

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković u Zagrebu
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti

Haris Car

***IN VITRO* SINERGIJA I POSTANTIBIOTSKI UČINAK
KOLISTINA U KOMBINACIJI S VANKOMICINOM I
MEROPENEMOM PREMA KARBAPENEM-REZISTENTNIM
GRAM-NEGATIVNIM BAKTERIJAMA S MULTIPLIM
KARBAPENEMAZAMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, 2020.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković u Zagrebu
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti

Haris Car

***IN VITRO* SINERGIJA I POSTANTIBIOTSKI UČINAK
KOLISTINA U KOMBINACIJI S VANKOMICINOM I
MEROPENEMOM PREMA KARBAPENEM-REZISTENTNIM
GRAM-NEGATIVNIM BAKTERIJAMA S MULTIPLIM
KARBAPENEMAZAMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Doktorska disertacija predložena

Sveučilišnom Vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne doktorske studije radi

stjecanja akademskog stupnja

doktora molekularnih bioznanosti - modul biomedicina

Osijek, 2020.

Doktorska disertacija izrađena je u Zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju kliničkog bolničkog centra Zagreb, pod vodstvom mentora: prof. dr. sc. Branke Bedenić i izv. prof. dr. sc. Amarele Lukić-Grlić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: Biologija i Temeljne medicinske znanosti

IN VITRO SINERGIJA I POSTANTIBIOTSKI UČINAK KOLISTINA U KOMBINACIJI S VANKOMICINOM I MEROPENEMOM PREMA KARBAPENEM-REZISTENTNIM GRAM-NEGATIVNIM BAKTERIJAMA S MULTIPLIM KARBAPENEMAZAMA

Haris Car

Disertacija je izrađena u: Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Kišpatićeva ul. 12, Zagreb

Mentori: prof. dr. sc. Branka Bedenić, izv. prof. dr. sc. Amarela Lukić-Grlić

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Kolistin je često jedina preostala opcija liječenja infekcija uzrokovanih enterobakterijama i acinetobakterima koje produciraju karbapenemaze. Međutim, rezistencija na kolistin u posljednje vrijeme raste kod enterobakterija i *Acinetobacter baumannii*. Cilj doktorske disertacije je analizirati *in vitro* sinergiju i post antibiotski učinak kolistina samog i u kombinaciji s meropenemom i vankomicinom u četiri soja enterobakterija koje produciraju multiple karbapenemaze ili kombinacije dvaju metalo- β -laktamaza (MBL) ili MBL s OXA-48 i prema osam sojeva *A. baumannii* s jednom ili multiplim karbapenemazama. Kolistin rezistentan soj *K. pneumoniae* pozitivan na OXA-48 također je uključen u istraživanje.

Broj stranica: 198

Broj slika: 44

Broj tablica: 55

Broj literaturnih navoda: 324

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, postantibiotički učinak, sinergistički učinak, kombinacije antibiotika, kolistin, meropenem, vankomicin

Datum obrane: 17. lipnja 2020.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof. dr. sc. Neven Žarković, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju (predsjednik povjerenstva)
2. Prof. dr. sc. Kamelija Žarković, redovita profesorica u trajnom zvanju (član)
3. Prof. dr. sc. Vera Cesar, redovita profesorica u trajnom zvanju (član)
4. Dr. sc. Lidija Milković, znanstvena suradnica (zamjena člana)

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruder Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences
Scientific Area: Interdisciplinary Area of Science
Scientific Fields: Biology and Basic Medical Sciences

PhD thesis

IN VITRO SYNERGY AND POSTANTIBIOTIC EFFECT OF COLISTIN COMBINED WITH VANCOMYCIN AND MEROPENEM AGAINST CARBAPENEM-RESISTANT GRAM-NEGATIVE BACTERIA WITH MULTIPLE CARBAPENEMASES

Haris Car

Thesis performed at: Clinical Institute for Clinical and Molecular Microbiology, Clinical Hospital Centre Zagreb, Kišpatičeva ul. 12, Zagreb

Supervisors: Branka Bedenić, PhD full professor tenure, Amarela Lukić-Grić, PhD associate professor

Short abstract:

Colistin is often the only therapeutic option left for the treatment of infections associated with carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacters*. However, colistin resistance emerged recently in *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. The aim of the study was to determine in vitro synergy and postantibiotic effect of colistin alone and combined with meropenem or vancomycin against four *Enterobacteriaceae* producing multiple carbapenemases or combinations of two metallo- β -lactamases (MBL) or MBL with OXA-48 and against eight *A. baumannii* with single or multiple carbapenemases. with single or multiple carbapenemases. Colistin resistant *K. pneumoniae* strain positive for OXA-48 was also included in the study.

Number of pages: 198

Number of figures: 44

Number of tables: 55

Number of references: 324

Original in: Croatian

Key words: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, postantibiotic effect, synergy effect, antibiotic combinations, colistin, meropenem, vancomycin

Date of the thesis defense: June 17, 2020

Reviewers:

1. Professor Neven Žarković, PhD, senior scientist, re-elected (president of review committee)
2. Full Professor Kamelija Žarković, PhD (reviewer)
3. Full Professor Vera Cesar, PhD (reviewer)
4. Scientific Associate Lidija Milković, PhD (substitute reviewer)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

ZAHVALA

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem glavnoj mentorici prof. dr. sc. Branki Bedenić na uloženom trudu, vremenu i pomoći pri izradi ove disertacije. Zahvaljujem se i mentorici izv. prof. dr. sc. Amareli Lukić-Grlić koja je svojim iskustvom i savjetima pomogla u izradi rada.

Zahvalu dugujem predstojnici Zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC Zagreb prof. dr. sc. Ivani Mareković što je odobrila i omogućila izradu praktičnog rada u Zavodu.

Također se zahvaljujem prof. dr. sc. Nevenu Žarkoviću koji je svojim savjetima kao predavač tijekom doktorskog studija, ali i kao studijski savjetnik uvijek bio spreman pomoći.

Zahvaljujem se djelatnicama Zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC Zagreb mag. med. lab. diag. Esmini Prahin i prof. dr. sc. Nataši Beader na podršci i pomoći za vrijeme boravka u laboratoriju.

Naposljetku, zahvaljujem roditeljima, sestri, supruzi Dijani i kćeri Arabelli na bezuvjetnoj podršci, strpljenju i razumijevanju.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Enterobakterije.....	4
1.1.1. <i>Klebsiella</i>	5
1.1.2. <i>Enterobacter</i>	7
1.2. <i>Acinetobacter</i>	7
1.3. Antimikrobni lijekovi.....	12
1.3.1. Antibiotici koji inhibiraju sintezu stanične stjenke.....	14
1.3.2. β -laktamski antibiotici.....	14
1.3.3. Karbapenemi.....	15
1.3.4. Glikopeptidi.....	17
1.3.5. Antibiotici koji djeluju na citoplazmatsku membranu.....	19
1.3.6. Antibiotici koji ometaju sintezu proteina.....	25
1.3.7. Antibiotici koji djeluju na sintezu nukleinskih kiselina.....	25
1.4. β -laktamaze.....	26
1.4.1. Klasifikacija β -laktamaza.....	27
1.4.2. Funkcionalna klasifikacija β -laktamaza.....	27
1.4.3. Molekularna klasifikacija β -laktamaza.....	31
1.5. β -laktamaze proširenog spektra.....	49
1.6. Karbapenemaze.....	51
2. CILJ RADA.....	52
3. MATERIJALI I METODE.....	54
3.1. Bakterijski izolati.....	54
3.2. Karakterizacija pojedinačnih sojeva.....	56
3.2.1. Ispitivanje osjetljivosti na antibiotike-disk difuzijska metoda.....	56
3.2.2. Ispitivanje osjetljivosti na antibiotike-bujon dilucijska metoda.....	57
3.2.3. Pripremanje inokuluma.....	59
3.2.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije.....	61
3.2.5. Određivanje minimalne baktericidne koncentracije.....	63
3.3. Testovi za ispitivanje sinergije.....	63
3.3.1. Krivulje baktericidnog učinka.....	63
3.3.2. Šah metoda.....	65
3.3.3. Metoda dvije jažice.....	65
3.4. Postantibiotski učinak.....	66
3.5. Testovi za detekciju β -laktamaza.....	67
3.5.1. Modificirani Hodge test.....	67
3.5.2. Testovi za dokaz produkcije ESBL.....	71
3.5.3. Dvostruki disk-sinergistički test.....	71
3.5.4. CLSI konfirmatorni test.....	72
3.5.5. Inhibitorom potencirani disk-difuzijski test.....	73
3.5.6. E-test ESBL.....	73
3.5.7. Test inducibilnosti kromosomske AmpC β -laktamaze.....	74

3.5.8. Detekcija hiperprodukcije kromosomske AmpC β -laktamaze ili produkcije plazmidne AmpC β -laktamaze.....	75
3.6. Detekcija gena rezistencije.....	76
4. STATISTIČKA ANALIZA.....	78
5. REZULTATI.....	79
5.1. Molekularna detekcija gena rezistencije.....	79
5.2. Fenotipski testovi za detekciju β -laktamaza kod enterobakterija.....	79
5.2.1. Detekcija ESBL.....	79
5.2.2. Detekcija karbapenemaza.....	80
5.3. Testiranje osjetljivosti – Enterobakterije.....	80
5.4. Testiranje osjetljivosti - <i>Acinetobacter</i> spp.....	82
5.5. Testovi sinergije – Enterobakterije.....	83
5.6. Testovi sinergije – <i>Acinetobacter</i> spp.....	97
5.7. Postantibiotski učinak – Enterobakterije.....	123
5.8. Postantibiotski učinak – <i>Acinetobacter</i> spp.....	136
6. RASPRAVA.....	162
7. ZAKLJUČCI.....	167
8. LITERATURA.....	168
9. SAŽETAK.....	195
10. SUMMARY.....	197
11. ŽIVOTOPIS.....	IV
12. POPIS RADOVA.....	VI

1. UVOD

Bakterije koje istovremeno pokazuju razistenciju na više različitih grupa antibiotika nazivaju se multirezistentnim bakterijama (MDR, eng., multidrug-resistant bacteria). Mnoge studije ukazuju na visoki stupanj prevalencije MDR u svijetu. Infekcije uzrokovane takvim sojevima predstavljaju terapijski problem kliničarima zbog limitiranih terapijskih opcija i povezane su s povećanim mortalitetom i lošijim terapijskih ishodom te većom stopom komplikacija liječenja.

U najvažnije MDR Gram-negativne bakterije ubrajaju se enterobakterije koje produciraju enzime kao što su β -laktamaze proširenog spektra (ESBL, eng., extended-spectrum β -lactamases), plazmidne AmpC β -laktamaze i karbapenemaze kao i karbapenemaza pozitivni izolati *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa* (1).

β -lakamaze su enzimi koji hidroliziraju β -laktamske antibiotike, a produciraju ih različite vrste bakterija uključujući i Gram-pozitivne i Gram-negativne. Klinički značajne β -laktamaze su β -laktamaze proširenog spektra, AmpC β -laktamaze, inhibitor-rezistentne β -laktamaze i karbapenemaze.

Svrstavane su u različite klasifikacijske sheme. Jedna od najstarijih je ona po Richmondu i Sykesu iz 1973. godine koju su kasnije nadopunili Sykes i Matthew (1976.) Danas se koristi klasifikacijska shema po Bush, Jacoby, Medeiros (2, 3, 4, 5). MDR, posebno one koje produciraju enzime karbapenemaze, predstavljaju veliki terapijski problem. Opcije liječenja infekcija uzrokovanih karbapenem-rezistentnim enterobakterijama su ograničene i kao jedini preostali izbor liječenja često ostaje davno zaboravljeni antibiotik kolistin. Kolistin (također poznat kao polimiksin E) je multi-komponentni polipeptidni antibiotik otkriven još 1950. godine, a koji djeluje na Gram-negativne bakterije na način da se kao pozitivno nabijena molekula veže s negativno nabijenim lipopolisaharidima i fosfolipidima na površini vanjske i citoplazmatske membrane i na taj način ometa membransku permeabilnost što dovodi do

istjecanja sadržaja citoplazme (6, 7). Iako je kolistin predstavljao jedinu uspješnu terapijsku opciju, u novije vrijeme opisani su i slučajevi rezistencije na taj antibiotik (8, 9, 10). Rezistencija na kolistin nastaje zbog dodavanja fosfoetanolamina ili L arabinoze na lipopolisaharid vanjske membrane čime se maskira negativni naboj i onemogućava vezanje pozitivno nabijenog kolistina. Dodavanje navedenih molekula nastaje zbog mutacija u dvokomponentnom transdukcijskom signalnom sistemu *pho*, *pmr* (9, 10). Zbog dramatičnog porasta stope karbapenem rezistentnih enterobakterija (CRE, eng., carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*), nužna je potreba procijene načina upravljanja antibioticima koji se koriste za liječenje infekcija uzrokovanih ovim sojevima. Kliničke studije pokazuju da je kombinacija antibiotske terapije povezana s boljim ishodom nego monoterapija kod liječenja ozbiljnih infekcija uzrokovanih ovim sojevima čak ako su izolirani sojevi rezistentni *in vitro* na pojedinačne lijekove (11).

Kao jedina mogućnost preostaju kombinacije antibiotika, načešće kolistina s karbapenemima, ciprofloksacinom ili fosfomicinom gdje se učinkovitost kombinacija antibiotika određuje *in vitro* i *in vivo* testiranjem.

Enterobakterije mogu razviti rezistenciju na karbapeneme uslijed hiperprodukcije ESBL ili plazmidnih AmpC β -laktamaza u kombinaciji s gubitkom porina vanjske membrane (12, 13), zbog produkcije karbapenemaza (KPC, IMI, NMC i SME) iz grupe A (14, 15, 16, 17, 18, 19, 20) i klase D (OXA-48 β -laktamaze) ili hiperekspresije efluks pumpi (21). Rezistencija na karbapeneme opisana je i u Hrvatskoj kod KPC-2 pozitivne *K. pneumoniae* te kod VIM-1 pozitivnog *Enterobacter cloacae* (22). Rezistencija na karbapeneme kod enterobakterija globalno se povećala tijekom prošlog desetljeća, posebno kod *Klebsiella pneumoniae* što je karakteristično povezano s produkcijom karbapenemaza kao najvažnijeg mehanizma rezistencije (23). Acinetobakteri obično razvijaju rezistencije na karbapeneme zbog produkcije karbapenemaza iz grupe B (VIM, IMP, NDM, SIM) ili D, zbog gubitka porina vanjske

membrane (CarO) ili zbog pojačane aktivnosti efluks pumpi (24, 25, 26). Najčešći mehanizam rezistencije na karbapeneme je produkcija karbapenem-hidrolizirajućih karbapenemaza (CHDL, eng., carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases) koje spadaju u grupe OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143 i OXA 235-like (26, 27, 28, 29, 30, 31). Postoje izvještaji o boljem terapijskom uspjehu za kombinacije kolistina s karbapenemom, tigeciklinom, fosfomicinom i vankomicinom. U nedostatku kliničkih studija koje su teške za izvođenje, *in vitro* studije mogu dati uvid u ovaj problem (32). Enterobakterije su dobar vektor za plazmide tako da mogu akumulirati gene rezistencije i za β -laktamske kao i za ostale antibiotike uključujući aminoglikozide, sulfonamide, tetracikline, fluorokinolone itd (33). Nedavno su u Zagrebu pronađeni izolati enterobakterija s višestrukim karbapenemazama, uključujući kombinacije VIM-1, NDM-1 i OXA-48 (34, 35). Povrh toga, prijavljena je i kolistinska rezistencija u Zagrebu u *K. pneumoniae* koja proizvodi OXA-48 te u *Enterobacter aerogenes* u Puli (36). Takvi izolati predstavljaju ozbiljan problem liječenja u bolnici, osobito *Enterobacter* spp. koji je sklon da razvije adaptivnu rezistenciju na kolistin zbog upregulacije efluks pumpi ili gubitka porina vanjske membrane. Postoje mnogi izvještaji o sinergiji kolistina s drugim antibioticima prema KPC (eng., *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) i MBL (eng., metallo- β -lactamases) pozitivnim enterobakterijama (37, 38, 39).

Međutim, nema izvještaja o ispitivanju sinergije i PAE (eng., postantibiotic effect) izazvanog kombinacijama kolistina s drugim antibioticima u izolata s višestrukim karbapenemazama ili onima pozitivnim na OXA-48 i otpornima na kolistin.

Postantibiotski učinak (PAE) je perzistentna supresija umnožavanja bakterija nakon kratkotrajnog izlaganja antibioticima (40).

Antibiotici se razlikuju u sposobnosti izazivanja PAE. β -laktamski antibiotici u pravilu ne izazivaju PAE u Gram-negativnih bakterija osim karbapenema. S obzirom da je kolistin, u

pravilu zadnja terapijska opcija, i s obzirom na sve veću učestalost kolistin rezistentnih sojeva, jedino što ostaje u terapiji infekcija su kombinacije antibiotika.

Za karbapeneme kao i za kolistin je otkriveno da stvaraju PAE kao zasebni lijekovi kod Gram-negativnih bakterija, ali je samo nekoliko izvještaja o PAE izazvanom u kombinaciji kolistina s karbapenemima (41, 42, 43).

1.1. Enterobakterije

Porodica *Enterobacteriaceae* obuhvaća Gram-negativne štapičaste bakterije koje ne stvaraju sporu, raširene su u prirodi, žive kao komenzali u probavnom sustavu ljudi i životinja, mnoge žive slobodno u prirodi dok određeni pripadnici uzrokuju bolesti u ljudi i životinja. Obzirom da većina enterobakterija treba male uvjete za rast, laboratorijska dijagnostika nije zahtjevna za razliku od liječenja koje traži izradu testova osjetljivosti jer je većina enterobakterija razvila otpornost na antimikrobne lijekove. Za izolaciju iz primarno sterilnih uzoraka koristi se krvni agar dok se za izolaciju iz stolice koriste selektivne podloge. Kolonije su glatke i sjajne, pravilnih rubova i konveksne, a kod klepsijele dodatno i sluzave zbog posjedovanja kapsule. Zbog pokretljivosti zamućuju difuzno tekuće podloge i stvaraju talog. Za identifikaciju se koriste biokemijski nizovi koji uključuju razgradnju šećera (razlikovanje laktoza pozitivnih od laktoza negativnih vrsta) i aminokiselina. Optimalna temperatura za rast i razmnožavanje iznosi 37 °C. Neki bakterijski sojevi imaju izrazito razvijenu kapsulu kao npr. sojevi iz roda *Klebsiella* i neki sojevi roda *Enterobacter*. Sve vrste unutar porodice enterobakterija posjeduju fimbrije (pile), većina je vrsta pokretna, no ima i nepokretnih (npr. neke od vrsta iz roda *Shigella*). Enterobakterije pokazuju složenu antigensku strukturu. Sve enterobakterije imaju O-antigene u obliku cjelovite molekule polisaharida kao sastavni dio stanične stjenke, inkapulirani sojevi posjeduju K-antigene u obliku polisaharida dok pokretni sojevi sadrže i H-antigene kao sastavne dijelove flagela u obliku proteina-flagelina. Karakterizira ih prilična otpornost na

vanjske uvjete, dobro podnose niske temperature dok ih temperatura od 55 °C ubija za otprilike jedan sat. Za razliku od Gram-pozitivnih bakterija, pokazuju slabiju osjetljivost na antibiotike zbog relativno brze sposobnosti stjecanja otpornosti na antibiotike prijenosom plazmida koji sadržavaju gene rezistencije za različite antibiotike ili rezistentnim spontanim mutacijama u sredini u kojoj se dosta često upotrebljavaju antibiotici. Razlikujemo podjelu na primarno patogene enterobakterije koje uzrokuju infekcije kod osjetljivih ljudi očuvane imunosti (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, određene vrste i podvrste u rodu *Klebsiella* i određeni tipovi *Escherichia coli*) te oportunističko patogene enterobakterije koje predstavljaju komenzale najčešće u probavnom sustavu osoba (manje u genitalnom sustavu i usnoj šupljini) te izazivaju infekcije ukoliko dospiju u unutarnju sredinu čovjeka prilikom npr. oslabljenosti imunološkog sustava, operacijskih zahvata, trauma, tumora, oštećenja sluznica i drugog (komezalne vrste i podvrste u rodu *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*), komenzalni tipovi *Escherichia coli* kao najčešći uzročnici oportunističkih infekcija i dr. (22).

1.1.1. *Klebsiella*

Karakteristike roda *Klebsiella* je dobro razvijena kapsula koja predstavlja značajnog čimbenika virulencije, nepokretne su i posjeduju endotoksin. Vrsta *Klebsiella pneumoniae* ima tri podvrste: *K. pneumoniae* subsp. *ozenae*, *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* od kojih zadnja najčešće uzrokuje infekcije u ljudi. Kao komenzal obitava u probavnom sustavu ljudi i životinja, ali se može naći i posvuda u prirodi. Kod ljudi oslabljenog imuniteta izaziva, infekcije mokraćnog sustava (IMS), upalu pluća, infekcije nakon operativnih zahvata, ali i meningitis i sepsu koji su dosta česti i kod novorođenčadi u jedinicama intenzivnog liječenja (22).

Prema dostupnim podacima u Hrvatskoj je 2011. godine provedeno istraživanje na oko 4000 bakterijskih sojeva te je zabilježena otpornost oko 40% sojeva *K. pneumoniae* na sve

β -laktamske antibiotike, osim na karbapeneme (22). Unazad nekoliko godina zbog velike primjene karbapenema u terapiji infekcija uzrokovanih sa ESBL pozitivnim sojevima *K. pneumoniae*, sve se češće uočavaju i izoliraju sojevi rezistentni i na tu, zadnju liniju djelotvornih antibiotika iz skupine β -laktamskih antibiotika.

Mutacije u dvokomponentnom signalnom transdukcijskom sistemu *phoP/phoQ* ili *pmrA/pmrB*, reguliraju gene potrebne za sintezu lipopolisaharida u enterobakterija imaju ulogu u nastanku rezistencije na kolistin u *K. pneumoniae*. Također i disrupcija *mrgB* gena uslijed insercijske sekvence i akvizicija plazmidno kodiranih *mcr* gena može uzrokovati rezistenciju na kolistin u enterobakterija (8, 9, 10, 44). Od ostalih rezistencija uočeno je da 40% sojeva *K. pneumoniae* pokazuje rezistenciju na sulfametoksazol + trimetoprim, 35% na fluorokinolone, 35% na gentamicin, a samo 5% na amikacin. Geni koji kodiraju ESBL se nalaze u oko 40% sojeva, locirani su na plazmidima koji često sadržavaju gene rezistencije na ostale antibiotike što ESBL sojeve čini mnogostruko rezistentnim na antibiotike iz različitih skupina antibiotika, a to limitira terapijske opcije (22).



Slika 1. *Klebsiella pneumoniae* na krvnom agaru (Izvor: Branka Bedenić, Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, KBC, Zagreb)

1.1.2. *Enterobacter*

Rodovi *Citrobacter*, *Serratia* i *Enterobacter* mogu normalno živjeti slobodno u prirodi i predstavljaju floru probavnog sustava životinja i ljudi. Ne izazivaju infekcije kod zdravih ljudi, pokretni su Gram-negativni štapići, ali se pronalaze kao uzročnici bolničkih infekcija. Zbog mnogo rezistentnih sojeva potrebno je napraviti antibiogram, ali su načelno osjetljivi na kinolone, aminoglikozide, trimetoprim-sulfametoksazol, cefalosporine III. i IV. generacije i karbapeneme (22). Najčešći predstavnici roda *Enterobacter* koji uzrokuju infekcije mokraćnog sustava (IMS), pneumonija, sepsa i dr. su *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. sakazakii* i *E. agglomerans* (22). *Enterobacter cloacae* i *Enterobacter aerogenes* važni su uzročnici teških bolničkih infekcija kao što su infekcije mokraćnog sustava povezane s kateterom, pneumonije, infekcije kože i potkožnog tkiva, intraabdominalne infekcije i bakteremije (45, 46).

1.2. *Acinetobacter*

Unutar roda *Acinetobacter* do danas je opisano tridesetak vrsta od kojih je tek nešto više od pola imenovano zbog izrazito velikih sličnosti koje se teško mogu razlikovati samo na osnovu fenotipskih karakteristika (22). Pripadnici roda *Acinetobacter* su nepokretni Gram-negativni bacili, posjeduju kapsulu, striktni su aerobi, katalaza pozitivni, oksidaza negativni i ne reduciraju nitrate. Sve vrste unutar roda dobro rastu na većini hranjivih podloga. Na krvnom agaru kolonije su sjajne, pravilnog ruba i glatke površine. Kolonije su bijele ili krem boje promjera oko 1 mm (24, 47). *Acinetobacter baumannii* je važan nozokomijalni patogen u jedinicama intenzivnog liječenja (JIL) kao i na odjelima za opekline (24, 48). Vrlo često uzrokuje hospitalne infekcije i to najčešće infekcije mokraćnog sustava, sepsu, meningitis, pneumoniju uzrokovanu strojnom ventilacijom te infekcije kirurških rana (49).

Na osnovu sposobnosti hemolize na krvnom agaru i oksidacije ugljikohidrata razlikuju se tri biotipa; *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* kompleks (glukoza pozitivan i hemoliza

negativan), *Acinetobacter lwoffii* (glukoza i hemoliza negativan) i hemoliza pozitivan *Acinetobacter haemolyticus* (50, 51). Najveću zastupljenost od gotovo 75% među kliničkim izolatima pokazuje *Acinetobacter calcoaecitus-baumannii* (52). *Acinetobacter baumannii* se u laboratoriju rutinski identificira kao bakterija koja za razliku od enterobakterija ne reducira nitrate, katalaza je pozitivna, oksidaza negativna te kao nonfermentor s oksidativnom razgradnjom glukoze (22). Ima mnogobrojne intrinzične i stečene mehanizme rezistencije na antibiotike što otežava terapiju infekcija te vrlo često preostaje jedino antibiotik kolistin kao terapijska opcija (53, 54). Do danas su poznate 32 genomske vrste, od kojih 18 nosi ime vrste zahvaljujući metodi DNA-DNA hibridizacije kojom su identificirane (55, 56).

Acinetobacter baumannii je čest uzročnik bolničkih infekcija kao što su sepsa, infekcije središnjeg živčanog sustava, pneumonija u ventiliranih bolesnika, infekcija rana i opekotina itd. Te infekcije se teško liječe jer on ima mnogobrojne urođene i stečene mehanizme rezistencije. Urođeno je otporan na prirodne i semisintetske peniciline, te prvu i drugu generaciju cefalosporina, na koamoksiklav i na fosfomicin. Lako stječe rezistenciju na antibiotike preko prenosivih genetskih elemenata. U najvažnije stečene mehanizme rezistencije spadaju karbapenemaze iz klase A, B i D te β -laktamaze proširenog spektra. Rezistencija na karbapeneme nastaje najčešće zbog produkcije karbapenem hidrolizirajućih oksacilinaza koje spadaju u klasu D.

Vrste unutar roda *Acinetobacter* predstavljaju ubikvitarne bakterije široko rasprostranjene na tlu, vodi i drugim površinama u okolišu s mogućnošću preživljavanja u nepovoljnim uvjetima i do desetak dana (24, 57). Poseban problem predstavlja preživljavanje acinetobaktera u bolničkim sredinama (uređaji za respiratornu potporu, radne površine i dr.). Česti su uzročnici bolničkih infekcija pogotovo u jedinicama intenzivnog liječenja te su sve češći uzročnici pneumonija povezanih sa strojnom ventilacijom i sepsi povezanih s uvođenjem

intravaskularnih katetera (22). *Acinetobacter* može preživjeti na suhim površinama i do 3 tjedna i također preživljava dobro u otopinama antibiotika i dezinficijensa.

A. baumannii zbog svoje sposobnosti prilagodbe i preživljavanja kako izvan tako i unutar bolnica s brzim razvojem rezistencije na antibiotike postao je značajan uzročnik bolničkih infekcija što predstavlja problem ne samo u Europi već širom svijeta. Promjena genomske strukture s različitom ekspresijom gena omogućila je njegovu prilagodbu i rezistenciju na antibiotike. Obzirom da su vrste unutar roda *Acinetobacter* široko rasprostranjene na radnim površinama, medicinskim pomagalicama i uređajima unutar bolnica sve se češće spominju izvještaji o hospitalnim epidemijama s teškim kliničkim slikama u jedinicama intenzivnog liječenja uzrokovane multirezistentnim sojevima *A. baumannii* (58, 59, 60). Brojna mjesta poput mokraćnog, dišnog i probavnog sustava mogu predstavljati izvorišna mjesta za infekcije uzrokovane ovom vrstom (61). Vrste *Acinetobacter* spp. koloniziraju kožu i sluznice kod ljudi (62, 63). Kolonizacija kože bolničkog osoblja također predstavlja veliki problem jer se smatra da je *Acinetobacter* spp. najčešća Gram-negativna bakterija koja koloniza kožu (64). Osobe, pogotovo one starije dobi koje se dugo zadržavaju u jedinicama intenzivnog liječenja, imunokompromitirane su, koriste respirator, kateter ili su bile podvrgnute kirurškom zahvatu imaju veći rizik za razvoj bolničke infekcije uzrokovane *A. baumannii* (58). Veliki problem predstavljaju teške pneumonije povezane sa strojno potpomognutom ventilacijom uzrokovane multirezistentnim sojem *A. baumannii* kod kojih smrtnost može biti veća od 80% (61, 65, 66) dok se kod sepsi kao posljedica uvođenja intravenskih katetera smrtnost kreće između 15% do 46% (67). Za praćenje i detekciju regionalnih i međunarodnih epidemijskih prijenosa multirezistentnih sojeva *A. species* koriste se molekularne metoda poput elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE, eng., pulsed field gel electrophoresis), rep-PCR (eng., repetitive element sequence polymerase chain reaction), RAPD (eng., random amplified polymorphic

DNA analysis) i određivanje sekvencijskih grupa ili EU klonova (danas international clonal lineage).

Takve metode omogućavaju i praćenje širenja multirezistentnih izolata *A. baumannii* (68). Rezistencija sojeva *A. baumannii* na karbapeneme najizraženija je u Turskoj, Italiji, Grčkoj i Španjolskoj, dok je na sjeveru Europe u Skandinavskim zemljama zasad najmanje izražena (69, 70, 71). Stopa prijavljenih multirezistentnih sojeva *A. baumannii* sve više raste, a time su limitirane terapijske opcije potrebne za liječenje (57). I Hrvatska je pri europskom vrhu po stopi karbapenem-rezistentnih izolata (oko 90 %).

Rezistencijom na tetracikline, fluorokinolone, aminoglikozide, peniciline i cefalosporine te napređivanjem i sve brže rastućom rezistencijom na karbapeneme, *Acinetobacter* spp. predstavlja veliki problem u liječenju bolesnika u jedinicama intenzivnog liječenja pogotovo kada se govori o sojevima rezistentnim na karbapeneme pošto se ti antibiotici koriste kao jedna od zadnjih opcija liječenja (72). Rezistencija na karbapeneme posredovana karbapenemazama iz grupe A, B i D predstavlja najvažniji oblik mehanizma rezistencije (54, 73). Osim toga mehanizmi rezistencije mogu uključivati i promjenu strukture porina vanjske membrane koja dovodi do njene smanjene propustljivosti, promjenu PBP (eng., penicillin-binding protein) molekula na koje se vežu β -laktamski antibiotici, pojačani rad efluks pumpi ili pojačanu produkciju plazmidnih ampC β -laktamaza (47, 55). Stanična stijenka Gram-negativnih bakterija građena je od citoplazmatske membrane na koju se nastavlja deblji sloj peptidoglikana, a iznad kojeg se nalazi vanjska membrana. Između unutarnje i vanjske membrane nalazi se periplazmatski prostor. Transmembranski proteini porini koji povezuju unutrašnji citoplazmatski dio bakterijske stanice s vanjskim okruženjem prolazeći na taj način kroz lipidni dvosloj formiraju uske kanaliće do 1nm putem kojih se odvija postupak difuzije molekula i prolaz metabolita. Na taj način u bakterijsku stanicu mogu ući i antibiotici mase do 700 Da (24, 47). Da bi antibiotici izrazili svoje djelovanje moraju prvo doći do svog ciljnog mjesta što ovisi

o grupi antibiotika. β -laktamski antibiotici zbog svoje male veličine do PBP-a tj. njihovog ciljnog mjesta dolaze prolazeći kroz sustave proteinskih kanala koji su poznatiji pod imenom porini. Ovi sustavi kanala protežu se kroz cijeli stanični zid bakterija (74). Istražena je rezistencija na antibiotike karbapeneme u *A. baumannii* koja je posredovana mutacijama gena odgovornih za stvaranje porina, a koji zbog navedenih mutacija onemogućavaju prolazak antibiotika kroz sustav porina unutar bakterijske stanice. Riječ je o CarO porinu (eng., carbapenem resistance - associated outer membrane protein) inače odgovornom za ulazak antibiotika u bakterijsku stanicu, a čiji gubitak dovodi do rezistencije (55, 74, 75, 76).

Efluks pumpe posredovane brojnim genima odgovornim za njihovo djelovanje, svojim pojačanim radom i izbacivanjem štetnih tvari pa time i antibiotika bakteriji omogućuju da i na ovaj način razvije rezistenciju na antibiotike. Transmembranski sustav MexAB koji se sastoji od tri proteina od kojih je jedan porin na vanjskoj membrani, drugi se nalazi u citoplazmi, a treći povezuje prethodno dva opisana predstavlja sustav koji je prisutan i kod acinetobaktera.

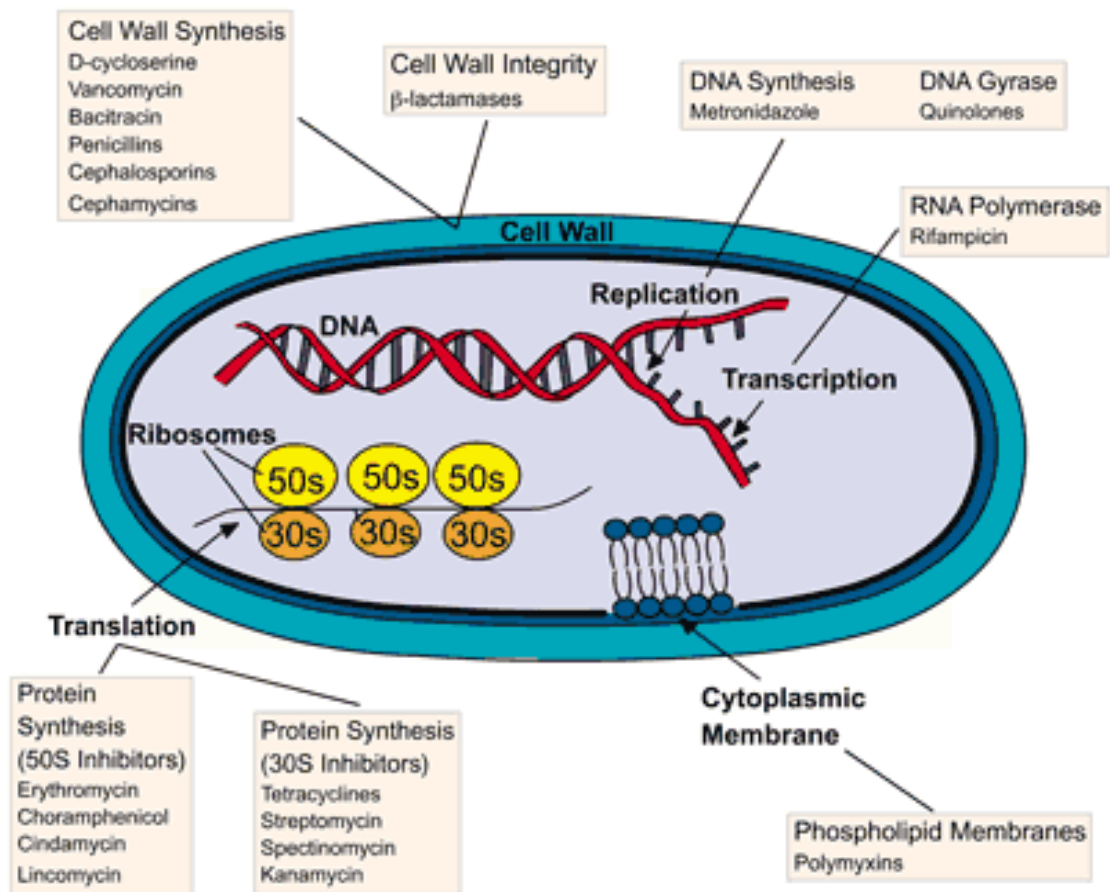
Mutacijom takvih gena odgovornih za rad efluks pumpi može doći do hiperekspresije samih efluks pumpi i izbacivanja većine antibiotika izvan bakterijske stanice (55). Racionalna i smisljena primjena antibiotika uz ostale mjere za suzbijanje bolničkih infekcija treba se provoditi s ciljem sprječavanja širenja i prijenosa infekcija uzrokovanih sojem *A. baumannii* dok se molekularnim metodama trebaju pratiti novi mehanizmi rezistencije (72).



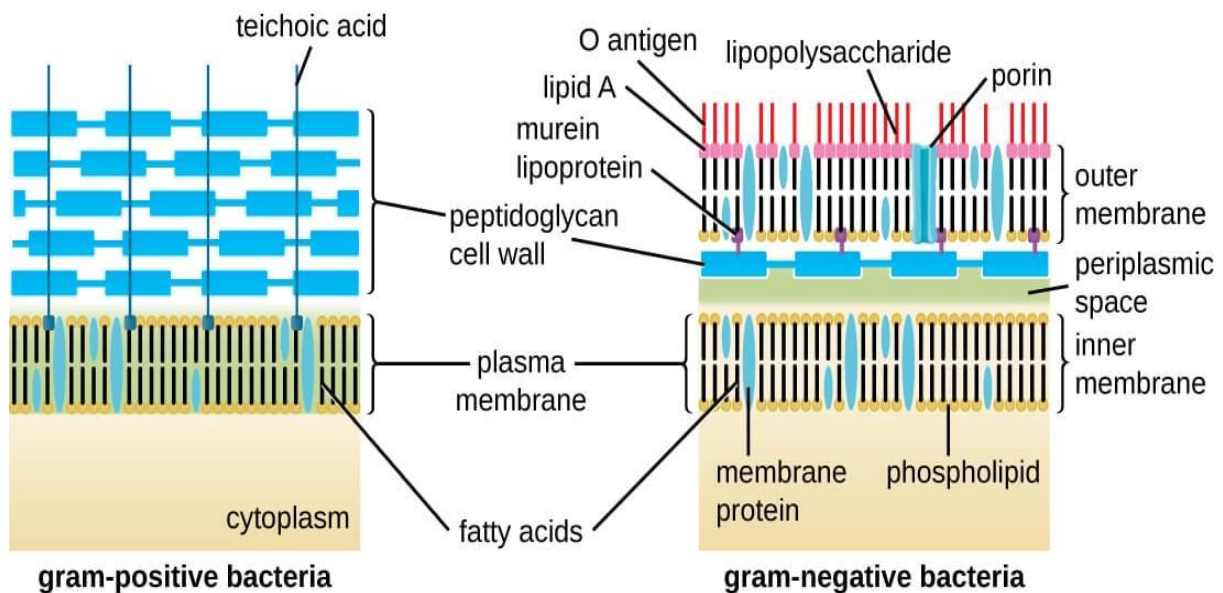
Slika 2. Kolonija izolata *Acinetobacter baumannii* na krvnom agaru (Izvor: Branka Bedenić, Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, KBC, Zagreb)

1.3. Antimikrobni lijekovi

Karakteristika antibiotika ili antimikrobnih lijekova je da pokazuju selektivnu toksičnost, odnosno da su netoksični ili prihvatljivo toksični za čovjeka, a toksični su za bakterije (22). Postoji nekoliko glavnih skupina mehanizama djelovanja antibiotika na bakterijsku stanicu; inhibicija sinteze staničnog zida (inhibicija sinteze stanične stijenke i ometanje funkcije citoplazmatske membrane), inhibicija sinteze proteina i inhibicija sinteze nukleinskih kiselina (77).



Slika 3. Mehanizmi djelovanja antimikrobnih lijekova (78)



Slika 4. Razlika građe staničnog zida između Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (79)

1.3.1. Antibiotici koji inhibiraju sintezu stanične stjenke

Čvrsta stanična stjenka održava oblik i veličinu bakterija te ih ujedno štiti od mehaničkih i osmotskih oštećenja. Osmotski tlak unutar bakterijske stanice je veći nego izvan nje, tako da oštećenja stanične stjenke uslijed djelovanja antibiotika mogu dovesti do lize stanice.

Za razliku od ljudskih stanica koje ne posjeduju peptidoglikan, stanični zid bakterija sadržava taj polimer čime se postiže visoka selektivna toksičnost. Čvrsti peptidoglikanski sloj postiže se poprečnim umrežavanjem polipeptidnih lanaca kao rezultat transpeptidacijske reakcije uz katalitičku aktivnost različitih enzima. Puno deblji i izraženiji sloj peptidoglikana imaju Gram-pozitivne bakterije u odnosu na Gram-negativne bakterije (77).

1.3.2. β -laktamski antibiotici

β -laktamski antibiotici vežu se na receptore PBP koji vežu penicilin, a koji se nalaze na citoplazmatskoj membrani bakterija i imaju funkciju transpeptidaza. Antibiotici koji se vežu na neke PBP molekule mogu uzrokovati elongaciju ili lizu bakterijskih stanica. Nakon vezanja β -laktamskog antibiotika na receptor dolazi do inhibicije transpeptidacijske reakcije i do prestanka sinteze peptidoglikana. U sljedećem koraku djelovanja dolazi do odstranjenja ili inaktivacije inhibitorских molekula autolitičkih enzima u stijenci bakterije čime se aktiviraju enzimi koji dovode do lize bakterija. Inhibicija transpeptidaza nastaje zbog strukturne sličnosti penicilina i cefalosporina s acil-D-alanil-D-alaninom koji je strukturna komponenta peptidoglikana. Transpeptidacijska reakcija uzrokuje gubitak D-alanina iz pentapeptida.

Promjene na PBP molekulama mogu dovesti do smanjenog afiniteta vezanja pojedinih β -laktamskih antibiotika, a to može dovesti do pojave rezistencije (77). Ovaj način djelovanja pokazuju β -laktamski antibiotici (penicilini, cefalosporini, monobaktami i karbapenemi), bacitracin i glikopeptidi (22).

To je mehanizam tipičan za MRSA sojeve. Oni imaju promijenjeni PBP-2a koji je pod kontrolom *mecA* gena. Taj promijenjeni PBP ne može vezati niti jedan β -laktamski antibiotik osim ceftarolina (cefalosporin 5. generacije koji ima 100 puta veći afinitet vezanja na PBP).

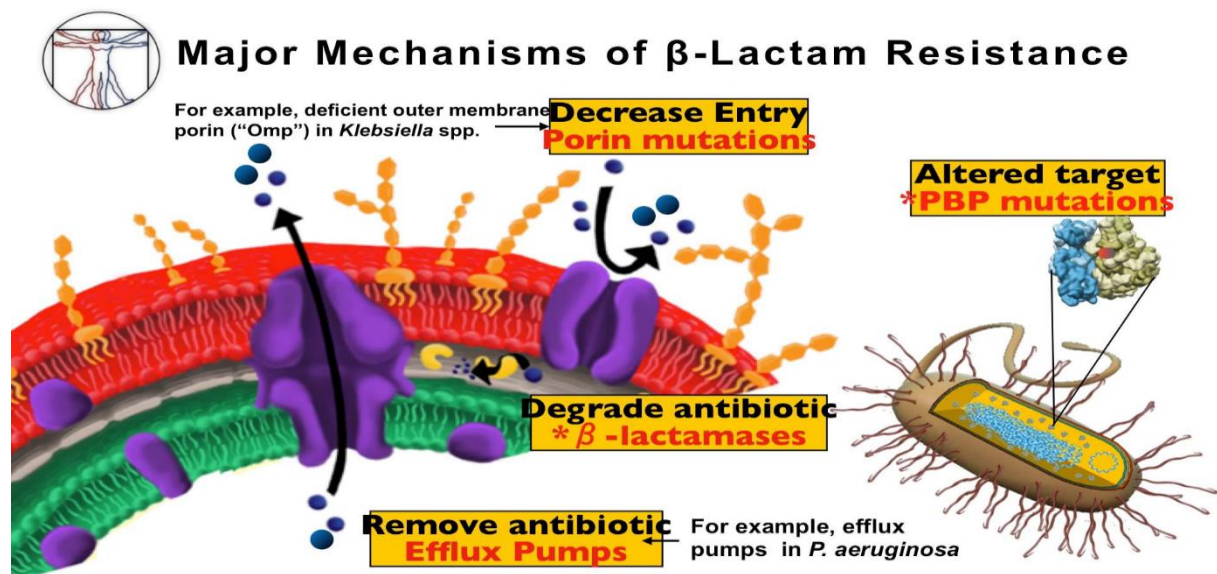
1.3.3. Karbapenemi

Na hrvatskom tržištu je dostupan imipenem, meropenem i ertapenem, a na američkom još i doripenem.

Karbapenemi pokazuju najširi potencijal i najširi spektar djelovanja protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Kao rezultat toga često se koriste kao antibiotici zadnje linije ili kao antibiotici zadnjeg izbora kod teških bolesnika ili kod rezistentnih bakterija (80, 81, 82, 83, 84). Djeluju snažno antibakterijski na Gram-pozitivne koke, većinu enterobakterija (uključujući i one rezistentne na ostale β -laktame i aminoglikozide), *Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. i *Serratia* spp (77).

To su semisintetski derivati tienamicina koje proizvodi *Streptomyces* spp. Tienamicini se razlikuju od ostalih β -laktama po tome što imaju transkonfiguraciju hidroksietil postraničnog lanca na poziciji 6, a i po tome što nemaju atom sumpora ili kisika u bicikličkoj jezgri. Takva stereokemija postraničnog lanca osigurava stabilnost prema β -laktamazama. Mehanizam djelovanja karbapenema očituje se u vezanju se na PBP 1 i PBP 2 molekule Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija kojima uzrokuju elongaciju i lizu bakterijskih stanica. Karbapenemi su otporni na hidrolizu β -laktamazama širokog i proširenog spektra klase A i kromosomskim AmpC β -laktamazama iz klase C. U klasi A postoje karbapenemaze koje razgrađuju karbapeneme kao što je KPC i GES, a u klasi D se nalaze karbapenem-hidrolizirajuće oksacilinaze.

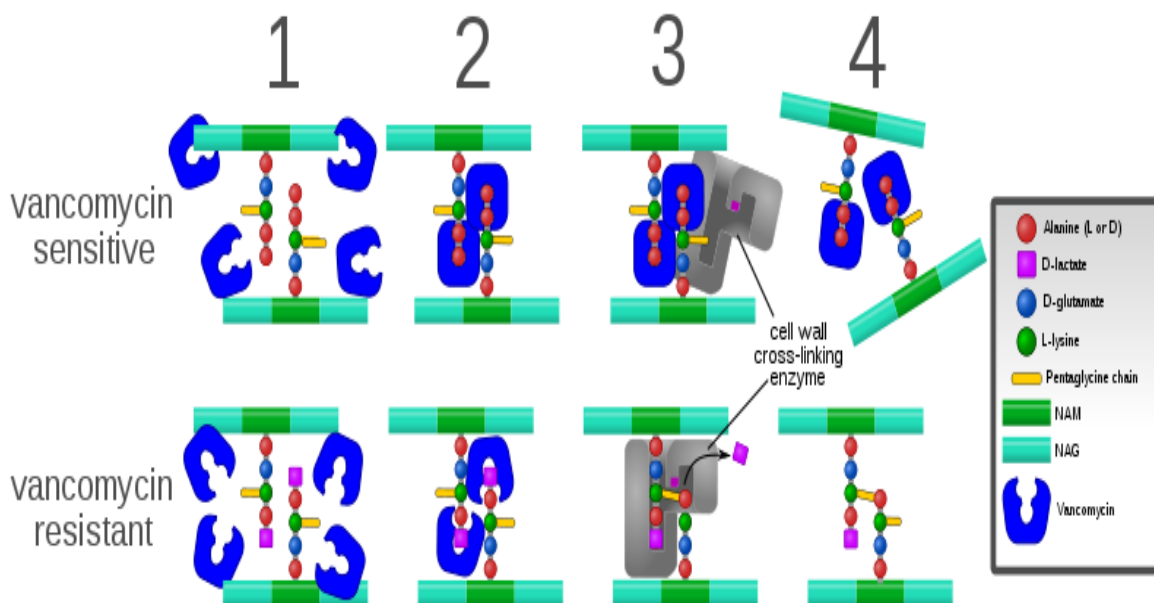
Meropenem pokazuje jaču djelotvornost prema Gram-negativnim bakterijama, posebno prema enterobakterijama, gonokokima, *H. influenzae* i *P. aeruginosa* (22). Ima prednost pred imipenemom jer se može primjenjivati bez cilastatina koji je nefrotoksičan jer nije osjetljiv na renalnu dihidropeptidazu. Imipenem ima bolji učinak prema Gram-pozitivnim bakterijama (85, 86). U novije vrijeme zapažen je dramatičan porast karbapenemaza pozitivnih izolata Gram-negativnih bakterija diljem svijeta. Najviše stope imaju zemlje jugoistične Europe posebno Grčka, Italija i Španjolska te zemlje Dalekog Istoka (87, 88). Više studija je pokazalo zabrinjavajući porast rezistencije na karbapeneme širom svijeta (89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96). Proizvodnjom enzima karbapenemaza smanjila se osjetljivost enterobakterija na karbapeneme. Osim karbapenemazama bakterije stvaraju rezistenciju i gubitkom porina vanjske membrane, pojačanim radom efluks pumpi kao i promjenama na PBP molekulama (22).



Slika 5. Najčešći mehanizmi rezistencije na β -laktamske antibiotike (97)

1.3.4. Glikopeptidi

Antibiotici velike molekulske mase koji djeluju samo na Gram-pozitivne bakterije jer ne mogu prolaziti kod staničnu stijenku Gram-negativnih bakterija (22). Gram-pozitivne bakterije imaju prekursore peptidoglikana na površini citoplazmatske membrane za razliku od Gram-negativnih bakterija koje su zaštićene vanjskom lipopolisaharidnom membranom neprobojnom za velike i hidrofobne molekule iz okoliša (100). Glikopeptidi se koriste za liječenje infekcija koje uzrokuju rezistentne Gram-pozitivne bakterije kao što je MRSA, MRSE i penicilin neosjetljivi pneumokok. Ne daju se ako je stafilokok osjetljiv na meticilin. U tom slučaju mogu se koristiti izoksazolil penicilini.



Slika 6. Mehanizam djelovanja vankomicina i prikaz rezistencije na vankomicin (101)

Opis slike broj 6.;

1. Vankomicin je dodan u bakterijsko okruženje za vrijeme dok bakterija pokušava sintetizirati novi stanični zid, koji još nije poprečno povezan.

2. Vankomicin prepoznaje i veže se na D-alanin-D-alanin na kraju peptidnih lanaca. Međutim kod rezistentnih bakterija D-alanin-D-alanin je zamijenjen D-alanin-D-laktatom pa se vankomicin ne može vezati.
3. Kod rezistentnih bakterija poprečna povezanost je uspješna. Međutim kod osjetljivih bakterija, vankomicinska veza s peptidnim lancima sprječava ih pravilnoj interakciji s enzimom odgovornim za poprečno povezivanje.
4. Kod rezistentnih bakterija stvorene su stabilne poprečne veze. Kod osjetljivih bakterija poprečne veze ne mogu biti formirane i stanični zid se raspada (101).

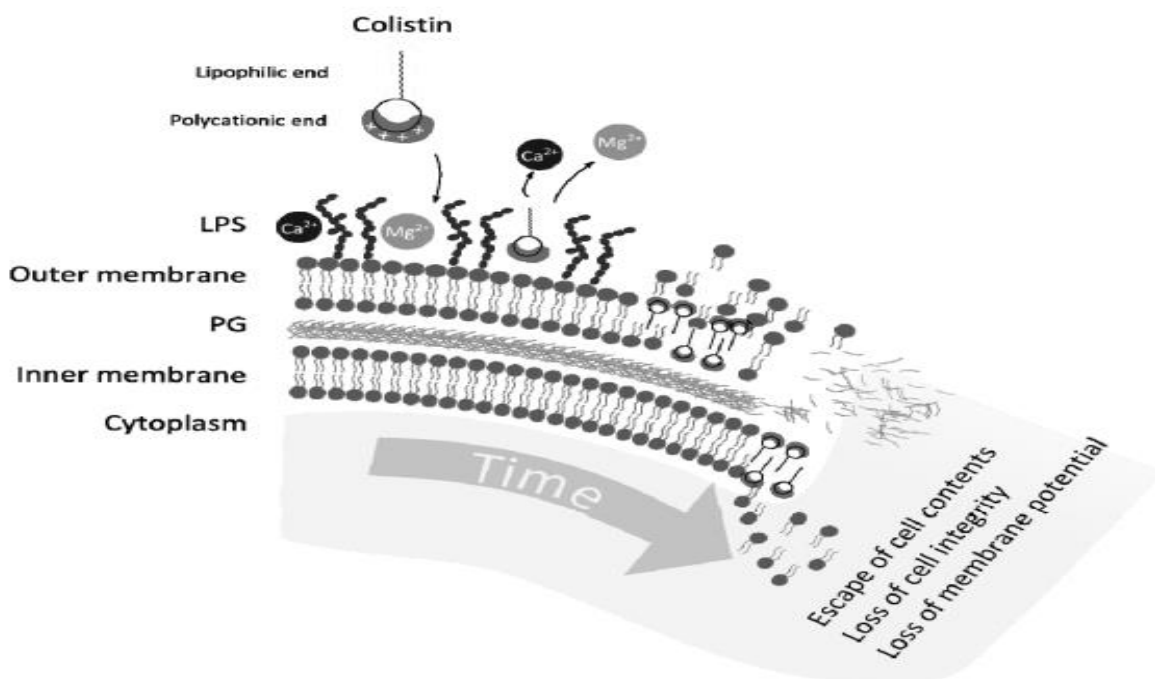
Često se koriste kao opcija liječenja kod teških infekcija uzrokovanih multirezistentnim Gram-pozitivnim patogenima kao što su *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. i *Clostridium difficile*. Oni predstavljaju lijekove zadnjeg izbora protiv MRSA (eng., meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus*) koji je značajan uzročnik hospitalnih infekcija koje imaju visoku stopu mortaliteta (102). Sprječavaju stvaranje stanične stijenke na razini pentapeptida u citoplazmi vezujući se na kraj pentapeptida na D-alanin-D-alanin te tako sprječavaju njegovu ugradnju u peptidoglikanski lanac. Glavni predstavnici ove skupine antibiotika su vankomicin i teikoplanin (22). Vankomicin je prirodni glikopeptid proizveden od aktinomicete *Amycolatopsis orientalis* i prvi put je uveden u kliničku primjenu davne 1958. godine (102). Opisana je rezistencija kod enterokoka gdje se D-alanin-D-alanin zamjenjuje D-alanin-D-laktatom, a za koji se potom glikopeptid ne može vezati. Kod stafilokoka dolazi do rezistencije hiperprodukcijom pentapeptida čega je posljedica da se vankomicin nije vezao na sve slobodne pentapeptide što je u konačnici rezultiralo nastavkom izgradnje stanične stijenke bakterije (22). Početkom 20. stoljeća raste broj vankomicin rezistentnih enterokoka (VRE) i vankomicin rezistentnih *S. aureus* (VRSA) što je potaklo znanstvenike da proizvedu drugu generaciju semisintetskih

glikopeptida (oritavancin i telavancin iz obitelji vankomicina) ili dalbavancin kao semisintetski derivat teikoplanina (103, 104).

