vezuju jone gvožđa formirajući stabilne helate (Dorsey i sar., 2003). Acinetobaktin u većoj meri proizvode MDR nego osetljivi sojevi *A. baumannii* (Lee i sar., 2017). Sistem za preuzimanje cinka sastoji se od ZnuABC transportera i ZigA GTP-aze koja metaboliše preuzeti cink. Na taj način *A. baumannii* limitira dejstvo kalprotektina, proteina imunskog sistema koji u kompleksu sa cinkom ili manganom inhibira rast bakterija (Ayoub Moubareck i Hammoudi Halat, 2020).

1.7. Osetljivost *A. baumannii* na antibiotike

U poslednje tri decenije zapaža se dramatičan porast rezistencije *A. baumannii* na antibiotike. Ovo je razlog zašto je *A. baumannii* svrstan među ESKAPE organizme (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* species), klinički važne patogene sa značajnim potencijalom za razvoj antimikrobne rezistencije (De Rosa i sar., 2015). Acinetobakter je urođeno rezistentan na ampicilin, amoksicilin, amoksicilin-klavulanat, aztreonam, ertapenem, trimetoprim, hloramfenikol i fosfomicin (CLSI, 2017).

Kako je *A. baumannii* razvijao stečenu rezistenciju prema β -laktamskim antibioticima širokog spektra dejstva, aminoglikozidima i fluorohinolonima, terapijski izbor za lečenje bolničkih infekcija postaju karbapenemi (Maragakis i sar., 2008). Ipak, vrlo brzo se u bolnicama širom sveta detektuju karbapenem-rezistentni *A. baumannii* (engl. *carbapenem-resistant A. baumannii*, CRAB) izolati. Terapiju dodatno komplikuje i činjenica da CRAB izolati najčešće ispoljavaju MDR fenotip (Mugnier i sar., 2010; Perez i sar., 2007; Qureshi i sar., 2015). Infekcije pacijenata hospitalizovanih u jedinicama intenzivne nege MDR *A. baumannii* sojevima značajno povećavaju stope mortaliteta (Falagas i sar., 2006). U poslednjem izveštaju Centara za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) CRAB je na listi pretećih bolničkih patogena u Americi sa 8.500 obolelih i 700 umrlih u bolnicama u 2017. godini (CDC, 2019).

Godišnji izveštaj Evropske mreže za kontrolu antimikrobne rezistencije (engl. *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*, EARS-Net) pokazao je da u 2018. godini prevalencija rezistencije *Acinetobacter* spp. na karbapeneme značajno raste od severne ka južnoj Evropi i da je veća od 70% u bar osam zemalja Evrope, uključujući i one u našoj regiji: Bugarska (74,5%), Italija (79,2%), Rumunija (85,3%), Grčka (92,4%) i Hrvatska (95,5%) (EARS-Net, 2019). Podatke za prevalenciju rezistencije invazivnih izolata *Acinetobacter* spp. na antibiotike u Srbiji u 2018. godini nalazimo u izveštaju Mreže za kontrolu antimikrobne rezistencije u centralnoj Aziji i istočnoj Evropi (engl. *Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance*, CAESAR). Prevalencija rezistencije kretala se od 91% do 97% za sve antibiotike obuhvaćene monitoringom [karbapenemi (96%), aminoglikozidi (91%) i fluorohinoloni (97%)]. MDR izolata, rezistentnih na sve tri grupe antibiotika bilo je 92% (CAESAR, 2019).

Zabrinjavajuća je činjenica da su u svetu opisani slučajevi rezistencije *A. baumannii* na lekove poslednje linije, polimiksine i tigeciklin (Apisarnthanarak i sar., 2009; Chuang i sar., 2009; Peleg i sar., 2007).

1.8. Genska osnova rezistencije *A. baumannii* na antibiotike

Kod Gram negativnih bakterija, pa i *A. baumannii*, postoje tri glavna mehanizma rezistencije na antibiotike. Prvi i najznačajniji je inaktivacija leka dejstvom enzima bakterije, drugi je nemogućnost leka da u adekvatnoj koncentraciji dospe u bakterijsku ćeliju (smanjena propustljivost spoljašnje membrane zbog gubitka porina ili aktivnog izbacivanja antibiotika iz ćelije – mehanizam efluksa), a treći je mutacijama uzrokovana promena ciljnog mesta dejstva leka poput promene strukture penicilin vezujućih proteina (engl. *penicillin-binding proteins*, PBPs), enzima, ribozoma, DNK, RNK, struktura uključenih u metabolizam folne kiseline (Manchada i sar., 2010). Mehanizmi rezistencije *A. baumannii* na različite klase antibiotike prikazani su u Tabeli 1 i 2.

Tabela 1. Mehanizmi rezistencije *A. baumannii* na β -laktamske antibiotike

Mehanizam rezistencije	Enzim/Ciljna struktura/Smanjena propustljivost membrane	Primeri
β -laktamaze	β -laktamaze klase A	Cefalosporini širokog spektra, osim cefamicina: CTX-M, PER, VEB, TEM, SHV Karbapenemi: GES, KPC
	β -laktamaze klase B	Karbapenemi: IMP, VIM, SIM, NDM
	β -laktamaze klase C	Cefalosporini širokog spektra, osim cefepima: Amp C (ADC)
	β -laktamaze klase D	Karbapenemi: OXA-23, OXA-24/40, OXA-51, OXA-58, OXA-143, OXA-235
Smanjena propustljivost spoljašnje membrane	Izmene porina i proteina spoljne membrane	CarO, OmpA, 33-36 kDa OMP, OprB, Omp25, OprC, OprD, OmpW
Prekomerna aktivnost efluksnih pumpi	RND pumpa	AdeABC
Izmena ciljne strukture	PBP	PBP6b (dacD)

(preuzeto i modifikovano iz Ayoub Moubareck i Hammoudi Halat, 2020; Djahmi i sar., 2014; Peleg i sar., 2008)

Tabela 2. Mehanizmi rezistencije *A. baumannii* na ostale klase antibiotika

Antibiotik	Mehanizam rezistencije	Enzim/Ciljna struktura/Smanjena propustljivost membrane	Primeri
Tetraciklini	- Prekomerna aktivnost efluksnih pumpi	- RND pumpa	- AdeABC, AdeIJK, AcrAB-TolC
		- Tet pumpa	- TetA i TetB
	- Zaštita ribozoma	-Disocijacija tetraciklina sa ribozoma	- TetO i TetM
Fluorohinoloni	- Prekomerna aktivnost efluksnih pumpi	- RND pumpa - MATE familija	- AdeABC - AbeM
	- Izmena ciljnog mesta	- DNK giraza - DNK topoizomeraza IV	- GyrA - ParC
Aminoglikozidi	- Prekomerna aktivnost efluksnih pumpi	- RND pumpa	- AdeABC
	- Izmena ciljnog mesta	- Geni za 16sRNK metilazu	- <i>armA</i> , <i>rmtA</i> , <i>rmtB</i> , <i>rmtC</i> , <i>rmtD</i>
	- Enzimska inaktivacija leka	- Enzimi koji modifikuju aminoglikozide	- AAC(3)-Ia, AAC(3')-Ia, ANT(2'')-Ia, ANT(3'')-Ia
Makrolidi	Prekomerna aktivnost efluksnih pumpi	SMR pumpa	AbeS
	Izmena ciljnog mesta	- Izmena lipida A Pet N transferazom	- PmrC, MCR-1, MCR-4
Polimiksini		-Nedostatak sinteze lipida A	- LpxA, LpxC, LpxD
		- Smanjena stabilnost spoljašnje membrane	- LpsB, LptD, VacJ
		- Smanjena sinteza biotina	- LpsB

(preuzeto i modifikovano iz Ayoub Moubareck i Hammoudi Halat, 2020; Djahmi i sar., 2014; Peleg i sar., 2008)

1.9. β -laktamaze identifikovane kod vrste *A. baumannii*

Gram negativne bakterije proizvode β -laktamaze kojima hidrolizuju β -laktamske antibiotike (peniciline, cefalosporine, monobaktame, karbapeneme). Na osnovu građe samih enzima podeljene su po Ambleru u četiri klase: A, B, C, D. Klasi B su za aktivnost neophodni joni cinka, a ostale tri klase su od serina zavisni enzimi. Geni koji kodiraju sintezu β -laktamaza nalaze se na hromozomu ili na mobilnim genskim elementima poput plazmida, integrona ili transpozona. Sve četiri klase β -laktamaza identifikovane su kod vrste *A. baumannii*. Razlog tome je prisustvo gena za β -laktamaze (engl. *β -lactamase genes*, *bla genes*) na mobilnim genskim elementima i intenzivan horizontalni genski transfer između bakterija iste ili različitih vrsta.

- Klasa A: β -laktamaze proširenog spektra (engl. *Extended spectrum β -lactamases*, ESBL) - CTX-M, PER, VEB, TEM, SHV i karbapenemaze: KPC i GES
- Klasa B: metalo β -laktamaze (engl. *Metallo β -lactamases*, MBL) - IMP, VIM, SIM, NDM
- Klasa C: Amp C ili ADC (engl. *Acinetobacter-derived cephalosporinases*, ADC)
- Klasa D: oksacilinaze (engl. *OXA-type β -lactamases*) - OXA-51, OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143, OXA-235

Samo dve do sada otkrivene β -laktamaze su intrinzični hromozomski kodirani enzimi (ADC i OXA-51) urođeno prisutni kod vrste *A. baumannii*. Svi ostali enzimi su stečeni i najčešće kodirani genima sa mobilnih genskih elemenata.

Iz klase A su kod *A. baumannii* otkrivene dve grupe enzima (ESBL i karbapenemaze). ESBL inhibira klavulanska kiselina, uspešno hidrolizuju peniciline i cefalosporine (Jeon i sar., 2015). Dve karbapenemaze iz klase A, KPC (engl. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) i GES (engl. *Guiana extended-spectrum β -lactamase*) kod *A. baumannii* pored penicilina i cefalosporina hidrolizuju i karbapeneme (Djahmi i sar., 2014).

MBL uspešno razgrađuju sve β -laktame osim monobaktama (aztreonama). Snažne su karbapenemaze. Kod *A. baumannii* su do sada detektovane VIM (engl. *Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*), IMP (engl. *Imipenemase*), NDM (engl. *New Delhi metallo- β -lactamase*) i SIM (engl. *Seoul imipenemase*) karbapenemaze (Lee i sar., 2017).

Urođeno prisutna, ADC nije adekvatno inhibisana klavulanskom kiselinom, ili ostalim inhibitorima β -laktamaza i odgovorna je za rezistenciju na peniciline, cefalosporine (osim cefepima) i cefamicine (cefoksitin i cefotetan) (Jeon i sar., 2015). Pokazano je da prisustvo IS*AbaI* u regiji promotora *bla*ADC gena rezultira visokim nivoima rezistencije na ceftazidim (Corvec i sar., 2003).

OXA svoj naziv duguju bržoj hidrolizi oksacilina u odnosu na benzilpenicilin. Uz MBL dominantno su odgovorni za rezistenciju *A. baumannii* na karbapeneme (Jeon i sar., 2015).

1.10. Genska osnova rezistencije *A. baumannii* na karbapeneme

Rezistencija na karbapeneme uzrokovana je neenzimskim i enzimskim mehanizmima. Prvi su manje značajni kod vrste *A. baumannii* i odnose se na smanjenu propustljivost spoljašnje membrane zbog izmene/gubitka porina i proteina membrane (gubitak 29 kDa CarO porina i 33-36kDa OMP) ili izmene ciljne strukture (PBP6b - dacD) membrane. Pokazano je i da ugradnja

insercione sekvence *ISAbal* (engl. *Insertion sequence*, IS) u gen koji kodira sintezu CarO ili PBP6b remeti njegovu ekspresiju. Rezistencija na karbapeneme povezana je i sa prekomernom aktivnošću AdeABC efluksne pumpe, koja nastaje usled tačkastih mutacija gena koji kodiraju regulatorni deo pumpe (AdeR) ili zbog ugradnje *ISAbal* u gen koji kodira senzornu kinazu (AdeS) (Ayoub Moubareck i Hammoudi Halat, 2020).

Najznačajniji mehanizam rezistencije *A. baumannii* na karbapeneme je enzimaska razgradnja leka karbapenemazama. CRAB izolati najčešće produkuju oksacilinaze, zatim karbapenemaze iz MBL klase i najređe KPC i GES karbapenemaze.

1.10.1. Oksacilinaze

Oksacilinaze su najčešći karbapenem hidrolizujući enzimi i kao takvi vodeći uzrok rezistencije *A. baumannii* na karbapeneme (Manchada i sar., 2010). Ova klasa (klaster) enzima podeljena je u šest podklasa: OXA-51 enzimi (intrinzični hromozomski kodirani enzimi, sa više od 70 varijanti, specifični za vrstu *A. baumannii*) i stečeni enzimi kodirani sa mobilnih genskih elemenata: OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143, OXA-235 (Djahmi i sar., 2014). Kod enzima stečenih horizontalnim genskim transferom su takođe opisane brojne varijante, pri čemu se najčešće detektuju članovi prva tri klastera: OXA-23, OXA-24/40, OXA-58 (Slika 4).

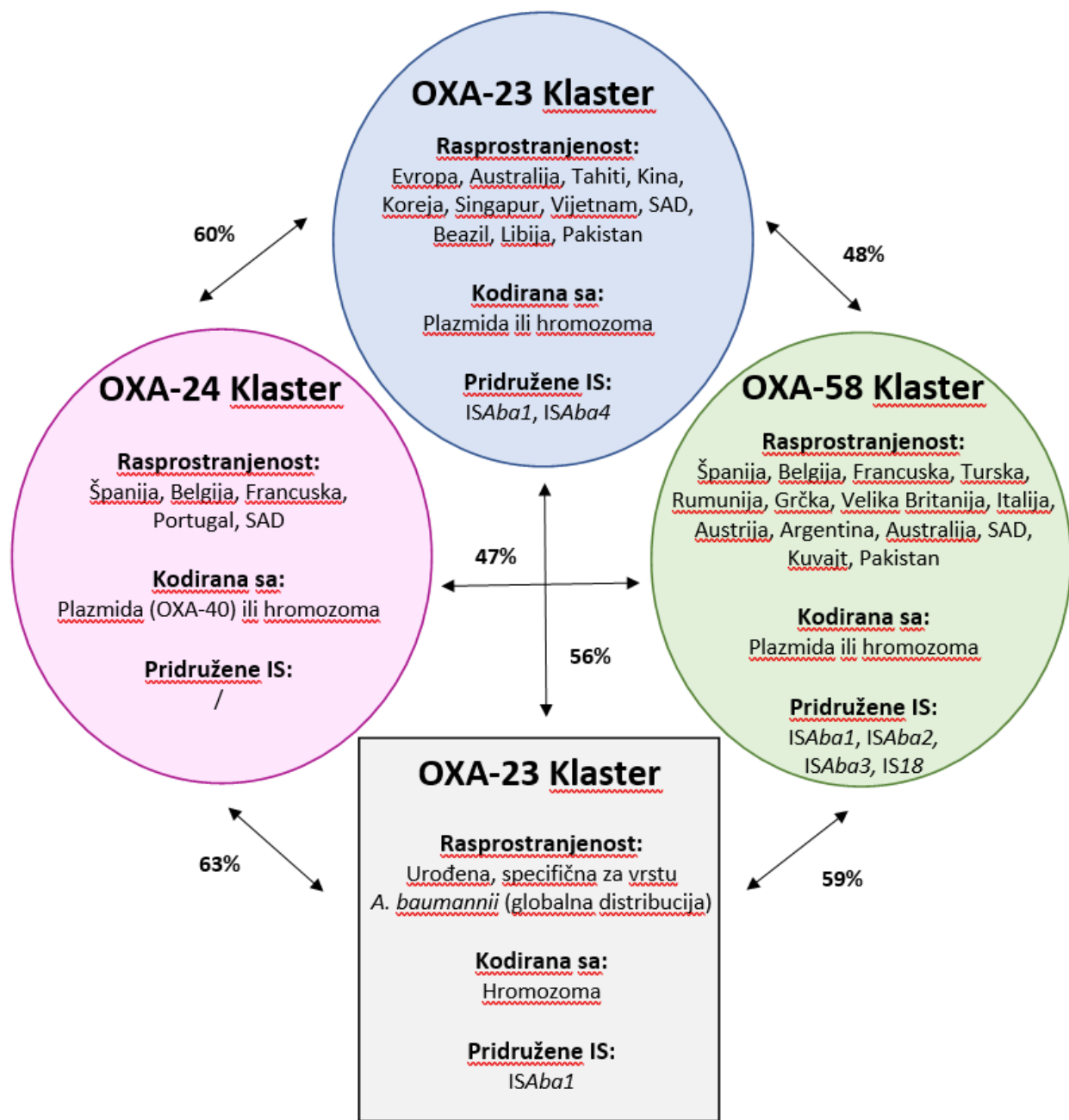
Prva karbapenemaza (OXA-23) otkrivena je u kliničkom izolatu *A. baumannii* 1985. godine u Edinburgu (Perez i sar., 2007). Od tada se bolničke epidemije ili sporadične infekcije izazvane klonskom propagacijom CRAB sojeva koji produkuju OXA enzime beleže širom sveta (Peleg i sar., 2008). CRAB sojevi, pripadnici EC I i EC II, nosioci OXA-23 izolovani su kod pacijenata sa invazivnim i neinvazivnim infekcijama hospitalizovanim u jedinicama intenzivne nege u Kini, Brazilu, Belgiji, Bugarskoj, Južnoj Africi, Libiji, Iraku, Avganistanu, Vijetnamu, na Tajlandu i Tahitiju (Mugnier i sar., 2010). Za zemlje Mediterana do 2009. godine bila je značajna klonska propagacija OXA-58. Nakon toga se na Mediteranu (Alžir, Egipat, Tunis, Francuska, Španija, Italija, Turska, Grčka, Hrvatska) od svih OXA enzima najčešće detektuje OXA-23. Razlog ove promene može biti selektivni pritisak zbog snažnije hidrolitičke aktivnosti ili prenos gena rezistencije horizontalnim genskim transferom i njihova dalja klonska propagacija (Djahmi i sar., 2014).

Klonska propagacija OXA-24/40 pozitivnih CRAB izolata ređa je u odnosu na OXA-23 pozitivne sojeve. OXA-24/40 klaster detektovan je u CRAB izolatima u Americi i Evropi (Španiji, Belgiji, Francuskoj, Portugaliji) (Peleg i sar., 2008). U našoj regiji su OXA-24/40 pozitivni CRAB sojevi izolovani kod hospitalizovanih pacijenata u Hrvatskoj i Bugarskoj (Franolić-Kukina i sar., 2011; Strateva i sar., 2018).

OXA-58 pozitivan CRAB prvi put je opisan kao uzrok bolničke epidemije na klinici za opekotine u Tuluzu 2003. godine (Poirel i Nordmann, 2006). U narednim godinama beleži se njegova klonska propagacija širom sveta, da bi iza 2009. godine bio postepeno zamenjen OXA-23 ili OXA-24/40 produkujućim *A. baumannii* sojevima (Adams-Haduch i sar. 2011; Djahmi i sar., 2014; Mugnier i sar., 2010; Rosales-Reyes i sar., 2017; Schleicher i sar., 2013; Tran i sar., 2017). U našem okruženju se takođe beleži niska prevalencija OXA-58 pozitivnih CRAB bolničkih izolata (Franolić-Kukina i sar., 2011; Pournaras i sar., 2017; Strateva i sar., 2018).

Urođeno prisutna, kodirana genima sa hromozoma, OXA-51 specifična je za vrstu *A. baumannii* i koristi se za njenu identifikaciju (Turton i sar., 2006a). Za hidrolizu karbapenema

neophodna joj je *ISAbal*, locirana ushodno od *blaOXA-51* gena u regiji promotora, takođe specifična za vrstu *A. baumannii* (Turton i sar., 2006b).



Slika 4: Rasprostranjenost i genetički kontekst oksacilinaza vrste *A. baumannii* (Strelice i procenti ukazuju na stepen homologije aminokiselina među različitim klasterima)

(preuzeto i modifikovano iz Peleg i sar., 2008)

1.10.2. Karbapenemaze iz MBL klase

Iako se u CRAB izolatima MBL detektuju znatno ređe nego OXA, ovi enzimi su 100-1000 puta snažnije karbapenemaze (Peleg i sar., 2008). Do sada je kod nefermentora i ređe kod enterobakterija opisano šest grupa MBL (IMP, VIM, SIM, NDM, GIM i SPM), od čega su četiri grupe MBL otkrivene u sojevima *A. baumannii*: IMP, VIM, SIM i NDM (Djahmi i sar., 2014; Ellington i sar., 2007). Svaka grupa javlja se u više varijanti u odnosu na stepen heterogenosti aminokiselina u lancu.

Prva MBL detektovana u *A. baumannii* izolatu bila je IMP-2 u Italiji 2000. godine (Djahmi i sar., 2014). Od tada se IMP, VIM i SIM sporadično javljaju u kliničkim izolatima *A. baumannii* (IMP-1 u Italiji, Japanu, Južnoj Koreji; IMP-2 u Italiji i Japanu; IMP-4 u Hong Kongu; IMP-5 u Portugalu; IMP-6 u Brazilu; IMP-11 u Japanu; VIM-2 i SIM-1 u Južnoj Koreji) (Poirel i Nordmann, 2006). U Španiji, Grčkoj, Singapuru i Australiji beleži se istovremeno prisustvo OXA i MBL u istim sojevima *A. baumannii* (Peleg i sar., 2008).

U poslednjoj deceniji klinički izolati *A. baumannii* produktori NDM enzima detektuju se širom sveta. NDM-1 pozitivan CRAB postao je preteći patogen u bolnicama Evrope, na srednjem istoku, istočnoj i jugoistočnoj Aziji i južnoj Americi (Bonnin i sar., 2012; Chen i sar., 2011; El-Sayed-Ahmed i sar., 2015; Tran i sar., 2017; Villacís i sar., 2019). Genotipizacijom metodama molekularne epidemiologije omogućeno je upoređivanje i praćenje kretanja CRAB bolničkih sojeva. Tako je prva zabeležena bolnička epidemija uzrokovana NDM-1 pozitivnim CRAB u Evropi opisana u Francuskoj 2013. godine. Nulti pacijent je primljen u jedinicu intenzivne nege iz Alžira i potom je inficirao još pet pacijenata. Svi izolati su pripadali istoj klonskoj liniji i posedovali isti tip sekvence, ST85 (engl. *Sequence type, ST*) (Decousser i sar., 2013). Slična situacija opisana je u jedinici intenzivne nege bolnice u Češkoj Republici 2011. godine pošto je njihov državljani hospitalizovan posle boravka na bolničkom lečenju u Egiptu. Pacijent je razvio VAP, a iz bronhoalveolarnog lavata (BAL) je izolovan NDM-1 pozitivan *A. baumannii*. Šest dana kasnije NDM-1 pozitivan *A. baumannii* izolovan je iz respiratornog uzorka drugog pacijenta na asistiranju ventilaciji koji je boravio u istoj sobi. Posle odrađene tipizacije zaključeno je da se radi o istom soju, osetljivom samo na kolistin, istog PFGE profila (engl. *pulsed-field gel electrophoresis*) i istog MLST (engl. *multi-locus sequence typing*) profila, ST1 (Hrabák i sar., 2012). NDM-2 varijanta detektovana je u *A. baumannii* izolatima iz Egipta i Izraela (Djahmi i sar., 2014).

Za razliku od OXA enzima, koji su kodirani genima sa hromozoma ili plazmida, geni za MBL se nalaze na integronima, strukturama koje sadrže više genskih kaseti čime je olakšan kako transfer gena rezistencije tako i njihova ekspresija korišćenjem zajedničkog promotora. Najčešće su to integroni klase 1 u kojima se pored gena za MBL nalaze i geni koji kodiraju enzime koji modifikuju aminoglikozide. *A. baumannii* sojevi nosioci integrona pokazali su znatno veći stepen rezistencije na antibiotike u odnosu na izolate bez integrona u genomu. Kako sami nisu mobilni genski elementi, horizontalan genski transfer bakterija ostvaruje njihovom inkorporacijom u plazmid ili transpozon (Peleg i sar., 2008; Poirel i Nordmann, 2006).

1.10.3. Klasa A karbapenemaza po Ambleru kod vrste *A. baumannii*

Brojne ESBL (GES, CTX-M, PER, VEB, TEM, SHV, KPC) detektovane su u izolovima *A. baumannii* širom sveta (Djahmi i sar., 2014; Peleg i sar., 2008). Sposobnost hidrolize karbapenema do sada je utvrđena samo za dve grupe ovih enzima (KPC i GES) (Djahmi i sar., 2014).

U studiji sprovedenoj od 2008. - 2009. godine u šest bolnica u Belgiji izolovano je devet GES pozitivnih MDR *A. baumannii* sojeva. Sekvenciranjem DNA *bla*GES gena identifikovane su GES-11, GES-12 i GES-14 varijante. Svi indeksni sojevi izolovani su od pacijenata koji su ranije boravili u bolnicama zemalja srednjeg istoka (Turska, Egipat, Palestina). Sva tri GES alela bila su deo integrona klase 1 inkorporiranog u plazmid ili hromozom. Tehnikom kloniranja, transferom *bla*GES gena u hromozom *E. coli* došlo se do zaključka da GES-14 varijanta najsnažnije hidrolizuje imipenem, a da su GES-11 i GES-12 znatno slabije karbapenemaze (Bogaerts i sar., 2010). Nakon izolacije *A. baumannii* iz BAL-a pacijenta hospitalizovanog u Parizu detektovana je GES-14 ESBL, za koju je takođe pokazano da hidrolizuje sve β -laktame uključujući i karbapeneme (Bonnin i sar., 2011).

U sedamnaest bolnica širom Portorika tokom 2009. godine sprovedeno je istraživanje genske osnove rezistencije *A. baumannii* na β -laktame. Od 274 MDR soja 10 (3.4%) su bili KPC produktori. Sekvenciranjem *bla*KPC gena svih 10 izolata nađene su sledeće varijante: KPC-3 (kod 7 izolata), KPC-4, KPC-2 i KPC-10. Svi KPC pozitivni sojevi bili su rezistentni na β -laktame uključujući i karbapeneme (Robledo i sar., 2010). Iste godine je nakon sekvenciranja čitavog genoma (engl. *whole-genome sequencing*, WGS) predstavljen draft genoma MDR *A. baumannii* kliničkog izolata iz Portorika. Soj je produkovao KPC i MLST analizom mu je dodeljen novi ST (ST250) (Martínez i sar., 2015). Na klinici za opekotine u Iranu je 2013. godine izolovano šezdeset pet imipenem rezistentnih *A. baumannii* sojeva. Šest (9.23%) izolata produkovalo je istovremeno KPC i OXA-23 karbapenemaze (Azimi i sar., 2015).

1.10.4. Molekularna epidemiologija karbapenemaza produkujućih *A. baumannii* bolničkih izolata u Republici Srbiji

Molekularna epidemiologija CRAB bolničkih izolata, kao i njihova klonska povezanost i distribucija u Republici Srbiji je još uvek nepoznanica. Ne postoje publikovani podaci iz multicentričnih studija.

Do sada su objavljeni rezultati samo jednog istraživanja koje je obuhvatilo dvadeset osam MDR CRAB kliničkih sojeva izolovanih u periodu jun 2012.- februar 2014. godine kod dece hospitalizovane na Institutu za majku i dete "Dr. Vukan Čupić". Većina izolata (67,68%) pripadala je ST1, EC II. Svi su produkovali urođenu OXA-51 karbapenemazu. Od stečenih oksacilinaza, OXA-23 je detektovana kod 16 izolata (57,14%), OXA-24 kod 23 izolata (82,14%) i OXA-58 kod 11 izolata (39,29%). Sojevi obuhvaćeni analizom nisu produkovali karbapenemaze iz MBL grupe (NDM, VIM, IMP), kao ni KPC karbapenemazu iz ESBL grupe (Novovic i sar., 2015).

Takođe se pronalaze rezultati evropskih studija o OXA i MBL pozitivnim CRAB sojevima izolovanim u bolnicama zapadne Evrope kod pacijenata prethodno hospitalizovanih u bolnicama u Srbiji. Tako je u nemačkoj bolnici 2007. godine iz trahealnog aspirata, brisa rane i

brisa grafta izolovan *A. baumannii* osetljiv samo na kolistin kod pacijenta sa infekcijom femorokruralnog dakronskog bajpasa. Pacijent je prethodno bolnički lečen u našoj zemlji. Daljom analizom otkriveno je da je *A. baumannii* soj NDM-1 produktor (Göttig i sar., 2010; Pfeifer i sar., 2011). Dortet je sa saradnicima analizirao *A. baumannii* soj izolovan iz urina pacijenta kome je zbog retencije urina aplikovan kateter u bolnici u Srbiji, a zatim je zbog urinarne infekcije primljen na urgentno odeljenje francuske bolnice. Izolat je bio rezistentan na sve antibiotike sem kolistina i tigeciklina. WGS analizom otkriveno je da je *A. baumannii* nosilac *blaOXA-72* gena (varijante ili alela *blaOXA-40* gena), a MLST je pokazao pripadnost ST492 i EC II (Dortet i sar., 2016).

Na osnovu gorenavedenih studija može se pretpostaviti da je naša zemlja potencijalni rezervoar CRAB bolničkih sojeva produktora karbapenemaza.

1.11. Molekularna tipizacija i populaciona struktura bolničkih izolata *A. baumannii*

Tipizacija bakterija je metoda kojom se vrši karakterizacija sojeva unutar jedne bakterijske vrste. Tipizacijom bakterija se mogu odrediti izvor infekcije i putevi prenošenja uzročnika, što ima nesumnjiv epidemiološki značaj. Da bi metoda tipizacije bila uspešna, identifikovani tipovi bakterija bi trebalo da budu stabilni, tehnika bi trebalo da ima dovoljnu moć diskriminacije, da bude jednostavna, reproducibilna, a metod standardizovan velikim brojem ponovljenih testiranja. Klasične metode tipizacije koje se baziraju na fenotipskim osobinama (detekcija fenotipova), biohemijskim osobinama (detekcija biotipova), profilima rezistencije (detekcija rezistotipova) i drugim, sve više se zamenjuju metodama molekularne biologije, odnosno metodama genotipizacije (Dijkshoorn, 2008; Rafei i sar., 2014).

Tipizacija bolničkih izolata *A. baumannii* se vrši radi praćenja učestalosti i poređenja tipova rezistentnih na antibakterijske agense unutar jedne bolnice, između većeg broja bolnica jedne države ili među različitim državama. Poznavanje molekularne epidemiologije je od ključnog značaja u borbi sa epidemijskim širenjem infekcija, kako na različite kontinente i države, tako i unutar jedne zemlje. Genotipizacijom dobijamo odgovore na pitanja da li su bolnički izolati endemski ili se prvi put javljaju, da li je pojava sporadična ili ima epidemijski karakter, koliko klonskih linija je zastupljeno, ko je rezervoar infekcije i koji su putevi prenosa među pacijentima ili osobljem u bolnici. Rezultati studija koje se bave praćenjem distribucije i promena učestalosti pojedinih tipova u bolničkoj sredini su od velikog značaja u kreiranju različitih terapijskih protokola, mera prevencije i sistemu nadzora nad infekcijama (Rafei i sar., 2014). Metode genotipizacije *A. baumannii* koje se koriste u rutinskom radu mikrobioloških laboratorija kao i u velikim referentnim centrima navedene su u Tabeli 3 i 4. Kako su još uvek retke laboratorije kojima je dostupno WGS, zlatni standard za tipizaciju i poređenje sojeva u definisanom vremenu i prostoru (unutar jedne bolnice, posebno epidemijskih sojeva) je PFGE, a za poređenje sojeva u različitim vremenskim i prostornim okvirima (više bolnica u jednoj ili većem broju zemalja) je MLST metoda.

1.11.1. PFGE

PFGE je metoda kojom se DNK fragmenti dobijeni enzimskom restrikcijom genoma razdvajaju gel-elektroforezom u pulsirajućem, odnosno promenljivom električnom polju. Nekoliko parova suprotno pozicioniranih elektroda obezbeđuju izmene električnog polja. Ovakva elektroforeza omogućava razdvajanje velikih molekula veličine i do 1000 kilobaza (KB). Zbog stalnih promena smera električnog polja, DNK menja orijentaciju, okreće se u gelu, pa je na ovaj način moguće razdvojiti čak i pojedinačne hromozome.

Najpre se bakterijski sojevi kalupe u agarozni gel, a potom inkubiraju sa restrikcionim enzimom u cilju digestije i dobijanja fragmenata različitih dužina. Izbor restrikcionog enzima je od vitalne važnosti za dobijanje kvalitetnih rezultata. Restrikcioni enzimi koji se najčešće koriste u digestiji sojeva *A. baumannii* su *SmaI* i *ApaI*. U zavisnosti od mesta i broja restrikcionih lokusa, u kojima enzim vrši isecanje (restrikcionih mesta), dobija se različit broj fragmenta, različite dužine. Potom se radi elektroforeza u električnom polju sa promenljivim smerom struje. Nakon bojenja i vizualizacije proizvoda, najčešće se pomoću kompjuterskog softvera identifikuju PFGE profili. Ovakvi softveri najčešće postavljaju >80% poklapanja fragmenata kao najnižu ("cut-off") vrednost, što govori o pripadnosti istom klasteru. Dakle, na osnovu genskih razlika unutar bakterijske vrste, odnosno genskih polimorfizama, PFGE metodom se vrši identifikacija genotipova. Genske varijacije koje se registruju ovom metodom akumuliraju se u relativno kratkom vremenskom periodu, te je PFGE vrlo pogodan za kratkoročne epidemijske studije, posebno za praćenje bolničkih epidemija. U kombinaciji sa nekom od metoda genotipizacije baziranom na karakterizaciji genskih sekvenci, poput MLST analize, našao je primenu kako u nacionalnim, tako u internacionalnim studijama nadzora nad bolničkim infekcijama uzrokovanim MDR *A. baumannii* sojevima (Rafei i sar., 2014).

PFGE metoda poseduje i nekoliko ograničenja: zahteva značajan utrošak vremena (2-4 dana); komplikovana je za izvođenje pa se radi samo u posebno opremljenim laboratorijama; nemogućnost tipizacije pojedinih sojeva; problem interlaboratorijskog poređenja i reproducibilnosti zbog osetljivosti samog procesa elektroforeze i DNK pripreme (Rafei i sar., 2014).

1.11.2. MLST

MLST je metoda genotipizacije, koja se bazira na umnožavanju i sekvenciranju 7 visoko konzerviranih, tzv. "housekeeping" gena, koji se nalaze u svakom bakterijskom hromozomu i kodiraju sintezu enzima od vitalnog značaja za bakterijsku ćeliju. Dobijene sekvence se porede sa referentnim sekvencama iz MLST internet elektronske baze (<http://pubmlst.org/abaumannii/>). Trenutno se u MLST bazi nalazi 3.237 ST, kao i 1.287 deponovanih čitavih bakterijskih genoma. Kombinacija dobijenih alelnih profila za svih 7 "housekeeping" gena prisutnih u MLST bazi definiše jedan ST kao i pripadnost određenom klonu. Na ovaj način se može proučavati klonska veza među sojevima koja se može predstaviti i grafički. Bakterijski klonovi su sojevi koji imaju zajedničkog pretka i imaju iste alele u svakom "housekeeping" lokusu, odnosno imaju isti ST. Bakterijski sojevi sa filogenetski bliskim ST svrstavaju se u klonske komplekse (engl. *clonal complex*, CC) (Rafei i sar., 2014).

U MLST internet bazi se nalaze dve šeme za tipizaciju *A. baumannii*. Prvu, Oksfordsku šemu su predložili Bartual i saradnici i njome se sekvencira sledećih 7 gena: *gltA*, *gyrB*, *gdhB*,

recA, *cpn60*, *gpi*, *rpoD* (Bartual i sar., 2005). Drugom, Pasterovom šemom sekvencira se novi set gena: *cpn60*, *fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *rplB*, *rpoB* (Diancourt i sar., 2010). Obe šeme su pokazale dobru korelaciju sa PFGE analizom (Rafei i sar., 2014).

MLST ima brojne prednosti za populacione studije i globalnu epidemiološku analizu pošto omogućava dugotrajno evolutivno praćenje sojeva, jer se promene unutar sedam visoko konzerviranih gena akumuliraju veoma sporo. Prednost je i to što se za razliku od rezultata dobijenih metodama zasnovanim na razdvajanju fragmenata DNK u gelu, MLST rezultati dobijeni u različitim laboratorijama mogu lako porediti, korišćenjem internet MLST baze, bez potrebe za poređenjem slika gelova (Rafei i sar., 2014).

1.11.3. Sekvenciranje celog genoma

Sekvenciranje celog genoma ili WGS analiza omogućila je određivanje redosleda nukleotida čitavog bakterijskog genoma, njegovog jezgra ili visoko konzerviranog dela bakterijskog genoma, kao i pridruženih genskih elemenata. Danas predstavlja zlatni standard genotipizacije mikroorganizama. Sekvenciranje čitavog genoma pogodno je za proučavanje bolničkih epidemija ali i za lokalnu i globalnu epidemiološku analizu kroz filogenetske i populacione studije.

U slučaju pojave epidemije u bolnici, WGS može da ukaže na rezervoar i izvor infekcije, puteve transmisije cirkulišućih sojeva komparativnom analizom genetičkog materijala srodnih bakterijskih izolata, tako što detektuje pojedinačne mutacije, rekombinacije ili delecije koje mogu menjati fenotipske osobine bolničkih izolata. Takođe WGS beleži i horizontalni genski transfer gena rezistencije i/ili virulencije lociranih na mobilnim genskim elementima poput transpozona, integrona ili plazmida. U populacionim analizama WGS je koristan za svrstavanje sojeva u IC i poređenje kako srodnih, tako i genetički raznolikih izolata.

