

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Nataša BUKOVEC

**DOLOČANJE SINERGISTIČNEGA UČINKA
KOMBINACIJE ANTIBIOTIKOV PROTI
VEČKRATNO ODPORNIM SEVOM BAKTERIJE
*Acinetobacter baumannii***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Nataša BUKOVEC

**DOLOČANJE SINERGISTIČNEGA UČINKA KOMBINACIJE
ANTIBIOTIKOV PROTI VEČKRATNO ODPORNIM SEVOM
BAKTERIJE *Acinetobacter baumannii***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**EVALUATION OF ANTIBIOTIC COMBINATIONS AGAINST
MULTI-DRUG RESISTANT STRAINS OF *Acinetobacter baumannii***

M. SC. THESIS

Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je na seji dne 29. 5. 2013 za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Katjo Seme, dr. med. in za recenzentko prof. dr. Sonjo Smole Možina.

Mentorica: prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Recenzentka: prof. dr. Sonja Smole Možina, univ. dipl. inž. živil. tehnol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK, univ. dipl. biol.
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Katja SEME, dr. med.
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA, univ. dipl. inž. živil. tehnol.
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Nataša Bukovec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

- ŠD Du2
- DK UDK 579.61+579.24:615.33:579.84(043)=163.6
- KG patogeni mikroorganizmi/*Acinetobacter baumannii*/odpornost proti antibiotikom/sinergija/mikrodilucija/ metoda navzkrižnega seta difuzijskih gradientov/metoda šahovnice/metoda time-kill
- AV BUKOVEC, Nataša, dipl. mikrobiol. (UN)
- SA SEME, Katja (mentorica)/ SMOLE MOŽINA, Sonja (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
- LI 2014
- IN DOLOČANJE SINERGISTIČNEGA UČINKA KOMBINACIJE ANTIBIOTIKOV PROTI VEČKRATNO ODPORNIM SEVOM BAKTERIJE *Acinetobacter baumannii*
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
- OP XI, 56 str., 8 pregl., 7 sl., 49 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Zdravljenje okužb, ki jih povzroča *Acinetobacter baumannii*, najbolj otežujejo večkratno odporni izolati. Zaradi visoke odpornosti proti trenutno dosegljivim antibiotikom se v prakso skuša vpeljati kombinirano zdravljenje. Za najustreznejšo kombinacijo se lahko odločimo, če najprej ugotovimo, če pri določenih kombinacijah antibiotikov *in vitro* obstaja sinergistični učinek. V raziskavi smo želeli ugotoviti katere kombinacije antibiotikov *in vitro* sinergistično delujejo proti 15 večkratno odpornim izolatom *A. baumannii*, ki so bili izolirani pri bolnikih hospitaliziranih v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani v obdobju enega leta. Želeli smo tudi ugotoviti katera metoda za določanje sinergističnega učinka kombinacije antibiotikov je najbolj primerna za rutinski mikrobiološki laboratorij. Sinergistični učinek smo preverjali z metodo navzkrižnega seta difuzijskih gradientov, metodo šahovnice in metodo time-kill. Preverjali smo kombinacije antibiotikov tigeciklin z imipenemom, tigeciklin z levofloksacinom, tigeciklin s kolistinom in polimiksin B z imipenemom. Z metodo navzkrižnega seta difuzijskih gradientov nismo ugotovili sinergističnega delovanja antibiotikov. Z metodo šahovnice smo ugotovili sinergistični učinek kombinacije polimiksina B in imipenema proti 7 testiranim izolatom in kombinacije tigeciklina in kolistina proti 14 izolatom. Z metodo time-kill smo pri 6 izolatih potrdili sinergistični učinek kombinacije tigeciklina in kolistina, medtem ko nismo potrdili sinergističnega učinka kombinacije polimiksina B in imipenema. Pri dveh izolatih, pri katerih smo z metodo šahovnice ugotovili sinergistični učinek tigeciklina in kolistina, smo z metodo time-kill pri po eni od testiranih koncentracij antibiotikov ugotovili antagonizem. Najbolj hitra in tehnično najmanj zahtevna metoda za ugotavljanje sinergističnega učinka kombinacije antibiotikov je sicer metoda navzkrižnega seta difuzijskih gradientov, vendar ni primerna za uporabo v rutinskem mikrobiološkem laboratoriju, saj njeni rezultati niso zanesljivi. Metodi šahovnice in time-kill sta tehnično veliko bolj zahtevni in zamudni, rezultati so bolj zanesljivi vendar niso popolnoma primerljivi. Kombinacija tigeciklina in kolistina je imela najboljši sinergistični učinek proti slovenskim izolatom večkratno odporne bakterije *A. baumannii*.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

- DN Du2
- DC UDC 579.61+579.24:615.33:579.84(043)=163.6
- CX pathogens/*Acinetobacter baumannii*/antibiotic resistance/synergy/microdilution/crossing set/checkerboard/time-kill
- AU BUKOVEC, Nataša
- AA SEME, Katja (supervisor)/ SMOLE MOŽINA, Sonja (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
- PY 2014
- TI EVALUATION OF ANTIBIOTIC COMBINATIONS AGAINST MULTI-DRUG RESISTANT STRAINS OF *Acinetobacter baumannii*
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
- NO XI, 56 p., 8 tab., 7 fig., 49 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Infections caused by multi-drug resistant strains of *Acinetobacter baumannii* are most problematic and difficult to treat. Combination therapy can be used in a case of extensive resistance against currently available antibiotics. It is easier to choose the appropriate combination if antibiotic combinations are first evaluated *in vitro* and synergistic effect is determined. In this study we wanted to determine which combination of antibiotics has *in vitro* synergistic effect against 15 multi-drug resistant isolates of *A. baumannii*, which were isolated from patients hospitalized at the University Medical Centre in Ljubljana during one year period. We also wanted to determine which method for the determination of antibiotic synergy is the most convenient and accurate for routine microbiological laboratory. For evaluation of synergy we performed crossing-set, checkerboard and time-kill methods. Combinations of tigecycline with imipenem, tigecycline with levofloxacin, tigecycline with colistin and polymyxin B with imipenem were tested. Using crossing-set method we were not able to demonstrate any synergy. Using checkerboard method synergy of polymyxin B in combination with imipenem was determined in 7 isolates and of tigecycline in combination with colistin in 14 isolates. Using time-kill method synergy of tigecycline in combination with colistin was detected in 6 isolates but synergy could not be detected for polymyxin B in combination with imipenem. In the case of two isolates, with synergy of tigecycline in combination with colistin detected using checkerboard method we detected antagonism in one of the tested concentrations of antibiotics using time-kill method. The fastest and easy to perform is crossing-set method, but unfortunately according to our results it does not give reliable results. Checkerboard and time-kill methods are technically much more demanding and time-consuming and the results are more reliable, but not fully comparable. The combination of tigecycline with colistin most frequently demonstrated synergy against Slovenian multi-drug resistant strains of *A. baumannii*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	3
2.2 MEHANIZMI ODPORNOSTI BAKTERIJE <i>A. baumannii</i> PROTI ANTIBIOTIKOM	4
2.2.1 Encimska inaktivacija antibiotikov	4
2.2.2 Onemogočanje dostopa do tarčnega mesta v bakterijski celici.....	5
2.2.2.1 Družina membranskih izlivnih črpalk MFS	6
2.2.2.2 Družina membranskih izlivnih črpalk RND.....	6
2.2.3 Spremembe tarč ali celičnih funkcij zaradi mutacij	7
2.3 ANTIBIOTIKI ZA ZDRAVLJENJE OKUŽB, KI JIH POVZROČA <i>A. baumannii</i> ..	7
2.3.1 Beta-laktamski antibiotiki	8
2.3.2 Aminoglikozidni antibiotiki.....	9
2.3.3 Kinoloni	9
2.3.4 Glicilciklini.....	9
2.3.5 Polimiksini	9
2.4 KOMBINIRANO ZDRAVLJENJE	10