1.3.5. Antibiotici koji djeluju na citoplazmatsku membranu

Citoplazmatska membrana okružuje citoplazmu bakterije, a služi kao selektivna permeabilna barijera kroz koju se vrši aktivni transport. Narušavanjem funkcionalnog integriteta citoplazmatske membrane dolazi do izlaska makromolekula iz bakterijske stanice što može dovesti do oštećenja ili do smrti bakterije. Temelj selektivne toksičnosti predstavlja citoplazmatska membrana bakterija koja se po svom sastavu razlikuje od stanične citoplazmatske membrane animalnih stanica te se lakše oštećuje djelovanjem određenih agenasa. Ovaj način djelovanja pokazuju antimikrobni lijekovi polimiksini (77). Kolistin je polipeptidni antibiotik širokog spektra iz skupine polimiksina dobrog djelovanja na Gram-negativne bakterije, uključujući multirezistentne izolate poput *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Klebsiella pneumoniae* (105). Kolistin je stari antibiotik otkriven 1947. godine koji je poznat još pod nazivom polimiksin E. Od 1959. godine se počeo koristiti za liječenje infekcija uzrokovanih Gram-negativnim bakterijama (106). Rezistencija bakterija na kolistin u to je doba bila jako mala (107, 108). Otkako je 1970. godine otkriveno da kolistin ima nefrotoksično i neurotoksično djelovanje njegova uporaba je naglo prekinuta te je zamijenjen cefalosporinima i drugim djelotvornim antibioticima koji su smatrani sigurnijima. Nagli prekid korištenja kolistina nakon otkrića o štetnom djelovanju utjecao je na prekid novih znanja i spoznaja te istraživanja vezanih uz ovaj antibiotik (106, 107, 108). Porast broja MDR potaknuo je mikrobiologe da se vrate starom, davno zaboravljenom antibiotiku kolistinu za koji je davno dokazano da je uspješan u borbi protiv Gram-negativnih bakterija (106, 108, 109, 110). Kolistin je lipopeptid kojeg proizvodi *Bacillus* spp. Postoji 5 grupa polimiksina (A-E), ali se

jedino polimiksin B (PMB) i polimiksin E tj. kolistin koriste u kliničkoj uporabi. Ostali polimiksini (A, C i D) pokazali su iznimnu toksičnost i ne koriste se liječenje. Polimiksin B je proizveden od *Bacillus polymyxa*, dok je polimiksin E, odnosno kolistin proizveden od *Bacillus colistinus* (111). Za kliničku primjenu postoje dvije vrste kemijske strukture kolistina. Prva je poznata kao kolistin sulfat dok je druga poznata kao natrijev kolistimetat. Kolistin sulfat je pokazao jako nefrotoksično i neurotoksično djelovanje te je isto potaknulo na daljnje istraživanje koje je 1959. godine dovelo do otkrića kolistimetata, derivata manje toksičnog kolistina (107). Zbog svoje izražene aktivnosti prema Gram-negativnim bakterijama koristi se kao „salvage“ terapija kod infekcija uzrokovanih multirezistentnim Gram-negativnim patogenima (6). Molekule polimiksina su kationi (pozitivan naboj) i djeluju na negativno nabijen fosfat u molekuli lipida A, sastavnom dijelu lipopolisaharida (LPS) na koji se vežu uz visoki afinitet. Vezanje kolistina na lipid A istiskuje dvovalentne katione kalcija i magnezija. Posljedica je destabilizacija i disrupcija vanjske membrane, dolazi do curenja sadržaja citoplazme u vanjski medij i do smrti stanice (112).



Slika 7. Mehanizam djelovanja kolistina (107)

Kolistin antagonizira djelovanje endotoksina vezanjem na lipidnu komponentu lipopolisaharida. Drugi mehanizam je inhibicija respiratornih enzima (NADH oksidoreduktaza). Urođena rezistencija je opisana u proteusa, providencije i seracije. Kolistin metasulfat je polianionski neaktivan prolijek koji je manje toksičan od kolistin sulfata. On nema antibakterijsku aktivnost i nakon intravenske primjene konvertira se polako u kolistin. Izlučuje se glomerularnom filtracijom, a 60% nepromjenjenog lijeka se nalazi u mokraći (113, 114, 115). Nažalost, u novije vrijeme sve češće se u medicinskoj literaturi pojavljuju izvještaji o rezistenciji na kolistin u enterobakterija i acinetobaktera (116, 117).

Rezistencija na kolistin nastaje zbog dodatka pozitivno nabijene 4-amino-deoxy-L-arabinoze (L-Ara4-N) ili fosfoetanolamina (PEtN) na mjesto negativno nabijene fosfatne grupe u lipidu A. Promjene u negativnom naboju sprječavaju vezanje polimiksina, a te promjene nastaju zbog mutacija u dvokomponentnom signalnom transdukcijskom sistemu (TCS) koji regulira gene potrebne za modifikaciju LPS-a. Rezistencija na kolistin u *Klebsiella* spp. nastaje kao posljedica mutacija u dvokomponentnom signalnom transdukcijskom sistemu. Ti sistemi reguliraju *pmrC* i *arnBCADTEF* operone, što modificira LPS. Kromosomska rezistencija u *Klebsiella* spp. očituje se vrijednostima MIK-a obično između 3 i 16 mg/L. Sistem *phoPQ* je negativno reguliran od *mgrB* gena. Inaktivacija *mgrB* gena (negativan feedback) uzrokuje upregulaciju *phoPQ* sistema. Mutacija ili prekid *mgrB* gena zbog insercijske sekvence uzrokuje smanjenu osjetljivost ili rezistenciju na kolistin. Insercijske sekvence: IS5-like, ISF1-like and ISKpn14 mogu uzrokovati prekid i inaktivaciju gena. Te insercijske sekvence se često nalaze uz *bla_{KPC}* gen. Akvizicija *bla_{KPC}* gena u sojeva s kolistinskom rezistencijom može uzrokovati pandrug rezistenciju. MIK-ovi izolata s mutiranim *mgrB* genom variraju između 4 i 64 µg/ml. RCS (eng., regulator of capsule synthesis) ima važnu ulogu u nastanku kolistinske rezistencije, modulira ekspresiju kapsularnog polisaharida, povećava produkciju kapsule i uzrokuje rezistenciju na antimikrobne peptide prisutne u dišnim putovima.

Rezistencija na kolistin u acinetobaktera nastaje zbog dva mehanizma, a to su gubitak lipopolisaharida vanjske membrane ili modifikacija lipida A (116, 117).

Rezistencija na kolistin u *Acinetobacter* spp. pokazuje dva osnovna mehanizma kolistinske rezistencije u *A. baumannii*. Prvi je modifikacija LPS pod djelovanjem fosfoetanolamina kao što je prethodno opisano u enterobakterija, a drugi je inaktivacija, insercija ili delecija gena koji su odgovorni za biosintezu lipida A (*lpxA*, *lpxC* i *lpxD* geni) uslijed čijih mutacija dolazi do potpunog gubitka lipida A. Zbog toga kolistin ne može stupiti u interakciju s vanjskom membranom i nastaje rezistencija s izrazito visokim vrijednostima MIK-a (>128 mg/L). Acinetobakteri nemaju *phoPQ* sistem kao pseudomonas i enterobakterije. Plazmidna rezistencija na kolistin uzrokovana je *mcr-1* i *mcr-2* genima koji se nalaze na IncI2 plazmidu i opisana je kod izolata *E. coli* u ljudi i životinja u Kini. Kodira fosfoetanolamin transferazu, enzim koji dodaje fosfoetanolamin (PEtN) u lipid A. Gen *mcr-1* identificiran je u Belgiji, Maleziji, Švicarskoj, Francuskoj, Nizozemskoj i Njemačkoj (7, 108, 118). Epidemija uzrokovana kolistin rezistentnim izolatima *K. pneumoniae* pozitivnim na KPC-2 β -laktamazu opisana je u Italiji (119). U Tunisu su opisani sojevi *K. pneumoniae* pozitivni na OXA-48 i rezistentni na kolistin (120). Rezistencija na kolistin je nastala zbog insercijske sekvence u *mgrB* genu koja uzrokuje disrupciju gena (121).

U Hrvatskoj je kolistin rezistentni soj pronađen kod soja *E. aerogenes* koji je izoliran 2016. godine u bolnici u Puli iz trahealnog aspirata. Drugi kolistin rezistentni *E. aerogenes* izoliran je kod istog bolesnika iz hemokulture. Rezistencija na kolistin se tumači gubitkom porina vanjske membrane ili pojačanom aktivnošću efluks pumpi kao što je prethodno opisano u izolatu *E. aerogenes* u Francuskoj (36). Veliki problem predstavljaju teške infekcije Gram-negativnim bakterijama poput *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* i *Klebsiella pneumoniae* koje postaju otporne na većinu dostupnih antibiotika. Razvoj rezistencije na kolistin počinje se pojačavati početkom devedestih godina uslijed pojačanog korištenja ovog

antibiotika. Rezultat toga su prijavljeni kolistin rezistentni sojevi kod mnogih vrsta kao što su *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* i *A. baumannii* (107).

Indikacija za uvođenje kolistina je infekcija MDR ili XDR Gram-negativnim bakterijama. MDR-multirezistentni fenotip znači rezistenciju na najmanje jedan antibiotik u tri skupine, a XDR odnosno ekstenzivno rezistentan je osjetljiv na samo dva antibiotika iz različitih skupina.

Kolistin je zadnja terapijska opcija zbog nefrotoksičnosti i neurotoksičnosti (110). *In vitro* kolistin pokazuje dobar učinak prema enterobakterijama kao što su *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp. i *Morganella morganii* kao i prema nefermentativnim bakterijama kao što su *P. aeruginosa* i *A. baumannii*. Antibiotik pokazuje dobru aktivnost i prema multirezistentnim sojevima kao što su *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* i *Klebsiella* spp (108). Prema smjernicama CLSI (eng., clinical and laboratory standards institute) rezistencija je ako soj pokazuje MIK (eng., minimum inhibitory concentration) veći od 2 mg/L. To se odnosi na sve Gram-negativne bakterije (122). Urođenu otpornost na kolistin pokazuju Gram-pozitivne bakterije, anaerobi i *P. mirabilis*. To su vrste s urođenom rezistencijom na kolistin. Kod Gram-pozitivnih vrsta to je posljedica toga što nemaju vanjsku membranu koja je ciljno mjesto djelovanja polipeptidnih antibiotika (108). Neki autori navode da se broj osoba s nefrotoksičnim poremećajima nakon korištenja kolistina smanjio za razliku od prijašnjih prvotnih studija (110). Kolistin pokazuje djelotvornost u liječenju sepse, pneumonije i infekcija središnjeg živčanog sustava, ali nije dobar za infekcije mokraćnog sustava, kože i mekih tkiva (123). Faktori koji utječu na nefrotoksičnost su starija dob, prijašnje bubrežne bolesti i kombinacija s drugim nefrotoksičnim antibioticima (107, 124). Podaci iz 2013. godine pokazuju prevalenciju nefrotoksičnosti uzrokovanu kolistinom između 11% i 24% (107). Nefrotoksičnost kolistina se povećava u prisustvu diuretika Henleove petlje.

Brojene kliničke studije pokazale su sinergiju između kolistina i drugih antibiotika.

Studija koja je ispitala 53 bolesnika s cističnom fibrozom i kroničnom infekcijom pluća uzrokovanom *P. aeruginosa* pokazala je bolji učinak kombinacije antibiotika kolistina s drugim antibioticima poput aztreonama, ceftazidima, imipenema, ciprofoksacina i piperacilina u odnosu kada je kolistin primijenjen sam u monoterapiji (106, 110, 125). U studiji koja je ispitala kombinaciju kolistina i karbapenema, tigeciklina ili rifampicina kod *K. pneumoniae* (KPC) također se došlo do zaključka da je kombinirana terapija pokazala bolji rezultat nego monoterapija kolistinom (126). Kombinacija kolistina i sulbaktama, imipenema ili tigeciklina pokazala je sinergijski efekt kod infekcija uzrokovanih multirezistentnim sojem *A. baumannii* (105). Do sada kolistin nije preporučen kao empirijska terapija iako kombinacije s drugim antibioticima poput karbapenema i rifampicina pokazuju dobru sinergiju u *in vitro* studijama. Da bi se napravio korak dalje i kako bi kolistin postao empirijska terapija potrebno je puno više studija *in vivo* (105).

Racionalna primjena i praćenje uspjeha terapije kolistinom protiv multirezistentnih sojeva Gram-negativnih bakterija preporuča se u kombinaciji s drugim antibioticima, ne preporuča se za empirijsku terapiju kao ni za monoterapiju, a sve kako bi se spriječila pojava panrezistentnih sojeva.

Danas širom svijeta veliki problem predstavlja pojava teških infekcija Gram-negativnim bakterijama *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii*, otpornih na većinu klasa komercijalno dostupnih antibiotika kao i nedostatak novih antibiotika s aktivnošću protiv tih bakterija. Stoga su ponovno razmotrene terapijske mogućnosti polimiksina i došlo je do ponovne uporabe ovih polipeptidnih antibiotika, odnosno polimiksina B i kolistina (127).

Sinergije antibiotika

Studija koja je provedena *in vitro* i uključivala je 12 karbapenem rezistentnih sojeva *A. baumannii* pokazala je dobru osjetljivost sojeva kada je primijenjena kombinacija antibiotika kolistina i meropenema u odnosu kada je meropenem ili kolistin primijenjen sam u monoterapiji. Frakcionalni inhibitorski koncentracijski indeks (FICI) iznosio je $\leq 0,5$ te su antibiotici u kombinaciji mogli ostvariti baktericidni učinak nakon 24 sata u vrijednosti $3.8 \log_{10}$ (98). Istraživanje koje je uključivalo 56 objavljenih studija, 20 vrsta različitih antibiotika i 1228 izolata *A. baumannii* pokazalo je da kombinacija antibiotika meropenema s polimiksinom B, rifampicinom i amikacinom mogu postići visoki sinergijski učinak *in vitro* protiv multirezistentnih izolata *A. baumannii* dok bi kolistin i sulbaktam u kombinaciji s meropenemom trebali predstavljati drugi izbor u liječenju. Studija je pokazala da najmanju sinergiju pokazuju kombinacije ciprofloksacina i tigeciklina s meropenemom (99).

1.3.6. Antibiotici koji ometaju sintezu proteina

U ovu skupinu antimikrobnih lijekova ubrajaju se tetraciklini, makrolidi, aminoglikozidi i kloramfenikol (77).

1.3.7. Antibiotici koji djeluju na sintezu nukleinskih kiselina

Na sintezu nukleinskih kiselina djeluju nitrofurantoin, kinoloni, trimetoprim, rifampicini, sulfonamidi i metronidazol (22).

1.4. β -laktamaze

Bakterijski enzimi koji hidrolizom amidne veze u β -laktamskom prstenu antibiotika razgrađuju β -laktamski prsten penicilina, cefalosporina, monobaktama i karbapenema čineći navedene antibiotike nedjelotvornima nazivaju se β -laktamaze (128, 129).

PBP je proteinski receptor bakterijske stanice koji predstavlja ciljno mjesto vezanja β -laktamskih antibiotika. Enzimi β -laktamaze otvaraju β -laktamski prsten antibiotika i čine ga nedjelotvornim nekovalentnim vezanjem aktivnog serinskog mjesta enzima s antibiotikom stvarajući nekovalentni Michaelisov kompleks. Enzimi sa serinskim aktivnim mjestom inaktiviraju peniciline, cefalosporine i monobaktame. Vezanjem hidroksilne skupine aktivnog serinskog mjesta enzima s β -laktamskim prstenom antibiotika dolazi do stvaranja kovalentnog kiselog estera čijom hidrolizom se oslobađa nedjelotvorni inaktivirani antibiotik i slobodni enzim (129).

Glavni mehanizam rezistencije kliničkih izolata na β -laktamske antibiotike predstavlja produkcija β -laktamaza koje proizvode Gram-negativne, ali i Gram-pozitivne bakterije. Razlika je u tome što se kod Gram-negativnih bakterija β -laktamaze nalaze u periplazmatskom prostoru pa djeluju na antibiotik i prije dolaska na ciljno mjesto, dok se kod Gram-pozitivnih bakterija β -laktamaze izlučuju najčešće izvan stanice, ali se mogu naći vezane i za citoplazmatsku membranu (129). Sve učestalija primjena antibiotika dovela je do prilagodbe Gram-negativnih bakterija koje su razvile nove mehanizme obrane prema β -laktamskim antibioticima bilo produkcijom mnogostrukih enzima, odnosno multiplih β -laktamaza ili produkcijom enzima koji djeluju na nove supstrate (129, 130, 131). Propusnost vanjske membrane Gram-negativnih bakterija, afinitet vezanja za određeni supstrat, količina enzima i brzina hidrolize supstrata predstavljaju čimbenike djelotvornosti β -laktamaza (130). Različite karakteristike enzima β -laktamaza dovele su do mnogih pokušaja njihove klasifikacije na osnovu biokemijskih karakteristika (132). β -laktamaze se međusobno razlikuju prema fenotipskim obilježjima i

redosljedju aminokiselina, a do danas je poznato preko 400 ovih enzima (133). Prema genetskom podrijetlu razlikuju se plazmidne i kromosomske β -laktamaze (129). Za plazmidne β -laktamaze smatra se da su potekle od kromosomskih β -laktamaza, a dokazane su u različitim vrsta enterobakterija kao i u vrsta iz roda *Haemophilus*, *Neisseria* i *Staphylococcus*. Prenose se prenosivim genetskim elementima tj. plazmidima te za razliku od kromosomskih β -laktamaza nisu specifične za vrstu već imaju mogućnost širenja između različitih vrsta kod Gram-pozitivnih bakterija transdukcijom preko bakteriofaga, a kod Gram-negativnih bakterija konjugacijom (129, 130, 131).

Razlikuju se konstitutivne i inducibilne kromosomske β -laktamaze koje su kodirane kromosomskim genima bakterije.

Karakteristika konstitutivnih kromosomskih β -laktamaza očituje se u njihovom kontinuiranom stvaranju neovisno o prisutnosti β -laktamskog antibiotika (129, 130). β -laktamaze koje se stvaraju u velikim količinama prilikom kontakta bakterijske stanice i β -laktamskog antibiotika nazivaju se inducibilnim kromosomskim β -laktamazama (133, 134).

1.4.1. Klasifikacija β -laktamaza

Razlikuje se funkcionalna (fenotipska) i molekularna podjela β -laktamaza. Funkcionalna podjela temelji se na određivanju različitih parametara kao što su molekularna težina, osjetljivost na inhibitore, hidrolitički spektar i izoelektrična točka dok se molekularna podjela zasniva na određivanju redosljeda aminokiselina (132, 135). Zbog složenosti i različitosti β -laktamaza do danas su se zadržale uglavnom dvije podjele, a to su funkcionalna podjela po Bush i sur. te molekularna podjela prema Ambleru (132, 135, 136).

1.4.2. Funkcionalna klasifikacija β -laktamaza

Podjelom prema K. Bush u grupu 1 ubrajaju se kromosomski kodirane cefalosporinaze zastupljene kod brojnih enterobakterija koje pokazuju bolju hidrolizu cefalosporina od

penicilina, dobro razgrađuju cefemicine poput cefoksitina i nisu inhibirane klavulanskom kiselinom. Podgrupa 1e koja se još naziva AmpC β -laktamazama proširenog spektra pokazuje bolju učinkovitost prema oksimino cefalosporinima koja je još jače izražena uz promjene na porinima. Prema molekularnoj podjeli ova grupa odgovara grupi C.

Grupa 2 uključuje serinske β -laktamaze u koje se ubrajaju penicilaze, ceflosporinaze te enzimi koji su inhibirani klavulanskom kiselinom u cijelosti, varijabilno ili nisu inhibirani klavulanskom kiselinom. Unutar ove grupe koja prema molekularnoj strukturi pripada grupama A i D postoji 12 podgrupa.

Unutar podgrupe 2a nalaze se hidrolitički aktivni enzimi stafilokoka i enterokoka koji djeluju na peniciline. Riječ je uglavnom o enzimima kromosomskog porijekla, osim plazmidnih penicilaza stafilokoka. Prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi A.

U podgrupu 2b spadaju ESBL koje podjednako dobro djeluju na peniciline i cefalosporine te su dobro inhibirane tazobaktamom i klavulanskom kiselinom. Obuhvaćaju plazmidski kodirane enzime TEM-1, TEM-2 i SHV-1, a koji prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi A.

2be podgrupa uključuje ESBL koje hidroliziraju peniciline, cefalosporine, oksimino cefalosporine (ceftriakson, ceftazidim, cefotaksim), monobaktame poput aztreonama, ali i cefalosporine četvrte generacije poput cefepima.

Uz TEM i SHV skupinu enzima β -laktamaza razlikuje se i CTX-M (eng., cefotaximases) grupa ESBL koja bolje hidrolizira cefotaksim i ceftriakson u odnosu na ceftazidim. Cefepim je četvrta generacija i obično ima nešto niže MIK-ove od treće generacije.

Za uočavanje enzima podgrupe 2b u rutinskom radu pomaže činjenica da su enzimi ove skupine dobro inhibirani klavulanskom kiselinom. Prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi A.

ESBL spadaju u grupu 2be po Bushu i to sve ESBL uključujući sve tri važne porodice: TEM, SHV, CTX-M. Uglavnom su osjetljive na tazobaktam, a imaju stečenu rezistenciju na inhibiciju klavulanskom kiselinu i sulbaktamom. Prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi A.

U grupu 2br spadaju inhibitori rezistentne TEM β -laktamaze. To su one koje nisu osjetljive na inhibiciju klavulanskom kiselinom. Uključuje TEM enzime povećane sposobnosti hidrolize cefalosporina proširenog spektra i monobaktama u kombinaciji s otpornošću na klavulansku kiselinu, sulbaktam i tazobaktam. Prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi A.

Podgrupu 2c čine penicilinaze koje hidroliziraju benzilpenicilin, karbencilin, tikarcilin, oksacilin i kloksacilin. Inhibirane su sulbaktamom, tazobaktamom i klavulanskom kiselinom. Prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi A.

Karbapenemaze uskog spektra također spadaju u podgrupu 2c, a karakterizira ih sposobnost hidrolize samo penicilina te prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi A.

β -laktamaze podgrupe 2d brže hidroliziraju oksacilin i kloksacilin od benzilpenicilina te su ti enzimi poznati pod nazivom OXA (eng., oxacilin-hydrolysing), a prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi D.

2de podgrupa obuhvaća ESBL koji hidroliziraju oksimino cefalosporine, kloksacilin ili oksacilin, ali ne hidroliziraju karbapeneme. Prema molekularnoj podjeli također pripadaju grupi D.

Skupina OXA enzima 2df uz hidrolizu oksacilina i kloksacilina pokazuje sposobnost hidrolize karbapenema. Najčešće su prisutni kod izolata *Acinetobacter baumannii* i kodirani su kromosomski smještenim genima. Prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi D.

U podgrupu 2e ubrajaju se cefalosporinaze proširenog spektra koje nisu inhibirane aztreonamom, ali jesu klavulanskom kiselinom. Glavni predstavnici grupe su inducibilne,

kromosomalne cefalosporinaze vrste *Proteus*, a mnogi od tih enzima danas su poznati kao ESBL. Prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi A.

Serinske karbapenemaze podgrupe 2f djeluju na karbapeneme te su bolje inhibirane tazobaktamom nego klavulanskom kiselinom.

Enzimi iz te podgrupe, poput SME i IMI-1, slabo hidroliziraju cefalosporine proširenog spektra i izuzetno dobro aztreonam.

Podgrupa 2f uključuje KPC i GES (Guinea extended-spectrum) enzime.

U 3. grupu ubrajaju se metalo- β -laktamaze koje sadrže u aktivnom mjestu cink. Enzimi su osjetljivi na inhibiciju metalnim kelatorima. U tu skupinu spadaju stečene MBL iz IMP, VIM, NDM, SIM, DIM i AIM serije. Djeluju na sve β -laktamske antibiotike osim monobaktama. Nisu inhibirani tazobaktamom i klavulanskom kiselinom, ali se mogu inhibirati s EDTA. Najvažniji predstavnici grupe su VIM-1 i IMP-1. Grupa 3 metalo- β -laktamaza podijeljena je na 3 funkcionalne podgrupe 3a, 3b i 3c kao i na 3 molekularne podgrupe B1, B2 i B3. Prema molekularnoj podjeli svrstani su u grupu B.

U grupu 4 ubrajaju se penicilinaze koje nisu inhibirane klavulanskom kiselinom i koje nisu svrstane ni u jednu grupu prema molekularnoj podjeli (132, 135, 136).

Bush-Jacoby group	Molecular class (Ambler's scheme)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by:		Representative Enzyme(s)
			Clavulanic acid	EDTA	
1 CMY-2, FOX-1, MIR-1	C	Cephalosporins	-	-	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1,
1e	C	Cephalosporins	-	-	GC1, CMY-37
2a	A	Penicillins	+	-	PC-1
2b	A	Penicillins, early cephalosporins	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be M-15, PER-1, VEB-1	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams		+	TEM-3, SHV-2, CTX-
2br	A	Penicillins	-	-	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams		-	TEM-50
2c	A	Carbenicillin	+	-	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicillin, cefepime	+	-	RTG-4
2d	D	Cloxacillin	Variable	-	OXA-1, OXA-10
2de	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	-	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenems	Variable	-	OXA-23, OXA-48
2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	+	-	CepA
2f	A	Carbapenems	Variable	-	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B(B1)	Carbapenems	-	+	IMP-1, VIM-1, CerA, IND-1
3b	B(B2)	Carbapenems	-	+	CphA, Sfh-1

Source: Bush et al. (2010).

Slika 8. Funkcionalna klasifikacija β -laktamaza prema Bushu i suradnicima (137)

1.4.3. Molekularna klasifikacija β -laktamaza

Do danas postoji nekoliko klasifikacija β -laktamaza, ali se trenutno širom svijeta najčešće koristi klasifikacija po Ambleru koja postoji od 1980. godine i još je aktualna, a temelji se na sličnosti sekvenci aminokiselina i dijeli na četiri velike klase A, C i D serinske β -laktamaze i klasa B u koju spadaju tzv. metalo- β -laktamaze koje trebaju cink kao kofaktor (135, 138, 139).

Ova podjela β -laktamaza temelji se na slijedu nukleotida i aminokiselina u enzimima. Prema Ambleru molekularna podjela β -laktamaza uključuje grupe A, B, C i D.

U grupu A ubrajaju se penicilinaze koje hidroliziraju peniciline i starije cefalosporine, ESBL enzimi koji hidroliziraju novije cefalosporine i karbapenemaze koje hidroliziraju peniciline, cefalosporine i karbapeneme. Enzimi ove grupe mogu biti djelomično ili potpuno inhibirani tazobaktamom ili klavulonatom. Grupa A obuhvaća vrsno specifične i/ili stečene β -laktamaze

koje mogu biti konstitutivne ili inducibilne, a odgovara velikom broju enzima grupe 2 po Bushu (136, 140, 142).

Grupa C uključuje AmpC β -laktamaze proširenog spektra i cefalosporinaze koje pokazuju bolju sposobnost hidrolize prema cefalosporinima nego prema penicilinima.

Grupa D uključuje oksacilinaze sa sposobnošću hidrolize oksacilina i kloksacilina kao i druge β -laktamaze koje imaju sposobnost hidrolize karbapenema kao što je OXA-48 u enterobakterija. U grupu D spadaju i karbapenem hidrolizirajuće oksacilinaze tipične za vrstu *A. baumannii*: OXA-23-like, OXA-40-like, OXA-58-like, OXA-143-like i OXA-235-like.

MBL enzimi iz grupe B u aktivnom mjestu sadrže cinkove ione (Zn^{2+}), a enzimi iz grupa A, C i D sadrže kao aktivno mjesto serin.

MBL enzimi iz grupe B hidroliziraju sve β -laktame izuzev aztreonama i ne mogu se inhibirati klavulanatom ili tazobaktamom. Enzimi ove grupe inhibiraju se metalnim kelatorima kao što je EDTA, merkaptopropionska i merkaptosumporna kiselina koje inaktiviraju cink. Predstavnici ove grupe su NDM, VIM i IMP β -laktamaze (132, 135, 136, 140).

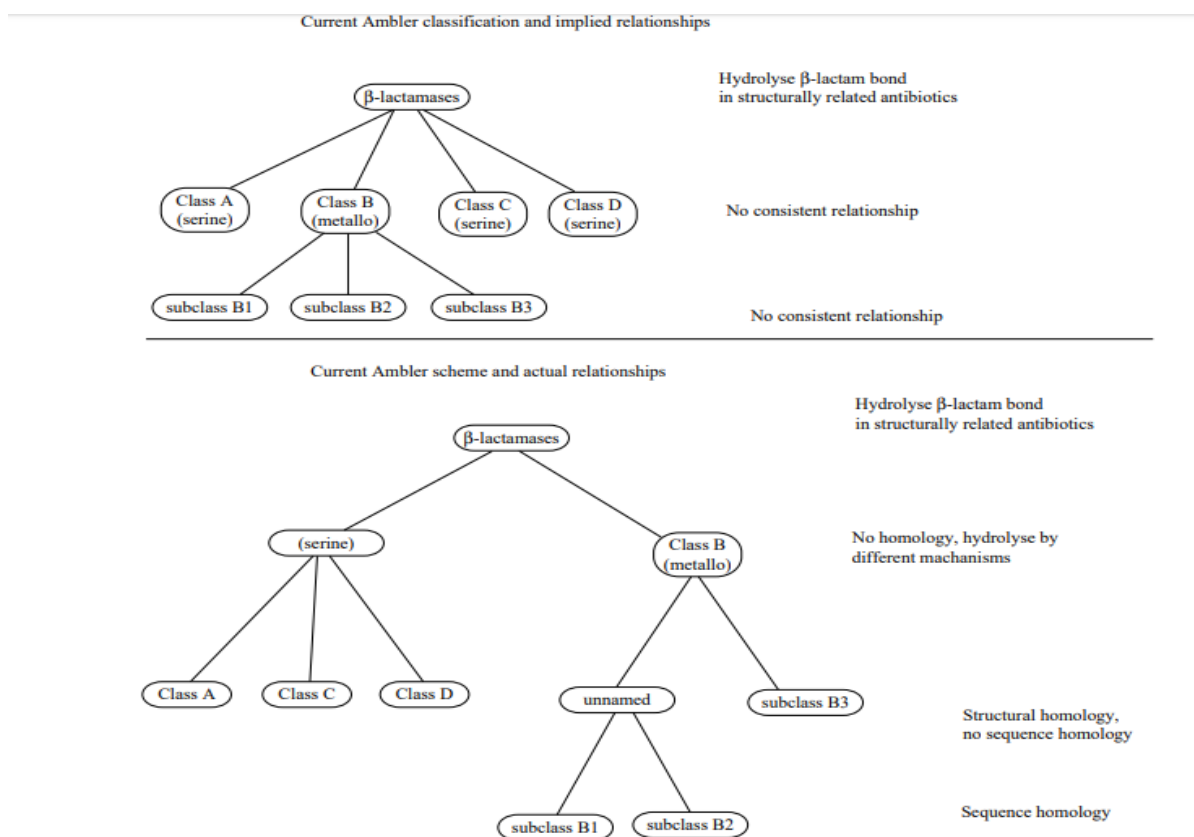


Figure 1. Schematic diagram of Ambler classification system.

Slika 9: Shematski prikaz molekularne klasifikacije β -laktamaza po Ambleru (142)

Type	Ambler Molecular Class	Characteristics	Examples of Enzymes
Narrow-spectrum β -lactamases ^{12,18,19}	A	Hydrolyze penicillin; produced primarily by <i>Enterobacteriaceae</i>	Staphylococcal penicillinase, TEM-1, TEM-2, SHV-1
Extended-spectrum β -lactamases ²⁰	A	Hydrolyze narrow and extended-spectrum β -lactam antibiotics	SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
Serine carbapenemases ²⁰	A	Hydrolyze carbapenems	KPC-1, IMI-1, SME-1
Metallo- β -lactamases ^{21,22}	B	Hydrolyze carbapenems	VIM-1, IMP-1, NDM-1
Cephalosporinases ^{10,23,24}	C	Hydrolyze cephamycins and some oxyimino β -lactams; inducible; chromosomally mediated	AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
OXA-type enzymes ²⁵⁻²⁷	D	Hydrolyze oxacillin, oxyimino β -lactams, and carbapenems; produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA enzymes

Slika 10. Molekularna klasifikacija β -laktamaza po Ambleru (143)

Karbapenemaze uključene u stečenu otpornost pripadaju Ambler klasi A (serinske β -laktamaze), klasi B (metallo- β -laktamaze) ili klasi D (OXA-48-like) β -laktamaze (144).

β -laktamaze klasa A prema Ambleru

Najznačajnija karbapenemaza ove grupe je plazmidno kodirana KPC (eng., *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) koja je prvi put otkrivena u Južnoj Karolini 1996. godine nakon čega se vrlo brzo proširila po cijelom svijetu. KPC-2 je otkrivena na području Baltimora, a KPC-3 na području New Yorka (145).

Uz KPC plazmidno kodirana je i GES karbapenemaza koja je prvi put dokazana u izolatu *K. pneumoniae* u Francuskoj 1998. godine dok su glavni predstavnici kromosomski kodiranih NMC-A, SME-1, SME-2, SME-3 i IMI-1 u *E. cloacae* i *S. marcescens*.

IMI enzim otkriven je 1984. godine u SAD u izolatima *Enterobacter cloacae*, SME enzim izoliran je 1982. godine u izolatima *Serratia marcescens* u Londonu, a NMC enzim 1990. godine u Francuskoj (146, 147). Ova grupa karbapenemaza uspješno hidrolizira karbapeneme, aztreonam, peniciline te prvu i drugu generaciju cefalosporina. Najčešće se javljaju u izolatima *K. pneumoniae*, ali su također opisane i u *E. coli*, *Enterobacter* spp. te rjeđe u ostalim enterobakterijama. Grupa A karbapenemaza uključuje karbapenemaze koje su inhibirane klavulanskom kiselinom (22). Klasa A β -laktamaza sadrži penicilaze Gram-pozitivnih bakterija kao što su *Staphylococcus aureus* kao i plazmidne β -laktamaze širokog spektra (TEM-1 i TEM-2) Gram-negativnih bakterija (138). Mutacijom gena SHV-1, TEM-1 i TEM-2 β -laktamaza širokog spektra uslijed pretjeranog korištenja β -laktamskih antibiotika došlo je do pojave β -laktamaza proširenog spektra (ESBL) sojeva (148). β -laktamaze proširenog spektra razgrađuju oksimino cefalosporine i aztreonam, a najčešće se pojavljuju u izolatima enterobakterija (149). TEM β -laktamaze su najčešće β -laktamaze Gram-negativnih izolata. Poznato je da TEM-2

potječe od TEM-1 i da obje imaju uzak spektar djelovanja. Posljedica zamjene aminokiselina na aktivnim mjestima Glu104Lys i Gly238Ser dovela je do stvaranja prvog TEM-3 ESBL enzima (129, 150, 151). TEM varijante uglavnom bolje hidroliziraju ceftazidim u odnosu na cefotaksim i ceftriakson. Intrinzična rezistencija kod *K. pneumoniae* uzrokovana je kromosomski kodiranom β -laktamazom širokog spektra SHV-1. Dokazana je produkcija SHV-1 β -laktamaza i kod drugih enterobakterija, ali kod njih nisu kodirane kromosomski već plazmidno. Učinkovitu hidrolizu ceftazidima pokazuju SHV-5 i SHV-12 β -laktamaza (141, 152).

Većina SHV varijanti bolje hidrolizira ceftazidim u odnosu na cefotaksim i ceftriakson.

CTX-M (cefotaximase Munich) β -laktamaze su plazmidno posredovani enzimi s tendencijom brzog rasta. Prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi A, a prema funkcionalnoj svrstani su u podgrupu 2be (135, 136). Najveća zastupljenost otkrivena je i dokazana kod izolata *K. pneumoniae* i *E. coli*, a rjeđe kod ostalih vrsta enterobakterija (150). Do danas je širom svijeta poznato preko trideset varijanti ovog enzima, a prvi put CTX-M β -laktamaza je izolirana u Njemačkoj 1989. godine iz izolata *E. coli*. Prva takva s preferencijalnom hidrolitičkom sposobnošću prema cefotaksimu je zapravo bila FEC β -laktamaza izolirana u Japanu iz fecesa psa koji je korišten u farmakokinetским istraživanjima β -laktamskih antibiotika. CTX-M β -laktamaze za razliku od TEM i SHV bolje hidroliziraju cefotaksim i ceftriakson u odnosu na ceftazidim pa spadaju u cefotaksimaze. Na početku su bile dominantne među izvanbolničkim izolatima *E. coli*, ali danas dominiraju i među hospitalnim izolatima (130, 153, 154). Rasprostranjenost na svim kontinentima pokazuje CTX-M-15 β -laktamaza. Za razliku od većine ostalih CTX-M varijanti dobro hidrolizira i ceftazidim što se manifestira visokim MIK-ovima ceftazidima. To je dominantan tip ESBL danas u Hrvatskoj. U ranim devedesetima dominirale su SHV varijante SHV-2, SHV-5 i SHV-2a (155, 156, 157, 158, 159, 160, 161). Ovi

enzimi podijeljeni su u 5 grupa: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 i CTX-M-25 (162).

CTX-M β -laktamaze dobro hidroliziraju cefotaksim i ceftriakson, a neke alelske varijante kao što je CTX-M-15 mogu hidrolizirati i ceftazidim (163, 164). Klasu A čine i karbapenemaze koje mogu biti kromosomski kodirane (SME, NmcA, SFC-1, BIC-1, PenA, FPH-1, SHV-38), plazmidno kodirane (KPC, GES, FRI-1) ili oboje kao IMI (165, 166).

Navedene karbapenemaze hidroliziraju peniciline, I. i II. generaciju cefalosporina, aztreonam i imipenem. Ne djeluju na cefalosporine treće i četvrte generacije. Inhibirani su inhibitorima β -laktamaza (klavulanat, tazobaktam i sulbaktam).

Kromosomski kodirane karbapenemaze grupe A

Uzrokuju rezistenciju na starije cefalosporine i imipenem, a štede meropenem i novije cefalosporine. Vrlo su rijetke i nemaju veliko kliničko značenje. Iako pokazuju rezistenciju na karbapeneme obično ostaju osjetljivi na celalosporine proširenog spektra.

Porodice SME i IMI/NmcA pronađene su kod malog broja izolata *Enterobacter* i *Serratia* (15, 167, 168).

SME (*Serratia marcescens* enzyme) je prvotno pronađen kod izolata *S. marcescens* u Engleskoj nakon čega su se pojavile varijante tog enzima na osnovu zamjene samo jedne ili dvije aminokiseline u Kanadi, Švicarskoj, Americi i Argentini (15, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176). IMI/NmcA (IMIPenemase/Non-metallo-carbapenemaseA) su enzimi koji se u osnovi sastoje od dvije podgrupe IMI i NmcA (16, 167, 168). Otkriveni su kod izolata *E. cloacae* u Argentini, Irskoj i Americi (167, 168, 177, 178, 179). Porast prevalencije dokazanih IMI karbapenemaza u enterobaktera zabilježen je u zemljama poput Francuske, Singapura, Finske i Irske (179, 180, 181, 182, 183). SFC-1 (*Serratia fonticola*) je kromosomski kodiran enzim

izoliran do sada samo iz jednog soja *Serratia fonticola* u Portugalu (184, 185). Enzim SHV-38 (eng., sulphhydryl variable) je izoliran u *K. pneumoniae* te je pokazivao smanjenu osjetljivost na imipenem. Gen *imu* je kromosomski kodiran (186). Nedavno je u Brazilu pronađena još jedna *K. pneumoniae* koja producira SHV-38 enzim (187). BIC-1 enzim je otkriven u Francuskoj kod izolata *Pseudomonas fluorescens* (188). FPH-1 enzim je nedavno opisan kod izolata *Francisella philomiragia* (189). PenA je karbapenemaza pronađena kod *Burkholderia multivorans*, a koja posjeduje mogućnost hidrolize inhibitora β -laktamaza kao i svih klasa β -laktamskih antibiotika. *Burkholderia multivorans* je oportunistički nazokomijalni patogen koji primarno uzrokuje infekcije u bolesnika s cističnom fibrozom (190, 191).

Plazmidno kodirani enzimi, stečene karbapenemaze klase A

IMI-2 enzim za razliku od IMI-1/NmcA enzima koji su kromosomski kodirani, IMI-2 je do sada jedina poznata takva varijanta koja je plazmidno kodirana kod izolata *E. asburiae*, a pronađena je u rijekama Amerike (147). Također je pronađena i kod tri izolata koja su izolirana iz vodenog okružja u Francuskoj te kod kliničkog izolata *E. cloacae* iz Kine i Francuske (192, 193). FRI-1 karbapenemaza je pronađena kod izolata *E. cloacae* iz uzorka brisa rektuma hospitaliziranog bolesnika u Francuskoj (194).

Karbapenemaze iz klase A hidroliziraju starije cefalosporine, aztreonam i imipenem s izuzetkom KPC koja hidrolizira uspješno sve β -laktamske antibiotike. KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) je najviše zabrinjavajuća skupina karbapenemaza zbog njene lokacije na samostalno konjugacijskom plazmidu kod izolata *K. pneumoniae*.

Prvi tip KPC karbapenemaza (KPC-1) porodice otkriven je 1996. godine u sjevernoj Karolini (14). Do 2005. godine ovi enzimi su se zadržali u enterobakterija, posebno kod *K. pneumoniae* na istočnom dijelu Amerike (195). Nakon toga KPC enzimi su se globalno proširili gdje su opisani u mnogim Europskim zemljama, Kini, Sjevernoj i Južnoj Americi i Izraelu (145).

KPC je klinički najvažnija porodica karbapenemaza zbog sposobnosti epidemijskog širenja i visokog stupnja rezistencije na sve β -laktamske antibiotike.

KPC su nedavno opisane i u nefermentativnih bakterija kao što je *P. aeruginosa* i *A. baumannii*.

KPC je opisana i u Hrvatskoj (34, 272).

Smatra se je da su glavni razlozi takvog brzog širenja vertikalni prijenos sojeva u hospitaliziranih pacijenta (23).

Iako je najveći broj prijavljenih izolata s pozitivnim KPC karbapenemazama potjecao od sojeva *K. pneumoniae*, opisani su izolati i kod *E. coli* i drugih enterobakterija.

Također je povećan broj prijavljenih KPC pozitivnih sojeva kod *P. aeruginosa* i *A. baumannii* (145, 196, 197, 198, 199, 200). KPC hidrolizira sve β -laktamske antibiotike, a sojevi koji posjeduju te karbapenemaze imaju na istom plazmidu i gene koji kodiraju rezistenciju na aminoglikozide i fluorokinolone, a u novije vrijeme i na kolistin pa su terapijske opcije limitirane. Infekcije uzrokovane takvim izolatima imaju visoku stopu smrtnosti (196). KPC pozitivni izolati otkriveni su u uzorcima uzetima iz kanalizacije u Kini, Austriji i Brazilu kao i iz rijeka u Brazilu i Portugalu što pokazuje širenje takvih izolata u druge ekološke niše osim bolnica (201, 202, 203, 204, 205). GES enzimi otkriveni su u Francuskoj Gvineji, a kodirani su „kazetnim“ genima smještenim u plazmidskim integronima izolata *Pseudomonas aeruginosa* i drugih enterobakterija te predstavljaju noviju porodicu ESBL enzima svrstanu u grupu A (141, 206). Do sada je poznato preko dvadesetak inačica od kojih je GES-1 otkriven kod *Klebsiella pneumoniae*, a GES-2 kod *P. aeruginosa* u Južnoj Africi (207). GES enzimi su u povećanom broju prijavljeni kod *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. coli*, i *K. pneumoniae* (145, 208). Neke GES varijante enzima su kategorizirane kao ESBL bez ikakve karbapenem-hidrolizirajuće aktivnosti dok se npr. GES-14 enzim odlikuje proširenim spektrom djelovanja prema karbapenemima, monobaktamima i cefamicinu (209). Do sada su se GES karbapenemaze javljale širom svijeta u pojedinačnim slučajevima (208, 210). Međutim, postoji

nekoliko epidemijskih primjera GES producirajućih Gram-negativnih bakterija opisanih kod *K. pneumoniae* u Brazilu, Portugalu i Koreji, *S. marcescens* u Nizozemskoj i *P. aeruginosa* u Južnoj Africi (211, 212, 213, 214, 215). Glavni izvor karbapenemske rezistencije kod *A. baumannii* je produkcija karbapenem-hidrolizirajućih karbapenemaza grupe D (CHDL) po Ambleru (216). Međutim, prijavljeni su i GES tipovi karbapenemaza kod *A. baumannii* (209, 217, 218, 219).

β-laktamaze klasa B po Ambleru

Skupina enzima svrstana u grupu B koja inaktivira β-laktamski prsten pomoću iona cinka (Zn^{2+}) vezanog za histidinski i cisteinski ostatak ili svaki pojedinačno nazivaju se metalo-β-laktamaze (MBL). Ovi enzimi se vežu s karboksilnom skupinom β-laktamskih antibiotika te uspješno djeluju na karbapeneme, cefalosporine i peniciline (129). Za djelovanje im je neophodan cink kao kofaktor te pokazuju osjetljivost na inhibiciju metalnim-kelatorima kao što su EDTA i pokazuju visoki stupanj rezistencije na sve β-laktamske antibiotike osim monobaktama (22, 54, 220).

Sojevi s metalo-β-laktamazama izuzetno su otporni na antibiotike jer plazmidi koji ih kodiraju imaju i gene rezistencije na ostale antibiotike..

Metallo-β-laktamaze uključuju plazmidno kodirane enzime kao što su IMP (eng., imipenemase enzyme), VIM (eng., Verona integron-encoded metallo-β-lactamase), NDM (eng., New Delhi metallo-β-lactamase), SIM (eng., Seoul imipenemase), SPM (eng., Sao Paulo metallo-β-lactamase), GIM (eng., German imipenemase) i DIM (eng., Dutch imipenemase) koji su od velikog kliničkog značaja kod Gram-negativnih bakterija (221). Najčešći predstavnici su VIM i IMP porodice enzima (145, 146, 147). VIM porodica metalo-β-laktamaza najčešće je zastupljena u mediteranskim zemljama dok IMP porodica prevladava na Dalekom istoku (22).

U Japanu je IMP-1 prvi put opisan 1990. godine u izolatima *Pseudomonas aeruginosa*, a IMP-2 dokazana je u Italiji 1992. godine u izolatima *Acinetobacter baumannii*. Prva otkrivena VIM metalo- β -laktamaza (VIM-1) opisana je u Italiji 1996. godine.

Od ostalih predstavnika SPM-1 dokazana je u Brazilu u izolatima *P. aeruginosa*, GIM-1 opisana je u Njemačkoj 2002. godine, SIM-1 opisana je u izolatima *P. aeruginosa* i *A. baumannii*, a NDM-1 opisana je 2009. godine u Švedskoj u izolatu *K. pneumoniae* (145, 146, 147). GIM ima za razliku od ostalih MBL dva iona cinka u aktivnom središtu. Gen *bla*SPM nije lociran na prenosivim genetskim elementima pa se prenosi samo vertikalno klonskim širenjem sojeva.

Metallo- β -laktamaze najčešće se javljaju u nefermentativnih bakterija (*A. baumannii* i *P. aeruginosa*), ali su također opisane i u enterobakterija *E. cloacae* i *K. pneumoniae* (22). NDM β -laktamaze enterobakterija mogu izazvati multirezistenciju ili čak i panrezistenciju zbog *bla*NDM gena koji se plazmidno konjugacijom prenosi između bakterija, a karakterizira ga veći broj rezistencija na različite skupine antibiotika. Zasad su NDM enzimi pronađeni samo u enterobakterija, *P. aeruginosa* i *A. baumannii*. Smatra se da je područje Indije i Pakistana izvorišno mjesto na kojem su se prvi put pojavile NDM β -laktamaze, a zbog sve učestalijih migracija vrlo brzo su opisani slučajevi i na drugim kontinentima poput SAD, Kanade, Europe, Azije i Australije (22). Metallo- β -laktamaze su podijeljene u tri podskupine nazvane B1, B2 i B3 na osnovu razlika u raspodjeli i položaju cinka i na osnovu sekvenci aminokiselina (222). NDM-1 i VIM-2 su opisani u Hrvatskoj (320, 321). NDM ima izvorište i na Balkanu (Srbija, Kosovo). To je tzv. Balkanski klon koji je vezan uz ilegalne transplantacije organa.

β-laktamaze klase C po Ambleru

U ovu klasu ubrajaju se ampC β-laktamaze (135).

Grupa C β-laktamaza hidrolizira oksimino-cefalosporine, nije osjetljiva na inhibitore poput tazobaktama i klavulonata i pokazuju dobru osjetljivost na cefalosporine 4. generacije i karbapeneme koji se mogu dati u terapiji i invazivnih infekcija.

Problem predstavljaju prenosivi plazmidi koji sadrže stečene gene za AmpC enzime, a koji se mogu širiti i na druge vrste enterobakterija. AmpC β-laktamaze najčešće su dokazane kod *Proteus*, *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas* i *Acinetobacter*.

AmpC enzimi pripadaju molekularnoj klasi C prema Ambleru (135, 223, 224, 225).

Plazmidne AmpC β-laktamaze su nastale prijenosom kromosomskog ampC gena bakterija iz roda *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia*, *Pseudomonas* i *Acinetobacter* na plazmid što omogućuje prijenos tog gena između bakterija istih ili različitih vrsta. Te β-laktamaze uzrokuju rezistenciju na peniciline, cefalosporine prve, druge i treće generacije te kombinacije penicilina i inhibitora β-laktamaza. Ne djeluju na cefalosporine četvrte generacije i karbapeneme koji se mogu dati u terapiji i invazivnih infekcija. Inhibitori β-laktamaza poput klavulanske kiseline, sulbaktama i tazobaktama koji dobro inhibiraju klasu A β-laktamaza kod klase AmpC pokazuju puno manji utjecaj (225, 226, 227, 228). β-laktamski antibiotici karbapenemi pokazuju dobru djelotvornost u liječenju infekcija uzrokovanih β-laktamazama iz klase A i C (54). Karbapenemska rezistencija se može pojaviti kod nekih bakterija putem gubitka porina vanjske membrane ili pojačanim radom efluks pumpi (225). AmpC enzim kod *Acinetobacter* spp. je primjerice dosta nisko izražen i nije inducibilan, ali se kod *A. baumannii* pojačana ekspresija pojavljuje umetanjem insercijskog elementa *ISAbal* što predstavlja učinkoviti promotora za *bla*_{AmpC} gene (229, 230, 231).

Pretjerana ekspresija ovih enzima nosi sa sobom rezistenciju na cefalosporine proširenog spektra (cefotaksim, ceftazidim i ceftriakson). *E. cloacae* je u principu osjetljiv na treću generaciju cefalosporina osim u slučaju indukcije ili derepresije AmpC β -laktamaze koja uzrokuje rezistenciju na cefalosporine treće generacije, ali četvrta generacija (cefepim) ostaje osjetljiva.

Rezistencija plazmidnim AmpC enzimima je manje učestala nego ESBL enzimima, ali se teže otkriva (225). AmpC se razlikuju od ESBL i po tome što izazivaju rezistenciju na drugu generaciju cefalosporina kao što je cefoksitin, na cefamicine (cefotetan, moksalaktam) i što nisu inhibirane suicidalnim inhibitorima β -laktamaza kao što su klavulanska kiselina, sulbaktam i tazobaktam (232).

β -laktamaze klasa D po Ambleru

Klasa D β -laktamaze također poznate i kao oksacilinaze ili OXA β -laktamaze su enzimi s aktivnim mjestom serinom kao i Ambler klasa A i C β -laktamaza, razlikujući se od klasa A i C prema strukturi aminokiselina. Prvotno su ovi enzimi pronađeni kod izolata *Pseudomonas aeruginosa*, zatim kod roda *Acinetobacter* (135, 233, 234, 235, 236).

Prema podjeli po Bushu i aktivnosti prema supstratima OXA β -laktamaze svrstane su u podgrupe 2d, 2de i 2df. Skupina 2df sadrži kromosomski kodirane β -laktamaze roda *Acinetobacter* i plazmidski kodirane β -laktamaze enterobakterija, neke imaju aktivnost prema karbapenemima i nazivaju se karbapenem-hidrolizirajuće oksacilinaze, a tipične su za vrstu *A. baumannii* te spadaju u OXA-23-like, OXA-40-like, OXA-58-like, OXA-143-like i OXA-258 grupu. OXA-48 karbapenemaza prisutna je kod enterobakterija, a njeno brzo širenje između različitih vrsta poput *Klebsiella pneumoniae* i *Enterobacter cloacae* posljedica je plazmidno smještenog *bla_{OXA}* gena. OXA β -laktamaze slabo su inhibirane klavulanskom kiselinom, imaju sposobnost hidrolize karbapenema, pokazuju otpornost na ampicilin te hidroliziraju kloksacilin

i oksacilin (136). Uzrokuju rezistenciju na peniciline, cefalosporine uskog i širokog spektra, monobaktame i karbapeneme. OXA-51 je intrinzična kromosomska β -laktamaza vrste *A. baumannii* i ne uzrokuje rezistenciju na karbapeneme ako nije riječ o hiperprodukciji zbog insercijske sekvence *IsaBaI* ispred *bla*_{OXA-51} gena (22). U filogenetskoj skupini OXA-51/69 nalaze se intrinzične oksacilinaze, tj. nativni enzimi vrste *A. baumannii*. One ne uzrokuju rezistenciju na karbapeneme osim ako ne postoji pojačana ekspresija gena *bla*_{OXA-51} zbog insercijske sekvence smještene ispred gena (27). OXA β -laktamaze su kodirane na plazmidima i prenosive su s jedne bakterijske stanice na drugu. Izolati *A. baumannii* koji proizvode oksacilinaze pokazuju najčešće multiplu rezistenciju na većinu antibiotika uključujući sve β -laktame, aminoglikozide i fluorokinolone pa je najčešće kolistin lijek izbora. Skupina OXA-23 je proširena po čitavom svijetu, OXA-58 u Turskoj, Francuskoj, Grčkoj i Ujedinjenom Kraljevstvu, dok je skupina OXA-24/40 opisana u Španjolskoj, Portugalu, SAD-u, Tajvanu, Kini i Brazilu. Skupina OXA-143 je opisana do sada samo u Njemačkoj, a OXA-258 također u toj državi (31). Najveći broj OXA enzima pronađen je kod roda *Acinetobacter* kod vrste *Acinetobacter baumannii* dok se OXA-2 i OXA-10 dominantno nalaze u vrsti *Pseudomonas aeruginosa* (237, 238). OXA-48 enzim pretežno je zastupljen unutar vrsta *Enterobacter cloacae* i *K. pneumoniae* (239). Prethodna istraživanja karbapenemske rezistencije u acinetobaktera u Hrvatskoj su utvrdila visoku prevalenciju OXA-72 β -laktamaze koja spada u OXA-24/40 grupu u KBC-Zagreb i KBC-u Split (240, 241). U KBC-u Zagreb također su opisane i OXA-58 i OXA-23. Kasnije su OXA-23 i OXA-24-like opisane i u bolnici u Puli (242, 243). Unutar sve četiri klase β -laktamaza po Ambleru, klasa D β -laktamaza predstavlja klasu s najviše različitih enzima. Klasa OXA β -laktamaza od nedavno pokazuju najveći rast po broju novih, ali i prema različitim novo otkrivenim varijantama enzima (244, 245). Ova različitost je proučena na genetskim i biokemijskim nivoima kod OXA enzima koji posjeduju uski ili široki spektar hidrolize. Nekoliko klasa D β -laktamaza posjeduje široki spektar

aktivnosti koji potječe od točkastih mutacija (246, 247). Klasa D β -laktamaza također je poznata po imenu oksacilinaze ili OXA enzimi što duguju činjenici da je prvi opisani OXA enzim pokazivao veći stupanj hidrolize prema penicilinu oksacilinu nego prema benzilpenicilinu (132, 248, 249).

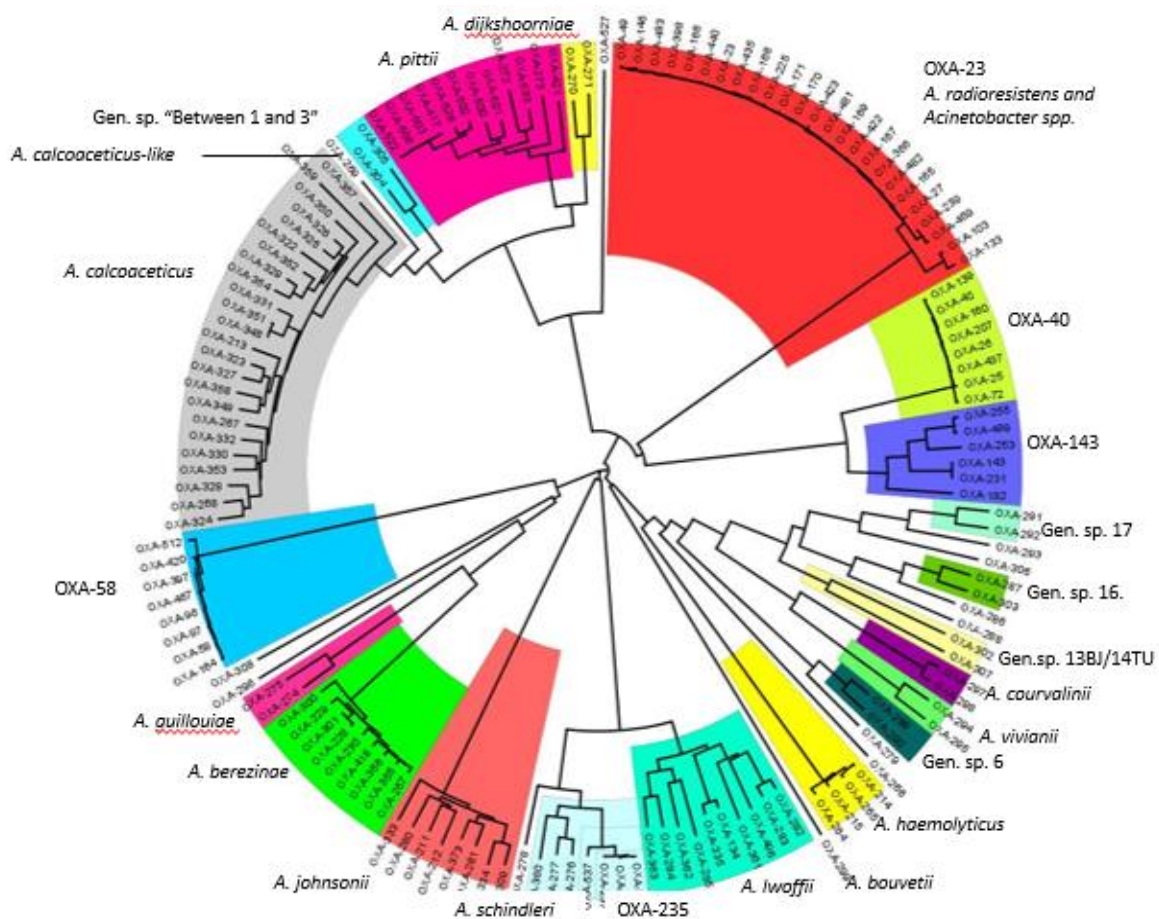
Ova definicija se ne čini više vjerodostojnom obzirom da su nedavno opisani enzimi iz ove skupine loše inaktivirali kloksacilin i oksacilin, ponekad i štedeći iste od svog djelovanja. Međutim, sve klase D β -laktamaza značajno hidroliziraju amino i karboksi peniciline.