Proučavanjem pojedinačnih sojeva WGS nam daje odgovore o sadržaju gena rezistencije na antimikrobne agense kao i gena koji kodiraju faktore virulencije ili pojedine strukturne ili metaboličke komponente bakterijske ćelije. Detektuje se i precizan raspored gena, na hromozomu ili pridruženim genskim elementima - genskim ostrvima, kao i na mobilnim genskim elementima (Rafei i sar., 2014).

1.11.4. Populaciona struktura bolničkih izolata *A. baumannii*

Kako je u poslednje tri decenije rastao klinički značaj infekcija izazvanih *A. baumannii*, populacionim studijama metodama genotipizacije u bolnicama širom Evrope prvobitno su otkrivena tri dominantna klon, nazvana EC I - III. Bakterijski klonovi su bili odgovorni za pojavu epidemija u bolnicama, a pripadnici EC I i EC II su bili MDR izolati *A. baumannii*. Kako je ubrzo pojava sva tri klona zabeležena u bolnicama širom sveta, preimenovani su u internacionalne klonove (engl. *International clone*, IC). Danas su CRAB izolati pripadnici sva tri IC, a zbog niske inicijalne filogenetske raznolikosti *A. baumannii* brzo se razvijaju i šire novi IC (Diancourt i sar., 2010; Peleg i sar., 2008).

Tabela 3. Metode genotipizacije *A. baumannii* bazirane na karakterizaciji genomskih fragmenata

Metoda	Ciljna genska struktura	Postupak	Upotreba
RAPD	Čitav genom	PCR sa arbitrarnim prajmerima praćen gel elektroforezom	Brza i jednostavna metoda, zadovoljavajuće diskriminatorne moći, pogodna za epidemiološke studije na lokalnom nivou.
Rep-PCR	Čitav genom (posebno delovi između repetitivnih sekvenci)	PCR sa prajmerima komplementarnim repetitivnim sekvencama (rep1 i rep2) praćen gel elektroforezom	Brza i jednostavna metoda, visoke diskriminatorne moći, za tipizaciju izolata i svrstavanje u IC. Postoje manuelne i automatizovane forme. Pogodna za epidemiološke studije na lokalnom nivou, kao i za populacione studije.
PFGE	Čitav genom	DNA restrikcija jednim enzimom (<i>ApaI</i>), praćena gel elektroforezom u pulsnom polju	Metoda visoke diskriminatorne moći, predstavljala je zlatni standard za tipizaciju i poređenje sojeva u definisanom vremenu i prostoru i korisna dopuna globalnim epidemiološkim studijama. Komplikovana je za izvođenje, radi se u referentnim centrima.
AFLP	Čitav genom	Simultana DNA restrikcija sa 2 enzima (<i>MseI</i> i <i>EcoRI</i>), praćena selektivnom amplifikacijom sa <i>Cyc-5EcoRI+A</i> i <i>MseI+C</i> prajmerima (A i C selektivni nukleotidi) i gel elektroforezom	Komplikovana i skupa metoda, radi se u referentnim centrima. Visoke diskriminatorne moći i razvijene baze podataka. Genotipizacija visoke rezolucije do različitih nivoa (soja, vrste, IC). Važna za taksonomiju <i>Acinetobacter spp.</i> (identifikaciju do nivoa vrste) i zlatni standard molekularne epidemiologije na lokalnom i globalnom nivou.
MLVA	Genski polimorfizmi unutar VNTR lokusa	Amplifikacija VNTR lokusa, praćena gel elektroforezom	Metoda visoke diskriminatorne moći i razvijene elektronske baze podataka. Brza genotipizacija određenih genskih lokusa. Pogodna za poređenje bliskih sojeva, ali i za populacione studije.

AFLP: *Amplified fragment length polymorphism*; MLVA: *Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis*; PFGE: *elektroforeza u pulsirajućem električnom polju*; RAPD: *Random amplified polymorphic DNA*; Rep-PCR: *Repetitive sequencing-based PCR*; VNTR: *Variable-number tandem repeat*

(preuzeto i modifikovano iz Rafei i sar., 2014)

Tabela 4. Metode genotipizacije *A. baumannii* bazirane na karakterizaciji genskih sekvenci/celog genoma

Metoda	Ciljna genska struktura	Postupak	Upotreba
SLST	Polimorfizam jednog od sledećih genskih lokusa (<i>adeB</i> , <i>rpoB</i> , <i>recA</i> , <i>blaOXA-51</i>)	<i>adeB</i> : analiza unutrašnjeg fragmenta gena <i>rpoB</i> : parcijalno sekvenciranje <i>recA</i> : parcijalno sekvenciranje <i>blaOXA-51</i> : sekvenciranje čitavog gena	Brza i jednostavna metoda limitirane diskriminatorne moći, korisna za preliminarnu tipizaciju izolata i svrstavanje u IC. Važna za taksonomiju <i>Acinetobacter spp.</i> (identifikaciju do nivoa vrste): sekvenciranje <i>rpoB</i> gena ili PCR za detekciju <i>blaOXA-51</i> gena
3-LST	Polimorfizam tri genska lokusa (<i>ompA</i> , <i>blaOXA-51</i> , <i>csuE</i>)	Sekvenciranje sva tri gena ili multiplex PCR sa prajmerima za sva tri gena	Brza i jednostavna metoda, korisna za preliminarnu tipizaciju izolata i svrstavanje u IC. Postoji elektronska baza podataka.
MLST	Polimorfizam unutar 7 konzerviranih gena 1. Oksfordska šema (<i>gltA</i> , <i>gyrB</i> , <i>gdhB</i> , <i>recA</i> , <i>cpn60</i> , <i>gpi</i> , <i>rpoD</i>) 2. Pasterova šema (<i>cpn60</i> , <i>fusA</i> , <i>gltA</i> , <i>pyrG</i> , <i>recA</i> , <i>rplB</i> , <i>rpoB</i>)	Sekvenciranje i analiza svih 7 konzerviranih "housekeeping" gena	Metoda komplikovana za izvođenje, visoko reproducibilna, korisna za svrstavanje izolata u IC i njihovo interlaboratorijsko poređenje u populacionim studijama na globalnom nivou. Postoji elektronska baza podataka.
WGS	Polimorfizmi čitavog genoma	Sekvenciranje čitavog genoma i njegova komparativna analiza	Skupa metoda, rezervisana za referentne centre. Brzo i automatizovano sekvenciranje korisno za tipizaciju sojeva, svrstavanje sojeva u IC, određivanje gena rezistencije, virulencije, za filogenetske populacione analize.

SLST: *Single-locus sequence-based typing*; 3-LST: *3-locus sequence typing*; MLST: *Multilocus sequence typing*; WGS: *Whole-genome sequencing*; IC: *International clone*

(preuzeto i modifikovano iz Rafei i sar., 2014)

1.12. Terapijske opcije za lečenje infekcija izazvanih CRAB sojevima

Kasnih devedesetih godina zbog razvoja rezistencije na sve do tada korišćene antibakterijske agense lekovi izbora za terapiju većine bolničkih infekcija izazvanih *A. baumannii* postaju karbapenemi. Ubrzo po uvođenju u terapijske protokole u bolnicama širom sveta izoluju se sojevi rezistentni na imipenem (Manchanda i sar., 2010). CRAB bolnički izolati njačešće ispoljavaju MDR fenotip što dodatno komplikuje terapijski pristup (Mugnier i sar., 2010). Limitiran je broj antibiotika za lečenje infekcija izazvanih MDR *A. baumannii*. To su rezervni antibiotici poput minociklina/tigeciklina i polimiksina (kolistin i polimiksin B), kao i kombinacija ampicilina sa sulbaktamom. Sinergistički efekat u terapiji CRAB MDR *A. baumannii* infekcija pokazale su i kombinacije karbapanema sa nekim od navedenih antibiotika (karbapenem + ampicilin-sulbaktam; karbapenem + kolistin; karbapenem + kolistin + tigeciklin; karbapenem + kolistin + rifampicin; karbapenem + polimiksin B) (Lee i sar., 2017).

Zabrinjavajuća je činjenica da se u poslednjoj deceniji detektuju *A. baumannii* sojevi rezistentni na sve trenutno dostupne antibiotike. U borbi sa infekcijama izazvanim ovakvim sojevima pribegava se kombinacijama kolistina sa nekim od sledećih antibiotika: amikacin, tigeciklin, rifampicin, minociklin, sulbaktam, tazobaktam, fosfomicin, fuzidinska kiselina, teikoplanin, daptomicin, vankomicin, imipenem, meropenem (Lee i sar., 2017). Primećuje se da je kombinovana terapija MDR izolata vrlo slična, a u nekim slučajevima i identična kombinacijama lekova koje se koriste u terapiji panrezistentnih sojeva (engl. *pandrug-resistant*, PDR).

Brojna su istraživanja drugih oblika, neantibiotskog lečenja MDR *A. baumannii* infekcija poput terapije bakteriofagima, virusima koji inficiraju i liziraju bakterijsku ćeliju. Istražuje se i dejstvo bakteriofagom kodiranog endolizina koji razgrađuje ćelijski zid bakterije, kao i artilizina sintetisanog genetičkim inženjeringom a sposobnog da na putu do ćelijskog zida razgradi i spoljašnju membranu bakterije. Umereno toksična svetlo crvena boja "rose bengal" inhibira periplazmatsku translokaciju oksacilinaza pa ispoljava sinergistički efekat u kombinaciji sa karbapenemima. Sinergistički sa karbapenemima deluje i bulgecin A, prirodni derivat *Pseudomonas mesoacidophila*. Iste efekte u kombinaciji sa kolistinom imaju β -aminoketon (MD3) i farnezol koga luči *Candida albicans* kao jedan od "quorum-sensing" molekula. Ispituju se i različiti biljni proizvodi poput oleinske kiseline, zatim prirodni metali poput galijuma, peptidi sa antimikrobnim dejstvom, nanočestice i probiotici (Lee i sar., 2017).

1.13. Vakcine

Istraživanja na polju razvoja profilaktičke vakcine koja bi se koristila za prevenciju bolničkih infekcija izazvanih *A. baumannii* su u toku. Za sada se izvode na animalnim modelima u dva pravca: dizajnira se celoćelijska vakcina i prečišćena subjedinična proteinska vakcina.

Pokazano je da celoćelijska vakcina dovodi do razvoja brzog serološkog odgovora sa produkcijom antitela. Redukuje se količina bakterija u inficiranom tkivu imunizovanih životinja, a takođe je smanjen i nivo proinflamatornih citokina (IL-1 β , TNF- α i IL-6) u serumu životinja sa razvijenom sepsom. Uprkos dobrom imunskom odgovoru na celoćelijsku vakcinu, istraživače zabrinjava njena bezbednost zbog mogućnosti nepotpune inaktivacije bakterijske ćelije kao i mogućnosti kontaminacije pirogenim endotoksinom (McConnell i Pachón, 2010). Ovakav problem u dizajnu celoćelijske vakcine prevaziđen je upotrebom *A. baumannii* soja bez mogućnosti da sintetiše LPS usled mutacije jednog od gena uključenog u njegovu sintezu. Važno

je da su imunizovane životinje razvile zadovoljavajući imunski odgovor koji ih je zaštitio od infekcije ATCC 19606 *A. baumannii* sojem kao i kliničkim izolatom *A. baumannii* (García-Quintanilla i sar., 2014).

"Kandidati" za subjedinične proteinske vakcine su brojni: Bap, kompleks spoljašnje membrane (engl. *outer membrane complex*, OMC) i OMV. Bap je površinski protein *A. baumannii* koji ima regulatornu ulogu u sazrevanju biofilma. Subjedinična rekombinantna Bap vakcina dovodi do produkcije imunoglobulina G (IgG) u visokom titru, kao i do kompletne redukcije bakterija u inficiranom tkivu (Fattahian i sar., 2011). Vakcina sa OMC sačinjenim od brojnih površinskih antigena porekla ćelijske membrane *A. baumannii* testirana je na modelu mišje sepse. Imunizacija je indukovala humoralni i celularni imunski odgovor, smanjenje koncentracije proinflammatoryh citokina u serumu kao i broja bakterija u inficiranom tkivu. Šest dana posle aplikacije jedne doze vakcine razvijen je protektivni imunski odgovor koji je trajao dvadeset jedan dan. Ova činjenica je značajna u potencijalnoj odbrani u epidemijama izazvanim MDR *A. baumannii* bolničkim izolatima. Problem ove vakcine je moguća kontaminacija endotoksinom (McConnell i sar., 2011). OMV imaju ulogu u bakterijskoj kolonizaciji, razmeni gena rezistencije i transportu brojnih proteina, enzima, LPS-a i nukleinskih kiselina do ciljnih ćelija osetljivog domaćina. Vakcina sa prečišćenim OMV *A. baumannii* proučavana je na mišjem modelu diseminovane sepse. Indukovala je snažan humoralni imunski odgovor na višestruke bakterijske antigene sa prisustvom IgG i IgM antitela, uz redukciju proinflammatoryh citokina (IL-6 i IL-1 β) u serumu i bakterijskih ćelija u inficiranom tkivu. Vakcinisan miš bio je zaštićen od dejstva ATCC 19606 *A. baumannii* soja i dva klinička *A. baumannii* izolata od kojih je jedan bio panrezistentan (McConnell i sar., 2011).

Napredak na polju iznalaženja efikasne i bezbedne vakcine se nastavlja. Na modelu mišje sepse testirana je i vakcina sačinjena od dva proteinska antigena (Bap i OMV). Testirana dvokomponentna vakcina je indukovala protektivan celularni i humoralni imunski odgovor i kompletnu zaštitu protiv *A. baumannii* ATCC 19606 i MDR *A. baumannii* soja (Badmasti i sar., 2015).

2. Ciljevi istraživanja

- **Odrediti prevalenciju MDR, XDR i PDR izolata *A. baumannii* u bolnicama u Srbiji i uporediti osetljivost izolata *A. baumannii* između bolnice sekundarnog i tercijarnog nivoa**
- **Uporediti fenotipske i genotipske karakteristike sojeva *A. baumannii* izolovanih iz primarno sterilnih i kolonizovanih regija**
- **Odrediti gene koji kodiraju β -laktamaze klase A, B i D i njihovu distribuciju u bolnicama u Srbiji**
- **Odrediti MLST profile karbapenem rezistentnih izolata *A. baumannii*, ispitati klonsku distribuciju i klonsku povezanost izolata u bolnicama u Srbiji, kao i njihovu vezu sa internacionalnim klonskim linijama**

3. Materijal i metode

3.1. Poreklo *Acinetobacter spp.* bolničkih izolata

Istraživanje je obuhvatilo prospektivnu analizu svih nerepetitivnih kliničkih izolata *Acinetobacter spp.*, izolovanih u rutinskom radu bolničkih mikrobioloških laboratorija u bolnicama sekundarnog i tercijarnog nivoa u Republici Srbiji. U postavci ove studije, Republika Srbija sa blizu sedam miliona stanovnika arbitrarno je podeljena na tri regiona: Beograd (dva miliona), Južna Srbija (tri miliona) i Vojvodina (dva miliona). U devet bolničkih mikrobioloških laboratorija u sedam gradova Srbije [Opšta bolnica (OB) Subotica, OB Sombor, OB Pančevo, Institut za plućne bolesti u Sremskoj Kamenici, Kliničko bolnički centar (KBC) Bežanijska Kosa, KBC "Dr Dragiša Mišović", Institut za kardiovaskularne bolesti Dedinje, Klinički centar (KC) Kragujevac, KC Niš] metodom slučajnog izbora analiziran je 2401 klinički izolat izolovan iz različitih uzoraka hospitalizovanih pacijenata sa potvrđenim bakterijskim infekcijama tokom 2018. godine (period januar 2018. – januar 2019. godine). Bolničke laboratorije na teritoriji Vojvodine i južne Srbije analizirale su po 800 kliničkih izolata dok je u Beogradu analizom obuhvaćen 801 klinički izolat.

Identifikacija sojeva do nivoa roda ili Acb kompleksa izvršena je u kliničkim mikrobiološkim laboratorijama VITEK[®]2 sistemom (bioMérieux, Francuska) i metodama konvencionalne bakteriologije (morfologija kolonija na krvnom i MacConkey agaru, izgled bakterijskih ćelija na preparatu bojenom po Gramu, oksidaza testom, testiranjem pokretljivosti i paletom biohemijskih testova).

Kriterijum za uključivanje sojeva u studiju bila je izolacija Acb kompleksa iz nerepetitivnih kliničkih uzoraka (jedan uzorak po inficiranom pacijentu) obrađenih u rutinskom radu svake laboratorije. Postojanje bakterijske infekcije je dokazano odgovarajućim kliničkim i laboratorijskim parametrima. Kriterijum za isključivanje izolata iz studije bila je detekcija sojeva koji nisu pripadnici Acb kompleksa ili izolacija Acb kompleksa kod kolonizovanih pacijenata, odnosno pacijenata bez ikakvih kliničkih ili laboratorijskih markera infekcije. Da bi se isključila moguća pristrasnost u postavljanju dijagnoze infekcije, kliničke i laboratorijske markere infekcije je analizirao nezavisni klinički lekar.

Izolovani sojevi poslani su u mikrobiološku laboratoriju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu, radi daljeg ispitivanja. Izolati su transportovani u transportnim medijumima (Amies gel, Transystem, Copan, Italija), na čvrstim hranljivim podlogama razlivenim u petri šolje [krvni agar, hranljivi agar ili MacConkey agar (HiMedia, India)] ili u dubokom hranljivom agaru (HiMedia, India).

3.2. Identifikacija *A. baumannii* i konzervisanje sojeva

Sojevi su identifikovani do nivoa vrste *A. baumannii* molekularnim tehnikama, detekcijom *bla*OXA-51 gena u mikrobiološkoj laboratoriji Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu. Svi izolati su subkultivisani na Kolumbija krvnom agaru (KKA) sa 5% ovčije krvi i inkubirani 18-24h, na temperaturi od 36°C, u aerobnim uslovima. Sveža bakterijska kultura je korišćena za izolaciju bakterijske DNK.

3.2.1. Izolacija bakterijske DNK

Ekstrakcija bakterijske DNK je obavljena termičkom metodom. Puna eza sveže prekonocne bakterijske kulture je suspendovana u 200 μ l puferovanog fiziološkog rastvora (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS) u sterilnim plastičnim epruvetama, zapremine 1,5 ml (Eppendorf, Nemačka). Nakon homogenizacije suspenzije u vorteks aparatu (Vortex genius 3, Ika, Nemačka), dodato je još 800 μ l PBS. Posle centrifugiranja u trajanju od 2 minuta na 20.000 g obrtaja, supernatant je odbačen. Sediment je suspendovan u 200 μ l sterilne destilovane vode i homogenizovan. Epruvete su potom zagrevane u pećnici na 95-100°C, 10 minuta, nakon čega su hlađene na ledu i centrifugirane na 16.000 g obrtaja, 15 minuta, na 4°C. Supernatant, koji sadrži izolovanu DNK je prebacivan u novu sterilnu plastičnu mikroeprevetu, zapremine 1,5 ml. Izolovana DNK je bila odmah upotrebljena ili je čuvana u frižideru na temperaturi +4°C u periodu do 7 dana ili u zamrzivaču na -80°C u dužem vremenskom periodu.

3.2.2. Merenje prinosa DNK

Merenje prinosa DNK, odnosno DNK kvantitacija je obavljena korišćenjem spektrofotometra (Biophotometer 8,5 Light Center Height, Eppendorf, Nemačka). Koncentracija izolovane DNK je izračunavana na osnovu absorpcije svetlosti određene talasne dužine (260nm) prema Lambert Beer zakonu.

3.2.3. Prajmeri korišćeni za umnožavanje *blaOXA-51* gena koji kodira urođenu OXA-51 karbapenemazu

blaOXA-51 gen detektovan je reakcijom lančanog umnožavanja (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), korišćenjem prajmera, čije su sekvence prethodno publikovane (Tabela 5).

Temperature topljenja (engl. *melting temperature*, T_M) prajmera su određene korišćenjem PerlPrimer programa, na osnovu dužine sekvenci i procentualne zastupljenosti različitih nukleotida. U zavisnosti od T_M Fw i Rev prajmera, dizajnirana je temperatura vezivanja prajmera (engl. *annealing temperature*, T_A), koja je korišćena u protokolima za PCR ($T_A \sim T_M - 5^\circ\text{C}$). Eventualna međusobna komplementarnost prajmera proverena je korišćenjem web servera OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Prajmeri (Invitrogen, SAD), su rastvoreni u koncentraciji od 100 μ M i čuvani na $T = -20^\circ\text{C}$. Koncentracije radnih rastvora su bile 20 μ M i oni su čuvani na $T = -20^\circ\text{C}$.

Tabela 5: Prajmeri koji su korišćeni za umnožavanje *blaOXA-51* gena metodom PCR

Prajmer	Sekvenca 5' → 3'	Produkt (bp)	Referenca
<i>blaOXA-51</i> Fw	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353	Turton, 2006a
<i>blaOXA-51</i> Rev	TGGATTGCACTTCATCTTGG		

3.2.3.1. Reakcija lančanog umnožavanja *blaOXA-51* gena

Za PCR su korišćene sterilne plastične mikroeprovete, zapremine 0,2ml (Eppendorf, Nemačka). *blaOXA-51* gen je amplifikovan metodom PCR u reakcionoj smeši zapremine 25 μ l. U sterilnim, plastičnim mikroeprevetama, zapremine 0,2ml (Eppendorf, Nemačka) pravljena je reakciona smeša, koju su činili 12 μ l Taq PCR MasterMix (Qiagen, Nemačka), po 2 μ l rastvora prajmera *blaOXA-51* Fw i *blaOXA-51*Rev, koncentracije 20 μ M (Invitrogen, SAD), 4 μ l dejonizovane vode (Qiagen, Nemačka) i 5 μ l bakterijske DNK. Mikroeprovete sa reakcionim smešama su stavljane u termoblok aparata (Mastercycler Gradient, Eppendorf), pod uslovima opisanim u tabeli 6. Dejonizovana destilovana voda je korišćena kao negativna kontrola, a *blaOXA-51* pozitivni *A. baumannii* izolati, potvrđeni PCR-om i sekvenciranjem kao pozitivna kontrola.

Tabela 6: Uslovi izvođenja PCR metode za umnožavanje *blaOXA-51* gena

	T (°C)	Vreme
1. Inicijalna denaturacija	94	5 min.
2. Denaturacija	94	1 min.
3. Vezivanje prajmera	55	1 min.
4. Ekstenzija	72	1 min.
5. Finalna ekstenzija	72	5 min.
Broj ciklusa (od 2-4)	35	

3.2.3.2. Elektroforeza u agaroznom gelu

Elektroforetsko razdvajanje PCR produkata, na osnovu veličine produkta i naelektrisanja, obavljeno je u 1,5% agaroznom gelu. Smeša TAE pufera (40mM TRIS, 20mM sirćetne kiseline, 1mM EDTA, pH=7,6) i agaroze je više puta kuvana do tačke ključanja radi homogenizacije, do postizanja bezbojnosti. U tečnu agarozu je sipano 2 μ l 0,01% etidijum bromida, interkalirajuće boje, radi vizualizacije produkta. Smeša je zatim razlivana u kalup za gel, u koji je prethodno

učvršćen plastični češalj, koji služi za formiranje bunarčića. Nakon stezanja gela, češalj je izvađen, a ceo sistem je unošen u kadnicu za elektroforezu u koju je sipan TAE pufer do granične linije. Bunarčići su punjeni mešavinom 8μl PCR produkta i 2μl pufera za punjenje koncentracije 5X (engl. *loading buffer*), odnosno rastvora bromfenol plavog (Fermentas, SAD). Pored ispitivanih PCR produkata na gel je nanošen i DNK standard (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas, SAD), odnosno smeša DNK fragmenata poznatih veličina (engl. *ladder*) u zapremini od 5μl. Elektroforeza je obavljena pri naponu struje od 100V u trajanju od 60min.

3.2.3.3. Vizualizacija PCR produkta

Vizualizacija je obavljena prosvetljavanjem gelova korišćenjem UV transiluminatora (Kodak Gel logic 200 imaging system, SAD). Pojava trake odgovarajućeg broja baznih parova ukazivala je na postojanje datog gena u ispitivanom uzorku, a izostanak trake na njegovo odsustvo. Sistem za fotodokumentaciju (Kodak, 1D 3.6, SAD) je korišćen za slikanje gelova i skladištenje dobijenih fotografija.

3.2.4. Konzervisanje *A. baumannii* sojeva

Svi identifikovani *A. baumannii* izolati su presejani na hranljivi agar (HiMedia, India) inkubirani 18-24h, na temperaturi od 36°C, u aerobnim uslovima, a zatim je sveža bakterijska kultura konzervirana u bujonu sa obranim mlekom (skim milk, HiMedia, Indija) u plastičnim mikro-epruветama zapremine 2ml na temperaturi od -80°C, do dalje dijagnostike.

3.3. Test osetljivosti na antibiotike

Osetljivost *A. baumannii* na antibakterijske agense je ispitivana disk difuzionim metodom antibiograma, kombinovanim difuziono-dilucionim metodom korišćenjem gradijent traka (Liofilchem, Italija), kao i bujon mikrodilucionim metodom.

3.3.1. Disk difuzioni metod antibiograma

Disk difuzioni metod antibiograma izveden je na osnovu preporuka Američkog udruženja za testiranje antimikrobne osetljivosti (engl. *Clinical & Laboratory Standards Institute*, CLSI) (CLSI, 2017). Korišćeni su sledeći diskovi (Bio-Rad, UK): ampicilin-sulbaktam (AMS) 10/10μg, piperacilin-tazobaktam (TZP) 100/10μg, ceftazidim (CAZ) 30μg, cefepim (FEP) 30μg, meropenem (MER) 10μg, imipenem (IMP) 10μg, gentamicin (GEN) 10μg, amikacin (AK) 30μg, tobramicin (TOB) 10μg, tetraciklin (TET) 30μg, ciprofloksacin (CIP) 5μg, levofloksacin (LEV) 5μg i trimetoprim-sulfametoksazol (TSX) 1.25/23.75μg.

Pojedinačne kolonije *A. baumannii*, sveže prekonocne bakterijske kulture na hranljivom agaru (HiMedia, Indija), suspendovane su u fiziološki rastvor (FR). Gustina inokuluma je bila ekvivalentna turbiditetu od 0,5 McFarland (McF). Tako pripremljen inokulum je, pomoću sterilnog brisa, zasejavan na Miler Hinton agar (engl. *Mueller Hinton agar*, MHA) (HiMedia, Indija). Nakon aplikacije diskova impregniranih antibiotikom, izvršena je inkubacija u trajanju

od 20-24 sata, na temperaturi od 36°C, u aerobnim uslovima. Prečnici zona inhibicije rasta su očitavani u milimetrima, a kategorije osetljivosti su interpretirane prema preporukama CLSI standarda (CLSI, 2017). Rezistentni i intermedijarno osetljivi sojevi su tretirani kao izolati sa smanjenom osetljivošću na antibiotike. *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 korišćeni su kao kontrolni sojevi.

3.3.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za IMP i MER su određivane kombinovanim difuziono-dilucionim metodom antibiograma, korišćenjem gradijent traka (Liofilchem, Italija). Od sveže prekončne kulture je pravljena bakterijska suspenzija turbiditeta 0,5 McF, koja je zasejavana brisom na MHA (HiMedia, Indija). Nakon aplikacije traka impregniranih antibiotikom ploče su inkubirane u trajanju od 20-24 sata na 36°C u aerobnim uslovima, a potom je očitavana MIK antibiotika u µg/ml. Rezultati su interpretirani prema preporukama CLSI (CLSI, 2017).

Osetljivost na kolistin (COL) određivana je bujon mikrodilucionom metodom, ComASP™ Colistin testom (Liofilchem, Italija). Pojedinačne kolonije *A. baumannii*, sveže prekončne bakterijske kulture na hranljivom agaru (HiMedia, Indija), suspendovane su u FR. Gustina inokuluma je bila ekvivalentna turbiditetu od 0,5 McF. Od ovako pripremljenog inokuluma su u roku od petnaest minuta napravljeni radni rastvori A i B. Rastvor A je činio razblaženje bakterijskog inokuluma od 0,5 McF u FR u odnosu 1:20. Rastvor B je napravljen dodavanjem 0.4 ml rastvora A u eprvetu sa Miler Hinton bujonom (engl. *Mueller Hinton broth*, MHB) obezbeđenim u kitu. U test polje, odnosno bunarčić u test panelu pipetirano je 100 µl rastvora B. Poklopljen panel je zatim inkubiran 16-20 sati na 36°C u aerobnim uslovima, a potom je očitavana MIK za COL u µg/ml. Rezultati su interpretirani prema preporukama proizvođača, a u skladu sa CLSI smernicama (CLSI, 2017).

Osetljivost na tigeciklin (TYG) određivana je bujon mikrodilucionom metodom u sveže pripremljenom MHB (HiMedia, Indija) adekvatne jonske koncentracije, prateći CLSI proceduru (CLSI, 2018). Testirane koncentracije TYG kretale su se od 0,06 do 64 µg/ml. Paneli su inokulisani manuelno a rezultati očitavani vizuelno i izražavani u µg/mL. Kako za vrstu *A. baumannii* ni CLSI standard ni Evropski komitet za ispitivanje osetljivosti bakterija na antibiotike (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST) još uvek nisu determinisali kategorije osetljivosti za TYG, iste su interpretirane prema preporukama EUCAST standarda za Enterobacterales ($S \leq 1 \mu\text{g/mL}$; $R > 2 \mu\text{g/mL}$) (EUCAST, 2018).

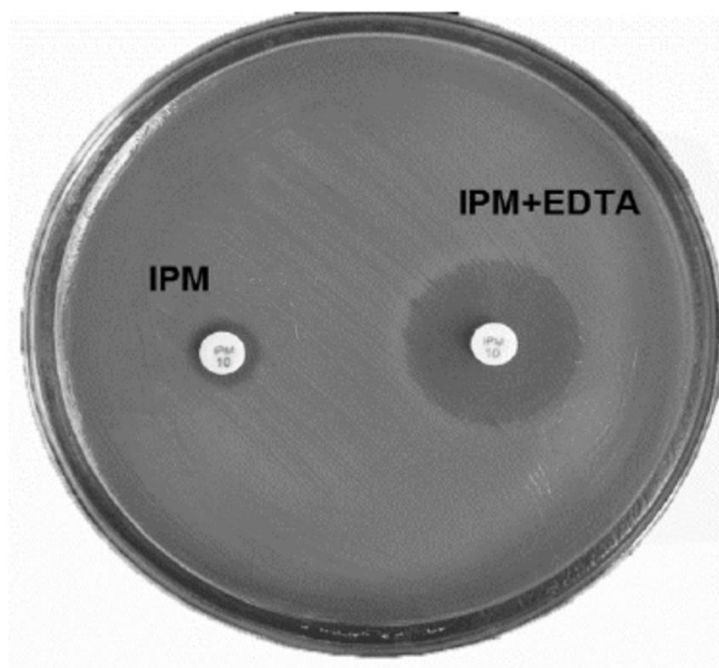
3.3.3. Kategorizacija *A. baumannii* na multirezistentne, ekstenzivno rezistentne i panrezistentne izolate

Svi testirani *A. baumannii* sojevi su u skladu sa razvijenom rezistencijom na određene antibakterijske agense klasifikovani u sledeće kategorije: MDR [soj rezistentan na bar jedan antibiotik u/iz 3 ili više testiranih antimikrobnih klasa], ekstenzivno rezistentan (engl. *extensively drug-resistant*, XDR) [soj rezistentan na bar jedan antibiotik u svim osim dve ili jedne antimikrobne klase] i PDR [soj rezistentan na sve antibiotike iz svih testiranih antimikrobnih klasa] (Magiorakos i sar., 2012).

3.4. Fenotipska detekcija produkcije metalo β -laktamaza primenom imipenem-EDTA kombinovanog disk testa

Kod svih IMP rezistentnih *A. baumannii* izolata testirana je produkcija MBL imipenem-EDTA kombinovanim disk testom. Suspenzija turbiditeta 0,5 McF napravljena je od sveže prekončne čiste bakterijske kulture i brisom zasejana na MHA (HiMedia, Indija). Na MHA su zatim postavljena dva diska IMP (10 μ g) na rastojanju od 20 mm (od centra jednog do centra drugog diska). Na jedan IMP disk pipetom je naneto 750 μ g 0,5 M EDTA. MHA sa postavljenim testom inkubiran je 16-18 sati na 35°C. Rezultat testa je očitavan na osnovu prečnika zone inhibicije rasta oko oba diska. Prečnik zone inhibicije rasta kod MBL produkujućih sojeva bio je za 7 mm manji oko diska IMP u odnosu na IMP+EDTA disk (Slika 5) (El-Kazzaz i El-khier, 2015; Yong i sar., 2002).

Rastvor 0,5 M koncentracije EDTA napravljen je rastvaranjem 186,1 g dinatrijum EDTA \cdot 2H₂O u 1000 ml destilovane vode. Dodajući NaOH postignut je pH 8.0. Rastvor je potom sterilisan u autoklavu. EDTA kao helator metala pojačava dejstvo β -laktamskih antibiotika inaktivirajući jon cinka u aktivnom mestu MBL (Yong i sar., 2002).



Slika 5: Pozitivan imipenem-EDTA kombinovani disk test

(preuzeto i modifikovano iz El-Kazzaz i El-khier, 2015)

3.5. Detekcija gena koji kodiraju stečene oksacilinaze

3.5.1. Prajmeri korišćeni za umnožavanje gena koji kodiraju stečene oksacilinaze

Svim CRAB izolatima detektovani su *blaOXA-23*, *blaOXA-24*, *blaOXA-58* i *blaOXA-143* geni, korišćenjem prajmera, čije su sekvence prethodno publikovane (Tabela 7). T_M i T_A , kao i eventualna međusobna komplementarnost prajmera su određeni postupkom opisanim u poglavlju 3.2.3. Prajmeri (Invitrogen, SAD), su rastvoreni u koncentraciji od 100 μ M i čuvani na $T=-20^\circ\text{C}$. Koncentracije radnih rastvora su bile 20 μ M i oni su čuvani na $T=-20^\circ\text{C}$.

Tabela 7: Prajmeri koji su korišćeni za umnožavanje gena koji kodiraju stečene oksacilinaze

Prajmer	Sekvenca 5' → 3'	Produkt (bp)	Referenca
<i>blaOXA-23</i> Fw	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501	Woodford, 2006.
<i>blaOXA-23</i> Rev	ATTTCTGACCGCATTTCAT		
<i>blaOXA-24</i> Fw	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	246	Woodford, 2006.
<i>blaOXA-24</i> Rev	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT		
<i>blaOXA-58</i> Fw	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599	Woodford, 2006.
<i>blaOXA-58</i> Rev	CCCCTCTGCGCTCTACATAC		
<i>blaOXA-143</i> Fw	TGGCACTTTCAGCAGTTCCT	149	Higgins, 2010.
<i>blaOXA-143</i> Rev	TAATCTTGAGGGGGCCAACC		

3.5.2. Reakcije lančanog umnožavanja za detekciju *blaOXA-23*, *blaOXA-24*, *blaOXA-58* i *blaOXA-143* gena

Za PCR su korišćene sterilne plastične mikroeprovete, zapremine 0,2ml (Eppendorf, Nemačka). Geni su amplifikovani primenom dva multiplex PCR-a u reakcionoj smeši zapremine 25 μ l. U sterilnim, plastičnim mikroeprovetama, zapremine 0,2ml (Eppendorf, Nemačka) pravljena je reakciona smeša, koju su činili:

- **Multiplex PCR I:** 12,5 μ l Taq PCR MasterMix (Qiagen, Nemačka), po 1 μ l rastvora prajmera *blaOXA-23* Fw, *blaOXA-23* Rev, *blaOXA-24* Fw, *blaOXA-24* Rev koncentracije 20 μ M (Invitrogen, SAD), 3,5 μ l dejonizovane vode (Qiagen, Nemačka) i 5 μ l bakterijske DNA.
- **Multiplex PCR II:** 12,5 μ l Taq PCR MasterMix (Qiagen, Nemačka), po 1 μ l rastvora prajmera *blaOXA-58* Fw, *blaOXA-58* Rev, *blaOXA-143* Fw, *blaOXA-*

143 Rev koncentracije 20 μ M (Invitrogen, SAD), 3,5 μ l dejonizovane vode (Qiagen, Nemačka) i 5 μ l bakterijske DNA.

Mikroeprovete sa reakcionim smešama su stavljane u termoblok aparata (Mastercycler Gradient, Eppendorf), pod uslovima opisanim u tabeli 8.

Tabela 8: Uslovi izvođenja multiplex PCR-a za detekciju *blaOXA-23*, *blaOXA-24*, *blaOXA-58* i *blaOXA-143* gena

	T (°C)	Vreme
1. Inicijalna denaturacija	94	5 min.
2. Denaturacija	94	1 min.
3. Vezivanje prajmera	55	1 min.
4. Ekstenzija	72	1 min.
5. Finalna ekstenzija	72	5 min.
Broj ciklusa (od 2-4)	35	

Vizualizacija PCR produkata je vršena elektroforetskim razdvajanjem u 1,5% agaroznom gelu i prosvetljavanjem na UV transiluminatoru, kako je opisano u poglavljima 3.2.3.2. i 3.2.3.3.