2.4.1 Argumenti za in proti kombiniranemu protimikrobnemu zdravljenju.....	11
2.5 LABORATORIJSKE METODE ZA DOLOČANJE <i>in vitro</i> UČINKA KOMBINACIJE ANTIBIOTIKOV	12
2.5.1 Metoda navzkrižnega seta difuzijskih gradientov	13
2.5.2 Metoda šahovnice	14
2.5.3 Metoda time-kill	14
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 BAKTERIJSKI IZOLATI	16
3.2 METODE.....	17
3.2.1 Priprava uporabljenih gojišč	17
3.2.2 Priprava bakterijskih izolatov in bakterijske suspenzije	18
3.2.3 Izbor in priprava antibiotikov	18
3.2.4 Določanje minimalne inhibitorne koncentracije	19
3.2.4.1 Metoda difuzijskega gradienta.....	19
3.2.4.2 Mikrodilucijska metoda.....	20
3.2.5 Določanje sinergističnega učinka kombinacije antibiotikov	21
3.2.5.1 Navzkrižni set difuzijskih gradientov.....	21
3.2.5.2 Metoda šahovnice	22
3.2.5.3 Metoda time-kill	22
4 REZULTATI.....	26
4.1 DOLOČANJE MIK ANTIBIOTIKOV Z METODO DIFUZIJSKEGA GRADIENTA IN Z METODO MIKRODILUCIJE	26
4.2 DOLOČANJE SINERGISTIČNEGA UČINKA Z NAVZKRIŽNIM SETOM DIFUZIJSKIH GRADIENTOV	28
4.3 DOLOČANJE SINERGISTIČNEGA UČINKA Z METODO ŠAHOVNICE	30
4.4 DOLOČANJE SINERGISTIČNEGA UČINKA Z METODO TIME-KILL	32
4.5 PRIMERJAVA METOD ZA DOLOČANJE SINERGISTIČNEGA UČINKA ANTIBIOTIKOV.....	37

5 RAZPRAVA	40
5.1 DOLOČANJE SINERGISTIČNEGA UČINKA KOMBINACIJE TIGECIKLINA IN LEVOFLOKSACINA	41
5.2 DOLOČANJE SINERGISTIČNEGA UČINKA KOMBINACIJE TIGECIKLINA IN IMIPENEMA.....	42
5.3 DOLOČANJE SINERGISTIČNEGA UČINKA KOMBINACIJE TIGECIKLINA IN KOLISTINA	43
5.4 DOLOČANJE SINERGISTIČNEGA UČINKA KOMBINACIJE POLIMIKSINA B IN IMIPENEMA.....	44
5.5 PRIMERJAVA METOD ZA DOLOČANJE SINERGISTIČNEGA UČINKA KOMBINACIJE ANTIBIOTIKOV	45
6 SKLEPI	48
7 POVZETEK	49
8 VIRI	51
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Občutljivost izbranih 15 izolatov na antibiotike, ki se uporabljajo za zdravljenje okužb z <i>A. baumannii</i> .	17
Preglednica 2: Antibiotiki in razpon njihovih koncentracij, ki smo jih testirali pri vseh 15 izolatih <i>A. baumannii</i> .	19
Preglednica 3: Pregled in primerjava MIK, določenih z metodo difuzijskega gradienta in z mikrodilucijo pri 15 izolatih <i>A. baumannii</i> .	27
Preglednica 4: Rezultati določanja MIK z metodo difuzijskega gradienta in rezultati metode navzkrižnega seta difuzijskih gradientov za testirane kombinacije antibiotikov pri 15 izolatih <i>A. baumannii</i> .	29
Preglednica 5: Rezultati določanja MIK z mikrodilucijo in rezultati metode šahovnice za vse testirane kombinacije antibiotikov pri 15 izolatih <i>A. baumannii</i> .	31
Preglednica 6: Rezultati metode time-kill pri kombinaciji tigeciklina s kolistinom za 14 izolatov <i>A. baumannii</i> .	34
Preglednica 7: Rezultati metode time-kill pri kombinaciji polimiksina B z imipenemom za 7 izolatov <i>A. baumannii</i> .	35
Preglednica 8: Primerjava rezultatov testiranja sinergije z metodo navzkrižnega seta difuzijskih gradientov, metodo šahovnice in metodo time-kill pri 15 izolatih <i>A. baumannii</i> .	38

KAZALO SLIK

Slika 1: Pravilna postavitev E-testov pri izvajanju sinergističnega testa z metodo navzkrižnega seta difuzijskih gradientov in odčitanje vrednosti MIK antibiotika v kombinaciji (Bonapace in sod., 2000: 46).....	14
Slika 2: Prikaz metode navzkrižnega seta difuzijskih gradientov in rezultat testiranja sinergije antibiotikov tigeciklina in kolistina	30
Slika 3: Rastna krivulja bakterije <i>A. baumannii</i>	32
Slika 4: Motnost/bistrost reakcijskih epruvet pri metodi time-kill po 24 urah inkubacije .	33
Slika 5: Primer sinergije tigeciklina s kolistinom pri izolatu <i>A. baumannii</i>	35
Slika 6: Primer antagonizma tigeciklina s kolistinom pri izolatu <i>A. baumannii</i>	36
Slika 7: Primer indiference tigeciklina in kolistina pri izolatu <i>A. baumannii</i>	36

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATCC	angl. the American Type Culture Collection
CFU	angl. colony forming units
CLSI	angl. Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	deoksiribonukleinska kislina
ESBL	laktamaze beta z razširjenim spektrom delovanja
EUCAST	angl. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FIC	angl. fractional inhibitory concentration index
IS	insercijska sekvenca
KA	krvni agar
LPS	lipopolisaharid
m-RNA	informacijska ribonukleinska kislina
MBL	metalo-beta laktamaze
McF	McFarland
MDR	večkratno odporni proti antibiotiku (angl. multidrug-resistant)
MFP	membranski fuzijski protein (angl. membrane fusion protein)
MFS	angl. major facilitator family
MH	Mueller-Hinton agar
MHB	Mueller-Hinton bujon
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
OD	optična gostota
OMP	zunanji membranski protein (angl. outer membrane protein)

ORF	odprti bralni okvir (angl. open reading frame)
PBP	penicilin vezoči proteini (angl. penicilin binding proteins)
RNA	ribonukleinska kislina
RND	angl. resistance-nodulation-division
rpm	število obratov na minuto (angl. revolutions per minute)
t-RNA	prenašalna ribonukleinska kislina
XDR	široko odporni proti antibiotiku (angl. extensively drug-resistant)

1 UVOD

Acinetobacter baumannii je pomemben povzročitelj bolnišničnih okužb (Peleg in sod., 2008). Zdravljenje okužb, ki jih povzroča *A. baumannii* v zadnjem času, najbolj otežujejo večkratno odporni (angl. multidrug resistant, MDR) in celo široko odporni (angl. extensively drug-resistant, XDR) sevi (Kiratisin in sod., 2010). MDR sevi so tisti, ki so odporni proti najmanj enemu antibiotiku v treh ali večih kategorijah antibiotikov. Med XDR seve uvrščamo tiste izolate, ki so občutljivi za le eno ali dve kategoriji antibiotikov (Magiorakos in sod., 2012).

Prav zaradi visoke odpornosti proti zdaj dosegljivim antibiotikom se v prakso skuša vpeljati kombinirano zdravljenje, kjer bolnik sočasno prejema dva ali več antibiotikov z različnim načinom delovanja (Tan in sod., 2007). Za najustreznejšo kombinacijo se lahko odločimo, če najprej ugotovimo, če pri določenih kombinacijah antibiotikov *in vitro* obstaja sinergistični učinek.

Za ugotavljanje sinergističnega učinka kombinacije antibiotikov se lahko uporablja več različnih metod, najpogosteje metoda šahovnice, time-kill in difuzijski gradient. Vsaka od njih ima svoje prednosti in pomanjkljivosti (Bonapace in sod., 2000).

Vse pogosteje tudi pri slovenskih bolnikih osamimo izolate *A. baumannii*, ki so odporni proti vsem antibiotikom, primernih za zdravljenje, z izjemo kolistina (Sopirala in sod., 2010).