Mnoge kromosomalne β -laktamaze klase D su pretvorene u plazmidne varijante i predstavljaju veliku prijetnju liječenju (250, 251).

Neki OXA enzimi su zadržali svoju djelotvornost samo na uskom spektru i djeluju samo na peniciline i prvu generaciju cefalosporina dok drugi pokazuju prošireni spektar djelovanja koji uključuje zadnju generaciju cefalosporina.

Kako substratni spektar ovih enzima nije uključivao karbapeneme, njihova uloga nije se smatrala značajnom do otkrića prve CHDL također poznatije kao ARI-1 (252). CHDL pokazuju izniman brojčani rast i širenje među Gram-negativnim bakterijama, uključujući *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* i *Pseudomonas* (234, 249). Ove bakterije su uzročnici brojnih nazokomijalnih infekcija s visokom smrtnošću (24). Kako su ovi enzimi često povezani s integronima i insercijskim sekvencama mogu se prenositi između vrsta (234, 253). Mnogi OXA enzimi pokazuju visoki afinitet za karbapeneme (239). Izvanredan učinak ovih enzima je zapažen kod vrsta *Acinetobacter* i *Pseudomonas* preko njihovih minimalnih inhibitornih koncentracija (132, 239, 254, 255). Ove bakterije pokazuju povećane minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) kombinacijama smanjene membranske permeabilnosti, mnogostrukim efluks pumpama i gubitkom porina (54, 75, 254).

Od 1980 godine prema danas raste broj izolata *Acinetobacter baumannii* koji pokazuju plazmidno kodiranu rezistenciju na karbapeneme poput OXA-23, OXA-40 i OXA-58. Ubrzo je otkriveno da svaki soj *A. baumannii* posjeduje i kromosomski kodiranu OXA β -laktamazu (OXA-51-like) od kojih neki od njih mogu pokazati rezistenciju na karbapeneme kada okružje oko gena promovira njegovu ekspresiju. Određene karbapenem hidrolizirajuće OXA β -laktamaze poput OXA-48 su migrirale u porodicu *Enterobacteriaceae* i počele su predstavljati značajan uzrok rezistencije na karbapeneme (257).



Slika 11. Filogenetska analiza oksacilinaza *Acinetobacter* spp. bez OXA-51 (256)

OXA-23

Prva grupa karbapenem rezistentnih OXA β -laktamaza koja je dokazana kod izolata *A. baumannii* bila je OXA-23 i pronađena je Edinburgu u Velikoj Britaniji 1985. godine (258).

Unutar grupe OXA-23 do danas je poznato 19 enzima (OXA-23, OXA-27, OXA-49, OXA-73, OXA-102, OXA-103, OXA-105, OXA-133, OXA-134, OXA-146, OXA-165–OXA-171, OXA-225 i OXA-239) čiji su plazmidima prenošeni geni pronađeni u mnogim *Acinetobacter* vrstama (*A. baumannii*, *A. junii*, *A. radioresistens*, *A. pittii*, *Acinetobacter phenon 5*, *Acinetobacter phenon 6/ct 13TU*, *A. nosocomialis*, *Acinetobacter* genomskih vrsta 10/11, *A. lwoffii* i *A. baylyi*) kao i kod vrsta koje pripadaju porodici *Enterobacteriaceae* kao što su *Proteus mirabilis* i *Klebsiella pneumoniae* (257). Među karbapenemima OXA-23 pokazuje puno bolje djelovanje na imipenem nego na meropenem, ertapenem ili doripenem (259).

OXA-23 grupa je sada najrasprostranjenija i istisnula je ostale grupe jer uzrokuje visoki stupanj rezistencije na karbapeneme pa takvi sojevi imaju selektivnu prednost u odnosu na ostale grupe. Prva takva je bila ARI-1 (*Acinetobacter* resistant to imipenem) opisna u Škotskoj, a ona je poslije preimenovana u OXA-23.

OXA-24/40

Druga grupa OXA β -laktamaza koja je bila otkrivena kod *A. baumannii* prvotno je bila nazvana OXA-24 da bi kasnije bila preimenovana u grupu OXA-40. Prvotni član ove grupe tj. OXA-24 pronađen je u Španjolskoj (29).

U ovoj grupi do sada je uz OXA-40 otkriveno još 6 enzima iz ove grupe (OXA-25, OXA-26, OXA-72, OXA-139, OXA-160 i OXA-207).

Iako su izvorno pronađeni kod različitih izolata acinetobaktera (*A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. pittii*, *A. baylyi*, *A. calcoaceticus*) sve je više izvještaja o pronalasku ovih oksacilinaza i kod drugih vrsta bakterija poput *K. pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa* (257). Jedina alelska varijanta koja je opisana i kod nas i u susjednim zemljama (Srbija, BiH) je OXA-72 (241). To je najproširenija grupa u Hrvatskoj i to i u Zagrebu i Splitu.

OXA-51

Do danas se u ovoj grupi nalazi 95 izoliranih OXA β -laktamaza (OXA-51, OXA-64–OXA-71, OXA-75–OXA-80, OXA-82–OXA-84, OXA-86–OXA-95, OXA-98–OXA-100, OXA-104, OXA-106–OXA-113, OXA-115–OXA-117, OXA-120–OXA-128, OXA-130–OXA-132, OXA-138, OXA-144, OXA-148–OXA-150, OXA-172–OXA-180, OXA-194–OXA-197, OXA-200–OXA-203, OXA-206, OXA-208, OXA-216, OXA-217, OXA-219, OXA-223, OXA-241, OXA-242, OXA-248–OXA-250 i OXA-254). To su intrinzične, kromosomski kodirane β -laktamaze vrste *A. baumannii* pa se za potvrdu identifikacije te vrste radi PCR za OXA-51. One ne uzrokuju rezistenciju na karbapeneme osim ako ne postoji hiperekspresija zbog insercijske sekvence *ISAbal* ispred gena.

Do sada su pripadnici ove grupe enzima pronađeni kod *A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* i *K. pneumoniae*. Ovi enzimi su intrinzični za *A. baumannii*. Pokusi su pokazali kada se enzimi iz ove grupe eksprimiraju *in vivo* i da mogu izrazito pojačati MIK karbapenema kod izolata što dovodi do rezistencije (257).

OXA-58

U ovu grupu osim izvornog OXA-58 enzima pripadaju i enzimi OXA-96, OXA-97 i OXA-164. Prvi član ove grupe je enzim izoliran iz *A. baumannii* u Francuskoj 2003. godine (260). OXA-96 je pronađena kod izolata *A. baumannii* u Singapuru (261) OXA-97 u Tunisu (262), a OXA-164 u Njemačkoj (263). *A. baumannii* s izraženom razinom ekspresije efluks pumpi i pozitivnim OXA-58 enzimom pokazuje rezistenciju na karbapeneme što potvrđuje činjenicu da rezistencija na karbapeneme raste ukoliko određeni soj posjeduje istovremeno više mehanizama rezistencije (264). Do sada su pripadnici ove grupe enzima pronađeni kod mnogih vrsta acinetobaktera uključujući *A. baumannii* kao i kod *E. cloacae*, *E. coli* i *K. pneumoniae* (257).

OXA-48

Velika skupina enzima za koju se do sada zna da sadrži ukupno 11 OXA enzima (OXA-48, OXA-48b, OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-199, OXA-204, OXA-232, OXA-244, OXA-245 i OXA-247) i karakterizira ju da niti jedan od navedenih enzima nije do sada pronađen kod bilo koje vrste acinetobaktera pa tako ni kod *A. baumannii*.

OXA-48 enzimi pronađeni su kod *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Shewanella xiamenensis*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Providencia rettgeri*, *Klebsiella oxytoca* i *Enterobacter sakazakii* (257).

Nova grupa OXA enzima, odnosno OXA-48 je formirana nakon otkrića multirezistentnog izolata *Klebsiella pneumoniae* 2011. godine u Turskoj, a koji je bio rezistentan i na karbapeneme (265). Mnoge varijante enzima iz OXA-48 skupine su danas široko

rasprostranjene kod *K. pneumoniae* i drugih bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae*, a prijavljen je i prvi slučaj kod *A. baumannii* (266).

Ova grupa je u porastu u većini EU zemalja uključujući i Hrvatsku (322). Kod te grupe postoji problem s detekcijom jer su vrlo varijabilni MIK-ovi karbapenema i veliki dio izolata pokazuje rezistenciju samo na ertapenem. Cefalosporini su osjetljivi osim ako soj ne posjeduje dodatnu ESBL ili AmpC β -laktamazu. OXA-48 izolati često promaknu u laboratoriju, a pokazuju veliki potencijal širenja preko L plazmida.

1.5. β -laktamaze proširenog spektra (ESBL)

ESBL su enzimi koji hidroliziraju cefalosporine treće i četvrte generacije, a nastaju mutacijama od parentalnih enzima TEM-1, TEM- i SHV-1. Mutacije dovode do zamjene aminokiseline u aktivnom središtu enzima što mijenja konfiguraciju aktivnog središta i substratni profil (141).

Derivati TEM-1 i TEM-2 (plazmidno kodirane β -laktamaze *E. coli*) i SHV-1 (kromosomski kodirani enzimi *K. pneumoniae*) kao i CTX-M β -laktamaze predstavljaju ESBL.

Prema molekularnoj podjeli po Ambleru ESBL pripadaju grupama A i D, a prema klasifikaciji po Karen Bush podgrupama 2be (136).

Učestalo korištenje cefalosporina 3. generacije utjecalo je na nastanak i brzo širenje ESBL sojeva širom svijeta.

TEM i SHV β -laktamaze su nastale točkastim mutacijama u *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-2} i *bla*_{SHV-1} genu. Te točkaste mutacije mijenjaju strukturu aktivnog središta tako da velike molekule kao što su oksimino cefalosporini mogu ući u aktivno središte enzima i time može doći do hidrolize

β -laktamaze (141). Gram-negativne bakterije produkcijom ESBL enzima hidroliziraju peniciline, cefalosporine i monobaktame (267). Prema Ambleru ESBL pripadaju grupama A i D prema molekularnoj strukturi (135, 224).

ESBL su inhibirane inhibitorima β -laktamaza poput klavulanske kiseline, sulbaktama i tazobaktama (267, 268).

ESBL najčešće nalazimo u izolata *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Providencia*, *Serratia*, *Salmonela*, *Shigella* i *Proteus*. Danas oko 40% izolata *K. pneumoniae*, oko 4% izolata *E. coli* i oko 1% ostalih enterobakterija proizvodi ESBL i njihova stopa je u porastu diljem svijeta (269). Sekvenciranjem aminokiselina otkriveno je oko 300 različitih alelskih varijanti ESBL (141, 150). Osim mutacija koje dovode do stvaranja ESBL impermeabilnosti vanjske membrane i hiperekspresija efluks pumpi može dovesti do smanjene osjetljivosti na cefalosporine (141, 267, 268). Prva β -laktamaza koja je plazmidno kodirana dokazana je u Grčkoj 1965. godine u kliničkom izolatu *E. coli* i nazvana je TEM-1 prema imenu pacijentice (grč., Temoniera), a iz čije urinokulture je izolirana (131). Nedugo nakon izolacije prve TEM-1 β -laktamaze uslijedilo je širenje različitih β -laktamaza kod vrsta *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* i *Neisseria gonorrhoeae* te kod brojnih vrsta iz porodice *Enterobacteriaceae*. Te β -laktamaze se i dan danas otkrivaju u različitim varijacijama diljem svijeta (150).

1969. godine, otkrivena je i druga β -laktamaza nazvana TEM-2 otkrivena kod izolata *Pseudomonas aeruginosa*, a koja se od TEM-1 razlikovala prema slijedu aminokiselina, odnosno zamjenom glutamina serinom na poziciji 37.

1974. godine otkriven je treći kromosomski kodiran enzim SHV-1 (eng., sulfhydryl variable β -lactamases) vrste *Klebsiella pneumoniae* čiji je promotorski gen prenešen na plazmid (131).

CTX-M β -laktamaze proširenog spektra danas su dominantne u svijetu i istisnule su u velikoj mjeri TEM i SHV varijante. One su native ESBL i nisu nastale mutacijama kao TEM i SHV. Nastale su od kromosomskih gena vrsta iz roda *Kluyvera*. Preferencijalno hidroliziraju cefotaksim tako da je MIK cefotaksima viši nego ceftazidima. U početku su dominirale među izvanbolničkim izolatima, a danas su dominantne i u bolnicama. Postoji pet grupa: 1, 2, 8, 9 i 25. Najčešća je grupa 1, a u toj grupi dominantna CTX-M-15 koja je opisana posvuda i uzrokuje visoku rezistenciju i na ceftazidim.

1.6. Karbapenemaze

Pretjerana uporaba karbapenema u liječenju infekcija uzrokovanih ESBL pozitivnim sojevima dovela je do pojave i širenja karbapenemaza. Ovi enzimi izolirani su kod *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii* kao i enterobakterija. Poznate su tri klase i to A (GES, KPC, SME, IMI, NMC), klasa B (IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, NDM, DIM, AIM) i klasa D u koju pripadaju OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-58, OXA-143 i OXA-238 (145).

2. CILJ RADA

Cilj ovog istraživanja je:

1. Utvrditi *in vitro* sinergiju i post antibiotski učinak (PAE) kolistina u kombinaciji s meropenemom i vankomicinom u izolatima *A. baumannii* s različitim tipovima CHDL i u enterobakterija s multiplim karbapenemazama ili kombinacijom karbapenemaze i rezistencije na kolistin.
2. Komparirati dužinu trajanja PAE u karbapenem rezistentnih izolata s i bez izražene rezistencije na kolistin.
3. Usporediti različite metode za testiranje sinergije (šah metoda, krivulja baktericidnog učinka i metoda dvije jažice) i utvrditi koja od navedenih metoda ima najveću osjetljivost.

Radna hipoteza je:

Izolati sa multiplim karbapenemazama imaju slabije izraženu sinergiju kolistina s meropenemom i kraće trajanje PAE u odnosu na sojeve s jednom karbapenemazom zbog izraženije hidrolize karbapenema. Takav učinak se ne očekuje za kombinaciju kolistina s vankomicinom s obzirom da vankomicin ne podliježe hidrolizi karbapenemazama.

Kraće trajanje PAE se očekuje kod kolistin-rezistentnog izolata s obzirom da kolistin oštećuje vanjsku membranu i time omogućuje lakši prolaz vankomicinu i meropenemu kroz vanjsku membranu Gram-negativnih bakterija i vezanje na receptore na citoplazmatskoj membrani.

Također se očekuje podudarnost među različitim metodama za istraživanje sinergije kao što su šah metoda, metoda dvije jažice i time-kill krivulja.

Pretpostavka je da će postojati razlike u sinergiji i dužini trajanja PAE između različitih sojeva zbog individualnih bioloških razlika u reakcijama na izlaganje antibiotiku.

Očekivani znanstveni doprinos rada

Očekivani znanstveni doprinos je razjašnjavanje farmakodinamskih učinaka kombinacija antibiotika. Dokaz sinergije *in vitro* bi dao povod za klinička istraživanja kombinacija starih i novih antibiotika što bi bio važan doprinos razvoju novih terapijskih opcija za liječenje infekcija uzrokovanih multirezistentnim sojevima enterobakterija i acinetobaktera. Produženje PAE bi omogućilo duži interval doziranja lijeka što bi smanjilo rizik od nuspojava.

U današnje vrijeme kada farmaceutska industrija gubi interes za razvoj novih antibiotika „oživljavanje“ starih antibiotika i istraživanje različitih kombinacija ima veliko značenje u vremenu sve većeg pojavljivanja ekstenzivno rezistentnih i panrezistentnih bakterija.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Bakterijski izolati

Istraživanje je provedeno u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC Zagreb. U studiju je uključeno osam izolata *Acinetobacter baumannii* sa smanjenom osjetljivošću na karbapeneme i četiri karbapenem-rezistentna izolata enterobakterija od kojih je jedan izolat *Enterobacter cloacae*, a tri izolata *Klebsiella pneumoniae*.

Sojevi *Acinetobacter baumannii*:

A. baumannii, broj protokola 1486/485, pozitivan na OXA-23, KBC-Zagreb, trahealni aspirat, kirurški JIL (241),

A. baumannii, broj protokola 1794/793, pozitivan na OXA-24/40, KBC-Zagreb, abdominalna kirurgija, centralni venski kateter (241),

A. baumannii, broj protokola 5353/352, pozitivan na OXA-58, Opća bolnica Bjelovar, bris stome, kirurški JIL (242),

A. baumannii, broj protokola 135040, pozitivan na OXA-143, hemokultura, JIL, Brazil, 2004, ljubazno ustupljen od dr. Paul Higgins, Sveučilište Cologne, Njemačka,

A. baumannii, broj protokola 157195, pozitivan na OXA-23 i VIM-1, dom za starije i nemoćne Godan, obrisak rane, 18.09.2013 (270),

Acinetobacter guillouie, broj protokola 95991, pozitivan na OXA-58 i NDM-1, KBC Zagreb (271),

A. baumannii, broj protokola 15429, pozitivan na OXA-69 (varijanta kromosomske OXA-51 β -laktamaze) reguliran sa *ISAbal* (bez stečene oksacilinaze), Opća bolnica Pula, urin, 05.07.2012. (242),

A. baumannii, broj protokola 9728/1419, pozitivan na OXA-72, neurokirurški JIL, aspirat traheje (323).

Sojevi enterobakterija:

Enterobacter cloacae, broj protokola 209377, pozitivan na VIM-1, NDM-1, OXA-48, TEM-1 i CTX-M-15, KBC Zagreb, urin, vanjski pacijent, 13.12.2013. (35),

Klebsiella pneumoniae broj protokola 145846, pozitivna na NDM-1 VIM-1, TEM-1 i SHV-11, KBC Zagreb, 28.08.2013. (35),

Klebsiella pneumoniae, broj protokola 38985, pozitivna na KPC-2, TEM-1 i SHV-11, KBC Zagreb, likvor (272),

Klebsiella pneumoniae, broj protokola 609815, pozitivna na OXA-48 i SHV-11 te kolistin rezistentna, KBC Zagreb, hematologija, obrisak rane (neobjavljeni rezultati).

Svi navedeni izolati su prikupljeni i analizirani u prethodnim istraživanjima u kojima je određen tip oksacilinaze PCR-om i sekvenciranjem na Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu dijagnostiku KBC Zagreb (PCR cycler, Applied Biosystems) dok su izolati identificirani do vrste standardnim biokemijskim testovima (Kligler, MIL, citrat i oksidaza) i potvrđeni uređajem MALDI-TOF (eng., matrix-assisted laser desorption/ionization- time-of-flight mass spectrometer).

Hodogram istraživanja provodio se metodama u tri faze;

1. Karakterizacija pojedinačnih sojeva koja je uključivala: ispitivanje osjetljivosti na antibiotike disk-difuzijskom i dilucijskom metodom, određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) i određivanje minimalne baktericidne koncentracije (MBK).
2. Ispitivanje sinergije između antibiotika metodom krivulje baktericidnog učinka, šah metodom i metodom dvije jažice.
3. Određivanje postantibiotskog učinka

3.2. Karakterizacija pojedinačnih sojeva

3.2.1. Ispitivanje osjetljivosti na antibiotike-disk difuzijska metoda

U rutinskom bakteriološkom laboratoriju obično se primjenjuje Kirby-Bauer disk-difuzijska metoda. Suspenzija soja priprema se na način da se bakteriološkom ušicom pokupi 3 do 5 poraslih kolonija s površine krute hranjive podloge, koje se potom razmute u 5 ml fiziološke otopine i mućkaju uz pomoć vortex mješalice da se dobije homogena suspenzija. Gustoća suspenzije podešava se prema standardnoj 0.5 McFarland suspenziji koja predstavlja 10^8 / mL CFU (eng., colony forming units) uz pomoć denzitometra. Suspenzija testiranog soja natopi se pomoću brisa od vate i nanese se na površinu Mueller-Hinton (M-H) agara u tri smjera te se nakon sušenja nanose diskovi natopljeni s antibioticima pomoću dispenzera ili pincete nakon 15 minuta. M-H podloga se potom stavlja u termostat na 35-37°C i inkubira 20-24 sata. Za to vrijeme antibiotici koji su impregnirani na papirnatim diskovima u poznatim i određenim koncentracijama difundiraju kroz agarozni gel M-H podloge i stvara se gradijent koncentracija.

Promjer inhibicijske zone oko diskova mjeri se ravnalom i izražava se u mm. Na osnovu veličine inhibicijske zone određuje se da li je ispitivani soj osjetljiv (S, eng., susceptible), smanjeno osjetljiv (I, eng., intermediate) ili rezistentan (R, eng., resistant).

Za testiranje osjetljivosti na antibiotike u *A. baumannii* korišteni su sljedeći diskovi s antibioticima (Biorad): piperacilin/tazobaktam (100/10 µg), ceftazidim (30 µg), cefotaksim (30 µg), ceftriakson (30 µg), cefepim (30 µg) i meropenem (10 µg), imipenem (10 µg), gentamicin (10 µg), amikacin (30 µg), ciprofloksacin (5 µg), tigeciklin (15 µg), sulbaktam + ampicilin (10/10 µg), sulfametoksazol/trimetoprim (1.25/3.75 µg) i tetraciklin (30 µg).

Za testiranje osjetljivosti na antibiotike u enterobakterija korišteni su isti diskovi s antibioticima kao i kod *A. baumannii* samo bez diska sulbaktam + ampicilin te su još dodatno stavljeni sljedeći diskovi s antibioticima: amoksicilin (30 µg), amoksicilin + klavulanska kiselina (20/10 µg), cefazolin (30 µg) i cefuroksim (30 µg).

Rezultati su interpretirani prema smjernicama CLSI-a (273).

3.2.2. Ispitivanje osjetljivosti na antibiotike-bujon dilucijska metoda

Dilucijskim metodama određuje se minimalna inhibitorna koncentracija (MIK), a to je najniža koncentracija koja spriječava rast bakterija. Može se izvoditi u krutoj podlozi kao agar dilucija ili u tekućoj kao dilucija u bujonu. Dilucija u bujonu se može izvoditi u nizu epruveta kao makrodilucija ili u mikrotitar pločicama kao mikrodilucija. Osnovni princip je da se pripremaju serijska dvostruka razrijeđenja antibiotika koja se inkorporiraju u bakteriološku podlogu i zatim se u nju ili na nju inokulira ispitivani soj bakterije koji odgovara koncentraciji 5×10^5 CFU/ml. Nakon inkubacije od 18 do 24 sati na 37° C se gleda da li je došlo do zamućenja bujona ili porasta kolonija na krutoj podlozi. Najniže koncentracija antibiotika koja je spriječila zamućenje bujona ili porast kolonija na krutom hranilištu odgovara za MIK. Antibiotici se prvo

pripremaju kao stock solucija od 5120 $\mu\text{g/ml}$ i to se onda razrijeđuje 1:10 te se od tog razrijeđenja dalje pripremaju dvostruka razrijeđenja u nizu epruveta. Pripremanje razrijeđenja antibiotika uključivalo je otapanje 20 mg antibiotika kolistina, meropenema i vankomicina u prahu te njihovo pojedinačno razrijeđivanje u 4 ml destilirane vode s ciljem dobivanja željene koncentracije od 5120 $\mu\text{g/ml}$. Dilucijska metoda izvodi se u standardiziranoj tekućoj podlozi Mueller Hinton bujon. Stock solucije antibiotika kolistina, meropenema i vankomicina u koncentraciji od 5120 $\mu\text{g/ml}$ razrijede se u omjeru 1:10 (1 ml antibiotika i 9 ml M-H bujona) te se na taj način dobije početna koncentracija od 512 $\mu\text{g/ml}$. Od te koncentracije kreće se sa serijskim razrijeđenjima u 12 sterilnih epruveta.

U prvu epruvetu pipetira se 1 ml bujona i 1 ml prethodno pripremljenog antibiotika koncentracije 512 $\mu\text{g/ml}$ te se na taj način dobije koncentracija od 256 $\mu\text{g/ml}$. U svaku sljedeću epruvetu pipetiraju se zadani volumeni bujona i volumeni antibiotika prikazani kao u tablici broj 1.

Tablica 1. Serijska razrjeđenja antibiotika za bujon dilucijsku metodu

Epruveta broj	Volumen bujona	Volumen antibiotika	Koncentracija antibiotika u epruveti
1.	1 ml	1 ml iz stock epruvete	256 µg/ml
2.	3 ml	1 ml iz stock epruvete	128 µg/ml
3.	7 ml	1 ml iz stock epruvete	64 µg/ml
4.	1 ml	1 ml iz 3. epruvete	32 µg/ml
5.	3 ml	1 ml iz 3. epruvete	16 µg/ml
6.	7 ml	1 ml iz 3. epruvete	8 µg/ml
7.	1 ml	1 ml iz 6. epruvete	4 µg/ml
8.	3 ml	1 ml iz 6. epruvete	2 µg/ml
9.	7 ml	1 ml iz 6. epruvete	1 µg/ml
10.	1 ml	1 ml iz 9. epruvete	0.5 µg/ml
11.	3 ml	1 ml iz 9. epruvete	0.25 µg/ml
12.	3 ml	1 ml iz 9. epruvete	0.12 µg/ml

Tako pripremljena razrjeđenja antibiotika iz epruveta se prenose i ukapavaju pomoću automatske mikropipete u količini od 50 µl u svaku jažicu okomitih stupaca mikrotitar pločice na način da svaki antibiotik bude pojedinačno zastupljen u svim koncentracijama u tom okomitom stupcu.

U prvi stupac mikrotitar pločice stavlja se samo bujon bez antibiotika radi kontrole rasta soja.

3.2.3. Pripremanje inokuluma

Kod Enterobakterija i nonfermentora se preporučuje pripremanje inokuluma iz bujonske kulture. Testirani soj zasijava se u 5 ml M-H bujona i inkubira preko noći na 35 do 37°C. Prekonoćna kultura obično sadržava 10^9 do 10^{10} CFU/ml. Nju se potom razrijeđuje tako da se

prenese 100 μ l kulture u 9.99 ml fiziološke otopine da se dobije razrjeđenje od 10^8 CFU/ml koje odgovara McFarland suspenziji 0.5. Od tog razrjeđenja uzima se 100 μ l i prenosi u 9.9 ml M-H bujona tako da se dobije veličina inokuluma od 10^6 CFU/ml. 50 μ l takovog razrjeđenja se zatim nanosi pomoću stepera u jažice mikrotitar pločica u kojima se već nalazilo 50 μ l određenog razrjeđenja antibiotika da bi se dobila konačna veličina inokuluma od 10^5 CFU/ml. Budući da u svakoj jažici na 50 μ l točno određenog razrjeđenja antibiotika dolazi i 50 μ l soja smjesa se razrjeđuje još na pola. Time se dobivaju konačne koncentracije od 0.06 do 128 μ g/ml. Nakon inokulacije svaka pločica se zatvora sterilnim poklopcem da se spriječi sušenje tokom inkubacije i inkubiraju se na 35°C 18 do 20 sati.

Očitavanje rezultata

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je određivana metodom dilucije u bujonu u mikrotitracijskim pločicama s 96 jažica i Mueller-Hinton bujonu (274, 275, 276).

Interpretacija rezultata obuhvaća promatranje zamućenja jažica u mikrotitar pločicama. Ukoliko se u jažicama uoči zamućenje to je pokazatelj da koncentracija antibiotika nije bila dovoljno visoka da spriječi umnožavanje bakterija, a ako je sadržaj jažice ostao bistar to znači da je koncentracija antibiotika u istoj dovoljno visoka da spriječi umnožavanje bakterija. Koncentracija antibiotika u prvoj bistroj jažici u kojoj nema vidljivog porasta bakterija odgovara MIK-u.

Uzorak soja koji je razrijeđen za ukapavanje u mikrotitar pločice treba također dodatno razrijediti u omjerima 1:100 i 1:1000 te 100 μ l svakog takvog razrjeđenja zasijati na krutu M-H agar podlogu radi provjere veličine inokuluma koji mora biti 10^5 CFU.

Jažica sa sojem, ali bez antibiotika se subkultivira na krvni agar radi provjere rasta i čistoće kulture (277).

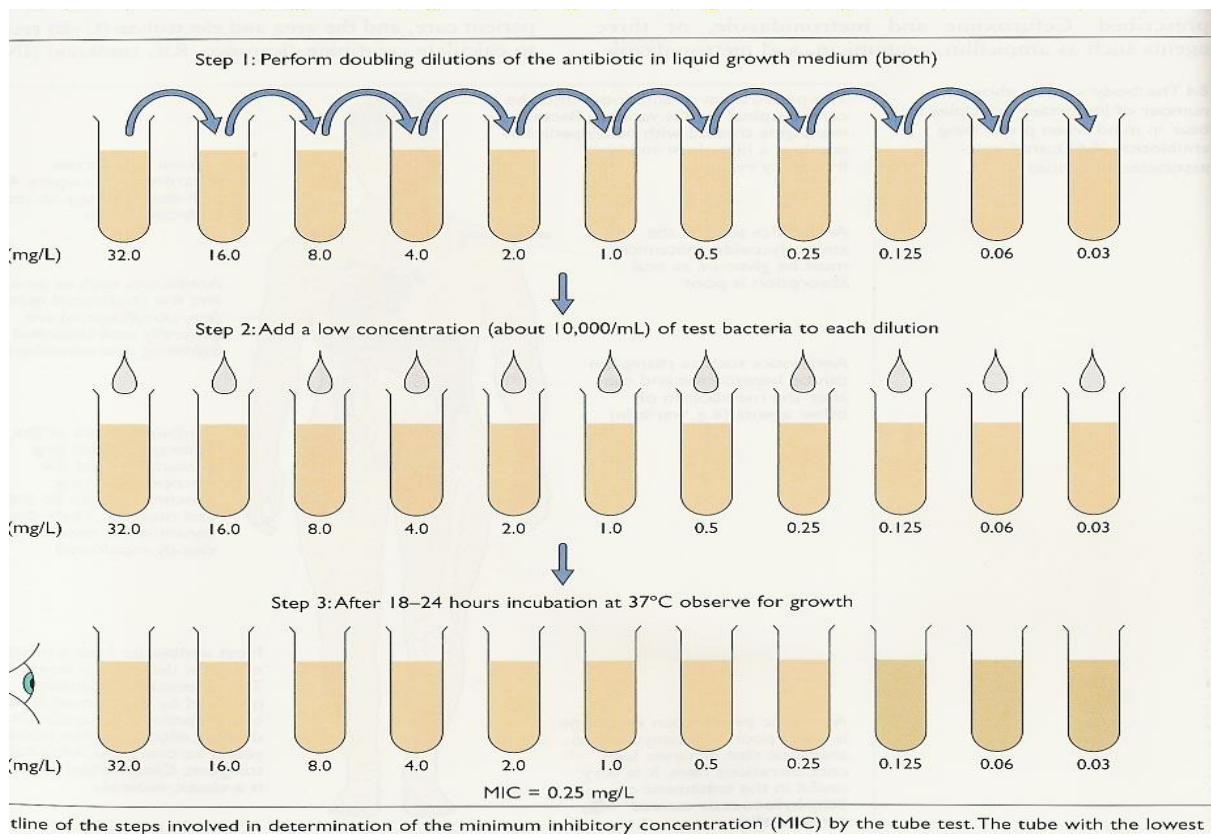
3.2.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)

Razina antimikrobne aktivnosti koja inhibira rast bakterije odnosno njena bakteriostatska aktivnost, određuje se *in vitro* testiranjem aktivnosti standardizirane koncentracije bakterija u serijskim razrjeđenjima antibiotika gdje se najniža koncentracija antibiotika koja inhibira rast bakterija zove minimalna inhibitorna koncentracija (77). Određivanje korelacije između osjetljivosti uzročnika i dosegnute koncentracije antibiotika u krvi se određuje određivanjem serumskih baktericidnih koncentracija. Kada je koncentracija antibiotika u tkivu veća od MIK-a, liječenje će vjerojatno biti uspješno (278).

Minimalna inhibitorna koncentracija može se određivati metodom dilucije u bujonu ili agar-dilucijskim testom. Da bi se odredio MIK testiranog soja mora se počevši od najniže prema najvišoj koncentraciji u mikrotitar pločici pronaći prva jažica u nizu u kojoj je bujon ostao bistar. Koncentracija antibiotika u toj jažici odgovara MIK-u testiranog soja. Postoje različite optičke naprave koje olakšavaju očitavanje zamućenja. Najjednostavniji način je čitanje konkavnim zrcalom koje povećava sliku. Minimalne inhibitorne koncentracije ispitivanih izolata određene su metodom mikrodilucije u mikrotitarskim pločicama s dvostrukim razrjeđenjima antibiotika (od 0.06 do 128 mg/l) i M-H bujonom. Ispitivanje MIK-a provedeno je na slijedeće antibiotike (Sigma, Aldrich, Njemačka): kolistin, meropenem i vankomicin. Antibiotik se važe u količini od 20 mg i otapa u 3.9 ml destilirane vode kako bi se dobila početna koncentracija od 5120 µg/ml. Ta stock solucija se razrijeđuje u M-H bujonu u omjeru 1:10 (1 ml stock solucije i 9 ml bujona) da se dobije početno razrijeđenje od 512 mg/l koje se dalje razrijeđuje u nizu epruveta da se dobije raspon koncentracija od 0.12 do 256 mg/l. Ta razrijeđenja se ukapavaju u količini od 50 µl u jažice mikrotitar pločica. Kada se ta razrijeđenja antibiotika pomiješaju s 50 µl suspenzije testiranog soja dobije se raspon od 0.06 do 128 µg/ml. U provjeri točnosti testiranja korišteni su kontrolni sojevi: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 i *A. baumannii* 19606 za testiranje osjetljivosti acinetobaktera i *Escherichia coli*

ATCC 25922 i *K. pneumoniae* 700603 (ESBL pozitivna) za testiranje osjetljivosti enterobakterija kao preporučeni standardni kontrolni sojevi prema CLSI.

Razrjeđenje antibiotika kolistina, vankomicina i meropenema uključivalo je otapanje 20 mg antibiotika u prahu te njihovo pojedinačno razrjeđivanje u 4 ml destilirane vode s ciljem dobivanja koncentracije od 5120 µg/ml. Stock solucije antibiotika u koncentraciji od 5120 µg/ml razrijeđene su u omjeru 1:10 (1 ml antibiotika i 9 ml M-H bujona) te se na taj način dobila početna koncentracija od 512 µg/ml. Dvostruka serijska razrjeđenja pripremljena su u M-H bujonu te ukapana mikropipetom u jažice mikrotitarskih pločica u količini od 50 µL po jažici na koje je naknadno dodano 50 µL bakterijskog inokuluma gustoće 0,5 McF. Mikrotitarske pločice inkubirane su 18-20 sati na 35-37°C te je nakon inkubacije MIK očitavan uz pomoć ogledala (277).



Slika 12. Metoda dilucije u bujonu (279)



Slika 13. Mikrodilucijska metoda u mikrotitracijskim pločicama s 96 jažica (Izvor: Branka Bedenić, Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, KBC, Zagreb)

3.2.5. Određivanje minimalne baktericidne koncentracije (MBK)

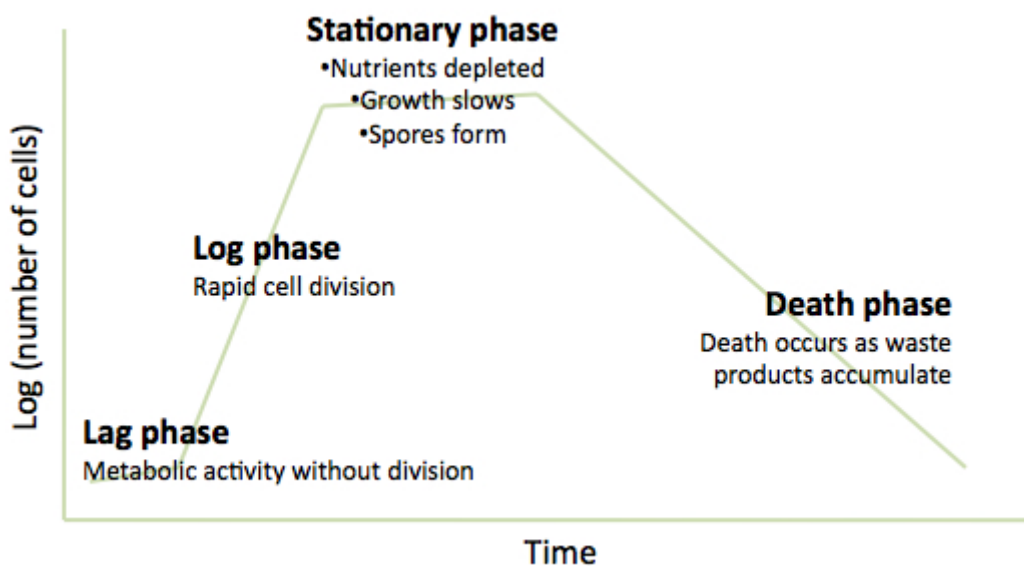
Koncentracija antibiotika koja ireverzibilno uništi 99.9% bakterijskih stanica smatra se minimalnom baktericidnom koncentracijom. MBK je ujedno i najniža koncentracija antibiotika koja sprečava porast testiranog soja u supkulturi, a određivana je na način da su uzorci testiranog soja iz jažica mikrotitar pločica u kojima je bujon ostao bistar presijavani na M-H agar u količini od 10 μ l (280).

3.3. Testovi za ispitivanje sinergije

3.3.1. Krivulje baktericidnog učinka

Prekonoćna kultura svakog testiranog soja razrjeđuje se da se postigne optička gustoća koja odgovara 0.5 McF tj. 10^8 CFU/ml i zatim se ista još jednom razrjeđuje u omjeru 1:100 kako bi se postigla koncentracija bakterijskih stanica od 10^6 do 10^7 CFU /ml. Nakon toga se svaki soj

dodatno inkubira 2 sata kako bi se postigla eksponencijalna ili log faza rasta, odnosno faza u kojoj je razmnožavanje bakterija najbrže. Broj bakterija u toj fazi se udvostručuje stalnom brzinom sve dok postoji dovoljno hranjivih sastojaka, a koncentracija metaboličkih produkata ne poraste do vrijednosti koje usporavaju ili onemogućavaju rast. Postizanje log faze je neophodno iz razloga što se u toj fazi bakterije najviše i najbrže dijele te su najosjetljivije na djelovanje antibiotika.



Slika 14. Krivulja rasta bakterija (281)

Nakon postizanja eksponencijalne faze rasta dodan je antibiotik u koncentracijama koje se postižu u krvi tokom uobičajenog doziranja antibiotika kolistin (4 mg/L), vankomicin (9 mg/L) i meropenem (10 mg/L). To su vršne koncentracije u serumu koje se postižu nakon uobičajenog doziranja od 1 g meropenema i vankomicina i 300 milijuna jedinica kolistina (282, 283, 284). Svakih sat vremena uzimani su uzorci u količini od 100 μ l i razrjeđivani u omjeru 10^{-2} , 10^{-4} i 10^{-6} te se 50 μ l svakog takvog razrjeđenja zasijavalo na M-H agar radi određivanja broja CFU/ml. Ploče su inkubirane preko noći u termostatu na 37 °C. Slijedeći dan određen je broj poraslih kolonija koji se pomnožio s razrjeđenjem kako bi se odredila vrijednost CFU/ml.

Postupak se radi u tri mjerenja nakon čega se određuje srednja vrijednost i standardna devijacija, a krivulja oporavka rasta bakterija prikazuje se na grafu (285).

3.3.2. Šah metoda

Za šah metodu korišten je raspon koncentracija kolistina od 0.06-128 µg/mL u horizontalnim jažicama i raspon od 0.03-4 µg/mL vankomicina ili meropenema u vertikalnim jažicama. Ako se MIK nalazi izvan tog raspona rade se dodatna razrjeđenja od 0.0007 do 0.003 µg/ml.

Veličina inokuluma od 10^5 CFU/ml pripremljena je od prekonocne kulture razrjeđivanjem u omjeru 1:100 u Mueller-Hinton bujonu (50 µl prekonocne kulture i 4.95 ml M-H bujona). Veličina inokuluma je određivana uspoređivanjem sa standardnom McFarland suspenzijom. Pripremljen inokulum dodan je u količini od 50 µl u jažice mikrotitar pločice u kojima se već prethodno nalazilo 50 µl razrjeđenja antibiotika.

Ploče su bile očitavane nakon 18 sati inkubacije na 37°C, a jažice u kojima nije bilo vidljivog porasta bakterija su identificirane pomoću ogledala.

FICI (eng., fractional inhibitory concentration index) je izračunat za svaki antibiotik u kombinaciji pomoću formule: $FIC_A + FIC_B = FICI$ u kojoj je $FIC_A = MIK$ od kolistina u kombinaciji s vankomicinom ili meropenem/MIK kolistina samog, a $FIC_B = MIC$ vankomicina ili meropenema u kombinaciji s kolistinom/MIK vankomicina ili meropenema samog. FICI je interpretiran na slijedeći način: sinergija ($FICI \leq 0.5$), nema interakcije ($FICI > 0.5 - \leq 4$) i antagonizam ako je $FICI > 4$ (285).

3.3.3. Metoda dvije jažice

Za svako ispitivanje pripremljeno je 6 sterilnih epruveta. Prva epruveta sadržava kolistin sam u koncentraciji 0.25 x MIK, druga kolistin sam u koncentraciji 2 x MIK, treća 0.25 x MIK

kolistina u kombinaciji 0.25 x MIK meropenema, četvrta 2 X MIK kolistina u kombinaciji s 2 x MIK meropenema, peta sadržava 0.25 x MIK kolistina u kombinaciji s 0,25 x MIK vankomicina i šesta koja sadržava 2 x MIK kolistina u kombinaciji s 2 x MIK vankomicina. Inokulum se dodaje u koncentraciji od 10^5 CFU/ml (dobiveno razrjeđivanjem prekončne kulture). Epruvete se inkubiraju preko noći na 37°C u termostatu i slijedeći dan se gleda da li postoji zamućenje ili su epruvete ostale bistre. Izostanak rasta uz koncentraciju od 0.25 x MIK kolistina u kombinaciji s meropenemom ili vankomicinom ukazuje na sinergiju antibiotika (286).

3.4. Postantibiotski učinak

Određivanje postantibiotskog učinka (PAE).

Prekončna kultura testiranog soja razrijeđena je u M-H bujonu (50 µl prekončne kulture u 4,95 ml bujona) kako bi se postigla optička gustoća koja odgovara za McF 0.5 i zatim se ista razrijedila u omjeru 1:100 u M-H bujonu (100 µl prekončne kulture u 9.99 ml bujona) da se postigne koncentracija bakterijskih stanica od 10^6 do 10^7 CFU /ml. Nakon toga se soj dodatno inkubira 2 sata kako bi se postigla eksponencijalna faza rasta. Potom se dodaje antibiotik u koncentracijama koje se postižu u krvi tokom uobičajenog doziranja antibiotika, kolistin (4 mg/L), vankomicin (9 mg/L) i meropenem (10 mg/L). Uzorci se inkubiraju uz tresenje u vodenoj kupelji na 37 °C 1 sat nakon čega se 2 ml istih prenosi u eppendorf epruvete, centrifugira i talog ispiru 2 puta u fiziološkoj otopini kako bi se odstranio antibiotik iz uzorka. Preostali talog resuspendira se u 2 ml M-H bujona i inkubira 24 sata na 37 °C kako bi se pratio oporavak rasta soja. Kontrolni uzorak ne izlaže se djelovanju antibiotika, ali se radi u svakom testu na isti način kao i uzorak tretiran antibioticima. Nakon inkubacije od 24 sata, svakih sat vremena tijekom 8 sati te nakon 24 sata uzimaju se uzorci u količini od 100 µl i razrjeđuju u

omjeru 10^{-2} , 10^{-4} i 10^{-6} u fiziološkoj otopini (100 μ l kulture + 9.99 ml fiziološke otopine) te se po 50 μ l svakog razrjeđenja zasijava na M-H agar radi određivanja broja CFU/ml. Ploče se inkubiraju preko noći u termostatu na 37°C. Slijedeći dan se određuje broj poraslih kolonija na M-H agaru koji se množi s razrjeđenjem kako bi se odredio broj CFU/ml. Krivulja oporavka rasta bakterija prikazuje se na grafu. Pokus se radi tri puta i određuje se srednja vrijednost i standardna devijacija od tri mjerenja.

PAE je definiran prema slijedećoj formuli: $PAE = T - C$, u kojoj je T vrijeme potrebno da se broj CFU u uzorcima tretiranim antibioticima poveća za $1 \log_{10}$ iznad one vrijednosti koju smo dobili odmah nakon uklanjanja antibiotika, a C je vrijeme potrebno kontrolnom uzorku koji nije izložen antibioticima da poveća broj CFU za $1 \log_{10}$.

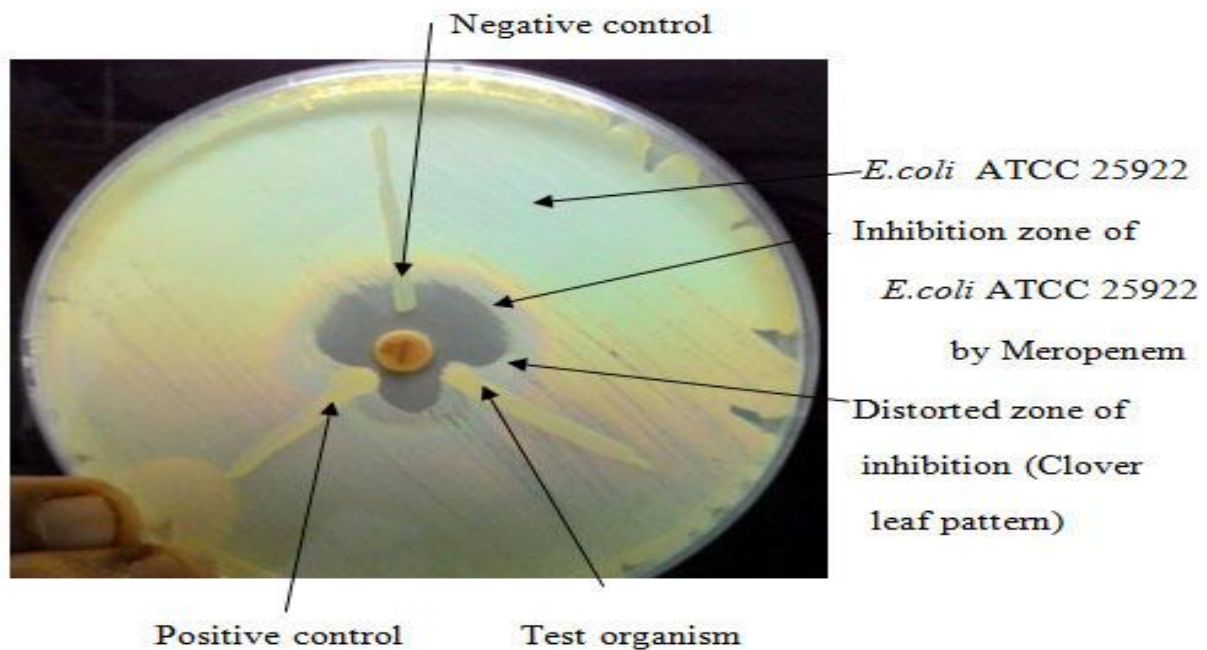
3.5. Testovi za detekciju β -laktamaza

Postupak sa sojevima enterobakterija sa smanjenom osjetljivošću na jedan od karbapenema (ertapenem, meropenem, imipenem) uključuje sljedeće testove;

3.5.1. Modificirani Hodge test

Ovim testom testiraju se sojevi *P. aeruginosa*, *A. baumannii* i enterobakterije sa smanjenom osjetljivošću na karbapeneme. Prekonoćna kultura referentnog soja *E. coli* ATCC25922 (eng., American type culture collection) se razrijeđuje tako da se postigne optička gustoća koja odgovara McF standardu 0.5 što odgovara za 10^8 CFU/ml. To razrijeđenje se zasijava na M-H agar i zatim se na sredinu ploče postavlja disk s karbapenemskim antibiotikom imipenemom (10 μ g) ili meropenemom (10 μ g). Okomito na disk se povuče testirani soj u obliku crte. Ploča se inkubira preko noći na 37°C. Interpretacija pozitivnog rezultata na produkciju

karbapenemaza podrazumijeva deformiranje i uvrtnje inhibicijske zone oko diska karbapenema tamo gdje se nalazi crta testiranog soja poput „lista djeteline“ (287).



Slika 15. Modificirani Hodge Test (288)

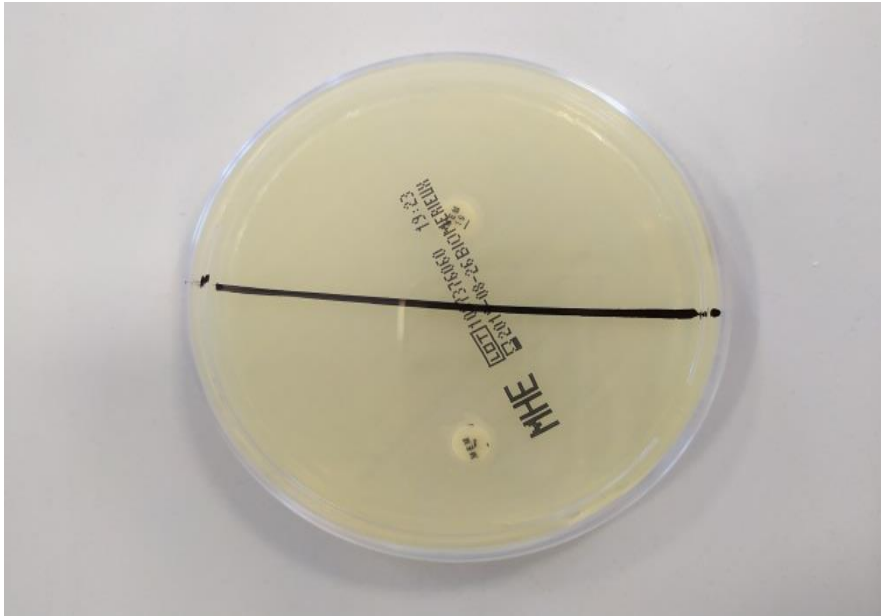
Ako je Hodge test pozitivan potrebno je testirati soj na produkciju metalo- β -laktamaza E testom (288) ili metodom dvostrukog diska sa EDTA i učiniti PCR na KPC, metalo- β -laktamaze (IMP, VIM, GIM, SPM, NDM) ili OXA-48. Za izolate *Enterobacter* spp. potrebno je još testirati IMI β -laktamaze, a za izolate *Serratia* spp. SME β -laktamaze.

Uvećanje zone uz dodatak EDTA ukazuje na produkciju metalo- β -laktamaze (290).

Test CIM (eng., carbapenem-inactivation method)

Test se izvodi na način da se disk natopljen s antibiotikom meropenemom stavlja u eppendorf epruvetu u kojoj je prethodno pripremljena gusta suspenzija testiranog soja. Nakon inkubacije

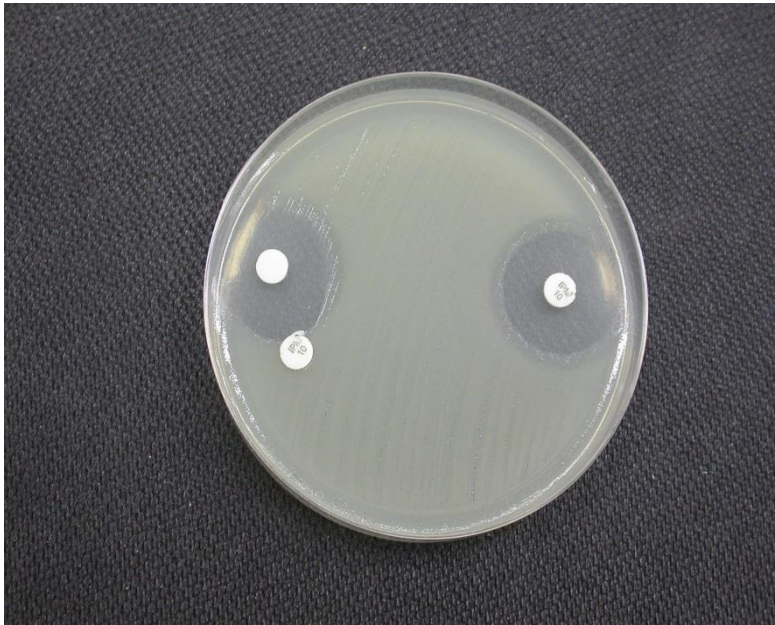
u trajanju od 2 sata vadi se disk i stavlja na M-H ploču na koju je prethodno naci jepljena osjetljiva *E. coli* ATCC 25922 koja inače ima veliku zonu oko diska meropenema. Ukoliko ispitivani bakterijski soj proizvodi karbapenemazu dolazi do hidrolize meropenema u disku tako da neće biti inhibicijske zone u osjetljive *E. coli* ili će ona biti manja od 14 mm ili će rasti kolonije unutar inhibicijske zone.



Slika 16. CIM test (Izvor: Branka Bedenić, Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, KBC, Zagreb)

Test za detekciju metalo – β -laktamaza s EDTA (eng., ethylenediaminetetraacetic acid)

Testirani soj se naci jepi na Mueller-Hinton agar kao za antibiogram. Na ploču se postavljaju dva diska imipenema i dva diska meropenema. EDTA (0.5 mM) se ukapava na diskove antibiotika meropenema i imipenema u količini od 10 μ l te se gleda da li će doći do uvećanja inhibicijske zone za najmanje 7 mm u odnosu na kontrolni disk koji nije nakapan s EDTA. EDTA inhibira metalo- β -laktamaze jer veže ione cinka, pa to onda upućuje na produkciju MBL.



Slika 17. Prikaz testa za detekciju metalo- β -laktamaza s EDTA (Izvor: Branka Bedenić, Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, KBC, Zagreb)

Metoda kombiniranih diskova za detekciju KPC i metalo- β -laktamaza

Testirani soj je zasijan na M-H agar na koji su stavljeni diskovi imipenema (10 μ g) i meropenema (10 μ g), bez dodatka inhibitora kao kontrola i s dodatkom 20 μ l fenilboronične kiseline (PBA) za detekciju produkcije KPC, EDTA za detekciju metalo- β -laktamaza ili kombinirano EDTA i PBA, za detekciju kombinirane produkcije KPC i metalo- β -laktamaza. Uvećanje inhibicijske zone oko diska koji sadržava PBA u odnosu na kontrolni disk za najmanje 5 mm upućuje na produkciju KPC β -laktamaze, uvećanje oko diska s EDTA za 7 ili više mm na produkciju MBL, a uvećanje oko diska s oba inhibitora na kombiniranu produkciju KPC i MBL (174, 290).

Kod ESBL (TEM, SHV, CTX-M, PER) ili plazmidnih ampC β -laktamaza (FOX, MOX, BIL, CMY, DHA, ACT) treba učiniti PCR na *ompK36* i *ompK35*. Ako se radi o izolatima *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp. i *Morganella* treba dodati

kod izvođenja dvostrukog disk testa u podlogu 200 mg/L kloksacilina jer AmpC β -laktamaza može antagonizirati sinergistički učinak s klavulanskom kiselinom.

3.5.2. Testovi za dokaz produkcije ESBL

Detekcija ESBL se uglavnom vrši za izolate *K. pneumoniae* i *E. coli* iako se one ponekad mogu pojaviti i kod ostalih enterobakterija i čak kod nonfermentora. Svi fenotipski testovi za detekciju ESBL se baziraju na sinergizmu cefalosporina proširenog spektra i aztreonama s klavulanskom kiselinom i zbog toga ne otkrivaju AmpC β -laktamaze proširenog spektra koje nisu inhibirane klavulanatom. Za detekciju AmpC β -laktamaza koristimo diskove cefalosporina u kombinaciji s fenilboroničnom kiselinom ili kloksacilinom jer oni inhibiraju ampC.