3.6. Detekcija gena koji kodiraju metalo β -laktamaze

3.6.1. Prajmeri korišćeni za umnožavanje gena koji kodiraju stečene metalo β -laktamaze

Svim CRAB izolatima detektovani su *blaIMP*, *blaVIM*, *blaGIM*, *blaNDM*, *blaSPM* i *blaSIM* geni, korišćenjem prajmera, čije su sekvence prethodno publikovane (Tabela 9). T_M i T_A , kao i eventualna međusobna komplementarnost prajmera su određeni postupkom opisanim u poglavlju 3.2.3. Prajmeri (Invitrogen, SAD), su rastvoreni u koncentraciji od 100 μ M i čuvani na $T=-20^\circ\text{C}$. Koncentracije radnih rastvora su bile 20 μ M i oni su čuvani na $T=-20^\circ\text{C}$.

Tabela 9: Prajmeri koji su korišćeni za umnožavanje gena koji kodiraju stečene metalo β -laktamaze

Prajmer	Sekvenca 5' → 3'	Produkt (bp)	Referenca
<i>blaIMP</i> Fw	GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC	232	Poirel, 2011.
<i>blaIMP</i> Rev	GGTTTAAAYAAAACAACCACC		
<i>blaVIM</i> Fw	GATGGTGTTTGGTCGCATA	390	Poirel, 2011.
<i>blaVIM</i> Rev	CGAATGCGCAGCACCAG		
<i>blaGIM</i> Fw	TCGACACACCTTGGTCTGAA	477	Poirel, 2011.
<i>blaGIM</i> Rev	AACTTCCAACCTTGGCCATGC		
<i>blaNDM</i> Fw	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621	Poirel, 2011.
<i>blaNDM</i> Rev	CGGAATGGCTCATCACGATC		
<i>blaSPM</i> Fw	AAAATCTGGGTACGCAAACG	271	Poirel, 2011.
<i>blaSPM</i> Rev	ACATTATCCGCTGGAACAGG		
<i>blaSIM</i> Fw	TACAAGGGATTCGGCATCG	570	Poirel, 2011.
<i>blaSIM</i> Rev	TAATGGCCTGTTCCCATGTG		

3.6.2. Reakcije lančanog umnožavanja za detekciju *blaIMP*, *blaVIM*, *blaGIM*, *blaNDM*, *blaSPM* i *blaSIM* gena

Za PCR su korišćene sterilne plastične mikroeprovete, zapremine 0,2ml (Eppendorf, Nemačka). Geni su amplifikovani primenom dva multiplex PCR-a u reakcionoj smeši zapremine 25 μ l. U sterilnim, plastičnim mikroeprovetama, zapremine 0,2ml (Eppendorf, Nemačka) pravljena je reakciona smeša, koju su činili:

- **Multiplex PCR I:** 12,5 μ l Taq PCR MasterMix (Qiagen, Nemačka), po 1 μ l rastvora prajmera *blaGIM* Fw, *blaGIM* Rev, *blaNDM* Fw, *blaNDM* Rev, *blaSPM* Fw i *blaSPM* Rev koncentracije 20 μ M (Invitrogen, SAD), 1,5 μ l dejonizovane vode (Qiagen, Nemačka) i 5 μ l bakterijske DNA.
- **Multiplex PCR II:** 12,5 μ l Taq PCR MasterMix (Qiagen, Nemačka), po 1 μ l rastvora prajmera *blaIMP* Fw, *blaIMP* Rev, *blaSIM* Fw, *blaSIM* Rev, *blaVIM* Fw i *blaVIM* Rev koncentracije 20 μ M (Invitrogen, SAD), 1,5 μ l dejonizovane vode (Qiagen, Nemačka) i 5 μ l bakterijske DNA.

Mikroeprovete sa reakcionim smešama su stavljanje u termoblok aparata (Mastercycler Gradient, Eppendorf), pod uslovima opisanim u tabeli 10 i 11.

Tabela 10: Uslovi izvođenja multiplex PCR-a za detekciju *blaGIM*, *blaNDM* i *blaSPM* gena

	T (°C)	Vreme
1. Inicijalna denaturacija	94	5 min.
2. Denaturacija	94	1 min.
3. Vezivanje prajmera	57	1 min.
4. Ekstenzija	72	1 min.
5. Finalna ekstenzija	72	5 min.
Broj ciklusa (od 2-4)	35	

Tabela 11: Uslovi izvođenja multiplex PCR-a za detekciju *blaIMP*, *blaSIM* i *blaVIM* gena

	T (°C)	Vreme
1. Inicijalna denaturacija	94	5 min.
2. Denaturacija	94	1 min.
3. Vezivanje prajmera	55	1 min.
4. Ekstenzija	72	1 min.
5. Finalna ekstenzija	72	5 min.
Broj ciklusa (od 2-4)	35	

Vizualizacija PCR produkata je vršena elektroforetskim razdvajanjem u 1,5% agaroznom gelu i prosvetljavanjem na UV transiluminatoru, kako je opisano u poglavljima 3.2.3.2. i 3.2.3.3.

3.7. Detekcija gena koji kodiraju β -laktamaze klase A po Ambleru

3.7.1. Prajmeri korišćeni za umnožavanje gena koji kodiraju β -laktamaze klase A po Ambleru

Svim CRAB izolatima detektovani su *blaTEM*, *blaSHV*, *blaVEB*, *blaPER*, *blaGES*, *blaKPC* i *blaCTX-M* geni, korišćenjem prajmera, čije su sekvence prethodno publikovane (Tabela12). T_M i T_A , kao i eventualna međusobna komplementarnost prajmera su određeni postupkom opisanim u poglavlju 3.2.3. Prajmeri (Invitrogen, SAD), su rastvoreni u koncentraciji

od 100µM i čuvani na T=-20°C. Koncentracije radnih rastvora su bile 20µM i oni su čuvani na T=-20°C.

Tabela 12: Prajmeri koji su korišćeni za umnožavanje gena koji kodiraju β-laktamaze klase A po Ambleru

Prajmer	Sekvenca 5' → 3'	Produkt (bp)	Referenca
<i>bla</i> TEM Fw	AGACGTCAGGTGGCACTTTT	977	Findlay, 2011.
<i>bla</i> TEM Rev	GGCACCTATCTCAGCGATCT		
<i>bla</i> SHV Fw	CGCCGGGTTATTCTTATTTG	1069	Findlay, 2011.
<i>bla</i> SHV Rev	CCACGTTTATGGCGTTACCT		
<i>bla</i> VEB Fw	C GACTTCCATTTCCCGATGC	643	Findlay, 2011.
<i>bla</i> VEB Rev	GGACTCTGCAACAAATACGC		
<i>bla</i> PERFw	ATGAATGTCATTATAAAAGC	925	Findlay, 2011.
<i>bla</i> PER Rev	AATTTGGGCTTAGGGCAGAA		
<i>bla</i> GES Fw	ATGCGCTTCATTGACGCAC	864	Findlay, 2011.
<i>bla</i> GES Rev	CTATTTGTCCGTGCTCAGG		
<i>bla</i> KPC Fw	CAGCTCATTCAAGGGCTTTC	196	Findlay, 2011.
<i>bla</i> KPC Rev	GGCGGCGTTATCACTGTATT		
<i>bla</i> CTX-M Fw	GACGTCCGTATTTGCCTTC	985	Findlay, 2011.
<i>bla</i> CTX-M Rev	ACCGTCCGGTGACGATTTTAG		

3.7.2. Reakcije lančanog umnožavanja za detekciju *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*VEB, *bla*PER, *bla*GES, *bla*KPC i *bla*CTX-M gena

Za PCR su korišćene sterilne plastične mikroeprovete, zapremine 0,2ml (Eppendorf, Nemačka). Geni su amplifikovani primenom dva multiplex PCR-a u reakcionoj smeši zapremine 25µl. U sterilnim, plastičnim mikroeproveta, zapremine 0,2ml (Eppendorf, Nemačka) pravljena je reakciona smeša, koju su činili:

- **Multiplex PCR I:** 12,5µl Taq PCR MasterMix (Qiagen, Nemačka), po 1µl rastvora prajmera *bla*TEM Fw, *bla*TEM Rev, *bla*VEB Fw, *bla*VEB Rev, *bla*GES Fw i *bla*GES Rev koncentracije 20µM (Invitrogen, SAD), 1,5µl dejonizovane vode (Qiagen, Nemačka) i 5µl bakterijske DNA.
- **Multiplex PCR II:** 12,5µl Taq PCR MasterMix (Qiagen, Nemačka), po 1µl rastvora prajmera *bla*CTX-M Fw, *bla*CTX-M Rev, *bla*SHV Fw, *bla*SHV Rev, *bla*KPC Fw i *bla*KPC Rev koncentracije 20µM (Invitrogen, SAD), 1,5µl dejonizovane vode (Qiagen, Nemačka) i 5µl bakterijske DNA.

- **Uniplex PCR:** 12µl Taq PCR MasterMix (Qiagen, Nemačka), po 2µl rastvora prajmera *bla*PER Fw i *bla*PER Rev, koncentracije 20 µM (Invitrogen, SAD), 4µl dejonizovane vode (Qiagen, Nemačka) i 5µl bakterijske DNA.

Mikropruvete sa reakcionim smešama su stavljanje u termoblok aparata (Mastercycler Gradient, Eppendorf), pod uslovima opisanim u tabeli 13, 14 i 15.

Tabela 13: Uslovi izvođenja multiplex PCR-a za detekciju *bla*TEM, *bla*VEB, *bla*GES gena

	T (°C)	Vreme
1. Inicijalna denaturacija	94	5 min.
2. Denaturacija	94	1 min.
3. Vezivanje prajmera	58	1 min.
4. Ekstenzija	72	1 min.
5. Finalna ekstenzija	72	5 min.
Broj ciklusa (od 2-4)	35	

Tabela 14: Uslovi izvođenja multiplex PCR-a za detekciju *bla*CTX-M, *bla*SHV, *bla*KPC gena

	T (°C)	Vreme
1. Inicijalna denaturacija	94	5 min.
2. Denaturacija	94	1 min.
3. Vezivanje prajmera	56	1 min.
4. Ekstenzija	72	1 min.
5. Finalna ekstenzija	72	5 min.
Broj ciklusa (od 2-4)	35	

Tabela 15: Uslovi izvođenja uniplex PCR-a za detekciju *blaPER* gena

	T (°C)	Vreme
1. Inicijalna denaturacija	94	5 min.
2. Denaturacija	94	1 min.
3. Vezivanje prajmera	50	1 min.
4. Ekstenzija	72	1 min.
5. Finalna ekstenzija	72	5 min.
Broj ciklusa (od 2-4)	35	

Vizualizacija PCR produkata je vršena elektroforetskim razdvajanjem u 1,5% agaroznom gelu i prosvetljavanjem na UV transiluminatoru, kako je opisano u poglavljima 3.2.3.2. i 3.2.3.3.

3.8. Detekcija insercione sekvence *ISAbal*

3.8.1. Prajmeri korišćeni za umnožavanje *ISAbal*

Sekvenca *ISAbal* detektovana je reakcijom lančanog umnožavanja korišćenjem prajmera, čije su sekvence prethodno publikovane (Tabela 16).

T_M i T_A , kao i eventualna međusobna komplementarnost prajmera su određeni postupkom opisanim u poglavlju 3.2.3. Prajmeri (Invitrogen, SAD), su rastvoreni u koncentraciji od 100 μ M i čuvani na $T=-20^\circ\text{C}$. Koncentracije radnih rastvora su bile 20 μ M i oni su čuvani na $T=-20^\circ\text{C}$.

Tabela 16: Prajmeri koji su korišćeni za umnožavanje *ISAbal* metodom PCR

Prajmer	Sekvenca 5' → 3'	Produkt (bp)	Referenca
<i>ISAbal</i> Fw	CACGAATGCAGAAGTTG	549	Segal, 2005.
<i>ISAbal</i> Rev	CGACGAATACTATGACAC		

3.8.2. Reakcija lančanog umnožavanja za detekciju *ISAbal*

Za PCR su korišćene sterilne plastične mikroeprovete, zapremine 0,2ml (Eppendorf, Nemačka). *ISAbal* je amplifikovana metodom PCR u reakcionoj smeši zapremine 25 μ l. U sterilnim, plastičnim mikroeprevetama, zapremine 0,2ml (Eppendorf, Nemačka) pravljen je reakciona smeša, koju su činili 12 μ l Taq PCR MasterMix (Qiagen, Nemačka), po 2 μ l rastvora prajmera *ISAbal* Fw i *ISAbal* Rev, koncentracije 20 μ M (Invitrogen, SAD), 4 μ l dejonizovane vode (Qiagen, Nemačka) i 5 μ l bakterijske DNA. Mikroeprovete sa reakcionim smešama su stavljane u termoblok aparata (Mastercycler Gradient, Eppendorf), pod uslovima opisanim u tabeli 17. Dejonizovana destilovana voda je korišćena kao negativna kontrola, a *ISAbal* pozitivni *A. baumannii* izolati, potvrđeni PCR-om i sekvenciranjem kao pozitivna kontrola.

Tabela 17: Uslovi izvođenja PCR metode za umnožavanje *ISAbal*

	T (°C)	Vreme
1. Inicijalna denaturacija	94	5 min.
2. Denaturacija	94	1 min.
3. Vezivanje prajmera	56	1 min.
4. Ekstenzija	72	1 min.
5. Finalna ekstenzija	72	5 min.
Broj ciklusa (od 2-4)	35	

3.9. Sekvenciranje *blaOXA* i *blaMBL* gena

Metodom slučajnog izbora iz svake od pomenutih bolnica u Srbiji izabran je reprezentativan broj CRAB sojeva nosilaca *blaOXA* i *blaMBL* gena. Geni su amplifikovani PCR metodama na način opisan u poglavljima 3.2.3; 3.5.1; 3.5.2; 3.6.1 i 3.6.2. Potom je izvršeno prečišćavanje dobijenog PCR produkta, reakcija cikličnog sekvenciranja, precipitacija produkta cikličnog sekvenciranja, denaturacija i kapilarna elektroforeza. Dobijene *blaOXA* i *blaMBL* genske sekvence su poređene sa bazom genskih sekvenci Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) koristeći BLAST (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) 2.7.0 program za pretragu homologije nukleotida.

3.9.1. Prečišćavanje PCR produkta

Dobijeni OXA i MBL amplikoni su prečišćeni komercijalnim setom (QIAquick PCR purification kit), prema preporuci proizvođača (Qiagen, Nemačka). U plastične mikroeprovete, zapremine 1,5ml je sipano 250 μ l PB pufera (pufer 1), nakon čega je dodato 50 μ l PCR produkta (preporučeni odnos zapremine pufera i uzorka je 5:1). Sadržaj je zatim prebacivan pipetom u spin kolone i centrifugiran 1 min na 17900 x g. Filtrat iz kolekcione epruvete je odstranjivan, a kolona je vraćana u istu epruvetu. Zatim je dodavano 750 μ l PE pufera (pufer 2) i sadržaj je opet centrifugiran 1min na 17900 x g. Dobijeni filtrat je odstranjen, a kolona vraćena u istu epruvetu. Nakon centrifugiranja u trajanju od 1min, pri brzini od 18000 x g, kolona je stavljena u čistu plastičnu mikroeprovetu zapremine 1,5ml. Tokom prethodnih postupaka, DNK je adherisala za silika gel membranu u prisustvu visokih koncentracija soli, uz istovremeno filtriranje drugih sastojaka PCR produkta. U poslednjoj fazi purifikacije, finalna elucija je postignuta dodavanjem 30 μ l EB pufera (pufer 3) u centar membrane. Kolone su ostavljane 1 min na sobnoj temperaturi, a nakon centrifugiranja u trajanju od 1min, kolone su bacane, a prečišćeni PCR produkt iz plastičnih epruvata je čuvan u frižideru na +4°C, do 7 dana, ili na -20°C u dužem vremenskom periodu.

3.9.2. Reakcija cikličnog sekvenciranja

U reakciji cikličnog sekvenciranja (engl. *cycle sequencing*) amplifikovan i prečišćen PCR produkt predstavlja matricu za sintezu jednostrukih DNK lanaca, različitih dužina, komplementarnih matrici. U odnosu na PCR metodu, u reakciji cikličnog sekvenciranja se pored deoksiribonukleotida dodaju i dideoksiribonukleotidi, nakon čije ugradnje prestaje dalja elongacija lanca. Četiri različita dideoksiribonukleotida su obeležena sa četiri različite fluorescentne boje. Produkt reakcije čine proizvodi različitih dužina, koji su komplementarni matrici. Reakciona smeša zapremine 15 μ l se sastojala od 1 μ l komercijalne smeše Big Dye Terminator v3.1 CycleSequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, Applied Biosystems, SAD), 1 μ l 20 μ M Fw prajmera za svaki sekvencirani gen, 3 μ l pufera (Applied Biosystems, SAD), 9 μ l dejonizovane vode i 1 μ l prečišćenog PCR produkta. Plastične mikroeprovete zapremine 0,2ml (Eppendorf, Nemačka), u kojima su bile reakcione smeše, postavljane su u termoblok aparata (Mastercycler Gradient, Eppendorf) pod uslovima opisanim u tabeli 18.

Tabela 18: Uslovi izvođenja reakcije cikličnog sekvenciranja amplifikovanih i prečišćenih *blaOXA* i *blaMBL* gena

	T (°C)	Vreme
1. Inicijalna denaturacija	96	1min.
2. Denaturacija	96	10sek.
3. Vezivanje prajmera	50	5sek.
4. Ekstenzija	60	4min.
Broj ciklusa (od 2-4)	40	

Dobijeni produkti su čuvani na T=+4°C ili na T=-20°C do faze prečišćavanja.

3.9.3. Precipitacija produkta cikličnog sekvenciranja izopropanolom

Zamrznuti produkti cikličnog sekvenciranja su, neposredno pred precipitaciju, odmrzavani na sobnoj temperaturi (T=+25°C). U uzorke je dodavano 80µl 75% izopropanola. Nakon kratkog vorteksiranja uzorci su ostavljani 15min. na sobnoj temperaturi u mraku. Posle centrifugiranja u trajanju od 45min na 500 x g, mikroeprove su okretane naopačke i postavljane na papirnatu vatu u cilju odstranjivanja supernatanta. Zatim su uzorci centrifugirani još 2min., na 300 x g u istom položaju i inkubirani u mraku 15-30min. Precipitirani produkti su denaturisani odmah ili su čuvani na T=-20°C do sledeće faze.

3.9.4. Denaturacija

Nakon precipitacije, u uzorke cikličnog sekvenciranja je dodato 20µl formamida. U termobloku je vršena denaturacija na temperaturi od 94°C, u trajanju od 2min. Uzorci su prebacivani u plastične stripove (Eppendorf, Nemačka), koji su stavljeni u automatizovani sekvenator (310 Genetic Analyser, Applied Biosystems) u kome se vrši kapilarna elektroforeza.

3.9.5. Kapilarna elektroforeza

Prehodno pripremljeni produkti reakcije cikličnog sekvenciranja u procesu elektroforeze prolaze kroz kapilaru automatizovanog sekvenatora (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer; Applied Biosystems). Na kraju svakog umnoženog fragmenta nalazi se dideoksinukleotid (DDN), koji je obeležen fluorescentnom bojom. Pri izlaganju snopu laserskih zraka, obeleženi DDN, biva ekscitiran, a kamera aparata detektuje svetlost određene talasne dužine. Dobijeni rezultati se obrađuju softverski (Sequences Analysis 5.1), nakon čega se konstruiše elektroferogram, odnosno skup sinusoidnih krivi, različitih boja, čiji vrhovi odgovaraju nukleotidima na odgovarajućim mestima. Vrhovi kriva su obeleženi slovima odgovarajućih nukleotida (A, T, G,

C), a njihov redosled odgovara ispitivanoj sekvenci. Sekvence su obrađivane i analizirane BioEdit 7.0.1 i MEGA 5.0 softverima.

3.9.6. Određivanje genskih varijanti ili alela

Dobijene *blaOXA* i *blaMBL* genske sekvence su poređene sa bazom genskih sekvenci Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) koristeći BLAST 2.7.0 program za pretragu homologije nukleotida. *blaOXA* i *blaMBL* aleli su određeni na osnovu visokog stepena homologije ($\geq 92\%$) između sekvence ispitivanih sojeva i sekvenci iz baze podataka.

3.10. PFGE

Metodom slučajnog izbora, uzevši u obzir vrstu materijala iz kog su izolovani kao i sadržaj gena koji kodiraju β - laktamaze CRAB izolata, iz svake od pomenutih bolnica u Srbiji izabran je reprezentativan broj sojeva za PFGE analizu, koji je u konačnom zbiru činio 60 izolata. PFGE je odrađen u 2015 Pulsafor aparatu (LKB Instruments, Broma, Švedska), po prethodono publikovanom protokolu (Seifert i sar., 2005).

3.10.1. Priprema bakterijskih sojeva i formiranje kalupa

CRAB sojevi su zasejani na hranljivi agar (HiMedia, Indija) i inkubirani preko noći u aerobnim uslovima na $36\pm 1^\circ\text{C}$. Puna eza (10 μl) čiste prekonocne bakterijske kulture inokulisana je u 2.5 ml pufera za suspendovanje ćelija (100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 8.0) u sterilnoj staklenoj epruveti. Gustina svake ćelijske suspenzija je podešena spektrofotometrom na 109 ćelija u 1 ml (500 μl u puferu suspendovanih bakterijskih ćelija prebačeno je transfer pipetom u plastičnu epruvetu sa zatvaračem na navoj zapremine 1.5 ml i centrifugirano 1 min. na 13000xg da bi se mogla izmeriti i podesiti gustina ćelijskog peleta). Zatim je ćelijski pelet resuspendovan vorteksiranjem i potom inkubiran 10 min. na 55°C u termomikseru vodenog kupatila. Nakon inkubacije, u ćelijsku suspenziju je dodato 25 μl proteinaze K (koncentracija radnog rastvora u sterilnoj dejonizovanoj vodi je bila 20mg/ml) i suspenzija je pažljivo promešana izvrtanjem epruvete 2-4 puta. U ćelijsku suspenziju su potom dodate jednake zapremine 1% agaroze (SeaKem zlatna agaroz, Biozym Diagnostics, Nemačka) i 1% natrijum dodecil sulfata u TE puferu (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) nakon čega je epruveta pažljivo promešana izvrtanjem 10-12 puta i sadržaj odmah sipan u bunarčice kalupa za PFGE (Bio-Rad Laboratories, Nemačka). Kalupi agaroze su ostavljeni na sobnoj temperaturi 5 min., a zatim u frižideru na 4°C još 5 min. da bi se formirao gel adekvatne konzistencije.

3.10.2. Liza ćelija u kalupu i ispiranje gelova

Agarozni kalupi su prebačeni u plastične epruvete sa zatvaračem na navoj zapremine 50 ml u koje je dodato 5 ml pufera za lizu ćelija (50 mM Tris, 50 mM EDTA [pH 8,0], 1% sarkozina) i 25 μ l proteinaze K (20 mg/ml radnog rastvora). Ćelije su lizirane tokom 2 sata u termomikseru (150-200 rpm) vodenog kupatila na 55°C. Nakon lize, pufer je uklonjen a agarozni kalupi su ispirani 5 puta (15 min. svaki ciklus ispiranja; 2 puta sa 10 ml sterilne dejonizovane vode i 3 puta sa 10 ml TE pufera) u termomikseru vodenog kupatila na 55°C. Pre svakog ciklusa ispiranja voda i TE pufer su zagrejani na 50-55°C. Nakon poslednjeg ispiranja u svaku epruvetu je dodato 10 ml svežeg TE pufera sa ambijentalne temperature. Ako agarozni kalupi nisu iskorišćeni istog dana ili dan kasnije stavljeni su u frižider na 4-8°C za korišćenje u narednih nekoliko nedelja.

3.10.3. Digestija restrikcionim enzimom i punjenje gela

Deo svakog agaroznog kalupa (4,0 x 5,5 mm) isečen je skalpelom i prebačen u plastičnu epruvetu sa zatvaračem na navoj u koju su dodati: restrikcioni pufer (200 μ l), ApaI restrikcioni enzim (Thermo Scientific, Litvanija) i 100 μ g/ml albumina porekla telećeg seruma. Navedena smeša je inkubirana 15 minuta na 25°C. Restrikcioni pufer je uklonjen i zamenjen svežim (200 μ l) sa 30 U ApaI. Smeša u epruvetama je pažljivo promešana i inkubirana 2 sata na 25°C. Pre izlivanja gela, restrikciona mešavina je uklonjena iz svake epruvete i zamenjena sa 200 μ l 0,5xTBE (10xTBE čini 0,89 M Tris, 0,89 M borne kiseline i 20 mM EDTA, pH 8,3). Ako isečci agaroznog kalupa nisu korišćeni istog dana ili sutradan čuvani su u frižideru na 4-8°C nekoliko dana. Isečeni delovi agaroznog kalupa stajali su na sobnoj temperaturi najviše 5 min., nakon čega su punjeni u bunarčiće (1,5mm) 1% agaroznog gela. U prvi bunarčić, odnosno polje broj jedan unet je isečak DNK standarda, za određivanje veličine DNK molekula, takozvani PFGE marker lambda fagne konkatemere (engl. *λ ladder*) (New England Biolabs, SAD) sastavljen od DNK fragmenata različite veličine. Testirani izolati, kao i referentni soj su punjeni u gel po unapred utvrđenom redosledu.

3.10.4. Gel-elektroforeza u pulsnom polju

Gel-elektroforeza je rađena u pulsirajućem, odnosno promenljivom električnom polju. Nekoliko parova suprotno pozicioniranih elektroda obezbedilo je izmene električnog polja. Gelovi su preliveni sa 2.000 ml 0,5xTBE. PFGE je odrađen u 2015 Pulsafor aparatu. Radna temperatura je podešena na 14°C, ukupno vreme trajanja analize na 19 sati, sa promenama u smeru električnog polja na 5-20 sekundi. Jačina struje je podešena na 6 V/cm ili 200 V. Gelovi su bojani 30 min. sa 300 ml 1 μ g/ml rastvora etidijum bromida i odbojavani destilovanom vodom tokom 45 min. uz lagano pomeranje. Vizualizacija je obavljena prosvetljavanjem gelova korišćenjem UV transiluminatora (Kodak Gel logic 200 imaging system, SAD). Sistem za fotodokumentaciju (Kodak, 1D 3.6, SAD) je korišćen za slikanje gelova i skladištenje dobijenih fotografija.

3.10.5. Analiza PFGE profila

Pomoću kompjuterskog softvera (BioNumerics softver, verzija 4.0, Applied Maths, Belgija) identifikovani su PFGE profili i izvršena je klaster analiza primenom metode grupisanja neponderisanih parova sa aritmetičkim prosekom (engl. *unweighted-pair group method using average linkages*, UPGMA). Sličnost PFGE profila je procenjena primenom Dice koeficijenta sličnosti sa tolerancijom od 1,5%. U istom aktu je konstruisan i dendrogram sličnosti. Klaster je definisan kao skup sojeva sa PFGE profilima čija je sličnost >80%, što ukazuje na visoku genetičku povezanost.

3.11. MLST

Selekcija sojeva koji će ući u MLST analizu napravljena je na sledeći način: analizirano je najmanje 50% CRAB izolata iz svakog PFGE klastera i bar jedan soj nosilac različitih *blaOXA* gena iz svake od pomenutih bolnica. Ukupno je tipizirano 37 izolata prema metodologiji Pasterove MLST šeme koja obuhvata amplifikaciju, prečišćavanje i sekvenciranje 7 "housekeeping" gena (*fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *cpn60*, *rpoB* i *rplB*) (Diancourt i sar., 2010).

3.11.1. Umnožavanje sedam visoko konzerviranih gena CRAB izolata metodom PCR

Prajmeri korišćeni u reakciji lančanog umnožavanja su prikazani u tabeli 19. PCR metodom je amplifikovano 7 visoko konzerviranih gena koji kodiraju: proteinski elongacioni faktor EF-G (*fusA*), citrat sintetazu (*gltA*), CTP sintetazu (*pyrG*), homologni rekombinantni faktor (*recA*), 60-KDa šaperonin (*cpn60*), subjedinicu B RNA polimeraze (*rpoB*) i 50S ribozomalni protein L2 (*rplB*) (tabela 18). PCR metoda je izvođena u sterilnim, plastičnim mikroepruvetama, zapremine 0,2ml (Eppendorf, Nemačka). Reakciona smeša zapremine 25μl, se sastojala od 12μl Taq PCR MasterMix (Qiagen, Nemačka), po 2μl 20μM rastvora Fw i Rev prajmera (Invitrogen, SAD), 4μl dejonizovane vode (Qiagen, Nemačka) i 5μl bakterijske DNK, pod uslovima opisanim u tabeli 20.

Tabela 19: Prajmeri koji su korišćeni za umnožavanje gena u MLST metodi

Prajmer	Sekvenca 5' → 3'	Produkt (bp)
<i>fusA</i> Fw	ATCGGTATTTCTGCKCACATYGAT	633
<i>fusA</i> Rev	CCAACATAACKYTGWACACCTTTGTT	
<i>gltA</i> Fw	AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC	483
<i>gltA</i> Rev	GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG	
<i>pyrG</i> Fw	GGTGTGTTTTCATCACTAGGWAAAGG	297
<i>pyrG</i> Rev	ATAAATGGTAAAGAYTCGATRTCACCMA	
<i>recA</i> Fw	CCTGAATCTTCYGGTAAAAC	372
<i>recA</i> Rev	GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC	
<i>cpn60</i> Fw	ACTGTACTIONGCTCAAGC	405
<i>cpn60</i> Rev	TTCAGCGATGATAAGAAGTGG	
<i>rpoB</i> Fw	GGCGAAATGGCDGARAACCAC	456
<i>rpoB</i> Rev	GARTCYTCGAAGTTGTAACC	
<i>rplB</i> Fw	GTAGAGCGTATTGAATACGATCCTAACC	330
<i>rplB</i> Rev	CACCACCACCRRTGYGGGTGATC	

(Diancourt i sar., 2010)

Tabela 20: Uslovi izvođenja PCR metoda za umnožavanje 7 „house-keeping“ gena

	T (°C)	Vreme
1. Inicijalna denaturacija	94	2 min.
2. Denaturacija	94	30 sek.
3. Vezivanje prajmera	50	30 sek.
4. Ekstenzija	72	30 sek.
5. Finalna ekstenzija	72	5 min.
Broj ciklusa (od 2-4)	35	

(<http://pubmlst.org/abaumannii/>)

3.11.2. Prečišćavanje PCR produkta

PCR produkti su prečišćeni komercijalnim setom za purifikaciju (QIAquick PCR purification kit, Qiagen, Nemačka), prema preporuci proizvođača, kako je opisano u poglavlju 3.9.1.

3.11.3. Reakcija cikličnog sekvenciranja

Reakcija cikličnog sekvenciranja (engl. *cycle sequencing*) je vršena prema prethodno objavljenom protokolu (<http://pubmlst.org/abaumannii/>), sa prajmerima koji su korišćeni i u PCR metodi.

3.11.4. Precipitacija i denaturacija produkta cikličnog sekvenciranja izopropanolom

U produkte cikličnog sekvenciranja je dodavano 80 μ l 75% izopropanola nakon čega su obavljane procedure opisane u poglavlju 3.9.3. i denaturacija po metodi opisanoj u poglavlju 3.9.4.

3.11.5. Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza je postupak u kome se prethodno pripremljeni produkti reakcije cikličnog sekvenciranja razvrstavaju prema veličini u kapilari automatizovanog sekvenatora i ekscitiraju laserskim snopom. Detalji postupka su opisani u poglavlju 3.9.5. Rezultat celog procesa predstavlja redosled nukleotida u umnoženoj sekvenci.

3.11.6. Određivanje tipa sekvence

Dobijene sekvence 7 „housekeeping“ gena *A. baumannii* su upoređivane sa referentnim sekvencama baze na internet sajtu <http://pubmlst.org/abaumannii/>, pri čemu je svaka od 7 sekvenci (*fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *cpn60*, *rpoB* i *rplB*) dobila svoj alelni broj. Dakle, svaki izolat je definisan kombinacijom 7 brojeva, koji određuju njegov alelni profil, odnosno ST. Izolati sa identičnim alelnim profilom pripadaju istom ST. Evolutivna srodnost sojeva je analizirana poređenjem alelnih profila.

3.12. Sekvenciranje celog genoma

Za izolaciju DNK za WGS korišćen je QIAampDNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka), a merenje prinosa je izvršeno na platformi DNK Qubit (Qubit 2.0 Fluorometer, ThermoFisher, Amerika), korišćenjem kita istog proizvođača Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (ThermoFisher, Amerika).

Sekvenciranje celog genoma urađeno je za 16 kliničkih izolata *A. baumannii*. Odrađena je tzv. *shotgun* tehnika sekvenciranja nove generacije, primenom Thermo Fisher Ion S5, prema uputstvu proizvođača.

Sirovi rezultati sekvenciranja su spojeni *de novo* primenom SPAdes Assembler algoritma (Bankevich i sar., 2012). Kvalitet dobijenih genoma procenjen je primenom Check-M programa (Parks i sar., 2015).

Anotacija genoma izvedena je korišćenjem NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/) i PATRIC baze podataka (<http://www.patricbrc.org>) (Wattam i sar., 2014).

Geni koji kodiraju rezistenciju na antibiotike su identifikovani primenom ResFinder v3.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) (Zankari i sar., 2012). Faktori virulencije detektovani su korišćenjem Virulence Factors Database, VFDB (Chen i sar., 2005).

Sličnost kodirajućih regiona 16 genoma analizirana je izračunavanjem tzv. *Average Nucleotide Identity* (ANI) za svaki par genoma koji je grafički prikazan.

Odrađena je komparativna analiza genoma 16 sojeva *A. baumannii* izolovanih u Srbiji i genoma *A. baumannii* dostupnih na Genbank *online* bazi NCBI (engl. *National Centre for Biotechnology Information*). Dendrogrami su konstruisani na osnovu filogenetske analize polimorfizama pojedinačnih nukleotida i odgovarajuće statističko-informatičke obrade, primenom Harvest i MUMer programa (Kurtz i sar., 2004; Treangen i sar., 2014).

3.13. Statistička obrada rezultata

U statističkoj obradi rezultata korišćene su metode deskriptivne statistike, pri čemu su izračunavane učestalosti fenotipova i genotipova. Za procenu značajnosti razlike korišćen je χ^2 test ili Fišerov test tačne verovatnoće. Za nivo značajnosti izabrana je vrednost od 5%, odnosno statistički značajnom razlikom je smatrana verovatnoća od $P < 0,05$. U statističkoj obradi rezultata korišćen je SPSS softver, verzija 13.0 (Čikago, SAD).

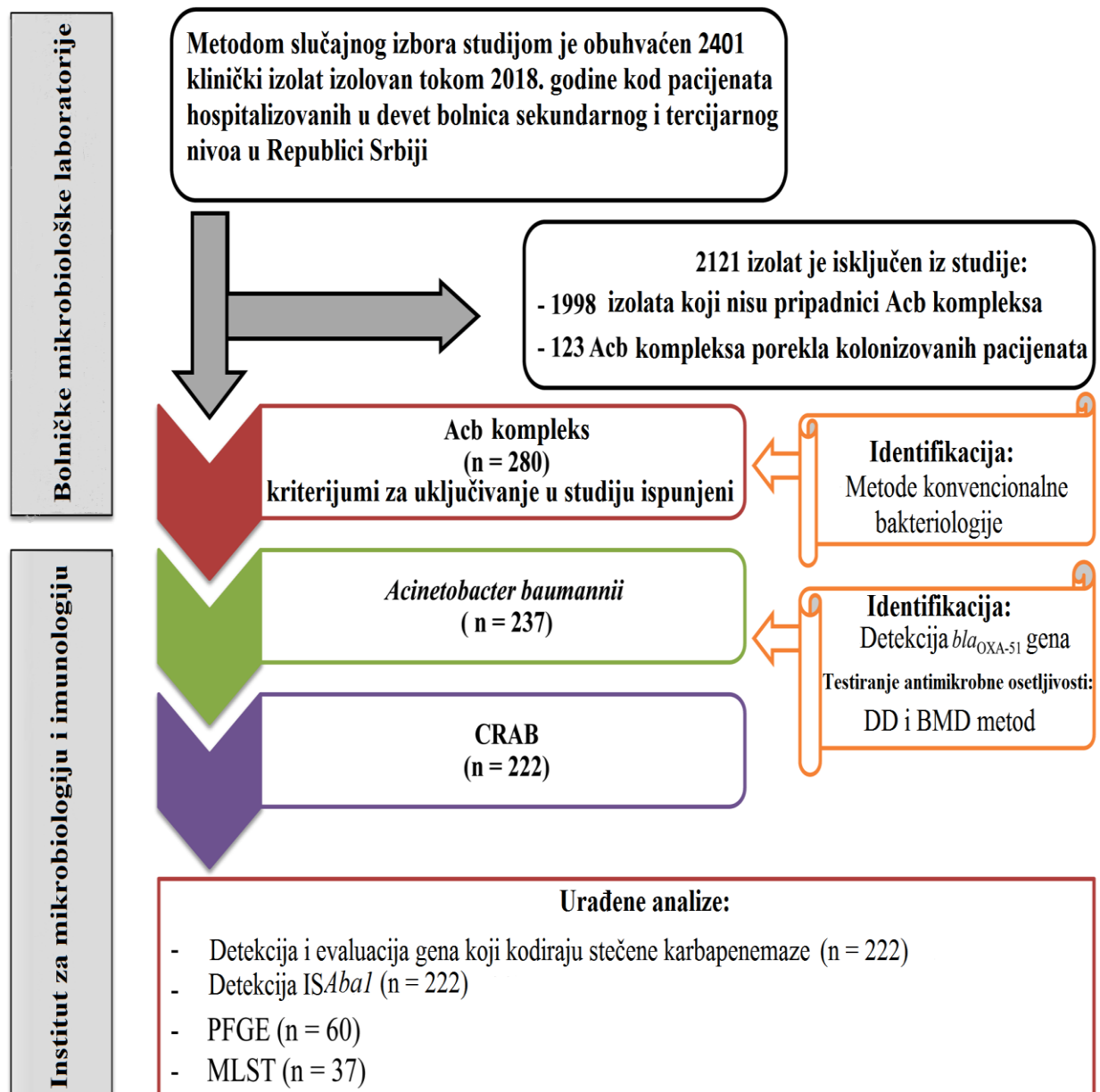
4. Rezultati

4.1. Učestalost izolacije *A. baumannii* u bolnicama u Republici Srbiji

U periodu obuhvaćenom studijom 2401 klinički izolat je prošao proceduru odabira za uključenje u studiju (Slika 6). Ukupno 280 (11,6%) bakterija Acb kompleksa izolovanih iz kliničkih uzoraka ispunilo je kriterijume za uključenje u studiju, od čega je njih 237 (84,6%) identifikovano kao *A. baumannii*.