V Sloveniji zaenkrat določanje sinergističnega učinka kombinacije antibiotikov ne spada med rutinske diagnostične bakteriološke teste.

1.1 NAMEN DELA

V magistrski nalogi smo želeli ugotoviti, katera metoda za določanje sinergističnega učinka kombinacij antibiotikov je najprimernejša. Želeli smo določiti kombinacije antibiotikov, ki *in vitro* izkazujejo sinergistični učinek proti večkratno odpornim sevom *Acinetobacter baumannii*.

Na osnovi podatkov iz literature smo pričakovali sinergistični učinek pri kombinacijah, ki smo jih tudi sami uporabili pri testiranju.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Posamezni antibiotik, proti kateremu je bakterija razvila odpornost, lahko v kombinaciji z drugim antibiotikom *in vitro* uspešno učinkuje proti bakteriji.

Določene kombinacije antibiotikov imajo zaradi sinergističnega učinka večjo učinkovitost proti slovenskim večkratno odpornim sevom *A. baumannii* kot druge kombinacije in kot posamezni antibiotiki.

2 PREGLED OBJAV

2.1 *Acinetobacter baumannii*

Bakterija *A. baumannii* je aeroben, po Gramu negativen kokobacil. Prvič je bakterija bila omenjena leta 1911 pod imenom *Micrococcus calco-aceticus*, ki ga je zamenjalo še nekaj imen vse do leta 1950, ko je dobila zdajšnje ime. Naravno okolje bakterije *A. baumannii* sta voda in tla. Pri ljudeh lahko kolonizira kožo, rane, respiratorni in prebavni trakt (Munoz-Price in Weinstein, 2008).

Z bolnišnico povezane okužbe so postale svetovni problem, ki nas veliko stanejo, tako v ekonomskem smislu kot v povečanju mortalitete. Že desetletja so po Gramu negativne bakterije prispevale velik delež k tovrstnim okužbam. Med vsemi po Gramu negativnimi bakterijami je ravno *A. baumannii* tista, ki konstantno povečuje število primerov bolnišničnih okužb (Fouad in sod., 2013).

Večkratno odporna bakterija *A. baumannii* se je izkazala kot povzročiteljica najbolj težkih bolnišničnih okužb med po Gramu negativnimi bakterijami, kar se tiče uspešnosti zdravljenja in kontrole. Različni mehanizmi odpornosti, ki jih poseduje, omejujejo možnosti zdravljenja, še posebej, če je bolnik okužen s sevom *A. baumannii*, ki je odporen proti karbapenemskim antibiotikom. Možnost okužbe z *A. baumannii* se povečuje s podaljšanim bivanjem v bolnišnici, posebej v enotah intenzivnega zdravljenja, z mehansko ventilacijo, z invazivnimi postopki, operacijami in s stikom z okuženimi bolniki (Maragakis in Perl, 2008).

Acinetobacter spp. je postal pomemben patogen v enotah intenzivne nege in je povezan z bolnišničnimi okužbami, kot so pljučnica, okužbe urinarnega trakta, endokarditis, okužbe kože in ran in meningitis. Identificiranih je bilo več vrst rodu *Acinetobacter*, vendar je bakterija *A. baumannii* prepoznana kot vrsta, ki je najpogosteje odgovorna za bolnišnične okužbe. Zadnja leta se je izredno povečalo število izolatov *A. baumannii*, ki so odporni proti večini dosegljivih antibiotikov. Večina izolatov je odpornih proti starejšim antibiotikom, vključujoč peniciline razširjenega spektra, cefalosporine 1. in 2. generacije, aminoglikozide in tetracikline (Bonapace in sod., 2000).

Zdravljenje okužb z MDR *A. baumannii* predstavlja pravi izziv zaradi omejene izbire antibiotikov in tudi zato, ker so najpogostejši izbruhi okužb v enotah intenzivnega zdravljenja, kjer so nastanjeni najbolj ranljivi bolniki.

2.2 MEHANIZMI ODPORNOSTI BAKTERIJE *A. baumannii* PROTI ANTIBIOTIKOM

Bakterija *A. baumannii* je ena izmed najbolj težavnih patogenov, ki se pojavljajo v bolnišničnem okolju. Tako pridobljena kot naravna odpornost prispevata k večkratni odpornosti proti antibiotikom. Pridobljena odpornost je lahko pogojena s pridobivanjem genetskih elementov, ki nosijo informacije za večkratno odpornost ali z mutacijami, ki se odražajo na izražanju porinov in/ali membranskih izlivnih črpalk. Naravna odpornost se izraža preko zmanjšane prepustnosti celične membrane in konstitutivnega izražanja aktivnih sistemov za izčrpavanje (Vila in sod, 2007).

A. baumannii je razvil več mehanizmov, ki mu pomagajo pri boju proti antibiotikom. Glavni trije mehanizmi so: encimska inaktivacija antibiotikov, onemogočanje dostopa do tarčnega mesta v bakterijski celici in spremembe tarčnega mesta delovanja antibiotikov ali celičnih funkcij zaradi mutacij (Singh in sod., 2013).

2.2.1 Encimska inaktivacija antibiotikov

Najbolj pogost mehanizem rezistence pri *A. baumannii* je encimska razgradnja betalaktamskih antibiotikov s pomočjo encimov beta-laktamaz. Vsem sevom *A. baumannii* so skupne kromosomsko kodirane AmpC cefalosporinaze, poznane tudi kot ADCs (angl. *Acinetobacter*-derived cephalosporinases). Ključni element, ki regulira prekomerno izražanje encima je element IS (insercijska sekvenca), znan kot IS*Aba1*, ki se nahaja višje od regije, ki kodira encim. Prisotnost te regije močno sovпада s povečanjem izražanja gena in s pojavom odpornosti proti razširjenemu spektru cefalosporinaz (Peleg in sod., 2008).

Encimi beta-laktamaze hidrolizirajo substance kot so penicilini, sintetični cefalosporini in karbapenemi. V povezavi s karbapenemskimi antibiotiki so odkrili penicilinaze razreda D, tip encimov OXA in metalo-beta-laktamaze (MBL) razreda B, ki predstavljajo velik problem, saj se zapisi za encim nahajajo na mobilnih genskih elementih, ki se zlahka prenašajo med bakterijami (Singh in sod., 2013; Munoz-Price in Weinstein, 2008). Najbolj

problematične beta-laktamaze so tipa OXA. Prvi identificiran encim OXA pri *A. baumannii* je bil leta 1985 na Škotskem. Tipe encimov OXA delimo v štiri glavne skupine: OXA-23, OXA-24, OXA-51 in OXA-58. Med njimi je velika homologija v aminokislinskem zaporedju. Sekvence, ki kodirajo zapise za encime, se nahajajo na kromosomu ali na plazmidu. Skupina OXA-51 ima kodiran zapis le na kromosomu. To je tudi edina skupina encimov OXA, ki je naravno prisotna pri *A. baumannii*. Najpogostejši tip beta-laktamaz OXA pa je encim OXA-23 (Peleg in sod., 2008).

Hitro širjenje sevov *A. baumannii*, ki so odporni proti vsem beta-laktamom, vključujoč karbapeneme, kaže na dejstvo, da je *A. baumannii* sposoben hitrega prilagajanja na različne spremembe v okolju in na selekcijski pritisk (Peleg in sod., 2008). Po sekvenciranju celotnega genoma bakterije *A. baumannii* sta Fourier in Richet (2006) odkrila 86 kilobaz dolg rezistenčni otok v genomu, ki je hkrati tudi en izmed najdaljših opisanih doslej (AbaR1). Izmed skupno 88 predvidevanih odprtih bralnih okvirjev (angl. open reading frame, ORF) znotraj genomske regije, se za 82 ORF predvideva, da izvirajo iz drugih po Gramu negativnih organizmov, kot so *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp. in *Escherichia coli*. Vsebnost baz gvanina in citozina v tej regiji znaša 52,8 %, v primerjavi s celotnim genomom 38,8 %, kar kaže na to, da ima regija tuj izvor. Identificiranih je bilo 52 rezistenčnih genov, od tega se jih 45 nahaja na genomskem otoku AbaR1 (Fournier in Richet, 2006).