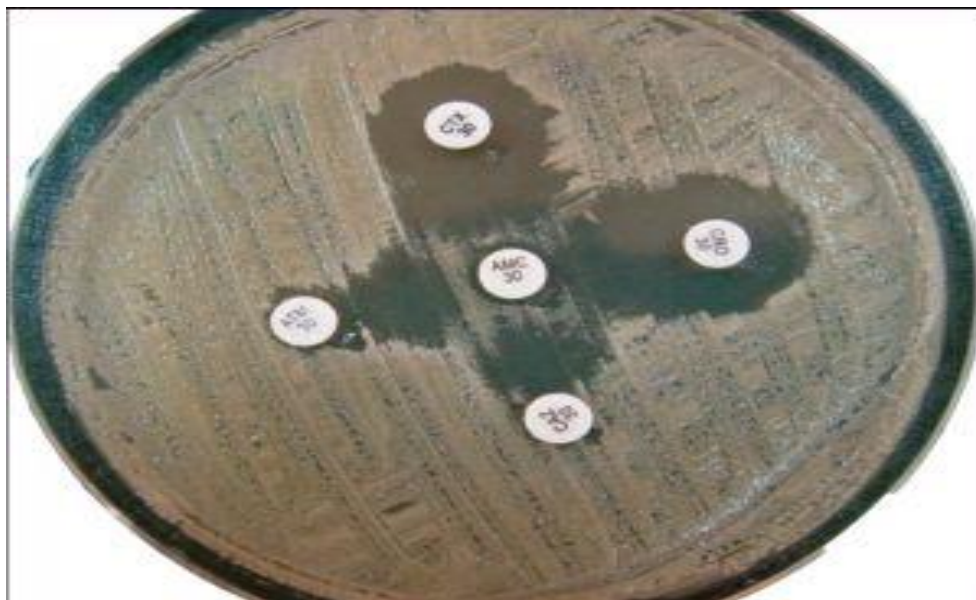
Test koji se najčešće provodi u rutinskim laboratorijima je dvostruki-disk sinergistički test. Ako se produkcija ESBL testira u bakterija koje imaju kromosomsku ampC β -laktamazu (*Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*) potrebno je u M-H agar dodati 200 mg/L kloksacilina.

3.5.3. Dvostruki disk-sinergistički test (DDST, eng., double disc synergy test)

Testirani soj suspendira se u fiziološkoj otopini na jednak način kao za izvođenje antibiograma i sterilnim brisom se nanese na površinu M-H agara. U sredinu ploče se stavlja disk koji sadržava amoksisilin kombiniran s klavulanskom kiselinom (10 000 μ g/ml, a na udaljenost od 2 do 3 cm od istog se stavljaju diskovi ceftazidima (30 μ g), cefotaksima (30 μ g), ceftriaskona (30 μ g) i aztreonama (30 μ g). Optimalna udaljenost između cefalosporinskog i centralnog diska ovisi o soju, stupnju njegove rezistencije i količini β -laktamaze koji proizvodi. Ploče se zatim inkubiraju 18 do 24 sata na 37° i zatim se očitava rezultat. Ako dođe do širenja inhibicijske zone

oko cefalosporina ili aztreonama u smjeru prema centralnom disku to se smatra pozitivnim rezultatom testa (291).

Prednost testa je njegova jednostavnost, a nedostatak je subjektivnost u čitanju rezultata. Neki autori preporučuju upotrebu cefpodoksimskog diska umjesto gore navedenih jer on uspješno detektira ESBL iz sve tri porodice: TEM, SHV i CTX- M pa je dovoljno koristiti jedan disk.



Slika 18. Dvostruki disk sinergistički test-pozitivan rezultat produkcije ESBL (292).

3.5.4. CLSI konfirmatorni test

Prekonoćna kultura testiranog soja razrijeđuje se da se postigne optička gustoća koja odgovara 0.5 McF tj. 10^8 CFU/ml. To razrijeđenje se zasijava na M-H agar i zatim se postavljaju diskovi cefotaksima, cefotaksima, ceftriaksona i aztreonama na jednu ploču, a na drugu ploču isti diskovi s dodatkom klavulanske kiseline. Klavulanska kiselina se kapa na površinu diska u koncentraciji od 10 000 mg/ml. Ploče se inkubiraju 18 do 24 sata na 35 do 37 °C. Ako je inhibicijska zona oko cefalosporinskih diskova i diska aztreonama uz dodatak klavulanske

kiseline veća za više od 5 mm u odnosu na kontrolnu ploču bez klavulanske kiseline to dokazuje produkciju ESBL (293).

3.5.5. Inhibitorom potencirani disk-difuzijski test

Za taj test je potrebno pripremiti M-H agar s inkorporiranom klavulanskom kiselinom. Klavulanska kiselina dodaje se u koncentraciji od 4 mg/L u podlogu koja mora biti prethodno ohlađena na 55 °C. Kontrolna ploča ne sadržava klavulanat. Testirani soj se zasijava na ploču s klavulanskom kiselinom i na ploču bez inkorporirane klavulanske kiseline. Na ploče se postavljaju diskovi cefalosporina (ceftazidim, cefotaksim, ceftriakson) i aztreonama i mjere se zone inhibicije na ploči s klavulanatom i na ploči bez klavulanata. Dokaz produkcije ESBL je povećanje zone inhibicije rasta oko cefalosporinskog diska za najmanje 5 mm na ploči s klavulanskom kiselinom u odnosu na kontrolnu ploču.

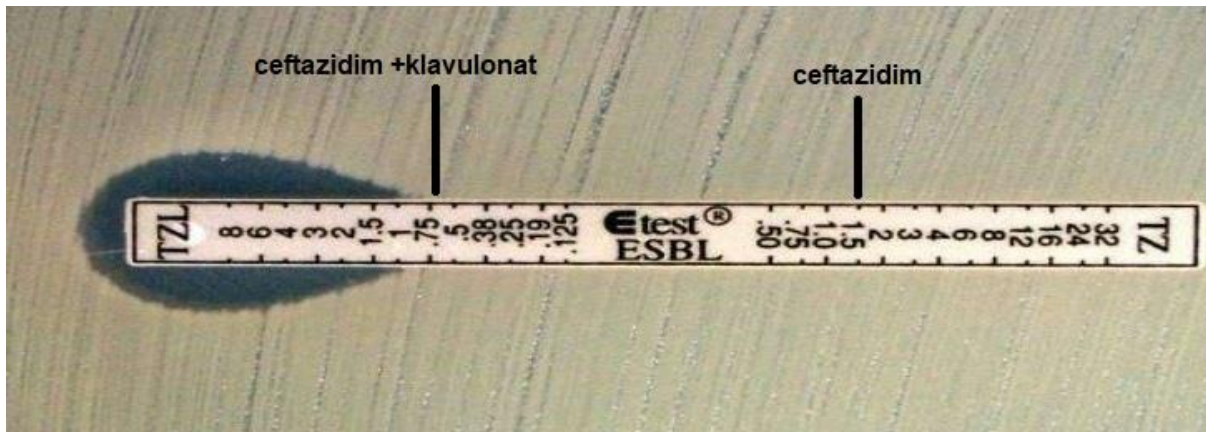
Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija ceftazidima s i bez klavulanske kiseline

Da bi se dokazala produkcija ESBL potrebno je odrediti MIK ceftazidima samog i uz dodatak fiksne koncentracije klavulanske kiseline (4 mg/L). Pozitivan rezultat je smanjenje MIK-a ceftazidima za najmanje tri razrijeđenja u prisustvu klavulanske kiseline (293).

3.5.6. E-test-ESBL

Testirani soj se suspendira u fiziološkoj otopini kao što je opisano za izradu antibiograma i nanosi se sterilnim brisom na M-H agar. Na ploču se zatim postavlja E test traka koja na jednoj polovici trake ima nanesen ceftazidim s rasponom MIK-a od 0,5 do 32 mg/ml, a na drugoj

polovici trake kombinaciju ceftazidima (s rasponom MIK-a od 0,125 do 8 mg/ml) i klavulanske kiseline u trajnoj koncentraciji od 4 mg/ml. Interpretacija rezultata se vrši prema uputama proizvođača gdje omjer MIK-a ceftazidim/ceftazidim-klavulanat predstavlja razlikovni kriterij, a pozitivna produkcija ESBL se tumači kada je MIK ceftazidima s klavulanatom za najmanje 3 razrjeđenja manji od MIK-a samog ceftazidima (289).



Slika 19. E-test- pozitivan rezultat produkcije ESBL (294)

3.5.7. Test inducibilnosti kromosomske AmpC β -laktamaze

Inducibilnost produkcije AmpC β -laktamaze je izveden pomoću cefoksitin-cefotaksim antagonističkog testa. Prekonoćna kultura testiranog soja se razrijeđuje tako da se postigne optička gustoća koja odgovara Mc Farland standardu 0.5 što odgovara za 10^8 CFU/ml. To razrjeđenje se zasijava na M-H agar i zatim se postavljaju diskovi cefoksitina i cefotaksima. Smanjenje inhibicijske zone oko diska cefotaksima u smjeru prema disku cefoksitina upućuje na inducibilnost produkcije kromosomske AmpC β -laktamaze (295).



Slika 20. Pozitivan test inducibilnosti kromosomske β -laktamaze (296)

3.5.8. Detekcija hiperprodukcije kromosomske AmpC β -laktamaze ili produkcije plazmidne AmpC β -laktamaze

Bakterije koje mogu hiperproducirati kromosomsku ampC β -laktamazu su *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii*.

Bakterije kod kojih dokazujemo plazmidne AmpC β -laktamaze su *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* i *P. mirabilis*.

Sojevi kod kojih postoji hiperprodukcija kromosomske ampC ili plazmidna ampC β -laktamaza imaju rezistenciju na cefalosporine treće generacije, cefoksitin ili kombinacije β -laktama i inhibitora β -laktamaze, a zadržavaju osjetljivost na cefepim.

Da bi se utvrdio utjecaj hiperprodukcije kromosomske AmpC β -laktamaze na rezistenciju prema cefalosporinima proširenog spektra MIK ceftazidima treba biti određivan uz dodatak kloksacilina (200 mg/L). Smanjenje MIK-a ceftazidima za najmanje 3 razrijeđenja upućuje na hiperprodukciju kromosomske β -laktamaze.

Hiperprodukcija kromosomske β -laktamaze može se potvrditi pomoću sinergizma s fenilboroničnom kiselinom koja inhibira kromosomske i plazmidne AmpC β -laktamaze. 10 μ l fenilboronične kiseline (400 μ g) se kapa na diskove cefalosporina proširenog spektra. Uvećanja inhibicijske zone za najmanje 5 mm u prisustvu inhibitora u odnosu na kontrolnu ploču koja sadržava iste diskove samo bez inhibitora, upućuje na hiperprodukciju kromosomske AmpC β -laktamaze (297). Karakterizacija plazmidnih ampC β -laktamaza vrši se pomoću multiplex PCR-a.

3.6. Detekcija gena rezistencije

Geni koji kodiraju β -laktamaze širokog i proširenog spektra: *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} i *bla*_{PER-1} (298, 299, 300, 301), plazmidne AmpC β -laktamaze (302), klasu A: *bla*_{KPC}, *bla*_{SME}, *bla*_{IMI}, *bla*_{NMC} (14, 15), klasu B karbapenemaza: *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} i *bla*_{NDM} (303, 304) i karbapenem hidrolizirajuće oksacilinaze *bla*_{OXA-48} (21, 305) te rezistenciju na fluorokinolone *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* (306) su određivani PCR-om kao što je prethodno opisano. Grupa CTX-M β -laktamaza je određivana multiplex PCR-om prema Woodford i sur. (307). PCR-mapiranje je vršeno s početnicama za insercijske sekvence *IS26* i *ISEcp1* u kombinaciji s (eng., *forward* i *reverse*) početnicom za *bla*_{CTX-M} kako bi se dokazalo prisustvo insercijske sekvence ispred ili iza gena (308).

Detekcija PCR produkata je vršena elektroforezom u agarozu gelu s naknadnim bojenjem etidium bromidom. Vizualizacija produktata se vršila pod UV transiluminatorom.

Amplikoni su bili pročišćeni na kolonama (Qiagen Purification Kit) i zatim sekvencirani s obje strane u Eurofin servisu (Ebersberg, Njemačka). Sekvence nukleotida i aminokiselina koje proizlaze iz njih su analizirane pomoću Blast programa na stranici <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Identifikacija mutacija u *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, i *bla*_{CTX} genima

se bazirala na PCR-u i sekvenciranjem PCR produkata. Sekvence su analizirane blast metodom (309). Dostupno na [http:// www.lahey.org/studies/](http://www.lahey.org/studies/).

4. STATISTIČKA ANALIZA

Podaci su prikazani tablično i grafički. Ukupna koncentracija (broj) pojedinih bakterija izražena je kroz logaritamske vrijednosti (\log_{10}), a u slučajevima gdje je uopće nije bilo bakterija navedena je vrijednost 0. Unutar uzoraka antibiotika i kontrolnog uzorka izračunate su prosječne vrijednosti triju pokusa za TK i PAE unutar svakog mjerenog vremena (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 i 24 sata) i za te vrijednosti su navedene standardne devijacije, standardna greška te 95% interval pouzdanosti (95% CI) koji predstavlja raspon mogućih vrijednosti unutar kojega se s 95% vjerojatnosti nalazi ta statistička mjera u populaciji.

Interval pouzdanosti za bilo koju statističku mjeru predstavlja raspon mogućih vrijednosti unutar kojega se s izvjesnom vjerojatnosti nalazi ta statistička mjera populacije. Kao takav, interval pouzdanosti je objektivna procjena (ne)preciznosti i veličine uzorka nekog istraživanja. Stoga, na interval pouzdanosti posredno možemo gledati i kao na mjerilo kvalitete uzorka i istraživanja. Interval pouzdanosti je omeđen granicama. Ovisno o razini pouzdanosti koju biramo, mijenja se i raspon, tj. granice intervala. Najčešće korišteni intervali pouzdanosti u biomedicinskoj literaturi su 90%-tni, 95%-tni, 99%-tni i nešto rjeđe 99,9%-tni interval pouzdanosti. Što su granice intervala uže, preciznost procjene je veća. Tradicionalno se u literaturi najčešće koristi 95%-tni interval pouzdanosti, koji je u svezi s opće prihvaćenom razinom statističke značajnosti $P < 0,05$. Za uzorak iste veličine vrijedi pravilo: što je manja razina pouzdanosti - veća je preciznost procjene (324).

Razlika u dinamici (vrijednosti \log_{10} broja bakterija) u promatranom vremenskom intervalu (od 0 do 24 sata) između uzoraka antibiotika i kontrolnog uzorka analizirana je analizom varijance za ponavljana mjerenja (RM-ANOVA) s post-hoc analizom između pojedinih uzoraka prilagođenoj prema Bonferroniju. Sve P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane statistički značajnima. U analizi se koristila programska podrška IBM SPSS for Windows verzija 25.0.

5. REZULTATI

5.1. Molekularna detekcija gena rezistencije

PCR i sekvenciranje su identificirali *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VNDM-1} i *bla*_{OXA-48} gene u izolatu *E. cloacae* 209377. *K. pneumoniae* 145846 bila je pozitivna na *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VNDM-1}, *bla*_{TEM-1}, i *bla*_{SHV-11}. U *K. pneumoniae* 38985 utvrđeni su *bla*_{KPC-2}, *bla*_{TEM-1} i *bla*_{SHV-11} geni dok je *K. pneumoniae* 609815 bila pozitivna na *bla*_{OXA-48, 1} i *bla*_{SHV-11} gene i posjedovala je kolistinsku rezistenciju koja nije bila plazmidna.

Izolati *A. baumannii* su bili pozitivni na kromosomski *bla*_{OXA-51} gen dok je *A. guillouie* bio negativan. *Bla*_{OXA-23} geni su utvrđeni i u izolatima 1486/485 i 157195. Izolati 5353/352 i *A. guillouie* su bili pozitivni na *bla*_{OXA-58} gen dok je izolat 1794/793 posjedovao *bla*_{OXA-24/40} gen. Gen koji kodira OXA-72 β-laktamazu koja je varijanta OXA-24-like identificiran je u izolatu 9728/1419. Izolat 157195 je osim *bla*_{OXA-23} gena posjedovao i *bla*_{VIM-1} gen koji kodira metalo-β-laktamazu.

5.2. Fenotipski testovi za detekciju β-laktamaza kod enterobakterija

5.2.1. Detekcija ESBL

Soj *Enterobacter cloacae* 209377 je pokazivao deformaciju inhibicijske zone u smjeru diska s klavulanskom kiselinom u testu dvostrukog diska što je upućivalo na produkciju ESBL i povećanje inhibicijske zone za više od 10 mm u prisustvu klavulanske kiseline u metodi kombiniranih diskova po CLSI-u što potvrđuje produkciju ESBL.

5.2.2. Detekcija karbapenemaza

Svi izolati enterobakterija su bili pozitivni u Hodge i CIM testu što je indiciralo produkciju karbapenemaze. *K. pneumoniae* 38985 je nadalje, pokazivala značajno uvećanje inhibicijske zone uz dodatak fenilboronične kiseline, dok je enterobakter 209377 pokazivao značajno uvećanje inhibicijske zone uz dodatak EDTA što je u skladu s produkcijom MBL.

Svi izolati acinetobaktera osim 5352/352 su bili pozitivni u Hodge i CIM testu što upućuje na produkciju karbapenemaze. Testovima s inhibitorima kao što su EDTA i klavulanska kiselina su bili negativni što pokazuje nedostatak MBL i ESBL.

5.3. Testiranje osjetljivosti - Enterobakterije

Svi osim jednog izolata (609815, OXA-48) su bili osjetljivi na kolistin s vrijednostima MIK-a u rasponu od 0.5 do 2 mg/L. Kao što je i očekivano s obzirom da su Gram-negativne bakterije svi izolati su pokazivali rezistenciju na vankomicin (MIK>128 mg/L) i varijabilne vrijednosti MIK-a meropenema s vrijednostima u rasponu od 8 do 128 mg/L kao što je prikazano u tablici 2. Minimalne bakteridicne koncentracije (MBK) su bile jednake ili veće od MIK-a do dva razrijeđenja kao što je također prikazano u tablici 2.

Tablica 2. Vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija i minimalnih baktericidnih koncentracija kolistina, vankomicina i meropenema kod testiranih sojeva enterobakterija

Izolat	MIK (mg/L)			MBK (mg/L)		
	kolistin	vankomicin	meropenem	kolistin	vankomicin	meropenem
<i>Enterobacter cloacae</i> 209377	0.5	>128	16	0.5	>128	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 145846	0.5	>128	8	0.5	>128	32
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 39895	2	>128	8	4	>128	32
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 609815	16	>128	>128	16	>128	>128

5.4. Testiranje osjetljivosti - *Acinetobacter* spp.

Svi izolati su bili osjetljivi na kolistin, ali rezistentni ili umjereno osjetljivi na meropenem te rezistentni na vankomicin. Vrijednosti MBK su bili jednake ili više od MIK-a (tablica 3).

Tablica 3. Vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija i minimalnih baktericidnih koncentracija kolistina, vankomicina i meropenema kod testiranih sojeva acinetobaktera

Izolat/broj protokola	MIK (mg/L)			MBK (mg/L)		
	kolistin	vankomicin	meropenem	kolistin	vankomicin	meropenem
Acb-OXA-23/ 1486/485	2	>128	64	2	>128	>128
Acb-OXA-24/40 / 1794/793	2	>128	>128	2	>128	>128
Acb-OXA-58 / 5353/352	2	>128	>128	4	>128	>128
Acb-OXA-143 / 135040	0.5	>128	64	2	>128	>128
Acb-OXA-23+VIM-1 / 157195	1	>128	>128	4	>128	>128
Acb OXA-58+NDM-1 / 95991	0.5	>128	64	0.5	>128	>128
Acb-OXA-72/9728 / 1419	1	>128	>128	4	>128	>128
Acb <i>ISAbal</i> /OXA-51 / 15429	0.25	>128	8	1	>128	64

Acb- *A. baumannii*

5.5. Testovi sinergije - Enterobakterije

Analiza šah metodom je utvrdila sinergiju kolistina u kombinaciji s meropenemom u svim testiranim izolatima s FICI vrijednostima između 0.12 i 0.24. FICI vrijednosti za kombinacije kolistina s vankomicinom su iznosile 0.5 u dva izolata (*K. pneumoniae* 14846 i *K. pneumoniae* 609815- kolistin rezistentan) što je upućivalo na sinergiju i iznad 0.5 što isključuje sinergiju u preostala dva izolata kao što je prikazano u tablici 4. Metoda dvije jažice je utvrdila porast svih izolata uz koncentraciju kolistina od 0.25xMIK i odsutnost rasta uz koncentraciju istog od 2 x MIK. Nije bilo porasta niti jednog testiranog soja uz 0.25 x MIK i 0.5 x MIK kolistina u kombinaciji bilo s meropenemom ili vankomicinom što dokazuje sinergiju (tablica 4).

Kolistin sam i u kombinaciji s drugim antibioticima je uzrokovao 3 log₁₀ redukciju u broju kolonija nakon prvog sata u dva od četiri testirana soja. Međutim, oporavak rasta se dogodio i u kolistina samog i u kombinaciji s druga dva antibiotika iako je dodatak meropenema ili vankomicina usporio oporavak rasta za 1 do 3 sata. Dodatak vankomicina ili meropenema nije prevenirao oporavak rasta nakon 24 sata. Baktericidni učinak nakon 24 sata je utvrđen za kombinacije s vankomicinom ili meropenemom u izolata *K. pneumoniae* 145846 pozitivnog na MBL i izolata *E. cloacae* 60815 pozitivnog na dvije MBLs i OXA-48 s redukcijom od 3 do 4 log₁₀ u odnosu na početni inokulum. Sinergija, definirana kao $\geq 2 \log_{10}$ redukcija u broju CFU/ml je zapažena u soja *K. pneumoniae* 145846 i *K. pneumoniae* 609815 pozitivnog na OXA-48 s obje kombinacije, uključujući meropenem (3-4 log₁₀ smanjenje u usporedbi sa samim kolistinom) i vankomicin (2-4 log₁₀ smanjenje u usporedbi sa samim kolistinom) što je vidljivo u tablici 4. Vankomicin sam nije imao nikakav učinak na rast sojeva pa nije prikazan u grafikonu.

Tablica 4. Sinergistički učinak kolistina u kombinaciji s meropenemom ili vankomicinom s tri testirane metode u enterobakterija

Izolat	šah metoda kolistin + vankomicin (FICI)	šah metoda kolistin + meropenem (FICI)	Time-kill kolistin + vankomicin ($\geq 2 \log_{10}$ redukcija)	Time-kill kolistin + meropenem ($\geq 2 \log_{10}$ redukcija)	Metoda dvije jažice kolistin + meropenem	Metoda dvije jažice kolistin + vankomicin
<i>Enterobacter cloacae</i> 209377	- (1,003)	+ (0.12)	-	-	Sinergija	Sinergija
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 145846	+ (0.5)	+ (0.12)	+	+	Sinergija	Sinergija
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 38985	- (1,003)	+ (0.24)	-	-	Sinergija	Sinergija
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 609815	+ (0.5)	+ (0.12)	+	+	Sinergija	Sinergija

Tablica 5. Opisna statistika baktericidnog učinka izraženog u (\log_{10} broja bakterija) soja *E.cloacae* 209377 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>E. cloacae</i> 209377 0h	kolistin TK	6,966	0,255	6,333	7,599
	kolistin+meropenem TK	6,965	0,252	6,339	7,591
	kolistin+vankomicin TK	6,965	0,252	6,339	7,591
	kontrola	6,965	0,218	6,797	7,132
<i>E. cloacae</i> 209377 1h	kolistin TK	2,945	0,666	1,291	4,599
	kolistin+meropenem TK	2,645	0,081	2,443	2,847
	kolistin+vankomicin TK	2,170	0,365	1,263	3,076
	kontrola	7,714	0,392	7,413	8,016
<i>E. cloacae</i> 209377 2h	kolistin TK	2,932	0,397	1,945	3,919
	kolistin+meropenem TK	2,543	0,454	1,416	3,669
	kolistin+vankomicin TK	2,111	0,622	0,565	3,656
	kontrola	8,377	0,556	7,950	8,804
<i>E. cloacae</i> 209377 3h	kolistin TK	2,884	0,162	2,481	3,287
	kolistin+meropenem TK	2,650	0,515	1,371	3,929
	kolistin+vankomicin TK	2,363	1,017	-0,164	4,891
	kontrola	8,691	0,656	8,186	9,195
<i>E. cloacae</i> 209377 4h	kolistin TK	3,111	0,294	2,381	3,841
	kolistin+meropenem TK	2,829	0,218	2,288	3,369
	kolistin+vankomicin TK	2,412	1,049	-0,194	5,018
	kontrola	9,135	0,553	8,709	9,560
<i>E. cloacae</i> 209377 5h	kolistin TK	3,350	0,329	2,533	4,167
	kolistin+meropenem TK	2,554	0,211	2,031	3,077
	kolistin+vankomicin TK	2,348	1,073	-0,318	5,014
	kontrola	9,217	0,459	8,864	9,571
<i>E. cloacae</i> 209377 6h	kolistin TK	3,506	0,532	2,185	4,827
	kolistin+meropenem TK	2,924	0,028	2,855	2,993
	kolistin+vankomicin TK	2,573	1,143	-0,266	5,411
	kontrola	9,623	0,139	9,515	9,730
<i>E. cloacae</i> 209377 7h	kolistin TK	3,351	0,516	2,069	4,632
	kolistin+meropenem TK	3,073	0,273	2,395	3,752
	kolistin+vankomicin TK	2,646	1,162	-0,241	5,532
	kontrola	9,647	0,296	9,420	9,875
<i>E. cloacae</i> 209377 8h	kolistin TK	3,545	1,091	0,833	6,256
	kolistin+meropenem TK	2,861	0,196	2,374	3,348
	kolistin+vankomicin TK	2,457	1,134	-0,359	5,274
	kontrola	9,944	0,065	9,894	9,993
<i>E. cloacae</i> 209377 24h	kolistin TK	5,633	0,215	5,099	6,167
	kolistin+meropenem TK	4,855	0,061	4,704	5,005
	kolistin+vankomicin TK	3,295	1,048	0,692	5,899
	kontrola	9,730	0,165	9,603	9,857

TK-time kill krivulje

Tablica 6. Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *E. cloacae* 209377 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

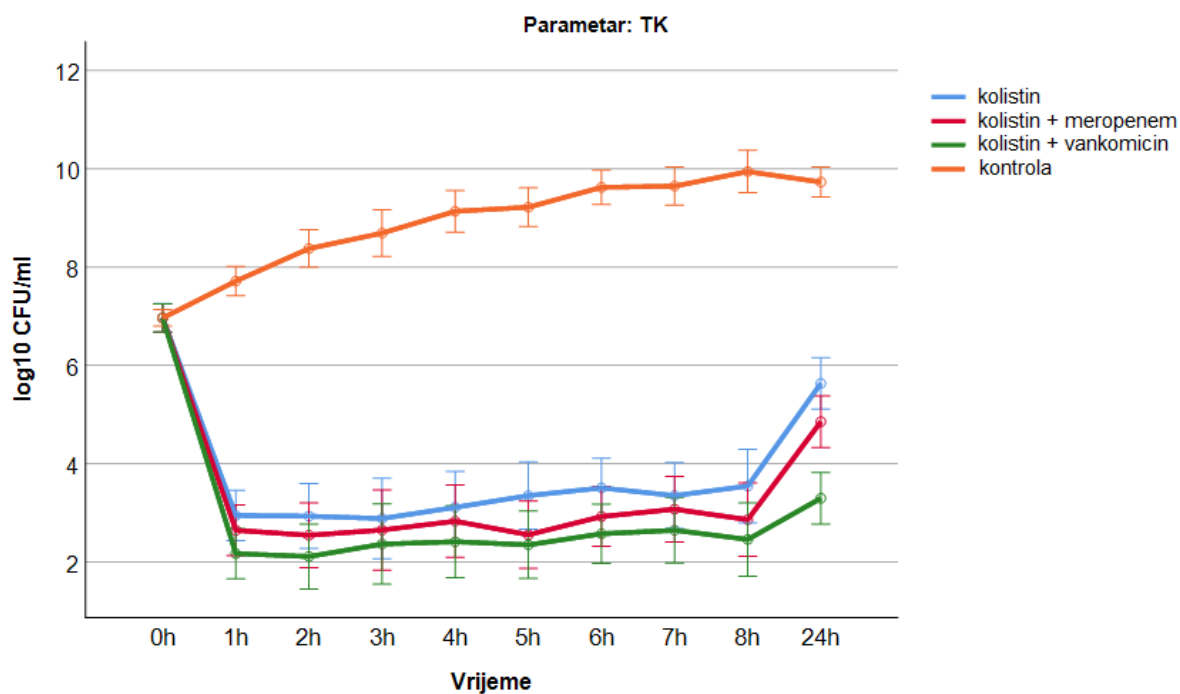
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin TK	3,822	0,210	3,371	4,273
kolistin+meropenem TK	3,390	0,210	2,939	3,841
kolistin+vankomicin TK	2,934	0,210	2,483	3,385
kontrola	8,904	0,121	8,644	9,164

Parametar = TK
TK-time kill krivulje

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin TK	kolistin+meropenem TK	0,432	0,297	1,000	-0,480	1,345
	kolistin+vankomicin TK	0,888	0,297	0,059	-0,024	1,801
	kontrola	-5,082*	0,243	<0,001	-5,827	-4,337
kolistin+meropenem TK	kolistin TK	-0,432	0,297	1,000	-1,345	0,480
	kolistin+vankomicin TK	0,456	0,297	0,884	-0,456	1,368
	kontrola	-5,514*	0,243	<0,001	-6,259	-4,770
kolistin+vankomicin TK	kolistin TK	-0,888	0,297	0,059	-1,801	0,024
	kolistin+meropenem TK	-0,456	0,297	0,884	-1,368	0,456
	kontrola	-5,970*	0,243	<0,001	-6,715	-5,225
kontrola	kolistin TK	5,082*	0,243	<0,001	4,337	5,827
	kolistin+meropenem TK	5,514*	0,243	<0,001	4,770	6,259
	kolistin+vankomicin TK	5,970*	0,243	<0,001	5,225	6,715

TK-time kill krivulje



Slika 21. Dinamika baktericidnog učinka u bakterijskog soja *E. cloacae* 209377 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *E. cloacae* 209377 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 6 i na slici 21. Zabilježene su značajno niže vrijednosti u uzorcima tretiranim antibioticima u odnosu na kontrolni uzorak ($P < 0,001$), dok između antibiotika nije bilo značajnih razlika.

Tablica 7. Opisna statistika baktericidnog učinka izraženog u (\log_{10} broja bakterija) soja *K. pneumoniae* 145846 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>K. pneumoniae</i> 145846 0h	kolistin TK	6,734	0,273	6,055	7,413
	kolistin+meropenem TK	6,734	0,273	6,055	7,413
	kolistin+vankomicin TK	6,734	0,273	6,055	7,413
	kontrola	6,734	0,237	6,552	6,916
<i>K. pneumoniae</i> 145846 1h	kolistin TK	2,655	0,837	0,576	4,733
	kolistin+meropenem TK	2,156	0,943	-0,186	4,498
	kolistin+vankomicin TK	2,003	0,725	0,204	3,803
	kontrola	7,580	0,457	7,228	7,931
<i>K. pneumoniae</i> 145846 2h	kolistin TK	2,277	0,686	0,573	3,980
	kolistin+meropenem TK	2,146	0,876	-0,031	4,322
	kolistin+vankomicin TK	1,473	1,457	-2,147	5,093
	kontrola	8,248	0,633	7,761	8,734
<i>K. pneumoniae</i> 145846 3h	kolistin TK	1,919	0,797	-0,060	3,899
	kolistin+meropenem TK	1,699	1,511	-2,054	5,452
	kolistin+vankomicin TK	1,212	1,191	-1,746	4,170
	kontrola	8,447	0,668	7,933	8,960
<i>K. pneumoniae</i> 145846 4h	kolistin TK	1,905	0,862	-0,236	4,046
	kolistin+meropenem TK	1,574	1,363	-1,813	4,961
	kolistin+vankomicin TK	1,133	1,026	-1,416	3,682
	kontrola	9,128	0,602	8,666	9,591
<i>K. pneumoniae</i> 145846 5h	kolistin TK	2,716	0,941	0,378	5,054
	kolistin+meropenem TK	1,579	1,377	-1,842	4,999
	kolistin+vankomicin TK	1,001	0,965	-1,395	3,397
	kontrola	9,328	0,514	8,933	9,723
<i>K. pneumoniae</i> 145846 6h	kolistin TK	3,268	1,527	-0,524	7,061
	kolistin+meropenem TK	1,823	1,589	-2,124	5,771
	kolistin+vankomicin TK	1,079	0,937	-1,248	3,406
	kontrola	9,470	0,404	9,160	9,780
<i>K. pneumoniae</i> 145846 7h	kolistin TK	3,636	2,056	-1,472	8,744
	kolistin+meropenem TK	1,850	1,605	-2,137	5,837
	kolistin+vankomicin TK	1,194	1,035	-1,376	3,765
	kontrola	9,519	0,457	9,168	9,871
<i>K. pneumoniae</i> 145846 8h	kolistin TK	3,578	1,980	-1,340	8,496
	kolistin+meropenem TK	1,985	1,719	-2,286	6,256
	kolistin+vankomicin TK	1,357	1,176	-1,564	4,278
	kontrola	9,508	0,403	9,198	9,818
<i>K. pneumoniae</i> 145846 24h	kolistin TK	6,105	0,474	4,927	7,284
	kolistin+meropenem TK	3,517	0,410	2,498	4,536
	kolistin+vankomicin TK	3,264	0,313	2,488	4,040
	kontrola	9,649	0,025	9,630	9,669

TK-time kill krivulje

Tablica 8. Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *K. pneumoniae* 145846 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

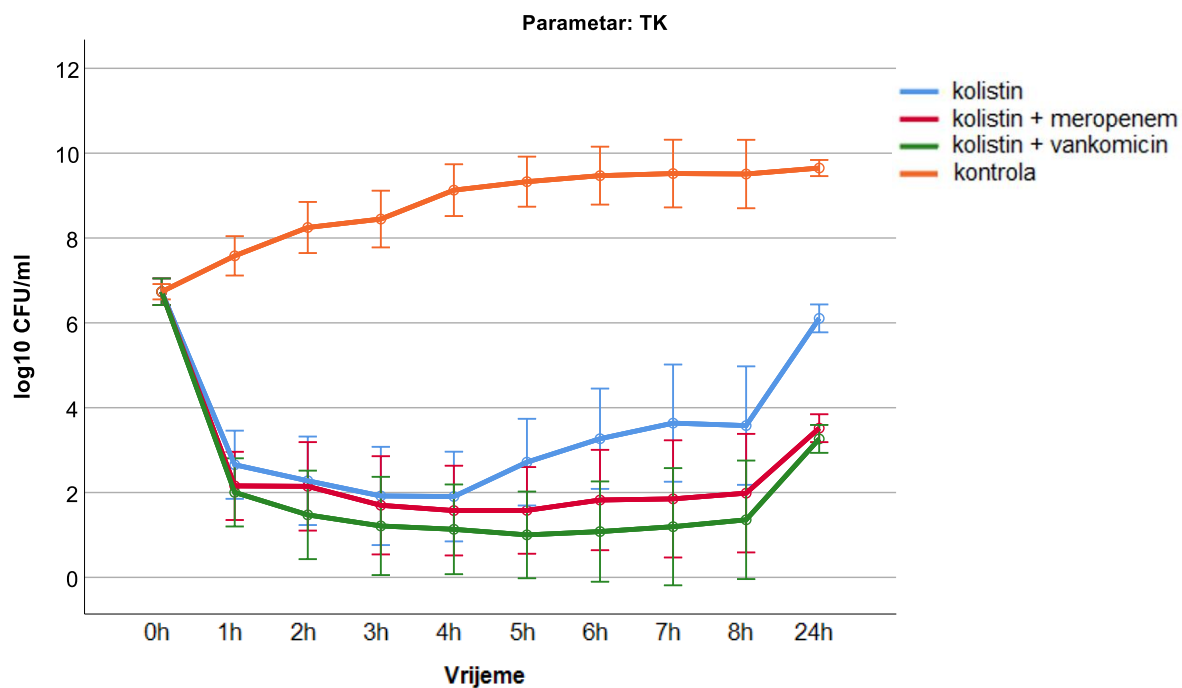
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin TK	3,479	0,396	2,630	4,329
kolistin+meropenem TK	2,506	0,396	1,657	3,356
kolistin+vankomicin TK	2,045	0,396	1,195	2,895
kontrola	8,761	0,229	8,271	9,252

Parametar = TK
TK-time kill krivulje

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin TK	kolistin+meropenem TK	0,973	0,560	0,626	-0,746	2,692
	kolistin+vankomicin TK	1,434	0,560	0,136	-0,285	3,153
	kontrola	-5,282*	0,457	<0,001	-6,685	-3,878
kolistin+meropenem TK	kolistin TK	-0,973	0,560	0,626	-2,692	0,746
	kolistin+vankomicin TK	0,461	0,560	1,000	-1,258	2,180
	kontrola	-6,255*	0,457	<0,001	-7,658	-4,851
kolistin+vankomicin TK	kolistin TK	-1,434	0,560	0,136	-3,153	0,285
	kolistin+meropenem TK	-0,461	0,560	1,000	-2,180	1,258
	kontrola	-6,716*	0,457	<0,001	-8,120	-5,312
kontrola	kolistin TK	5,282*	0,457	<0,001	3,878	6,685
	kolistin+meropenem TK	6,255*	0,457	<0,001	4,851	7,658
	kolistin+vankomicin TK	6,716*	0,457	<0,001	5,312	8,120

TK-time kill krivulje



Slika 22. Dinamika baktericidnog učinka u bakterijskog soja *K. pneumoniae* 145846 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *K. pneumoniae* 145846 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 8 i na slici 22. Zabilježene su značajno niže vrijednosti u uzorcima tretiranim antibioticima u odnosu kontrolini uzorak ($P < 0,001$), dok između pojedinih antibiotika nije bilo značajnih razlika.

Tablica 9. Opisna statistika baktericidnog učinka izraženog u (\log_{10} broja bakterija) soja *K. pneumoniae* 38985 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>K. pneumoniae</i> 38985 0h	kolistin TK	6,959	0,530	5,643	8,275
	kolistin+meropenem TK	6,959	0,530	5,643	8,275
	kolistin+vankomicin TK	6,959	0,530	5,643	8,275
	kontrola	6,959	0,459	6,606	7,312
<i>K. pneumoniae</i> 38985 1h	kolistin TK	5,216	0,402	4,217	6,214
	kolistin+meropenem TK	4,581	1,136	1,759	7,403
	kolistin+vankomicin TK	4,822	0,557	3,437	6,206
	kontrola	7,922	0,049	7,884	7,960
<i>K. pneumoniae</i> 38985 2h	kolistin TK	4,844	0,323	4,042	5,646
	kolistin+meropenem TK	4,820	0,918	2,540	7,100
	kolistin+vankomicin TK	4,432	0,500	3,189	5,674
	kontrola	8,667	0,198	8,515	8,820
<i>K. pneumoniae</i> 38985 3h	kolistin TK	5,223	0,768	3,317	7,130
	kolistin+meropenem TK	3,910	0,352	3,035	4,785
	kolistin+vankomicin TK	3,965	0,901	1,726	6,204
	kontrola	8,948	0,059	8,902	8,993
<i>K. pneumoniae</i> 38985 4h	kolistin TK	5,366	0,452	4,243	6,490
	kolistin+meropenem TK	4,686	0,336	3,850	5,522
	kolistin+vankomicin TK	4,044	0,411	3,022	5,065
	kontrola	9,707	0,097	9,632	9,781
<i>K. pneumoniae</i> 38985 5h	kolistin TK	5,729	0,272	5,053	6,406
	kolistin+meropenem TK	4,842	0,227	4,278	5,406
	kolistin+vankomicin TK	4,059	0,654	2,435	5,684
	kontrola	9,879	0,046	9,843	9,914
<i>K. pneumoniae</i> 38985 6h	kolistin TK	5,800	0,483	4,600	7,001
	kolistin+meropenem TK	5,120	0,357	4,234	6,006
	kolistin+vankomicin TK	4,733	0,285	4,026	5,440
	kontrola	9,913	0,065	9,863	9,963
<i>K. pneumoniae</i> 38985 7h	kolistin TK	6,164	0,559	4,776	7,552
	kolistin+meropenem TK	5,259	0,595	3,780	6,738
	kolistin+vankomicin TK	5,055	0,793	3,086	7,024
	kontrola	9,599	0,179	9,461	9,737
<i>K. pneumoniae</i> 38985 8h	kolistin TK	6,185	0,588	4,723	7,647
	kolistin+meropenem TK	5,778	0,288	5,064	6,493
	kolistin+vankomicin TK	5,313	0,580	3,872	6,753
	kontrola	9,641	0,331	9,387	9,896
<i>K. pneumoniae</i> 38985 24h	kolistin TK	6,869	0,070	6,696	7,043
	kolistin+meropenem TK	5,597	1,233	2,536	8,659
	kolistin+vankomicin TK	5,865	0,015	5,828	5,902
	kontrola	9,887	0,029	9,865	9,910

TK-time kill krivulje

Tablica 10. Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *K. pneumoniae* 38985 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

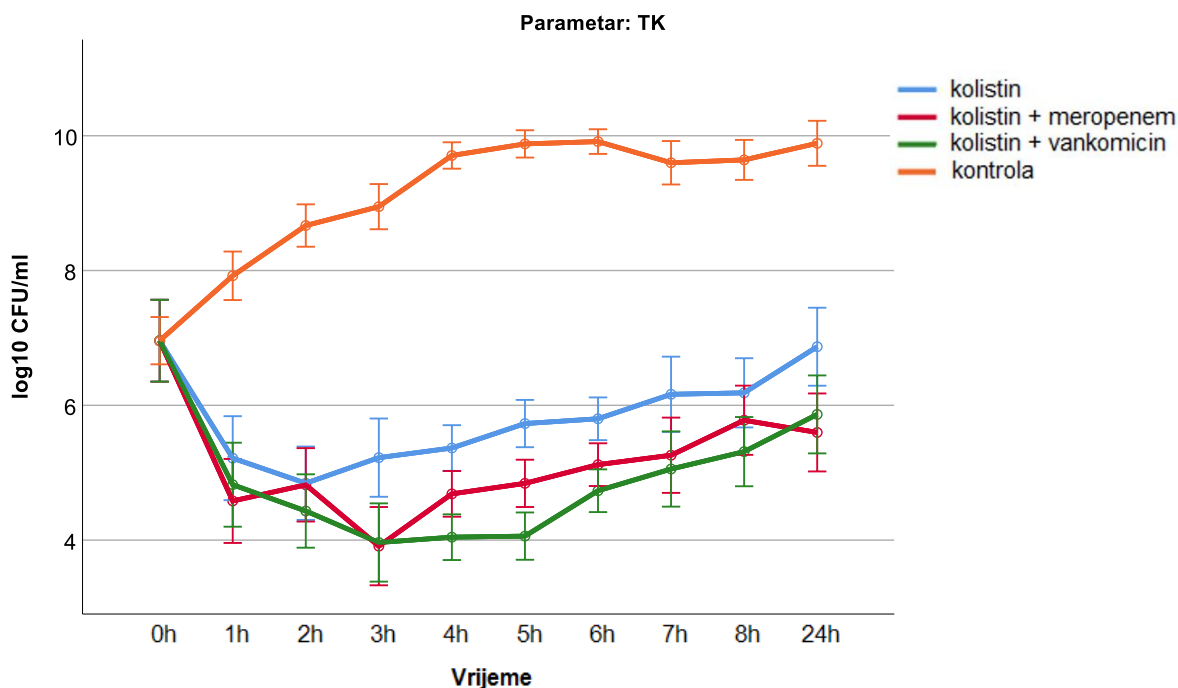
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin TK	5,836	0,144	5,527	6,144
kolistin+meropenem TK	5,155	0,144	4,847	5,464
kolistin+vankomicin TK	4,925	0,144	4,616	5,233
kontrola	9,112	0,083	8,934	9,290

Parametar = TK
TK-time kill krivulje

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin TK	kolistin+meropenem TK	0,680*	0,203	0,029	0,056	1,305
	kolistin+vankomicin TK	0,911*	0,203	0,003	0,287	1,535
	kontrola	-3,277*	0,166	<0,001	-3,786	-2,767
kolistin+meropenem TK	kolistin TK	-0,680*	0,203	0,029	-1,305	-0,056
	kolistin+vankomicin TK	0,231	0,203	1,000	-0,394	0,855
	kontrola	-3,957*	0,166	<0,001	-4,467	-3,447
kolistin+vankomicin TK	kolistin TK	-0,911*	0,203	0,003	-1,535	-0,287
	kolistin+meropenem TK	-0,231	0,203	1,000	-0,855	0,394
	kontrola	-4,188*	0,166	<0,001	-4,697	-3,678
kontrola	kolistin TK	3,277*	0,166	<0,001	2,767	3,786
	kolistin+meropenem TK	3,957*	0,166	<0,001	3,447	4,467
	kolistin+vankomicin TK	4,188*	0,166	<0,001	3,678	4,697

TK-time kill krivulje



Slika 23. Dinamika baktericidnog učinka u bakterijskog soja *K. pneumoniae* 38985 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *K. pneumoniae* 38985 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 10 i na slici 23. Zabilježene su značajno niže vrijednosti broja vijabilnih bakterijskih stanica u uzorcima tretiranim antibioticima u odnosu na kontrolni uzorak ($P < 0,001$), dok između pojedinih antibiotika i njihovih kombinacija postoje značajne niže vrijednosti u kombinacijama kolistina s meropenemom ($P = 0,029$) i kolistina u kombinaciji s vankomicinom ($P = 0,003$) u odnosu na kolistin sam.

Tablica 11. Opisna statistika baktericidnog učinka izraženog u (\log_{10} broja bakterija) soja *K. pneumoniae* 609815 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>K. pneumoniae</i> 609815 0h	kolistin TK	6,721	0,407	5,711	7,732
	kolistin+meropenem TK	6,721	0,407	5,711	7,732
	kolistin+vankomicin TK	6,721	0,407	5,711	7,732
	kontrola	6,721	0,352	6,451	6,992
<i>K. pneumoniae</i> 609815 1h	kolistin TK	7,029	0,363	6,128	7,930
	kolistin+meropenem TK	3,536	0,337	2,699	4,373
	kolistin+vankomicin TK	4,121	0,574	2,696	5,546
	kontrola	7,299	0,308	7,061	7,536
<i>K. pneumoniae</i> 609815 2h	kolistin TK	7,176	0,431	6,105	8,247
	kolistin+meropenem TK	2,723	0,545	1,369	4,077
	kolistin+vankomicin TK	3,808	0,489	2,592	5,023
	kontrola	7,580	0,376	7,292	7,869
<i>K. pneumoniae</i> 609815 3h	kolistin TK	7,819	0,152	7,440	8,197
	kolistin+meropenem TK	1,727	0,308	0,962	2,493
	kolistin+vankomicin TK	3,068	0,668	1,408	4,729
	kontrola	8,178	0,585	7,728	8,627
<i>K. pneumoniae</i> 609815 4h	kolistin TK	7,912	0,129	7,592	8,233
	kolistin+meropenem TK	1,427	0,442	0,330	2,525
	kolistin+vankomicin TK	3,095	0,434	2,017	4,173
	kontrola	8,387	0,539	7,973	8,802
<i>K. pneumoniae</i> 609815 5h	kolistin TK	8,393	0,386	7,434	9,351
	kolistin+meropenem TK	0,786	0,688	-0,923	2,495
	kolistin+vankomicin TK	2,471	0,524	1,170	3,771
	kontrola	8,739	0,300	8,508	8,969
<i>K. pneumoniae</i> 609815 6h	kolistin TK	8,616	0,472	7,444	9,789
	kolistin+meropenem TK	0,159	0,275	-0,525	0,843
	kolistin+vankomicin TK	2,550	0,609	1,038	4,062
	kontrola	9,164	0,460	8,810	9,517
<i>K. pneumoniae</i> 609815 7h	kolistin TK	9,177	0,473	8,003	10,351
	kolistin+meropenem TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kolistin+vankomicin TK	2,559	0,932	0,245	4,873
	kontrola	9,512	0,441	9,173	9,851
<i>K. pneumoniae</i> 609815 8h	kolistin TK	9,453	0,419	8,412	10,494
	kolistin+meropenem TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kolistin+vankomicin TK	2,661	1,107	-0,089	5,411
	kontrola	9,643	0,235	9,462	9,823
<i>K. pneumoniae</i> 609815 24h	kolistin TK	9,448	0,520	8,157	10,739
	kolistin+meropenem TK	5,962	0,342	5,114	6,811
	kolistin+vankomicin TK	5,197	0,576	3,767	6,627
	kontrola	9,857	0,018	9,843	9,871

TK-time kill krivulje

Tablica 12. Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *K. pneumoniae* 609815 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

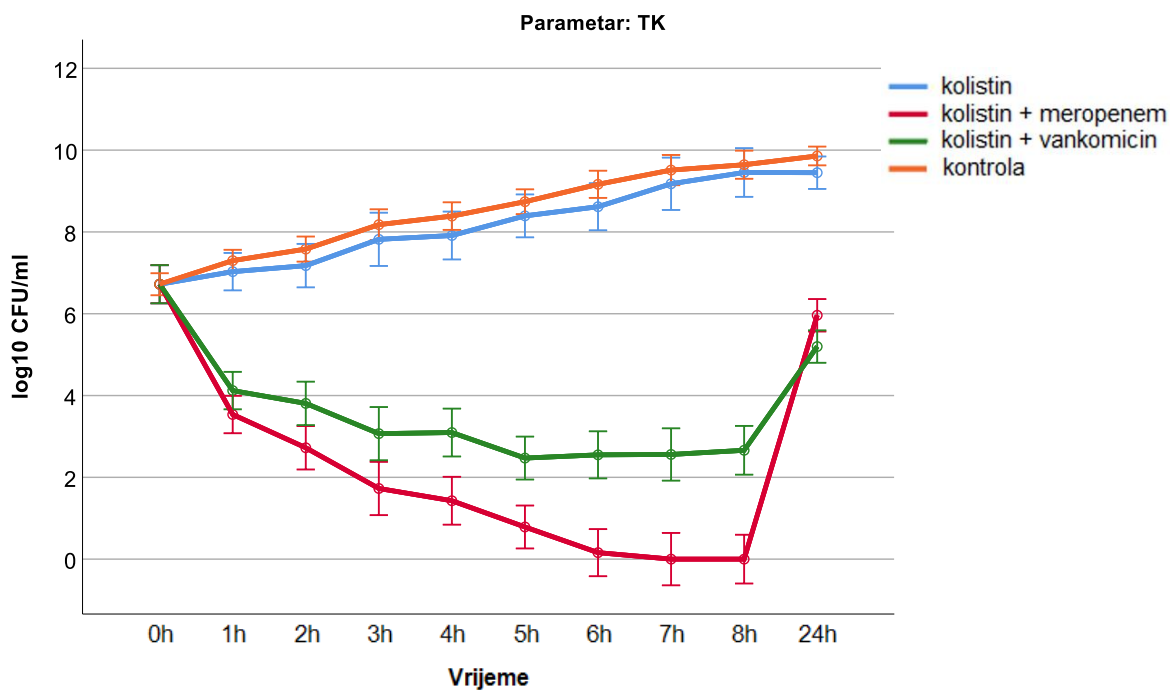
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin TK	8,174	0,167	7,817	8,531
kolistin+meropenem TK	2,304	0,167	1,947	2,661
kolistin+vankomicin TK	3,625	0,167	3,268	3,982
kontrola	8,508	0,096	8,302	8,714

Parametar = TK
TK-time kill krivulje

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin TK	kolistin+meropenem TK	5,870*	0,235	<0,001	5,147	6,593
	kolistin+vankomicin TK	4,549*	0,235	<0,001	3,827	5,272
	kontrola	-0,334	0,192	0,628	-0,924	0,256
kolistin+meropenem TK	kolistin TK	-5,870*	0,235	<0,001	-6,593	-5,147
	kolistin+vankomicin TK	-1,321*	0,235	<0,001	-2,043	-0,598
	kontrola	-6,204*	0,192	<0,001	-6,794	-5,614
kolistin+vankomicin TK	kolistin TK	-4,549*	0,235	<0,001	-5,272	-3,827
	kolistin+meropenem TK	1,321*	0,235	<0,001	0,598	2,043
	kontrola	-4,883*	0,192	<0,001	-5,473	-4,293
kontrola	kolistin TK	0,334	0,192	0,628	-0,256	0,924
	kolistin+meropenem TK	6,204*	0,192	<0,001	5,614	6,794
	kolistin+vankomicin TK	4,883*	0,192	<0,001	4,293	5,473

TK-time kill krivulje



Slika 24. Dinamika baktericidnog učinka u bakterijskog soja *K. pneumoniae* 609815 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *K. pneumoniae* 609815 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 12 i na slici 24. Zabilježene su značajno niže vrijednosti broja vijabilnih bakterijskih stanica u uzorcima tretiranim antibioticima u odnosu na kontrolni uzorak ($P < 0,001$) osim kod kolistina samog ($P = 0,628$), dok između pojedinih antibiotika postoje značajne niže vrijednosti kombinacija kolistina s meropenemom ($P < 0,001$), te kolistina s vakomicinom ($P < 0,001$) u odnosu na kolistin sam.

5.6. Testovi sinergije – *Acinetobacter* spp.

Rezultati šah metode su dokazali sinergiju između kolistina i vankomicina za sve testirane sojeve osim OXA-58, OXA-58+NDM-1 i *ISAbal/OXA-69* pozitivnih organizama s vrijednostima FICI-a između 0.003 i 1 kao što je vidljivo u tablici 13. Metodom dvije jažice utvrđen je porast svih sojeva uz 0.25 x MIK kolistina samog i izostanak rasta nakon izlaganja 2 x MIK kolistina (tablica 13). Nije bilo porasta niti jednog testiranog soja uz koncentraciju od 0.25 x MIK i 2 x MIK kolistina u kombinaciji bilo s vankomicinom ili meropenemom što ukazuje na sinergiju (tablica 13).

Krivulje baktericidnog učinka su pokazale brzi baktericidni učinak kolistina samog s redukcijom broja CFU/ml od 1.5 log₁₀ (OXA-23, OXA-24), 2 log₁₀ (OXA-58, OXA-143, OXA-72, OXA-23+VIM-1) ili 3log₁₀ (*ISAbal/OXA69*, OXA-58+NDM-1) unutar 1 sata od izlaganja početnog inokuluma. Međutim, nakon početnog baktericidnog učinka nije bilo dodatne redukcije broja CFU unutar tri sata. Kolistin u kombinaciji s vankomicinom je uzrokovao brz baktericidni učinak s manje od 1 log₁₀ (OXA-23, OXA-24, OXA-23+VIM-1, OXA-72) ili nedetektabilnim brojem kolonija (OXA-58, OXA-143, OXA-58+NDM-1, *ISAbal/OXA69*) nakon 2 sata ekspozicije i bez ponovnog oporavka rasta nakon 24 sata. Kombinacija kolistina s vankomicinom je pokazivala >5 puta razliku u broju CFU nakon 24 sata u odnosu na kolistin sam i u odnosu na početni inokulum. Kada je kolistin kombiniran s meropenemom sinergija je utvrđena u OXA-24 pozitivnog soja (1 log₁₀ redukcija u broju kolonija u odnosu na kulturu tretiranu samim kolistinom, 3 log₁₀ u OXA-72 pozitivnog soja, 4 log₁₀ OXA-23+VIM-1, *ISAbal/OXA69* i OXA-58+NDM-1 (5 log₁₀), OXA-23, OXA-58 i OXA-143 pozitivni izolati nisu iskazivali sinergistički učinak.