U posmatranom periodu prevalencija infekcija izazvanih *A. baumannii* bila je sledeća: sepsa (n = 28/351; 7,9%), infekcije donjih partija respiratornog sistema (n = 89/319; 27,9%), infekcije kože i mekih tkiva (n = 87/511; 17%), meningitis (n = 1/34; 2,9%), infekcije povezane sa aplikacijom centralnog venskog katetera (n = 14/94; 14,9%) i infekcije urinarnog sistema (n = 18/1092; 1,6%).

A. baumannii je najčešće izolovan kod pacijenata hospitalizovanih u jedinicama intenzivne nege (39,6%). Što se vrste kliničkog materijala tiče, najčešće je izolovan iz uzoraka donjih partija respiratornog sistema (37,6%), sadržaja rana (36,7%) i uzoraka krvi (11,8%). Većinu inficiranih pacijenata činili su stariji muškarci (medijana godišta 66; u rangu od 14–87 godina). Najčešći faktori rizika za razvoj infekcije bili su diabetes melitus (23,2%) i hirurške procedure (46,8%). Detaljne informacije o vrsti uzoraka, odeljenjima na kojima su pacijenti hospitalizovani, demografskim karakteristikama pacijenata i faktorima rizika navedene su u tabeli 21.



Slika 6: Dijagram procesa uključivanja izolata Acb kompleksa u studiju i selekcije sojeva za dalju molekularnu analizu. Kriterijum za uključivanje sojeva u studiju je bio sledeći: izolacija nerepetitivnih (jedan po hospitalizovanom pacijentu) Acb kompleksa porekla inficiranih pacijenata tokom rutinskog rada kliničke mikrobiološke laboratorije. [Acb kompleks - *Acinetobacter calcoaceticus–baumannii* complex; *A. baumannii* - *Acinetobacter baumannii*; BMD - Bujon mikrodilucioni metod antibiograma; CRAB - Karbapenem-rezistentan *A. baumannii*; DD - Disk difuzioni metod antibiograma; MLST - Tipizacija na osnovu sekvenci visoko konzerviranih genskih lokusa; PFGE - Elektroforeza u pulsirajućem električnom polju]

Tabela 21. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata inficiranih bakterijom *Acinetobacter baumannii*

Karakteristika	Pacijenti Br. (%)
Pol	
Muški	148 (62,5)
Ženski	89 (37,5)
Odeljenje hospitalizacije	
Jedinica intenzivne nege	94 (39,6)
Grudna hirurgija	10 (4,3)
Ortopedska hirurgija	14 (5,9)
Plastična hirurgija	16 (6,7)
Vaskularna hirurgija	15 (6,4)
Neurohirurgija	9 (3,8)
Opšta hirurgija	12 (5,1)
Urološka hirurgija	7 (2,9)
Interno odeljenje	60 (25,3)
Vrsta uzorka	
Trahealni aspirat	61 (25,7)
Bronhijalni aspirat	19 (8,1)
Sputum	9 (3,8)
Sadržaj rane	87 (36,7)
Krv	28 (11,8)
Vrh centralnog venskog katetera	14 (5,9)
Urin	18 (7,6)
Likvor	1 (0,4)
Komorbidity	
Diabetes melitus	55 (23,2)
Hipertenzija	53 (22,4)
Srčana insuficijencija	46 (19,4)
Cerebrovaskularna bolest	42 (17,7)
Hronična venska insuficijencija	35 (14,7)
Hronična opstruktivna bolest pluća	25 (10,5)
Bubrežna insuficijencija	21 (8,9)
Hronična bolest jetre	1 (0,4)
Neuromuskularni poremećaji	0
Psihijatrijske bolesti	0
Maligniteti	19 (8,0)
Imunološki poremećaji	1 (0,4)
Hematološka oboljenja	0
Politrauma	13 (5,5)
Ozbiljne opekotine	9 (3,8)
Invazivne procedure	
Bilo koja hirurška intervencija	111 (46,8)
Asistirana ventilacija	68 (28,7)
Traheotomija	11 (4,6)
Centralni venski kateter	46 (19,4)
Urinarni kateter	68 (28,7)

4.2. Učestalost rezistencije bolničkih izolata *A. baumannii* na antibiotike

Rezistencija svih 237 *A. baumannii* izolata na testirane antibiotike prikazana je u tabeli 22. Prevalencija CRAB izolata iznosila je 93,7%. Od ukupnog broja CRAB izolata 219 (92,4%) je bilo rezistentno na IMP i MER, dok su preostala tri razvila rezistenciju samo na MER, a zadržala osetljivost prema IMP. Petnaest izolata (6,3%) bilo je osetljivo na oba testirana karbapenema. MIK testiranih karbapenema kretala se u intervalu od 2–256 µg/mL. Vrednosti MIK50/MIK90 za IMP i MER bile su 8/> 32 µg/mL i 16/> 32 µg/mL. Iako je rezistencija na karbapeneme u većem procentu detektovana kod neinvazivnih (94,9%) u odnosu na invazivne (92,1%) *A. baumannii* izolate, statistički značajne razlike nije bilo ($P > 0.05$).

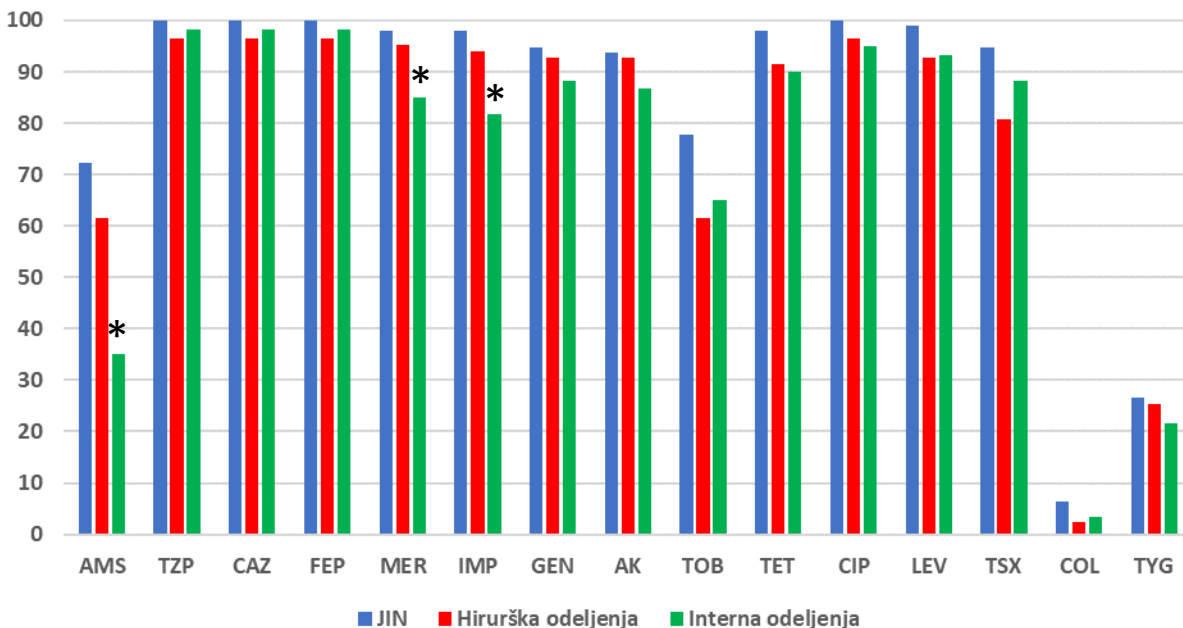
Klinički izolati *A. baumannii* ispoljili su umerene nivoe rezistencije na AMS (59,1%) i TOB (68,8%). Najviša osetljivost detektovana je za lekove poslednje linije, COL (95,7%) i TYG (75,1%). Vrednosti MIK za COL kretale su se od < 0,25 do 4 µg/mL sa MIC50/ MIC90 vrednostima < 0,25/1 µg/mL, a za TYG u rasponu od 0,125–16 µg/mL sa MIC50/MIC90 vrednostima 2/8 µg/mL.

Učestalost rezistencije *A. baumannii* na sve testirane antibiotike bila je veća za sojeve izolovane kod pacijenata hospitalizovanih u jedinicama intenzivne nege u odnosu na ostala odeljenja (Grafik 1), sa statističkom značajnošću za AMS, IMP i MER ($P < 0,05$). Iako je zabeležena geografska/regionalna razlika u rezistenciji *A. baumannii* izolata na karbapeneme (Vojvodina - 91,5%; Beograd - 87,5%; Južna Srbija - 96,3%), ona nije bila statistički značajna ($P > 0,05$). Sveukupno, CRAB izolati ispoljili su veće stope rezistencije na sve testirane antimikrobne agense, poređeno sa karbapenom osetljivim sojevima *A. baumannii* (Tabela 22), sa izuzetkom TYG i COL.

Od ukupno testiranih 222 CRAB sojeva, produkcija MBL je fenotipskim testom detektovana samo kod pet (2,23%) izolata.

Tabela 22. Rezistencija karbapenem-osetljivih i karbapenem-rezistentnih *A. baumannii* izolata na antibiotike

Antibakterijski agens	Ukupna rezistencija (n = 237) Br. (%)	Karbapenem-rezistentan <i>A. baumannii</i> (n = 222) Br. (%)	Karbapenem-osetljiv <i>A. baumannii</i> (n = 15) Br. (%)	P vrednost
Ampicilin-sulbaktam	140 (59,1%)	136 (61,3)	4 (26,7)	P =0,008
Piperacilin-tazobaktam	233 (98,3%)	222 (100)	11 (73,3)	P <0,001
Ceftazidim	233 (98,3%)	222 (100)	11 (73,3)	P <0,001
Cefepim	233 (98,3%)	222 (100)	11 (73,3)	P <0,001
Imipenem	219 (92,4%)	219 (98,6)	0 (0)	P <0,001
Meropenem	222 (93,7%)	222 (100)	0 (0)	P <0,001
Amikacin	217 (91,6%)	209 (94,1)	8 (53,3)	P <0,001
Gentamicin	220 (92,8%)	210 (94,6)	10 (66,7)	P <0,001
Tobramicin	163 (68,8%)	159 (71,6)	4 (26,7)	P =0,000
Ciprofloksacin	231 (97,5%)	221 (99,5)	10 (66,7)	P <0,001
Levofloksacin	226 (95,4%)	217 (97,7)	9 (60)	P <0,001
Trimetoprim-sulfametoksazol	209 (88,2%)	202 (91)	7 (47)	P <0,001
Tetraciklin	222 (93,7%)	214 (96,4)	8 (53,3)	P <0,001
Tigeciklin	59 (24,9%)	58 (26,1)	1 (6,7)	P =0,092
Kolistin	10 (4,3%)	10 (4,5)	0 (0)	P =0,401

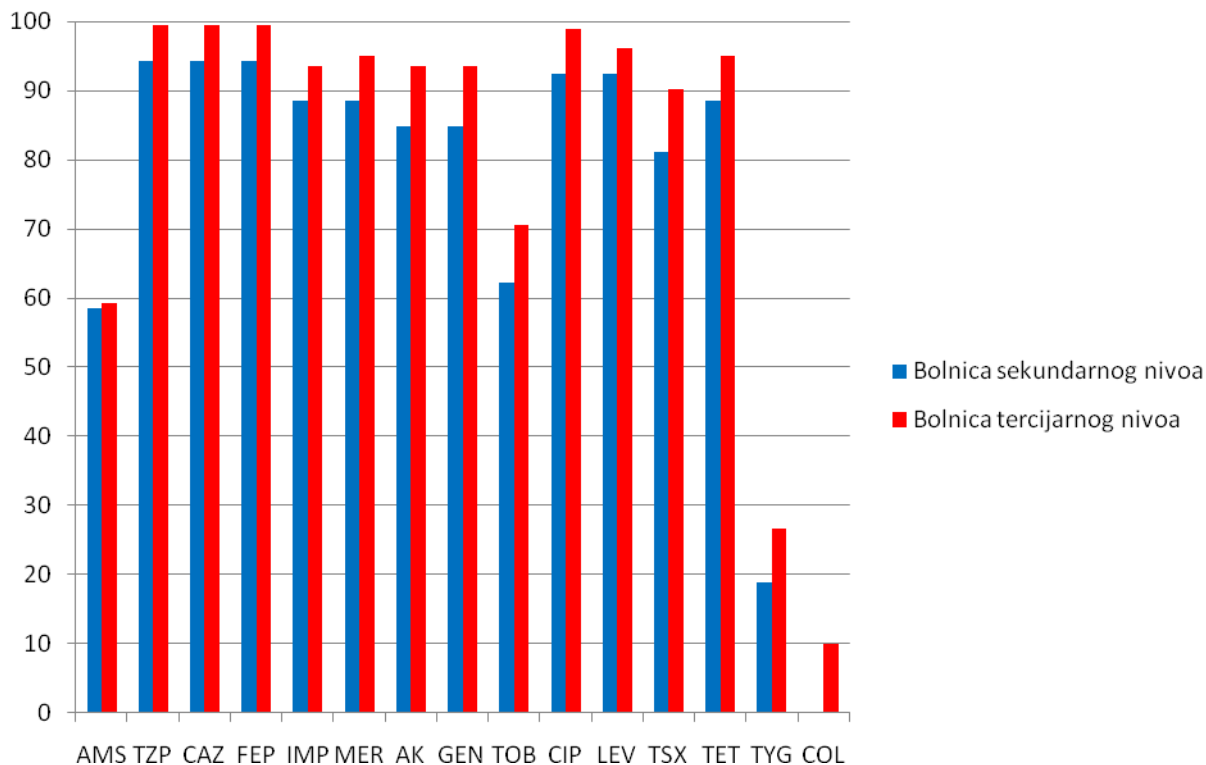


Grafik 1: Učestalost rezistencije sojeva *A. baumannii* izolovanih sa različitim kliničkih odeljenja na antibiotike. AMS - ampicilin-sulbaktam; TZP - piperacilin-tazobaktam; CAZ - ceftazidim; FEP - cefepim; MER - meropenem; IMP - imipenem; GEN - gentamicin; AK - amikacin; TOB - tobramicin; TET - tetraciklin; CIP - ciprofloksacin; LEV - levofloksacin; TSX - trimetoprim-sulfametoksazol; COL - kolistin; TYG - tigeciklin; JIN – jedinice intenzivne nege; * $P < 0,05$

4.3. Prevalencija multirezistentnih, ekstenzivno rezistentnih i panrezistentnih izolata *A. baumannii* u bolnicama sekundarnog i tercijarnog nivoa u Republici Srbiji

MDR fenotip detektovan je kod 203 (85,6%) *A. baumannii* izolata, XDR kod 95 (40%), dok je deset izolata (4,3%) klasifikovano kao PDR. MDR, XDR i PDR sojevi su češće izolovani kod pacijenata hospitalizovanih u jedinicama intenzivne nege, u odnosu na ostala odeljenja. MDR i XDR izolati su izolovani i u bolnicama sekundarnog i tercijarnog nivoa, dok su PDR *A. baumannii* sojevi izolovani samo u bolnicama tercijarnog nivoa. Ni za jedan od pomenutih fenotipova rezistencije statistički značajne razlike nije bilo ($P > 0,05$).

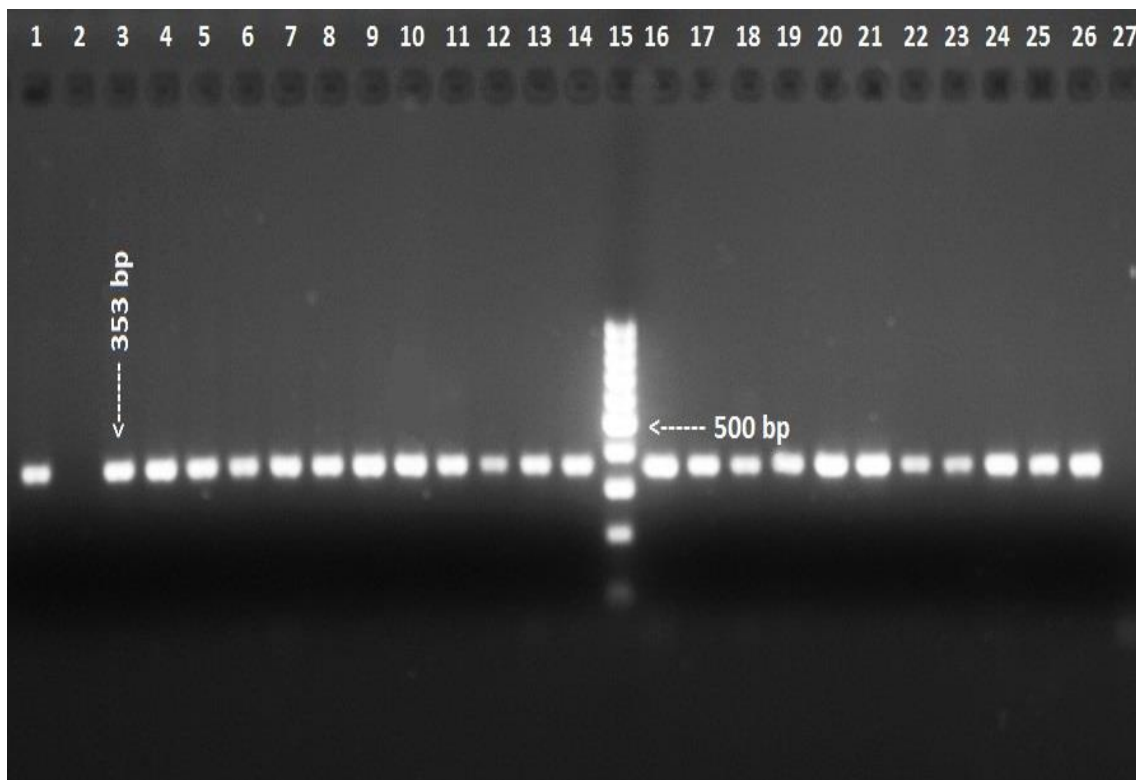
A. baumannii sojevi izolovani kod pacijenata hospitalizovanih u bolnicama tercijarnog nivoa ispoljili su veću učestalost rezistencije na sve testirane antibiotike u odnosu na *A. baumannii* izolate iz bolnica sekundarnog nivoa (Grafik 2). Ipak, statistički značajne razlike nije bilo ni za jedan testirani antibiotik ($P > 0,05$).



Grafik 2: Učestalost rezistencije sojeva *A. baumannii* izolovanih u bolnicama sekundarnog i tercijarnog nivoa na antibiotike. AMS - ampicilin-sulbaktam; TZP - piperacilin-tazobaktam; CAZ - ceftazidim; FEP - cefepim; MER - meropenem; IMP - imipenem; GEN - gentamicin; AK - amikacin; TOB - tobramicin; TET - tetraciklin; CIP - ciprofloksacin; LEV - levofloksacin; TSX - trimetoprim-sulfametoksazol; COL - kolistin; TYG - tigeciklin.

4.4. Detekcija gena koji kodiraju β -laktamaze klase A, B i D i njihova distribucija u bolnicama u Republici Srbiji

Kod svih 237 *A. baumannii* izolata detektovan je *bla*OXA-51 gen koji kodira urođeno prisutnu, odnosno intrinzičnu OXA-51 karbapenemazu (Slika 7).



Slika 7: Elektroforetski gel; PCR metoda detekcije gena koji kodira OXA-51 karbapenemazu

Traka 1 - pozitivna kontrola za *bla*OXA-51 gen (353 bp)

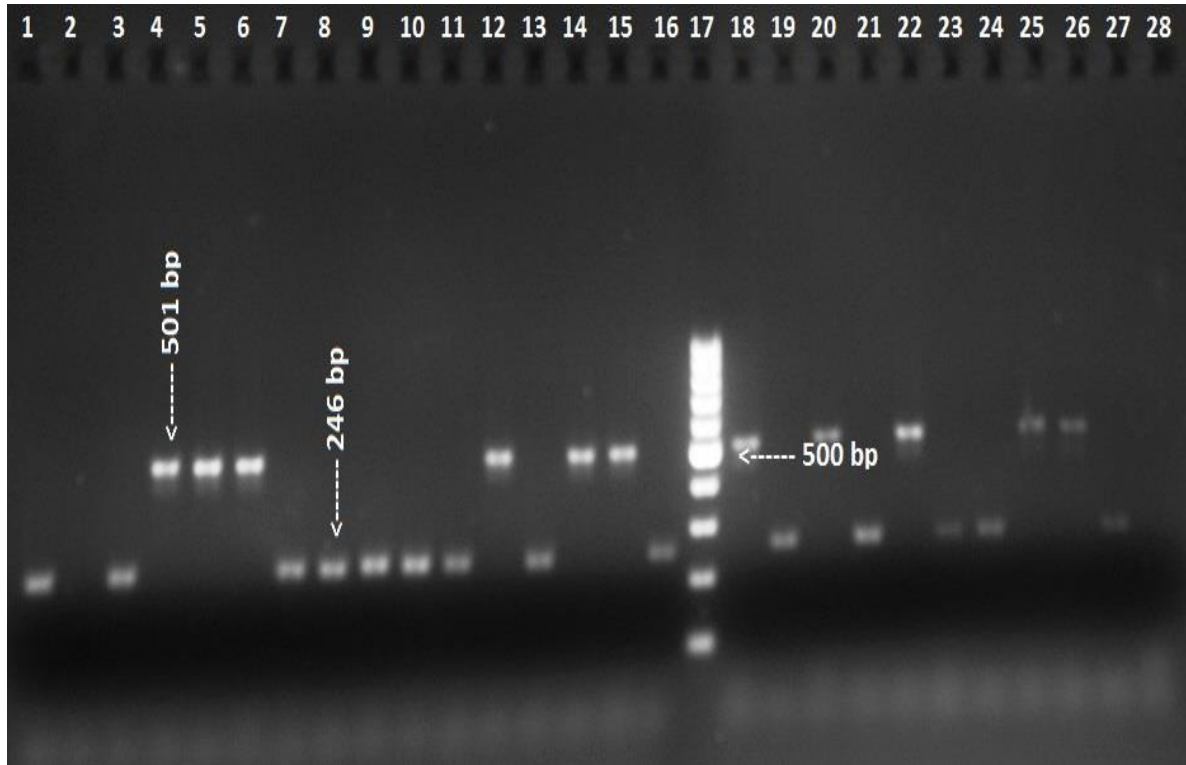
Traka 2 - negativna kontrola

Trake 3-14 i 16-26 - pozitivni uzorci za *bla*OXA-51 gen

Traka 15 - DNK standard (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas)

Traka 27 - negativan uzorak za *bla*OXA-51 gen

Od ukupno testiranih 222 CRAB sojeva, kod 98 izolata (44,2%) detektovan je *bla*OXA-24, a kod 76 izolata (34,5%) *bla*OXA-23 gen (Slika 8). Kod dva CRAB izolata detektovana su istovremeno oba gena koja kodiraju stečene oksacilinaze, *bla*OXA-23 i *bla*OXA-24. U testiranoj populaciji sojeva nisu detektovani *bla*OXA-58 i *bla*OXA-143 geni.



Slika 8: Elektroforetski gel; Multiplex PCR metoda detekcije gena koji kodiraju OXA-23 i OXA-24 karbapenemazu

Traka 1 - pozitivna kontrola za *bla*OXA-24 gen (246 bp)

Traka 2 - negativna kontrola

Traka 4 - pozitivna kontrola za *bla*OXA-23 gen (501 bp)

Trake 3, 7-11, 13, 16, 19, 21, 23, 24, 27 - pozitivni uzorci za *bla*OXA-24 gen

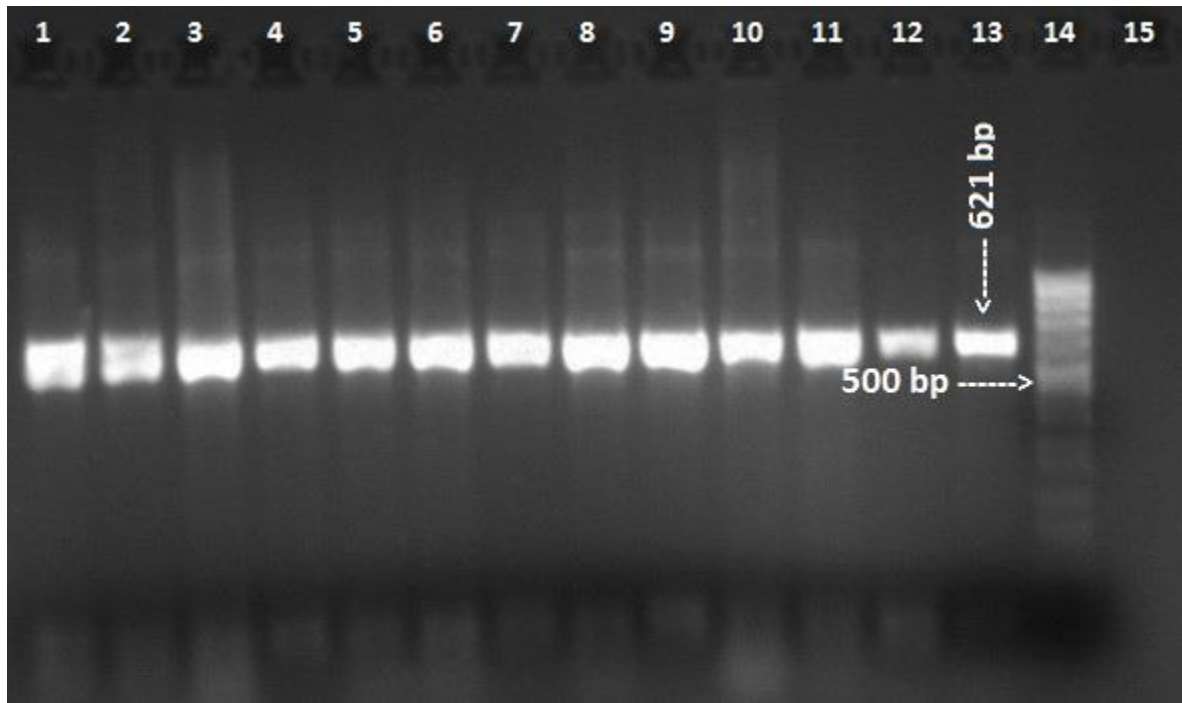
Trake 5, 6, 12, 14, 15, 18, 20, 22, 25, 26 - pozitivni uzorci za *bla*OXA-23 gen

Traka 17- DNK standard (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas)

Traka 28 - negativan uzorak

Jedini gen koji kodira MBL detektovan u ovoj studiji bio je *bla*NDM gen, koji je detektovan kod sedam CRAB izolata (Slika 9). Takođe, svi *bla*NDM pozitivni CRAB izolati bili su u isto vreme i nosioci *bla*OXA-24 gena. Ni kod jednog CRAB izolata nisu otkriveni *bla*IMP, *bla*VIM, *bla*GIM, *bla*SPM i *bla*SIM geni.

Geni koji kodiraju ESBL nisu detektovani među CRAB izolatima u ovoj studiji.



Slika 9: Elektroforetski gel; Multiplex PCR metoda detekcije gena koji kodira NDM metalo β -laktamazu

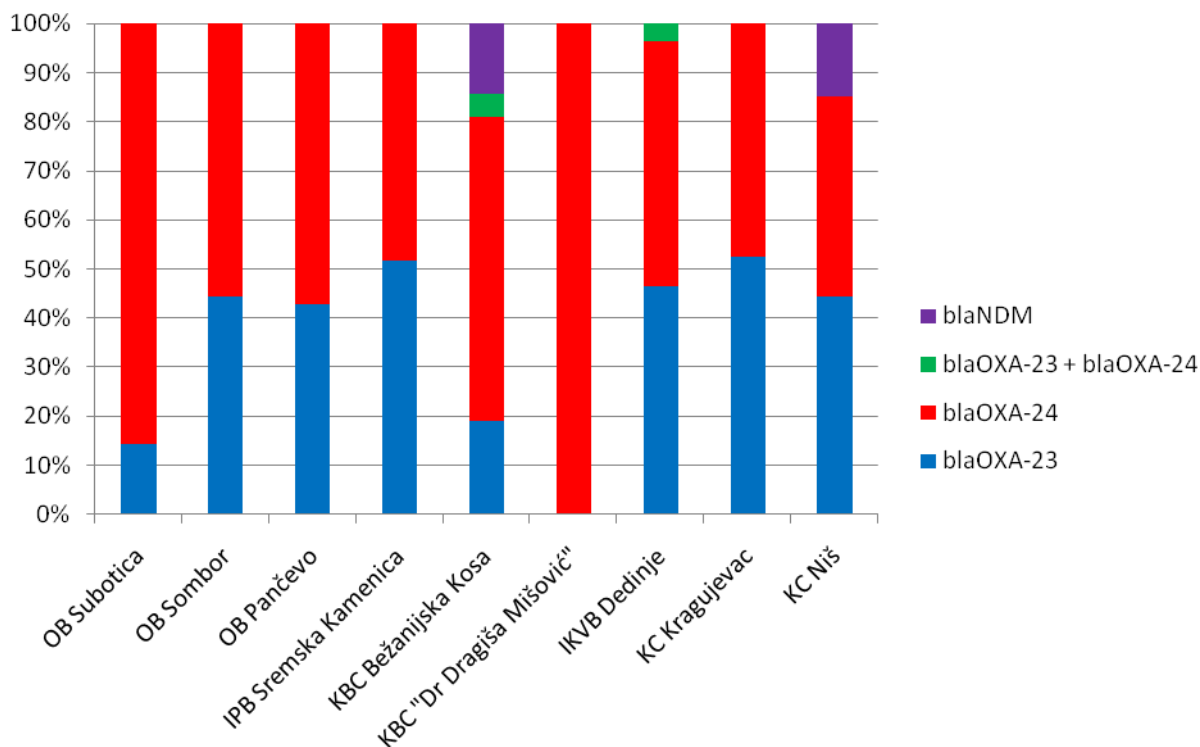
Trake 1-12 - pozitivni uzorci za gen koji kodira NDM metalo β -laktamazu

Traka 13 - pozitivna kontrola za gen koji kodira NDM metalo β -laktamazu (621bp)

Traka 14 - DNK standard (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas)

Traka 15 - negativna kontrola

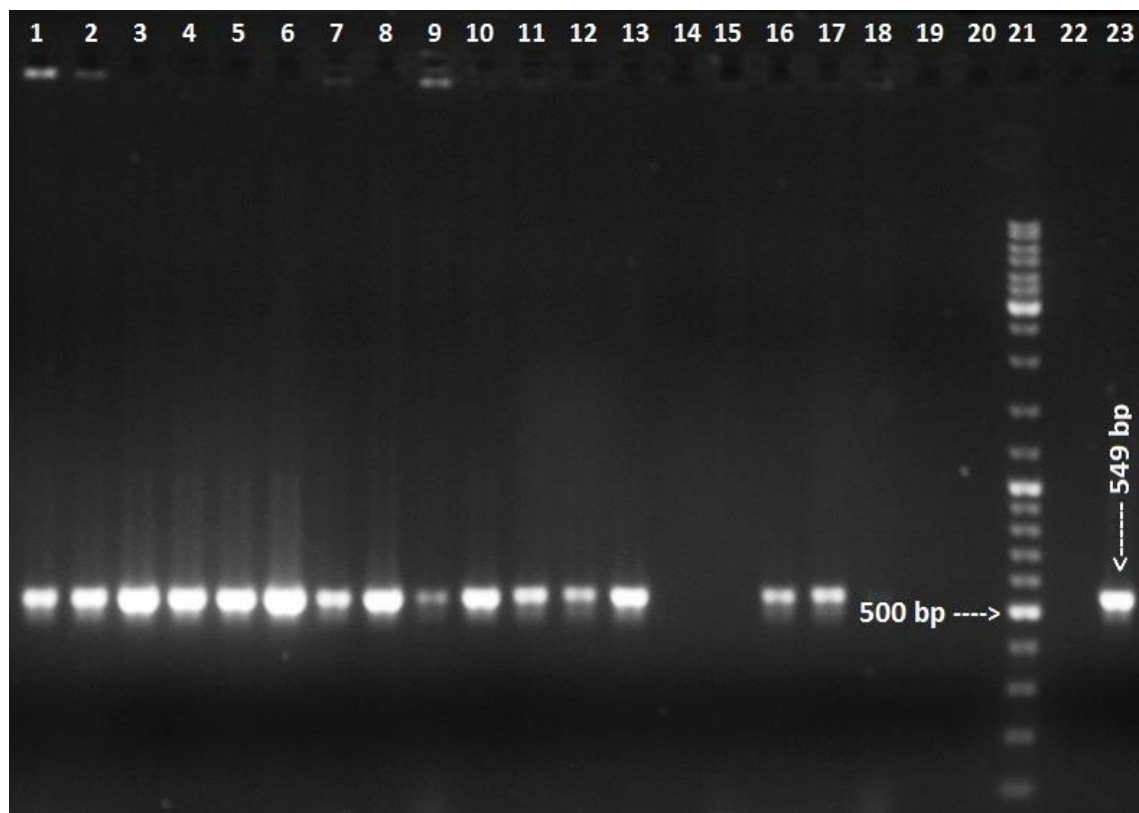
Razlika među regionima obuhvaćenim studijom u proporciji CRAB bolničkih izolata nosilaca različitih *blaOXA* gena bila je statistički značajna ($P < 0,05$) samo za region Beograda [Vojvodina: *blaOXA*-24 (44,3%) i *blaOXA*-23 (30,7%); Beograd: *blaOXA*-24 (47,5%) i *blaOXA*-23 (27,8%); Južna Srbija: *blaOXA*-24 (37,5%) i *blaOXA*-23 (41,2%)]. Zanimljivo je međutim da su *blaNDM* pozitivni izolati detektovani u bolnicama tercijarnog nivoa u samo dva grada, Beogradu i Nišu. Distribucija *blaOXA* i *blaNDM* gena po bolnicama prikazana je na grafiku 3.



Grafik 3: Distribucija *blaOXA* i *blaNDM* gena po bolnicama u Republici Srbiji. Opšta bolnica (OB) Subotica, OB Sombor, OB Pančevo, Institut za plućne bolesti (IPB) u Sremskoj Kamenici, Kliničko bolnički centar (KBC) Bežanijska Kosa, KBC "Dr Dragiša Mišović", Institut za kardiovaskularne bolesti (IKVB) Dedinje, Klinički centar (KC) Kragujevac, KC Niš

4.5. Detekcija genske sekvence *ISAbal*

Genska sekvenca *ISAbal* detektovana je kod 161 (71,8%) CRAB izolata (Slika 10). Istovremeno prisustvo *ISAbal* i gena za urođene i stečene oksacilinaze detektovano je u sledećim varijantama: *ISAbal/blaOXA-51* (16,5%), *ISAbal/blaOXA-24* (28,1%), *ISAbal/blaOXA-23* (26,7%) i *ISAbal/blaOXA-23/blaOXA-24* (0,5%) kod testiranih CRAB izolata.



Slika 10: Elektroforetski gel; PCR metoda za detekciju *ISAbal*

Traka 23 - pozitivna kontrola za genetičku determinantu *ISAbal* (549 bp)

Traka 22 - negativna kontrola

Trake 1-13 i 16, 17 - pozitivni uzorci za *ISAbal*

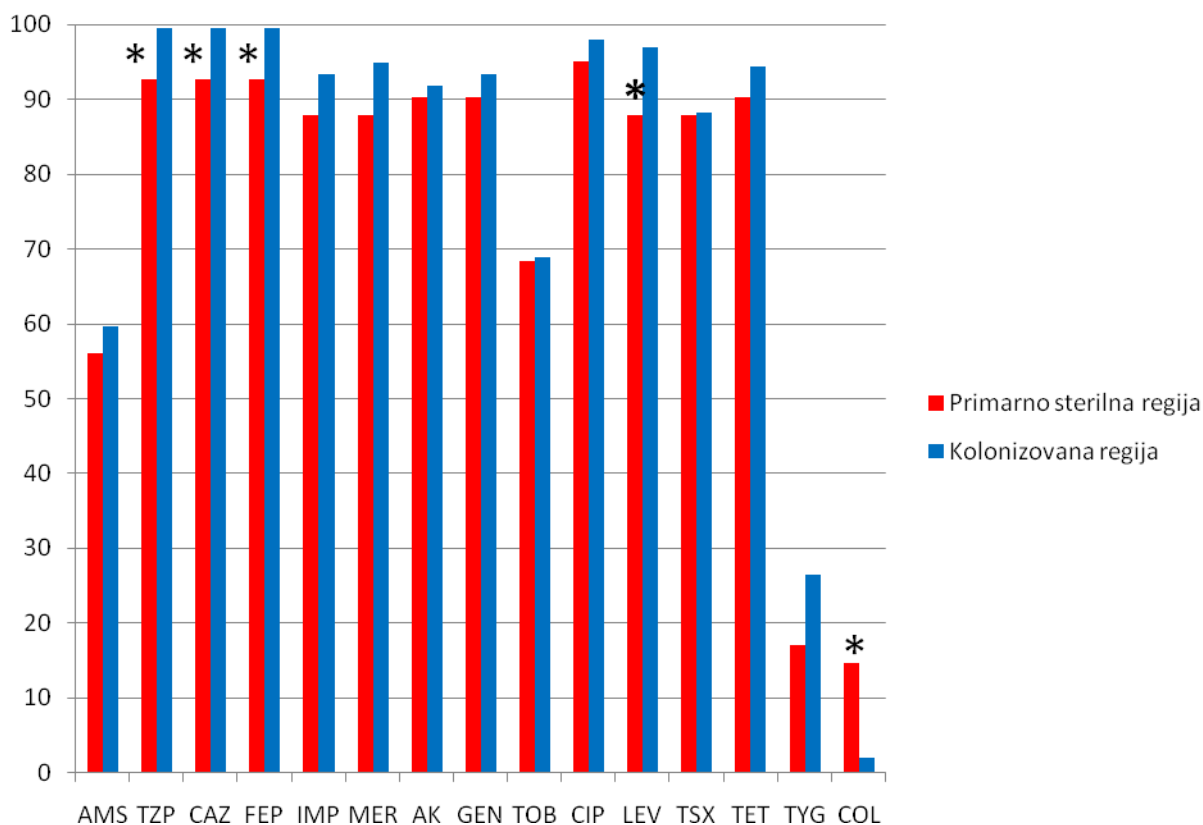
Traka 21 - DNK standard (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas)

Traka 18-20 - negativni uzorci

4.6. Fenotipske i genotipske karakteristike sojeva *A. baumannii* izolovanih iz primarno sterilnih i kolonizovanih regija

Rezistencija *A. baumannii* izolata iz primarno sterilnih i kolonizovanih regija na antibiotike prikazana je na grafiku 4. Iako su sojevi iz kolonizovanih regija pokazali veću učestalost rezistencije na sve testirane antibiotike, statistički značajna razlika ($P < 0,05$) nađena je samo za TZP, CAZ, FEP, LEV i COL.