Tudi beta-laktamaze razširjenega spektra (ESBL) so že našli pri *A. baumannii*, vendar je laboratorijsko dokazovanje teh encimov oteženo in so zato ti encimi velikokrat spregledani (Peleg in sod., 2008).

2.2.2 Onemogočanje dostopa do tarčnega mesta v bakterijski celici

Zunanjo celično membrano bakterije *A. baumannii* sestavljajo proteini zunanje membrane - porini in membranske izlivne črpalke, ki prispevajo velik delež k mehanizmu odpornosti. Proteini zunanje membrane tvorijo kanalčke v celični membrani in omogočajo transport hidrofilnih molekul preko lipidnega sloja bakterijske membrane. Lahko so tarča za adhezijo na druge celice in za vezavo baktericidnih komponent na površino pri po Gramu negativnih bakterijah. Variacije v njihovi strukturi in regulacija ekspresije porinov sta načina kako se bakterija obrani pred antibiotiki (Vila in sod., 2007). Če primerjamo *A.*

baumannii z drugimi po Gramu negativnimi bakterijami, opazimo, da ima *A. baumannii* manjše število in tudi po velikosti manjše porinske kanalčke, kar prispeva k zmanjšanju prepustnosti zunanje membrane in k naravni odpornosti proti antibiotikom. Odkrili so tudi, da se celična stena bakterije spreminja glede na pogoje v okolju. Tako se v suhem okolju celična stena odebeli in tudi s to spremembo prispeva k večji odpornosti proti visokim temperaturam v okolju (Singh in sod., 2013).

Pri po Gramu negativnih bakterijah zunanja membrana omejuje količino protimikrobnih učinkovin, ki vstopajo v celico, obenem membranske izlivne črpalke aktivno izčrpavajo protimikrobne učinkovine iz bakterije. Sistemi za izčrpavanje so izraženi pri vseh živih celicah, saj jih ščitijo pred toksičnimi komponentami. Tako je velikokrat bakterijska večkratna odpornost povezana s prekomernim izražanjem teh prenašalcev. Protimikrobne učinkovine, ki jih transportni sistemi izčrpajo, morajo v želji po novem vstopu v celico ponovno prečkati slabo permeabilno zunanjo membrano. Najbolj pogosto se izčrpajo tetraciklini, makrolidi in kinoloni (Vila in sod., 2007).

A. baumannii poseduje membranske izlivne črpalke večinoma iz družin MFS (angl. major facilitator family) in RND (angl. resistance-nodulation-division).

2.2.2.1 Družina membranskih izlivnih črpalk MFS

Membranske izlivne črpalke MFS običajno ne služijo kot splošni prenašalci, temveč služijo kot specifični iznašalci za določene razrede protimikrobnih agensov. Delimo jih v skupine Tet, CmlA in MdfA. Izlivne črpalke Tet so odgovorne za odpornost proti tetraciklinu. Gen *tet*, ki nosi zapis za odpornost, se nahaja na transpozonih, ki so vstavljeni v plazmide. Pri *A. baumannii* sta glavni izlivni črpalke v tej skupini Tet(A) in Tet(B). Tet(A) je odgovoren za odpornost proti tetraciklinu, Tet(B) pa proti tetraciklinu in minociklinu. Ti sistemi za izčrpavanje ne vplivajo na nove tetracikline kot so glicilciklini (Vila in sod., 2007).

2.2.2.2 Družina membranskih izlivnih črpalk RND

V to družino črpalk spada sistem AdeABC. Družina AdeABC deluje s pomočjo protonskega gradienta, ki je vir energije za izčrpanje antibiotika. Prekomerno izražanje gena za to membransko izlivno črpalko vodi do odpornosti proti aminoglikozidom, beta-

laktamom, kloramfenikolu, eritromicinu, tetraciklinom in etidijevemu bromidu. Večina tovrstnih prenašalcev reagira z membranskim fuzijskim proteinom (angl. membrane fusion protein, MFP) in z zunanjim membranskim proteinom (angl. outer membrane protein, OMP). Ta interakcija dovoli, da protibakterijska učinkovina prečka notranjo in zunanjo membrano bakterije brez akumulacije v periplazmi. Tako je AdeABC trikomponentni sistem, kjer je AdeA MFP, AdeB je prenašalec in AdeC je OMP. Trije geni, ki kodirajo ta trikomponentni sistem so locirani, en poleg drugega v genomu, so direktno orientirani in tvorijo operon (Vila in sod., 2007).

2.2.3 Spremembe tarč ali celičnih funkcij zaradi mutacij

Pogoste so tudi točkovne mutacije v genih, ki kodirajo tarčne proteine in s tem zmanjšajo afiniteto za protimikrobne substance (Singh in sod., 2013). Bakterija *A. baumannii* je razvila odpornost proti kinolonskim antibiotikom s spremembo v strukturi encima DNA-giraze ali topoizomeraze IV, s pomočjo mutacije v genih *gyrA* ali *parC*. Sprememba rezultira v zmanjšani afiniteti antibiotika do kompleksa encim - DNA (Van Looveren in sod., 2004).

2.3 ANTIBIOTIKI ZA ZDRAVLJENJE OKUŽB, KI JIH POVZROČA *A. baumannii*

Antibiotike uporabljamo v namene zdravljenja bakterijskih okužb. Protimikrobne učinkovine so naravne ali sintetične snovi, ki uničijo ali le začasno zavrejo rast mikroorganizma. Antibiotike glede na učinek na bakterijsko kulturo ločimo na baktericidne, bakteriostatične in bakteriolitične. Bakteriostatiki so pogosto inhibitorji sinteze proteinov in delujejo z vezavo na ribosome. Ob zmanjšanju koncentracije antibiotika, se le ta sprost iz vezavnega mesta na ribosomu in omogočena je ponovna rast bakterije. Baktericidni antibiotiki se močno vežejo na tarče na bakterijski celici in s svojim delovanjem dokončno uničijo celico. Pri tem mrtve bakterijske celice niso uničene in skupno število bakterijskih celic ostane konstanto. V nasprotju pa bakteriolitični antibiotiki s svojim delovanjem povzročijo lizo celice in s tem sprostitev celičnega materiala v okolico. Liza povzroči znižanje števila bakterijskih celic. Bakteriolitični agensi vključujejo antibiotike, ki inhibirajo sintezo celične stene ali poškodujejo celično membrano (Madigan in sod., 2009).

2.3.1 Beta-laktamski antibiotiki

Ena izmed najpomembnejših skupin antibiotikov je skupina beta-laktamov. Beta-laktamski antibiotiki so inhibitorji sinteze celične stene. Ti antibiotiki odločilno vplivajo na proces transpeptidizacije, ki je pomemben korak pri sintezi bakterijske celične stene. Encimi, ki vodijo proces so transpeptidaze in se ob prisotnosti beta-laktamskega antibiotika vežejo nanj, zato jih imenujemo PBPs (angl. penicillin-binding proteins). Ob vezavi PBPs na antibiotik je preprečena reakcija povezovanja peptidnih verig, vendar se sinteza celične stene kljub temu nadaljuje. Novonastala bakterijska celična stena ni dovolj močno povezana in je zato šibkejša v svoji strukturi. Kompleks antibiotik-PBP nadaljnje stimulira sproščanje avtolizinov in bakterijska celica je obsojena na propad (Madigan in sod., 2009).

Med betalaktamske antibiotike spadajo tudi karbapenemi. Njihov spekter delovanja je najširši med znanimi zaviralci sinteze celične stene (Seme, 2002). Karbapenemski antibiotiki ostajajo prva izbira pri zdravljenju okužb z *A. baumannii*, če je bakterija še vedno občutljiva na ta antibiotik (Pankey in Ashcraft, 2008). Žal pa je njihova učinkovitost velikokrat zmanjšana zaradi razvoja karbapenemaz razreda D (Cetin in sod., 2013). Upanje za zdravljenje okužb z *A. baumannii*, ki posedujejo karbapenemaze, je novi sintetični tetraciklinski antibiotik, tigeciklin. Žal pa so se že pojavili prvi sevi, ki izkazujejo zmanjšano občutljivost za tigeciklin (Principe in sod., 2009).