Tablica 13. Sinergistički učinak kolistina u kombinaciji s meropenemom ili vankomicinom s tri testirane metode u acinetobaktera

Izolat	Šah metoda kolistin + vankomicin (FICI)	Šah metoda kolistin + meropenem (FICI)	Metoda dvije jažice kolistin + vankomicin	Metoda dvije jažice kolistin + meropenem	Time-kill kolistin + vankomicin ≥ 2 log ₁₀ redukcija u broju CFU/ml	Time-kill kolistin + meropenem ≥ 2 log ₁₀ redukcija u broju CFU/ml
OXA-23	+ (0.031)	+ (0.015)	+	+	+ (nema rasta)	-
OXA-24	+ (0.25)	+ (0.03046)	+	+	+ (nema rasta)	+ (2 log ₁₀)
OXA-58	- (0.56)	+ (0.00077)	+	+	+ (nema rasta)	-
OXA-143	+ (0.003)	+ (0.125)	+	+	+ (nema rasta)	-
OXA-23+VIM-1	+ (0.253)	+ (0.5)	+	+	+ (nema rasta)	+ (nema rasta)
OXA-58+NDM-1	- (0.5003)	- (0.5001)	+	+	+ (nema rasta)	+ (nema rasta)
OXA-72	+ (0.253)	+ (0.5)	+	+	+ (nema rasta)	+ (nema rasta)
<i>ISAbal</i> /OXA-51	- (1.009)	- (1.25)	+	+	+ (nema rasta)	+ (nema rasta)

Tablica 14. Opisna statistika baktericidnog učinka izraženog u (\log_{10} CFU/ml) soja *A. baumannii* 1486/485, pozitivan na OXA-23 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>A. baumannii</i> (OXA-23) 0h	kolistin TK	7,170	0,540	5,828	8,512
	kolistin+meropenem TK	7,170	0,540	5,828	8,512
	kolistin+vankomicin TK	7,170	0,540	5,828	8,512
	kontrola	7,431	0,500	7,047	7,815
<i>A. baumannii</i> (OXA-23) 1h	kolistin TK	5,023	1,108	2,272	7,775
	kolistin+meropenem TK	4,037	0,437	2,952	5,121
	kolistin+vankomicin TK	1,193	0,890	-1,018	3,404
	kontrola	7,794	0,286	7,575	8,014
<i>A. baumannii</i> (OXA-23) 2h	kolistin TK	4,740	1,284	1,550	7,930
	kolistin+meropenem TK	3,813	0,395	2,831	4,795
	kolistin+vankomicin TK	0,420	0,727	-1,387	2,227
	kontrola	8,360	0,431	8,029	8,691
<i>A. baumannii</i> (OXA-23) 3h	kolistin TK	4,653	1,487	0,960	8,346
	kolistin+meropenem TK	4,023	0,960	1,637	6,409
	kolistin+vankomicin TK	0,200	0,346	-0,661	1,061
	kontrola	8,987	0,624	8,507	9,466
<i>A. baumannii</i> (OXA-23) 4h	kolistin TK	4,637	1,079	1,955	7,318
	kolistin+meropenem TK	4,173	1,140	1,340	7,006
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,403	0,657	8,898	9,908
<i>A. baumannii</i> (OXA-23) 5h	kolistin TK	4,733	0,854	2,611	6,856
	kolistin+meropenem TK	4,180	1,062	1,541	6,819
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,547	0,493	9,168	9,926
<i>A. baumannii</i> (OXA-23) 6h	kolistin TK	4,663	0,645	3,060	6,266
	kolistin+meropenem TK	3,800	0,693	2,079	5,521
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,704	0,218	9,537	9,872
<i>A. baumannii</i> (OXA-23) 7h	kolistin TK	4,287	0,555	2,908	5,666
	kolistin+meropenem TK	3,927	0,817	1,897	5,957
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,793	0,160	9,670	9,916
<i>A. baumannii</i> (OXA-23) 8h	kolistin TK	4,460	0,014	4,333	4,587
	kolistin+meropenem TK	3,943	0,925	1,645	6,242
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,728	0,198	9,483	9,973
<i>A. baumannii</i> (OXA-23) 24h	kolistin TK	5,033	1,289	1,832	8,235
	kolistin+meropenem TK	5,467	0,857	3,338	7,596
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,870	0,045	9,835	9,905

TK-time kill krivulje

Tablica 15. Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 1486/485 pozitivan na OXA-23 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

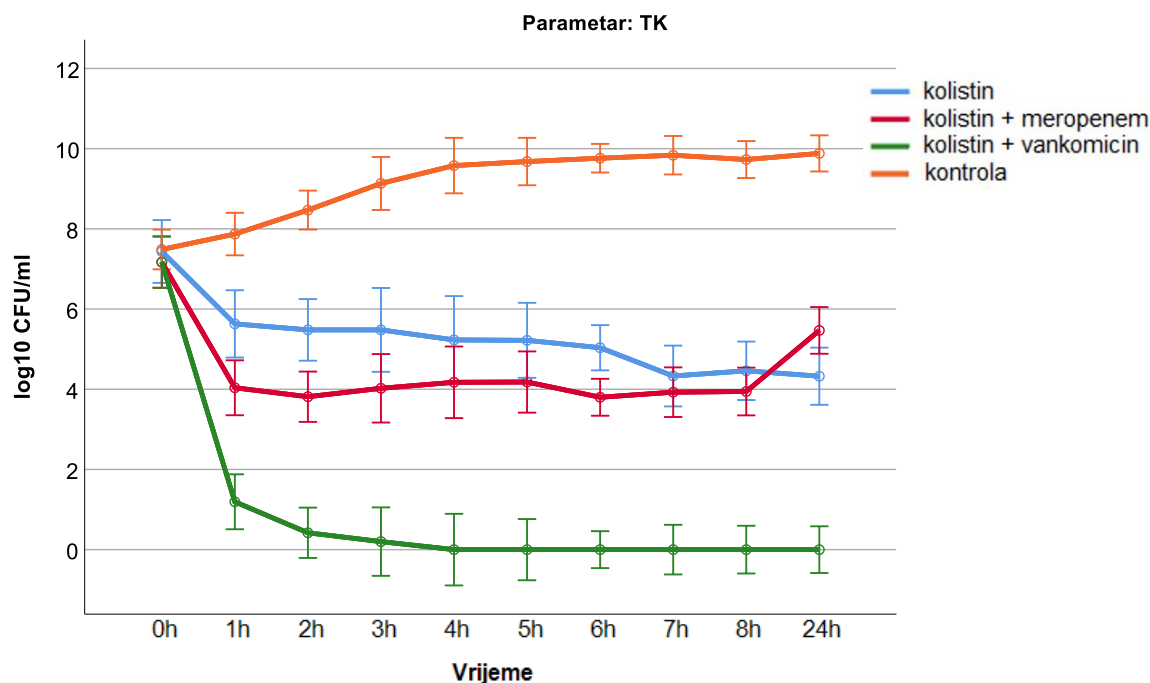
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin TK	4,791	0,369	4,000	5,583
kolistin+meropenem TK	4,453	0,369	3,662	5,245
kolistin+vankomicin TK	0,898	0,369	0,107	1,690
kontrola	8,629	0,213	8,173	9,086

Parametar = TK
TK-time kill krivulje

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin TK	kolistin+meropenem TK	0,338	0,522	1,000	-1,263	1,939
	kolistin+vankomicin TK	3,893*	0,522	<0,001	2,292	5,494
	kontrola	-3,838*	0,426	<0,001	-5,145	-2,531
kolistin+meropenem TK	kolistin TK	-0,338	0,522	1,000	-1,939	1,263
	kolistin+vankomicin TK	3,555*	0,522	<0,001	1,954	5,156
	kontrola	-4,176*	0,426	<0,001	-5,483	-2,869
kolistin+vankomicin TK	kolistin TK	-3,893*	0,522	<0,001	-5,494	-2,292
	kolistin+meropenem TK	-3,555*	0,522	<0,001	-5,156	-1,954
	kontrola	-7,731*	0,426	<0,001	-9,038	-6,424
kontrola	kolistin TK	3,838*	0,426	<0,001	2,531	5,145
	kolistin+meropenem TK	4,176*	0,426	<0,001	2,869	5,483
	kolistin+vankomicin TK	7,731*	0,426	<0,001	6,424	9,038

TK-time kill krivulje



Slika 25. Dinamika baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 1486/485 pozitivan na OXA-23 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 1486/485 pozitivan na OXA-23 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 15 i na slici 25. Zabilježene su značajno niže vrijednosti broja vijabilnih bakterijskih stanica u uzorcima tretiranim svim antibioticima u odnosu na kontrolni uzorak ($P < 0,001$), dok između pojedinih antibiotika i njihovih kombinacija postoje značajne niže vrijednosti za kombinaciju kolistina s vankomicinom u odnosu na kolistin sam ili kombinaciju kolistina s meropenemom ($P < 0,001$).

Tablica 16. Opisna statistika krivulja baktericidnog učinka izražena u (\log_{10} CFU/ml) soja *A. baumannii* 1794/793 pozitivan na OXA-24 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>A. baumannii</i> (OXA-24) 0h	kolistin TK	7,067	0,140	6,718	7,416
	kolistin+meropenem TK	7,067	0,140	6,718	7,416
	kolistin+vankomicin TK	7,067	0,140	6,718	7,416
	kontrola	7,517	0,236	7,336	7,698
<i>A. baumannii</i> (OXA-24) 1h	kolistin TK	5,290	1,138	2,462	8,118
	kolistin+meropenem TK	3,703	0,220	3,156	4,251
	kolistin+vankomicin TK	0,767	0,709	-0,996	2,529
	kontrola	8,093	0,139	7,987	8,200
<i>A. baumannii</i> (OXA-24) 2h	kolistin TK	5,177	1,190	2,220	8,133
	kolistin+meropenem TK	3,353	0,806	1,352	5,354
	kolistin+vankomicin TK	0,333	0,577	-1,101	1,768
	kontrola	8,577	0,051	8,538	8,616
<i>A. baumannii</i> (OXA-24) 3h	kolistin TK	5,307	0,909	3,048	7,565
	kolistin+meropenem TK	3,410	0,540	2,069	4,751
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	8,860	0,092	8,790	8,930
<i>A. baumannii</i> (OXA-24) 4h	kolistin TK	5,117	0,549	3,752	6,481
	kolistin+meropenem TK	3,407	0,829	1,349	5,465
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,076	0,334	8,819	9,332
<i>A. baumannii</i> (OXA-24) 5h	kolistin TK	5,200	0,651	3,583	6,817
	kolistin+meropenem TK	3,713	0,574	2,287	5,140
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,237	0,409	8,923	9,551
<i>A. baumannii</i> (OXA-24) 6h	kolistin TK	4,963	0,648	3,355	6,572
	kolistin+meropenem TK	3,947	0,365	3,041	4,852
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,287	0,372	9,001	9,572
<i>A. baumannii</i> (OXA-24) 7h	kolistin TK	4,770	0,225	4,210	5,330
	kolistin+meropenem TK	4,100	0,637	2,519	5,681
	kolistin+vankomicin TK	0,100	0,173	-0,330	0,530
	kontrola	9,493	0,395	9,190	9,797
<i>A. baumannii</i> (OXA-24) 8h	kolistin TK	3,765	0,290	1,160	6,370
	kolistin+meropenem TK	3,757	0,977	1,329	6,184
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,510	0,470	8,927	10,093
<i>A. baumannii</i> (OXA-24) 24h	kolistin TK	4,927	1,879	0,259	9,594
	kolistin+meropenem TK	3,385	2,128	-15,738	22,508
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,507	0,399	9,200	9,813

TK-time kill krivulje

Tablica 17. Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 1794/793 pozitivan na OXA-24 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

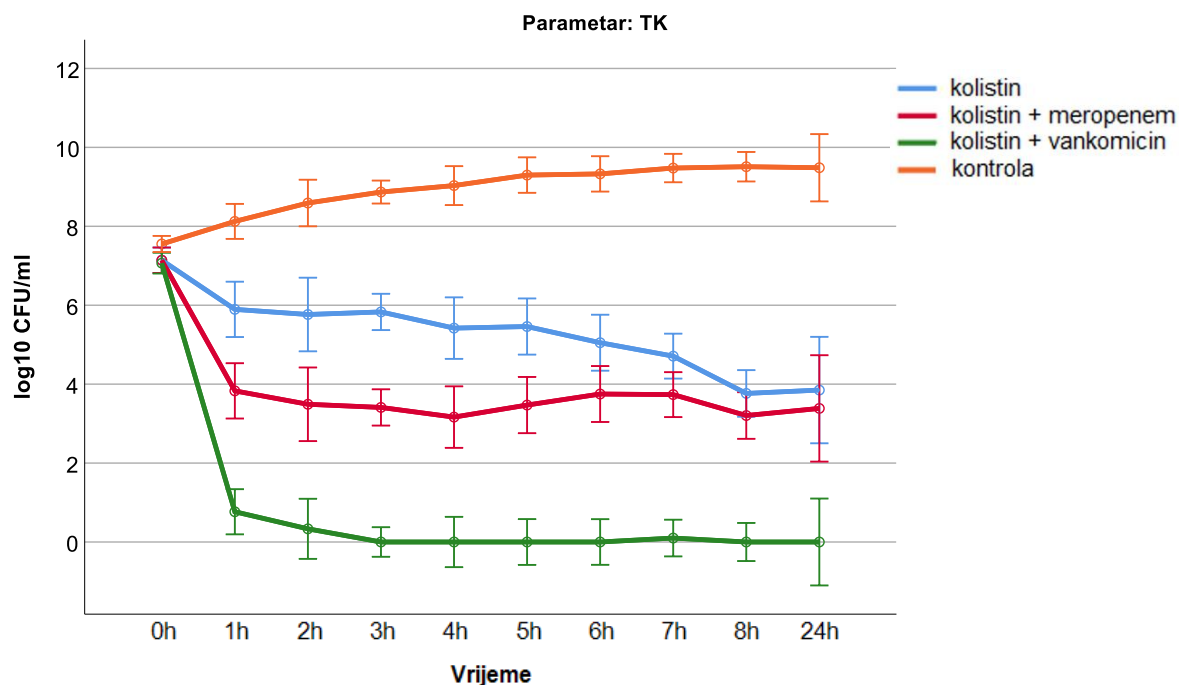
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin TK	5,033	0,262	4,470	5,595
kolistin+meropenem TK	3,871	0,262	3,309	4,434
kolistin+vankomicin TK	0,827	0,262	0,264	1,389
kontrola	8,493	0,151	8,168	8,818

Parametar = TK
TK-time kill krivulje

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin TK	kolistin+meropenem TK	1,161*	0,371	0,044	0,024	2,299
	kolistin+vankomicin TK	4,206*	0,371	<0,001	3,068	5,344
	kontrola	-3,460*	0,303	<0,001	-4,389	-2,531
kolistin+meropenem TK	kolistin TK	-1,161*	0,371	0,044	-2,299	-0,024
	kolistin+vankomicin TK	3,045*	0,371	<0,001	1,907	4,182
	kontrola	-4,622*	0,303	<0,001	-5,551	-3,693
kolistin+vankomicin TK	kolistin TK	-4,206*	0,371	<0,001	-5,344	-3,068
	kolistin+meropenem TK	-3,045*	0,371	<0,001	-4,182	-1,907
	kontrola	-7,666*	0,303	<0,001	-8,595	-6,737
kontrola	kolistin TK	3,460*	0,303	<0,001	2,531	4,389
	kolistin+meropenem TK	4,622*	0,303	<0,001	3,693	5,551
	kolistin+vankomicin TK	7,666*	0,303	<0,001	6,737	8,595

TK-time kill krivulje



Slika 26. Dinamika baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 1794/793 pozitivan na OXA-24 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 1794/793 pozitivan na OXA-24 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 17 i na slici 26. Zabilježene su značajno niže vrijednosti broja CFU u uzorcima tretiranim antibioticima u odnosu na kontrolni uzorak ($P < 0,001$), dok između pojedinih antibiotika i njihovih kombinacija postoje značajne niže vrijednosti kolistina s vankomicinom ($P < 0,001$) i kolistina s meropenemom ($P = 0,044$) u odnosu na kolistin sam, te veće vrijednosti u uzorku kolistina s meropenemom u odnosu na kolistin s vankomicinom ($P < 0,001$).

Tablica 18. Opisna statistika krivulja baktericidnog učinka izraženog u (\log_{10} CFU/ml) soja *A. baumannii* 5353/352 pozitivan na OXA-58 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>A. baumannii</i> (OXA-58) 0h	kolistin TK	6,783	0,455	5,653	7,914
	kolistin+meropenem TK	6,827	0,529	5,512	8,141
	kolistin+vankomicin TK	6,783	0,455	5,653	7,914
	kontrola	7,174	0,563	6,741	7,607
<i>A. baumannii</i> (OXA-58) 1h	kolistin TK	4,584	1,379	1,157	8,010
	kolistin+meropenem TK	3,973	0,900	1,738	6,208
	kolistin+vankomicin TK	0,301	0,301	-0,447	1,049
	kontrola	7,677	0,629	7,193	8,161
<i>A. baumannii</i> (OXA-58) 2h	kolistin TK	4,152	1,209	1,148	7,156
	kolistin+meropenem TK	3,635	0,438	2,548	4,722
	kolistin+vankomicin TK	0,100	0,174	-0,331	0,532
	kontrola	8,104	0,618	7,630	8,579
<i>A. baumannii</i> (OXA-58) 3h	kolistin TK	4,141	1,582	0,211	8,071
	kolistin+meropenem TK	3,789	0,620	2,248	5,330
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	8,779	0,752	8,201	9,357
<i>A. baumannii</i> (OXA-58) 4h	kolistin TK	3,841	1,404	0,353	7,329
	kolistin+meropenem TK	3,092	0,991	0,630	5,554
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,075	0,622	8,597	9,552
<i>A. baumannii</i> (OXA-58) 5h	kolistin TK	3,790	1,706	-0,448	8,029
	kolistin+meropenem TK	3,373	0,888	1,166	5,580
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,350	0,509	8,958	9,742
<i>A. baumannii</i> (OXA-58) 6h	kolistin TK	4,650	2,063	-0,475	9,776
	kolistin+meropenem TK	3,386	0,690	1,672	5,100
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,331	0,417	9,010	9,651
<i>A. baumannii</i> (OXA-58) 7h	kolistin TK	4,534	0,612	3,013	6,056
	kolistin+meropenem TK	3,605	1,006	1,107	6,103
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,463	0,400	9,156	9,771
<i>A. baumannii</i> (OXA-58) 8h	kolistin TK	4,726	0,269	4,057	5,394
	kolistin+meropenem TK	3,694	1,290	0,489	6,899
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,496	0,478	9,129	9,863
<i>A. baumannii</i> (OXA-58) 24h	kolistin TK	4,887	0,818	2,855	6,920
	kolistin+meropenem TK	4,229	1,542	0,399	8,059
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,558	0,249	9,366	9,749

TK-time kill krivulje

Tablica 19. Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 5353/352 pozitivan na OXA-58 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

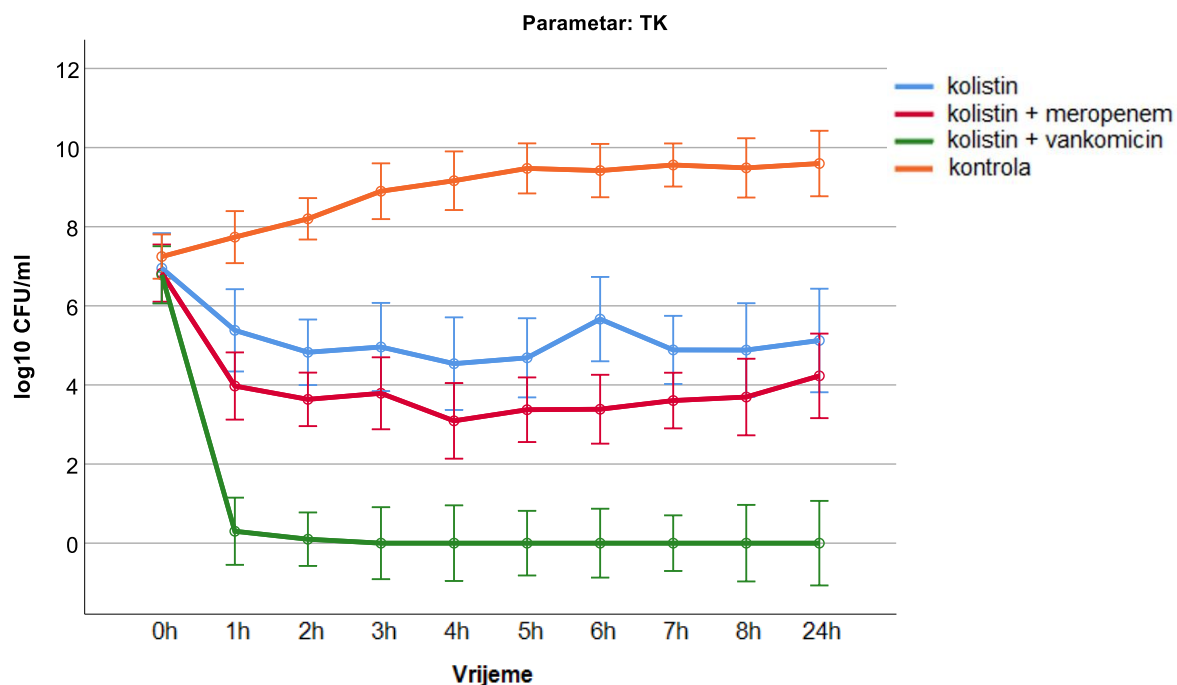
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin TK	4,462	0,464	3,468	5,456
kolistin+meropenem TK	3,960	0,464	2,966	4,954
kolistin+vankomicin TK	0,718	0,464	-0,276	1,713
kontrola	8,378	0,268	7,804	8,952

Parametar = TK
TK-time kill krivulje

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin TK	kolistin+meropenem TK	0,501	0,656	1,000	-1,510	2,513
	kolistin+vankomicin TK	3,743*	0,656	<0,001	1,732	5,755
	kontrola	-3,916*	0,535	<0,001	-5,559	-2,274
kolistin+meropenem TK	kolistin TK	-0,501	0,656	1,000	-2,513	1,510
	kolistin+vankomicin TK	3,242*	0,656	0,001	1,230	5,253
	kontrola	-4,418*	0,535	<0,001	-6,060	-2,775
kolistin+vankomicin TK	kolistin TK	-3,743*	0,656	<0,001	-5,755	-1,732
	kolistin+meropenem TK	-3,242*	0,656	0,001	-5,253	-1,230
	kontrola	-7,660*	0,535	<0,001	-9,302	-6,017
kontrola	kolistin TK	3,916*	0,535	<0,001	2,274	5,559
	kolistin+meropenem TK	4,418*	0,535	<0,001	2,775	6,060
	kolistin+vankomicin TK	7,660*	0,535	<0,001	6,017	9,302

TK-time kill krivulje



Slika 27. Dinamika baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 5353/352 pozitivan na OXA-58 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 5353/352 pozitivan na OXA-58 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 19 i na slici 27. Zabilježene su značajno niže vrijednosti broja vijabilnih kolonija u uzorcima tretiranim antibioticima u odnosu na kontrolni uzorak ($P < 0,001$), dok između pojedinih antibiotika i njihovih kombinacija postoje značajne niže vrijednosti u uzorcima tretiranim kombinacijama kolistina s vankomicinom u odnosu na kolistin sam ($P < 0,001$) te veće vrijednosti u uzorku izloženom kolistinu s meropenemom u odnosu na uzorak izložen kolistinu s vankomicinom ($P = 0,001$).

Tablica 20. Opisna statistika kinetike baktericidnog učinka izražene u (\log_{10} broja CFU/ml) soja *A. baumannii* 135040 pozitivan na OXA-143 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>A. baumannii</i> (OXA-143) 0h	kolistin TK	6,908	0,409	5,892	7,924
	kolistin+meropenem TK	6,908	0,409	5,892	7,924
	kolistin+vankomicin TK	7,105	0,373	6,179	8,031
	kontrola	7,263	0,325	7,013	7,513
<i>A. baumannii</i> (OXA-143) 1h	kolistin TK	4,228	0,929	1,921	6,535
	kolistin+meropenem TK	4,844	0,399	3,853	5,836
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	7,591	0,451	7,244	7,937
<i>A. baumannii</i> (OXA-143) 2h	kolistin TK	3,955	1,011	1,444	6,465
	kolistin+meropenem TK	4,571	0,364	3,666	5,476
	kolistin+vankomicin TK	0,100	0,174	-0,331	0,532
	kontrola	7,912	0,650	7,412	8,412
<i>A. baumannii</i> (OXA-143) 3h	kolistin TK	3,395	1,242	0,310	6,481
	kolistin+meropenem TK	4,662	0,530	3,346	5,977
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	8,327	0,522	7,926	8,728
<i>A. baumannii</i> (OXA-143) 4h	kolistin TK	3,843	1,114	1,074	6,611
	kolistin+meropenem TK	4,075	0,097	3,833	4,316
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	8,462	0,662	7,953	8,971
<i>A. baumannii</i> (OXA-143) 5h	kolistin TK	3,822	0,969	1,416	6,229
	kolistin+meropenem TK	4,275	0,276	3,588	4,962
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	8,969	0,670	8,454	9,484
<i>A. baumannii</i> (OXA-143) 6h	kolistin TK	3,460	0,467	2,300	4,621
	kolistin+meropenem TK	4,460	0,797	2,481	6,439
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,210	0,524	8,807	9,612
<i>A. baumannii</i> (OXA-143) 7h	kolistin TK	3,787	0,034	3,702	3,872
	kolistin+meropenem TK	4,667	0,802	2,676	6,658
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,422	0,400	9,114	9,729
<i>A. baumannii</i> (OXA-143) 8h	kolistin TK	3,822	0,174	3,388	4,255
	kolistin+meropenem TK	4,709	1,126	1,912	7,507
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,408	0,422	9,084	9,732
<i>A. baumannii</i> (OXA-143) 24h	kolistin TK	5,164	0,659	3,526	6,802
	kolistin+meropenem TK	5,485	0,425	4,429	6,541
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,635	0,204	9,478	9,793

TK-time kill krivulje

Tablica 21. Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 135040 pozitivan na OXA-143 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

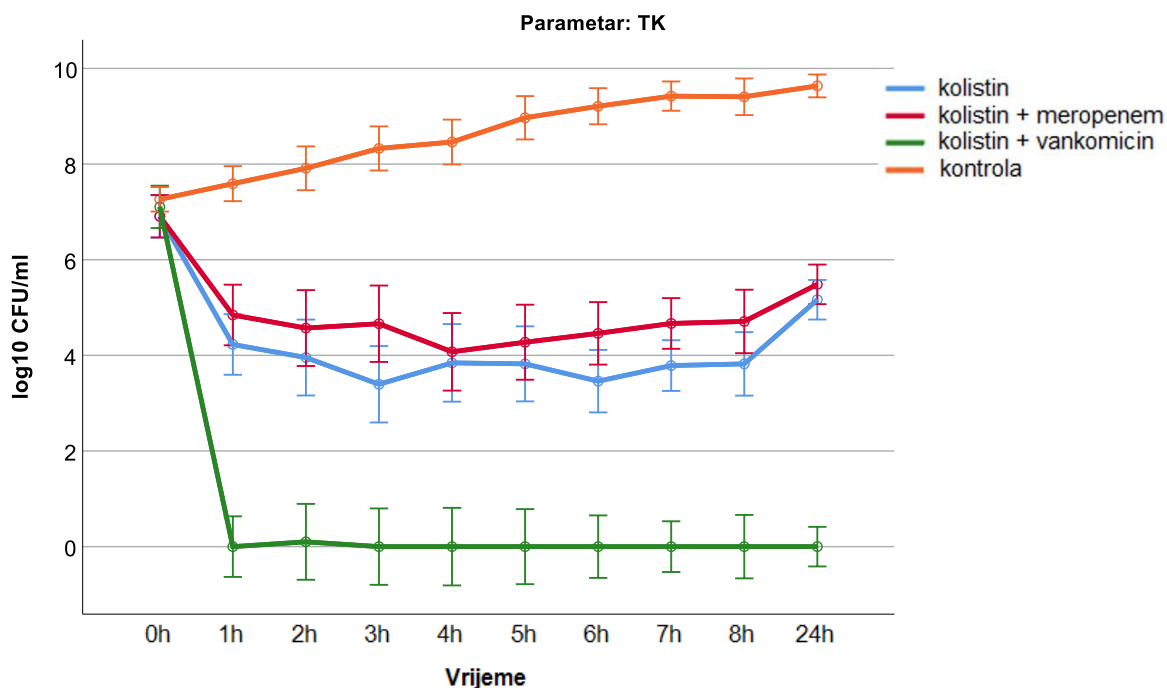
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin TK	4,107	0,342	3,373	4,841
kolistin+meropenem TK	4,866	0,342	4,132	5,600
kolistin+vankomicin TK	0,721	0,342	-0,013	1,455
kontrola	8,202	0,198	7,778	8,626

Parametar = TK
TK-time kill krivulje

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin TK	kolistin+meropenem TK	-0,759	0,484	0,835	-2,244	0,726
	kolistin+vankomicin TK	3,386*	0,484	<0,001	1,901	4,871
	kontrola	-4,096*	0,395	<0,001	-5,308	-2,883
kolistin+meropenem TK	kolistin TK	0,759	0,484	0,835	-0,726	2,244
	kolistin+vankomicin TK	4,145*	0,484	<0,001	2,660	5,630
	kontrola	-3,337*	0,395	<0,001	-4,549	-2,124
kolistin+vankomicin TK	kolistin TK	-3,386*	0,484	<0,001	-4,871	-1,901
	kolistin+meropenem TK	-4,145*	0,484	<0,001	-5,630	-2,660
	kontrola	-7,482*	0,395	<0,001	-8,694	-6,269
kontrola	kolistin TK	4,096*	0,395	<0,001	2,883	5,308
	kolistin+meropenem TK	3,337*	0,395	<0,001	2,124	4,549
	kolistin+vankomicin TK	7,482*	0,395	<0,001	6,269	8,694

TK-time kill krivulje



Slika 28. Dinamika baktericidnog učinka u soja *A. baumannii* 135040 pozitivan na OXA-143 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 135040 pozitivan na OXA-143 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 21 i na slici 28. Zabilježene su značajno niže vrijednosti broja vijabilnih kolonija u uzorcima tretiranim antibioticima i njihovim kombinacijama u odnosu na kontrolni uzorak ($P < 0,001$), dok između antibiotika značajno niže vrijednosti pokazuje kombinacija kolistina s vankomicinom u odnosu na kolistin sam ($P < 0,001$) ili kombinaciju s meropenemom ($P < 0,001$).

Tablica 22. Opisna statistika kinetike baktericidnog učinka izraženog u (\log_{10} broja CFU/ml) soja *A. baumannii* 15429 pozitivan na OXA-69 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>A. baumannii</i> (OXA-69) 0h	kolistin TK	6,449	0,185	5,990	6,908
	kolistin+meropenem TK	6,449	0,185	5,989	6,909
	kolistin+vankomicin TK	6,449	0,185	5,989	6,909
	kontrola	6,449	0,161	6,326	6,572
<i>A. baumannii</i> (OXA-69) 1h	kolistin TK	2,984	0,383	2,032	3,936
	kolistin+meropenem TK	0,725	0,262	0,073	1,377
	kolistin+vankomicin TK	0,986	0,135	0,651	1,322
	kontrola	6,905	0,075	6,847	6,962
<i>A. baumannii</i> (OXA-69) 2h	kolistin TK	3,145	0,772	1,228	5,062
	kolistin+meropenem TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	7,566	0,370	7,282	7,851
<i>A. baumannii</i> (OXA-69) 3h	kolistin TK	2,957	0,412	1,932	3,981
	kolistin+meropenem TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	7,899	0,138	7,794	8,005
<i>A. baumannii</i> (OXA-69) 4h	kolistin TK	3,267	0,350	2,399	4,136
	kolistin+meropenem TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	8,175	0,201	8,021	8,329
<i>A. baumannii</i> (OXA-69) 5h	kolistin TK	3,704	0,254	3,073	4,336
	kolistin+meropenem TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kolistin+vankomicin TK	0,159	0,275	-0,525	0,843
	kontrola	8,568	0,228	8,393	8,743
<i>A. baumannii</i> (OXA-69) 6h	kolistin TK	4,029	0,368	3,114	4,944
	kolistin+meropenem TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	8,794	0,155	8,675	8,913
<i>A. baumannii</i> (OXA-69) 7h	kolistin TK	4,428	0,607	2,921	5,936
	kolistin+meropenem TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,120	0,221	8,950	9,290
<i>A. baumannii</i> (OXA-69) 8h	kolistin TK	4,156	0,449	3,040	5,273
	kolistin+meropenem TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,338	0,327	9,086	9,589
<i>A. baumannii</i> (OXA-69) 24h	kolistin TK	5,443	0,871	3,281	7,606
	kolistin+meropenem TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,040	1,151	8,155	9,924

TK-time kill krivulje

Tablica 23. Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 15429 pozitivan na OXA-69 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

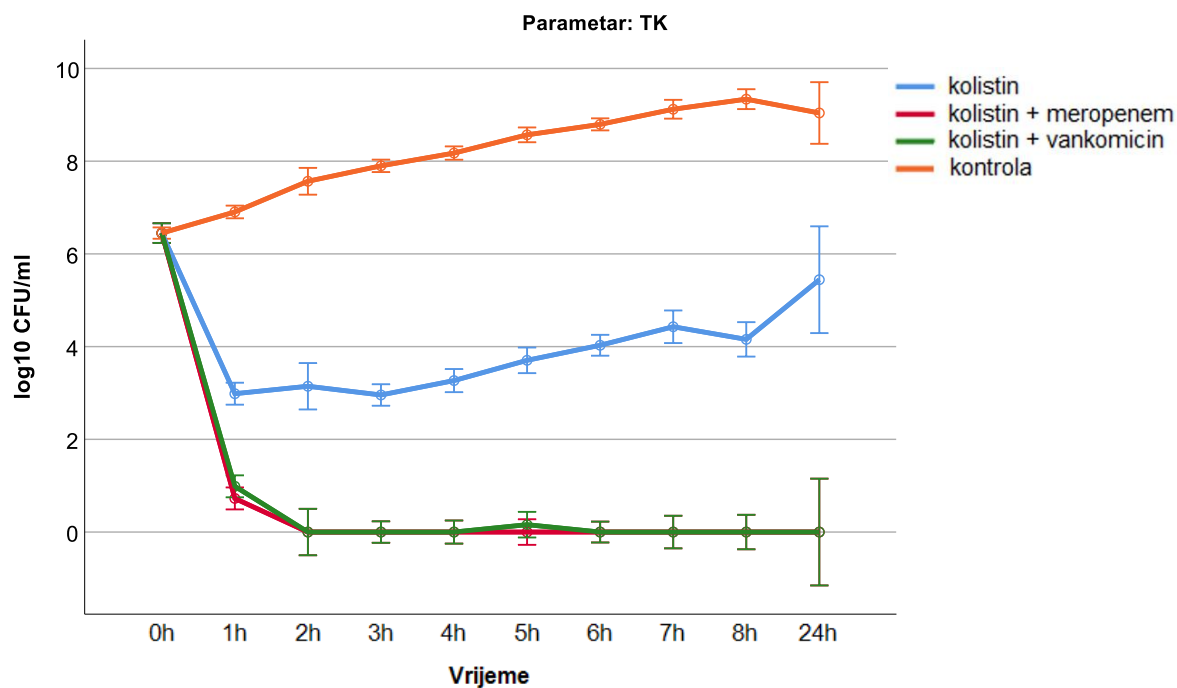
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin TK	4,056	0,122	3,795	4,317
kolistin+meropenem TK	0,717	0,122	0,457	0,978
kolistin+vankomicin TK	0,759	0,122	0,499	1,020
kontrola	8,185	0,070	8,035	8,336

Parametar = TK
TK-time kill krivulje

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin TK	kolistin+meropenem TK	3,339*	0,172	<0,001	2,811	3,867
	kolistin+vankomicin TK	3,297*	0,172	<0,001	2,769	3,825
	kontrola	-4,129*	0,140	<0,001	-4,560	-3,698
kolistin+meropenem TK	kolistin TK	-3,339*	0,172	<0,001	-3,867	-2,811
	kolistin+vankomicin TK	-0,042	0,172	1,000	-0,570	0,486
	kontrola	-7,468*	0,140	<0,001	-7,899	-7,037
kolistin+vankomicin TK	kolistin TK	-3,297*	0,172	<0,001	-3,825	-2,769
	kolistin+meropenem TK	0,042	0,172	1,000	-0,486	0,570
	kontrola	-7,426*	0,140	<0,001	-7,857	-6,995
kontrola	kolistin TK	4,129*	0,140	<0,001	3,698	4,560
	kolistin+meropenem TK	7,468*	0,140	<0,001	7,037	7,899
	kolistin+vankomicin TK	7,426*	0,140	<0,001	6,995	7,857

TK-time kill krivulje



Slika 29. Dinamika baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 15429 pozitivan na OXA-69 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 15429 pozitivan na OXA-69 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 23 i na slici 29. Zabilježene su značajno niže vrijednosti u uzorcima tretiranim antibioticima u odnosu na kontrolni uzorak ($P < 0,001$), dok između pojedinih antibiotika postoje značajno niže vrijednosti u uzorcima tretiranim kombinacijama kolistina s vankomicinom i kolistina s meropenemom ($P < 0,001$) u odnosu na kolistin sam.

Tablica 24. Opisna statistika baktericidnog učinka izraženog u (\log_{10} broja CFU/ml) soja *A. baumannii* 157195 pozitivan na OXA-23 i VIM-1 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>A. baumannii</i> (OXA-23+VIM-1) 0h	kolistin TK	6,079	0,152	5,700	6,458
	kolistin+meropenem TK	6,079	0,152	5,700	6,458
	kolistin+vankomicin TK	6,079	0,152	5,700	6,458
	kontrola	6,079	0,132	5,978	6,180
<i>A. baumannii</i> (OXA-23+VIM-1) 1h	kolistin TK	3,787	0,483	2,586	4,987
	kolistin+meropenem TK	1,814	0,428	0,751	2,877
	kolistin+vankomicin TK	1,159	0,481	-0,035	2,353
	kontrola	6,620	0,207	6,461	6,779
<i>A. baumannii</i> (OXA-23+VIM-1) 2h	kolistin TK	3,723	0,407	2,712	4,734
	kolistin+meropenem TK	1,441	1,261	-1,692	4,574
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	7,089	0,206	6,931	7,248
<i>A. baumannii</i> (OXA-23+VIM-1) 3h	kolistin TK	3,943	0,618	2,408	5,479
	kolistin+meropenem TK	1,179	0,460	0,037	2,322
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	7,473	0,146	7,361	7,585
<i>A. baumannii</i> (OXA-23+VIM-1) 4h	kolistin TK	4,194	0,554	2,819	5,569
	kolistin+meropenem TK	1,127	0,550	-0,240	2,493
	kolistin+vankomicin TK	0,282	0,488	-0,930	1,494
	kontrola	7,664	0,127	7,567	7,762
<i>A. baumannii</i> (OXA-23+VIM-1) 5h	kolistin TK	4,819	0,535	3,490	6,148
	kolistin+meropenem TK	1,250	0,168	0,832	1,667
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	8,003	0,415	7,683	8,322
<i>A. baumannii</i> (OXA-23+VIM-1) 6h	kolistin TK	4,902	0,962	2,513	7,290
	kolistin+meropenem TK	1,498	0,159	1,104	1,892
	kolistin+vankomicin TK	0,360	0,623	-1,188	1,907
	kontrola	8,262	0,343	7,999	8,525
<i>A. baumannii</i> (OXA-23+VIM-1) 7h	kolistin TK	4,980	1,238	1,903	8,057
	kolistin+meropenem TK	1,468	0,243	0,865	2,071
	kolistin+vankomicin TK	0,333	0,577	-1,101	1,768
	kontrola	8,742	0,156	8,623	8,862
<i>A. baumannii</i> (OXA-23+VIM-1) 8h	kolistin TK	4,835	0,957	2,457	7,213
	kolistin+meropenem TK	1,488	0,248	0,873	2,103
	kolistin+vankomicin TK	0,301	0,521	-0,994	1,596
	kontrola	8,998	0,192	8,851	9,146
<i>A. baumannii</i> (OXA-23+VIM-1) 24h	kolistin TK	6,400	0,421	5,353	7,447
	kolistin+meropenem TK	2,333	0,577	0,899	3,768
	kolistin+vankomicin TK	0,301	0,521	-0,994	1,596
	kontrola	9,408	0,220	9,239	9,577

TK-time kill krivulje

Tablica 25. Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 157195 pozitivan na OXA-23 i VIM-1 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

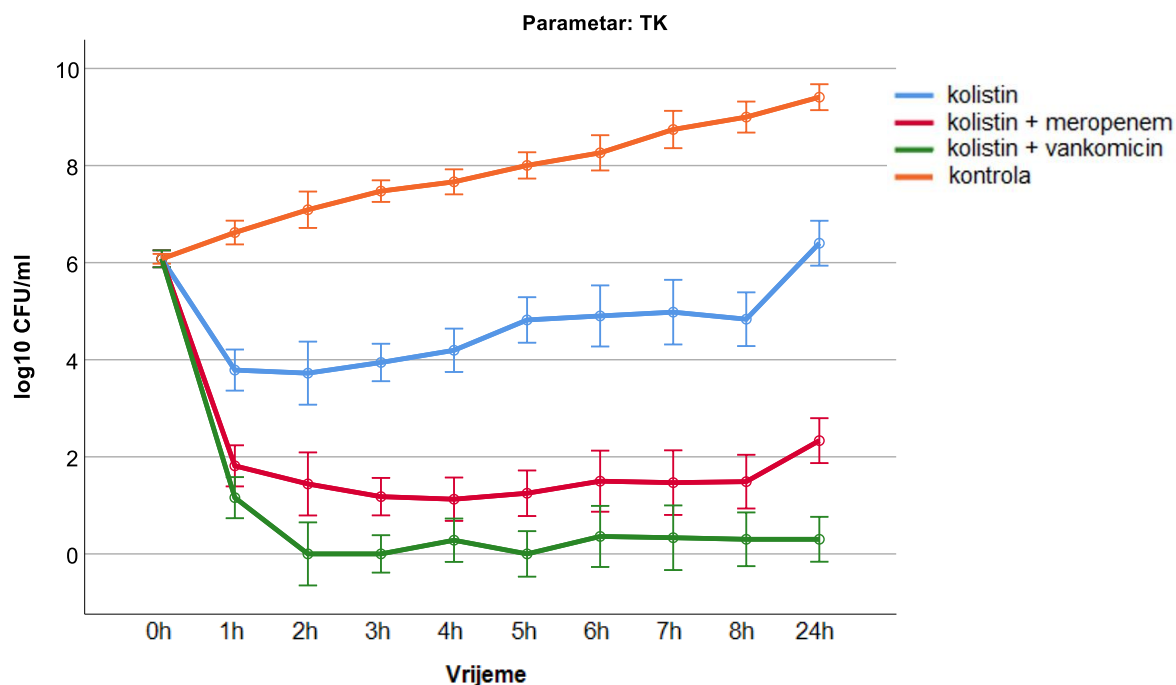
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin TK	4,766	0,144	4,458	5,075
kolistin+meropenem TK	1,968	0,144	1,659	2,276
kolistin+vankomicin TK	0,881	0,144	0,573	1,190
kontrola	7,834	0,083	7,656	8,012

Parametar = TK
TK-time kill krivulje

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin TK	kolistin+meropenem TK	2,798*	0,203	<0,001	2,174	3,423
	kolistin+vankomicin TK	3,885*	0,203	<0,001	3,260	4,509
	kontrola	-3,068*	0,166	<0,001	-3,578	-2,558
kolistin+meropenem TK	kolistin TK	-2,798*	0,203	<0,001	-3,423	-2,174
	kolistin+vankomicin TK	1,086*	0,203	0,001	0,462	1,711
	kontrola	-5,866*	0,166	<0,001	-6,376	-5,356
kolistin+vankomicin TK	kolistin TK	-3,885*	0,203	<0,001	-4,509	-3,260
	kolistin+meropenem TK	-1,086*	0,203	0,001	-1,711	-0,462
	kontrola	-6,953*	0,166	<0,001	-7,462	-6,443
kontrola	kolistin TK	3,068*	0,166	<0,001	2,558	3,578
	kolistin+meropenem TK	5,866*	0,166	<0,001	5,356	6,376
	kolistin+vankomicin TK	6,953*	0,166	<0,001	6,443	7,462

TK-time kill krivulje



Slika 30. Dinamika baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 157195 pozitivan na OXA-23 i VIM-1 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 157195 pozitivan na OXA-23 i VIM-1 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 25 i na slici 30. Zabilježene su značajno niže vrijednosti CFU/ml kod svih antibiotika i njihovih kombinacija u odnosu na kontrolni uzorak ($P < 0,001$), dok između antibiotika postoje značajno niže vrijednosti za kolistin s vankomicinom ($P < 0,001$) i kolistin s meropenemom ($P < 0,001$) u odnosu na kolistin sam.

Tablica 26. Opisna statistika baktericidnog učinka izraženog u (\log_{10} broja CFU/ml) soja *A. guillouie* 95991 pozitivan na OXA-58 i NDM-1 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>A. guillouie</i> (OXA-58+NDM-1) 0h	kolistin TK	6,559	0,211	6,034	7,084
	kolistin+meropenem TK	6,559	0,211	6,034	7,084
	kolistin+vankomicin TK	6,559	0,211	6,034	7,084
	kontrola	6,559	0,183	6,418	6,700
<i>A. guillouie</i> (OXA-58+NDM-1) 1h	kolistin TK	3,112	1,144	0,269	5,954
	kolistin+meropenem TK	1,272	0,135	0,936	1,608
	kolistin+vankomicin TK	0,259	0,241	-0,340	0,859
	kontrola	7,025	0,437	6,689	7,361
<i>A. guillouie</i> (OXA-58+NDM-1) 2h	kolistin TK	3,046	0,578	1,611	4,481
	kolistin+meropenem TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	7,350	0,407	7,038	7,662
<i>A. guillouie</i> (OXA-58+NDM-1) 3h	kolistin TK	3,440	0,462	2,292	4,588
	kolistin+meropenem TK	0,100	0,174	-0,331	0,532
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	7,923	0,363	7,644	8,202
<i>A. guillouie</i> (OXA-58+NDM-1) 4h	kolistin TK	3,907	0,500	2,665	5,150
	kolistin+meropenem TK	0,233	0,404	-0,770	1,236
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	8,460	0,379	8,168	8,751
<i>A. guillouie</i> (OXA-58+NDM-1) 5h	kolistin TK	4,255	0,553	2,881	5,630
	kolistin+meropenem TK	0,360	0,623	-1,188	1,907
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	8,769	0,388	8,471	9,067
<i>A. guillouie</i> (OXA-58+NDM-1) 6h	kolistin TK	4,448	0,503	3,197	5,699
	kolistin+meropenem TK	0,447	0,775	-1,477	2,372
	kolistin+vankomicin TK	0,233	0,404	-0,770	1,236
	kontrola	8,860	0,235	8,679	9,040
<i>A. guillouie</i> (OXA-58+NDM-1) 7h	kolistin TK	5,294	0,524	3,993	6,595
	kolistin+meropenem TK	0,519	0,898	-1,713	2,750
	kolistin+vankomicin TK	0,100	0,174	-0,331	0,532
	kontrola	9,403	0,017	9,390	9,417
<i>A. guillouie</i> (OXA-58+NDM-1) 8h	kolistin TK	4,526	1,249	1,424	7,628
	kolistin+meropenem TK	0,619	1,072	-2,044	3,282
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,456	0,431	9,125	9,787
<i>A. guillouie</i> (OXA-58+NDM-1) 24h	kolistin TK	5,717	0,803	3,721	7,713
	kolistin+meropenem TK	0,418	0,725	-1,382	2,218
	kolistin+vankomicin TK	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,451	0,330	9,198	9,704

TK-time kill krivulje

Tablica 27. Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. guillouie* 95991 pozitivan na OXA-58 i NDM-1 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

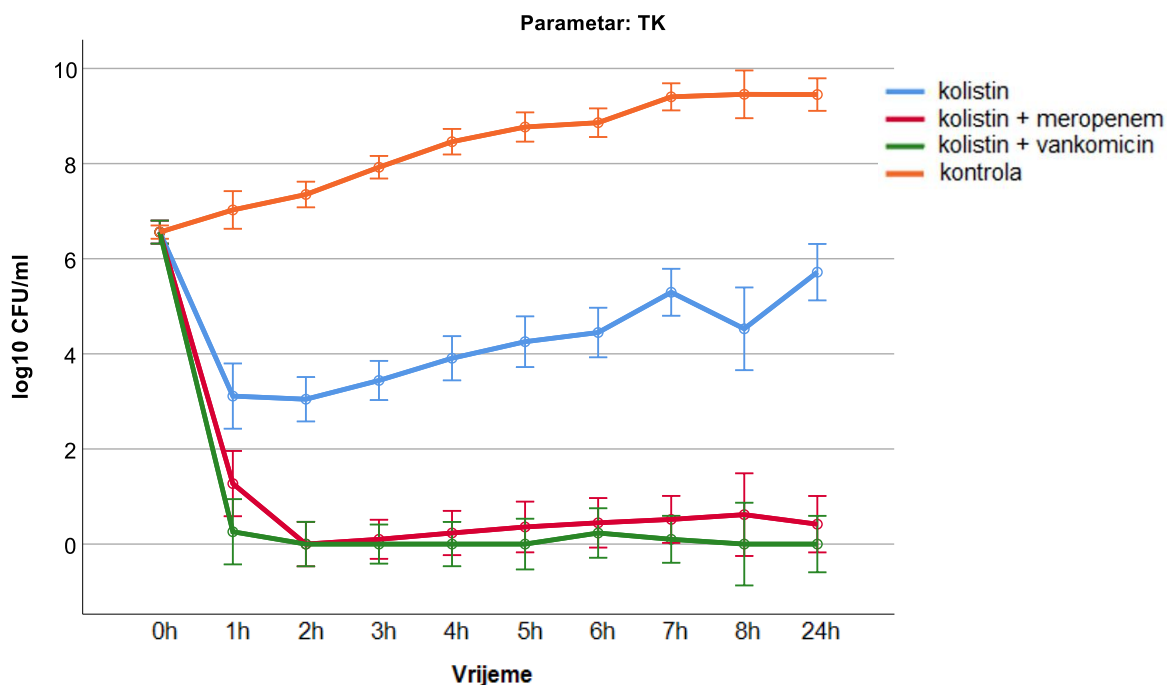
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin TK	4,430	0,175	4,055	4,806
kolistin+meropenem TK	1,053	0,175	0,677	1,429
kolistin+vankomicin TK	0,715	0,175	0,339	1,091
kontrola	8,326	0,101	8,109	8,543

Parametar = TK
TK-time kill krivulje

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI	Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI		
				Donji	Gornji	
kolistin TK	kolistin+meropenem TK	3,378*	0,248	<0,001	2,617	4,138
	kolistin+vankomicin TK	3,715*	0,248	<0,001	2,955	4,476
	kontrola	-3,895*	0,202	<0,001	-4,516	-3,274
kolistin+meropenem TK	kolistin TK	-3,378*	0,248	<0,001	-4,138	-2,617
	kolistin+vankomicin TK	0,338	0,248	1,000	-0,423	1,098
	kontrola	-7,273*	0,202	<0,001	-7,894	-6,652
kolistin+vankomicin TK	kolistin TK	-3,715*	0,248	<0,001	-4,476	-2,955
	kolistin+meropenem TK	-0,338	0,248	1,000	-1,098	0,423
	kontrola	-7,610*	0,202	<0,001	-8,231	-6,989
kontrola	kolistin TK	3,895*	0,202	<0,001	3,274	4,516
	kolistin+meropenem TK	7,273*	0,202	<0,001	6,652	7,894
	kolistin+vankomicin TK	7,610*	0,202	<0,001	6,989	8,231

TK-time kill krivulje



Slika 31. Dinamika baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. guillouie* 95991 pozitivan na OXA-58 i NDM-1 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. guillouie* 95991 pozitivan na OXA-58 i NDM-1 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 27 i na slici 31. Zabilježene su značajno niže vrijednosti u uzorcima tretiranim antibioticima u odnosu na kontrolni uzorak ($P < 0,001$), dok između antibiotika postoje značajno niže vrijednosti kolistina u kombinaciji s vankomicinom ($P < 0,001$) i kolistina s meropenemom ($P < 0,001$) u odnosu na kolistin sam.

Tablica 28. Opisna statistika baktericidnog učinka izraženog u (\log_{10} broja CFU/ml) soja *A. baumannii* 9728/1419 pozitivan na OXA 72 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>A. baumannii</i> (OXA-72) 0h	kolistin TK	6,287	0,665	4,634	7,939
	kolistin+meropenem TK	6,351	0,561	4,958	7,744
	kolistin+vankomicin TK	6,351	0,561	4,958	7,744
	kontrola	6,351	0,486	5,977	6,724
<i>A. baumannii</i> (OXA-72) 1h	kolistin TK	4,096	0,280	3,402	4,791
	kolistin+meropenem TK	2,107	0,360	1,213	3,000
	kolistin+vankomicin TK	1,321	0,219	0,777	1,865
	kontrola	6,880	0,444	6,539	7,221
<i>A. baumannii</i> (OXA-72) 2h	kolistin TK	3,561	0,455	2,432	4,691
	kolistin+meropenem TK	2,075	0,527	0,766	3,384
	kolistin+vankomicin TK	0,793	0,696	-0,936	2,522
	kontrola	7,242	0,391	6,942	7,543
<i>A. baumannii</i> (OXA-72) 3h	kolistin TK	3,842	0,265	3,184	4,501
	kolistin+meropenem TK	1,774	0,617	0,240	3,307
	kolistin+vankomicin TK	0,418	0,725	-1,382	2,218
	kontrola	7,851	0,435	7,516	8,185
<i>A. baumannii</i> (OXA-72) 4h	kolistin TK	4,240	0,332	3,415	5,064
	kolistin+meropenem TK	1,406	0,516	0,124	2,687
	kolistin+vankomicin TK	0,744	0,665	-0,907	2,396
	kontrola	8,175	0,339	7,915	8,436
<i>A. baumannii</i> (OXA-72) 5h	kolistin TK	4,426	0,540	3,085	5,768
	kolistin+meropenem TK	1,460	0,747	-0,395	3,314
	kolistin+vankomicin TK	0,593	0,658	-1,042	2,228
	kontrola	8,429	0,336	8,170	8,687
<i>A. baumannii</i> (OXA-72) 6h	kolistin TK	4,959	0,500	3,716	6,202
	kolistin+meropenem TK	1,666	0,438	0,579	2,753
	kolistin+vankomicin TK	0,502	0,869	-1,657	2,660
	kontrola	8,810	0,209	8,649	8,971
<i>A. baumannii</i> (OXA-72) 7h	kolistin TK	5,172	0,574	3,746	6,599
	kolistin+meropenem TK	1,800	0,381	0,853	2,746
	kolistin+vankomicin TK	0,645	1,117	-2,129	3,418
	kontrola	8,996	0,063	8,947	9,044
<i>A. baumannii</i> (OXA-72) 8h	kolistin TK	4,995	0,749	3,135	6,855
	kolistin+meropenem TK	1,528	0,461	0,383	2,673
	kolistin+vankomicin TK	0,638	1,105	-2,107	3,383
	kontrola	9,333	0,334	9,076	9,589
<i>A. baumannii</i> (OXA-72) 24h	kolistin TK	6,217	0,671	4,550	7,884
	kolistin+meropenem TK	2,534	0,503	1,283	3,785
	kolistin+vankomicin TK	0,333	0,577	-1,101	1,768
	kontrola	9,526	0,249	9,335	9,717

TK-time kill krivulje

Tablica 29. Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 9728/1419 pozitivan na OXA-72 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

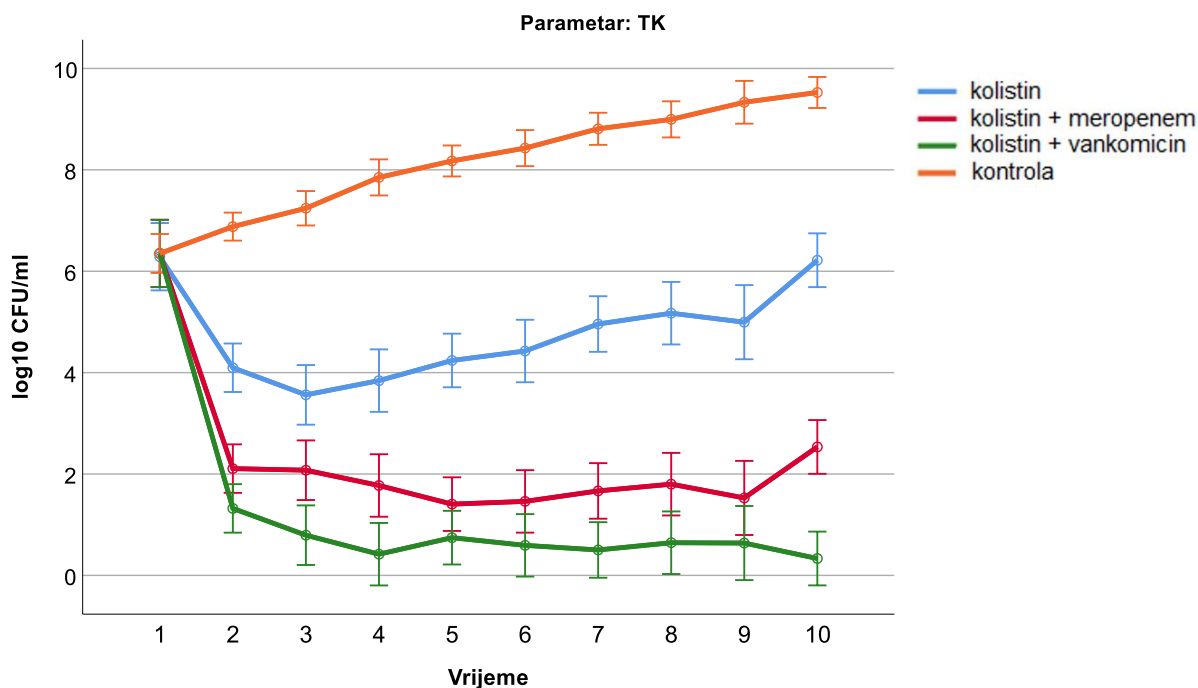
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin TK	4,780	0,185	4,382	5,177
kolistin+meropenem TK	2,270	0,185	1,872	2,667
kolistin+vankomicin TK	1,234	0,185	0,836	1,631
kontrola	8,159	0,107	7,930	8,389

Parametar = TK
TK-time kill krivulje

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin TK	kolistin+meropenem TK	2,510*	0,262	<0,001	1,705	3,314
	kolistin+vankomicin TK	3,546*	0,262	<0,001	2,742	4,350
	kontrola	-3,380*	0,214	<0,001	-4,036	-2,723
kolistin+meropenem TK	kolistin TK	-2,510*	0,262	<0,001	-3,314	-1,705
	kolistin+vankomicin TK	1,036*	0,262	0,009	0,232	1,840
	kontrola	-5,889*	0,214	<0,001	-6,546	-5,233
kolistin+vankomicin TK	kolistin TK	-3,546*	0,262	<0,001	-4,350	-2,742
	kolistin+meropenem TK	-1,036*	0,262	0,009	-1,840	-0,232
	kontrola	-6,925*	0,214	<0,001	-7,582	-6,269
kontrola	kolistin TK	3,380*	0,214	<0,001	2,723	4,036
	kolistin+meropenem TK	5,889*	0,214	<0,001	5,233	6,546
	kolistin+vankomicin TK	6,925*	0,214	<0,001	6,269	7,582

TK-time kill krivulje



Slika 32. Dinamika baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 9728/1419 pozitivan na OXA- 72 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike baktericidnog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 9728/1419 pozitivan na OXA 72 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 29 i na slici 32. Zabilježene su značajno niže vrijednosti u uzorcima tretiranim antibioticima u odnosu na kontrolni uzorak ($P < 0,001$), dok između antibiotika postoje značajne veće vrijednosti kolistina u odnosu na kolistin u kombinaciji s vankomicinom ($P < 0,001$) te veće vrijednosti kolistina u kombinaciji s meropenemom u odnosu na kolistin u kombinaciji s vankomicinom ($P = 0,009$).