Kod *A. baumannii* izolata iz primarno sterilnih regija detektovani su: *blaOXA-23* (21,9%) i *blaOXA-24* (43,9%). U sojevima iz kolonizovanih regija pored *blaOXA-23* (36,7%) i *blaOXA-24* (40,8%) detektovan je i *blaNDM* gen (3,6%).



Grafik 4: Učestalost rezistencije sojeva *A. baumannii* izolovanih iz primarno sterilnih i kolonizovanih regija na antibiotike. AMS - ampicilin-sulbaktam; TZP - piperacilin-tazobaktam; CAZ - ceftazidim; FEP - cefepim; MER - meropenem; IMP - imipenem; GEN - gentamicin; AK - amikacin; TOB - tobramicin; TET - tetraciklin; CIP - ciprofloksacin; LEV - levofloksacin; TSX - trimetoprim-sulfametoksazol; COL - kolistin; TYG - tigeciklin; * $P < 0,05$

4.7. Molekularna tipizacija CRAB izolata

Rezultati PFGE i MLST analiza testiranih CRAB izolata, uz informaciju o regionalnoj distribuciji bolnica kao i sadržaju gena koji kodiraju urođenu i stečene karbapenemaze sumirani su na slici 11.

4.7.1. PFGE analiza

Klonalna povezanost 60 CRAB izolata porekla svih devet bolnica obuhvaćenih studijom inicijalno je ispitana PFGE analizom. Sličnost PFGE profila testiranih CRAB izolata kretala se u intervalu od 70 do 99%. Konačno, PFGE analizom otkriveno je šest različitih klastera (A-F), a tri izolata nisu svrstana ni u jedan klaster (Slika 11). Tri najveća klastera B, C i D sa po pet (8,3%), 33 (55%) i 12 (20%) sojeva, u svom sastavu imala su CRAB izolate iz Vojvodine, Beograda i Južne Srbije. Kod pripadnika klastera B i C detektovane su obe stečene oksacilinaze, OXA-24 i OXA-23. Izolati iz preostala četiri klastera [klaster A (n = 3; 5%), klaster D (n = 12; 20%), klaster E (n = 2; 3,3%) i klaster F (n = 2; 3,3%)] su po genskom sastavu bili homogeniji, noseći samo *blaOXA-24* gen.

4.7.2. MLST analiza

Na osnovu različitih PFGE profila, odnosno pripadnosti različitim klasterima, sadržaja *blaOXA* gena i regionalne pripadnosti svake od bolnica, 37 CRAB izolata je obuhvaćeno MLST analizom (Slika 11).

MLST metodom genotipizacije svi testirani CRAB izolati svrstani su u tri ST: ST2 (n = 13), ST492 (n = 14) i ST636 (n = 10) (Tabela 23). Pripadnici ST2 i ST492 (varijanta ST2 - razlika u jednom genskom lokusu) bili su članovi ICII. Pripadnici ST 636 (varijanta ST2 - razlika u tri genska lokusa) nisu svrstani ni u jedan postojeći IC.

CRAB izolati nosioci *blaOXA-23* gena su svi svrstani u ST2, dok je *blaOXA-24* pozitivnih sojeva bilo u ST492 i ST636, a *blaNDM-1* pozitivnih u ST2 i ST492.

Sva tri ST su ravnomerno raspoređena po bolnicama i regionima (Vojvodina, Beograd i Južna Srbija).

Tabela 23. Alelni profili i tipovi sekvence sojeva *A. baumannii* koji su analizirani MLST metodom

Broj izolata	<i>cpn60</i>	<i>fusA</i>	<i>gltG</i>	<i>pyrG</i>	<i>recA</i>	<i>rplB</i>	<i>rpoB</i>	ST
13	2	2	2	2	2	2	2	ST2
14	2	3	2	2	2	2	2	ST492
10	2	1	2	2	2	1	1	ST636

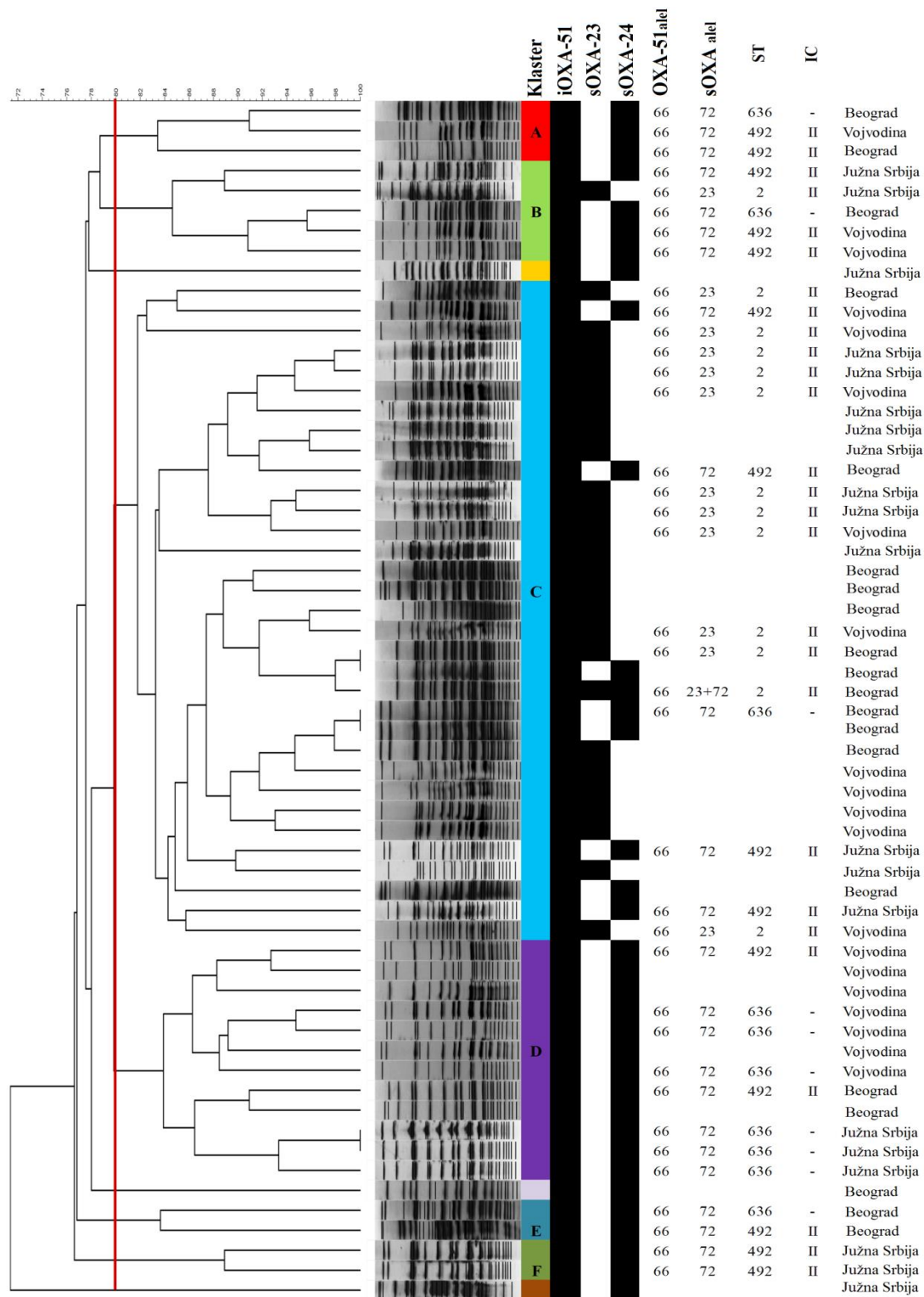
4.7.3. Sekvenciranje *blaOXA* i *MBL* gena

CRAB izolatima obuhvaćenim MLST analizom, odrađeno je i sekvenciranje *blaOXA* gena koji kodiraju urođenu i stečene oksacilinaze.

Sekvenciranjem *blaOXA-51* gena kod svih testiranih izolata je otkrivena *blaOXA-66* varijanta ili alel. Takođe je kod svih testiranih izolata sekvenciranjem *blaOXA-24* gena nađena *blaOXA-72* varijanta, a kod *blaOXA-23* pozitivnih sojeva *blaOXA-23* varijanta (Slika 11).

Sekvenciranjem svih sedam *blaNDM* gena detektovanih u ovoj studiji otkrivena je *blaNDM-1* varijanta.

Poštujući klonalnu distribuciju CRAB izolata, zaključak je da su cirkulišući klonovi u bolnicama sekundarnog i tercijarnog nivoa u Republici Srbiji sledeći: *blaOXA-66/blaOXA-23/ST2* (32,4%), *blaOXA-66/blaOXA-23/blaOXA-72/ST2* (2,7%), *blaOXA-66/blaOXA-72/ST492* (37,8%) i *blaOXA-66/blaOXA-72/ST636* (27,1%).

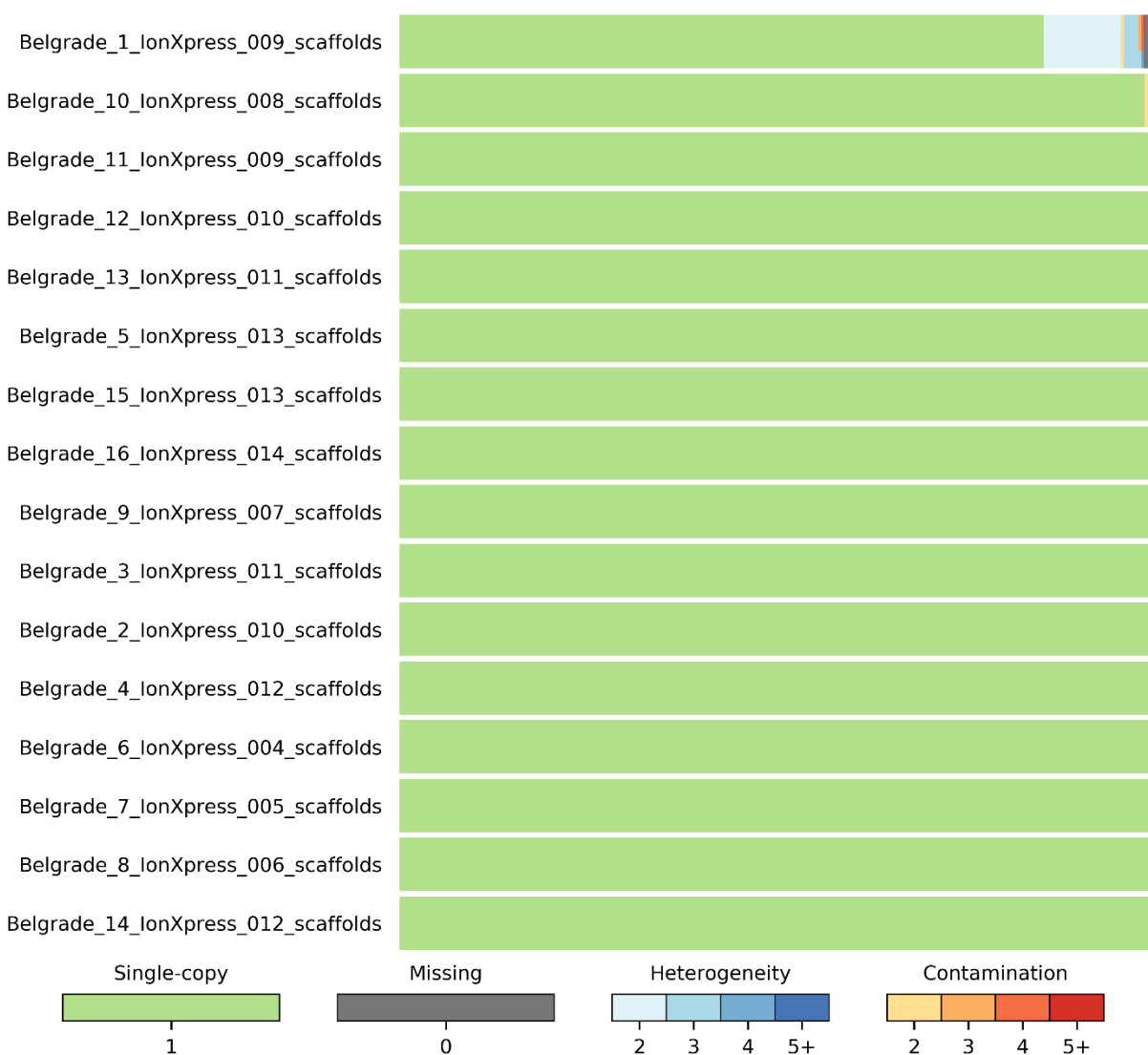


Slika 11: Dendrogram PFGE profila CRAB sojeva izolovanih kod hospitalizovanih pacijenata u devet bolnica u Republici Srbiji. Klasteri (A-F); intrinzična oksacilinaza (iOXA); stečena oksacilinaza (sOXA); tip sekvence (ST) i pripadajući internacionalni klon (IC); regionalna distribucija bolnica (Vojvodina, Beograd, Južna Srbija).

4.8. Sekvenciranje celog genoma

4.8.1. Karakteriste sekvenciranih genoma

Da bi smo stekli uvid u genomske karakteristike *A. baumannii*, 16 izolata je podvrgnuto sekvenciranju celog genoma. Karakteristike sekvenciranih genoma su prikazane na slici 12 i u tabeli 24.



Slika 12: Karakteristike 16 sekvenciranih genoma *A. baumannii* koji su analizirani WGS metodom

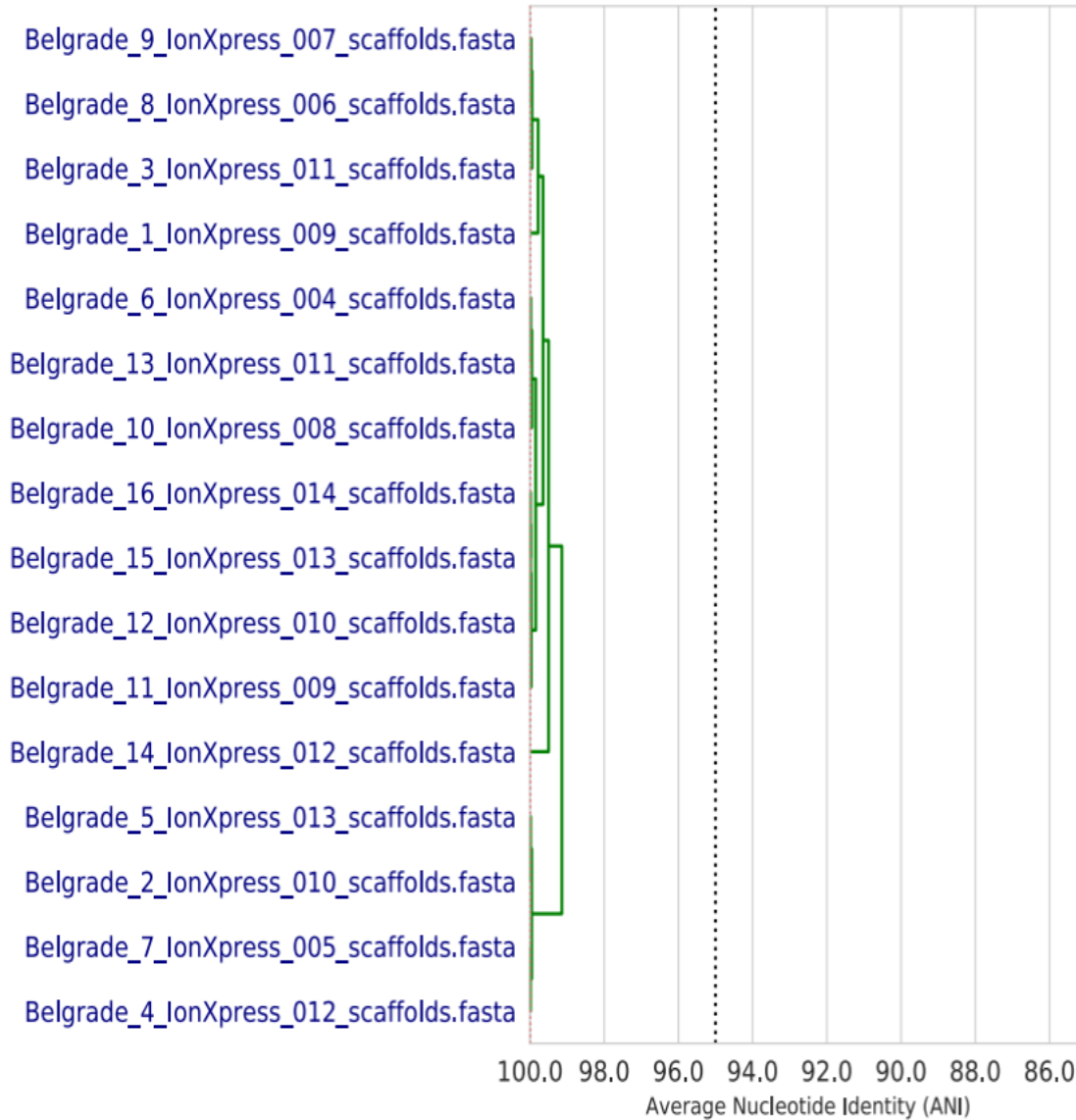
Tabela 24. Dužine genoma 16 sojeva *A. baumannii* koji su analizirani WGS metodom

<i>A. baumannii</i> izolat	Dužina genoma (bp)
Belgrade_1_IonXpress_009_scaffolds.fasta	4703584
Belgrade_2_IonXpress_010_scaffolds.fasta	3984112
Belgrade_3_IonXpress_011_scaffolds.fasta	4034965
Belgrade_4_IonXpress_012_scaffolds.fasta	3974708
Belgrade_5_IonXpress_013_scaffolds.fasta	3878539
Belgrade_6_IonXpress_004_scaffolds.fasta	3964228
Belgrade_7_IonXpress_005_scaffolds.fasta	3938008
Belgrade_8_IonXpress_006_scaffolds.fasta	4075418
Belgrade_9_IonXpress_007_scaffolds.fasta	4047141
Belgrade_10_IonXpress_008_scaffolds.fasta	3954571
Belgrade_11_IonXpress_009_scaffolds.fasta	3820393
Belgrade_12_IonXpress_010_scaffolds.fasta	3821744
Belgrade_13_IonXpress_011_scaffolds.fasta	3952425
Belgrade_14_IonXpress_012_scaffolds.fasta	4120326
Belgrade_15_IonXpress_013_scaffolds.fasta	3894819
Belgrade_16_IonXpress_014_scaffolds.fasta	3818994

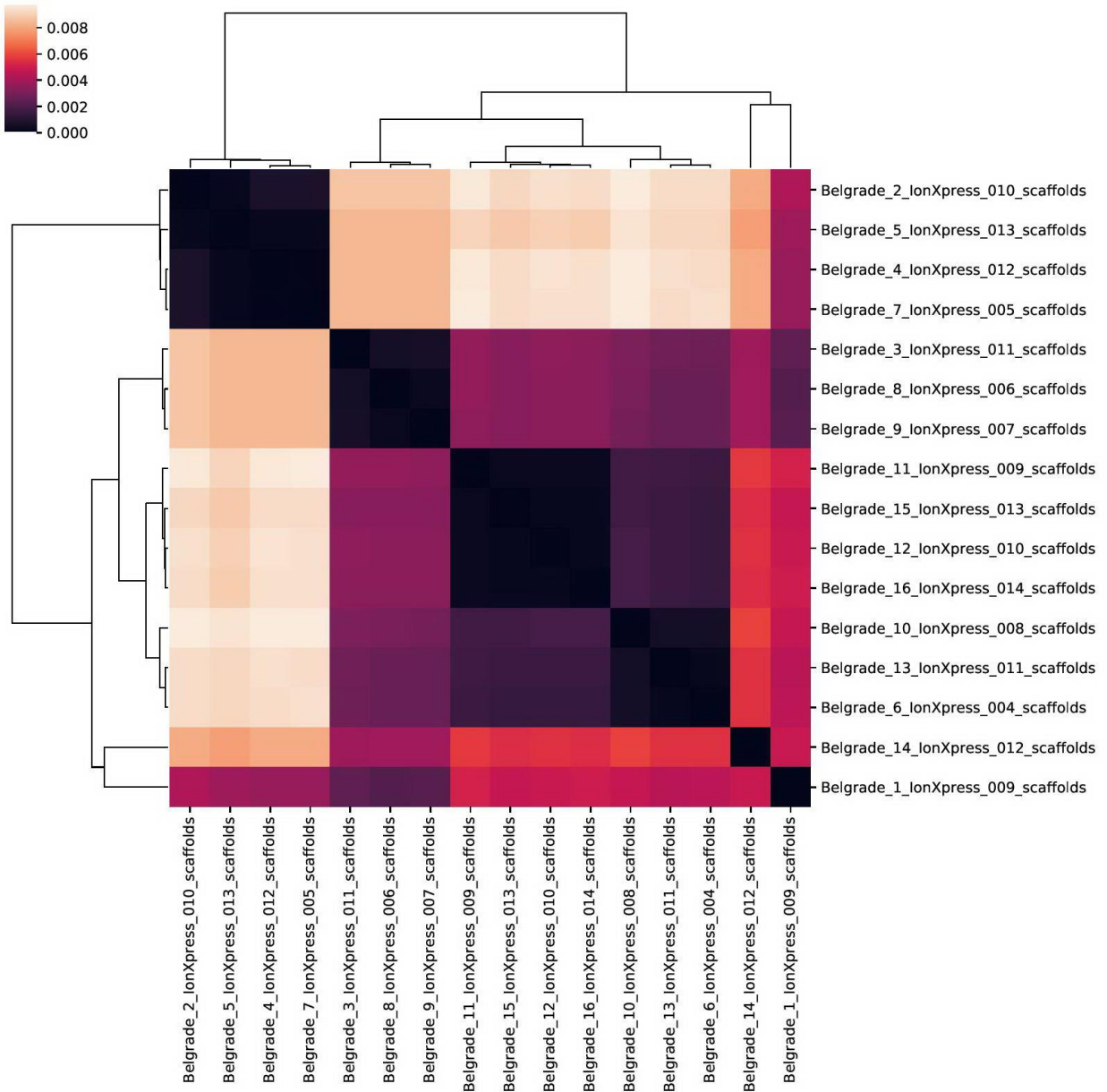
Dužine sekvenciranih genoma su se kretale od 3818994 do 4703584 bp, pri čemu je najkraći genom pripadao soju *A. baumannii* izolovanom iz kolonizovane regije od pacijenta sa teritorije grada Niša, dok je najduži genom zabeležen kod soja izolovanog sa vrha aspiracionog katetera od pacijenta koji se lečio u Beogradu u Institutu za kardiovaskularne bolesti Dedinje.

4.8.2. Genetička sličnost sekvenciranih genoma

Genomi svih 16 analiziranih sojeva *A. baumannii* koji su izolovani u Srbiji imaju sličnosti $\geq 99\%$ (Slika 13A i 13B).



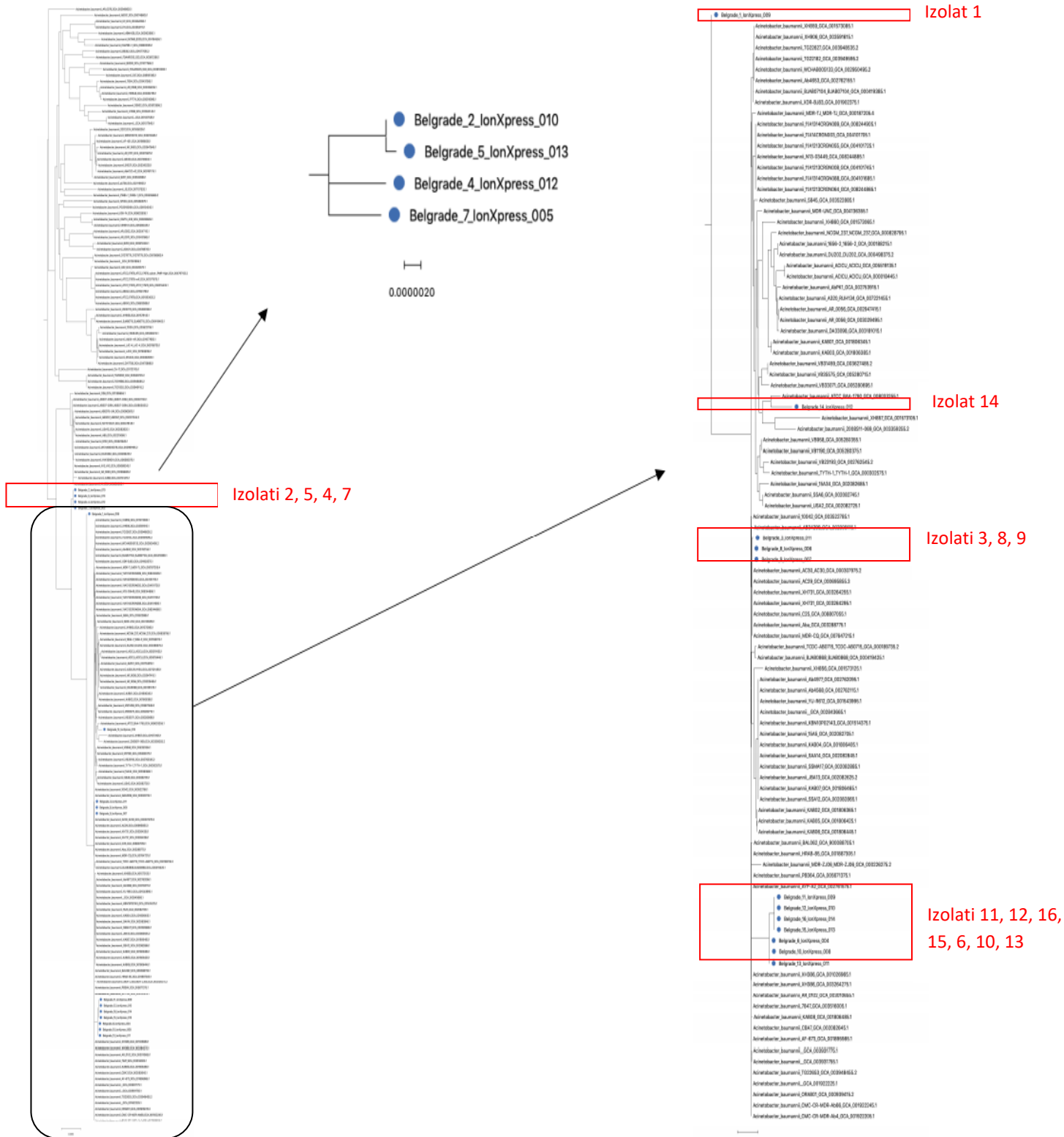
Slika 13A: Sličnost kodirajućih regiona 16 genoma *A. baumannii* primenom *Pairwise Average Nucleotide Identity* (ANI) analize - Dendrogram konstruisan na osnovu ANI analize



Slika 13B: Sličnost kodirajućih regiona 16 genoma *A. baumannii* primenom *Pairwise Average Nucleotide Identity* (ANI) - Grafički prikaz ANI u kojem boja kvadrata ukazuje na stepen sličnosti (najintenzivnija boja odgovara najvećoj genetičkoj sličnosti)

Grafički prikaz uparenih ANI, ukazuje na postojanje 4 grupe izolata koji su međusobno genetički visoko srodni: I (2, 5, 4 i 7); II (3, 8 i 9); III (11, 15, 12 i 16) i IV (10, 13 i 6), pri čemu su grupe III i IV međusobno genetički veoma slične (Slika 13B).

U filogenetskom stablu konstruisanom na osnovu polimorfizama pojedinačnih nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP), izolati koji pripadaju grupama III i IV se grupišu zajedno (Slika 14). Sojevi *A. baumannii* koji su genetički klasterovani zajedno sa ovom grupom su izolovani u Kini, Južnoj Koreji, Sjedinjenim Američkim Državama i Australiji, mahom u periodu od 2014. godine (Slika 14). Izolati 3, 8 i 9 su grupisani zajedno na dendrogramu, sa sojevima *A. baumannii* koji su izolovani iz uzoraka donjeg respiratornog trakta, u Kini i Maleziji, u periodu od 2011. godine. Soj 14 je genetički vrlo srodan sa referentnim sojem ATCC BAA 1790.



Slika 14: Komparativna analiza 16 izolata *A. baumannii* izolovanih u Srbiji i izolata čiji su genomi preuzeti sa GenBank NCBI. Filogenetska analiza polimorfizama pojedinačnih nukleotida.

U prikazanim matriksima distance je naveden broj različitih nukleotida u posmatranom paru sekvenciranih genoma sojeva *A. baumannii* (Slika 15A, 15B i 15C).

	Acinetobacter_baumannii_ATCC_BAA-1790_GCA_00803325.1	Belgrade_14_IonXpress_012	Acinetobacter_baumannii_XH857_GCA_001573105.1	Acinetobacter_baumannii_08311-069_GCA_003359255.2	Acinetobacter_baumannii_9538_GCA_005280355.1	Acinetobacter_baumannii_VB1190_GCA_005280375.1	Acinetobacter_baumannii_VB23193_GCA_002762545.2	Acinetobacter_baumannii_TYTH-1_TYTH-1_GCA_00030257.1	Acinetobacter_baumannii_15A34_GCA_002082685.1	Acinetobacter_baumannii_SSA6_GCA_002082745.1	Acinetobacter_baumannii_USA2_GCA_002082725.1	Acinetobacter_baumannii_10042_GCA_003522785.1	Acinetobacter_baumannii_AB34299_GCA_002009115.1	Belgrade_3_IonXpress_011	Belgrade_8_IonXpress_006	Belgrade_9_IonXpress_007	Acinetobacter_30_AC30_GCA_000307975.2
Acinetobacter_baumannii_ATCC_BAA-1790_GCA_00803325.1	0	2524	6175	4202	2545	2538	3132	3213	3127	2671	2493	2588	2640	2560	2561	2537	
Belgrade_14_IonXpress_012	2524	0	7121	5147	3491	3483	4078	4159	4072	3602	3616	3438	3534	3585	3506	3507	3482
Acinetobacter_baumannii_XH857_GCA_001573105.1	6175	7121	0	5385	5778	5771	6365	6446	6359	5889	5903	5726	5821	5872	5793	5794	5769
Acinetobacter_baumannii_2008S11-069_GCA_003359255.2	4202	5147	5385	0	3805	3797	4391	4473	4386	3916	3930	3752	3847	3899	3820	3821	3796
Acinetobacter_baumannii_VB958_GCA_005280355.1	2545	3491	5778	3805	0	25	814	895	1247	777	791	941	1037	1088	1009	1010	985
Acinetobacter_baumannii_VB1190_GCA_005280375.1	2538	3483	5771	3797	25	0	806	888	1240	770	784	934	1029	1080	1001	1002	978
Acinetobacter_baumannii_VB23193_GCA_002762545.2	3132	4078	6365	4391	814	806	0	910	1834	1364	1378	1528	1623	1675	1595	1597	1572
Acinetobacter_baumannii_TYTH-1_TYTH-1_GCA_00030257.1	3213	4159	6446	4473	895	888	910	0	1916	1446	1460	1609	1705	1756	1677	1678	1653
Acinetobacter_baumannii_15A34_GCA_002082685.1	3127	4072	6359	4386	1247	1240	1834	1916	0	1061	1075	1523	1618	1669	1590	1591	1567
Acinetobacter_baumannii_SSA6_GCA_002082745.1	2657	3602	5889	3916	777	770	1364	1446	1061	0	33	1053	1148	1199	1120	1121	1097
Acinetobacter_baumannii_USA2_GCA_002082725.1	2671	3616	5903	3930	791	784	1378	1460	1075	33	0	1067	1162	1213	1134	1135	1110
Acinetobacter_baumannii_10042_GCA_003522785.1	2493	3438	5726	3752	941	934	1528	1609	1523	1053	1067	0	151	202	123	124	100
Acinetobacter_baumannii_AB34299_GCA_002009115.1	2588	3534	5821	3847	1037	1029	1623	1705	1618	1148	1162	151	0	229	150	151	126
Belgrade_3_IonXpress_011	2640	3585	5872	3899	1088	1080	1675	1756	1669	1199	1213	202	229	0	114	115	105
Belgrade_8_IonXpress_006	2560	3506	5793	3820	1009	1001	1595	1677	1590	1120	1134	123	150	114	0	18	26
Belgrade_9_IonXpress_007	2561	3507	5794	3821	1010	1002	1597	1678	1591	1121	1135	124	151	115	18	0	27
Acinetobacter_baumannii_AC30_AC30_GCA_000307975.2	2537	3482	5769	3796	985	978	1572	1653	1567	1097	1110	100	126	105	26	27	0

Slika 15A: Matriks distance sekvenciranih genoma sojeva 14, 3, 8 i 9 *A. baumannii*

	Acinetobacter_baumannii_AR_0083_GCA_002996805.1	Acinetobacter_baumannii_A388_GCA_002741415.1	Acinetobacter_baumannii_A1_GCA_000830055.1	Belgrade_2_IonXpress_010	Belgrade_5_IonXpress_013	Belgrade_4_IonXpress_012	Belgrade_7_IonXpress_005	Belgrade_1_IonXpress_009	Acinetobacter_baumannii_XH859_GCA_001573085.1	Acinetobacter_baumannii_XH906_GCA_003591615.1	Acinetobacter_baumannii_TG22627_GCA_0010600
Acinetobacter_baumannii_AR_0083_GCA_002996805.1	0	1711	59	14595	14597	14595	14594	20735	24173	24179	24171
Acinetobacter_baumannii_A388_GCA_002741415.1	1711	0	1676	16214	16216	16214	16213	22354	25792	25798	25790
Acinetobacter_baumannii_A1_GCA_000830055.1	59	1676	0	14562	14564	14562	14561	20702	24140	24145	24138
Belgrade_2_IonXpress_010	14595	16214	14562	0	2	24	22	7164	10602	10607	10600
Belgrade_5_IonXpress_013	14597	16216	14564	2	0	26	25	7166	10604	10609	10602
Belgrade_4_IonXpress_012	14595	16214	14562	24	26	0	22	7164	10602	10607	10600
Belgrade_7_IonXpress_005	14594	16213	14561	22	25	22	0	7163	10601	10606	10599
Belgrade_1_IonXpress_009	20735	22354	20702	7164	7166	7164	7163	0	3438	3444	3436
Acinetobacter_baumannii_XH859_GCA_001573085.1	24173	25792	24140	10602	10604	10602	10601	3438	0	20	17
Acinetobacter_baumannii_XH906_GCA_003591615.1	24179	25798	24145	10607	10609	10607	10606	3444	20	0	22
Acinetobacter_baumannii_TG22627_GCA_0010600	24171	25790	24138	10600	10602	10600	10599	3436	17	22	0

Slika 15B: Matriks distance sekvenciranih genoma sojeva 2, 5, 4, 7 i 1 *A. baumannii*