Imipenem spada v skupino karbapenemskih antibiotikov, ki so tudi potencialni kandidati za kombinirano zdravljenje okužb z *A. baumannii*. Kiratisin in sod. so v svoji študiji (2010), pokazali, da je imipenem boljša izbira pri kombiniranem zdravljenju v primerjavi z meropenemom. Pokazali so tudi, da je uspešnost karbapenemskih antibiotikov višja, če jih uporabimo v kombinaciji z drugimi antibiotiki. Antibiotiki, kot je imipenem, so rezervirani za zdravljenje najbolj težkih infekcij zaradi njihove široke aktivnosti in same varnosti uporabe antibiotika (Fouad in sod., 2013).

Karbapenemski antibiotiki ostajajo prva izbira pri zdravljenju okužb z *A. baumannii*, če je bakterija še vedno občutljiva za ta antibiotik (Pankey in Ashcraft, 2008).

2.3.2 Aminoglikozidni antibiotiki

Glavna tarča aminoglikozidnih antibiotikov je ribosomska podenota 30S in s tem zaviranje sinteze proteinov. Z vezavo antibiotika na podenoto 30S se prepreči nastanek skupka med m-RNA, formil-metioninom in t-RNA in s tem je preprečena tvorba novih proteinov (Kotnik, 2002).

2.3.3 Kinoloni

Kinoloni s svojim delovanjem vplivajo na pravilno organizacijo DNA. Antibiotiki reagirajo z bakterijsko DNA girazo in tako preprečijo pravilno navijanje DNA, ki je pomemben korak pri organizaciji molekule DNA v bakterijski celici. Ker se encim DNA giraza nahaja pri po Gramu negativnih in pri po Gramu pozitivnih bakterijah, se kinoloni uporabljajo za zdravljenje okužb s po Gramu negativnimi in po Gramu pozitivnimi bakterijami (Madigan in sod., 2009). Levofloksacin, ki smo ga uporabili pri naši raziskavi spada med fluorokinolonske antibiotike.

2.3.4 Glicilciklini

Tigeciklin je bil junija, leta 2005, odobren s strani Food and Drug Administration za zdravljenje infekcij kože, kožnih struktur in intra-abdominalnih infekcij (Sopirala in sod., 2010). Je 9-glicilamidni derivat minociklina in je prvi predstavnik glicilciklinskih antibiotikov, ki je prešel v klinično uporabo in ki je izkazal širšo aktivnost proti različnim bakterijam, vključujoč *A. baumannii* (Petersen in sod., 2005). Njegovo delovanje proti večkratno odporni vrsti *Acinetobacter* je bakteriostatično (Singh in sod., 2013).

Tigeciklin s svojim delovanjem prepreči povezavo med nabito t-RNA in ribosomom ter s tem onemogoči proces translacije. Velika prednost tigeciklina pred tetraciklini in minociklini je, da na njegovo delovanje ne vplivajo bakterijski obrambni mehanizmi kot so izčrpanje antibiotika s pomočjo membranskih izlivnih črpalk ali mehanizem zaščite ribosomov (Petersen in sod., 2005).

2.3.5 Polimiksini

Kolistin ali polimiksin E in polimiksin B, ki smo ju uporabili za testiranje sinergije, spadata med polimiksinske antibiotike, ki zavirajo delovanje celične membrane.

Polimiksini zmanjšajo integriteto po Gramu negativne bakterijske membrane preko elektrostatske interakcije z negativno nabitimi fosfatnimi ostanki v lipidu A, ki sestavlja lipopolisaharidni (LPS) del membrane. Kolistin poleg porušanja integritete v citoplazemski membrani poveča permeabilnost zunanje membrane za snovi, ki običajno ne morejo prehajati preko membrane, kot so hidrofobni antibiotiki, ki imajo običajno zmanjšano delovanje proti po Gramu negativnim bakterijam (Gordon in sod., 2010).

Zaradi porasta odpornosti *A. baumannii* proti vsem dostopnim antibiotikom se je povečala uporaba polimiksinov, ki so jih v preteklosti opuščali zaradi njihove nefrotoksičnosti in nevrotoksičnosti. Zaradi njihove zmanjšane uporabe ostajajo dvomi o njihovi učinkovitosti, optimalni koncentraciji in njihovem potencialu o morebitnem pojavu odpornosti. V nekaterih primerih je večkratno odporna bakterija *A. baumannii* že razvila heterorezistenco na kolistin in s tem se je pojavil tudi dvom, ali je kolistin dovolj učinkovit proti bakteriji in ali je primeren antibiotik za monoterapijo. Več študij je potrdilo ugodno delovanje kolistina v kombinaciji z drugimi antibiotiki.

Kolistin se je pokazal kot učinkovit antibiotik v boju proti večkratno odporni *A. baumannii*. Znano je, da je toksičen, veliko manj pa vemo o njegovi farmakodinamiki in farmakokinetiki (Kiratisin in sod., 2010).

2.4 KOMBINIRANO ZDRAVLJENJE

Večkratno odporne po Gramu negativne bakterije predstavljajo veliko grožnjo hospitaliziranim bolnikom, ki so v bolnišničnem okolju veliko bolj dovzetni za okužbe in so odgovorne za 30-70 % umrljivost. Pogosta in velikokrat nepotrebna uporaba širokospektralnih antibiotikov pripomoreta k pojavu večkratno odpornih bakterij. Zaradi omejenega izbora antibiotikov, ki so trenutno na tržišču, predstavljajo okužbe z večkratno odpornimi bakterijami veliko skrb (Tamma in sod., 2012). Zato je pomembno, da se nameni več pozornosti izboru antibiotika in premislek ali je res potrebno zdravljenje s protibakterijsko učinkovino.

V primeru široke odpornosti proti trenutno razpoložljivim antibiotikom se v prakso skuša vpeljati kombinirano zdravljenje, kjer bolnik sočasno prejema dva ali več antibiotikov z različnim načinom delovanja. Tovrstno zdravljenje postaja vedno pomembnejše tudi zaradi

dejstva, da nekaj let na tržišče prav gotovo ne bo novih protibakterijskih učinkovin in tudi zato, ker bakterije zelo hitro razvijejo nove mehanizme, ki jim pomagajo pri obrambi pred antibiotiki.

Skupno delovanje kombiniranih antibiotikov je lahko različno. Sinergistični učinek dveh antibiotikov pomeni, da je aktivnost dveh kombiniranih antibiotikov večja v primerjavi s samostojnim delovanjem posameznih antibiotikov. Aditivnost ali indiferenca je pojav, ko je aktivnost kombiniranih antibiotikov enaka aktivnosti samostojnega antibiotika. Lahko se pojavi še antagonistični učinek, kar pomeni, da je aktivnost kombiniranih antibiotikov manjša v primerjavi s samostojnim delovanjem posameznih antibiotikov (Sopirala in sod., 2010).

Za kombinirano zdravljenje okužb s po Gramu negativnimi bakterijami se običajno uporablja kombinacija betalaktamskih in aminoglikozidnih ali fluorokinolonskih antibiotikov. Čeprav teorija podpira kombinirano zdravljenje, ki je potrjeno z *in vitro* modeli in živalskimi študijami, so klinični rezultati nasprotujoči pričakovanjem.

2.4.1 Argumenti za in proti kombiniranemu protimikrobnemu zdravljenju

Kombinirano zdravljenje je podprto s tremi razlogi: (i) zaobjeti večji razpon in delovanje proti bakteriji z antibiotikoma, ki imata različno aktivnost, (ii) izkoristiti sinergijo, ki je bila dosežena *in vitro* med dvema antibiotikoma v primerjavi z enim ali (iii) preprečiti ali odložiti pojav rezistence med zdravljenjem (Tamma in sod., 2012).