5.7. Postantibiotski učinak – Enterobakterije

Kao što je vidljivo iz tablice 30 svi izolati enterobakterija su pokazivali vrlo kratki PAE induciran kolistinom u rasponu od 0.9 sati (*K. pneumoniae* 609815) do 2.6 (*E. cloacae* 209377). Trajanje PAE je samo kratko produženo uz dodatak vankomicina u četiri testirana soja tako da je raspon iznosio od 1.16 (*K. pneumoniae* 38985) do 2.8 sati (*E. cloacae* 209377). Za razliku od vankomicina, meropenem je značajno produžio trajanje PAE (>2 sata) u dva testirana soja (*E. cloacae* 209377 i *K. pneumoniae* 38985) kao što je prikazano u Tablici 30.

Tablica 30. Postantibiotski učinak kolistina samog i u kombinaciji s vankomicinom ili meropenemom, prikazana je srednja vrijednost (SV) i standardna devijacija (SD)

kolistin			
<i>E. cloacae</i> 209377	<i>K. pneumoniae</i> 145846	<i>K. pneumoniae</i> 38985	<i>K. pneumoniae</i> 609815
SV: 2.6 SD: 0.86	SV: 1.26 SD: 1.15	SV: 1.06 SD: 0.41	SV: 0.9 SD: 0.26
kolistin + vankomicin			
<i>E. cloacae</i> 209377	<i>K. pneumoniae</i> 145846	<i>K. pneumoniae</i> 38985	<i>K. pneumoniae</i> 609815
SV: 2.8 SD: 0.65	SV: 1.38 SD: 0.68	SV: 1.16 SD: 0.35	SV: 1.34 SD: 0.23
kolistin + meropenem			
<i>E. cloacae</i> 209377	<i>K. pneumoniae</i> 145846	<i>K. pneumoniae</i> 38985	<i>K. pneumoniae</i> 609815
SV: 6.1 SD: 1.87	SV: 1.43 SD: 0.65	SV: 3.16 SD: 1.75	SV: 1.36 SD: 0.55

Tablica 31. Opisna statistika postantibiotskog učinka izraženog u (\log_{10} broja CFU/ml) soja *E. cloacae* 209377 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>E. cloacae</i> 209377 0h	kolistin PAE	6,965	0,252	6,339	7,591
	kolistin + meropenem PAE	6,965	0,252	6,339	7,591
	kolistin+vankomicin PAE	6,971	0,246	6,360	7,582
	kontrola	6,967	0,217	6,800	7,133
<i>E. cloacae</i> 209377 1h	kolistin PAE	2,946	0,667	1,288	4,604
	kolistin + meropenem PAE	2,645	0,081	2,443	2,847
	kolistin+vankomicin PAE	2,170	0,365	1,263	3,076
	kontrola	7,825	0,445	7,483	8,168
<i>E. cloacae</i> 209377 2h	kolistin PAE	2,824	0,556	1,443	4,204
	kolistin + meropenem PAE	3,002	0,296	2,267	3,737
	kolistin+vankomicin PAE	2,516	0,570	1,099	3,932
	kontrola	8,488	0,544	8,070	8,906
<i>E. cloacae</i> 209377 3h	kolistin PAE	3,194	0,344	2,340	4,048
	kolistin + meropenem PAE	2,973	0,246	2,362	3,584
	kolistin+vankomicin PAE	2,869	0,249	2,250	3,488
	kontrola	8,802	0,713	8,254	9,349
<i>E. cloacae</i> 209377 4h	kolistin PAE	3,763	0,223	3,208	4,318
	kolistin + meropenem PAE	3,290	0,308	2,524	4,055
	kolistin+vankomicin PAE	3,188	0,722	1,394	4,983
	kontrola	9,135	0,553	8,709	9,560
<i>E. cloacae</i> 209377 5h	kolistin PAE	4,373	0,513	3,098	5,647
	kolistin + meropenem PAE	3,376	0,374	2,447	4,305
	kolistin+vankomicin PAE	3,995	0,752	2,128	5,862
	kontrola	9,329	0,482	8,958	9,699
<i>E. cloacae</i> 209377 6h	kolistin PAE	4,526	0,581	3,082	5,970
	kolistin + meropenem PAE	3,728	0,302	2,977	4,480
	kolistin+vankomicin PAE	4,899	0,076	4,709	5,088
	kontrola	9,623	0,139	9,515	9,730
<i>E. cloacae</i> 209377 7h	kolistin PAE	5,052	0,321	4,255	5,849
	kolistin + meropenem PAE	4,133	0,465	2,978	5,288
	kolistin+vankomicin PAE	5,073	0,234	4,491	5,656
	kontrola	9,647	0,296	9,420	9,875
<i>E. cloacae</i> 209377 8h	kolistin PAE	5,252	0,557	3,868	6,635
	kolistin + meropenem PAE	4,183	0,464	3,030	5,336
	kolistin+vankomicin PAE	5,825	0,043	5,718	5,932
	kontrola	9,944	0,065	9,894	9,993
<i>E. cloacae</i> 209377 24h	kolistin PAE	6,880	1,136	4,057	9,703
	kolistin + meropenem PAE	5,261	0,574	3,834	6,688
	kolistin+vankomicin PAE	6,824	0,080	6,625	7,022
	kontrola	9,763	0,155	9,644	9,882

PAE-postantibiotic effect

Tablica 32. Usporedba dinamike postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *E. cloacae* 209377 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

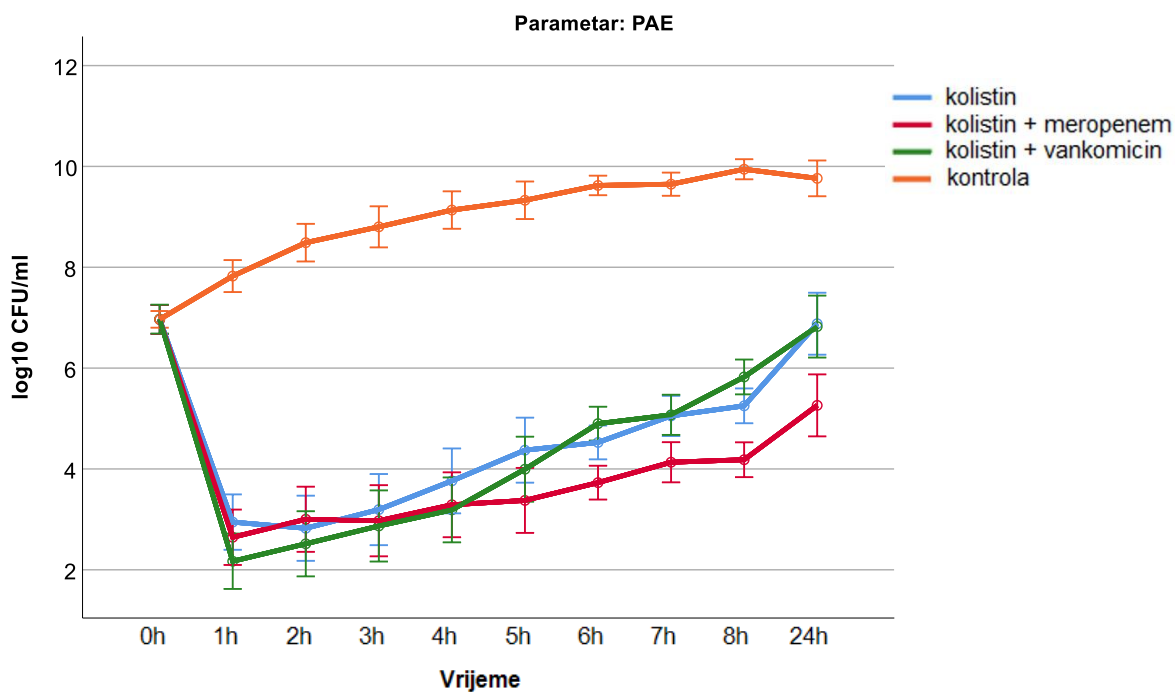
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin PAE	4,577	0,163	4,227	4,928
kolistin + meropenem PAE	3,956	0,163	3,605	4,306
kolistin+vankomicin PAE	4,433	0,163	4,082	4,783
kontrola	8,952	0,094	8,750	9,154

Parametar = PAE
PAE-postantibiotic effect

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin PAE	kolistin + meropenem PAE	0,622	0,231	0,105	-0,087	1,331
	kolistin+vankomicin PAE	0,144	0,231	1,000	-0,565	0,854
	kontrola	-4,375*	0,189	<0,001	-4,954	-3,796
kolistin + meropenem PAE	kolistin PAE	-0,622	0,231	0,105	-1,331	0,087
	kolistin+vankomicin PAE	-0,477	0,231	0,347	-1,187	0,232
	kontrola	-4,997*	0,189	<0,001	-5,576	-4,418
kolistin+vankomicin PAE	kolistin PAE	-0,144	0,231	1,000	-0,854	0,565
	kolistin + meropenem PAE	0,477	0,231	0,347	-0,232	1,187
	kontrola	-4,519*	0,189	<0,001	-5,098	-3,940
kontrola	kolistin PAE	4,375*	0,189	<0,001	3,796	4,954
	kolistin + meropenem PAE	4,997*	0,189	<0,001	4,418	5,576
	kolistin+vankomicin PAE	4,519*	0,189	<0,001	3,940	5,098

PAE-postantibiotic effect



Slika 33. Dinamika postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *E. cloacae* 209377 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike PAE u bakterijskog soja *E. cloacae* 209377 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 32 i na slici 33. Zabilježene su značajno niže vrijednosti u uzorcima tretiranim antibioticima u odnosu na kontrolni uzorak ($P < 0,001$), dok između antibiotika i njihovih kombinacija nije bilo značajnih razlika.

Tablica 33. Opisna statistika postantibiotskog učinka izraženog u (log10 broja CFU/ml) soja *K. pneumoniae* 145846 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>K. pneumoniae</i> 145846 0h	kolistin PAE	6,734	0,273	6,055	7,413
	kolistin + meropenem PAE	6,734	0,273	6,055	7,413
	kolistin+vankomicin PAE	6,757	0,280	6,062	7,452
	kontrola	6,742	0,239	6,558	6,925
<i>K. pneumoniae</i> 145846 1h	kolistin PAE	2,655	0,837	0,576	4,733
	kolistin + meropenem PAE	2,156	0,943	-0,186	4,498
	kolistin+vankomicin PAE	2,003	0,725	0,204	3,803
	kontrola	7,580	0,457	7,229	7,932
<i>K. pneumoniae</i> 145846 2h	kolistin PAE	2,758	0,929	0,450	5,067
	kolistin + meropenem PAE	2,283	1,278	-0,891	5,456
	kolistin+vankomicin PAE	2,205	0,185	1,745	2,665
	kontrola	8,236	0,621	7,759	8,714
<i>K. pneumoniae</i> 145846 3h	kolistin PAE	3,025	1,242	-0,061	6,111
	kolistin + meropenem PAE	2,857	1,205	-0,136	5,849
	kolistin+vankomicin PAE	2,471	0,427	1,410	3,531
	kontrola	8,448	0,669	7,934	8,962
<i>K. pneumoniae</i> 145846 4h	kolistin PAE	3,580	0,934	1,259	5,901
	kolistin + meropenem PAE	3,209	1,323	-0,078	6,496
	kolistin+vankomicin PAE	2,845	0,793	0,875	4,815
	kontrola	9,128	0,602	8,666	9,591
<i>K. pneumoniae</i> 145846 5h	kolistin PAE	4,004	1,308	0,755	7,253
	kolistin + meropenem PAE	4,019	1,030	1,461	6,577
	kolistin+vankomicin PAE	3,562	0,590	2,096	5,028
	kontrola	9,329	0,515	8,933	9,725
<i>K. pneumoniae</i> 145846 6h	kolistin PAE	4,475	1,232	1,415	7,535
	kolistin + meropenem PAE	4,247	1,137	1,423	7,070
	kolistin+vankomicin PAE	4,321	0,504	3,069	5,572
	kontrola	9,530	0,294	9,304	9,756
<i>K. pneumoniae</i> 145846 7h	kolistin PAE	4,627	1,158	1,751	7,503
	kolistin + meropenem PAE	4,382	1,461	0,752	8,012
	kolistin+vankomicin PAE	5,526	0,531	4,208	6,844
	kontrola	9,529	0,468	9,169	9,890
<i>K. pneumoniae</i> 145846 8h	kolistin PAE	5,260	1,395	1,794	8,727
	kolistin + meropenem PAE	5,342	1,488	1,647	9,038
	kolistin+vankomicin PAE	6,102	0,208	5,586	6,619
	kontrola	9,514	0,407	9,201	9,826
<i>K. pneumoniae</i> 145846 24h	kolistin PAE	5,931	1,015	3,409	8,453
	kolistin + meropenem PAE	6,565	1,544	2,730	10,400
	kolistin+vankomicin PAE	7,056	0,765	5,157	8,955
	kontrola	9,649	0,025	9,630	9,669

PAE-postantibiotic effect

Tablica 34. Usporedba dinamike postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *K. pneumoniae* 145846 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

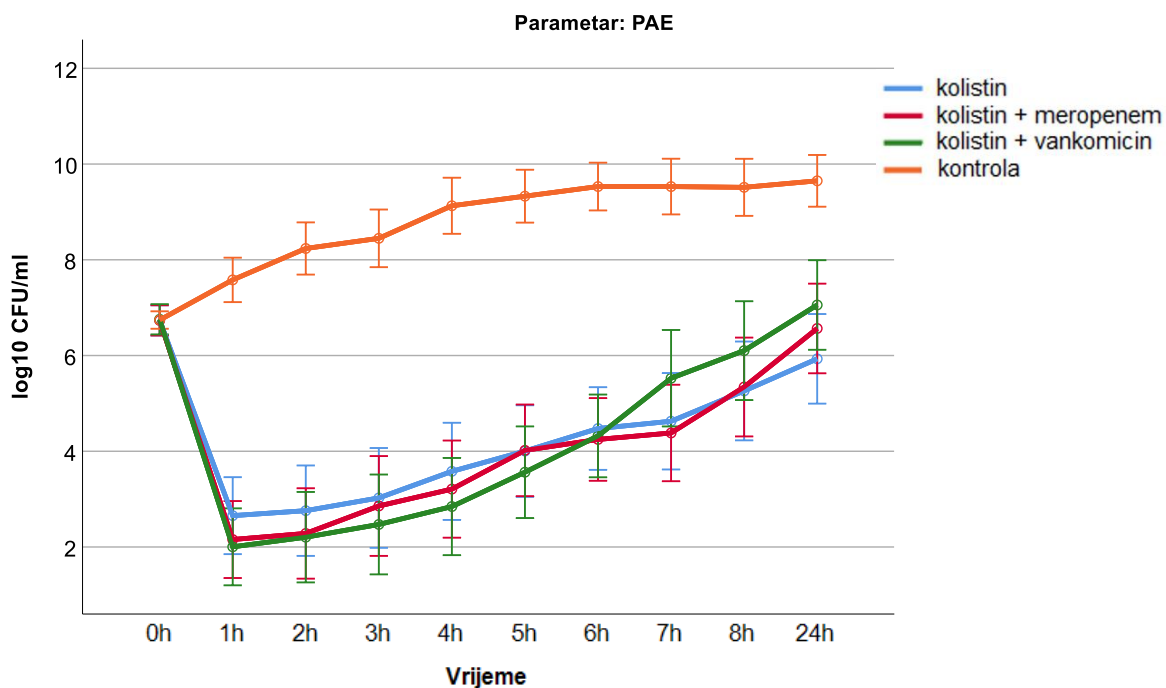
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin PAE	4,305	0,379	3,491	5,118
kolistin + meropenem PAE	4,179	0,379	3,366	4,993
kolistin+vankomicin PAE	4,285	0,379	3,471	5,098
kontrola	8,769	0,219	8,299	9,238

Parametar = PAE
PAE-postantibiotic effect

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin PAE	kolistin + meropenem PAE	0,125	0,536	1,000	-1,520	1,771
	kolistin+vankomicin PAE	0,020	0,536	1,000	-1,626	1,666
	kontrola	-4,464*	0,438	<0,001	-5,808	-3,120
kolistin + meropenem PAE	kolistin PAE	-0,125	0,536	1,000	-1,771	1,520
	kolistin+vankomicin PAE	-0,105	0,536	1,000	-1,751	1,540
	kontrola	-4,589*	0,438	<0,001	-5,933	-3,245
kolistin+vankomicin PAE	kolistin PAE	-0,020	0,536	1,000	-1,666	1,626
	kolistin + meropenem PAE	0,105	0,536	1,000	-1,540	1,751
	kontrola	-4,484*	0,438	<0,001	-5,828	-3,140
kontrola	kolistin PAE	4,464*	0,438	<0,001	3,120	5,808
	kolistin + meropenem PAE	4,589*	0,438	<0,001	3,245	5,933
	kolistin+vankomicin PAE	4,484*	0,438	<0,001	3,140	5,828

PAE-postantibiotic effect



Slika 34. Dinamika postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *K. pneumoniae* 145846 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike PAE u bakterijskog soja *K. pneumoniae* 145846 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 34 i na slici 34. Zabilježene su značajno niže vrijednosti u uzorcima tretiranim antibioticima u odnosu kontrolni uzorak u odnosu na sve skupne antibiotika ($P < 0,001$), dok između antibiotika nije bilo značajnih razlika.

Tablica 35. Opisna statistika postantibiotskog učinka izraženog u (\log_{10} broja CFU/ml) soja *K. pneumoniae* 38985 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>K. pneumoniae</i> 38985 0h	kolistin PAE	6,959	0,530	5,643	8,275
	kolistin + meropenem PAE	6,959	0,530	5,643	8,275
	kolistin+vankomicin PAE	6,959	0,530	5,643	8,275
	kontrola	6,959	0,459	6,606	7,312
<i>K. pneumoniae</i> 38985 1h	kolistin PAE	5,216	0,402	4,217	6,214
	kolistin + meropenem PAE	4,846	1,096	2,123	7,569
	kolistin+vankomicin PAE	4,822	0,557	3,437	6,206
	kontrola	7,922	0,049	7,884	7,960
<i>K. pneumoniae</i> 38985 2h	kolistin PAE	5,274	0,648	3,664	6,885
	kolistin + meropenem PAE	4,933	0,972	2,519	7,347
	kolistin+vankomicin PAE	5,084	0,315	4,301	5,867
	kontrola	8,671	0,192	8,523	8,819
<i>K. pneumoniae</i> 38985 3h	kolistin PAE	5,766	0,308	5,001	6,531
	kolistin + meropenem PAE	5,123	0,794	3,150	7,097
	kolistin+vankomicin PAE	5,246	0,473	4,071	6,422
	kontrola	8,948	0,059	8,902	8,993
<i>K. pneumoniae</i> 38985 4h	kolistin PAE	6,230	0,499	4,990	7,470
	kolistin + meropenem PAE	5,335	0,703	3,590	7,080
	kolistin+vankomicin PAE	5,758	1,070	3,101	8,415
	kontrola	9,485	0,463	9,129	9,840
<i>K. pneumoniae</i> 38985 5h	kolistin PAE	6,784	0,225	6,225	7,344
	kolistin + meropenem PAE	5,779	0,775	3,855	7,704
	kolistin+vankomicin PAE	6,138	0,524	4,837	7,439
	kontrola	9,879	0,046	9,843	9,914
<i>K. pneumoniae</i> 38985 6h	kolistin PAE	7,133	0,480	5,941	8,324
	kolistin + meropenem PAE	6,575	0,619	5,037	8,112
	kolistin+vankomicin PAE	6,225	1,758	1,858	10,592
	kontrola	9,913	0,065	9,863	9,963
<i>K. pneumoniae</i> 38985 7h	kolistin PAE	7,298	0,394	6,320	8,276
	kolistin + meropenem PAE	6,840	0,842	4,748	8,933
	kolistin+vankomicin PAE	7,070	0,275	6,388	7,752
	kontrola	9,599	0,179	9,461	9,737
<i>K. pneumoniae</i> 38985 8h	kolistin PAE	7,631	0,484	6,429	8,834
	kolistin + meropenem PAE	7,429	1,337	4,108	10,750
	kolistin+vankomicin PAE	7,124	0,375	6,194	8,055
	kontrola	9,641	0,331	9,387	9,896
<i>K. pneumoniae</i> 38985 24h	kolistin PAE	8,296	0,614	6,770	9,822
	kolistin + meropenem PAE	8,183	1,075	5,514	10,853
	kolistin+vankomicin PAE	8,796	1,049	6,191	11,402
	kontrola	9,887	0,495	9,507	10,268

PAE-postantibiotic effect

Tablica 36. Usporedba dinamike postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *K. pneumoniae* 38985 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

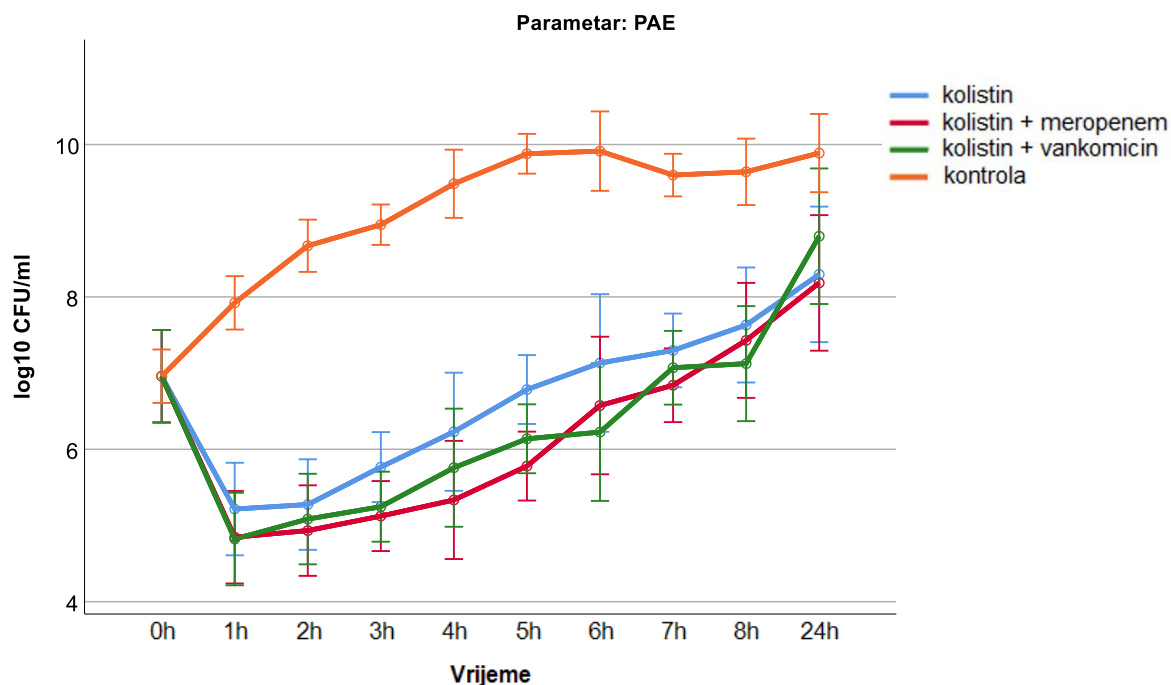
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin PAE	6,659	0,154	6,328	6,989
kolistin + meropenem PAE	6,200	0,154	5,870	6,531
kolistin+vankomicin PAE	6,322	0,154	5,992	6,653
kontrola	9,090	0,089	8,899	9,281

Parametar = PAE
PAE-postantibiotic effect

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin PAE	kolistin + meropenem PAE	0,458	0,218	0,324	-0,210	1,127
	kolistin+vankomicin PAE	0,336	0,218	0,870	-0,332	1,005
	kontrola	-2,432*	0,178	<0,001	-2,978	-1,886
kolistin + meropenem PAE	kolistin PAE	-0,458	0,218	0,324	-1,127	0,210
	kolistin+vankomicin PAE	-0,122	0,218	1,000	-0,791	0,547
	kontrola	-2,890*	0,178	<0,001	-3,436	-2,344
kolistin+vankomicin PAE	kolistin PAE	-0,336	0,218	0,870	-1,005	0,332
	kolistin + meropenem PAE	0,122	0,218	1,000	-0,547	0,791
	kontrola	-2,768*	0,178	<0,001	-3,314	-2,222
kontrola	kolistin PAE	2,432*	0,178	<0,001	1,886	2,978
	kolistin + meropenem PAE	2,890*	0,178	<0,001	2,344	3,436
	kolistin+vankomicin PAE	2,768*	0,178	<0,001	2,222	3,314

PAE-postantibiotic effect



Slika 35. Dinamika postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *K. pneumoniae* 38985 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike PAE u bakterijskog soja *K. pneumoniae* 38985 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 36 i na slici 35. Zabilježene su značajno niže vrijednosti u uzorcima tretiranim antibioticima u odnosu na kontrolni uzorak u odnosu na sve skupne antibiotika ($P < 0,001$), dok između antibiotika nije bilo značajnih razlika.

Tablica 37. Opisna statistika postantibiotskog učinka izraženog u (\log_{10} broja CFU/ml) soja *K. pneumoniae* 609815 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>K. pneumoniae</i> 609815 0h	kolistin PAE	6,721	0,407	5,711	7,732
	kolistin + meropenem PAE	6,721	0,407	5,711	7,732
	kolistin+vankomicin PAE	6,721	0,407	5,711	7,732
	kontrola	6,721	0,352	6,451	6,992
<i>K. pneumoniae</i> 609815 1h	kolistin PAE	7,029	0,363	6,128	7,930
	kolistin + meropenem PAE	3,536	0,337	2,699	4,373
	kolistin+vankomicin PAE	4,088	0,587	2,629	5,547
	kontrola	7,299	0,308	7,061	7,536
<i>K. pneumoniae</i> 609815 2h	kolistin PAE	7,460	0,525	6,154	8,765
	kolistin + meropenem PAE	3,853	0,165	3,443	4,264
	kolistin+vankomicin PAE	4,252	0,573	2,828	5,676
	kontrola	7,449	0,624	6,969	7,928
<i>K. pneumoniae</i> 609815 3h	kolistin PAE	7,937	0,659	6,299	9,575
	kolistin + meropenem PAE	4,091	0,283	3,389	4,793
	kolistin+vankomicin PAE	4,635	0,818	2,602	6,668
	kontrola	8,082	0,663	7,572	8,592
<i>K. pneumoniae</i> 609815 4h	kolistin PAE	8,222	0,448	7,109	9,335
	kolistin + meropenem PAE	4,454	0,427	3,393	5,515
	kolistin+vankomicin PAE	4,820	1,194	1,854	7,786
	kontrola	8,387	0,539	7,973	8,802
<i>K. pneumoniae</i> 609815 5h	kolistin PAE	8,787	0,147	8,421	9,152
	kolistin + meropenem PAE	4,938	0,304	4,182	5,693
	kolistin+vankomicin PAE	5,944	0,501	4,700	7,189
	kontrola	8,739	0,300	8,508	8,969
<i>K. pneumoniae</i> 609815 6h	kolistin PAE	9,153	0,487	7,942	10,364
	kolistin + meropenem PAE	5,289	0,312	4,515	6,063
	kolistin+vankomicin PAE	5,915	0,060	5,766	6,063
	kontrola	9,302	0,441	8,964	9,641
<i>K. pneumoniae</i> 609815 7h	kolistin PAE	9,518	0,305	8,760	10,276
	kolistin + meropenem PAE	5,603	0,397	4,617	6,589
	kolistin+vankomicin PAE	6,620	0,326	5,809	7,430
	kontrola	9,521	0,448	9,176	9,865
<i>K. pneumoniae</i> 609815 8h	kolistin PAE	9,896	0,069	9,725	10,067
	kolistin + meropenem PAE	5,933	0,063	5,776	6,090
	kolistin+vankomicin PAE	6,640	0,405	5,634	7,646
	kontrola	9,638	0,231	9,461	9,816
<i>K. pneumoniae</i> 609815 24h	kolistin PAE	9,843	0,118	9,551	10,135
	kolistin + meropenem PAE	8,209	0,982	5,770	10,648
	kolistin+vankomicin PAE	8,511	0,466	7,354	9,668
	kontrola	9,857	0,018	9,843	9,871

PAE-postantibiotic effect

Tablica 38. Usporedba dinamike postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *K. pneumoniae* 609815 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

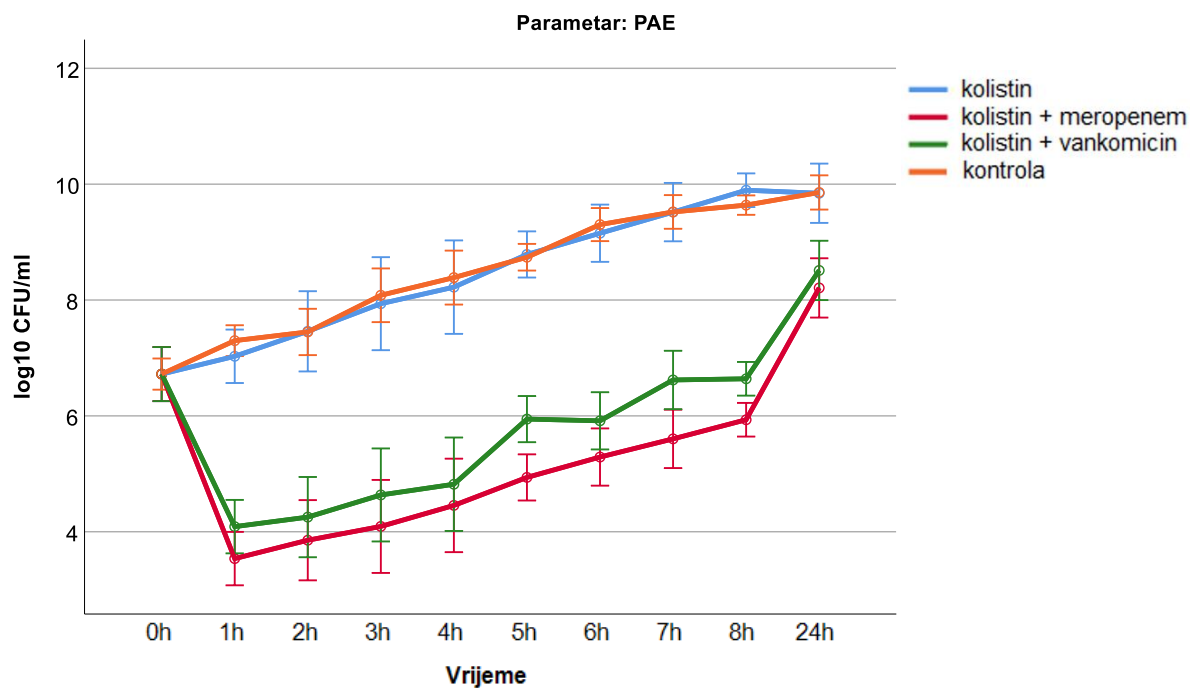
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin PAE	8,457	0,197	8,035	8,878
kolistin + meropenem PAE	5,263	0,197	4,841	5,684
kolistin+vankomicin PAE	5,815	0,197	5,393	6,236
kontrola	8,500	0,113	8,256	8,743

Parametar = PAE
PAE-postantibiotic effect

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin PAE	kolistin + meropenem PAE	3,194*	0,278	<0,001	2,341	4,047
	kolistin+vankomicin PAE	2,642*	0,278	<0,001	1,789	3,495
	kontrola	-0,043	0,227	1,000	-0,740	0,654
kolistin + meropenem PAE	kolistin PAE	-3,194*	0,278	<0,001	-4,047	-2,341
	kolistin+vankomicin PAE	-0,552	0,278	0,403	-1,405	0,301
	kontrola	-3,237*	0,227	<0,001	-3,933	-2,540
kolistin+vankomicin PAE	kolistin PAE	-2,642*	0,278	<0,001	-3,495	-1,789
	kolistin + meropenem PAE	0,552	0,278	0,403	-0,301	1,405
	kontrola	-2,685*	0,227	<0,001	-3,382	-1,988
kontrola	kolistin PAE	0,043	0,227	1,000	-0,654	0,740
	kolistin + meropenem PAE	3,237*	0,227	<0,001	2,540	3,933
	kolistin+vankomicin PAE	2,685*	0,227	<0,001	1,988	3,382

PAE-postantibiotic effect



Slika 36. Dinamika postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *K. pneumoniae* 609815 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike PAE u bakterijskog soja *K. pneumoniae* 609815 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 38 i na slici 36. Zabilježene su značajno veće vrijednosti u kontrolnom uzorku u odnosu na sve uzorke s antibioticima ($P < 0,001$), osim s kolistinom ($P = 1,000$), dok između antibiotika postoje značajne veće vrijednosti u uzorku s kolistinom u odnosu na uzorke s kolistinom i meropenemom ($P < 0,001$), te kolistinom i vankomicinom ($P < 0,001$).

5.8. Postantibiotski učinak – *Acinetobacter* spp.

Nakon izlaganja samom kolistinu PAE je bio negativan (-0.07 sati) u OXA-143, kratak (0.2-1,82 sata) u OXA-24, OXA-72, VIM-1+OXA-23, OXA-58+NDM-1 i *ISAbal*/OXA-69 pozitivnog organizma te umjereno dug (3.2 sata) u OXA-23 producenta. OXA-23 pozitivan soj je iskazivao najduži PAE nakon izlaganja kolistinu. Nije bilo moguće izračunati PAE nakon izlaganja kombinacijama kolistina s meropenemom ili vankomicinom jer nakon dva sata više nije bilo živih bakterijskih stanica u većini sojeva pa nije bilo moguće izračunati vrijeme potrebno za porast CFU/ml za 1 log₁₀.

U kombinaciji s vankomicinom PAE je bio umjereno dug (1.7-4 sata) s OXA-23, OXA-23+VIM-1, OXA-72 i OXA-24 pozitivnim sojevima dok u OXA-58, OXA-143, OXA-58/NDM-1 i *ISAbal*/OXA-69 pozitivnim sojevima nije bilo moguće izračunati PAE jer nije bilo oporavka rasta soja ili je bio duži od 5 sati. Kombinacija s meropenemom je rezultirala kratkim (0.2 sata) s OXA-143, umjerenim (2.4-3.73 sata) s OXA-24, OXA-58, OXA-23, OXA-23+VIM-1 ili dugim postantibiotskom učinkom od 5 sati s OXA-23 ili dužim od 5 sati s OXA-58+VIM-1 i *ISAbal*/OXA-69 kao što je prikazano u tablici 39.

Tablica 39. Postantibiotski učinak kolistina samog i u kombinacijama s vankomicinom ili meropenemom kod acinetobaktera. Trajanje je izraženo kao srednja vrijednost (SV) i standardna devijacija (SD) u satima.

kolistin			
OXA-23	OXA-24	OXA-58	OXA-143
SV: 3,240	SV: 0,298	SV: 1,138	SV: -0,078
SD: 2,676	SD: 1,310	SD: 0,961	SD: 1,942
kolistin + vankomicin			
OXA-23	OXA-24	OXA-58	OXA-143
SV: 3,598	SV: 1.75	SV: NA*	SV: NA*
SD: 0,750	SD: 0.07	SD: NA*	SD: NA*
kolistin + meropenem			
OXA-23	OXA-24	OXA-58	OXA-143
SV: 4,717	SV: 2,563	SV: NA*	SV: 0,293
SD: 2,033	SD: 3,288	SD: NA*	SD: 2,498
kolistin			
OXA-72	OXA-23+VIM-1	OXA-58+NDM-1	ISAb1/OXA-69
SV: 1,82	SV: 0,88	SV: 1,36	SV: 0,86
SD: 1,66	SD: 0,36	SD: 0,76	SD: 0,81
kolistin + vankomicin			
OXA-72	OXA-23+VIM-1	OXA-58+NDM-1	ISAb1/OXA-69
SV: 3,93	SV: 4,03	SV: 4,5->5	SV: 3,2->6
SD: 0,81	SD: 1,26	SD: NA*	SD: NA*
kolistin + meropenem			
OXA-72	OXA-23+VIM-1	OXA-58+NDM-1	ISAb1/OXA-69
SV: 3,73	SV: 2,5	SV: 4,3->5,5	SV: 4,4->5,3
SD: 0,49	SD: 2,15	SD: NA*	SD: NA*

NA* (not applicable)-postantibiotski učinak bio je duži od perioda mjerenja (>5 sati) pa se nije mogla izračunati srednja vrijednost

Tablica 40. Opisna statistika postantibiotskog učinka izraženog u (\log_{10} broja CFU/ml) soja *A. baumannii* 1486/485 pozitivan na OXA-23 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>A. baumannii</i> (OXA-23) 0h	kolistin PAE	7,170	0,540	5,828	8,512
	kolistin + meropenem PAE	7,170	0,540	5,828	8,512
	kolistin+vankomicin PAE	7,170	0,540	5,828	8,512
	kontrola	7,377	0,472	7,014	7,739
<i>A. baumannii</i> (OXA-23) 1h	kolistin PAE	5,357	1,348	2,008	8,705
	kolistin + meropenem PAE	4,037	0,437	2,952	5,121
	kolistin+vankomicin PAE	1,143	0,240	0,547	1,740
	kontrola	7,683	0,538	7,270	8,097
<i>A. baumannii</i> (OXA-23) 2h	kolistin PAE	4,517	0,508	3,254	5,780
	kolistin + meropenem PAE	3,510	0,815	1,485	5,535
	kolistin+vankomicin PAE	0,687	0,645	-0,916	2,289
	kontrola	8,294	0,459	7,941	8,648
<i>A. baumannii</i> (OXA-23) 3h	kolistin PAE	4,870	0,745	3,019	6,721
	kolistin + meropenem PAE	3,423	1,184	0,482	6,365
	kolistin+vankomicin PAE	0,517	0,454	-0,610	1,644
	kontrola	9,064	0,668	8,551	9,578
<i>A. baumannii</i> (OXA-23) 4h	kolistin PAE	5,490	0,521	4,195	6,785
	kolistin + meropenem PAE	3,170	1,572	-0,734	7,074
	kolistin+vankomicin PAE	0,700	0,614	-0,826	2,226
	kontrola	9,390	0,647	8,893	9,887
<i>A. baumannii</i> (OXA-23) 5h	kolistin PAE	6,293	0,437	5,207	7,380
	kolistin + meropenem PAE	3,613	1,503	-0,120	7,347
	kolistin+vankomicin PAE	1,303	0,550	-0,063	2,670
	kontrola	9,541	0,489	9,165	9,917
<i>A. baumannii</i> (OXA-23) 6h	kolistin PAE	6,513	0,569	5,101	7,926
	kolistin + meropenem PAE	3,990	0,873	1,821	6,159
	kolistin+vankomicin PAE	1,810	0,380	0,866	2,754
	kontrola	9,593	0,350	9,324	9,862
<i>A. baumannii</i> (OXA-23) 7h	kolistin PAE	6,687	0,252	6,062	7,312
	kolistin + meropenem PAE	4,317	0,677	2,635	5,998
	kolistin+vankomicin PAE	2,343	0,476	1,160	3,527
	kontrola	9,793	0,160	9,670	9,916
<i>A. baumannii</i> (OXA-23) 8h	kolistin PAE	7,425	0,120	6,345	8,505
	kolistin + meropenem PAE	5,257	0,771	3,341	7,172
	kolistin+vankomicin PAE	2,540	0,404	1,535	3,545
	kontrola	9,742	0,205	9,488	9,996
<i>A. baumannii</i> (OXA-23) 24h	kolistin PAE	8,363	0,483	7,163	9,564
	kolistin + meropenem PAE	6,903	0,461	5,759	8,047
	kolistin+vankomicin PAE	5,667	0,577	4,232	7,101
	kontrola	9,864	0,044	9,831	9,898

PAE-postantibiotic effect

Tablica 41. Usporedba dinamike postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 1486/485 pozitivan na OXA-23 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

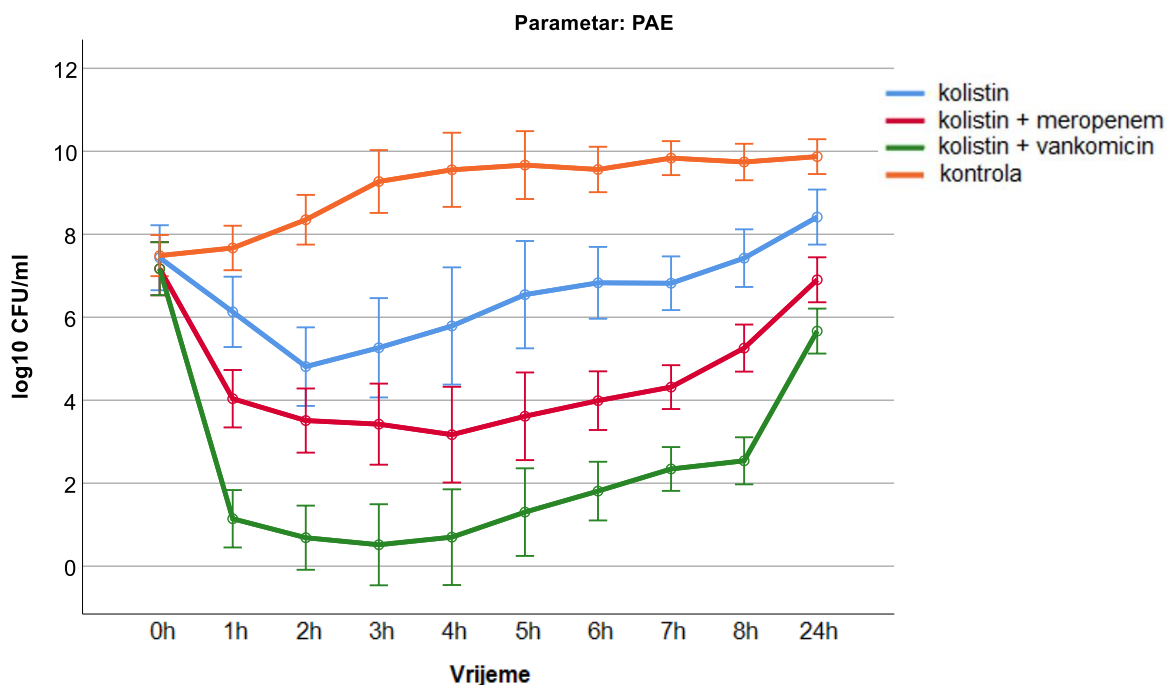
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin PAE	6,021	0,388	5,189	6,853
kolistin + meropenem PAE	4,539	0,388	3,707	5,371
kolistin+vankomicin PAE	2,134	0,388	1,302	2,966
kontrola	8,601	0,224	8,121	9,082

Parametar = PAE
PAE-postantibiotic effect

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin PAE	kolistin + meropenem PAE	1,482	0,549	0,103	-0,202	3,166
	kolistin+vankomicin PAE	3,887*	0,549	<0,001	2,203	5,571
	kontrola	-2,580*	0,448	<0,001	-3,955	-1,205
kolistin + meropenem PAE	kolistin PAE	-1,482	0,549	0,103	-3,166	0,202
	kolistin+vankomicin PAE	2,405*	0,549	0,004	0,721	4,089
	kontrola	-4,062*	0,448	<0,001	-5,437	-2,687
kolistin+vankomicin PAE	kolistin PAE	-3,887*	0,549	<0,001	-5,571	-2,203
	kolistin + meropenem PAE	-2,405*	0,549	0,004	-4,089	-0,721
	kontrola	-6,467*	0,448	<0,001	-7,842	-5,092
kontrola	kolistin PAE	2,580*	0,448	<0,001	1,205	3,955
	kolistin + meropenem PAE	4,062*	0,448	<0,001	2,687	5,437
	kolistin+vankomicin PAE	6,467*	0,448	<0,001	5,092	7,842

PAE-postantibiotic effect



Slika 37. Dinamika postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 1486/485 pozitivan na OXA-23 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike PAE u bakterijskog soja *A. baumannii* 1486/485 pozitivan na OXA-23 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 41 i na slici 37. Zabilježene su značajno veće vrijednosti u kontrolnom uzorku u odnosu na sve uzorke antibiotika ($P < 0,001$), dok između antibiotika postoje značajne veće vrijednosti u uzorku kolistina u odnosu na uzorak kolistin+vankomicin ($P < 0,001$) te veće vrijednosti u uzorku kolistin i meropenem u odnosu na uzorak kolistin i vankomicin ($P = 0,004$).

Tablica 42. Opisna statistika postantibiotskog učinka izraženog u (\log_{10} broja CFU/ml) soja *A. baumannii* 1794/793 pozitivan na OXA-24 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>A. baumannii</i> (OXA-24) 0h	kolistin PAE	7,067	0,140	6,718	7,416
	kolistin + meropenem PAE	7,067	0,140	6,718	7,416
	kolistin+vankomicin PAE	7,067	0,140	6,718	7,416
	kontrola	7,511	0,228	7,336	7,686
<i>A. baumannii</i> (OXA-24) 1h	kolistin PAE	5,290	1,138	2,462	8,118
	kolistin + meropenem PAE	3,703	0,220	3,156	4,251
	kolistin+vankomicin PAE	1,070	0,403	0,069	2,071
	kontrola	8,073	0,124	7,978	8,169
<i>A. baumannii</i> (OXA-24) 2h	kolistin PAE	5,337	0,782	3,393	7,280
	kolistin + meropenem PAE	3,380	0,937	1,052	5,708
	kolistin+vankomicin PAE	0,953	0,600	-0,537	2,444
	kontrola	8,577	0,051	8,538	8,616
<i>A. baumannii</i> (OXA-24) 3h	kolistin PAE	5,473	0,555	4,094	6,852
	kolistin + meropenem PAE	3,633	0,990	1,175	6,092
	kolistin+vankomicin PAE	1,153	0,532	-0,167	2,474
	kontrola	8,860	0,092	8,790	8,930
<i>A. baumannii</i> (OXA-24) 4h	kolistin PAE	6,200	0,603	4,702	7,698
	kolistin + meropenem PAE	3,623	0,968	1,219	6,027
	kolistin+vankomicin PAE	1,067	0,729	-0,743	2,877
	kontrola	9,196	0,311	8,957	9,434
<i>A. baumannii</i> (OXA-24) 5h	kolistin PAE	6,857	0,902	4,616	9,097
	kolistin + meropenem PAE	3,390	1,516	-0,376	7,156
	kolistin+vankomicin PAE	1,757	0,353	0,880	2,634
	kontrola	9,237	0,409	8,923	9,551
<i>A. baumannii</i> (OXA-24) 6h	kolistin PAE	7,170	0,675	5,493	8,847
	kolistin + meropenem PAE	3,833	1,097	1,108	6,558
	kolistin+vankomicin PAE	2,327	0,524	1,024	3,629
	kontrola	9,287	0,372	9,001	9,572
<i>A. baumannii</i> (OXA-24) 7h	kolistin PAE	7,500	0,447	6,389	8,611
	kolistin + meropenem PAE	4,543	1,026	1,994	7,093
	kolistin+vankomicin PAE	2,540	0,404	1,535	3,545
	kontrola	9,493	0,395	9,190	9,797
<i>A. baumannii</i> (OXA-24) 8h	kolistin PAE	7,535	0,771	0,610	14,460
	kolistin + meropenem PAE	5,033	0,457	3,899	6,167
	kolistin+vankomicin PAE	2,540	0,404	1,535	3,545
	kontrola	9,510	0,470	8,927	10,093
<i>A. baumannii</i> (OXA-24) 24h	kolistin PAE	8,057	0,718	6,273	9,840
	kolistin + meropenem PAE	7,447	0,539	6,108	8,786
	kolistin+vankomicin PAE	6,500	0,707	0,147	12,853
	kontrola	9,544	0,426	9,217	9,872

PAE-postantibiotic effect

Tablica 43. Usporedba dinamike postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 1794/793 pozitivan na OXA-24 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

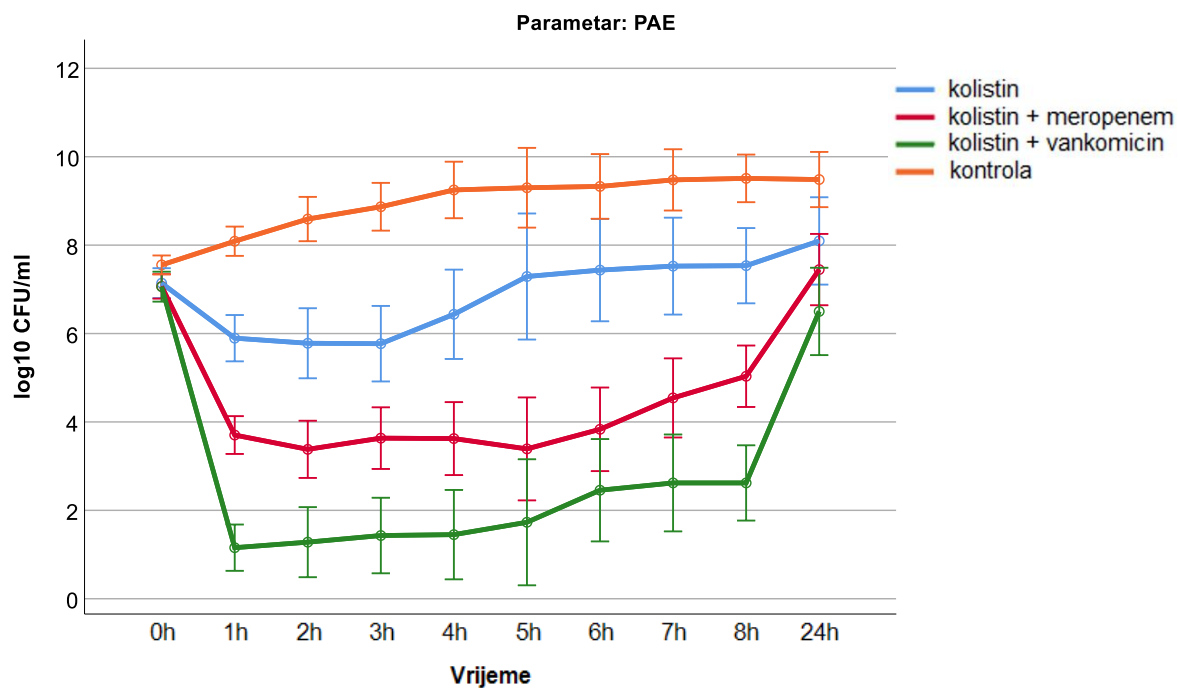
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin PAE	6,397	0,369	5,605	7,190
kolistin + meropenem PAE	4,565	0,369	3,773	5,358
kolistin+vankomicin PAE	2,227	0,369	1,434	3,019
kontrola	8,506	0,213	8,049	8,964

Parametar = PAE
PAE-postantibiotic effect

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin PAE	kolistin + meropenem PAE	1,832*	0,522	0,021	0,229	3,435
	kolistin+vankomicin PAE	4,171*	0,522	<0,001	2,567	5,774
	kontrola	-2,109*	0,427	0,001	-3,418	-0,800
kolistin + meropenem PAE	kolistin PAE	-1,832*	0,522	0,021	-3,435	-0,229
	kolistin+vankomicin PAE	2,339*	0,522	0,003	0,735	3,942
	kontrola	-3,941*	0,427	<0,001	-5,250	-2,632
kolistin+vankomicin PAE	kolistin PAE	-4,171*	0,522	<0,001	-5,774	-2,567
	kolistin + meropenem PAE	-2,339*	0,522	0,003	-3,942	-0,735
	kontrola	-6,279*	0,427	<0,001	-7,589	-4,970
kontrola	kolistin PAE	2,109*	0,427	<0,001	0,800	3,418
	kolistin + meropenem PAE	3,941*	0,427	<0,001	2,632	5,250
	kolistin+vankomicin PAE	6,279*	0,427	<0,001	4,970	7,589

PAE-postantibiotic effect



Slika 38. Dinamika postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 1794/793 pozitivan na OXA-24 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike PAE u bakterijskog soja *A. baumannii* (OXA-24) tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 43 i na slici 38. Zabilježene su značajno veće vrijednosti u kontrolnom uzorku u odnosu na sve uzorke antibiotika ($P < 0,001$), dok između antibiotika postoje značajno veće vrijednosti u uzorku kolistina u odnosu na uzorak kolistin i vankomicin ($P < 0,001$) te kolistin i meropenem ($P = 0,021$) te veće vrijednosti u uzorku kolistin i meropenem u odnosu na uzorak kolistin i vankomicin ($P = 0,003$).