	Acinetobacter_baumannii_MDR-ZJ06_MDR-ZJ06_GCA_0022225.2	Acinetobacter_baumannii_PB364_GCA_00056764_GCA_006713175.1	Acinetobacter_baumannii_AYP-AZ_GCA_0022665	Belgrade_11_IonXpress_009	Belgrade_12_IonXpress_010	Belgrade_16_IonXpress_014	Belgrade_15_IonXpress_013	Belgrade_6_IonXpress_004	Belgrade_10_IonXpress_008	Belgrade_13_IonXpress_011	Acinetobacter_baumannii_XH386_GCA_0010804	Acinetobacter_baumannii_XH386_GCA_0031804	Acinetobacter_baumannii_AR_0102_GCA_0008003	Acinetobacter_baumannii_7847_GCA_000351804	Acinetobacter_baumannii_KAB08_GCA_0011852	Acinetobacter_baumannii_ORAB01_GCA_0008006	Acinetobacter_baumannii_AF-673_GCA_0011801	Acinetobacter_baumannii_GCA_003931755	Acinetobacter_baumannii_TG22653_GCA_0008008	Acinetobacter_baumannii_GCA_001922225	Acinetobacter_baumannii_ORAB01_GCA_0008006	Acinetobacter_baumannii_CMC-CR-MDR-Ab	Acinetobacter_baumannii_CMC-CR-MDR-Ab	
Acinetobacter_baumannii_MDR-ZJ06_MDR-ZJ06_GCA_0022225.2	0	821	812	2665	2660	2663	2662	2251	2267	2257	804	804	803	804	852	816	801	817	818	802	800	806	817	807
Acinetobacter_baumannii_PB364_GCA_00056764_GCA_006713175.1	821	0	35	1889	1884	1887	1886	1474	1491	1481	36	36	35	36	85	48	33	49	50	34	32	39	49	40
Acinetobacter_baumannii_AYP-AZ_GCA_0022665	812	35	0	1852	1857	1860	1859	1448	1464	1454	27	27	26	27	75	39	24	40	41	25	22	29	40	30
Belgrade_11_IonXpress_009	2665	1889	1862	0	7	13	12	421	437	427	1880	1880	1879	1880	1929	1892	1877	1893	1894	1878	1876	1882	1893	1884
Belgrade_12_IonXpress_010	2660	1884	1857	7	0	7	6	415	432	422	1875	1875	1874	1875	1923	1887	1872	1888	1889	1873	1871	1877	1888	1878
Belgrade_16_IonXpress_014	2663	1887	1860	13	7	0	7	419	435	425	1878	1878	1877	1878	1926	1890	1875	1891	1892	1876	1874	1880	1891	1881
Belgrade_15_IonXpress_013	2662	1886	1859	12	6	7	0	418	434	424	1877	1877	1876	1877	1925	1889	1874	1890	1891	1875	1873	1879	1890	1880
Belgrade_6_IonXpress_004	2251	1474	1448	421	415	419	418	0	16	6	1466	1466	1465	1466	1514	1478	1463	1479	1480	1464	1462	1468	1479	1469
Belgrade_10_IonXpress_008	2267	1491	1464	437	432	435	434	16	0	16	1482	1482	1481	1482	1530	1494	1479	1495	1496	1480	1478	1484	1495	1485
Belgrade_13_IonXpress_011	2257	1481	1454	427	422	425	424	6	16	0	1472	1472	1471	1472	1521	1484	1469	1485	1486	1470	1468	1474	1485	1476
Acinetobacter_baumannii_XH386_GCA_0010804	804	36	27	1880	1875	1878	1877	1466	1482	1472	0	0	18	19	67	31	16	32	33	17	15	21	32	22
Acinetobacter_baumannii_XH386_GCA_0031804	804	36	27	1880	1875	1878	1877	1466	1482	1472	0	0	18	19	67	31	16	32	33	17	15	21	32	22
Acinetobacter_baumannii_AR_0102_GCA_0008003	803	35	26	1879	1874	1877	1876	1465	1481	1471	18	18	0	18	66	30	15	31	32	16	14	20	31	21
Acinetobacter_baumannii_7847_GCA_000351804	804	36	27	1880	1875	1878	1877	1466	1482	1472	19	19	18	0	67	31	16	32	33	17	15	21	32	22
Acinetobacter_baumannii_KAB08_GCA_0011852	852	85	75	1929	1923	1926	1925	1514	1530	1521	67	67	66	67	0	75	62	78	79	63	61	67	78	69
Acinetobacter_baumannii_ORAB01_GCA_0008006	816	48	39	1892	1887	1890	1889	1478	1494	1484	31	31	30	31	75	0	26	42	43	27	25	31	42	32
Acinetobacter_baumannii_AF-673_GCA_0011801	801	33	24	1877	1872	1875	1874	1463	1479	1469	16	16	15	16	62	26	0	20	21	5	3	10	20	11
Acinetobacter_baumannii_GCA_003931755	817	49	40	1893	1888	1891	1890	1479	1495	1485	32	32	31	32	78	42	20	0	1	21	19	26	36	27
Acinetobacter_baumannii_TG22653_GCA_0008008	818	50	41	1894	1889	1892	1891	1480	1496	1486	33	33	32	33	79	43	21	1	0	22	20	27	37	28
Acinetobacter_baumannii_GCA_001922225	802	34	25	1878	1873	1876	1875	1464	1480	1470	17	17	16	17	63	27	5	21	22	0	4	11	21	12
Acinetobacter_baumannii_ORAB01_GCA_0008006	800	32	22	1876	1871	1874	1873	1462	1478	1468	15	15	14	15	61	25	3	19	20	4	0	9	19	10
Acinetobacter_baumannii_CMC-CR-MDR-Ab	806	39	29	1882	1877	1880	1879	1468	1484	1474	21	21	20	21	67	31	10	26	27	11	9	0	26	16
Acinetobacter_baumannii_CMC-CR-MDR-Ab	817	49	40	1893	1888	1891	1890	1479	1495	1485	32	32	31	32	78	42	20	36	37	21	19	26	0	10
Acinetobacter_baumannii_CMC-CR-MDR-Ab	807	40	30	1884	1878	1881	1880	1469	1485	1476	22	22	21	22	69	32	11	27	28	12	10	16	10	0

Slika 15C: Matriks distance sekvenciranih genoma sojeva 11, 12, 16, 15, 6, 10 i 13 *A. baumannii*

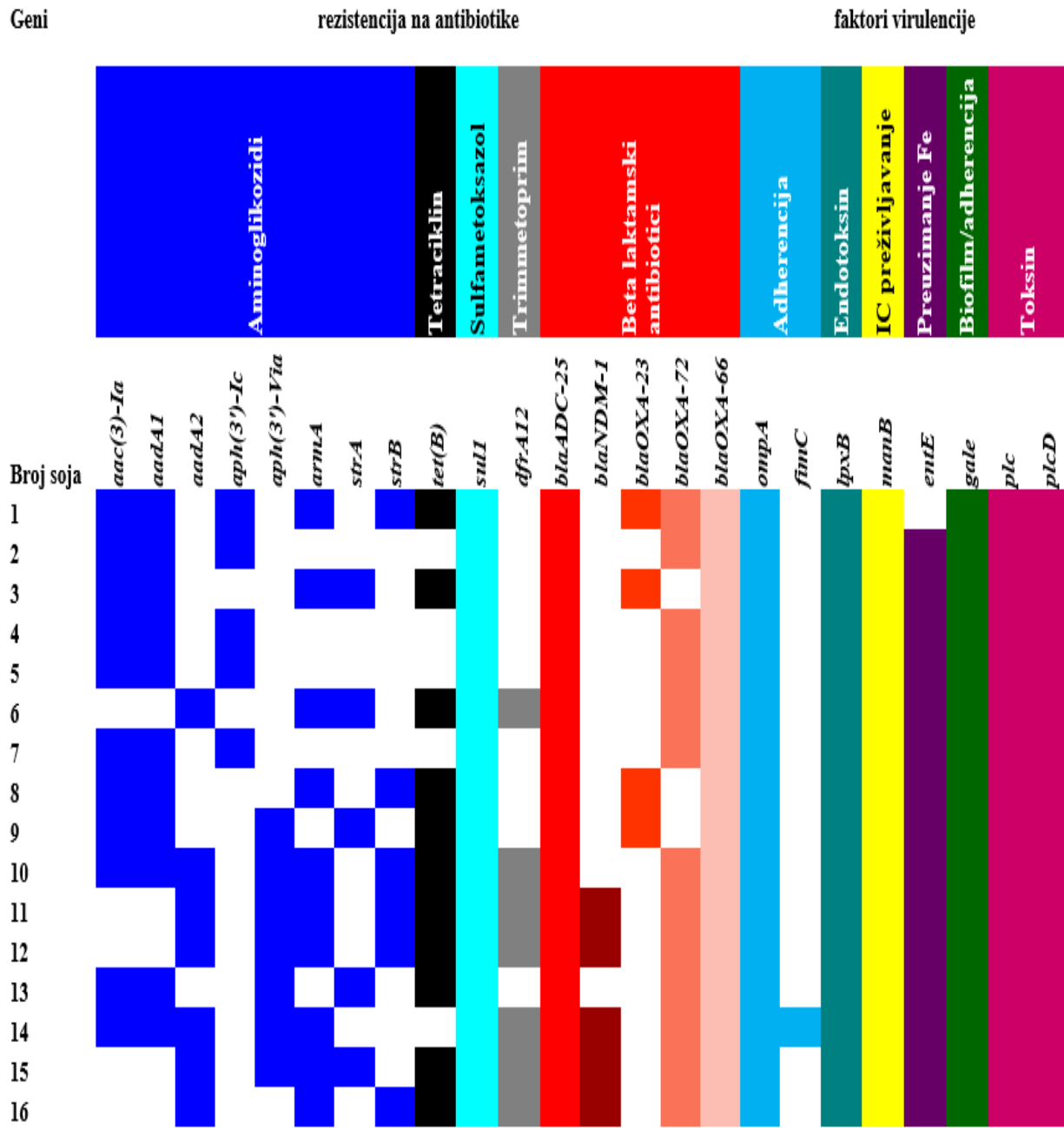
Visoko srodni sojevi *A. baumannii* 2, 4, 5 i 7 koji se klasteruju zajedno, su izolovani iz uzoraka krvi (n=3) i donjeg respiratornog trakta (n=1). Svi su posedovali *blaOXA-24* gen. Izolati 3, 8 i 9 su takođe poticali iz krvi (n=1) i donjeg respiratornog trakta (n=2), ali su bili nosioci *blaOXA-23* gena. Svi sojevi *A. baumannii* označeni brojevima 11, 12, 15 i 16 su izolovani iz uzoraka kože i mekih tkiva i imali su *blaOXA-24* gen, dok su sojevi 6, 10 i 13 vodili poreklo iz uzoraka rana (n=2) i donjeg respiratornog trakta (n=1). Kod svih sojeva ovog klastera je detektovan *blaOXA-24* gen.

4.8.3. Geni koji kodiraju rezistenciju na antibiotike

Kod sojeva kojima je urađeno sekvenciranje celog genoma detektovani su geni koji kodiraju rezistenciju na aminoglikozide (*aac(3)-Ia*, *aadA1*, *aadA2*, *aph(3')-Ic*, *aph(3')-Via*, *armA*, *strA*, *strB*), tetraciklin (*tet(B)*), sulfametoksazol (*sulI*), trimetoprim (*dfrA12*) i β -laktamske antibiotike, cefalosporine (*blaADC-25*) i karbapeneme. Nijedan od sekvenciranih izolata nije imao *mcr* gen. Detaljan profil genetičkih determinanti rezistencije je prikazan na slici 16.

4.8.4. Geni koji kodiraju faktore virulencije

Uvidom u sekvencirani genom, razmatrano je prisustvo gena koji kodiraju sledeće faktore virulencije: faktore adherencije i faktore značajne za formiranje biofilma (*OmpA*, *fimC*, *galE*), endotoksin (*lpxB*), faktore značajne za intracelularno preživljavanje *A. baumannii* (*manB*), za preuzimanje gvožđa (*entE*) i toksine (*Plc*, *PlcD*). Svi sojevi su imali adhezin *OmpA*, endotoksin, fosfolipaze, kao i faktore odgovorne za intracelularno preživljavanje (Slika 16). Jedini soj *A. baumannii* koji je posedovao gen za pile tipa 1 je izolovan iz urina pacijenta sa infekcijom urinarnog trakta koji je hospitalizovan u Nišu. Jedini soj koji nije imao gen za preuzimanje gvožđa je poticao iz donjeg respiratornog trakta pacijenta koji se lečio u Beogradu. Profili navednih faktora virulencije su grafički prikazani na slici 16.



Slika 16: Grafički prikaz gena koji kodiraju rezistenciju na aminoglikozide [*aac* - aminoglikozid acetiltransferaze; *aph* i *str* - aminoglikozid fosfotransferaze; *aad* - aminoglikozid adeniltransferaze; *arm A* - 16S rRNK metilazu], tetracikline [*tet(B)*- protein facilitator efluksne pumpe], sulfonamide [*sul I* - dihidropteroat sintetazu], trimetoprim [*dfrA12* - dihidrofolat reduktazu], β-laktamske antibiotike [*bla* - β-laktamaze] i faktore virulencije [*ompA* - protein spoljašnje membrane; *fim C* - pilusni šaperon; *lpxB* - sintetazu Lipida A; *man B* - O antigen; *ent E* - sintetazu enterobaktina; *gal E* - UDP-glukozo-4-epimerazu; *plc* - fosfolipazu] kod 16 sojeva *A. baumannii* kojima je urađen WGS. IC - intracelularno.

5. Diskusija

U okviru ove studije je po prvi put urađeno sveobuhvatno multicentrično ispitivanje kliničkih, demografskih i epidemioloških karakteristika pacijenata obolelih od infekcija izazvanih vrstom *A. baumannii* u Srbiji. Takođe, izvršena je i fenotipska i genotipska karakterizacija cirkulišućih sojeva *A. baumannii* i identifikovani su dominantni karbapenem rezistentni klonovi, njihova genetička osnova rezistencije i genetička srodnost.

A. baumannii je u poslednje dve decenije definisan kao tipičan bolnički patogen. Zbog dramatičnog porasta rezistencije na antibiotike i sve veće učestalosti infekcija u bolnicama, *A. baumannii* se poslednjih godina ubraja u preteće patogene (Peleg i sar., 2008). Rezultati ove multicentrične studije koja je obuhvatila različite bolnice sekundarnog i tercijarnog nivoa širom Republike Srbije pokazali su da je od svih testiranih kliničkih izolata Acb kompleksa kao uzročnik infekcije najčešće identifikovan *A. baumannii* (84,6%), što je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima (Peleg i sar., 2008; Visca i sar., 2011).

Više od trećine *A. baumannii* sojeva (37,6%) analiziranih u ovoj studiji izolovano je iz respiratornog trakta hospitalizovanih pacijenata. Da je respiratorni sistem mesto najčešće izolacije bolničkih sojeva *A. baumannii* potvrđuju i rezultati drugih autora. Gupta i saradnici su u multicentričnoj studiji koja je obuhvatila period od 2013. do 2017. godine u 411 bolnica širom SAD zabeležili da je sa najvećom učestalošću (45%) *A. baumannii* izolovan iz respiratornih uzoraka (Gupta i sar., 2019). Istraživanje meksičkih autora sprovedeno u opštoj bolnici u Meksiko Sitiju od januara do decembra 2014. godine pokazalo je da je kod pacijenata sa potvrđenom bolničkom infekcijom *A. baumannii* najčešće izolovan iz respiratornog trakta (50%) (Rosales-Reyes i sar., 2017). U kineskoj studiji u univerzitetskoj bolnici tercijarnog nivoa tokom trogodišnjeg perioda (2010-2013. godina) kod pacijenata hospitalizovanih u jedinicama intenzivne nege takođe je *A. baumannii* najčešće izolovan iz respiratornih uzoraka (42,6%) (Wang i sar., 2015). Sličan rezultat dobili su autori iz Maroka u univerzitetskoj klinici u Rabatu u dvogodišnjem periodu, 2012-2014. godine sa 44,67% *A. baumannii* izolata iz respiratornih uzoraka kao i istraživači iz Vijetnama u studiji koja je obuhvatila tri bolnice u istom dvogodišnjem periodu sa 40% *A. baumannii* sojeva porekla respiratornog trakta (Tuan Anh i sar., 2017; Uwingabiye i sar., 2016). Nešto veću učestalost izolacije *A. baumannii* iz respiratornih uzoraka detektovali su u tercijarnoj bolnici u petogodišnjem periodu (2012-2016. godina) autori iz Indije (52%), kao i libanski istraživači (53,1%) u sedmogodišnjem periodu (2007-2014. godina) u tercijarnoj ustanovi (Banerjee i sar., 2018; Kanafani i sar., 2018).

Drugi uzorak po učestalosti izolacije *A. baumannii* je bio sadržaj rane (36,7%). Sličan rezultat (37,2%) objavili su američki autori nakon obimnog istraživanja u 411 bolnica širom SAD (Gupta i sar., 2019). Nešto niža učestalost izolacije iz uzoraka rana nađena je u gorenavedenim studijama u Kini (odeljenje za opekotine: 25,2%; odeljenja opšte hirurgije: 32,2%), Meksiku (23,2%), Libanu (18,8%) i Indiji (19,7%) (Banerjee i sar., 2018; Kanafani i sar., 2018; Rosales-Reyes i sar., 2017; Wang i sar., 2015). Neophodno je istaći da visoka učestalost izolacije *A. baumannii* iz sadržaja rana u našim bolnicama govori o neophodnosti striktnog sprovođenja mera prevencije bolničkih infekcija, posebno onih koje se odnose na smanjenje transmisije *A. baumannii* u bolničkoj sredini.

A. baumannii je u našoj studiji sa daleko manjom učestalošću izolovan iz uzoraka krvi (11,8%) i urina (7,6%). Slične rezultate prezentovali su i već pomenuti libanski (krv: 12%; urin: 8%) i meksički (krv: 14,2%; urin: 7,1%) autori (Kanafani i sar., 2018; Rosales-Reyes i sar.,

2017). U ovoj studiji zabeležen je jedan slučaj meningitisa izazvanog vrstom *A. baumannii*, kao komplikacija prethodne neurohirurške intervencije, potvrđen izolacijom uzročnika iz likvora, što je u saglasnosti sa već publikovanim rezultatima (Metan i sar., 2007).

U bolničkoj sredini, odeljenja sa najvećim rizikom za razvoj infekcija izazvanih bakterijom *A. baumannii* su jedinice intenzivne nege (Visca i sar., 2011), što potvrđuju i rezultati ove studije sa 39,6% *A. baumannii* izolata uzorkovanih od pacijenata hospitalizovanih u jedinicama intenzivne nege. Takođe, ostali faktori rizika značajni za razvoj bolničkih infekcija izazvanih bakterijom *A. baumannii* nađeni su i u našem istraživanju. Hirurškim intervencijama podvrgnuto je 46,8% pacijenata, njih 28,7% je mehanički ventilirano, plasiran urinarni kateter imalo je 28,7%, a centralni venski kateter 19,4%. Kao najznačajniji komorbiditet detektovan je dijabetes melitus kod 23,2% obolelih. Većinu pacijenata (62,5%) činili su odrasli muškarci (medijana godina: 66). Brazilski autori su u petnaestomesečnoj studiji (avgust 2009-oktobar 2010. godine) sprovedenoj u tercijarnoj univerzitetskoj bolnici definisali najčešće faktore rizika za nastanak bolničkih infekcija izazvanih *A. baumannii* [hospitalizacija na odeljenju intenzivne nege (34,2%), hirurška intervencija (31,5%), mehanička ventilacija (61,6%), plasiran centralni venski kateter (60,3%), komorbiditeti: bubrežna insuficijencija (30,1%), maligniteti (13,7%) i dijabetes melitus (10,9%), muški pol (67,1%) sa medijanom godišta: 57,8] (Prata-Rocha i sar., 2012). Jedina razlika u odnosu na rezultate iz Brazila je da je u našem istraživanju kao komorbiditet dijabetes melitus (23,2%) češće zabeležen u odnosu na bubrežnu insuficijenciju (8,9%) i malignitete (8%). Slične rezultate dobijene u jednogodišnjoj studiji (2007-2008. godina) u jedinici intenzivne nege u tercijarnoj univerzitetskoj bolnici prikazali su autori iz Libana [hirurška intervencija (26%), mehanička ventilacija (58,9%), plasiran centralni venski kateter (9,6%), plasiran urinarni kateter (84,9%), komorbiditeti: bubrežna insuficijencija (43,8%), maligniteti (28,8%), dijabetes melitus (57,5%) i hronična bolest pluća (47,9%), muški pol (67,1%) sa medijanom godišta: 61,7] (Kanafani i sar., 2018).

Rezultati ove studije pokazali su da je prevalencija CRAB bolničkih izolata viša od 90%, pri čemu je IMP ispoljio nešto veću aktivnost od MER (IMP: 92,4%; MER: 93,7%). Razliku u osetljivosti *A. baumannii* izolata na karbapeneme, sa istovremenom osetljivošću na IMP i rezistencijom na MER publikovali su i drugi autori (Jones i sar., 2006; Lesho i sar., 2005). Zabeležena je i visoka učestalost rezistencije *A. baumannii* na fluorohinolone (95,4%) i aminoglikozide, sem tobramicina (AK: 91,6%; GEN: 92,8%; TOB: 68,8%). Razlog niže učestalosti rezistencije na TOB u odnosu na AK i GEN može se objasniti činjenicom da je TOB najmanje zastupljen aminoglikozid u terapijskim protokolima bolnica u Republici Srbiji. Sličnu disproporciju u učestalosti rezistencije *A. baumannii* na aminoglikozide (GEN: 69,3%; AK: 38,9%; TOB: 43,1%) objavili su autori multicentrične američke studije sprovedene od 2012 do 2015. godine (Bulens i sar., 2018), kao i istraživači u Nemačkoj koji su od 2012-2015. u univerzitetskoj bolnici u Hajdelbergu registrovali 79% *A. baumannii* sojeva rezistentnih na GEN, dok je njih 62% istovremeno bilo rezistentno na TOB (Eigenbrod i sar., 2019). Visoku prevalenciju rezistencije invazivnih izolata *Acinetobacter spp.* na antibiotike u Srbiji u 2018. godini nalazimo i u godišnjem CAESAR izveštaju koji obuhvata kliničke izolate iz bolnica tercijarnog (37%) i sekundarnog (63%) nivoa širom Srbije. Prevalencija rezistencije kretala se od 91% do 97% za sve antibiotike obuhvaćene monitoringom [karbapenemi (96%), aminoglikozidi (91%) i fluorohinoloni (97%)]. MDR fenotip imalo je 92% izolata (CAESAR, 2019). Ako analiziramo šestogodišnji period (2013.-2018. godina) učestalost rezistencije invazivnih izolata *Acinetobacter spp.* na antibiotike u Srbiji se postepeno povećava za karbapeneme (93-96%) i fluorohinolone (91-97%), dok se za aminoglikozide beleže oscilacije (od 91-94%) bez jasnog

trenda porasta tokom godina. Takođe je uočen i jasan porast detekcije MDR fenotipa (85-92%) (CAESAR, 2014; CAESAR, 2016; CAESAR, 2017; CAESAR, 2018; CAESAR, 2019).

U istom vremenskom periodu, tokom 2018. godine, EARS-Net je zabeležio da prevalencija rezistencije *Acinetobacter spp.* na karbapeneme značajno raste od severne ka južnoj Evropi i da je veća od 70% u bar osam zemalja Evrope, uključujući i one u našoj regiji: Bugarska (74,5%), Italija (79,2%), Rumunija (85,3%), Grčka (92,4%) i Hrvatska (95,5%). Suprotno ovome, zemlje severne Evrope su adekvatnim programima kontrole bolničkih infekcija uspele da održe nisku učestalost rezistencije na karbapeneme: Finska i Norveška (0%), Irska i Velika Britanija (1,7%; 1,8%), Švedska i Belgija (3,7%; 3,8%), Nemačka i Austrija (4,4%), Holandija (4,6%), Danska i Francuska (6,4%;6,5%), Slovenija i Češka Republika (17,9%, 19,8%). Slična je i geografska distribucija izolata rezistentnih na fluorohinolone, od 0% u Norveškoj, Finskoj, Irskoj i Luksemburgu do preko 90% u Grčkoj i Hrvatskoj. Ovome se pridružuje i regionalna raspodela rezistencije *Acinetobacter spp.* na aminoglikozide, koja od nepostojeće u Norveškoj i Luksemburgu, preko jednocifrenih vrednosti u Nemačkoj, Irskoj, Velikoj Britaniji, Holandiji, Švedskoj, Belgiji, Austriji i Francuskoj, dostiže značajno veće procenete u našem okruženju: Bugarska (73,6%), Italija (77%), Rumunija (80%), Grčka (81,6%) i Hrvatska (91,5%). (EARS-Net, 2019).

U petogodišnjem (2013.-2017. godina) istraživanju koje je obuhvatilo 411 bolnica širom SAD analizirano je 19.325 kliničkih izolata *Acinetobacter spp.* Ukupna prevalencija rezistencije *Acinetobacter spp.* na karbapeneme bila je 37,48%, dok je MDR fenotip detektovan kod 47,66% izolata. Tokom svih pet godina procenat rezistencije *Acinetobacter spp.* na karbapeneme kretao se u intervalu od 30,7-46,3%, a procenat MDR sojeva u intervalu od 40,1-57,2%. Bitna je činjenica da je tokom posmatranog perioda zahvaljujući programu nadzora nad bolničkim infekcijama zapažen linearni trend opadanja učestalosti rezistencije sojeva na karbapeneme (Gupta i sar., 2019). Uprkos ovakvom rezultatu u poslednjem CDC izveštaju CRAB se nalazi na listi pretećih bolničkih patogena u SAD sa 8.500 obolelih i 700 umrlih u bolnicama u 2017. godini (CDC, 2019). Četvorogodišnja (2012- 2015. godina) multicentrična studija američkih autora kojom je analiziran 621 CRAB bolnički soj izolovan kod pacijenata iz osam gradova u SAD prikazala je podatke o učestalosti rezistencije CRAB izolata na aminoglikozide (GEN: 69,3%; AK: 38,9%; TOB: 43,1%) i fluorohinolone (96,5%) (Bulens i sar., 2018).

O učestalosti rezistencije *A. baumannii* bolničkih izolata na antibiotike na azijskom kontinentu saznajemo iz multicentrične kineske studije sprovedene u 21 bolnici u sedam regiona širom Narodne Republike Kine. U dvogodišnjem periodu (2015.-2017. godina) prikupljeno je i analizirano 1.360 kliničkih izolata *A. baumannii*. Detektovano je 78,7% CRAB izolata. Rezistencija na aminoglikozide zabeležena je kod 67%, a na fluorohinolone kod 81,6% sojeva. MDR fenotip detektovan je kod 80,1% testiranih izolata (Zhang i sar., 2020).

A. baumannii izolati obuhvaćeni našim istraživanjem ispoljili su umeren nivo rezistencije na AMS (59,1%). Dobijeni rezultati ukazuju da navedeni antibakterijski agens ima *in vitro* dejstvo na CRAB sojeve. Većina kliničkih mikrobioloških laboratorija u našoj zemlji usvojila je EUCAST standard za testiranje osetljivosti bakterijskih izolata na antibiotike. U EUCAST smernicama ne postoje zone inhibicije za AMS kod *Acinetobacter spp.*, tako da se osetljivost na AMS ne testira u rutinskom radu što ga čini manje prisutnim u terapijskim protokolima. Slične rezultate nalazimo u nekoliko studija zemalja iz okruženja. U dvogodišnjem (2014-2016. godina) istraživanju bugarskih autora u četiri univerzitetske bolnice učestalost rezistencije 226 CRAB izolata na AMS bila je 41,6% (Strateva i sar., 2019). U hrvatskoj studiji, testiranjem CRAB sojeva izolovanih od 2016. do 2018. godine u Klinici za dečije bolesti u Zagrebu takođe je nađen

umeren nivo rezistencije na AMS (67%). Prema podacima iz poslednjeg publikovanog CDC izveštaja, 61% CRAB izolata bilo je rezistentno na AMS u SAD 2017. godine (CDC, 2019). Slične rezultate objavili su i autori iz Vijetnama u studiji koja je obuhvatila period od septembra 2017. do marta 2018. godine, gde je učestalost rezistencije kliničkih izolata *A. baumannii* na IMP bila 84,5%, dok za AMS nije prelazila 60% (Hoang Quoc i sar., 2019).

MDR fenotip detektovali smo kod 203 (85,6%) *A. baumannii* izolata, XDR kod 95 (40%), dok je deset izolata (4,3%) klasifikovano kao PDR. Polimiksini i TYG su jedine terapijske opcije za lečenje pacijenata inficiranih XDR *A. baumannii* izolatima. U našoj studiji učestalost rezistencije na TYG bila je 24,9%. Sličan rezultat prikazali su i autori iz Bugarske u svojoj multicentričnoj dvogodišnjoj studiji (2014-2016. godina) sa 22,1% TYG rezistentnih *A. baumannii* kliničkih izolata (Strateva i sar., 2019). Jednogodišnje istraživanje američkih autora sprovedeno tokom 2016. godine koje je obuhvatilo 888 nerepetitivnih *A. baumannii* kliničkih izolata različitog geografskog porekla pokazalo je da je globalna prevalencija rezistencije na TYG bila 25,6%, sa najvećom učestalošću u Evropi (31,9%), a zatim slede region Azije i Pacifika (23,1%), Latinske Amerike (18,3%) i SAD (15,4%) (Pfaller i sar., 2018). Za razliku od prethodne studije Bulens i saradnici su testirali 621 CRAB bolnički soj izolovan kod pacijenata iz osam gradova u SAD, u četvorogodišnjem periodu (2012-2015. godina) i detektovali 38,3% TYG rezistentnih izolata (Bulens i sar., 2018).

U našoj studiji najveću aktivnost protiv *A. baumannii* kliničkih izolata pokazao je COL. Ipak, detekcija deset (4,3%) izolata rezistentnih na COL je zabrinjavajuća. Svih deset izolata ispoljilo je PDR fenotip. Trenutno su za PDR *A. baumannii* izolate limitirane terapijske opcije. U borbi sa infekcijama izazvanim ovakvim sojevima najčešće se koriste kombinacije COL sa nekim od sledećih antibiotika: tigeciklin, rifampicin, fosfomicin, vankomicin, fuzidinska kiselina, teikoplanin, imipenem, meropenem, amikacin, gentamicin (Lee i sar., 2017; Leite i sar., 2016). Rezistencija kliničkih izolata *A. baumannii* na COL više nije nepoznanica pa se ovakvi slučajevi beleže na američkom, afričkom, evropskom i azijskom kontinentu (Pormohammad i sar., 2020). Rezultat identičan našem publikovali su kineski autori koji su u dvogodišnjem periodu (2015-2017. godina) u 21 bolnici u sedam regiona Kine registrovali 4,3% COL rezistentnih *A. baumannii* izolata (Zhang i sar., 2020). Istraživanje koje je obuhvatilo tri bolnice u Vijetnamu, od 2012. do 2014. godine, beleži 11% *A. baumannii* izolata rezistentnih na COL (Tuan Anh i sar., 2017). U SAD prevalencija rezistencije na COL u periodu od 2012. do 2015. godine iznosila je 6,6% (Bulens i sar., 2018). Sličan rezultat (5%) zabeležen je i na teritoriji Latinske Amerike, u peruanskim bolnicama u dvogodišnjem periodu 2014-2016. godina (Levy-Blitchein i sar., 2018). Na tlu Evrope se COL rezistentni *A. baumannii* sojevi izveštavaju iz pojedinačnih zdravstvenih centara. Tako su nemački autori od 2012. do 2015. godine u univerzitetskoj bolnici u Hajdelbergu detektovali 15% COL rezistentnih *A. baumannii* izolata (Eigenbrod i sar., 2019). U grčkoj petogodišnjoj studiji (2010-2014. godina) u tercijarnoj ustanovi zapažen je porast COL rezistentnih *A. baumannii* izolata, od 0% 2010. godine do 7,9% 2014. godine (Maragaki i sar., 2016). U Hrvatskoj je u 2018. godini registrovano 1,15% COL rezistentnih *A. baumannii* izolata u univerzitetskoj bolnici u Osijeku, a 0,52% tokom 2017. godine u opštoj bolnici u Puli (D'Onofrio i sar., 2020).

Kod svih *A. baumannii* izolata analiziranih ovom studijom detektovan je *blaOXA-51* gen koji kodira urođeno prisutnu, odnosno intrinzičnu OXA-51 karbapenemazu. Prvi put su kod vrste *A. baumannii* *blaOXA-51* gen opisali istraživači iz Velike Britanije 2005. godine, analizirajući šest epidemijskih CRAB sojeva izolovanih u petnaestomesečnom periodu (oktobar 1993. - novembar 1994. godine) u tri bolnice u Argentini. Zaključili su i da *blaOXA-51* gen kodira

OXA-51 enzim koji pripada β -laktamazama klase D po Ambleru i da isti slabo hidrolizuje karbapeneme (Brown i sar., 2005). Godinu dana kasnije Turton i saradnici objavljuju da je OXA-51 urođeno prisutna, kodirana genima sa hromozoma, specifična za vrstu *A. baumannii* i da se može koristiti za njenu identifikaciju (Turton i sar., 2006a). Za snažnu hidrolizu karbapenema neophodna joj je *ISAbal*, locirana ushodno od *blaOXA-51* gena u regiji promotora, takođe specifična za vrstu *A. baumannii* (Turton i sar., 2006b). U našem istraživanju, kod 16,5% CRAB izolata koji su produkovali samo OXA-51 karbapenemazu detektovano je istovremeno prisustvo *ISAbal* i *blaOXA-51* gena. U međuvremenu su otkrivene brojne varijante ovog enzima (OXA-64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 75, 76, 77, 83, 84, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 94, 95) koje su svrstane u OXA-51 klaster, a međusobno se razlikuju u sadržaju pojedinih aminokiselina (Turton i sar., 2006a). Sekvenciranjem *blaOXA-51* gena kod 37 reprezentativnih CRAB izolata u našoj studiji otkrivena je *blaOXA-66* varijanta ili alel. Molekularna epidemiologija CRAB bolničkih izolata u Republici Srbiji je do sada bila nepoznanica. Nisu postojali publikovani podaci iz multicentričnih studija. Do sada su objavljeni rezultati samo jednog istraživanja koje je obuhvatilo 28 MDR CRAB kliničkih sojeva izolovanih u periodu od juna 2012. do februara 2014. godine kod dece hospitalizovane na Institutu za majku i dete "Dr. Vukan Čupić". Svi izolati su produkovali urođenu OXA-51 karbapenemazu, ali njeno sekvenciranje nije rađeno (Novovic i sar., 2015). Dortet je sa saradnicima 2016. godine analizirao *A. baumannii* soj izolovan iz urina pacijenta kome je zbog retencije urina aplikovan kateter u bolnici u Srbiji, a zatim je zbog urinarnе infekcije primljen na urgentno odeljenje francuske bolnice. Izolat je bio rezistentan na sve antibiotike sem COL i TYG. WGS analizom otkriveno je da je *A. baumannii* nosilac *blaOXA-66* gena (Dortet i sar., 2016). Zemlje u regionu publikovale su slične rezultate. Autori iz Hrvatske su u vreme bolničke epidemije od jula do oktobra 2008. godine u KBC Zagreb izolovali i analizirali 33 CRAB epidemijaska soja. Svi sojevi su bili nosioci *blaOXA-66* gena koji kodira urođenu karbapenemazu (Franolić-Kukina i sar., 2011). Još jedna hrvatska studija ispitala je molekularnu epidemiologiju 185 *A. baumannii* kliničkih izolata sakupljenih u 13 centara severne Hrvatske i Istre tokom 2009-2010. godine. Kod svih CRAB izolata koji su produkovali samo OXA-51 karbapenemazu otkrivena je i *ISAbal*. Sekvenciranjem *blaOXA-51* gena 14 reprezentativnih CRAB sojeva detektovali su *blaOXA-69* ili *blaOXA-107* alel kod izolata koji su produkovali samo OXA-51 enzim, dok su oni pozitivno testirani na stečene OXA enzime svi bili nosioci *blaOXA-66* varijante (Vranić-Ladavac i sar., 2014). Pournaras je sa saradnicima tokom 2015. godine analizirao 194 CRAB soja izolovana u 11 bolnica tercijarnog nivoa širom Grčke. CRAB izolati su dominantno bili nosioci *blaOXA-66* gena (80,9%), dok su sa manjom učestalošću detektovani *blaOXA-69* (18,6%) i *blaOXA-90* (0,5%) geni. Takođe je kod 22,7% CRAB sojeva detektovano istovremeno prisustvo *ISAbal* i *blaOXA-51* gena (Pournaras i sar., 2017). Slične rezultate publikovali su i istraživači sa Srednjeg istoka i iz Azije. Autori iz Saudijske Arabije su od 2008. do 2012. godine u sedam bolnica kod 65% testiranih CRAB izolata pronašli *blaOXA-66* varijantu (Al-Sultan i sar., 2015). Libanska studija sprovedena od 2011. do 2013. godine u sedam bolnica u Tripoliju je molekularnom tipizacijom 116 nerepetitivnih *A. baumannii* izolata *blaOXA-66* alel detektovala kod 62,9% sojeva (Rafei i sar., 2015). Chen i saradnici su analizom 101 *A. baumannii* soja iz dve univerzitetske bolnice u Šangaju izolovanih na neurohirurškoj (2011-2013. godina) i ginekološko-akušerskoj klinici (2015-2016. godina) kod svih sojeva pronašli *blaOXA-66* alel (Chen i sar., 2017). O globalnoj distribuciji *blaOXA-66* gena svedoči studija Zandera i saradnika. Ispitujući kolekciju od 492 imipenem rezistentna *A. baumannii* izolata poreklom iz 32 države iz SAD, Latinske Amerike, Evrope, Azije, Južne Afrike i Australije prikupljena u periodu od 2004. do 2010. godine za

tipizaciju su izabrali 102 izolata. Njihovom analizom je *blaOXA-66* gen detektovan u sojevima iz Evrope (Velika Britanija, Irska, Austrija, Italija, Poljska, Grčka, Portugal), Australije i Južne Afrike (Zander i sar., 2012).