Čeprav veliko dejstev govori v prid kombiniranemu zdravljenju, pa še vedno ostaja dvom o primernosti tovrstnega zdravljenja. Dodajanje drugega antibiotika za zdravljenje okužbe s po Gramu negativno bakterijo, ki je občutljiva za prvi antibiotik lahko morda celo vodi do povečanja možnosti odpornosti proti prvemu antibiotiku. Skrb povzročajo tudi antibiotiki, ki so dokazano nefro- in nevrotoksični.

Argumenti za uporabo kombiniranega zdravljenja so naslednji (Tamma in sod., 2012):

- Širok spekter aktivnosti. V času povečevanja okužb s po Gramu negativnimi bakterijami, kombinirano zdravljenje nudi ustreznejšo pokritost v boju proti povzročitelju. Z dodatnim antibiotikom se lahko izognemo neuspešnemu

zdravljenju, hitremu pojavu rezistence in nekaterim dodatnim zapletom med zdravljenjem.

- Prilagoditev terapije za posameznega bolnika. Vsak bolnik je unikaten v smislu zdravstvenega stanja, različnih bolezni, narave infekcije in tudi predhodnega zdravljenja z antibiotiki. Znanje o bolnikovi zdravstveni zgodovini nam omogoči ustrezno izbiranje antibiotika.
- Sinergija. Prednost hkratnega zdravljenja z dvema antibiotikoma je dosežek sinergističnega učinka. S kombinacijo antibiotikov lahko dosežemo tudi nižji koncentracijski odmerek antibiotika, ki je še vedno dovolj učinkovit v boju proti bakteriji.

Argumenti proti uporabi kombiniranega zdravljenja so naslednji (Tamma in sod., 2012):

- Nefrotoksičnost. Aminoglikozidni antibiotiki se akumulirajo v ledvicah. Vežejo se na glikoproteine ledvičnih tubularnih celic, kar je nujno za delovanje zdravila. Ko se aminoglikozidi koncentrirajo v citosolu celice, aktivirajo apoptozo, ki povzroči celično smrt. Pri tem je pomembno omeniti, da so aminoglikozidni antibiotiki nefrotoksični tudi, kadar se ne kombinirajo z drugimi antibiotiki.
- Dodatni zapleti. Kombinirano zdravljenje lahko posledično s sabo prinese več glivnih okužb in potrebo po večkratni kateterizaciji, s čimer bolnika izpostavljammo dodatnim infekcijam. Bolniki, ki so podvrženi okužbi z večkratno odporno bakterijo, prejemajo več zdravil hkrati, kar lahko vodi do neželenih interakcij med učinkovinami, ki lahko nadaljnje vodijo v zaplete.

2.5 LABORATORIJSKE METODE ZA DOLOČANJE *in vitro* UČINKA KOMBINACIJE ANTIBIOTIKOV

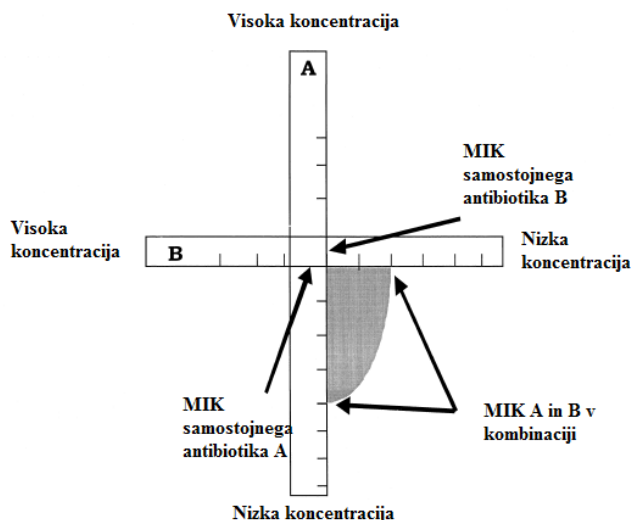
Vedno večje zanimanje za zdravljenje s kombinacijo antibiotikov, ki imajo različno delovanje na bakterijo, vodi do razvijanja metod, s katerimi lahko medsebojni učinek antibiotikov tudi uspešno preverimo. Metode se razlikujejo v izvedbi, tehnični zahtevnosti in času, ki je potreben, da dobimo rezultate. Vsaka od teh lastnosti je pomembna pri izbiri metode, ki jo bomo uporabili za preverjanje sinergističnega učinka.

2.5.1 Metoda navzkrižnega seta difuzijskih gradientov

Relativno nov način določanja sinergističnega učinka antibiotikov temelji na metodi difuzijskega gradienta (Bonapace in sod., 2000). Prvi korak za testiranje sinergističnega učinka je določitev MIK posameznega antibiotika z metodo difuzijskega gradienta.

Metoda navzkrižnega seta difuzijskih gradientov je le ena izmed možnosti preverjanja sinergističnega učinka z metodo difuzijskega gradienta. Pri prvi različici metode navzkrižnega seta difuzijskih gradientov položimo dve membrani z impregniranimi rastočimi koncentracijami antibiotika pravokotno eno na drugo na mestu določene MIK posameznega antibiotika (Slika 1). Pri drugi različici metode je en antibiotik že vgrajen v trdno gojišče in se nato nanj položi membrana z impregniranimi rastočimi koncentracijami drugega antibiotika. Pri tretji različici metode pa se položi prva membrana na gojišče, inkubira eno uro, odstrani in nato na odtis prve položi druga membrana in ponovno inkubira 24 ur (Sopirala in sod., 2010). Pri vseh treh različicah je zadnji korak izvedbe izračun vrednosti FIC (angl. fractional inhibitory concentration index), ki nam pove do kakšnega medsebojnega delovanja antibiotikov je prišlo.

Dobri lastnosti metode sta enostavna in hitra izvedba. Čeprav bi si želeli, da nam metoda daje najbolj zanesljive rezultate, temu ni tako. Metoda navzkrižnega seta difuzijskih gradientov se v številnih primerih izkaže za neustrezno in slabo zanesljivo.



Slika 1: Pravilna postavitev E-testov pri izvajanju sinergističnega testa z metodo navzkrižnega seta difuzijskih gradientov in odčitanje vrednosti MIK antibiotika v kombinaciji (Bonapace in sod., 2000: 46)

2.5.2 Metoda šahovnice

Metoda šahovnice je mikrodilucijska metoda, ki jo izvajamo v mikrotitrski ploščici. Je nekoliko bolj tehnično zahtevna metoda in tudi dolgotrajna. Predpogoj za preverjanje sinergističnega učinka antibiotikov je določitev MIK antibiotikov, ki jih želimo testirati. MIK antibiotikov določimo z mikrodilucijsko metodo. Določene MIK nam služijo kot orientacija za načrtovanje metode šahovnice. Za preverjanje sinergističnega učinka dveh antibiotikov določimo razpon testiranih koncentracij za vsak antibiotik. Tako se vsaka koncentracija prvega antibiotika kombinira z vsako koncentracijo drugega antibiotika. To dosežemo s konfiguracijo kvadrata (npr. 8×8), ki posnema šahovnico. Delovanje antibiotikov tako kot pri metodi navzkrižnega seta difuzijskih gradientov opredelimo z izračunom vrednosti FIC (Bonapace in sod., 2000).

2.5.3 Metoda time-kill

Metoda time-kill je dinamična metoda, ki nam omogoča ugotavljanje koncentracijsko in časovno odvisne baktericidne aktivnosti antibiotikov. Glede na raziskave daje najbolj zanesljive rezultate in zato velikokrat služi kot potrditvena metoda ostalih dveh metod za določanje sinergističnega učinka. Poleg metode šahovnice je to najbolj uporabljena metoda (Petersen in sod., 2005). Pri metodi time-kill ne računamo vrednosti FIC, temveč

medsebojni učinek antibiotikov opredelimo glede na logaritemsko zmanjšanje bakterijske rasti pri kombiniranih antibiotikih v primerjavi z najbolj aktivno samostojno učinkovino. Slaba stran metode time-kill je časovna zamudnost in zahtevnost tehnične izvedbe, zato se v rutinskih laboratorijih zelo redko uporablja (Tan in sod., 2007).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 BAKTERIJSKI IZOLATI

V raziskavo smo vključili 15 večkratno odpornih bakterijskih izolatov *A. baumannii*, osamljenih pri 15 bolnikih, ki so bili hospitalizirani v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani v obdobju 12 mesecev (od novembra 2012 do oktobra 2013).