Tablica 44. Opisna statistika postantibiotskog učinka izraženog u (\log_{10} broja CFU/ml) soja *A. baumannii* 5353/352 pozitivan na OXA-58 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>A. baumannii</i> (OXA-58) 0h	kolistin PAE	6,804	0,444	5,701	7,907
	kolistin + meropenem PAE	6,783	0,455	5,653	7,914
	kolistin+vankomicin PAE	6,804	0,444	5,701	7,907
	kontrola	7,285	0,784	6,682	7,888
<i>A. baumannii</i> (OXA-58) 1h	kolistin PAE	4,584	1,379	1,157	8,010
	kolistin + meropenem PAE	3,866	0,722	2,073	5,660
	kolistin+vankomicin PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	7,677	0,629	7,193	8,161
<i>A. baumannii</i> (OXA-58) 2h	kolistin PAE	4,715	1,073	2,050	7,380
	kolistin + meropenem PAE	4,086	0,704	2,337	5,835
	kolistin+vankomicin PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	8,103	0,618	7,628	8,579
<i>A. baumannii</i> (OXA-58) 3h	kolistin PAE	5,095	1,132	2,283	7,907
	kolistin + meropenem PAE	3,514	1,597	-0,454	7,482
	kolistin+vankomicin PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	8,779	0,752	8,201	9,357
<i>A. baumannii</i> (OXA-58) 4h	kolistin PAE	5,471	1,053	2,855	8,087
	kolistin + meropenem PAE	3,940	2,287	-1,741	9,620
	kolistin+vankomicin PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,076	0,621	8,599	9,553
<i>A. baumannii</i> (OXA-58) 5h	kolistin PAE	6,277	1,137	3,452	9,103
	kolistin + meropenem PAE	4,453	2,065	-0,677	9,583
	kolistin+vankomicin PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,350	0,509	8,958	9,742
<i>A. baumannii</i> (OXA-58) 6h	kolistin PAE	6,863	0,984	4,418	9,307
	kolistin + meropenem PAE	5,237	1,807	0,749	9,725
	kolistin+vankomicin PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,331	0,417	9,010	9,651
<i>A. baumannii</i> (OXA-58) 7h	kolistin PAE	7,176	0,659	5,540	8,813
	kolistin + meropenem PAE	5,291	2,001	0,321	10,261
	kolistin+vankomicin PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,463	0,400	9,156	9,771
<i>A. baumannii</i> (OXA-58) 8h	kolistin PAE	8,005	0,733	6,184	9,826
	kolistin + meropenem PAE	6,101	1,335	2,786	9,417
	kolistin+vankomicin PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,496	0,478	9,129	9,863
<i>A. baumannii</i> (OXA-58) 24h	kolistin PAE	8,744	0,748	6,886	10,601
	kolistin + meropenem PAE	7,596	0,182	7,143	8,049
	kolistin+vankomicin PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,564	0,258	9,365	9,763

PAE-postantibiotic effect

Tablica 45. Usporedba dinamike postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 5353/352 pozitivan na OXA-58 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

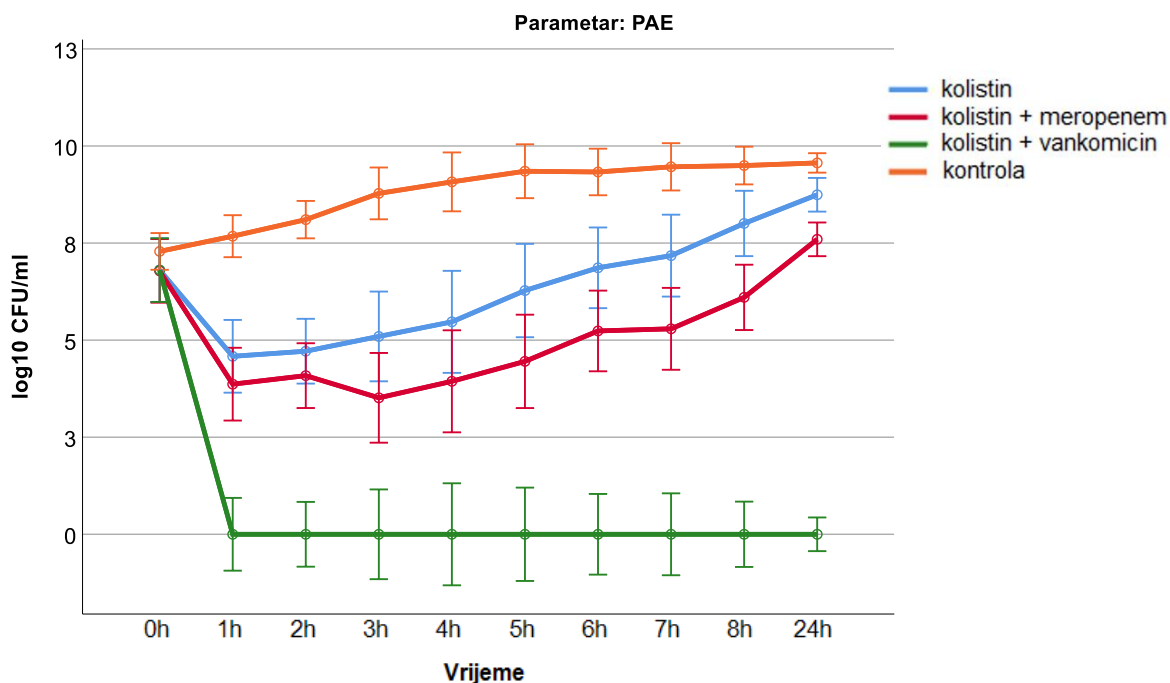
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin PAE	6,111	0,501	5,036	7,185
kolistin + meropenem PAE	5,087	0,501	4,012	6,161
kolistin+vankomicin PAE	0,680	0,501	-0,394	1,755
kontrola	8,390	0,289	7,769	9,010

Parametar = PAE
PAE-postantibiotic effect

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin PAE	kolistin + meropenem PAE	1,024	0,709	1,000	-1,151	3,198
	kolistin+vankomicin PAE	5,430*	0,709	<0,001	3,256	7,605
	kontrola	-2,279*	0,579	0,009	-4,055	-0,504
kolistin + meropenem PAE	kolistin PAE	-1,024	0,709	1,000	-3,198	1,151
	kolistin+vankomicin PAE	4,406*	0,709	<0,001	2,232	6,581
	kontrola	-3,303*	0,579	<0,001	-5,079	-1,527
kolistin+vankomicin PAE	kolistin PAE	-5,430*	0,709	<0,001	-7,605	-3,256
	kolistin + meropenem PAE	-4,406*	0,709	<0,001	-6,581	-2,232
	kontrola	-7,709*	0,579	<0,001	-9,485	-5,934
kontrola	kolistin PAE	2,279*	0,579	0,009	0,504	4,055
	kolistin + meropenem PAE	3,303*	0,579	<0,001	1,527	5,079
	kolistin+vankomicin PAE	7,709*	0,579	<0,001	5,934	9,485

PAE-postantibiotic effect



Slika 39. Dinamika postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 5353/352 pozitivan na OXA-58 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike PAE u bakterijskog soja *A. baumannii* 5353/352 pozitivan na OXA-58 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 45 i na slici 39. Zabilježene su značajno veće vrijednosti u kontrolnom uzorku u odnosu na sve uzorke antibiotika, dok između antibiotika postoje značajne veće vrijednosti u uzorku kolistina u odnosu na uzorak kolistin i vankomicin ($P < 0,001$) te veće vrijednosti u uzorku kolistin i meropenem u odnosu na uzorak kolistin i vankomicin ($P < 0,001$).

Tablica 46. Opisna statistika postantibiotskog učinka izraženog u (\log_{10} broja CFU/ml) soja *A. baumannii* 135040 pozitivan na OXA-143 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>A. baumannii</i> (OXA-143) 0h	kolistin PAE	6,901	0,415	5,870	7,932
	kolistin + meropenem PAE	6,908	0,409	5,892	7,924
	kolistin+vankomicin PAE	4,914	3,683	-4,234	14,062
	kontrola	7,263	0,325	7,013	7,513
<i>A. baumannii</i> (OXA-143) 1h	kolistin PAE	4,228	0,929	1,921	6,535
	kolistin + meropenem PAE	4,844	0,399	3,853	5,836
	kolistin+vankomicin PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	7,589	0,453	7,241	7,938
<i>A. baumannii</i> (OXA-143) 2h	kolistin PAE	3,921	0,729	2,110	5,732
	kolistin + meropenem PAE	4,728	0,905	2,481	6,976
	kolistin+vankomicin PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	7,974	0,599	7,514	8,434
<i>A. baumannii</i> (OXA-143) 3h	kolistin PAE	4,406	0,535	3,078	5,734
	kolistin + meropenem PAE	5,112	1,014	2,594	7,629
	kolistin+vankomicin PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	8,238	0,506	7,849	8,627
<i>A. baumannii</i> (OXA-143) 4h	kolistin PAE	5,270	0,523	3,970	6,569
	kolistin + meropenem PAE	5,628	0,854	3,507	7,749
	kolistin+vankomicin PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	8,541	0,637	8,051	9,031
<i>A. baumannii</i> (OXA-143) 5h	kolistin PAE	5,680	0,717	3,898	7,462
	kolistin + meropenem PAE	5,729	0,689	4,017	7,440
	kolistin+vankomicin PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	8,981	0,665	8,470	9,492
<i>A. baumannii</i> (OXA-143) 6h	kolistin PAE	6,247	0,531	4,928	7,565
	kolistin + meropenem PAE	6,194	0,352	5,320	7,068
	kolistin+vankomicin PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,275	0,501	8,890	9,660
<i>A. baumannii</i> (OXA-143) 7h	kolistin PAE	6,892	0,166	6,479	7,304
	kolistin + meropenem PAE	6,639	0,489	5,424	7,855
	kolistin+vankomicin PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,408	0,404	9,097	9,718
<i>A. baumannii</i> (OXA-143) 8h	kolistin PAE	6,920	0,063	6,762	7,078
	kolistin + meropenem PAE	6,806	0,177	6,365	7,247
	kolistin+vankomicin PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,444	0,422	9,120	9,769
<i>A. baumannii</i> (OXA-143) 24h	kolistin PAE	8,420	0,794	6,448	10,393
	kolistin + meropenem PAE	7,589	0,821	5,549	9,629
	kolistin+vankomicin PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	9,642	0,212	9,478	9,805

PAE-postantibiotic effect

Tablica 47. Usporedba dinamike postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 135040 pozitivan na OXA-143 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

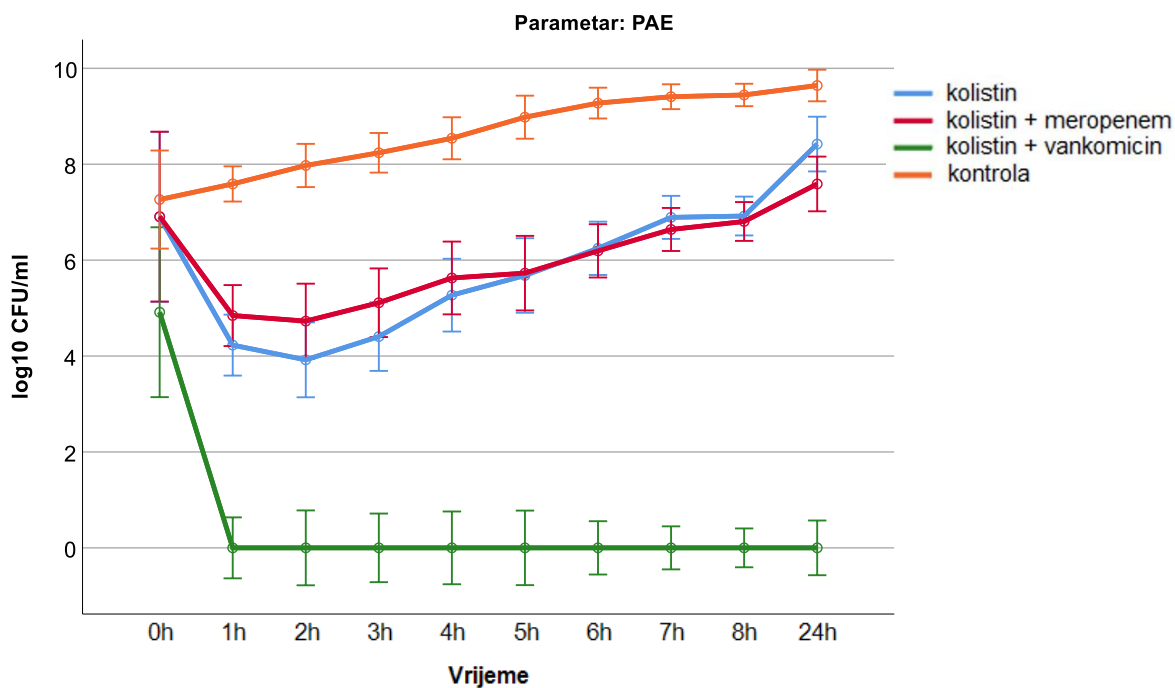
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin PAE	5,658	0,358	4,891	6,426
kolistin + meropenem PAE	6,018	0,358	5,250	6,785
kolistin+vankomicin PAE	0,491	0,358	-0,276	1,259
kontrola	8,212	0,207	7,768	8,655

Parametar = PAE
PAE-postantibiotic effect

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin PAE	kolistin + meropenem PAE	-0,359	0,506	1,000	-1,912	1,194
	kolistin+vankomicin PAE	5,167*	0,506	<0,001	3,614	6,720
	kontrola	-2,553*	0,413	<0,001	-3,821	-1,285
kolistin + meropenem PAE	kolistin PAE	0,359	0,506	1,000	-1,194	1,912
	kolistin+vankomicin PAE	5,526*	0,506	<0,001	3,973	7,080
	kontrola	-2,194*	0,413	0,001	-3,462	-0,926
kolistin+vankomicin PAE	kolistin PAE	-5,167*	0,506	<0,001	-6,720	-3,614
	kolistin + meropenem PAE	-5,526*	0,506	<0,001	-7,080	-3,973
	kontrola	-7,720*	0,413	<0,001	-8,988	-6,452
kontrola	kolistin PAE	2,553*	0,413	<0,001	1,285	3,821
	kolistin + meropenem PAE	2,194*	0,413	0,001	0,926	3,462
	kolistin+vankomicin PAE	7,720*	0,413	<0,001	6,452	8,988

PAE-postantibiotic effect



Slika 40. Dinamika postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 135040 pozitivan na OXA-143 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike PAE u bakterijskog soja *A. baumannii* 135040 pozitivan na OXA-143 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 47 i na slici 40. Zabilježene su značajno veće vrijednosti u kontrolnom uzorku u odnosu na sve uzorke antibiotika, dok između antibiotika postoje značajne veće vrijednosti u uzorku kolistina u odnosu na uzorak kolistin i vankomicin ($P < 0,001$) te veće vrijednosti u uzorku kolistin i meropenem u odnosu na uzorak kolistin i vankomicin ($P < 0,001$).

Tablica 48. Opisna statistika postantibiotskog učinka izraženog u (\log_{10} broja CFU/ml) soja *A. baumannii* 9728/1419 pozitivan na OXA-72 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>A. baumannii</i> (OXA-72) 0h	kolistin PAE	6,351	0,561	4,958	7,744
	kolistin + meropenem PAE	6,351	0,561	4,958	7,744
	kolistin+vankomicin PAE	6,351	0,561	4,958	7,744
	kontrola	6,351	0,486	5,977	6,724
<i>A. baumannii</i> (OXA-72) 1h	kolistin PAE	4,096	0,280	3,402	4,791
	kolistin + meropenem PAE	2,107	0,360	1,213	3,000
	kolistin+vankomicin PAE	1,321	0,219	0,777	1,865
	kontrola	6,769	0,247	6,579	6,959
<i>A. baumannii</i> (OXA-72) 2h	kolistin PAE	3,958	0,058	3,814	4,102
	kolistin + meropenem PAE	2,276	0,256	1,641	2,910
	kolistin+vankomicin PAE	0,971	0,921	-1,318	3,259
	kontrola	7,242	0,391	6,942	7,543
<i>A. baumannii</i> (OXA-72) 3h	kolistin PAE	3,990	0,409	2,974	5,006
	kolistin + meropenem PAE	2,492	0,520	1,200	3,784
	kolistin+vankomicin PAE	1,221	1,058	-1,407	3,849
	kontrola	7,851	0,435	7,516	8,185
<i>A. baumannii</i> (OXA-72) 4h	kolistin PAE	4,432	0,444	3,329	5,535
	kolistin + meropenem PAE	2,614	0,531	1,296	3,932
	kolistin+vankomicin PAE	1,480	0,763	-0,416	3,376
	kontrola	7,731	1,464	6,605	8,856
<i>A. baumannii</i> (OXA-72) 5h	kolistin PAE	4,935	0,089	4,715	5,156
	kolistin + meropenem PAE	2,749	0,508	1,486	4,011
	kolistin+vankomicin PAE	1,764	0,486	0,556	2,972
	kontrola	8,429	0,336	8,170	8,687
<i>A. baumannii</i> (OXA-72) 6h	kolistin PAE	5,521	0,470	4,353	6,688
	kolistin + meropenem PAE	2,899	0,449	1,785	4,014
	kolistin+vankomicin PAE	1,975	0,370	1,057	2,893
	kontrola	8,810	0,209	8,649	8,971
<i>A. baumannii</i> (OXA-72) 7h	kolistin PAE	5,863	0,135	5,527	6,199
	kolistin + meropenem PAE	3,335	0,582	1,889	4,782
	kolistin+vankomicin PAE	2,342	0,311	1,571	3,114
	kontrola	8,996	0,063	8,947	9,044
<i>A. baumannii</i> (OXA-72) 8h	kolistin PAE	7,083	1,605	3,096	11,069
	kolistin + meropenem PAE	3,631	0,875	1,456	5,805
	kolistin+vankomicin PAE	2,449	0,185	1,990	2,909
	kontrola	8,535	1,653	7,265	9,806
<i>A. baumannii</i> (OXA-72) 24h	kolistin PAE	8,881	0,065	8,719	9,044
	kolistin + meropenem PAE	7,139	2,229	1,601	12,677
	kolistin+vankomicin PAE	4,726	4,120	-5,507	14,960
	kontrola	9,526	0,249	9,335	9,717

PAE-postantibiotic effect

Tablica 49. Usporedba dinamike postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 9728/1419 pozitivan na OXA-72 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

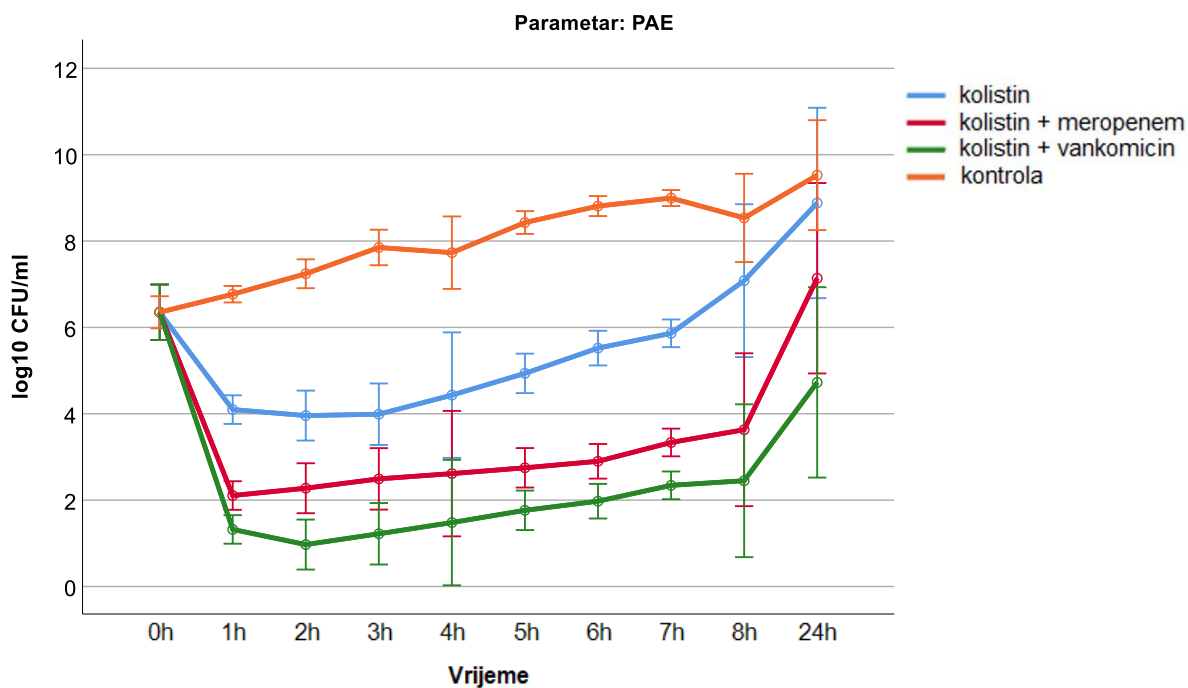
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin PAE	5,511	0,170	5,147	5,875
kolistin + meropenem PAE	3,559	0,170	3,195	3,923
kolistin+vankomicin PAE	2,460	0,170	2,096	2,824
kontrola	8,024	0,098	7,814	8,234

Parametar = PAE
PAE-postantibiotic effect

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin PAE	kolistin + meropenem PAE	1,952*	0,240	<0,001	1,216	2,688
	kolistin+vankomicin PAE	3,051*	0,240	<0,001	2,315	3,787
	kontrola	-2,513*	0,196	<0,001	-3,114	-1,912
kolistin + meropenem PAE	kolistin PAE	-1,952*	0,240	<0,001	-2,688	-1,216
	kolistin+vankomicin PAE	1,099*	0,240	0,003	0,363	1,835
	kontrola	-4,465*	0,196	<0,001	-5,066	-3,864
kolistin+vankomicin PAE	kolistin PAE	-3,051*	0,240	<0,001	-3,787	-2,315
	kolistin + meropenem PAE	-1,099*	0,240	0,003	-1,835	-0,363
	kontrola	-5,564*	0,196	<0,001	-6,165	-4,963
kontrola	kolistin PAE	2,513*	0,196	<0,001	1,912	3,114
	kolistin + meropenem PAE	4,465*	0,196	<0,001	3,864	5,066
	kolistin+vankomicin PAE	5,564*	0,196	<0,001	4,963	6,165

PAE-postantibiotic effect



Slika 41. Dinamika postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 9728/1419 pozitivan na OXA-72 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike PAE u bakterijskog soja *A. baumannii* 9728/1419 pozitivan na OXA-72 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 49 i na slici 41. Zabilježene su značajno niže vrijednosti u uzorcima tretiranim antibioticima u odnosu na kontrolni uzorak, dok između antibiotika postoje značajno niže vrijednosti za kombinacije kolistina s vankomicinom i meropenemom u odnosu na kolistin sam ($P < 0,001$), a kombinacija kolistina s vankomicinom je imala značajno niže vrijednosti u odnosu na kombinaciju s meropenemom ($P < 0,001$).

Tablica 50. Opisna statistika postantibiotskog učinka izraženog u (\log_{10} broja CFU/ml) soja *A. baumannii* 15429 pozitivan na OXA-69 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>A. baumannii</i> (OXA-69) 0h	kolistin PAE	6,449	0,185	5,989	6,909
	kolistin + meropenem PAE	6,436	0,162	6,033	6,839
	kolistin+vankomicin PAE	6,449	0,185	5,989	6,909
	kontrola	6,445	0,154	6,326	6,563
<i>A. baumannii</i> (OXA-69) 1h	kolistin PAE	2,984	0,383	2,032	3,936
	kolistin + meropenem PAE	0,725	0,262	0,073	1,377
	kolistin+vankomicin PAE	0,986	0,135	0,651	1,322
	kontrola	6,899	0,071	6,844	6,954
<i>A. baumannii</i> (OXA-69) 2h	kolistin PAE	2,913	0,467	1,752	4,074
	kolistin + meropenem PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kolistin+vankomicin PAE	0,360	0,623	-1,188	1,907
	kontrola	7,370	0,384	7,074	7,665
<i>A. baumannii</i> (OXA-69) 3h	kolistin PAE	3,222	0,352	2,348	4,096
	kolistin + meropenem PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kolistin+vankomicin PAE	0,527	0,669	-1,134	2,188
	kontrola	7,891	0,132	7,789	7,992
<i>A. baumannii</i> (OXA-69) 4h	kolistin PAE	3,738	0,100	3,489	3,987
	kolistin + meropenem PAE	0,519	0,482	-0,680	1,717
	kolistin+vankomicin PAE	1,021	0,934	-1,300	3,342
	kontrola	7,731	1,438	6,625	8,836
<i>A. baumannii</i> (OXA-69) 5h	kolistin PAE	3,906	0,024	3,846	3,966
	kolistin + meropenem PAE	0,447	0,536	-0,883	1,778
	kolistin+vankomicin PAE	1,113	0,997	-1,363	3,589
	kontrola	8,568	0,228	8,393	8,743
<i>A. baumannii</i> (OXA-69) 6h	kolistin PAE	4,228	0,346	3,370	5,086
	kolistin + meropenem PAE	1,096	0,151	0,720	1,472
	kolistin+vankomicin PAE	1,314	1,139	-1,515	4,143
	kontrola	8,572	0,701	8,033	9,111
<i>A. baumannii</i> (OXA-69) 7h	kolistin PAE	5,161	0,571	3,742	6,580
	kolistin + meropenem PAE	1,302	0,196	0,815	1,789
	kolistin+vankomicin PAE	1,507	1,328	-1,792	4,806
	kontrola	9,069	0,477	8,703	9,436
<i>A. baumannii</i> (OXA-69) 8h	kolistin PAE	5,488	0,460	4,346	6,629
	kolistin + meropenem PAE	1,531	0,244	0,926	2,137
	kolistin+vankomicin PAE	1,693	1,473	-1,966	5,352
	kontrola	9,345	0,441	9,006	9,684
<i>A. baumannii</i> (OXA-69) 24h	kolistin PAE	8,215	0,536	6,883	9,547
	kolistin + meropenem PAE	5,900	2,555	-0,447	12,248
	kolistin+vankomicin PAE	6,354	2,044	1,276	11,431
	kontrola	9,425	0,518	9,027	9,823

PAE-postantibiotic effect

Tablica 51. Usporedba dinamike postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 15429 pozitivan na OXA-69 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

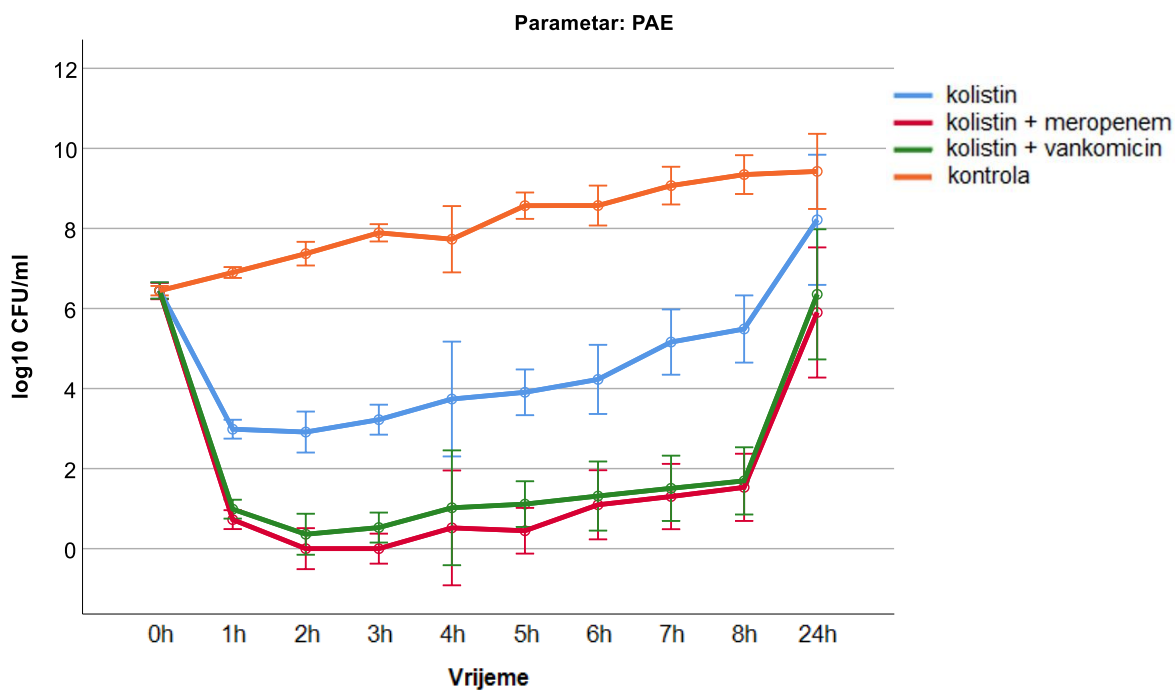
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin PAE	4,630	0,230	4,138	5,123
kolistin + meropenem PAE	1,796	0,230	1,303	2,288
kolistin+vankomicin PAE	2,132	0,230	1,640	2,625
kontrola	8,131	0,133	7,847	8,416

Parametar = PAE
PAE-postantibiotic effect

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin PAE	kolistin + meropenem PAE	2,835*	0,325	<0,001	1,838	3,832
	kolistin+vankomicin PAE	2,498*	0,325	<0,001	1,501	3,495
	kontrola	-3,501*	0,265	<0,001	-4,315	-2,687
kolistin + meropenem PAE	kolistin PAE	-2,835*	0,325	<0,001	-3,832	-1,838
	kolistin+vankomicin PAE	-0,337	0,325	1,000	-1,334	0,660
	kontrola	-6,336*	0,265	<0,001	-7,150	-5,521
kolistin+vankomicin PAE	kolistin PAE	-2,498*	0,325	<0,001	-3,495	-1,501
	kolistin + meropenem PAE	0,337	0,325	1,000	-0,660	1,334
	kontrola	-5,999*	0,265	<0,001	-6,813	-5,185
kontrola	kolistin PAE	3,501*	0,265	<0,001	2,687	4,315
	kolistin + meropenem PAE	6,336*	0,265	<0,001	5,521	7,150
	kolistin+vankomicin PAE	5,999*	0,265	<0,001	5,185	6,813

PAE-postantibiotic effect



Slika 42. Dinamika postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 15429 pozitivan na OXA-69 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike PAE u bakterijskog soja *A. baumannii* 15429 pozitivan na OXA-69 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 51 i na slici 42. Zabilježene su značajno niže vrijednosti u uzorcima tretiranim antibioticima u odnosu na kontrolni uzorak ($P < 0,001$), dok između antibiotika postoje značajne niže vrijednosti za kombinacije kolistina s meropenemom i vankomicinom u odnosu na kolistin sam ($P < 0,001$).

Tablica 52. Opisna statistika postantibiotskog učinka izraženog u (\log_{10} broja CFU/ml) soja *A. baumannii* 157195 pozitivan na OXA-23+VIM-1 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>A. baumannii</i> (OXA-23+VIM-1) 0h	kolistin PAE	6,079	0,152	5,700	6,458
	kolistin + meropenem PAE	6,079	0,152	5,700	6,458
	kolistin+vankomicin PAE	6,079	0,152	5,700	6,458
	kontrola	6,136	0,188	5,991	6,281
<i>A. baumannii</i> (OXA-23+VIM-1) 1h	kolistin PAE	3,787	0,483	2,586	4,987
	kolistin + meropenem PAE	1,814	0,428	0,751	2,877
	kolistin+vankomicin PAE	1,159	0,481	-0,035	2,353
	kontrola	6,657	0,191	6,510	6,804
<i>A. baumannii</i> (OXA-23+VIM-1) 2h	kolistin PAE	3,840	0,247	3,227	4,453
	kolistin + meropenem PAE	1,496	1,321	-1,787	4,778
	kolistin+vankomicin PAE	0,894	0,791	-1,072	2,859
	kontrola	7,104	0,199	6,951	7,257
<i>A. baumannii</i> (OXA-23+VIM-1) 3h	kolistin PAE	3,860	0,202	3,358	4,362
	kolistin + meropenem PAE	2,031	0,928	-0,276	4,337
	kolistin+vankomicin PAE	1,071	0,984	-1,372	3,514
	kontrola	7,520	0,186	7,377	7,663
<i>A. baumannii</i> (OXA-23+VIM-1) 4h	kolistin PAE	3,888	0,053	3,756	4,020
	kolistin + meropenem PAE	2,426	0,762	0,534	4,317
	kolistin+vankomicin PAE	1,312	0,687	-0,394	3,019
	kontrola	7,780	0,339	7,520	8,041
<i>A. baumannii</i> (OXA-23+VIM-1) 5h	kolistin PAE	4,715	0,107	4,449	4,982
	kolistin + meropenem PAE	2,588	0,714	0,814	4,362
	kolistin+vankomicin PAE	1,590	0,472	0,418	2,761
	kontrola	8,088	0,577	7,644	8,531
<i>A. baumannii</i> (OXA-23+VIM-1) 6h	kolistin PAE	5,165	0,449	4,050	6,279
	kolistin + meropenem PAE	3,165	1,003	0,673	5,658
	kolistin+vankomicin PAE	1,956	0,492	0,734	3,178
	kontrola	8,469	0,647	7,972	8,967
<i>A. baumannii</i> (OXA-23+VIM-1) 7h	kolistin PAE	6,809	1,896	2,099	11,520
	kolistin + meropenem PAE	3,350	1,018	0,822	5,878
	kolistin+vankomicin PAE	2,391	0,604	0,892	3,891
	kontrola	8,948	0,409	8,634	9,262
<i>A. baumannii</i> (OXA-23+VIM-1) 8h	kolistin PAE	5,752	0,293	5,024	6,480
	kolistin + meropenem PAE	3,576	1,012	1,062	6,090
	kolistin+vankomicin PAE	2,635	0,671	0,969	4,301
	kontrola	9,058	0,305	8,823	9,292
<i>A. baumannii</i> (OXA-23+VIM-1) 24h	kolistin PAE	8,897	0,158	8,505	9,289
	kolistin + meropenem PAE	6,987	3,666	-2,121	16,095
	kolistin+vankomicin PAE	8,429	0,503	7,178	9,679
	kontrola	9,374	0,445	9,032	9,716

PAE-postantibiotic effect

Tablica 53. Usporedba dinamike postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 157195 pozitivan na OXA-23+VIM-1 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

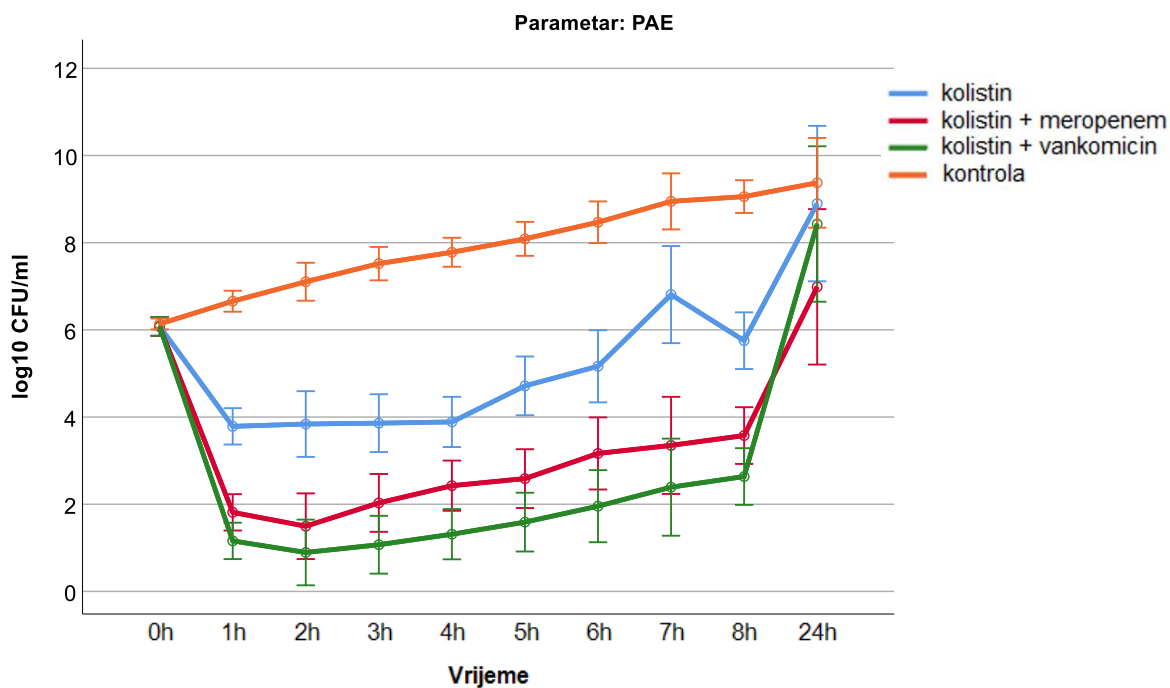
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin PAE	5,279	0,287	4,665	5,894
kolistin + meropenem PAE	3,351	0,287	2,737	3,966
kolistin+vankomicin PAE	2,752	0,287	2,137	3,366
kontrola	7,913	0,165	7,559	8,268

Parametar = PAE
PAE-postantibiotic effect

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI		Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI	
					Donji	Gornji
kolistin PAE	kolistin + meropenem PAE	1,928*	0,405	0,002	0,685	3,171
	kolistin+vankomicin PAE	2,528*	0,405	<0,001	1,284	3,771
	kontrola	-2,634*	0,331	<0,001	-3,649	-1,619
kolistin + meropenem PAE	kolistin PAE	-1,928*	0,405	0,002	-3,171	-0,685
	kolistin+vankomicin PAE	0,600	0,405	0,967	-0,644	1,843
	kontrola	-4,562*	0,331	<0,001	-5,578	-3,547
kolistin+vankomicin PAE	kolistin PAE	-2,528*	0,405	<0,001	-3,771	-1,284
	kolistin + meropenem PAE	-0,600	0,405	0,967	-1,843	0,644
	kontrola	-5,162*	0,331	<0,001	-6,177	-4,147
kontrola	kolistin PAE	2,634*	0,331	<0,001	1,619	3,649
	kolistin + meropenem PAE	4,562*	0,331	<0,001	3,547	5,578
	kolistin+vankomicin PAE	5,162*	0,331	<0,001	4,147	6,177

PAE-postantibiotic effect



Slika 43. Dinamika postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *A. baumannii* 157195 pozitivan na OXA-23+VIM-1 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike PAE u bakterijskog soja *A. baumannii* 157195 pozitivan na OXA-23+VIM-1 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 53 i na slici 43. Zabilježene su značajno niže vrijednosti u uzorcima tretiranim antibioticima u odnosu kontrolni uzorak, dok između antibiotika postoje značajne niže vrijednosti u uzorcima tretiranim kombinacijom kolistina s vankomicinom u odnosu na uzorke tretirane samim kolistinom ($P < 0,001$). Između kombinacija uzoraka kolistina s meropenemom i vankomicinom nije bilo signifikantnih razlika ($P = 0,967$).

Tablica 54. Opisna statistika postantibiotskog učinka izraženog u (\log_{10} broja CFU/ml) soja *A. guillouie* 95991 pozitivan na OXA-58+NDM-1 obzirom na vrijeme analize i pojedine antibiotike te kontrole

		Aritmetička sredina	SD	95% CI	
<i>A. guillouie</i> (OXA-58+NDM-1) 0h	kolistin PAE	6,559	0,211	6,034	7,084
	kolistin + meropenem PAE	6,559	0,211	6,034	7,084
	kolistin+vankomicin PAE	6,559	0,211	6,034	7,084
	kontrola	6,559	0,183	6,418	6,700
<i>A. guillouie</i> (OXA-58+NDM-1) 1h	kolistin PAE	3,112	1,144	0,269	5,954
	kolistin + meropenem PAE	1,272	0,135	0,936	1,608
	kolistin+vankomicin PAE	0,259	0,241	-0,340	0,859
	kontrola	6,965	0,318	6,720	7,209
<i>A. guillouie</i> (OXA-58+NDM-1) 2h	kolistin PAE	3,006	0,872	0,841	5,172
	kolistin + meropenem PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kolistin+vankomicin PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	7,350	0,407	7,038	7,662
<i>A. guillouie</i> (OXA-58+NDM-1) 3h	kolistin PAE	3,163	0,655	1,535	4,791
	kolistin + meropenem PAE	0,560	0,241	-0,039	1,160
	kolistin+vankomicin PAE	0,000	0,000	0,000	0,000
	kontrola	7,923	0,363	7,644	8,202
<i>A. guillouie</i> (OXA-58+NDM-1) 4h	kolistin PAE	3,541	0,540	2,201	4,881
	kolistin + meropenem PAE	0,318	0,551	-1,050	1,686
	kolistin+vankomicin PAE	0,318	0,551	-1,050	1,686
	kontrola	8,460	0,379	8,168	8,751
<i>A. guillouie</i> (OXA-58+NDM-1) 5h	kolistin PAE	4,104	0,731	2,287	5,921
	kolistin + meropenem PAE	1,040	0,040	0,942	1,138
	kolistin+vankomicin PAE	0,360	0,623	-1,188	1,907
	kontrola	8,846	0,339	8,585	9,106
<i>A. guillouie</i> (OXA-58+NDM-1) 6h	kolistin PAE	4,666	0,972	2,252	7,079
	kolistin + meropenem PAE	1,196	0,102	0,944	1,449
	kolistin+vankomicin PAE	0,634	0,605	-0,868	2,136
	kontrola	8,971	0,433	8,638	9,304
<i>A. guillouie</i> (OXA-58+NDM-1) 7h	kolistin PAE	4,971	1,046	2,371	7,570
	kolistin + meropenem PAE	1,512	0,211	0,989	2,036
	kolistin+vankomicin PAE	0,778	0,679	-0,910	2,466
	kontrola	9,403	0,017	9,390	9,417
<i>A. guillouie</i> (OXA-58+NDM-1) 8h	kolistin PAE	5,321	1,226	2,276	8,366
	kolistin + meropenem PAE	1,895	0,028	1,826	1,964
	kolistin+vankomicin PAE	0,900	0,781	-1,040	2,839
	kontrola	9,672	0,288	9,451	9,893
<i>A. guillouie</i> (OXA-58+NDM-1) 24h	kolistin PAE	8,709	0,318	7,920	9,497
	kolistin + meropenem PAE	6,931	1,005	4,434	9,427
	kolistin+vankomicin PAE	2,588	2,408	-3,394	8,570
	kontrola	9,451	0,336	9,192	9,709

PAE-postantibiotic effect

Tablica 55. Usporedba dinamike postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *A. guillouie* 95991 pozitivan na OXA-58+NDM-1 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu: ANOVA za ponavljana mjerenja s međusobnim usporedbama između uzoraka

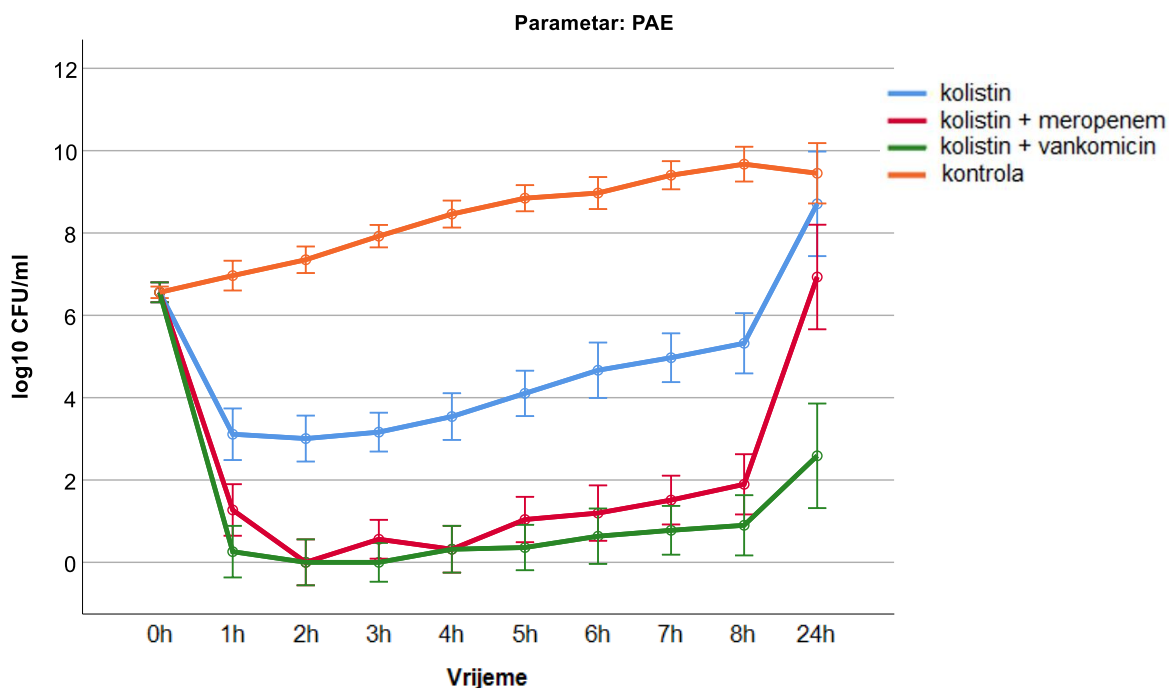
Uzorci SVI	Aritmetička sredina	Standardna greška	95% CI	
			Donji	Gornji
kolistin PAE	4,715	0,211	4,263	5,168
kolistin + meropenem PAE	2,128	0,211	1,676	2,581
kolistin+vankomicin PAE	1,240	0,211	0,787	1,692
kontrola	8,360	0,122	8,099	8,621

Parametar = PAE
PAE-postantibiotic effect

Međusobne usporedbe

Uzorci SVI	Razlika aritmetičkih sredina	Standardna greška	P vrijednost	95% CI		
				Donji	Gornji	
kolistin PAE	kolistin + meropenem PAE	2,587*	0,298	<0,001	1,671	3,502
	kolistin+vankomicin PAE	3,476*	0,298	<0,001	2,560	4,391
	kontrola	-3,645*	0,244	<0,001	-4,392	-2,897
kolistin + meropenem PAE	kolistin PAE	-2,587*	0,298	<0,001	-3,502	-1,671
	kolistin+vankomicin PAE	0,889	0,298	0,060	-0,027	1,804
	kontrola	-6,232*	0,244	<0,001	-6,979	-5,484
kolistin+vankomicin PAE	kolistin PAE	-3,476*	0,298	<0,001	-4,391	-2,560
	kolistin + meropenem PAE	-0,889	0,298	0,060	-1,804	0,027
	kontrola	-7,120*	0,244	<0,001	-7,868	-6,373
kontrola	kolistin PAE	3,645*	0,244	<0,001	2,897	4,392
	kolistin + meropenem PAE	6,232*	0,244	<0,001	5,484	6,979
	kolistin+vankomicin PAE	7,120*	0,244	<0,001	6,373	7,868

PAE-postantibiotic effect



Slika 44. Dinamika postantibiotskog učinka u bakterijskog soja *A. guillouie* 95991 pozitivan na OXA-58+NDM-1 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu

Usporedba dinamike PAE u bakterijskog soja *A. guillouie* 95991 pozitivan na OXA-58+NDM-1 tijekom promatranog vremena u odnosu na pojedine antibiotike te kontrolu prikazana je u tablici 55 i na slici 44. Uzorci tretirani antibioticima i njihovim kombinacijama su pokazivali značajno niže vrijednosti u odnosu na kontrolni uzorak ($P < 0,001$), dok između antibiotika postoje značajne niže vrijednosti u uzorku s kolistinom i vankomicinom ($P < 0,001$) te kolistinom i meropenemom ($P < 0,001$) u odnosu na kolistin sam kao i niže vrijednosti u uzorcima kolistina s vankomicinom ($P = 0,060$) u odnosu na kolistin u kombinaciji s meropenemom.

6. RASPRAVA

ENTEROBAKTERIJE

Dodatak meropenema uz kolistin je pokazao sinergistički učinak u šah metodi i metodi dvije jažice u svim testiranim sojevima. To je vjerojatno posljedica povećane propusnosti vanjske membrane uslijed djelovanja kolistina što dovodi do viših koncentracija meropenema u periplazmatskom prostoru i do pojačanog učinka usprkos visokim MIK vrijednostima. Sinergija u time-kill pokusima je utvrđena samo u sojevima *K. pneumoniae* 145846 i *K. pneumoniae* 609815 OXA-48- pozitivna i rezistentna na kolistin. Studija je pokazala određene diskrepance između metode dvije jažice i TK krivulja što se objašnjava činjenicom da metoda dvije jažice detektira bakteriostatsku aktivnost antibiotika dok krivulje baktericidnog učinka detektiraju baktericidnu aktivnost antibiotika. Nepodudarnost između šah metode i metode dvije jažice se može objasniti činjenicom da metoda dvije jažice detektira samo rast ili izostanak rasta soja dok šah metoda testira raspon od 12 razrijeđenja antibiotika. Nepodudarnosti su opisane i u prethodim istraživanjima (32). *K. pneumoniae* 609815 pozitivna na OXA-48 je pokazivala značajan i konzistentan sinergistički učinak kolistina s oba testirana antibiotika sa sve tri metode. Šah metoda je pokazivala sinergiju kolistina i meropenema u svim testiranim sojevima. Naše istraživanje ukazuje da meropenem pojačava aktivnost kolistina prema sojevima s pojedinačnim ili multiplim karbapenemazama. Istraživanja drugih autora su utvrdila sinergistički učinak kolistina s rifampicinom, doksiciklinom ili tigeciklinom prema KPC pozitivnim, karbapenem rezistentnim izolatima *K. pneumoniae* iz hemokultura (38, 310, 317). Nadalje, kombinacije koje uključuju kolistin i aztreonam i trostruke kombinacije kolistina s meropenemom, doripenemom i tigeciklinom su pokazale sinergiju prema VIM i NDM pozitivnim izolatima *K. pneumoniae* u prethodnim istraživanjima (11, 37, 318). Razlike u sinergističkom učinku antibiotika između pojedinih sojeva se mogu objasniti specifičnim biološkim razlikama između sojeva koji nisu vezani uz sadržaj gena rezistencije. Pokazalo da

se da kolistin i meropenem u kombinaciji u fiziološki postignutim koncentracijama pokazuju značajan PAE u polovici testiranih sojeva. Dodatak vankomicina nije imao utjecaj na trajanje PAE-a induciranog kolistinom. Zanimljivo je da je soj *E. cloacae* 209377 pozitivan na dvije metalo- β -laktamaze, OXA-48 i ESBL imao najduže trajanje PAE što upućuje na činjenicu da akvizicija velikog broja gena rezistencije ide na uštrb fitness-a i produžuje odgovor na izlaganje antibioticima. Najkraći PAE je opisan u kolistin rezistentnog soja *K. pneumoniae* pozitivnog na OXA-48 što se može objasniti neučinkovitošću kolistina zbog modifikacije lipopolisaharida vanjske membrane što je posljedica polimorfizma pojedinačnih nukleotida (SNIP) (rad u postupku objavljivanja). U drugim istraživanjima PAE induciran kombinacijama kolistina s rifampicinom ili tigeciklinom bio je značajno duži nego kolistina samog ili u kombinaciji s meropenemom ili vankomicinom. Trostruke kombinacije su izaivale duži PAE nego dvostruke u KPC pozitivnih organizama (310).

Istraživanje je pokazalo da je PAE bio ovisan o soju i antibiotiku, ali ne i o tipu karbapenemaze. Biološke razlike među sojevima istih ili različitih vrsta su mogle utjecati na vrlo velike razlike u trajanju PAE. Zanimljivo je da je soj 609815 rezistentan na kolistin pokazivao najizrazitiju sinergiju kolistina s ostalim antibioticima što je opisano i u ranijim studijama. To ukazuje da kolistinska rezistencije povećava sinergistički učinak kolistina s ostalim antibioticima, ali je mehanizam tog učinka nerazjašnjen. U većini prethodnih istraživanja testirani su sojevi pozitivni na KPC ili metalo- β -laktamaze i rezistentni na kolistin. U našem istraživanju testiran je soj koji je imao OXA-48 u kombinaciji s rezistencijom na kolistin (11, 37, 38, 310, 318).

Budući da su kliničke studije vezane uz pacijente inficirane multirezistentnim sojevima, teško provodljive i komplicirane, terapijske odluke često ovise o rezultatima *in vitro* istraživanja.

Prednost istraživanja je testiranje sinergije s tri različita testa, a nedostatak istraživanja je relativno mali broj izolata uključenih u istraživanje.

ACINETOBACTER BAUMANNII

A.baumannii je pokazivao značajan sinergistički učinak između kolistina i meropenema i vankomicina u šah metodi i metodi dvije jažice i izražen učinak meropenema i vankomicina na trajanje PAE-a induciranog kolistinom. *In vitro* sinergija je prethodno opisana u multirezistentnim Gram-negativnim bakterijama u „time-kill“ pokusima i šah metodi za kombinacije kolistina s vankomicinom, ciprofloksacinom, trimetoprimom i sulfametoksazolom. Vankomicin ne može proći kroz stanični zid Gram-negativnih bakterija, ali kolistin oštećuje vanjsku membranu i na taj način permeabilizira stanični zid tako da vankomicin prolazi kroz stijenkku i dolazi do svojih receptora na citoplazmatskoj membrani. Meropenem također djeluje na sintezu staničnog zida i koristi se u kombinaciji s antibioticima koji djeluju na sintezu proteina ili na funkciju citoplazmatske i vanjske membrane. Sinergija je bila izraženija u šah metodi u kombinaciji kolistina s meropenemom nego s vankomicinom što je vidljivo iz nižih FICI vrijednosti. U istraživanju koje su proveli Gordon i suradnici dobivene su FICI vrijednosti u rasponu od 0.37 do 0.56 uz 50% sojeva (tri od šest) koji su pokazivali sinergiju (286).

U istraživanju koje su proveli Percin i suradnici dobivene su FICI vrijednosti od 0.04 do 0.51 uz istu kombinaciju antibiotika (311).

U našem istraživanju su svi sojevi bili pozitivni u šah metodi osim soja OXA-58, OXA-58+VIM-1 i *ISAbal*/OXA-69, a FICI vrijednosti su se kretale u rasponu od 0.003 do 1.009. Wareham i suradnici izvještavaju o sličnim rezultatima šah metode s FICI vrijednostima u rasponu od 0.12 do 0.25 za kombinacije kolistina s teikoplaninom koji ima isti mehanizam djelovanja kao i vankomicin (312).

Većina istraživanja je utvrdila jaku *in vitro* sinergiju između kolistina i glikopeptida bez obzira na metodu testiranja (313).

Naše vrijednosti FICI-a za kombinaciju kolistina s meropenemom su bile značajno niže nego one o kojima izvještavaju Zusman i suradnici (0.8+/-0.43). U našem istraživanju su svi osim dva soja (OXA-58+VIM-1 i *ISAbal*/OXA-69) iskazivala sinergiju kolistina s meropenemom u šah metodi. Postojala diskrepanca između metode dvije jažice i šah metode u svih osima u ta dva soja.

U TK krivuljama dokazana je sinergija između kolistina i meropenema u samo pet sojeva (OXA-24, OXA-23+VIM, OXA-58+NDM, OXA-72 i *ISAbal*/OXA-69). Tri izolata nisu pokazivala sinergiju unatoč niskim FICI vrijednostima. Moguće objašnjenje je oslobađanje karbapenem hidrolizirajuće oksacilinaze (CHDL) iz periplazmatskog prostora u medij nakon oštećenja vanjske membrane pod djelovanjem kolistina i posljedična hidroliza meropenema. Iznenađujući, sojevi s metalo- β -laktamazama uz CHDL su bili osjetljiviji na baktericidni učinak kolistina u kombinaciji s meropenemom u odnosu na izolate koji su imali samo CHDL. Vankomicin ne podliježe hidrolizi karbapenemazama i samim tim može iskazivati sinergistički učinak bez obzira na tip karbapenemaze. Jak sinergistički učinak u TK krivuljama su također opisali i Gordon i sur., Percin i sur. i O' Hara i sur. koji su opisali da vankomicin u kombinaciji s kolistinom dovodi do brzom baktericidnog učinka bez naknadnog oporavka rasta, čak niti nakon 48 h. O'Hara i suradnici su opisali redukciju u broju kolonija od $>3 \log_{10}$ nakon 3 sata ili nakon 6 sati što je ovisilo o soju, prilikom izlaganja kombinaciji kolistina i vankomicina. Warenham i suradnici su opisali >8 puta \log_{10} razliku u broju kolonija nakon izlaganja kombinaciji kolistina i teikoplanina u usporedbi sa samim kolistinom i $>4 \log_{10}$ redukciju u broju kolonija u odnosu na startni inokulum u OXA-23 pozitivnih sojeva. Prema rezultatima Zusmana i suradnici dokazana je sinergija između polimiksina i karbapenema u *A. baumannii* od 71% u TK krivuljama, ali samo 32% u šah metodi (32, 286, 311, 314).

To je u koliziciji s našim rezultatima koji su pokazali izraženu sinergiju u šah metodi i metodi dviju jažica, ali varijabilnu sinergiju ovisnu o soju u TK pokusima. U TK pokusima kolistin

sam je pokazao brz baktericidni učinak, ali je došlo do oporavka rasta nakon 24 sata u svim sojevima, vjerojatno zbog razvoj heterorezistencije kao što je opisao Li i suradnici (319).

Da bi se dokazao mehanizam razvoj heterorezistencije bilo bi potrebno provesti populacijsku analizu. Heterorezistentni mutanti uzrokuju ponovni porast nakon 5 od 6 sati čak i uz koncentraciju kolistina od 64 x MIK.

Rezultati određivanja PAE-a su u skladu s prethodnim istraživanjima koja su dokazala produženi PAE kolistina u MDR izolata *A. baumannii*, ali su različiti od rezultata koje su dobili Owen i suradnici koji su našli negativni PAE induciran kolistinom (7, 315).

U našem istraživanju negativne vrijednosti PAE su dobivene samo s OXA-143 pozitivnim sojem. Trajanje PAE je ovisilo o soju i bilo je najduže u OXA-23 pozitivnog izolata. Kombinacije kolistina s ostalim antimikrobnim lijekovima su produžile trajanje PAE-a. Prethodne studije su pokazale da kombinacije antibiotika produžuju PAE u odnosu na svaki antibiotik sam. Ozbek je utvrdio da dodatak tigeciklina uz kolistin produžuje PAE (316).

Bazirano na rezultatima TK kinetike mogla bi se preporučiti terapijska primjena kolistina s vankomicinom s obzirom da uzrokuje brz baktericidni učinak bez ponovnog rasta nakon 24 sata. Za razliku od toga, na temelju metode dvije jažice mogle bi se preporučiti obje kombinacije i s vankomicinom i s meropenemom. Metoda TK krivulja istražuje baktericidni učinak kombinacija dok metoda dvije jažice mjeri bakteriostatsku aktivnost. Šah metoda je davala varijabilne rezultate ovisno o soju koje se nisu uvijek podudarale s izraženom sinergijom u TK tehnici i metodi dvije jažice.