Kod 222 CRAB klinička izolata testirana u našem istraživanju od gena koji kodiraju stečene OXA detektovani su *blaOXA-24* (44.2%) i *blaOXA-23* (34.5%) geni. Kod dva CRAB izolata detektovana su istovremeno oba gena koja kodiraju stečene oksacilinaze, *blaOXA-23* i *blaOXA-24*. Nismo pronašli CRAB izolate nosioce *blaOXA-58* gena. Prva opisana karbapenemaza, OXA-23 otkrivena je u kliničkom izolatu *A. baumannii* 1985. godine u Edinburgu (Perez i sar., 2007). Od tada su CRAB sojevi, nosioci *blaOXA-23* gena izolovani iz invazivnih i neinvazivnih kliničkih uzoraka pacijenata hospitalizovanih u jedinicama intenzivne nege u Kini, Brazilu, Belgiji, Bugarskoj, Južnoj Africi, Libiji, Iraku, Avganistanu, Vijetnamu, na Tajlandu i Tahitiju (Mugnier i sar., 2010). Za zemlje Mediterana do 2009. godine bila je značajna klonska propagacija *blaOXA-58* gena. Nakon toga se na Mediteranu (Alžir, Egipat, Tunis, Francuska, Španija, Italija, Turska, Grčka, Hrvatska) od svih OXA enzima najčešće detektuje OXA-23. Razlog ove promene može biti selektivni pritisak zbog snažnije hidrolitičke aktivnosti ili zamena gena rezistencije horizontalnim genskim transferom i njihova dalja klonska propagacija (Djahmi i sar., 2014). Za razliku od urođeno prisutne OXA-51 koja je kodirana genima sa hromozoma, stečene OXA-23, OXA-24/40 i OXA-58 karbapenemaze mogu biti kodirane i genima sa plazmida (Peleg i sar., 2008). Svi sekvencirani *blaOXA-23* geni u našoj studiji detektovani su kao *blaOXA-23* varijanta. Klonska propagacija *blaOXA-24/40* pozitivnih CRAB izolata ređa je u odnosu na *blaOXA-23* pozitivne sojeve (Peleg i sar., 2008). U odnosu na gorenavedene karbapenemaze struktura i funkcija OXA-24 enzima je poslednja opisana (Santillana i sar., 2007). Svi *blaOXA-24* geni sekvencirani u našem istraživanju identifikovani su kao *blaOXA-72* alel, koji se od izvornog *blaOXA-24* gena razlikuje u tome što kodira enzim sa varijacijom jedne aminokiseline. Za razliku od *blaOXA-23* pozitivnih CRAB izolata koji se sa najvećom učestalošću izoluju širom sveta (Mugnier i sar., 2010), CRAB sojevi nosioci *blaOXA-72* gena detektovani su u nekoliko zemalja Evrope, Azije i Latinske Amerike (Franolić-Kukina i sar., 2011; Kuo i sar., 2013; Levy-Blitchtein i sar., 2018; Majewski i sar., 2014; Povilonis i sar., 2013; Vasconcelos i sar., 2015). Rezultati naše studije saglasni su sa već pomenutim istraživanjem iz Beograda, Novović i saradnika, koji su među dvadeset osam CRAB sojeva izolovanih u periodu jun 2012.-februar 2014. godine kod dece hospitalizovane na Institutu za majku i dete "Dr. Vukan Čupić" od gena koji kodiraju stečene oksacilinaze sa najvećom učestalošću detektovali *blaOXA-24* (82,14%) i *blaOXA-23* (57,14%) gen. Za razliku od našeg istraživanja u kome *blaOXA-58* gen nije detektovan, ova studija je identifikovala 39,3% CRAB izolata nosilaca *blaOXA-58* gena što govori o potencijalnoj klonskoj propagaciji sojeva u pedijatrijskoj klinici. Sekvenciranje *blaOXA* gena nije rađeno (Novovic i sar., 2015). Sporadične izveštaje o *blaOXA* i *blaMBL* pozitivnim CRAB sojevima izolovanim u bolnicama zapadne Evrope kod pacijenata prethodno hospitalizovanih u bolnicama u Srbiji pronalazimo u rezultatima evropskih studija. U francuskoj studiji opisan je CRAB soj nosilac *blaOXA-72* gena izolovan iz urina pacijenta koji je prethodno hospitalizovan u Srbiji, a zatim je zbog urinarne infekcije primljen na urgentno odeljenje francuske bolnice (Dortet i sar., 2016). U zemljama u okruženju takođe se sa najvećom učestalošću detektuju CRAB klinički izolati nosioci *blaOXA-24* i/ili *blaOXA-23* gena. Tako je u Hrvatskoj u vreme bolničke epidemije od jula do oktobra 2008. godine u KBC Zagreb izolovano i analizirano 33 CRAB sojeva. Svi sojevi su bili nosioci *blaOXA-24* gena koji kodira stečenu OXA-24 karbapenemazu. Njihovim sekvenciranjem je detektovana *blaOXA-72* varijanta (Franolić-Kukina i sar., 2011). Strateva i saradnici su

analizom 226 CRAB izolata sakupljenih od 2014. do 2016. godine u četiri univerzitetske bolnice u Bugarskoj najčešće detektovali *blaOXA-24* (46,7%) i *blaOXA-23* (26,1%) gene, dok je *blaOXA-58* gen detektovan samo u jednom izolatu (0,4%) (Strateva i sar., 2019). Grčki autori su analizirali 194 reprezentativna CRAB soja izolovana u multicentričnoj studiji koja je obuhvatila 11 bolnica širom Grčke tokom 2015. godine. Sa najvećom učestalošću je identifikovan *blaOXA-23* gen kod 188 izolata (96,9%), dok je tri izolata bilo pozitivno na *blaOXA-23* i *blaOXA-58* gen (1,5%), kod dva izolata je detektovan samo *blaOXA-58* gen (1,0%) i kod jednog *blaOXA-24* gen (0,5%) (Pournaras i sar., 2017). U italijanskoj multicentričnoj studiji u kojoj je učestvovalo 25 kliničkih mikrobioloških laboratorija iz 23 grada širom Italije tokom 2011. godine izolovano je 246 CRAB kliničkih izolata. Kod 81,7% sojeva detektovan je *blaOXA-23*, a kod 4,5% *blaOXA-58* gen (Principe i sar., 2014). OXA-58 pozitivan CRAB prvi put je opisan kao uzrok bolničke epidemije na klinici za opekotine u Tuluzu 2003. godine (Poirel i Nordmann, 2006). U narednim godinama beleži se njegova klonska propagacija širom sveta, da bi od 2009. godine bio postepeno zamenjen OXA-23 ili OXA-24 produkujućim *A. baumannii* sojevima (Djahmi i sar., 2014; Mugnier i sar., 2010). Rezultati gorenavedenih studija iz naše regije u saglasnosti su sa istraživanjima iz drugih geografskih područja koja svedoče o internacionalnoj klonskoj zameni CRAB kliničkih izolata nosilaca *blaOXA-58* gena CRAB sojevima pozitivnim na *blaOXA-24* ili *blaOXA-23* gene. U SAD Adams-Haduch i saradnici su analizirali 65 reprezentativnih CRAB sojeva izolovanih tokom 2009. godine u bolnicama u Njujorku, Pensilvaniji, Misuriju, Nevadi, Kaliforniji i Floridi. Najveći broj CRAB izolata, njih 27 (42%) bio je pozitivno na *blaOXA-23* gen, dok je kod devet izolata (14%) detektovan *blaOXA-24* gen. Ni jedan CRAB soj nije bio nosilac *blaOXA-58* gena. Nakon sekvenciranja kod svih *blaOXA-23* pozitivnih izolata je detektovan *blaOXA-23* alel, dok je kod sedam *blaOXA-24* pozitivnih izolata detektovana *blaOXA-72* varijanta, a dva izolata su zadržala izvorni *blaOXA-24* gen (Adams-Haduch i sar. 2011). U meksičkoj studiji izolovano je u opštoj bolnici 112 *A. baumannii* bolničkih sojeva tokom 2014. godine. Kao jedini gen koji kodira stečene OXA detektovan je *blaOXA-72* alel kod 95% izolata (Rosales-Reyes i sar., 2017). Autori iz Perua su analizom 80 *A. baumannii* sojeva izolovanih od februara 2014. do aprila 2016. godine u dve tercijarne bolnice kod 80,1% izolata detektovali *blaOXA-72*, a kod 12,5% *blaOXA-23* alel (Levy-Blitchtein i sar., 2018). U brazilskoj multicentričnoj studiji koja je obuhvatila devet tercijarnih bolnica širom Brazila analizirani su uzročnici bolničkih infekcija izolovani od aprila do avgusta 2014. godine. Identifikovano je 46 *A. baumannii* nerepetitivnih sojeva, među kojima je 69,6% bilo pozitivno na *blaOXA-23*, a 21,7% na *blaOXA-72* alel (Vasconcelos i sar., 2015). Ni u jednoj od prethodno navedenih studija iz Severne i Latinske Amerike nisu detektovani *A. baumannii* klinički izolati nosioci *blaOXA-58* gena. Autori iz Azije publikuju slične podatke. Tako su Kuo i saradnici analizom 142 IMP rezistentna *A. baumannii* soja izolovana od juna do septembra 2007. u deset univerzitetskih bolnica na Tajvanu kod 27 (19%) izolata detektovali *blaOXA-72* alel lociran na plazmidu. Ni jedan soj nije bio nosilac *blaOXA-23* ili *blaOXA-58* gena (Kuo i sar., 2013). U vijetnamskoj studiji testirano je 582 CRAB kliničkih izolata sakupljenih u tri bolnice u Vijetnamu u periodu od avgusta 2010. do decembra 2014. godine. Kod 550 (98,4%) sojeva detektovan je *blaOXA-23*, a samo kod dva izolata (0,35%) *blaOXA-58* gen (Tran i sar., 2017). Autori iz Kine su analizom 101 *A. baumannii* soja izolovanog od 2011. do 2016. godine u dve bolnice u Šangaju kod 61 (60,4%) pronašli *blaOXA-23* gen, dok *blaOXA-58* i *blaOXA-24* geni nisu otkriveni (Chen i sar., 2017).

Jedini gen koji kodira MBL detektovan u ovoj studiji bio je *blaNDM* gen, koji je otkriven kod sedam CRAB izolata (3,2%). Svi *blaNDM* pozitivni CRAB sojevi izolovani su u

dve tercijarne ustanove u Beogradu (KBC Bežanijska Kosa) i Nišu (KC Niš). Sekvenciranjem je kod svih sedam *blaNDM* gena nađena *blaNDM-1* varijanta. Takođe, svi *blaNDM* pozitivni CRAB izolati bili su u isto vreme i nosioci *blaOXA-24* gena. Ni kod jednog CRAB izolata nisu otkriveni *blaIMP*, *blaVIM*, *blaGIM*, *blaSPM* i *blaSIM* geni. Poznato je već da se karbapenemaze iz MBL klase kod *A. baumannii* detektuju znatno ređe nego OXA enzimi (Peleg i sar., 2008). Prva MBL detektovana u *A. baumannii* izolatu bila je IMP-2 u Italiji 2000. godine (Djahmi i sar., 2014). Od tada se IMP, VIM i SIM karbapenemaze sporadično javljaju u kliničkim izolatima *A. baumannii* (IMP-1 u Italiji, Japanu, Južnoj Koreji; IMP-2 u Italiji i Japanu; IMP-4 u Hong Kongu; IMP-5 u Portugalu; IMP-6 u Brazilu; IMP-11 u Japanu; VIM-2 i SIM-1 u Južnoj Koreji) (Poirel i Nordmann, 2006). U Španiji, Grčkoj, Singapuru i Australiji beleži se istovremeno prisustvo *blaOXA* i *blaMBL* gena u istim sojevima *A. baumannii* (Peleg i sar., 2008). Prva zabeležena bolnička epidemija uzrokovana *blaNDM-1* pozitivnim CRAB u Evropi opisana u Francuskoj 2013. godine. Nulti pacijent je primljen u jedinicu intenzivne nege iz Alžira i potom je inficirao još pet pacijenata. Svi izolati su pripadali istoj klonskoj liniji i posedovali isti tip sekvence, ST85 (Decousser i sar., 2013). Slična situacija opisana je u jedinici intenzivne nege bolnice u Češkoj Republici 2011. godine pošto je njihov državljani hospitalizovan posle boravka na bolničkom lečenju u Egiptu. Pacijent je razvio VAP, a iz BAL-a je izolovan *blaNDM-1* pozitivan *A. baumannii*. Šest dana kasnije *blaNDM-1* pozitivan *A. baumannii* izolovan je iz respiratornog uzorka drugog pacijenta na asistiranoj ventilaciji koji je boravio u istoj sobi. Posle odrađene tipizacije zaključeno je da se radi o istom soju, osetljivom samo na kolistin, istog PFGE profila i istog MLST profila, ST1 (Hrabák i sar., 2012). U poslednjoj deceniji klinički izolati *A. baumannii* produktori NDM enzima detektuju se širom sveta. CRAB nosioc *blaNDM-1* gena postao je preteći patogen u bolnicama Evrope, Azije, Srednjeg istoka, Severne Afrike i Latinske Amerike (Adams i sar., 2020; Bonnin i sar., 2012; Chen i sar., 2011; El-Sayed-Ahmed i sar., 2015; Rafei i sar., 2015; Tran i sar., 2017). Suprotno našem istraživanju, u prethodnoj studiji iz Republike Srbije koja se bavila molekularnom analizom 28 CRAB bolničkih sojeva izolovanih od juna 2012. do februara 2014. godine u pedijatrijskoj bolnici u Beogradu, ni jedan CRAB izolat nije bio nosilac *blaNDM-1* gena (Novovic i sar., 2015). Takođe, nisu detektovani ni *blaIMP* i *blaVIM* geni (Novovic i sar., 2015). U saglasnosti sa našom studijom su i publikacije autora iz Evrope, koje govore o tome da bi naša zemlja mogla biti endemsko područje za CRAB kliničke izolate nosioce *blaNDM-1* gena. U nemačkoj bolnici 2007. godine iz trahealnog aspirata, brisa rane i brisa grafta izolovan je *A. baumannii* osetljiv samo na kolistin kod pacijenta sa infekcijom femorokruralnog dakronskog bajpasa. Pacijent je prethodno bolnički lečen u našoj zemlji. Daljom analizom otkriveno je da je *A. baumannii* soj NDM-1 produktor (Göttig i sar., 2010; Pfeifer i sar., 2011). Takođe je u švajcarskoj bolnici 2010. godine izolovan *A. baumannii* soj nosilac *blaNDM-1* gena iz rektalnog brisa pacijenta iz Srbije (Bonnin i sar., 2012). U studijama autora iz regiona takođe nisu detektovani CRAB izolati nosioci *blaMBL* gena. Analizom 33 CRAB soja izolovana u toku bolničke epidemije od jula do oktobra 2008. godine u KBC Zagreb ni kod jednog od njih nije detektovan *blaIMP*, *blaVIM*, *blaGIM*, *blaSPM* i *blaSIM* gen (Franolić-Kukina i sar., 2011). Podatke o nosilaštvu *blaNDM* gena nemamo pošto on nije bio obuhvaćen gorenavedenim ispitivanjem. Ni u drugoj hrvatskoj studiji koja je ispitivala molekularnu epidemiologiju 185 *A. baumannii* kliničkih izolata sakupljenih u 13 centara severne Hrvatske i Istre tokom 2009-2010. godine nisu detektovani CRAB sojevi nosioci *blaIMP*, *blaVIM*, *blaSIM* i *blaNDM* gena (Vranić-Ladavac i sar., 2014). D'Onofrio i saradnici su radili WGS analizu sedam COL rezistentnih *A. baumannii* sojeva izolovanih tokom 2018. godine u univerzitetškoj bolnici u

Osjeku i jednog koji je izolovan tokom 2017. godine u opštoj bolnici u Puli. Ni kod jednog nije detektovan *blaIMP*, *blaVIM* i *blaNDM* gen (D'Onofrio i sar., 2020). Bugarski autori analizom 226 CRAB izolata sakupljenih od 2014. do 2016. godine u četiri univerzitetske bolnice u Bugarskoj nisu otkrili prisustvo *blaIMP*, *blaVIM* i *blaNDM* gena (Strateva i sar., 2019). Ni grčki autori koji su analizirali 194 reprezentativna CRAB soja izolovana u multicentričnoj studiji koja je obuhvatila 11 bolnica širom Grčke tokom 2015. godine nisu među izolatima otkrili prisustvo *blaIMP*, *blaVIM* i *blaNDM* gena (Pournaras i sar., 2017). Isti je i rezultat italijanske multicentrične studije sprovedene u 25 kliničkih mikrobioloških laboratorija iz 23 grada širom Italije tokom 2011. godine kada ni jedan od 246 CRAB kliničkih izolata nije bio nosilac *blaIMP*, *blaVIM*, *blaGIM*, *blaNDM* i *blaSIM* gena (Principe i sar., 2014). Endemska područja CRAB kliničkih izolata nosilaca *blaNDM* gena su zemlje Azije, Srednjeg istoka, Severne Afrike i Latinske Amerike (Adams i sar., 2020; Benamrouche i sar., 2020; Chen i sar., 2011; El-Sayed-Ahmed i sar., 2015; Karthikeyan i sar., 2010; Rafei i sar., 2015; Tran i sar., 2017). U velikoj kineskoj studiji koja je obuhvatila 57 bolnica u 18 provincija od januara 2009. do septembra 2010. godine sakupljeno je i analizirano 2109 *A. baumannii* izolata. Samo četiri CRAB izolata su bila pozitivna na *blaNDM-1* gen. Ni jedan nije bio nosilac *blaOXA* gena koji kodiraju stečene oksacilinaze. Zanimljivo je da su sva četiri soja izolovana u različitim provincijama i da su imala različite PFGE profile (Chen i sar., 2011). Autori iz Vijetnama analizirali su 582 CRAB izolata sakupljena u tri bolnice u Vijetnamu u periodu od avgusta 2010. do decembra 2014. godine. Kod 23 (4%) soja detektovan je *blaNDM-1* gen. CRAB izolati produktori NDM-1 enzima bili su raspoređeni u sve tri bolnice. Takođe je 18 izolata imalo kombinaciju *blaNDM-1* i *blaOXA* gena [sedam izolata: *blaNDM-1/blaIMP-1/blaOXA-58*; jedan izolat: *blaNDM-1/OXA-23/blaOXA-58*; osam izolata: *blaNDM-1/blaOXA-58*; dva izolata: *blaNDM-1/blaOXA-23*] (Tran i sar., 2017). Indijski autori publikovali su podatke o tri *blaNDM-1* pozitivna CRAB soja izolovana aprila 2010. godine kod pacijenata hospitalizovanih u jedinici intenzivne nege u terciarnoj bolnici u Indiji. Kod sva tri izolata je istovremeno detektovan i *blaOXA-23* gen (Karthikeyan i sar., 2010). Libanska studija sprovedena od 2011. do 2013. godine u sedam bolnica u Tripoliju je analizom 70 CRAB izolata kod njih pet (7,1%) detektovala *blaNDM-1* gen. Ovi sojevi nisu bili pozitivni na *blaOXA* gene koji kodiraju stečene oksacilinaze. Četiri soja su izolovana kod hospitalizovanih migranata iz Sirije, a jedan kod pacijenta iz Libana (Rafei i sar., 2015). Autori iz Egipta su analizom 150 nerepetitivnih *A. baumannii* sojeva izolovanih od jula 2012. do septembra 2013. u tri egipatske bolnice (jedna u Aleksandriji i dve u Kairu) kod 59 (39,3%) izolata detektovali *blaNDM-1* gen. Kod 53 (35,3%) njih otkrivena je kombinacija *blaNDM-1* i *blaOXA-23* gena (El-Sayed-Ahmed i sar., 2015). U multicentričnoj studiji sprovedenoj u devet bolnica u Alžiru od januara 2012. do decembra 2016. godine sakupljeno je i analizirano 92 *A. baumannii* klinička izolata. Kod njih 5 (5,4%) detektovan je *blaNDM-1* gen (Benamrouche i sar., 2020). Nacionalna referentna laboratorija iz Argentine je od 2010. do 2015. godine radeći skrining nad CRAB kliničkim sojevima izolovanim u 19 bolnica raspoređenih u devet gradova i sedam provincija Argentine *blaNDM-1* gen detektovala kod 33 CRAB izolata (Adams i sar., 2020). Za razliku od gorenavedenih regija koje su endemska područja za CRAB kliničke izolate nosioce *blaNDM-1* gena, autori iz Evrope u svojim studijama izveštavaju o pojedinačnim slučajevima importovanim iz endemskih područja. Tako su Bonnin i saradnici sekvenciranjem *blaNDM* gena detektovanih kod CRAB sojeva izolovanih u nekoliko evropskih bolnica (Švajcarska, Slovenija, Nemačka i Francuska) pronašli *blaNDM-1* varijantu. CRAB soj iz Švajcarske izolovan je 2010. godine iz rektalnog brisa pacijenta iz Srbije. U bolnici u Nemačkoj je 2007. CRAB izolovan iz respiratornog uzorka i sa kože pacijenta koji je takođe prethodno

hospitalizovan u Srbiji. U bolnici u Sloveniji je 2008. izolovan CRAB iz respiratornog uzorka. U Francuskoj je 2011. izolovan CRAB iz rektalnog brisa pacijenta iz Alžira (Bonnin et al., 2012). Bogaerts i saradnici su prikazali slučaj pacijenta koji je zbog politraume hospitalizovan 2011. godine u Alžiru a zatim je zbog neuspešnog lečenja prebačen u jedinicu intenzivne nege belgijske bolnice. Pri redovnom skriningu iz uzorka rektalnog brisa izolovan je CRAB za koji se daljom analizom utvrdilo da je nosilac *bla*NDM-1 gena (Bogaerts i sar., 2012). Boulanger i saradnici opisuju slučaj pacijenta koji je 2011. godine zbog kranijalne traume nakon boravka u jedinici intenzivne nege u Alžiru prebačen na dalje lečenje u francusku bolnicu. Na prijemu mu je iz rektalnog brisa i CVK izolovan CRAB nosilac *bla*NDM-1 gena (Boulanger i sar., 2012). Sličan prikaz slučaja deteta iz Nemačke koje je na odmoru u Egiptu hospitalizovano zbog kranocerebralne povrede u jedinicama intenzivne nege dve bolnice u Kairu i neuspeha lečenja prebačeno u nemačku bolnicu objavili su i nemački autori. Iz CVK plasiranog u egipatskoj bolnici izolovan je CRAB nosilac *bla*NDM gena. Sekvenciranjem *bla*NDM gena zaključeno je da u odnosu na *bla*NDM-1 varijantu postoji razlika u jednoj aminokiselini (supstitucija prolina alaninom), pa je isti nazvan *bla*NDM-2 varijantom (Kaase i sar., 2011).

Kako je u poslednje tri decenije rastao klinički značaj infekcija izazvanih *A. baumannii*, populacionim studijama metodama genotipizacije u bolnicama širom Evrope prvobitno su otkrivena tri dominantna klona, nazvana EC I-III. Bakterijski klonovi su bili odgovorni za pojavu epidemija u bolnicama, a pripadnici EC I i EC II su bili MDR izolati *A. baumannii*. Kako je ubrzo pojava sva tri klona zabeležena u bolnicama širom sveta, preimenovani su u IC. Danas su CRAB izolati pripadnici sva tri IC, a zbog niske inicijalne filogenetske raznolikosti *A. baumannii* brzo se razvijaju i šire novi IC (Diancourt i sar., 2010; Peleg i sar., 2008).

Našom studijom dobijena je dobra korelacija između MLST rezultata i PFGE klasterovanja reprezentativnih CRAB izolata porekla svih devet bolnica obuhvaćenih studijom. U prilog verovatnoj transmisiji CRAB klonova među različitim bolnicama sekundarnog i tercijarnog nivoa u Republici Srbiji govori činjenica da je većina PFGE profila ravnomerno distribuirana širom zemlje, u bolnicama u Vojvodini, Beogradu i Južnoj Srbiji. Sličnost PFGE profila testiranih CRAB izolata kretala se u intervalu od 70 do 99%. Takođe, rezultati dobijeni genotipizacijom Pasterovom MLST analizom svedoče o tome da nekoliko genotipova cirkuliše u našim bolnicama: ST636, još uvek klonski neopredeljen, zajedno sa pripadnicima IC II (ST2 i ST492). Sva tri ST su ravnomerno raspoređena po bolnicama i regionima (Vojvodina, Beograd i Južna Srbija). Na osnovu identifikovanih genetičkih determinanti i filogenetske analize CRAB izolata, zaključak je da su cirkulišući klonovi u bolnicama sekundarnog i tercijarnog nivoa u Republici Srbiji sledeći: *bla*OXA-66/*bla*OXA-23/ST2 (32,4%), *bla*OXA-66/*bla*OXA-23/*bla*OXA-72/ST2 (2,7%), *bla*OXA-66/*bla*OXA-72/ST492 (37,8%) i *bla*OXA-66/*bla*OXA-72/ST636 (27,1%).

U saglasnosti sa našim istraživanjem su i rezultati drugih autora koji svedoče o globalnoj distribuciji IC II, posebno u regiji Mediterana (Karah i sar., 2012; Zarrilli i sar., 2013). Takođe, brojne studije izveštavaju o izolaciji CRAB bolničkih sojeva pripadnika ST2/IC II nosioca *bla*OXA-23 gena u bolnicama Evrope, SAD i Severne Afrike. U našem okruženju slične rezultate publikovali su autori iz Grčke i Italije. Pournaras i saradnici su analizirali 194 reprezentativna CRAB soja izolovana u multicentričnoj studiji koja je obuhvatila 11 bolnica širom Grčke tokom 2015. godine. Sa najvećom učestalošću je identifikovan *bla*OXA-23 gen kod 188 izolata (96,9%). CRAB izolata pripadnika ST2/IC II nosioca *bla*OXA-23 gena bilo je 157 (80,9%), dok je članova ST1/IC I bilo 36 (18,6%), a jedan izolat sa ST78 bio je klonski neopredeljen (Pournaras i sar., 2017). U italijanskoj multicentričnoj studiji u kojoj je učestvovalo

25 kliničkih mikrobioloških laboratorija iz 23 grada širom Italije tokom 2011. godine izolovano je 246 CRAB kliničkih izolata. Kod 81,7% sojeva detektovan je *blaOXA-23* gen. MLST analizom nađena je dominantna klonska linija ST2/IC II nosilaca *blaOXA-23* gena. Samo tri izolata su imala ST78 i bila klonski neopredeljena (Principe i sar., 2014). Sličan rezultat publikovali su i litvanski autori. Analizom 34 invazivna CRAB izolata sakupljena od maja 2008. do decembra 2009. godine u pet bolnica u Litvaniji zaključili su da su svi sojevi bili nosioci *blaOXA-23* gena i pripadnici ST2/IC II (Saule i sar., 2013). Autori iz Tunisa su analizom 25 CRAB sojeva izolovanih od februara 2013. do marta 2016. godine na tunižanskoj ortopedskoj klinici 14 (56%) sojeva genotipizacijom svrstali u *blaOXA-23*/ST2 cirkulišući klon, član IC II (Mathlouthi i sar., 2018). U SAD Adams-Haduch i saradnici su analizirali 65 reprezentativnih CRAB sojeva izolovanih tokom 2009. godine u bolnicama u šest saveznih država. Najveći broj CRAB izolata, njih 27 (42%) bio je pozitivno na *blaOXA-23* gen. Sa najvećom učestalošću detektovani su CRAB sojevi nosioci *blaOXA-23* gena, pripadnici ST2/IC II (Adams-Haduch i sar. 2011). Suprotno gorenavedenom cirkulišućem klonu, klonski nedeterminisani ST636 CRAB klinički izolati nosioci *blaOXA-72* gena izolovani su sporadično kod pacijenata u Švedskoj, Nemačkoj i Libanu. Karah i saradnici su WGS analizom CRAB soja izolovanog novembra 2013. godine iz bronhijalnog sekreta pacijenta hospitalizovanog u Stokholmu detektovali *blaOXA-66* i *blaOXA-72* alel. MLST analizom je izolatu dodeljen ST636, koji nije pripadnik ni jednog do sada definisanog IC (Karah i sar., 2016). Al Atrouni i saradnici su u svom istraživanju opisali CRAB soj izolovan 2015. iz sadržaja rane pacijenta hospitalizovanog u bolnici u Libanu. CRAB izolat je bio nosilac *blaOXA-24* gena i dodeljen mu je ST636 (Al Atrouni i sar., 2016). Nemački autori su WGS analizom CRAB soja izolovanog 2015. godine kod ruskog pacijenta na bolničkom lečenju u Nemačkoj detektovali *blaOXA-66* i *blaOXA-24* gene. MLST analizom mu je dodeljen ST636 (Eigenbrod i sar., 2019).

Na kraju, rezultati ove studije svedoče o tome da je naša zemlja potencijalni rezervoar CRAB bolničkih sojeva nosilaca *blaOXA-72* i *blaNDM-1* gena, pripadnika ST492/ICII cirkulišuće klonske linije. Osim našeg istraživanja CRAB izolat pomenutih karakteristika opisan je samo u još jednom prikazu slučaja. Dortet je sa saradnicima analizirao *A. baumannii* soj izolovan iz urina pacijenta kome je zbog retencije urina aplikovan kateter u bolnici u Srbiji, a zatim je zbog urinarne infekcije primljen na urgentno odeljenje francuske bolnice. Izolat je bio rezistentan na sve antibiotike sem COL i TYG. WGS analizom otkriveno je da je *A. baumannii* nosilac *blaOXA-72* gena, a MLST je pokazao pripadnost ST492 i EC II (Dortet i sar., 2016).

Naše istraživanje predstavlja prvu nacionalnu multicentričnu studiju koja se bavila molekularnom epidemiologijom CRAB izolata u bolnicama u Republici Srbiji. Dobijeni rezultati predstavljaju epidemiološku bazu podataka, na osnovu kojih bi se dalje mogle pratiti promene učestalosti rezistencije *A. baumannii* na antibiotike, kao i promene u klonskoj strukturi CRAB kliničkih sojeva u našoj zemlji.

Epidemiološki nadzor nad infekcijama izazvanim vrstom *A. baumannii* sprovodi se kontinuirano u razvijenim zemljama. Nadzor obuhvata praćenje nekoliko epidemioloških markera *A. baumannii* uključujući praćenje incidencije i prevalencije obolevanja, praćenje cirkulacije rezistentnih klonova, detekciju mehanizama rezistencije na antibiotike i određivanje distribucije gena koji determinišu rezistenciju na antibakterijske agense.

Iako u Srbiji ne postoji kontinuirano praćenje bolničkih infekcija izazvanih *A. baumannii*, naši rezultati ukazuju da je učestalost rezistencije kliničkih izolata *A. baumannii* na karbapeneme, aminoglikozide i fluorohinolone slična onoj koju izveštavaju zemlje u regionu. Ipak, za unapređenje mera prevencije, dijagnostičkih procedura i terapijskih opcija neophodno je

uvođenje aktivnog nadzora nad *A. baumannii* infekcijama. O neophodnosti aktivnog nadzora nad bolničkim infekcijama i uvođenju redovnog skrininga novoprimljenih pacijenata govore podaci našeg istraživanja o verovatnoj transmisiji CRAB klonova među različitim bolnicama sekundarnog i tercijarnog nivoa u Republici Srbiji. Većina PFGE profila i MLST genotipova ravnomerno je distribuirana širom zemlje, u bolnicama u Vojvodini, Beogradu i Južnoj Srbiji.

Rezultati ove studije mogu poslužiti kao osnov za buduća istraživanja promene trendova rezistencije *A. baumannii* na lekove kao i molekularne epidemiologije bolničkih izolata. Visoka prevalencija rezistencije *A. baumannii* na antibiotike i njegova klonska propagacija govore o neophodnosti striktnog sprovođenja mera prevencije bolničkih infekcija, posebno onih koje se odnose na smanjenje transmisije *A. baumannii* u bolničkoj sredini.

6. Zaključci

Na osnovu dobijenih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Od svih testiranih kliničkih izolata Acb kompleksa kao uzročnik infekcije najčešće je identifikovan *A. baumannii* (84,6%)
- *A. baumannii* je najčešće izolovan kod pacijenata hospitalizovanih u jedinicama intenzivne nege (39,6%). Što se vrste kliničkog materijala tiče, najčešće je izolovan iz uzoraka donjih partija respiratornog sistema (37,6%), sadržaja rana (36,7%) i uzoraka krvi (11,8%). Najčešći faktori rizika za razvoj infekcije bili su diabetes melitus (23,2%) i hiruške procedure (46,8%).
- Prevalencija CRAB izolata iznosila je 93,7%. Klinički izolati *A. baumannii* ispoljili su umerene nivoe rezistencije na AMS (59,1%) i TOB (68,8%). Najviši nivo rezistencije detektovan je za lekove poslednje linije, COL (4,3%) i TYG (24,9%).
- Učestalost rezistencije *A. baumannii* na sve testirane antibiotike bila je veća za sojeve izolovane kod pacijenata hospitalizovanih u jedinicama intenzivne nege u odnosu na ostala odeljenja, sa statističkom značajnošću za AMS, IMP i MER ($P < 0,05$). Iako je zabeležena geografska/regionalna razlika u rezistenciji *A. baumannii* izolata na karbapeneme (Vojvodina - 91,5%; Beograd - 87,5%; Južna Srbija - 96,3%), ona nije bila statistički značajna ($P > 0,05$).
- MDR fenotip detektovan je kod 203 (85,6%) *A. baumannii* izolata, XDR kod 95 (40%), dok je deset izolata (4,3%) klasifikovano kao PDR. MDR, XDR i PDR sojevi su češće izolovani kod pacijenata hospitalizovanih u jedinicama intenzivne nege, u odnosu na ostala odeljenja. MDR i XDR izolati su izolovani i u bolnicama sekundarnog i tercijarnog nivoa, dok su PDR *A. baumannii* sojevi izolovani samo u bolnicama tercijarnog nivoa.
- Kod svih 237 *A. baumannii* izolata detektovan je *blaOXA-51* gen koji kodira urođeno prisutnu, odnosno intrinzičnu OXA-51 karbapenemazu.
- Od ukupno testiranih 222 CRAB sojeva, kod 98 izolata (44,2%) detektovan je *blaOXA-24*, a kod 76 izolata (34,5%) *blaOXA-23* gen. Kod dva CRAB izolata detektovana su istovremeno oba gena koja kodiraju stečene oksacilinaze, *blaOXA-23* i *blaOXA-24*.
- Jedini gen koji kodira MBL detektovan u ovoj studiji bio je *blaNDM-1* gen, koji je detektovan kod sedam CRAB izolata, u Beogradu i Nišu. Takođe, svi *blaNDM* pozitivni CRAB izolati bili su u isto vreme i nosioci *blaOXA-24* gena.
- Cirkulišući klonovi u bolnicama sekundarnog i tercijarnog nivoa u Republici Srbiji su sledeći: *blaOXA-66/blaOXA-23/ST2* (32,4%), *blaOXA-66/blaOXA-23/blaOXA-72/ST2* (2,7%), *blaOXA-66/blaOXA-72/ST492* (37,8%) i *blaOXA-66/blaOXA-72/ST636* (27,1%).

7. Literatūra

1. Adams MD, Pasteran F, Traglia GM, Martinez J, Huang F, Liu C, Fernandez JS, Lopez C, Gonzalez LJ, Albornoz E, Corso A, Vila AJ, Bonomo RA, Ramirez MS. Distinct Mechanisms of Dissemination of NDM-1 Metallo- β -Lactamase in *Acinetobacter species* in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020 Apr 21;64(5):e00324-20.
2. Adams-Haduch JM, Onuoha EO, Bogdanovich T, Tian GB, Marschall J, Urban CM, Spellberg BJ, Rhee D, Halstead DC, Pasculle AW, Doi Y. Molecular epidemiology of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. *J Clin Microbiol*. 2011;49:3849-3854.
3. Al Atrouni A, Hamze M, Jisr T, Lemarié C, Eveillard M, Joly-Guillou ML, Kempf M. Wide spread of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to clonal complex II in different hospitals in Lebanon. *Int J Infect Dis*. 2016 Nov;52:29-36.
4. Al-Sultan AA, Evans BA, Aboulmagd E, Al-Qahtani AA, Bohol MF, Al-Ahdal MN, Opazo AF, Amyes SG. Dissemination of multiple carbapenem-resistant clones of *Acinetobacter baumannii* in the Eastern District of Saudi Arabia. *Front Microbiol*. 2015 Jul 2;6:634.
5. Apisarnthanarak A, Mundy LM. Mortality associated with Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in Thailand. *Am J Infect Control*. 2009 Aug;37(6):519-20.
6. Ayoub Moubareck C, Hammoudi Halat D. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. *Antibiotics (Basel)*. 2020 Mar 12;9(3):119.
7. Azimi L, Talebi M, Pourshafie MR, Owlia P, Rastegar Lari A. Characterization of Carbapenemases in Extensively Drug Resistance *Acinetobacter baumannii* in a Burn Care Center in Iran. *Int J Mol Cell Med*. 2015 Winter;4(1):46-53.
8. Badmasti F, Ajdary S, Bouzari S, Fooladi AA, Shahcheraghi F, Siadat SD. Immunological evaluation of OMV(PagL)+Bap(1-487aa) and AbOmpA(8-346aa)+Bap(1-487aa) as vaccine candidates against *Acinetobacter baumannii* sepsis infection. *Mol Immunol*. 2015 Oct;67(2 Pt B):552-8.
9. Banerjee T, Mishra A, Das A, Sharma S, Barman H, Yadav G. High prevalence and Endemicity of multidrug resistant *Acinetobacter spp.* in intensive care unit of a tertiary care hospital, Varanasi, India. *J Pathog*. 2018;2018:9129083.
10. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012 May;19(5):455-77.
11. 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.
12. Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J Bacteriol*. 1968 May; 95(5):1520-41.
13. Beijerinck M. Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. *Versl Koninklijke Akad Wetensch*. Amsterdam 1911; 19:1092–1103.
14. Benamrouche N, Lafer O, Benmahdi L, Benslimani A, Amhis W, Ammari H, Assaous F, Azzam A, Rahal K, Tali Maamar H. Phenotypic and genotypic characterization of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in Algerian hospitals. *J Infect Dev Ctries*. 2020 Dec 31;14(12):1395-1401.