Vsi bakterijski izolati so bili izolirani iz spodnjih dihal, v Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Vsi izolati so bili do uporabe shranjeni pri -80 °C.

Vseh 15 izolatov je bilo odpornih proti imipenemu, ceftazidimu, piperacilinu s tazobaktamom, ciprofloksacinu, gentamicinu in amikacinu. Proti ampicilinu s sulbaktamom in levofloksacinu je bilo odpornih 13 izolatov. Proti trimetoprim-sulfametoksazolu je bilo odpornih prvih 8 izolatov, ostalih 7 je bilo zanj občutljivih. Vsi izolati so bili občutljivi za kolistin, razen enega (Preglednica 1). Izolati niso bili testirani za občutljivost na meropenem in doripenem.

Kot kontrolo kakovosti uporabljenih metod smo uporabili referenčna seva: *Escherichia coli* ATCC 25922 in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Preglednica 1: Občutljivost izbranih 15 izolatov za antibiotike, ki se uporabljajo za zdravljenje okužb z *A. baumannii*.

Izolat	Antibiotik									
	CAZ	IP	TZP	SAM	CIP	LE	GM	AN	SXT	CO
1	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S
2	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S
3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
9	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
10	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
11	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
12	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
13	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
14	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
15	R	R	R	I	R	I	R	R	S	S

CAZ, ceftazidim; IP, imipenem; TZP, piperacilin s tazobaktamom; SAM, ampicilin s sulbaktamom; CIP, ciprofloksacin; LE, levofloksacin; GM, gentamicin; AN, amikacin; SXT, trimetoprim-sulfametoksazol; CO, kolistin; R, rezistenten; S, občutljiv; I, intermediaren.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava uporabljenih gojišč

Krvni agar (KA)

Za pripravo krvnega agarja smo na 1 L čiste vode dodali 40 g pripravljene mešanice BBL™ Infusion Agar (Blood Agar Base) (BD, Sparks, ZDA). Mešanica je sestavljena iz:

2,0 srčno-mišičnega ekstrakta,

13,0 g pankreasno razgrajenega kazeina,

5,0 g kvasnega ekstrakta,

5,0 g NaCl in

15,0 g agarja.

Nastalo zmes smo avtoklavirali in nato dodali 5 % sterilno govejo kri, citrano z natrijevim citratom.

Mueller-Hinton agar (MH)

Za pripravo Mueller-Hinton agarja smo na 1 L čiste vode dodali 38 g pripravljene mešanice BBL™ Brain Heart Infusion Agar (BD, Sparks, ZDA), ki je sestavljena iz:

2,0 g govejega ekstrakta,

17,5 g kislega hidrolizata kazeina,

1,5 g škroba in

17,0 g agarja.

Kationsko prilagojen Mueller-Hinton bujon (MHB)

Za pripravo kationsko prilagojenega Mueller-Hinton bujona smo na 1 L čiste vode dodali 22 g pripravljene mešanice BBL™ Mueller Hinton II Broth Cation Adjusted (BD, Sparks, ZDA), ki je sestavljena iz:

3,0 g govejega ekstrakta,

17,5 g kislega hidrolizata kazeina in

1,5 g škroba.

3.2.2 Priprava bakterijskih izolatov in bakterijske suspenzije

Izolate, ki so bili zamrznjeni pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ smo najprej odmrznili in jih nacepili na osnovno gojišče KA ter inkubirali pri $35 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po 24-urni inkubaciji smo jih ponovno precepili na KA in inkubirali pri $35 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 24 ur.

3.2.3 Izbor in priprava antibiotikov

Antibiotiki, ki smo jih uporabili za testiranje sinergije pri *A. baumannii* so bili izbrani po pregledu antibiogramov posameznih izolatov, po pregledu literature ter na podlagi rezultatov študij. Protibakterijske učinkovine, ki smo jih vključili v testiranje so bile: imipenem, kolistin, levofloksacin, polimiksin B in tigeciklin.

Za ugotavljanje sinergističnega učinka smo kombinirali po dva antibiotika, in sicer: tigeciklin in imipenem, tigeciklin in kolistin, tigeciklin in levofloksacin ter polimiksin B in imipenem.

Za določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) z metodo difuzijskega gradienta in z metodo mikrodilucije smo za vsak antibiotik pripravili razpon koncentracij, ki so navedene v Preglednici 2. Založna koncentracija antibiotika je bila pripravljena v redestilirani vodi in je vedno predstavljala stokratno koncentracijo najvišje testirane koncentracije antibiotika. Nadaljnje redčenje antibiotika je bilo opravljeno v kationsko prilagojenem Mueller-Hinton bujonu.

Preglednica 2: Antibiotiki in razpon njihovih koncentracij, ki smo jih testirali pri vseh 15 izolatih *A. baumannii*

Antibiotik	Razpon testiranih koncentracij ($\mu\text{g/mL}$)
Imipenem	0,002 – 32
Kolistin	0,016 - 256
Levofloksacin	0,002 – 32
Polimiksin B	0,064 – 1024
Tigeciklin	0,016 – 256

3.2.4 Določanje minimalne inhibitorne koncentracije

Za določanje sinergističnega učinka kombinacije antibiotikov smo najprej morali določiti MIK posameznih antibiotikov. MIK smo določali z mikrodilucijsko metodo in metodo difuzijskega gradienta.

3.2.4.1 Metoda difuzijskega gradienta

Pri vseh 15 izolatih iz zbirke bakterijskih izolatov Laboratorija za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani smo s pomočjo metode difuzijskega gradienta z uporabo E-testov (bioMérieux SA, Lyon, France) določili minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK).

Po 24 urni inkubaciji pri 35 ± 1 °C smo iz čistih kultur na KA pripravili bakterijsko suspenzijo v fiziološki raztopini in jo prilagodili na gostoto 0,5 po McFarlandu (McF). Pripravljeno suspenzijo smo s pomočjo sterilnega vatiranega brisa konfluentno razmazali na MH agar. Nato smo nanj položili ustrezen E-test.

Plošče smo inkubirali pri 35 ± 1 °C, 24 ur.

Po inkubaciji smo odčitali MIK za vsak antibiotik. MIK smo odčitali na presečišču inhibicijske cone bakterijske rasti z ustrežno koncentracijo antibiotika na impregniranem traku. Odčitane MIK smo interpretirali na osnovi smernic CLSI (CLSI, 2013).

3.2.4.2 Mikrodilucijska metoda

S pomočjo mikrodilucije smo določili MIK za vseh 15 izbranih izolatov iz zbirke in jih nato uporabili kot vodilo za načrtovanje preverjanja učinka sinergije s pomočjo metode šahovnice in time-kill. Mikrodilucijo smo opravili v mikrotitrski ploščici. Vsi antibiotiki, ki smo jih testirali, so produkti proizvajalca Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

Priprava inokuluma

Po 24 urni inkubaciji pri 35 ± 1 °C smo iz čistih kultur na KA pripravili bakterijsko suspenzijo v fiziološki raztopini in jo prilagodili na gostoto 0,5 McF. Prilagojeno bakterijsko suspenzijo smo nato redčili v MHB v razmerju 1:20. V 9,5 mL MHB smo dodali 0,5 mL bakterijske suspenzije in vorteksirali 15 – 20 sekund. Tako pripravljen inokulum je vseboval $\sim 5 \times 10^6$ CFU/mL.

Vsaka luknjica mikrotitrne ploščice je vsebovala 0,1 mL ustrezne koncentracije antibiotika, redčenega v MHB. K temu smo dodali 0,01 mL pripravljenega inokuluma in tako je vsaka luknjica po dodatku bakterijskega inokuluma vsebovala $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL. Mikrotitrne ploščice smo inkubirali pri 35 ± 1 °C, 16 – 20 ur.