7. ZAKLJUČCI

1. Sinergistički učinak i trajanje PAE su bili ovisni o soju i antibiotiku, ali ne i o tipu β -laktamaze i sadržaju gena rezistencije.
2. S kliničke točke gledišta, produženje PAE induciraog kolistinom bi moglo biti značajno za produženje intervala doziranja lijeka i optimizaciju liječenja infekcija uzrokovanih MDR bakterijama te minimizaciju nuspojava antibiotika.
3. Kombinirana terapija prevenira razvoj heterorezistencije u *A. baumannii* koja se događa kod monoterapije kolistinom.
4. Na temelju rezultata istraživanja bi se moglo zaključiti da bi kombinacije kolistina s meropenemom mogle biti učinkovite u liječenju infekcija uzrokovanih karbapenemaza pozitivnim izolatima enterobakterija.
5. U acinetobaktera su kombinacije s vankomicinom davale više stope pozitivnih rezultata u testovima sinergije.
6. Zanimljivo je da je izolat *K. pneumoniae* rezistentan na kolistin pokazivao izraženiju sinergiju s meropenemom i vankomicinom u odnosu na kolistin osjetljive sojeve što je opisano također i u drugim studijama, ali za taj fenomen ne postoji znanstveno obrazloženje.
7. S obzirom na sve češću pojavu ekstenzivno-rezistentnih i panrezistentnih bakterija te na nedostatak novih antibiotika kliničari se moraju oslanjati na kombinacije starih antibiotika.
8. S obzirom da su kliničke studije komplicirane i teško izvedive, liječnici se često moraju oslanjati na rezultate *in vitro* istraživanja.

8. LITERATURA

1. Bedenić B, Sardelić S, Ladavac M. Multirezistentne bakterije. *Acta Med Croatica*, 2015; 69:211-216.
2. Jacoby JA, Medeiros AA. More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agent Chemother* 1991;35(9):1697-1704.
3. Medeiros AA. Beta-lactamases. *Brit Med Bull* 1984;40(1):18-27.
4. Bush K. Classification of beta-lactamases. Groups 1, 2a, 2b and 2b'. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:264-270.
5. Bush K. Classification of beta-lactamases. Groups 2c, 2d, 2e, 3 and 4. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:271-276.
6. Evans MF, Feola DJ, Rapp RP. Polymixin sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant Gram-negative pathogens. *Ann Pharmacother* 1999;33:960-7.
7. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymixins for the management of multi-drug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 2005;40:1333-41.
8. Bogdanovich T, Adams-Haduch JM, Tian GB, Nguyen MH, Kwak EJ, Muto CA. Colistin resistant *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to the international epidemic clone ST258. *Clin Infect Dis* 2011;53:373-376.
9. Cannateli A, d'Andrea MM, Giani T, Pilato V, Arena F, Ambretti S, et al. *In vivo* emergence of colistin-resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemase mediated by insertional inactivation of the *phoQ/phoP mgrB* regulator. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:5521-6.
10. Mammina C, Bonura C, Bernardo F, Aleo A, Fasciana T, Sodano C, et al. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different ward of an acute general hospital. *Eurosurveillance* 2012;17(33):pii:20248.
11. Tangden T, Hickman A, Forsberg P, Lagerback C, Giske G, Cars O. Evaluation of double and triple antibiotic combinations for VIM and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* by *in vitro* time-kill experiments. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(3):1757-62.

12. Segal H, Elisha BG. Resistance to β -lactams, and reduced susceptibility to carbapenems, in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* due to interplay between CTX-M 15 and altered outer membrane permeability. *S Afr J Epidemiol Infect* 2006; 21:41-4.
13. Elliot E, Brink AJ, Van Greune J i sur. In vivo development of ertapenem resistance in a patient with pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* with an extended-spectrum β -lactamase. *Clin Infect Dis* 2006;42:95-8.
14. Yigit H, Quennan AM, Anderson GJ i sur. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1151-1161.
15. Naas T, Vandael W, Sougakof W, Livermore DM, Nordmann P. Cloning and sequence analysis of the gene for carbapenem hydrolyzing class A β -lactamase, Sme-1 from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1262-1270.
16. Nordmann P, Mariotte S, Naas T, Labia R, Nicolas MH. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase of *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:939-46.
17. Prottumarthy S, Moland ES, Jeretschko S, Swanzy R, Thomson KS, Fritsche TR. NMC-A carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerg Infect Dis* 2003;9:999-1002.
18. Yan JJ, Ko WCK, Chuang C, Wu JJ. Metallo β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a university hospital in Taiwan: prevalence of IMP-8 *Enterobacter cloacae* and first identification of VIM-2 in *Citrobacter freundii*. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:503-11.
19. Galani I, Souli M, Chryssouli Z, Orlandou K, Giamarellou H. Characterization of a new integron containing *bla_{VIM-1}* and *aac(6')*-IIc in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from Greece. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:634-38.
20. Yong D, Toleman MA, Giske CG i sur. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla_{NDM-1}*, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:5046-54.
21. Gulmez D, Woodford N, Palepou MF i sur. Carbapenem resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48 like carbapenemase and outer membrane protein loss. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31:523-6.
22. Smilja Kalenić i suradnici. *Medicinska mikrobiologija, Medicinska naklada, Zagreb* 2013.

23. Canton R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. And the European Network on carbapenemases. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:413-31.
24. Bergogne-Berenzin E, Towner KJ. *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogen: microbiological, clinical and epidemiologic features. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:148-65.
25. Brown S, Amyes S. OXA β -lactamase in *Acinetobacter*: the story so far. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:1-3.
26. Rasmussen JW, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2006;57: 373-83.
27. Turton JF, Ward ME, Woodford N i sur. The role of *ISAbal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 2006;258:72-7.
28. Stoeva T, Higgins P, Bojkova K, Seifert H. Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-23-positive *Acinetobacter baumannii* in a Bulgarian university hospital. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:723-6.
29. Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1556-61.
30. Pournas S, Markogiannakis A, Ikonomidis A i sur. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:557-61.
31. Higgins P, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:5035-8.
32. Zusman O, Avni T, Leibovici L, Adler A, Friberg L, Stergiopolous T, et al. Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems. *Antimicrob Agent Chemother* 2013;57(10):5104-5111.
33. Bedenić B. Extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Liječnički Vjesnik* 1996;118 (10):244-248.
34. Bedenić B, Mazzariol A, Plečko V, Bošnjak Z, Barl P, Vraneš J, et al. First report of KPC- producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatia. *J Chemother* 2012;24(4):237-9.

35. Bedenić B, Sardelić S, Luxner J, Bošnjak Z, Varda-Brkić D, Lukić-Grlić A, et al. Molecular characterization of class B carbapenemases in advanced stage of dissemination and emergence of class D carbapenemases in *Enterobacteriaceae* from Croatia. *Infect Genetic Evol* 2016;43:74-82.
36. Bedenić B, Vranić-Ladavac M, Venditti C, Tambić-Andrašević A, Barišić N, Gužvinec M, Karčić N, Petrosillo N, Ladavac R, di Caro A. Emergence of colistin resistance in *Enterobacter aerogenes* from Croatia. *J Chemother*. 2018;30(2):120-123.
37. Bercot B, Poirel L, Dortet L, Nordmann P. *In vitro* evaluation of antibiotic synergy for NDM-1 producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:2295-7.
38. Elemam A, Rahimian J, Doymaz M. *In vitro* evaluation of antibiotic synergy for polymixin-B-resistant carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2010;48:3558-62.
39. Souli M, Galani I, Boukovalas S, Gourgoulis MG, Chryssouly Z, Kanelakopoulou K, et al. *In vitro* interactions of antimicrobial combinations with fosfomycin against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and protection of resistance development. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:2395-97.
40. Bundtzen RW, Gerber AU, Cohn DL, Craig WA. Postantibiotic suppression of bacterial growth. *Rev Infect Dis* 1981;3:28-37.413-31.
41. Vidailac et al. *In vitro* synergy of colistin combinations against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrob agents chemother* 2012;56(9):4856–4861.
42. Hanberger H, Svensson E, Nilsson LE et al. Pharmacodynamic effects of meropenem on gram-negative bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:383–90.
43. Hanberger H, Nilsson LE, Kihlström E. Postantibiotic effect of betalactam antibiotics on *Escherichia coli* evaluated by bioluminescence assay of bacterial ATP. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:102-106.
44. Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, Di Pilato V, Arena F, Conte V, et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(10):5696-5703.
45. Sanders WE, Sanders CC. *Enterobacter spp.* Pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev* 1997;10(2):220–41.
46. Liu YC, Chen TL, Chen HS i sur. Clinical characteristics and risk factors for attributable mortality in *Enterobacter cloacae* bacteraemia. *J Microbiol Immunol Infect* 2006;39:67–72.

47. Livermore D, Woodford N. The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Trends in Microbiology 2006;14:413-420.
48. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol 2007;5:939-951.
49. Visca P, Seifert H, Towner KJ. *Acinetobacter* infection--an emerging threat to human health. IUBMB Life 2011;63:1048-1054.
50. Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative gramnegative rods. 2003.
51. Murray P.R, Baron E.J, Jorgensen J.H, Pfaller M.A, Tenover F.C, Tenover B.C. Manual of Clinical Microbiology 8. izd. Washington, D.C.:ASM;2003;749-79.
52. Richet H, Fournier PE. Nosocomial infections caused by *Acinetobacter baumannii*: a major threat worldwide. Infect Control Hosp Epidemiol 2006;27:645-6.
53. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 2010;65:233-238.
54. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin Microb Infect 2006;12:826-36.
55. Vila J, Marti S, Sanchez-Cespedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2007;59:1210-5.
56. Towner KJ. Global epidemiology of *Acinetobacter*. Clin Microbiol Infect 2007;13 (Suppl 1): S47S242.
57. Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* recovered from blood cultures in Australia. Infect Control Hosp Epidemiol 2006;27:759-61.
58. Rello J. *Acinetobacter baumannii* infections in the ICU. Chest 1999;115:1226-9.
59. Wisplinghoff H, Perbix W, Seifert H. Risk factors for nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*: a case-control study of adult burn patients. Clin Infect Dis 1999;28:59-66.
60. Blot S, Vandewoude K, Colardyn F. Nosocomial bacteremia involving *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients: a matched cohort study. Intensive Care Med. 2003;29:471-475.
61. Gaynes R, J. R. Edwards. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clin Infect Dis 2005;41:848-854.

62. Al-Khoja MS, Darell JH. The skin as the source of *Acinetobacter* and *Moraxella* species occurring in blood cultures. *J Clin Pathol* 1979;32:497-9.
63. 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;35:2819–2825.
64. Canduela MJ, Gallego L, Sevillano E, Valderrey C, Calvo F, Perez J. Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from elderly patients with respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:1220-2.
65. Playford EG, Craig JC, Iredell JR. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit patients: risk factors for acquisition, infection and their consequences. *J Hosp Infect* 2007;65:204-11.
66. Loh LC, Yii CT, Lai KK, Seevaunnamtum SP, Pushparasah G, Tong JM. *Acinetobacter baumannii* respiratory isolates in ventilated patients are associated with prolonged hospital stay. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:597-8.
67. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent S. M, Seifert H, Wenzel R. P., Edmond M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004;39:309–317.
68. Gouby A, Carles-Nurit MJ, Bouziges N, Bourg G, Mesnard R, Bouvet PJ. Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of hospital outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microb* 1992;30:1588-1591.
69. Kallman O, Lundberg C, Wretling B, Ortqvist A. Gramnegative bacteria from patients seeking medical advice in Stockholm after the tsunami catastrophe. *Scand J Infect Dis* 2006;38:448–450.
70. Dobrewski R et al. Genotypic diversity and antibiotic susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolates in a Bulgarian hospital. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:1135-7.
71. Wroblewska M M, Towner K J, Marchel H, Luczak M. Emergence and spread of carbapenem-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in a tertiary-care hospital in Poland. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:490–496.
72. Rungruanghiranya S, Somboonwit C, Kanchanapoom T. *Acinetobacter* Infection in the Intensive Care Unit. *J Infect Dis Antimicrob Agents* 2005;22:77-92.
73. Marti S, Sanchez-Céspedes J, Oliveira E, Belido D, Giralt E, Vila J. Proteomic analysis of a fraction enriched in cell envelope proteins of *Acinetobacter baumannii*. *Proteomics* 2006;6:82-7.

74. R B Clark. Imipenem resistance among *Acinetobacter baumannii*: association with reduced expression of a 33-36 kDa outer membrane protein. *J Antimicrob Chemother* 1996;38:245-251.
75. Bou G, Cervero G, Dominquez MA, Quereda C, Martinez-Beltran J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of β -lactamases. *J Clin Microbiol* 2000;38:3299-305.
76. Limansky A S, Mussi M A, Viale A M. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *J Clin Microbiol* 2002;40:4776-4778.
77. Bedenić B. Uzunović-Kamberović, Selma (ur.). Antibakterijski lijekovi. Medicinska mikrobiologija. Zenica: Štamparija Fojnica d.o.o, 2009.
78. https://www.wiley.com/college/pratt/0471393878/student/activities/bacterial_drug_resistance/index.html
79. <https://www.creative-biolabs.com/drug-discovery/therapeutics/bacterial-cell-wall-targets-identification.htm>
80. J S Bradley et al. Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. *Int J Antimicrob Agents* 1999;11:93–100.
81. Paterson D L. Recommendation for treatment of severe infections caused by *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol Infect* 2000;6:460–463.
82. Paterson D L. Serious infections caused by enteric gram-negative bacilli—mechanisms of antibiotic resistance and implications for therapy of gram-negative sepsis in the transplanted patient. *Semin Respir Infect* 2002;17:260–264.
83. Paterson D L, Bonomo R A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:657–686.
84. Torres J A, Villegas M V, Quinn J P. Current concepts in antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007;5:833–843.
85. Edwards JR. Meropenem: a microbiological overview. *J Antimicrob Chemother* 1995;36:1-17.
86. Balfour JA, Bryson HM, Brogden RN. Imipenem/cilastatin: an update of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy in the treatment of serious infections. *Drugs* 1996;51:99-136.

87. Canton R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen Q, Seifert H, Woodford N, Nordmann P. European Network on carbapenemases. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:413-431.
88. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:440-458.
89. Chouchani C, Marrakchi R, El Salabi A. Evolution of β -lactams resistance in Gram-negative bacteria in Tunisia. *Crit Rev Microbiol* 2011;37:167–177.
90. Gaibani P et al. Rapid increase of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a large Italian hospital: surveillance period 1 March - 30 September 2010. *Euro Surveill* 2011;16(8).
91. Gopalakrishnan R, Sureshkumar D. Changing trends in antimicrobial susceptibility and hospital acquired infections over an 8 year period in a tertiary care hospital in relation to introduction of an infection control programme. *J Assoc Physicians India* 2010;58(Suppl.):25–31.
92. Livermore D M et al. What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:415–419.
93. Nicasio A M, Kuti J L, Nicolau D P. The current state of multidrug-resistant gram-negative bacilli in North America. *Pharmacotherapy* 2008;28:235–249.
94. Nordmann P et al. Comparative activity of carbapenem testing: the COMPACT study. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1070–1078.
95. Patel G, Bonomo R A. Status report on carbapenemases: challenges and prospects. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011;9:555–570.
96. Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin Infect Dis* 2011;52:1138–1143.
97. <https://www.youtube.com/watch?v=oBmVHRuhm3A>
98. Xiaofen Liu, Miao Zhao, Yuancheng Chen, Xingchen Bian, Yunfei Li, Jun Shi, Jing Zhang. Synergistic killing by meropenem and colistin combination of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Chinese patients in an *in vitro* pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2016;48:5:559-563.

99. Jiang Z, He X, Li J. Synergy effect of meropenem-based combinations against *Acinetobacter baumannii*: a systematic review and meta-analysis. *Infection and Drug Resistance* 2018;11:1083—1095.
100. Kahne D, Leimkuhler C, Lu W, Walsh C. Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chem Rev* 2005;105:425-48.
101. <https://en.wikipedia.org/wiki/Vancomycin>
102. Rossolini GM, Arena F, Pollini S. Novel infectious diseases and emerging gram-positive multiresistant pathogens in hospital and community acquired infections. In *Antimicrobials*; Marinelli F, Genilloud O, editors. 1st ed. Berlin Heidelberg:Springer Verlag, 2014.
103. James RC, Pierce JG, Okano A, Xie J, Boger DL. Redesign of glycopeptide antibiotics: back to the future. *ACS Chem Biol* 2012;7:797-804.
104. Butler MS, Hansford KA, Blaskovich MA, Halai R, Cooper MA. Glycopeptide antibiotics: back to the future. *J Antibiot (Tokyo)* 2014;67:631-44.
105. Biswas S, Brunel JM, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Rolain JM. Colistin: An Update on the Antibiotic of the 21st Century. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012;10(8):917-934.
106. Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multiresistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrobial Agents*. 2005;25:11-25.
107. Karvanen M. Optimization of colistin dosage in the treatment of multiresistant Gram-negative infections (dissertation). Uppsala:Uppsala Universiteit 2013.
108. Li J, Nation RL, Turnidge JD, et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug resistant Gram-negative bacterial infection. *Lancet* 2006;9(6):589- 601.
109. Yahaf D, Farbman L, Leibovici L, Paul M. Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clin Microbial Infect* 2002;8:8-29.
110. Falagas EM, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug resistant Gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 2005;40(5):1333-41.
111. Warunee S. Polymixin re-visited: carbapenem resistant Gram-negative bacteria. Texas: The University of Texas 2010, p. 2-16.
112. Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 1985;49:1-32.

113. He H, Li J-C, Nation RL, Jacob J, Chen G, Lee HJ, et al. Pharmacokinetics of four different brands of colistimethate and formed colistin in rats. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:2311.
114. Mohamed AF, Karaiskos I, Plachouras D, Karvanen M, Pontikis K, Jansson B, et al. Application of a loading dose of colistin methanesulfonate in critically ill patients: population pharmacokinetics, protein binding, and prediction of bacterial kill. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:4241-9.
115. Omrani AS, Alfahad WA, Shoukri MM, Baadani AM, Aldalbahi S, Almitwazi AA, et al. High dose intravenous colistin methanesulfonate therapy is associated with high rates of nephrotoxicity; a prospective cohort study from Saudi Arabia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2015;14:3.
116. Moffatt HJ, Harper M, Harrison P, Hale JD, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(12):471-7.
117. Beceiro A, Liobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, et al. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the *pmrAB* two component regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(7):3370-9.
118. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev* 2017;30:557-596.
119. Giani T, Pini B, Arena F, Conte V, Bracco S, Migliavacca R. Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011. *Eurosurveillance* 2013, Volume 18, Issue 22.
120. Mansour W., Haenni M, Saras E, Grami R, Mani Y, Ben Haj Khalifa A, El Atrouss S, Kheder M, Fekih Hassen M, Boujâafar N, Bouallegue O, Madec JY. *J Glob Antimicrob Resist.* 2017 ;10:88-94.
121. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaiou DK. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist Updat* 2010;13:132-8.
122. Patel JB, Cockerill FR, Alder J, et al. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty fourth informational supplement. *Clin Lab Stand Inst* 2014;34 (Suppl 24):61-9.

123. Michalopoulos AS, Falagas ME. Colistin and Polymyxin B in critical care. *Crit Clin* 2008;24:377-91.
124. Sourli L, Luque S, Grau S, et al. Trough colistin plasma level is an independent risk factor for nephrotoxicity; a prospective observational cohort study. *BMC Infect Dis* 2013;13:1-9.
125. Konar J, Das S. Emergence of in-vitro colistin and/ or tigecycline resistance among carbapenemase producing Gram-negative bacteria in nosocomial set up. *Int J Pharm Science Inv* 2013;2:10-2.
126. Lee, GC, Burgess DS. Treatment of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. *BMC Ann Clinmicrob and Antimicrob* 2012;11:1-9.
127. Bilandžić N, Varenina I, Solomun K, Božica B, Luburić Đ, Varga I, Terzić S. Kolistin, polipeptidni antibiotik zadnje obrane protiv invazivnih Gram-negativnih bakterija. *Veterinarska stanica* 2018;4:273-286.
128. Fisher JF, Knowles JR. Bacterial resistance to β -lactams: the β -lactamases. *Ann Rep Med Chem* 1978;13:239–248
129. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:557-84.
130. Bedenić B. β -laktamaze u laboratoriju i njihova uloga u rezistenciji. *Liječ Vjesn* 2004;126:314-24.
131. Medeiros AA. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generation of β -lactams antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997;24:S19-45.
132. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211–1233.
133. Bush K. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 2001;32:1085-9.
134. Sykes BR, Matthew M. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1976;2:115-57.
135. Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond* 1980;289:321-31.
136. Bush K, Jacoby G. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:969-76.
137. https://www.researchgate.net/figure/beta-lactamases-classification-according-to-Bush-Jacoby-Medeiros_tbl2_276416564

138. Ambler PR, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, et al. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochem J* 1991;276:269-70.
139. Jacoby GA. β -Lactamase nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1123-1129.
140. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. *Res Microbiol* 2004;155:409-21.
141. Gniadkowski M. Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:11-32.
142. Barry G. Hall, Miriam Barlow. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005;55:(6):1050–1051.
143. https://www.researchgate.net/figure/b-Lactamases-Ambler-Classification_tbl1_267735062
144. Canton, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(5):413-31.
145. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1791-8.
146. Poirel L, Thomas IL, Naas T et al. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron in 52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:622-32.
147. Aubron C, Poirel L, Ash RJ, et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U. S. Rivers. *Emerg Infect Dis* 2005;11:260-4.
148. Phillipon A, Labia R, Jacoby GA. Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agent Chemoter* 1989;33:1131-1136.
149. Rahal J. Extended spectrum β -lactamases: how big is the problem? *Clin Microbiol Infect* 2000; 6(Suppl 2):2-6.
150. Bradford PA. Extended-Spectrum β -lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:933-51.
151. Sturenberg E, Mack D. Extended spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect* 2003;47:273-95.
152. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbio Rev* 2005;18:657-86.

153. Dutour C, Bonnet R, Marchandin H, Boyer M, Chanal C, Sirot D and Sirot J. CTX-M-1, CTX-M-3 and CTX-M-14 β -lactamases from *Enterobacteriaceae* Isolated in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:534-7.
154. Sabate M, Navarro F, Miro E, Canpony S, Mirelis B, Barbe J, Prats G. Novel complex sul-type integron in *Escherichia coli* carrying *bla* (CTX-M-9). *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2656-61.
155. Bedenić B, Žagar Ž. Extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Zagreb, Croatia. *Journal of Chemotherapy* 1998;10(6):449-459.
156. Bedenić B, Randegger C, Stobberingh E, Haechler H. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains, isolated in Zagreb, Croatia. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2001.
157. Bedenić B, Schmidt H, Herold S, Monaco M, Plečko V, Kalenić S, Katić S. Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 β -lactamase in Dubrava University Hospital, Zagreb. *Journal of Chemotherapy* 2005;17(4):367-375.
158. Tonkić M, Bedenić B, Goić-Barišić I, Katić S, Kalenić S, Kaufmann ME, Woodford N, Punda-Polić V. First report of CTX-M producing isolates from Croatia. *J Chemother* 2007;19(1):97-100.
159. Literacka E, Bedenic B, Baraniak A, Fiett J, Tonkic M, Jajic-Bencic I, Gniadkowski M. *bla*_{CTX-M} genes in *Escherichia coli* from Croatian hospitals are located in new (*bla*_{CTX-M-3}) and widely spread (*bla*_{CTX-M-3a}, *bla*_{CTX-M-15}) genetic structures. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(4):1630-1635.
160. Vranić-Ladavac M, Bošnjak Z, Bader N, Barišić N, Kalenić S, Bedenić B. Clonal spread of CTX-M producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatian hospital. *J Med Microbiol* 2010;(59):1069-1078.
161. Peirano G, Pitout JDD. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M β -Lactamases: worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:316-21.
162. Bonnet R. Growing of extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1-14.
163. Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat* 2006;9:142-56.

164. Timofte D, Maciucă JE, Evans NJ, Williams H, Wattret A, Fick JC, Williams NJ. Detection and Molecular Characterization of *Escherichia coli* CTX-M-15 and *Klebsiella pneumoniae* SHV-12 β -Lactamases from Bovine Mastitis Isolates in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:789-94.
165. Queenan A M, Bush K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:440–458.
166. Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:470–482.
167. Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, et al. Characterization of IMI-1 β -lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2080–2086.
168. Naas T, Nordmann P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7693–7697.
169. Yang YJ, Wu PJ, Livermore DM. Biochemical characterization of a β -lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:755–758.
170. Deshpande LM, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of *Enterobacteriaceae* isolated in the United States Medical Centers: Report from the MYSTIC Program (1999-2005). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;56:367–372.
171. Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS, et al. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:3035–3039.
172. Queenan AM, Shang W, Schreckenberger P, Lolans K, Bush K, Quinn J. SME-3, a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3485–3487.
173. Poirel L, Wenger A, Bille J, Bernabeu S, Naas T, Nordmann P. SME-2-producing *Serratia marcescens* isolate from Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:2282–2283.
174. Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2009;47:1631–1639.

175. Bush K, Pannell M, Lock JL, et al. Detection systems for carbapenemase gene identification should include the SME serine carbapenemase. *Int J Antimicrob Agents* 2013;41:1–4.
176. Marciano DC, Karkouti OY, Palzkill T. A fitness cost associated with the antibiotic resistance enzyme SME-1 β -lactamase. *Genetics* 2007;176:2381–2392.
177. Pottumarthy S, Moland ES, Juretschko S, Swanzy SR, Thomson KS, Fritsche TR. NmcA carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerg Infect Dis* 2003;9:999–1002.
178. Radice M, Power P, Gutkind G, et al. First class A carbapenemase isolated from *Enterobacteriaceae* in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1068–1069.
179. Boo TW, O'Connell N, Power L, et al. First report of IMI-1-producing colistin-resistant *Enterobacter* clinical isolate in Ireland, March 2013. *Euro Surveill* 2013;18(31):20548.
180. Österblad M, Kirveskari J, Hakanen AJ, Tissari P, Vaara M, Jalava J. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Finland: The first years (2008–11). *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2860–2864.
181. Naas T, Cattoen C, Bernusset S, Cuzon G, Nordmann P. First identification of *bla*_{IMI-1} in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:1664–1665.
182. Teo JW, La MV, Krishnan P, Ang B, Jureen R, Lin RT. *Enterobacter cloacae* producing an uncommon class A carbapenemase, IMI-1, from Singapore. *J Med Microbiol* 2013;62:1086–1088.
183. Bejuk D, Novkoski M, Juranko V, et al. A report of rarely observed resistance pattern to carbapenems in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Lijec Vjesn* 2013;135:316–321.
184. Henriques I, Moura A, Alves A, Saavedra MJ, Correia A. Molecular characterization of a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, SFC-1, from *Serratia fonticola* UTAD54. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2321–2324.
185. Fonseca F, Chudyk EI, van der Kamp MW, Correia A, Mulholland AJ, Spencer J. The basis for carbapenem hydrolysis by class A β -lactamases: A combined investigation using crystallography and simulations. *J Am Chem Soc* 2012;134:18275–18285.
186. Poirel L, Heritier C, Podglajen I, Sougakoff W, Gutmann L, Nordmann P. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV β -lactamase that

- compromises the efficacy of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:755–758.
187. Tollentino FM, Polotto M, Nogueira ML, et al. High prevalence of *bla*_{CTX-M} extended spectrum β -lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: First report of *bla*_{SHV-12}, *bla*_{SHV-31}, *bla*_{SHV-38}, and *bla*_{CTX-M-15} in Brazil. *Microb Drug Resist* 2011;17:7–16.
 188. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Novel Ambler class A carbapenem-hydrolyzing β -lactamase from a *Pseudomonas fluorescens* isolate from the Seine River, Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:328–332.
 189. Toth M, Vakulenko V, Antunes NT, Frase H, Vakulenko SB. Class A carbapenemase FPH-1 from *Francisella philomiragia*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2852–2857.
 190. Cheung TK, Ho PL, Woo PC, Yuen KY, Chau PY. Cloning and expression of class A β -lactamase gene *bla*_{A(BPS)} in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1132–1135.
 191. Papp-Wallace K.M., Taracila M.A., Gatta J.A., Ohuchi N., Bonomo R.A., Nukaga M. Insights into β -lactamases from *Burkholderia* species, two phylogenetically related yet distinct resistance determinants. *J. Biol. Chem.* 2013;288:19090–19102.
 192. Yu YS, Du XX, Zhou ZH, Chen YG, Li LJ. First isolation of *bla*_{IMI-2} in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1610–1611.
 193. Bernusset S, Naas T, Tandé D, et al. Characterisation of carbapenemase IMI-2 in *Enterobacter* spp. clinical isolates from France.; 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 31 March - 3 April 2012; London, United Kingdom. p. 1238.
 194. Dortet L, Poirel L, Abbas S, Oueslati S, Nordmann P. Genetic and Biochemical Characterization of FRI-1, a Carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:7420–7425.
 195. Bratu S, Landman D, Haag R, et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: A new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med* 2005;165:1430–1435.
 196. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009;9:228–236.

197. Naas T, Bonnin RA, Cuzon G, Villegas MV, Nordmann P. Complete sequence of two KPC-harboring plasmids from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:1757–1762.
198. Cuzon G, Naas T, Villegas MV, Correa A, Quinn JP, Nordmann P. Wide dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing β -lactamase *bla*_{KPC-2} gene in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:5350–5353.
199. Robledo IE, Aquino EE, Vazquez GJ. Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:2968–2970.
200. Davies TA, Marie Queenan A, Morrow BJ, et al. Longitudinal survey of carbapenem resistance and resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae* and non-fermenters from the USA in 2007–09. *J. Antimicrob Chemother* 2011;66:2298–2307.
201. Poirel L, Barbosa-Vasconcelos A, Simoes RR, Da Costa PM, Liu W, Nordmann P. Environmental KPC-producing *Escherichia coli* isolates in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother* 2012;56:1662–1663.
202. Oliveira S, Moura RA, Silva KC, et al. Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:849–852.
203. Zhang X, Lu X, Zong Z. *Enterobacteriaceae* producing the KPC-2 carbapenemase from hospital sewage. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;73:204–206.
204. Picao RC, Cardoso JP, Campana EH, et al. The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: Focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas spp.* and *Enterobacteriaceae* in sewage. *Diagn Microbiol Infect* 2013;76:80–85.
205. Galler H, Feierl G, Petternel C, et al. KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harboring *Enterobacteriaceae* detected in an Austrian wastewater treatment plant. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:O132–O134
206. Lee SH, Jeong SH. Nomenclature of GES-type extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2148–50.
207. Bebrone C, Bogaerts P, Delbruck H, Bennink S, Kupper M, Rezende de Castro R, Glupczynski Y, Hoffman KM. GES-18, a New Carbapenem –Hydrolyzing GES-Type β -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* That Contains Ile80 and Ser170 Residues. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:396–401.

208. Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum β -lactamases. Clin Microbiol Infect 2008;14(Suppl. 1):42–52.
209. Bogaerts P, Naas T, El Garch F, et al. GES extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:4872–4878.
210. Walsh TR. Emerging carbapenemases: A global perspective. Int J Antimicrob Agents 2010;36(Suppl. 3):S8–S14.
211. Jeong SH, Bae IK, Kim D, et al. First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing GES-5 and SHV-12 extended-spectrum β -lactamases in Korea. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:4809–4810.
212. Poirel L, Weldhagen GF, De Champs C, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum β -lactamase GES-2 in South Africa. J Antimicrob Chemother 2002;49:561–565.
213. de Vries JJ, Baas WH, van der Ploeg K, Heesink A, Degener JE, Arends JP. Outbreak of *Serratia marcescens* colonization and infection traced to a healthcare worker with long-term carriage on the hands. Infect Control Hosp Epidemiol 2006;27:1153–1158.
214. Duarte A, Boavida F, Grosso F, et al. Outbreak of GES-1 β -lactamase-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a university hospital in Lisbon, Portugal. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:1481–1482.
215. Picao RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P. Diversity of β -lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:3908–3913.
216. Bonnin RA, Nordmann P, Poirel L. Screening and deciphering antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*: A state of the art. Expert Rev Anti Infect Ther 2013;11:571–583.
217. Bonnin RA, Nordmann P, Potron A, Lecuyer H, Zahar JR, Poirel L. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother 2011;55:349–354.
218. Moubareck C, Bremont S, Conroy MC, Courvalin P, Lambert T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:3579–3581.
219. Zowawi HM, Balkhy HH, Walsh TR, Paterson DL. β -Lactamase production in key gram-negative pathogen isolates from the Arabian Peninsula. Clin Microbiol Rev 2013;26:361–380.

220. Gallant CV, Daniels C, Leung JM i sur. Common β -lactamases inhibit bacterial biofilm formation. *Mol Microbiol* 2005;58:1012-24.
221. Bebrone C. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol* 2007;74:1686–1701.
222. Karsisiotis AI, Damblon CF, Roberts GCK. A variety of roles for versatile zinc in metallo- β -lactamases. *Metallomics* 2014;6:1181–1197.
223. Thomson KS. Extended-Spectrum- β -Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. *J Clin Microbiol* 2010;48:1019-25.
224. Bush K, Jacoby G. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:969-76.
225. Jacoby GA. AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009;22:161-82.
226. Bush K, Macalintal C, Rasmussen BA, Lee VJ, and Yang Y. Kinetic interactions of tazobactam with β -lactamases from all major structural classes. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:851-858.
227. Kazmierczak A, Cordin X, Duez JM, Siebor E, Pechinot A, Sirot J. Differences between clavulanic acid and sulbactam in induction and inhibition of cephalosporinases in enterobacteria. *J Int Med Res* 1990;18(Suppl. 4):67D-77D.
228. Monnaie D, Frere JM. Interaction of clavulanate with class C β -lactamases. *FEBS Lett* 1993;334:269-271.
229. Corvec S, Caroff N, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Reynaud A. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:629-635.
230. H eritier C, Poirel L, Nordmann P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of *ISAbal* in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:123-130.
231. Segal H, Nelson EC, Elisha BG. Genetic environment and transcription of *ampC* in an *Acinetobacter baumannii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:612-614.
232. Philippon A, Arlet G, Jacoby G. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1-11.
233. Sanschagr in F, Couture F, Levesque RC. Primary structure of OXA-3 and phylogeny of oxacillin-hydrolyzing class D β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:887–893.

234. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:24–38.
235. Lamotte-Brasseur J, Knox J, Kelly JA, Charlier P, Fonzé E, Dideberg O, Frère JM. The structures and catalytic mechanisms of active-site serine β -lactamases. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1994;12:189-230.
236. Naas T, Nordman P. OXA-type beta-lactamase isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:785-90.
237. Danel F, Hall LM, Gur D, Livermore DM. OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:785-90.
238. Mugnier P, Casin L, Bouthors AT, Collatz E. Novel OXA-10-derived extended-spectrum beta-lactamases selected in vitro or in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:3113-6.
239. Antunes NT, Lamoureaux TL, Toth M, Stewart NK, Frase H, Vakulenko SB. Class D β -Lactamases: Are They All Carbapenemases? *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:2119-25.
240. Goić-Barišić I, Towner KJ, Kovačić A i sur. Outbreak in Croatia caused by a new carbapenem-resistant clone of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-72 carbapenemase. *J Hospit Infect* 2011;77:368-9.
241. Franolić-Kukina I, Bedenić B, Budimir A, Herljević Z, Vraneš J, Higgins P. Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-72 positive *Acinetobacter baumannii* in a Croatian University Hospital. *Int J Infect Dis* 2011;15:e706-e709.
242. Vranić-Ladavac M, Bedenić B, Minandri F, Ištók M, Frančula-Zaninović S, Ladavac R, Visca P. Carbapenem-resistance and acquired class D carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* from Croatia 2009-2010. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33(3):471-8.
243. Ladavac R, Bedenić B, Vranić-Ladavac M, Barišić N, Karčić N, Pompe K, Ferenčić A, Stojanović A, Seifert H, Katić S, Higgins PG. Emergence of different *Acinetobacter baumannii* clones in a Croatian hospital and correlation with antibiotic susceptibility. *J Glob Antimicrob Resist* 2017;10:213-218.
244. Bush K, Fisher JF. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2011;65:455–478.
245. Naas T, Nordmann P. OXA-type β -lactamases. *Curr Pharm Des* 1999;5:865-879.

246. Joris B, Ledent P, Dideberg O, Fonzé E, Lamotte-Brasseur J, Kelly JA, Ghuysen JM, Frère JM. Comparison of the sequences of class A β -lactamases and of the secondary structure elements of penicillin-recognizing proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:2294-2301
247. Mossakowska D, Ali NA, Dale JW. Oxacillin-hydrolysing β -lactamases. A comparative analysis at nucleotide and amino acid sequence levels. *Eur J Biochem* 1989;180:309-318.
248. Fisher JF, Meroueh SO, Mobashery S. Bacterial resistance to β -lactam antibiotics: Compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem Rev* 2005;105:395-424.
249. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:373-383.
250. Bush K. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Ann NY Acad Sci* 2013;1277:84-90.
251. Bush K. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *J Infect Chemother* 2013;19:549-559.
252. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG. ARI 1: β -Lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 1993;2:81-87.
253. Zhao WH, Hu ZQ. *Acinetobacter*: A potential reservoir and dispenser for β -lactamases. *Crit Rev Microbiol* 2012;38:30-51.
254. Heritier C, Poirel L, Fournier PE, Claverie JM., Raoult D, Nordmann P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4174-4179.
255. Heritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3198-3202.
256. Paul Higgins, Mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, University of Cologne, German Centre for Infection Research (DZIF), partner site Bonn-Cologne, Cologne, Germany, tečaj: Multirezistentne nefermentativne bakterije, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, ožujak, 2017.
257. Evans BA, Amyes SGB. OXA β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2014;27(2):241-263.
258. Lyon JA. Imipenem/cilastatin: the first carbapenem antibiotic. *Drug Intell Clin Pharm* 1985;19:895-899.

259. Smith CA, Antunes NT, Stewart NK, Toth M, Kumarasiri M, Chang M, Mobashery S, Vakulenko SB. Structural basis for carbapenemase activity of the OXA-23 β -lactamase from *Acinetobacter baumannii*. *Chem Biol* 2013;20:1107-1115.
260. Poirel L, Marque S, Heritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:202–208.
261. Koh TH, Sng LH, Wang GC, Hsu LY, Zhao Y. IMP-4 and OXA β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:627-632.
262. Poirel L, Mansour W, Bouallegue O, Nordmann P. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Tunisia producing the OXA-58-like carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-97. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1613-1617.
263. Higgins PG, Schneiders T, Hamprecht A, Seifert H. *In vivo* selection of a missense mutation in *adeR* and conversion of the novel *bla*_{OXA-164} gene into *bla*_{OXA-58} in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospitalized patient. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:5021-5027.
264. Higgins P, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:233-238.
265. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:15-22.
266. Goncalves D, Cecilio P, Ferreira H. First detection of OXA-48-like producing *Acinetobacter baumannii* in the faecal flora of nursing home residents in Northern Portugal. *Eur Congr Clin Microbiol Infect Dis Abstr* 2013;23rd.
267. Kenneth TS. Controversies about Extended-Spectrum and AmpC beta-Lactamases. *Emerg Infec Dis* 2001;7:333-6.
268. Gniadkowsky M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:597-608.
269. Goussard S, Courvalin P. Updated sequence information for TEM beta-lactamases genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:367-70.
270. Bedenić B, Bader N, Godič-Torkar K, Vranić-Ladavac M, Luxner J, Veir Z, Grisold AJ, Zarfel G. Nursing home as reservoir of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microb Drug Resist* 2015;21(3):270-278.
271. Bošnjak Z, Plečko V, Budimir A, Mareković I, Bedenić B. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter guillouie*. *Chemotherapy* 2014;60(4):250-252.

272. Bedenić B, Zujčić-Atalić V, Jajić I, Djuras-Cuculić B, Godič-Torkar K, Vraneš J, Zarfel G, Grisold A.: Clonal spread of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 β -lactamase in Croatian University Hospital. *J Chemother* 2015;27(4):241-5.
273. Wayne PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Approved tenth edition. CLSI document M02-A10 2009.
274. Wayne PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI/NCCLS M100-S20 2010.
275. Wayne PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. Twentieth informational supplement. (June 2010 update). CLSI document M100-S20 2010.
276. Leclercq R, Canton R, Brown DFJ i sur. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 2011;1:1-20.
277. Wayne PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 24th informational supplement. M100-S24 Supplement M100S 2016.
278. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd/prirucnik/infektologija/laboratorijska-dijagnostika-zaraznih-bolesti/ispitivanje-osjetljivosti-antibiogram>
279. Koneman EW, Allen SD, Dowel VR, Janda WM, Sommers HM, Winn W. Color atlas textbook of Diagnostic Microbiology, Lippincot Company, Philadelphia.1988.
280. Stratton CW, Cooksey R. Susceptibility tests: Special tests. In: Balows A, Hausler WJ. Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed., American Society for Microbiology, Washington DC 1991;115:1153-63.
281. <https://step1.medbullets.com/microbiology/104018/bacterial-growth-curve>
282. Akers KS, Rowan MP, Niece KL, Stewart IJ, Mende K, Cota JM et al. Colistin pharmacokinetics in burring patients during continuous venovenous hemofiltration. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; E pub.
283. Baptista J, Roberts JA, Sousa E, Freitas R, Devezza N, Pimentel J. Decreasing the time to achieve therapeutic vancomycin concentrations in critically ill patients: developing and testing of a dosing nomogram. *Crit Care* 2014;18(6):654.
284. Wiseman LR, Wagstaff AJ, Brogden RN, Bryson HM. Meropenem: A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy. *Drugs* 1995;50(1):73-101.
285. Krogstad DJ, Moellering RC. Antimicrobial combinations. In: *Antibiotics in Laboratory Medicine*, chapter 15, 2nd ed. Willams and Wilkins, 1986;537-95.

286. Gordon NC, Png K, Wareham DW. Potent synergy and sustained bactericidal activity of vancomycin-colistin combinations versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(12):5316-22.
287. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA-double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003;41:4623-9.
288. Sharan H, Katare N, Pandey A, Shivmurti Bhatambare G, Bajpai T. Emergence of Hospital Acquired Carbapenem Resistant Non-Fermenters in Teaching Institute. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2016;10(12):DC20-DC23.
289. Walsh TR, Bolmstrom A, Gales A. Evaluation of new E test for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002;40:2755-2759
290. Kim YK, Geung-Hong S, Moland ES, Thomson KS. Convenient test using combination of chelating agents for detection of metallo- β -lactamases in clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2007;45(9):2798-2801.
291. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988;10:867-878.
292. <https://bioinfopublication.org/viewhtml.php?artid=BIA0001938#ref-Fig-1>
293. Wayne PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100-S, 2016.
294. <https://www.slideshare.net/doctorrao/esbl-dynamics-and-detection>
295. Livermore DM, Brown DFJ. Detection of β -lactamase mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:59-64.
296. https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQDv-8wTnrrd_mw_-Ff82uWP8m87igWLvWr3edyMBdRNvZIMOTThQ
297. Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol* 2005;43:416-7.
298. Nüesch - Inderbilen MT, Hächler H, Kayser FH. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV β -lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:398-402.

299. Arlet G, Brami G, Decre D i sur. Molecular characterization by PCR restriction fragment polymorphism of TEM β -lactamases. FEMS Microbiol Lett 1995;134:203-8.
300. Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME i sur. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum β -lactamases in the UK. J Antimicrob Chemother 2004;54:735-43.
301. Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R i sur. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum β -lactamase in Northern Italy. J Clin Microbiol 2004;42:2523-9.
302. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol 2002;40:2153-62.
303. Poirel L, Walsh TR, Cuveiller V, Nordman P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemases genes. Diagn Microbiol Infect Dis 2011;70(1):119-125.
304. Mulvey MR, Grant JM, Plewes K, Roscoe D, Boyd DA. New Delhi metallo- β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. Emerging Infect Dis 2011;17:103-6.
305. Cuzon G, Quanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P. Outbreak of OXA-48 positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. Antimicrob Agents Chemother 2011;55(5):2420-2423.
306. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. Lancet Infect Dis 2006;6(10):629-640.
307. Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. J Antimicrob Chemother 2006;57(1):154-155.
308. Saladin M, Cao V T, Lambert T, Donay JL, Herrmann J L, Ould-Hocine Z, Verdet CG, et al. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoterregions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. FEMS Microbiol Lett 2002;209, 161–168.
309. Bush K, Jacoby GA. Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant β -lactamases. Lahey Clinic; 2002.
310. Gaibani P, Lombardo D, Russel L, Mercuri M, Bonora S, Landini MP, Ambretti S. In vitro activity and postantibiotic effects of colistin in combination with other antimicrobials against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates. J Antimicrob Chemother 2014;69:1856-1865.

311. Percin D, Akyiol S, Kalin G. In vitro synergism of combinations of colistin with selected antibiotics against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *GSM Hygiene and Infection Control* 2014;9(12):1-5.
312. Wareham DW, Gordon NC, Hornsey M. *In vitro* activity of teicoplanin combined with colistin versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1047-1051.
313. Claeys KC, Fiorvento AD, Rybak MJ. A review of novel combinations of colistin and lipopeptide or glycopeptide antibiotics for the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Infect Dis Ther* 2014;PMID 2475412.
314. O'Hara JA, Ambe LA, Casella LG, Townsend BM, Pelletier MR, Ernst RK, Shanks RMK, Doe Y. Activities of vancomycin-containing regimens against colistin resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *Antimicrobial Agents Chemother* 2013;57(5): 2103-2108.
315. Owen RJ, Li J, Nation RL, Spelman D. In vitro pharmacodynamics of colistin against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:473-77.
316. Ozbek B, Senturk A. Postantibiotic effects of tigecycline, colistin sulphate, and levofloxacin alone or tigecycline-colistin and tigecycline-levofloxacin combinations against *Acinetobacter baumannii*. *Chemotherapy* 2010;56(6):466-471.
317. Pournaras S, Vrioni G, Neou E, Dendrinou J, Dimitroulia E, Poulou A, Tsakris A. Activity of tigecycline alone and combined with colistin and meropenem against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) producing Enterobacteriaceae strains by time-kill assays. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:244-247.
318. Urban C, Mariano N, Rahal JJ. In vitro double and triple bactericidal activities of doripenem, polymixin B, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:2732-2734.
319. Lee J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, et al. Hetero-resistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob agents Chemother* 2006;50:2946-2950.
320. Mazzariol A, Bošnjak Z, Ballarini P, Budimir A, Bedenić B, Kalenić S, Cornaglia G. NDM-1 producing *Klebsiella pneumoniae*, Croatia. *Emerging Infectious Diseases* 2012; 18(3):532-534.
321. Sardelić S, Bedenić B, Colinon-Dupuich C, Orhanović S, Bošnjak Z, Plečko V, Cournoyer B, Rossolini GM. Infrequent finding of metallo- β -lactamase VIM-2 in carbapenem-

- resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Croatia. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(5):2746-2749.
322. Bedenić B, Slade M, Žele- Starčević L, Sardelić S, Vranić-Ladavac M, Benčić A, Zujčić-Atalić V, Bogdan M, Bubonja-Šonje M, Tomić-Paradžik M, Tot T, Lukić-Grić A, Drenjančević D, Varda-Brkić D, Bandić-Pavlović D, Mihaljević S, Zarfel G, Gužvinec M, Conzemić R, Barišić I, Tambić-Andrašević A. Epidemic spread of OXA-48 β -lactamase in Croatia. *J Med Microbiol* 2018;67(8):1031-1034
323. Bedenić B, Beader N, Godič-Torkar, Prahin E, Miljević L, Čačić M, Vraneš J. Postantibiotic effect of colistin alone and combined with vancomycin or meropenem against *Acinetobacter* spp. with well defined resistance mechanisms. *J Chemother* 2016;(28)5:375-82.
324. Šimundić AM. Interval pouzdanosti, *Biochemia Medica*, Vol. 18 No. 2, 2008;154-161

9. SAŽETAK

Cilj istraživanja bio je utvrditi in vitro sinergiju i postantibiotski učinak kolistina samog i u kombinaciji s meropenemom ili vankomicinom u enterobakterija i acinetobaktera s pojedinačnim i multiplim karbapenemazama; karbapenem hidrolizirajućim oksacilinazama, kombinacijom dviju metalo- β -laktamaza ili metalo- β -laktamaze i OXA-48. Kolistin rezistentan izolat *K. pneumoniae* pozitivan na OXA-48 je također bio uključen u studiju. Osjetljivost na antibiotike je određivana bujonskom mikrodilucijskom metodom. Sinergija testiranih antibiotika je određivana šah metodom, „time-kill“ krivuljama i metodom dvije jažice. Postantibiotski učinak je određivan brojanjem poraslih kolonija. Šah metoda je dokazala sinergiju kolistina s meropenemom u svim testiranim izolatima enterobakterija s FICI vrijednostima u rasponu od 0.12 to 0.24. FICI vrijednosti za kombinacije s vankomicinom su bile ispod 0.5 što ukazuje na sinergiju u dva od četiri izolata. Sinergistični učinak u time-kill krivuljama je zapažen u soja *K. pneumoniae* 145846 s dvije metalo- β -laktamaze i u *K. pneumoniae* 609815 pozitivnog na OXA-48 i s rezistencijom na kolistin, uz obje kombinacije i s meropenemom i vankomicinom. Kolistin sam je uzrokovao kratki PAE u svih enterobakterija. Meropenem je značajno produžio PAE kolistina u dva izolata za razliku od vankomicina koji nije pokazivao učinak. U acinetobaktera rezultati šah metode su ukazali na sinergiju kolistina s vankomicinom u svih testiranih izolata osim u tri izolata s FICI vrijednostima između 0.003 i 1. Kada je kolistin kombiniran s meropenemom FICI vrijednosti iznad 0.5 što upućuje na izostanak sinergije su opisane u dva izolata. Metoda dvije jažice je utvrdila rast svih sojeva uz 0.25 x MIK kolistina samog, ali odsutnost rasta nakon izlaganja 2 x MIK-u. *A. baumannii* je iskazivao negativan (-0.07 sata) u jednom soju, kratki (0.2-1,82 sata) u šest sojeva ili umjereni PAE (3.2 sata) u jednom soju nakon izlaganja kolistinu samom, u trajanju od 1 sata. U kombinaciji s vankomicinom PAE je bio umjereno dug (1.7-4 sata) u četiri soja dok se u druga četiri soja nije mogla izračunati srednja vrijednost za PAE zbog izostanka

ponovnog porasta soja nakon izlaganja antibioticima ili je bio duži od 5 sati. Kombinacija s meropenemom je rezultirala kratkim (0.2 sata) u jednom soju, umjereno dugim (2.4-3.73 sata) u četiri soja, dugim PAE u trajanju od 5 sati kod jednog soja ili dužim od 5 sati kod dva soja.

10. SUMMARY

The aim of the study was to determine *in vitro* synergy and postantibiotic effect of colistin alone and combined with meropenem or vancomycin against *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* producing single or multiple carbapenemases; carbapenem-hydrolyzing oxacillinases, combinations of two metallo- β -lactamases (MBL) or MBL with OXA-48. Colistin-resistant strain positive for OXA-48 was also included in the study. The antibiotic susceptibility was tested by broth microdilution method. Synergy was tested by chequerboard, time-kill and 2-well method. Postantibiotic effect was determined by viable counting method. The chequerboard analysis of *Enterobacteriaceae* revealed synergy for colistin combination with meropenem in all isolates with FICI values ranging from 0.12 to 0.24. FICI values for combinations with vancomycin were below 0.5 indicating synergy in two out of four isolates. Synergy effect in time-kill curves, was observed for *K. pneumoniae* 145846 with two MBLs and colistin resistant *K. pneumoniae* 609815 positive for OXA-48, with both combinations including meropenem and vancomycin. Colistin alone exhibited short postantibiotic effect (PAE) against all tested isolates. Meropenem markedly prolonged the PAE in two isolates in contrast to vancomycin which did not demonstrate significant effect on the duration of PAE. The results of the chequerboard analysis indicated synergism between colistin and vancomycin for all tested *A. baumannii* strains except three organisms with FICI ranging between 0.003 and 1. When colistin was combined with meropenem the FICI above 0.5 indicating lack of synergy was reported for two strains. Two well method revealed the growth of all strains at 0.25 x MIC of colistin alone but absence of growth when the strains were exposed to 2 x MIC of colistin alone. *A. baumannii* exhibited the negative (-0.07 h) (1 strain), short (0.2-1,82 h) (6 strains) or moderate PAE (3.2 h) (1 strain) after exposure of 1 h colistin alone. When combined with vancomycin, the PAE was moderate (1.7-4 h) with four strains while with another four strains it was not possible to calculate mean duration of PAE because there was no regrowth after

exposure to antibiotics or it was longer than five hours. The combination with meropenem resulted in short (0.2 h) (1 strain), moderate (2.4-3.73 h) (four strains), long PAE of 5 h (1 strain) or longer than 5 h (two strains).

5. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 11. veljače 1983. godine u Zagrebu, gdje sam završio osnovnu školu i srednju školu za zdravstveno-laboratorijskog tehničara u Zdravstvenom učilištu gdje sam 2001. godine na VII. državnom natjecanju učenika IV. razreda zdravstvenih škola Republike Hrvatske „Schola medica“ u programu zdravstveno-laboratorijski tehničar iz predmeta mikrobiologija i medicinska biokemija osvojio prvo mjesto. Diplomirao sam na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu 9. siječnja 2007. godine na temu „Učestalost nalaza najčešćih bakterijskih uzročnika infekcije mokraćnog sustava u djece i njihova osjetljivost na antimikrobne lijekove“ i stekao zvanje prvostupnik medicinsko-laboratorijske dijagnostike. Pripravnički staž odradio sam u Domu zdravlja Knežija 2008. godine, a državni stručni ispit pri Ministarstvu zdravstva položio sam 2009. godine. Od 2009. godine zaposlen sam u Zdravstvenom učilištu u Zagrebu gdje i danas radim kao nastavnik strukovnih predmeta u programima sanitarni i zdravstveno-laboratorijski tehničar/ka. Od 2010.-2014. godine u Zdravstvenom učilištu obnašao sam dužnost ispitnog koordinatora za državnu maturu, a za razdoblje od 2014.-2015. godine imenovan sam članom školskog ispitnog povjerenstva za državnu maturu. Od 2017. godine do danas obnašam dužnost voditelja programa za sanitarne i zdravstveno-laboratorijske tehničare. Na Učiteljskom fakultetu u Zagrebu 2011. godine položio sam program pedagoško- psihološke naobrazbe, nakon čega sam položio prosvjetni stručni ispit pri agenciji za strukovno obrazovanje i obrazovanje odraslih 2013. godine. Upisao sam Fakultet zdravstvenih studija, Univerziteta u Sarajevu 2012. godine na kojem sam 2014. godine diplomirao na temu „Prikaz testiranja markera krvlju prenosivih virusa (HBV, HCV i HIV) za bolesnike s hemodijalize i kirurške klinike“ i stekao zvanje diplomirani inženjer medicinsko laboratorijske dijagnostike.

Član sam Hrvatske komore zdravstvenih radnika od 2011. godine s licencom magistra medicinsko laboratorijske dijagnostike.

6. POPIS RADOVA

Koautor sam jednog izvornog znanstvenog rada indeksiranog u Current contents-u;

Bedenić B, Car H, Slačanac D, Lukić-Grlić A, Sviben M, Čačić M, Benčić A, Šijak D, Tripković M, Bader N, „*In vitro* synergy and postantibiotic effect of colistin combinations with meropenem and vancomycin against *enterobacteriaceae* with multiple carbapenem resistance mechanisms“, Journal of Infection and Chemotherapy, Ms. No. JIC-D-18-00018R3.

Koautor sam dva znanstvena rada citirana u drugim bazama podataka;

Prohaska-Potočnik C, Vukadinović MV, Car H, „Učestalost nalaza najčešćih bakterijskih uzročnika infekcije mokraćnog sustava u djece i njihova osjetljivost na antimikrobne lijekove“ Medica Jadertina, Vol. 38 No. 1-2, 2008.

Bedenić B, Ladavac R, Vranić-Ladavac M, Barišić N, Karčić N, Katherina Bernadette Sreter, Mihaljević S, Bielen L, Car H, Bader N, „False positive phenotypic detection of metallo-betalactamases in *Acinetobacter baumannii*“, Acta clinica Croatica, vol. 57, 2018.

Koautor sam tri kongresna sažetaka u zborniku radova;

Varda-Brkić D, Presečki-Stanko A, Zele-Starčević L, Tripković V, Mareković I, Car H, Bedenić B „Secondary antibiotic resistance and prevalence of *Helicobacter pylori* cag PAI genotypes in patients from Croatia“, 27th ECCMID (European congress of clinical microbiology and infectious diseases), Vienna, Austria, 22-25.4.2017.

Bedenić B, Bader N, Siroglavić M, Slade M, Car H, Dekić S, Šeruga M, Musić A, Presečki-Stanko D, Šijak Jasna Hrenović, „*Acinetobacter baumannii* from a sewage of a nursing home in Croatia“ 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Madrid, Spain, 21-24.4. 2018.

Branka Bedenić, Ranko Ladavac, Mirna Vranić-Ladavac, Nada Barišić, Natalie Karčić, Antun Ferencić, Slobodan Mihaljević, Luka Bielen, Nataša Beder, Haris Car, “False positive phenotypic detection of metallo-beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii*” 11 th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*, 20-22.9. 2017, Seville, Spain.