15. Berlau J, Aucken H, Malnick H, Pitt T. Distribution of *Acinetobacter species* on skin of healthy humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999 Mar;18(3):179-83.
16. Bogaerts P, Naas T, El Garch F, Cuzon G, Deplano A, Delaire T, Huang TD, Lissoir B, Nordmann P, Glupczynski Y. GES extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Nov;54(11):4872-8.
17. Bogaerts P, Rezende de Castro R, Roisin S, Deplano A, Huang TD, Hallin M, Denis O, Glupczynski Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Jun;67(6):1552-3.
18. Bonnin RA, Nordmann P, Potron A, Lecuyer H, Zahar JR, Poirel L. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jan;55(1):349-54.
19. Bonnin RA, Poirel L, Naas T, Pirs M, Seme K, Schrenzel J, Nordmann P. Dissemination of New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Sep;18(9):E362-5.
20. Boulanger A, Naas T, Fortineau N, Figueiredo S, Nordmann P. NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Apr;56(4):2214-5.
21. Bouvet PJ, Grimont PA. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann Inst Pasteur Microbiol*. 1987 Sep-Oct;138(5):569-78.
22. Bouvet PJ, Grimont PA. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov., and emended description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int J Syst Bacteriol*. 1986; 36:228–240.
23. Brisou J, Prevot AR. Etudes de systématique bactérienne. X. Révision des especes réunies dans le genre *Achromobacter* [Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Achromobacter* group]. *Ann Inst Pasteur (Paris)*. 1954;86(6):722-728.
24. Brown S, Young HK, Amyes SG. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect*. 2005 Jan;11(1):15-23.
25. Bulens SN, Yi SH, Walters MS, Jacob JT, Bower C, Reno J, Wilson L, Vaeth E, Bamberg W, Janelle SJ, Lynfield R, Vagnone PS, Shaw K, Kainer M, Muleta D, Mounsey J, Dumyati G, Concannon C, Beldavs Z, Cassidy PM, Phipps EC, Kenslow N, Hancock EB, Kallen AJ. Carbapenem-Nonsusceptible *Acinetobacter baumannii*, 8 US Metropolitan Areas, 2012-2015. *Emerg Infect Dis*. 2018 Apr;24(4):727-734.
26. CAESAR, 2019. Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance - Annual report 2019. World Health Organization Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.
27. CAESAR, 2018. Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance - Annual report 2018. World Health Organization Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.
28. CAESAR, 2017. Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance - Annual report 2017. World Health Organization Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.

29. CAESAR, 2016. Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance - Annual report 2016. World Health Organization Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.
30. CAESAR, 2014. Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance - Annual report 2014. World Health Organization Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.
31. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019.
32. Chen Y, Gao J, Zhang H, Ying C. Spread of the *bla*_{OXA-23}-Containing Tn2008 in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates Grouped in CC92 from China. *Front Microbiol.* 2017 Feb 6;8:163.
33. Chen L, Yang J, Yu J, Yao Z, Sun L, Shen Y, Jin Q. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jan 1;33(Database issue):D325-8.
34. Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, Yu Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Jun;66(6):1255-9.
35. Choi CH, Hyun SH, Lee JY, Lee JS, Lee YS, Kim SA, Chae JP, Yoo SM, Lee JC. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cell Microbiol.* 2008 Feb;10(2):309-19.
36. Chu YW, Leung CM, Houang ET, Ng KC, Leung CB, Leung HY, Cheng AF. Skin carriage of acinetobacters in Hong Kong. *J Clin Microbiol.* 1999 Sep;37(9):2962-7.
37. Chuang YY, Huang YC, Lin CH, Su LH, Wu CT. Epidemiological investigation after hospitalising a case with pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *J Hosp Infect.* 2009 May;72(1):30-5.
38. Čiginskienė A, Dambrauskienė A, Rello J, Adukauskienė D. Ventilator-Associated Pneumonia due to Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*: Risk Factors and Mortality Relation with Resistance Profiles, and Independent Predictors of In-Hospital Mortality. *Medicina (Kaunas).* 2019 Feb 13;55(2):49.
39. Cisneros JM, Reyes MJ, Pachón J, Becerril B, Caballero FJ, García-Garmendía JL, Ortiz C, Cobacho AR. Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical findings, and prognostic features. *Clin Infect Dis.* 1996 Jun;22(6):1026-32.
40. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 10th edition M07-A11 Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018, Wayne, PA.
41. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-seventh Informational Supplement M100-S27. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017, Wayne, PA.
42. Corbella X, Pujol M, Ayats J, Sendra M, Ardanuy C, Domínguez MA, Liñares J, Ariza J, Gudiol F. Relevance of digestive tract colonization in the epidemiology of nosocomial infections due to multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis.* 1996 Aug;23(2):329-34.
43. Corvec S, Caroff N, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Reynaud A. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Oct;52(4):629-35.
44. Decousser JW, Jansen C, Nordmann P, Emirian A, Bonnin RA, Anais L, Merle JC, Poirel L. Outbreak of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in France, January to May 2013. *Euro Surveill.* 2013 Aug 1;18(31):20547.

45. De Rosa FG, Corcione S, Pagani N, Di Perri G. From ESKAPE to ESCAPE, from KPC to CCC. *Clin Infect Dis*. 2015 Apr 15;60(8):1289-90.
46. 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.
47. Dijkshoorn L. 2008. Typing *Acinetobacter* strains: applications and methods, p. 85–104. In: Bergogne-Bérézin E, Friedman H, Bendinelli M (ed.), *Acinetobacter* Biology and Pathogenesis. Springer, New York, USA.
48. Dijkshoorn L, Nemeč A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Dec;5(12):939-51
49. Dijkshoorn L, van Aken E, Shunburne L, van der Reijden TJ, Bernardis AT, Nemeč A, Towner KJ. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clin Microbiol Infect*. 2005 Apr;11(4):329-32.
50. Djahmi N, Dunyach-Remy C, Pantel A, Dekhil M, Sotto A, Lavigne JP. Epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. *Biomed Res Int*. 2014;2014:305784.
51. D'Onofrio V, Conzemius R, Varda-Brkić D, Bogdan M, Grisold A, Gyssens IC, Bedenić B, Barišić I. Epidemiology of colistin-resistant, carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Croatia. *Infect Genet Evol*. 2020 Jul;81:104263.
52. Dorsey CW, Beglin MS, Actis LA. Detection and analysis of iron uptake components expressed by *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2003 Sep;41(9):4188-93.
53. Dortet L, Bonnin RA, Bernabeu S, Escaut L, Vittecoq D, Girlich D, Imanci D, Fortineau N, Naas T. First Occurrence of OXA-72-Producing *Acinetobacter baumannii* in Serbia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Sep 23;60(10):5724-30.
54. Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes Environ*. 2011;26(2):101-12.
55. EARS-Net, 2019. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network - Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report for 2018. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm.
56. Eigenbrod T, Reuter S, Gross A, Kocer K, Günther F, Zimmermann S, Heeg K, Mutters NT, Nurjadi D. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* using WGS revealed missed transmission events in Germany from 2012-15. *J Antimicrob Chemother*. 2019 Dec 1;74(12):3473-3480.
57. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Feb;59(2):321-2.
58. El-Kazzaz SS, El-khier NTA. AmpC and metallo beta-lactamases producing Gram negative bacteria in patients with hematological malignancy. *Afr J Microbiol Res*. 2015 May; 9(18):1247-1254.
59. El-Sayed-Ahmed MA, Amin MA, Tawakol WM, Loucif L, Bakour S, Rolain JM. High prevalence of bla(NDM-1) carbapenemase-encoding gene and 16S rRNA armA methyltransferase gene among *Acinetobacter baumannii* clinical Isolates in Egypt. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(6):3602-5

60. Erridge C, Moncayo-Nieto OL, Morgan R, Young M, Poxton IR. *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharides are potent stimulators of human monocyte activation via Toll-like receptor 4 signalling. *J Med Microbiol.* 2007 Feb;56(Pt 2):165-171.
61. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1;2018.
62. Eveillard M, Kempf M, Belmonte O, Pailhoriès H, Joly-Guillou ML. Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. *Int J Infect Dis.* 2013 Oct;17(10):e802-5.
63. Falagas ME, Bliziotis IA, Siempos II. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Crit Care.* 2006;10(2):R48.
64. Falagas ME, Rafailidis PI. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue. *Crit Care.* 2007;11(3):134.
65. Fattahian Y, Rasooli I, Mousavi Gargari SL, Rahbar MR, Darvish Alipour Astaneh S, Amani J. Protection against *Acinetobacter baumannii* infection via its functional deprivation of biofilm associated protein (Bap). *Microb Pathog.* 2011 Dec;51(6):402-6.
66. Findlay J, Hamouda A, Dancer SJ, Amyes SG. Rapid acquisition of decreased carbapenem susceptibility in a strain of *Klebsiella pneumoniae* arising during meropenem therapy. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Feb;18(2):140-6.
67. Franolić-Kukina I, Bedenić B, Budimir A, Herljević Z, Vraneš J, Higgins PG. Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-72-positive *Acinetobacter baumannii* in a Croatian university hospital. *Int J Infect Dis.* 2011 Oct;15(10):e706-9.
68. García-Quintanilla M, Pulido MR, Pachón J, McConnell MJ. Immunization with lipopolysaccharide-deficient whole cells provides protective immunity in an experimental mouse model of *Acinetobacter baumannii* infection. *PLoS One.* 2014 Dec 8;9(12):e114410.
69. González RH, Nusblat A, Nudel BC. Detection and characterization of quorum sensing signal molecules in *Acinetobacter* strains. *Microbiol Res.* 2001 Mar;155(4):271-7
70. Göttig S, Pfeifer Y, Wichelhaus TA, Zacharowski K, Bingold T, Averhoff B, Brandt C, Kempf VA. Global spread of New Delhi metallo- β -lactamase 1. *Lancet Infect Dis.* 2010 Dec;10(12):828-9.
71. Gupta V, Ye G, Olesky M, Lawrence K, Murray J, Yu K. Trends in resistant *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter species* in hospitalized patients in the United States: 2013-2017. *BMC Infect Dis.* 2019 Aug 23;19(1):742.
72. Hamouda A, Findlay J, Al Hassan L, Amyes SG. Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* of animal origin. *Int J Antimicrob Agents.* 2011 Oct;38(4):314-8.
73. Henriksen SD. *Moraxella*, *Acinetobacter*, and the *Mimeae*. *Bacteriol Rev.* 1973;37(4):522-561.
74. Hershman AA, Yogeesha Babu K V, Jayanth S S, Manjula R. Role of carriers of *Acinetobacter species* in transmission of nosocomial infections in intensive care units. *Int J Health Syst Disaster Manage.* 2014;2:210-5.
75. Higgins PG, Lehmann M, Seifert H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.* *Int J Antimicrob Agents.* 2010 Mar;35(3):305.
76. Hrabák J, Štolbová M, Študentová V, Fridrichová M, Chudáčková E, Zemlickova H. NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient repatriated to the Czech Republic from Egypt, July 2011. *Euro Surveill.* 2012;17(7):pii=20085.

77. Hrenovic J, Goic-Barisic I, Kazazic S, Kovacic A, Ganjto M, Tonkic M. Carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in a municipal wastewater treatment plant, Croatia, 2014. *Euro Surveill.* 2016;21(15): pii=30195.
78. Hoang Quoc C, Nguyen Thi Phuong T, Nguyen Duc H, Tran Le T, Tran Thi Thu H, Nguyen Tuan S, Phan Trong L. Carbapenemase Genes and Multidrug Resistance of *Acinetobacter Baumannii*: A Cross Sectional Study of Patients with Pneumonia in Southern Vietnam. *Antibiotics (Basel).* 2019 Sep 12;8(3):148.
79. Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J Clin Microbiol.* 1998 Jul;36(7):1938-41.
80. Jeon JH, Lee JH, Lee JJ, Park KS, Karim AM, Lee CR, Jeong BC, Lee SH. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *Int J Mol Sci.* 2015 Apr 29;16(5):9654-92.
81. Jones RN, Sader HS, Fritsche TR, Rhomberg PR. Carbapenem susceptibility discords among *Acinetobacter* isolates. *Clin Infect Dis.* 2006;42(1):158.
82. Juni E. 2005. *Acinetobacter*, p. 1-26. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Online © 2015 Bergey's Manual Trust. DOI: 10.1002/9781118960608.gbm01203. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.
83. Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus TA, Gatermann SG, Bonnin RA, Poirel L. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Jun;66(6):1260-2.
84. Kanafani ZA, Zahreddine N, Tayyar R, Sfeir J, Araj GF, Matar GM, Kanj SS. Multi-drug resistant *Acinetobacter species*: a seven-year experience from a tertiary care center in Lebanon. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2018 Jan 22;7:9.
85. Karah N, Dwibedi CK, Sjöström K, Edquist P, Johansson A, Wai SN, Uhlin BE. Novel Aminoglycoside Resistance Transposons and Transposon-Derived Circular Forms Detected in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Jan 11;60(3):1801-18.
86. Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Updat.* 2012 Aug;15(4):237-47.
87. Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Oct;65(10):2253-4.
88. Kim SW, Choi CH, Moon DC, Jin JS, Lee JH, Shin JH, Kim JM, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Lee JC. Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett.* 2009 Dec;301(2):224-31.
89. Knapp S, Wieland CW, Florquin S, Pantophlet R, Dijkshoorn L, Tshimbalanga N, Akira S, van der Poll T. Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter pneumonia*. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Jan 1;173(1):122-9.
90. Kuo SC, Yang SP, Lee YT, Chuang HC, Chen CP, Chang CL, Chen TL, Lu PL, Hsueh PR, Fung CP. Dissemination of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with new plasmid-borne bla(OXA-72) in Taiwan. *BMC Infect Dis.* 2013 Jul 13;13:319.
91. Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, Antonescu C, Salzberg SL. Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol.* 2004;5(2):R12.

92. Lee JC, Koerten H, van den Broek P, Beekhuizen H, Wolterbeek R, van den Barselaar M, van der Reijden T, van der Meer J, van de Gevel J, Dijkshoorn L. Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. *Res Microbiol*. 2006 May;157(4):360-6.
93. Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, Cha CJ, Jeong BC, Lee SH. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 Mar 13;7:55.
94. Leite GC, Oliveira MS, Perdigão-Neto LV, Rocha CK, Guimarães T, Rizek C, Levin AS, Costa SF. Antimicrobial Combinations against Pan-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates with Different Resistance Mechanisms. *PLoS One*. 2016 Mar 21;11(3):e0151270.
95. Lessel EF. International Committee on Nomenclature of Bacteria Subcommittee on the Taxonomy of *Moraxella* and Allied Bacteria: Minutes of the Meeting, 11 August 1970. Room Constitution C, Maria-Isabel Hotel, Mexico City, Mexico. *Int J Syst Bacteriol*. 1971; 21(2):213–214.
96. Lesho E, Wortmann G, Moran K, Craft D. Fatal *Acinetobacter baumannii* infection with discordant carbapenem susceptibility. *Clin Infect Dis* 2005; 41:758.
97. Levy-Blitchein S, Roca I, Plasencia-Rebata S, Vicente-Taboada W, Velásquez-Pomar J, Muñoz L, Moreno-Morales J, Pons MJ, Del Valle-Mendoza J, Vila J. Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones II and III in Lima, Peru. *Emerg Microbes Infect*. 2018 Jul 4;7(1):119.
98. Lukić-Grlić A, Kos M, Žižek M, Luxner J, Grisold A, Zarfel G, Bedenić B. Emergence of Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinases in *Acinetobacter baumannii* in Children from Croatia. *Chemotherapy*. 2019;64(4):167-172.
99. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Mar;18(3):268-81.
100. Majewski P, Wiczorek P, Ojdana D, Sacha PT, Wiczorek A, Tryniszewska EA. In vitro activity of rifampicin alone and in combination with imipenem against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring the blaOXA-72 resistance gene. *Scand J Infect Dis*. 2014 Apr;46(4):260-4.
101. Manchanda V, Sanchaita S, Singh N. Multidrug resistant acinetobacter. *J Glob Infect Dis*. 2010 Sep;2(3):291-304.
102. Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis*. 2008 Apr 15;46(8):1254-63.
103. Maraki S, Mantadakis E, Mavromanolaki VE, Kofteridis DP, Samonis G. A 5-year Surveillance Study on Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from a Tertiary Greek Hospital. *Infect Chemother*. 2016 Sep;48(3):190-198.
104. Martínez T, Ropelewski AJ, González-Mendez R, Vázquez GJ, Robledo IE. Draft Genome Sequence of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Acinetobacter baumannii* Strain M3AC9-7, Isolated from Puerto Rico. *Genome Announc*. 2015 Apr 9;3(2):e00274-15.
105. Mathlouthi N, Ben Lamine Y, Somai R, Bouhalila-Besbes S, Bakour S, Rolain JM, Chouchani C. Incidence of OXA-23 and OXA-58 Carbapenemases Coexpressed in Clinical

- Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Tunisia. *Microb Drug Resist*. 2018 Mar;24(2):136-141.
106. McConnell MJ, Domínguez-Herrera J, Smani Y, López-Rojas R, Docobo-Pérez F, Pachón J. Vaccination with outer membrane complexes elicits rapid protective immunity to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun*. 2011 Jan;79(1):518-26.
 107. McConnell MJ, Pachón J. Active and passive immunization against *Acinetobacter baumannii* using an inactivated whole cell vaccine. *Vaccine*. 2010 Dec 10;29(1):1-5.
 108. McConnell MJ, Rumbo C, Bou G, Pachón J. Outer membrane vesicles as an acellular vaccine against *Acinetobacter baumannii*. *Vaccine*. 2011 Aug 5;29(34):5705-10.
 109. Metan G, Alp E, Aygen B, Sumerkan B. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: an emerging threat for patients with post-neurosurgical meningitis. *Int J Antimicrob Agents*. 2007 Jan;29(1):112-3.
 110. Moubareck C, Brémont S, Conroy MC, Courvalin P, Lambert T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Aug;53(8):3579-81.
 111. Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis*. 2010 Jan;16(1):35-40.
 112. Novovic K, Mihajlovic S, Vasiljevic Z, Filipic B, Begovic J, Jovicic B. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Serbia: revision of CarO classification. *PLoS One*. 2015 Mar 30;10(3):e0122793.
 113. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res*. 2015 Jul;25(7):1043-55.
 114. Peleg AY, Potoski BA, Rea R, Adams J, Sethi J, Capitano B, Husain S, Kwak EJ, Bhat SV, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: a cautionary report. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Jan;59(1):128-31.
 115. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(3):538–82.
 116. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Oct;51(10):3471-84.
 117. Pfaller MA, Huband MD, Streit JM, Flamm RK, Sader HS. Surveillance of tigecycline activity tested against clinical isolates from a global (North America, Europe, Latin America and Asia-Pacific) collection (2016). *Int J Antimicrob Agents*. 2018 Jun;51(6):848-853.
 118. Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, Wichelhaus TA, Göttig S, Hunfeld KP, Seifert H, Witte W, Higgins PG. Molecular characterization of blaNDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Sep;66(9):1998-2001.
 119. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. 2006 Sep;12(9):826-36.
 120. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70(1):119–23.
 121. Pormohammad A, Mehdinejadi K, Gholizadeh P, Nasiri MJ, Mohtavinejad N, Dadashi M, Karimaei S, Safari H, Azimi T. Global prevalence of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: A systematic review and meta-analysis. *Microb Pathog*. 2020 Feb;139:103887.

122. Pournaras S, Dafopoulou K, Del Franco M, Zarkotou O, Dimitroulia E, Protonotariou E, Poulou A, Zarrilli R, Tsakris A; Greek Study Group on *Acinetobacter* Antimicrobial Resistance. Predominance of international clone 2 OXA-23-producing-*Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Greece, 2015: results of a nationwide study. *Int J Antimicrob Agents*. 2017 Jun;49(6):749-753.
123. Povilonis J, Seputiene V, Krasauskas R, Juskaite R, Miskinyte M, Suziedelis K, Suziedeliene E. Spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying a plasmid with two genes encoding OXA-72 carbapenemase in Lithuanian hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2013 May;68(5):1000-6.
124. Prata-Rocha ML, Gontijo-Filho PP, Melo GB. Factors influencing survival in patients with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Braz J Infect Dis*. 2012 May-Jun;16(3):237-41.
125. Principe L, Piazza A, Giani T, Bracco S, Caltagirone MS, Arena F, Nucleo E, Tammaro F, Rossolini GM, Pagani L, Luzzaro F; AMCLI-CRAB Survey Participants. Epidemic diffusion of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Italy: results of the first cross-sectional countrywide survey. *J Clin Microbiol*. 2014 Aug;52(8):3004-10.
126. Qureshi ZA, Hittle LE, O'Hara JA, Rivera JI, Syed A, Shields RK, Pasculle AW, Ernst RK, Doi Y. Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance. *Clin Infect Dis*. 2015 May 1;60(9):1295-303.
127. Rafei R, Hamze M, Pailhoriès H, Eveillard M, Marsollier L, Joly-Guillou ML, Dabboussi F, Kempf M. Extrahuman epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. *Appl Environ Microbiol*. 2015 Apr;81(7):2359-67.
128. Rafei R, Kempf M, Eveillard M, Dabboussi F, Hamze M, Joly-Guillou ML. Current molecular methods in epidemiological typing of *Acinetobacter baumannii*. *Future Microbiol*. 2014;9(10):1179-94.
129. Rafei R, Pailhoriès H, Hamze M, Eveillard M, Mallat H, Dabboussi F, Joly-Guillou ML, Kempf M. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in different hospitals in Tripoli, Lebanon using bla(OXA-51-like) sequence based typing. *BMC Microbiol*. 2015 May 16;15:103.
130. Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, Vázquez GJ. Detection of KPC in *Acinetobacter spp.* in Puerto Rico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010 Mar;54(3):1354-1357.
131. Rosales-Reyes R, Gayosso-Vázquez C, Fernández-Vázquez JL, Jarillo-Quijada MD, Rivera-Benítez C, Santos-Preciado JI, Alcántar-Curiel MD. Virulence profiles and innate immune responses against highly lethal, multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* from a tertiary care hospital in Mexico. *PLoS One*. 2017 Aug 10;12(8):e0182899.
132. Santillana E, Beceiro A, Bou G, Romero A. Crystal structure of the carbapenemase OXA-24 reveals insights into the mechanism of carbapenem hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 27;104(13):5354-9.
133. Saule M, Samuelsen Ø, Dumpis U, Sundsfjord A, Karlsone A, Balode A, Miklasevics E, Karah N. Dissemination of a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to international clone II/sequence type 2 and harboring a novel AbaR4-like resistance island in Latvia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Feb;57(2):1069-72.

134. Schleicher X, Higgins PG, Wisplinghoff H, Körber-Irrgang B, Kresken M, Seifert H. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Germany over a 5-year period (2005-2009). *Clin Microbiol Infect*. 2013 Aug;19(8):737-42.
135. Scott P, Deye G, Srinivasan A, Murray C, Moran K, Hulten E, Fishbain J, Craft D, Riddell S, Lindler L, Mancuso J, Milstrey E, Bautista CT, Patel J, Ewell A, Hamilton T, Gaddy C, Tenney M, Christopher G, Petersen K, Endy T, Petrucci B. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. *Clin Infect Dis*. 2007 Jun 15;44(12):1577-84.
136. Segal H, Garry S, Elisha BG. Is IS (ABA-1) customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiol Lett*. 2005;243(2):425-9.
137. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M. Distribution of *Acinetobacter species* on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol*. 1997 Nov;35(11):2819-25.
138. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D, Heersma H, Dijkshoorn L. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2005 Sep;43(9):4328-35.
139. Siegman-Igra Y, Bar-Yosef S, Gorea A, Avram J. Nosocomial acinetobacter meningitis secondary to invasive procedures: report of 25 cases and review. *Clin Infect Dis*. 1993 Nov;17(5):843-9.
140. Strateva T, Sirakov I, Stoeva T, Stratev A, Dimov S, Savov E, Mitov I. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: Current status of the problem in four Bulgarian university hospitals (2014-2016). *J Glob Antimicrob Resist*. 2019 Mar;16:266-273.
141. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology (Reading)*. 2003 Dec;149(Pt 12):3473-3484.
142. Tran DN, Tran HH, Matsui M, Suzuki M, Suzuki S, Shibayama K, Pham TD, Van Phuong TT, Dang DA, Trinh HS, Loan CT, Nga LT, van Doorn HR, Wertheim HF. Emergence of New Delhi metallo-beta-lactamase 1 and other carbapenemase-producing *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex among patients in hospitals in Ha Noi, Viet Nam. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017 Feb;36(2):219-225.
143. Treangen TJ, Ondov BD, Koren S, Phillippy AM. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol*. 2014;15(11):524.
144. Tuan Anh N, Nga TVT, Tuan HM, Tuan NS, Y DM, Vinh Chau NV, Baker S, Duong HHT. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance phenotypes of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients in three hospitals in southern Vietnam. *J Med Microbiol*. 2017 Jan;66(1):46-53.
145. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TL. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006b May;258(1):72-7.
146. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol*. 2006a Aug;44(8):2974-6.

147. Uwingabiye J, Frikh M, Lemnouer A, Bssaibis F, Belefquih B, Maleb A, Dahraoui S, Belyamani L, Bait A, Haimeur C, Louzi L, Ibrahim A, Elouennass M. *Acinetobacter* infections prevalence and frequency of the antibiotics resistance: comparative study of intensive care units versus other hospital units. *Pan Afr Med J*. 2016 Apr 15;23:191.
148. van den Broek PJ, Arends J, Bernards AT, De Brauwier E, Mascini EM, van der Reijden TJ, Spanjaard L, Thewessen EA, van der Zee A, van Zeijl JH, Dijkshoorn L. Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in The Netherlands during the period 1999-2001. *Clin Microbiol Infect*. 2006 Sep;12(9):837-43.
149. Vasconcelos AT, Barth AL, Zavascki AP, Gales AC, Levin AS, Lucarevski BR, Cabral BG, Brasiliense DM, Rossi F, Furtado GH, Carneiro IC, da Silva JO, Ribeiro J, Lima KV, Correa L, Britto MH, Silva MT, da Conceição ML, Moreira M, Martino MD, de Freitas MR, Oliveira MS, Dalben MF, Guzman RD, Cayô R, Morais R, Santos SA, Martins WM. The changing epidemiology of *Acinetobacter spp.* producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: a BrasNet report. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015 Dec;83(4):382-5.
150. Vijayakumar S, Biswas I, Veeraraghavan B. Accurate identification of clinically important *Acinetobacter spp.*: an update. *Future Sci OA*. 2019 Jun 27;5(6):FSO395.
151. Villacís JE, Bovera M, Romero-Alvarez D, Cornejo F, Albán V, Trueba G, Dorn HF, Reyes JA. NDM-1 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* sequence type 32 in Ecuador. *New Microbes New Infect*. 2019 Mar 8;29:100526.
152. Visca P, Seifert H, Towner KJ. *Acinetobacter* infection - an emerging threat to human health. *IUBMB Life*. 2011; 63(12):1048-54.
153. Vranić-Ladavac M, Bedenić B, Minandri F, Ištok M, Bošnjak Z, Frančula-Zaninović S, Ladavac R, Visca P. Carbapenem resistance and acquired class D beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Croatia 2009-2010. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Mar;33(3):471-8.
154. Wang D, Ma L, Wu Z, Li M, Li X, Zhang W, Chen K. Identification and characteristics of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in surgical wards in a Chinese university hospital. *Infect Dis (Lond)*. 2015 Mar;47(3):182-6.
155. Wattam AR, Abraham D, Dalay O, Disz TL, Driscoll T, Gabbard JL, Gillespie JJ, Gough R, Hix D, Kenyon R, Machi D, Mao C, Nordberg EK, Olson R, Overbeek R, Pusch GD, Shukla M, Schulman J, Stevens RL, Sullivan DE, Vonstein V, Warren A, Will R, Wilson MJ, Yoo HS, Zhang C, Zhang Y, Sobral BW. PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jan;42(Database issue):D581-91.
156. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG, Livermore DM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.* *Int J Antimicrob Agents*. 2006 Apr;27(4):351-3.
157. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *J Clin Microbiol*. 2002 Oct;40(10):3798-801.
158. Zander E, Nemeč A, Seifert H, Higgins PG. Association between β -lactamase-encoding bla(OXA-51) variants and DiversiLab rep-PCR-based typing of *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Clin Microbiol*. 2012 Jun;50(6):1900-4.
159. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Nov;67(11):2640-4.

160. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Jan;41(1):11-9.
161. Zhang H, Zhang G, Zhang J, Duan S, Kang Y, Yang Q, Xu Y. Antimicrobial Activity of Colistin Against Contemporary (2015 - 2017) *P. aeruginosa* and *A. baumannii* Isolates From a Chinese Surveillance Program. *Front Microbiol*. 2020 Sep 4;11:1966.

Spisak skraćenica

A. baumannii: *Acinetobacter baumannii*

A. calcoaceticus: *Acinetobacter calcoaceticus*

Acb kompleks: *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* complex

ADC: cefalosporinaze koje proizvodi *Acinetobacter* (engl. *Acinetobacter-derived cephalosporinases*, ADC)

AK: amikacin

AMS: ampicilin-sulbaktam

A. nosocomialis: *Acinetobacter nosocomialis*

A. pittii: *Acinetobacter pittii*

ATCC: američka kolekcija kultura sojeva (engl. *American type culture collection*)

bla: geni koji kodiraju β-laktamaze (engl. *β-lactamase genes*, *bla*)

*bla*OXA-51: gen koji kodira β-laktamazu OXA-51

BAL: bronhoalveolarni lavat (engl. *bronchoalveolar lavage*, BAL)

Bap: protein povezan sa sintezom biofilma (engl. *biofilm-associated protein*, Bap)

BLAST: program za pretragu homologije nukleotida (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*)

BMD: bujon mikrodilucioni metod antibiograma (engl. *broth microdilution method*)

bp: bazni parovi

CAESAR: mreža za kontrolu antimikrobne rezistencije u centralnoj Aziji i istočnoj Evropi (engl. *Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance*, CAESAR)

CAZ: ceftazidim

CC: klonski kompleks (engl. *clonal complex*, CC)

CDC: Centri za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC)

CIP: ciprofloksacin

CLSI: američko udruženje za testiranje antimikrobne osetljivosti (engl. *Clinical & Laboratory Standards Institute*)

COL: kolistin

CRAB: karbapenem-rezistentan *A. baumannii* (engl. carbapenem-resistant *A. baumannii*, CRAB)

DD: disk difuzioni metod antibiograma (engl. *disk diffusion method*)

DNK: dezoksiribonukleinska kiselina

EARS-Net: Evropska mreža za kontrolu antimikrobne rezistencije (engl. *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*, EARS-Net)

EC: evropski klon (engl. *European clone*, EC)

EDTA: etilen diamin tetra sirćetna kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA)

ESBL: β -laktamaze širokog spektra (engl. *Extended spectrum β -lactamases*, ESBL)

EUCAST: evropsko udruženje za testiranje antimikrobne osetljivosti (engl. *the european committee on antimicrobial susceptibility testing*)

Fe: gvožđe

FEP: cefepim

FR: fiziološki rastvor

GEN: gentamicin

IC: internacionalni klon (engl. *international clone*, IC)

IgG: *imunoglobulin G*

IL: interleukin

IMP: imipenem

IS: inserciona sekvenca (engl. *insertion sequence*, IS)

JIN: jedinica intenzivne nege

KB: kilobaza (KB)

KBC: kliničko bolnički centar

KC: klinički centar

KKA: kolumbija krvni agar

LEV: levofloksacin

LPS: lipopolisaharid

MBL: metalo β -laktamaze (engl. *Metallo β -lactamases*, MBL)

McF: McFarland

MDR: multirezistentan (engl. *multidrug resistant*, MDR), bakterijski soj rezistentan na bar jedan antibiotik u/iz 3 ili više testiranih antimikrobnih klasa

MER: meropenem

MIK: minimalna inhibitorna koncentracija

MHA: Miler Hinton agar (engl. *Mueller Hinton agar*)

MHB: Miler Hinton bujon (engl. *Mueller Hinton broth*)

μ g: mikrogram

MLST: tipizacija na osnovu sekvenci visoko konzerviranih genskih lokusa (engl. multi-locus sequence typing, MLST)

μ m: mikrometar

OB: opšta bolnica

OMC: kompleks spoljašnje membrane (engl. *outer membrane complex*, OMC)

OMP: proteini spoljašnje membrane (engl. *outer membrane proteins*, OMP)

OMV: vezikule spoljašnje membrane (engl. *outer membrane vesicles*, OMV).

OXAs: oksacilinaze (engl. *OXA-type β -lactamases*)

PBPs: penicilin vezujući proteini (engl. *penicillin-binding proteins*, PBPs)

PBS: fosforilisani fiziološki rastvor (engl. *phosphated buffer saline*)

PCR: reakcijom lančanog umnožavanja (engl. *polimerase chain reaction*, PCR)

PDR: panrezistentan (engl. *pandrug-resistant*, PDR), bakterijski soj rezistentan na sve antibiotike iz svih testiranih antimikrobnih klasa

PFGE: elektroforeza u pulsirajućem električnom polju (engl. *pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE)

rRNK: ribozomalna ribonukleinska kiselina

rpoB: gen koji kodira β -subjedinicu RNK polimeraze

SAD: Sjedinjene Američke Države

SLST: tipizacija na osnovu sekvence jednog genskog lokusa (engl. *single-locus sequence-based typing*, SLST)

ST: tip sekvence (engl. *sequence type*, ST)

T_A : temperatura vezivanja prajmera (engl. *annealing temperature*, T_A)

TAE pufer: rastvor pufera koji sadrži Tris baze, sirćetnu kiselinu i EDTA

Taq polimeraza: termostabilna DNA polimeraza izolovana iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*

TET: tetraciklin

TLR: receptor sličan Toll-u (engl. *Toll-like receptor*, TLR)

T_M : temperatura topljenja prajmera (engl. *melting temperature*, T_M)

TNF- α : faktor nekroze tumora α (engl. *tumour necrosis factor alpha*, TNF- α)

TOB: tobramicin

TSX: trimetoprim-sulfametoksazol

TZP: piperacilin-tazobaktam

UK: Ujedinjeno kraljevstvo (engl. United kingdom)

V: volt

WGS: sekvenciranje čitavog genoma (engl. *whole-genome sequencing*, WGS)

XDR: ekstenzivno rezistentan (engl. *extensively drug-resistant*, XDR), soj rezistentan na bar jedan antibiotik u svim osim dve ili jedne testirane antimikrobne klase

Zn: cink

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Bojana Luković rođena je 07.04.1976. godine u Beogradu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1995. godine, a diplomirala je 2006. godine sa srednjom ocenom 8,66. Dr Luković je završila obavezni lekarski staž u Kliničkom Centru Srbije (KCS).

Od 2009. do 2018. godine bila je zaposlena u Službi za mikrobiologiju KCS. Kao klinički mikrobiolog radila je u Laboratorijskim odsecima na Ginekološko-akušerskoj klinici, Klinici za infektivne i tropske bolesti, Poliklinici, kao i na Klinici za pulmologiju i Klinici za grudnu hirurgiju KCS. Kao šef Laboratorijskog odseka za dijagnostiku mikobakterija KCS, 2014. godine nakon studijskog boravka u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za dijagnostiku mikobakterija Slovenije u rutinski rad laboratorije uvela je molekularnu dijagnostiku - detekciju *M. tuberculosis* complexa i gena rezistencije na rifampicin iz uzorka PCR metodom GeneXpert MTB/RIF.

Od 2018. godine Dr Luković je zaposlena kao predavač u Visokoj zdravstvenoj školi strukovnih studija u Beogradu.

Specijalizaciju iz Mikrobiologije sa parazitologijom započela je 2009. godine, a specijalistički ispit položila 2012. godine sa odličnim uspehom. Specijalističke akademske studije iz Kliničke i eksperimentalne mikrobiologije upisala je 2011. godine, a 2013. godine ih završila sa prosečnom ocenom 9,36. Doktorske akademske studije iz oblasti Molekularna medicina - Mikrobiologija upisala je 2013. godine, pod mentorstvom prof. dr Lazara Ranina.

Dr Bojana Luković je autor i koautor dva originalna rada objavljena *in extenso* u časopisima sa JCR liste i brojnih radova štampanih u časopisima koji nisu na JCR listi, kao i radova koji su štampani u formi izvoda u zbornicima međunarodnih i nacionalnih naučnih skupova.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Bojana J. Luković

Broj indeksa: mm-14/13

Izjavljujem

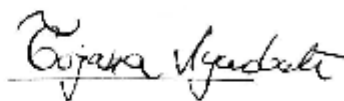
da je doktorska disertacija pod naslovom

„ FENOTIPSKE I GENOTIPSKE KARAKTERISTIKE SOJEVA *ACINETOBACTER BAUMANNII*
IZOLOVANIH U BOLNICAMA SEKUNDARNOG I TERCIJARNOG NIVOA U REPUBLICI SRBIJI “

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 19.04.2021.

Potpis autora



Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Bojana J. Luković

Broj indeksa: mm-14/13

Studijski program: Molekularna medicina

Naslov rada: "Fenotipske i genotipske karakteristike sojeva *Acinetobacter baumannii* izolovanih u bolnicama sekundarnog i tercijarnog nivoa u Republici Srbiji"

Mentor: prof. dr Lazar Ranin

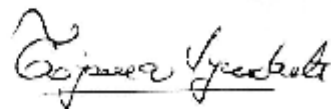
Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 19.04.2021.

Potpis autora



Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„ FENOTIPSKE I GENOTIPSKE KARAKTERISTIKE SOJEVA *ACINETOBACTER BAUMANNII* IZOLOVANIH U BOLNICAMA SEKUNDARNOG I TERCIJARNOG NIVOA U REPUBLICI SRBIJI ”

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)

2. Autorstvo - nekomercijalno (CC BY-NC)

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)

5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

Potpis autora

U Beogradu, 19.04.2021.