Po inkubaciji smo pregledali mikrotitrne plošče in določili MIK testiranih antibiotikov. Ta je določena s prvo bistro luknjico, kjer je inhibirana bakterijska rast. Določene MIK testiranih antibiotikov smo interpretirali na osnovi smernic CLSI (CLSI, 2013).

3.2.5 Določanje sinergističnega učinka kombinacije antibiotikov

3.2.5.1 Navzkrižni set difuzijskih gradientov

Z metodo navzkrižnega seta difuzijskih gradientov smo določili sinergistični učinek dveh antibiotikov s pomočjo membran z impregniranim antibiotikom. Metodo smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca membran z impregniranim antibiotikom (Liofilchem, 2012).

Iz čiste kulture na KA, po 24 urni inkubaciji pri 35 ± 1 °C, smo pripravili bakterijsko suspenzijo v fiziološki raztopini in jo prilagodili na gostoto 0,5 McF. Pripravljeno suspenzijo smo s pomočjo sterilnega vatiranega brisa konfluentno razmazali na MH agar. E-testa smo položili pravokotno drug na drugega tako, da je bilo njuno presečišče v točki predhodno določenih MIK. Pravilno postavitve membran z impregniranim antibiotikom nam kaže Slika 1. Plošče smo inkubirali pri 35 ± 1 °C, 24 ur.

Po inkubaciji smo pregledali plošče in odčitali vrednosti MIK posameznega antibiotika. MIK v kombinaciji smo odčitali tako, kot nam prikazuje Slika 1.

Nato smo s pomočjo formule (1) izračunali vrednost FIC, ki nam pove na kakšen način delujeta antibiotika v kombinaciji.

$$FIC = (MIK_{AB} \div MIK_A) + (MIK_{BA} \div MIK_B) \quad \dots(1)$$

MIK_A ... MIK antibiotika A

MIK_B ... MIK antibiotika B

MIK_{AB} ... MIK antibiotika A v prisotnosti antibiotika B

MIK_{BA} ... MIK antibiotika B v prisotnosti antibiotika A

Interpretacija vrednosti FIC:

$FIC \leq 0,5$... sinergija,

$FIC > 0,5$ in $\leq 4,0$... indiferenca ali aditivnost,

$FIC > 4$... antagonizem.

3.2.5.2 Metoda šahovnice

Po določitvi MIK posameznega antibiotika smo določili razpon koncentracij antibiotikov, ki smo jih kombinirali med sabo. Z mikrodilucijsko metodo določen MIK nam je služil kot najvišja testirana koncentracija antibiotika, dodali smo še 7 nižjih koncentracij. Tako smo v x smeri mikrotitrne ploščice nanašali naraščajoče koncentracije enega antibiotika in v y smeri naraščajoče koncentracije drugega antibiotika. Dobili smo konfiguracijo 8×8. S tem smo dosegli kombinacijo vseh koncentracij dveh antibiotikov. V vsako vdolbinico smo dodali 0,05 mL enega antibiotika in 0,05 mL drugega antibiotika ter 0,01 mL bakterijskega inokuluma, pripravljenega po istem postopku kot za mikrodilucijo. Pozitivno kontrolo je predstavljala luknjica z 0,1 mL bakterijskega inokuluma brez dodanega antibiotika. Mikrotitrne ploščice smo inkubirali pri 35 ± 1 °C, 16 – 20 ur.

Po inkubaciji smo pregledali mikrotitrne ploščice. V luknjicah, ki niso kazale bakterijske rasti je prišlo do uspešnega delovanja antibiotikov. Tako kot pri metodi navzkrižnega seta smo s pomočjo formule (1) izračunali vrednost FIC in opredelili delovanje kombiniranih antibiotikov.

3.2.5.3 Metoda time-kill

Tretja metoda, ki smo jo izbrali za preverjanje sinergističnega učinka kombinacije antibiotikov, je makrodilucijska metoda, imenovana time-kill.

Rastna krivulja

Za uspešno testiranje sinergističnega učinka z metodo time-kill smo morali določiti čas, v katerem se bakterija *A. baumannii* nahaja v logritemski fazi rasti. Tako smo najprej izdelali rastno krivuljo.

Po 24 urni inkubaciji pri 35 ± 1 °C smo iz čistih kultur na KA pripravili bakterijsko suspenzijo v kationsko prilagojenem Mueller-Hinton bujonu in jo prilagodili na gostoto 0,5 McF. 0,1 mL prilagojene bakterijske suspenzije smo prenesli v stekleno epruveto s 5 mL MHB. Tako pripravljen inokulum smo vorteksirali 15-20 sekund. Delali smo v trikratniku. Takoj po pripravi inokuluma in tudi vsako uro po inokulaciji smo iz vsake epruvete odvzeli 0,1 mL alikvota in ga redčili v 0,9 mL fiziološke raztopine do 10^{-5} . 0,1 mL vsake redčine smo konfluentno namazali na KA in plošče inkubirali 24 ur pri 35 ± 1 °C. Po 24 urah smo

prešteli zrasle kolonije na števni ploščah. Števne plošče so tiste, na katerih je poraslo od 30 do 300 kolonij. Izračunali smo število celic v CFU/mL in s pomočjo programa Excel narisali rastno krivuljo.

Izvedba metode time-kill

Pred začetkom testiranja z metodo time-kill, smo morali določiti nekaj parametrov. Najprej smo z mikrodilucijsko metodo določili MIK posameznega antibiotika pri vsakem bakterijskem izolatu. Z metodo time-kill smo testirali le izolate, ki so pri metodi šahovnice pri določeni kombinaciji antibiotikov že izkazali sinergijo. Ker smo torej pričakovali sinergijo, smo testirali kombinacije antibiotikov pri eni četrtni in eni osmini MIK vsakega antibiotika. Tako smo za vsak izolat testirali prvi antibiotik pri eni četrtni MIK, pri eni osmini MIK in enako za drugi antibiotik. Nato pa še kombinacijo dveh antibiotikov pri eni četrtni MIK in kombinacijo antibiotikov pri eni osmini MIK. Za vsak izolat smo imeli še kontrolo rasti, pri kateri epruveta ni vsebovala antibiotika. Določiti smo morali tudi čas vzorčenja. Odločili smo se, da bomo vzorčili pri času 0, torej takoj po dodatku inokuluma v epruveto z antibiotiki, nato pa še po 2, 4, 6 in 24 urah. Ob vsaki meritvi smo iz posamezne epruvete odvzeli alikvot 0,1 mL, ki smo ga nadaljnje redčili v 0,9 mL fiziološke raztopine. Ob času nič smo vse vzorce desetkratno redčili do 10^{-4} . Pri vseh naslednjih vzorčenjih smo vzorce desetkratno redčili glede na vidno motnost vzorca. Rahlo motne vzorce smo redčili do 10^{-5} , močno motne vzorce do 10^{-6} . Iz vsake redčine vzorca smo odvzeli alikvot volumna 0,1 mL in ga konfluentno razmazali na ploščo KA. Plošče smo inkubirali 16-20 ur pri 35 ± 1 °C. Po inkubaciji smo prešteli porasle kolonije in pri rezultatih upoštevali le tiste, ki so bile števne.

Priprava inokuluma in inokulacija

Po 24 urni inkubaciji pri 35 ± 1 °C smo iz čistih kultur na KA pripravili bakterijsko suspenzijo v kationsko prilagojenem Mueller-Hinton bujonu in jo prilagodili na gostoto 0,5 McF. Iz prilagojene suspenzije smo odvzeli 0,1 mL in ga prenesli v 5 mL kationsko prilagojenega Mueller-Hinton bujona. Tako pripravljen inokulum smo inkubirali v stresalniku pri 35 °C na 200 rpm (angl. revolutions per minute) do optične gostote OD_{595} 0,2.

Za pravilno izvajanje preverjanja sinergije antibiotikov z metodo time-kill mora biti bakterija na začetku testiranja v logaritemski fazi rasti (Slika 3). Na podlagi prej določene rastne krivulje za *A. baumannii* je to med 6 in 7 uro po začetku inkubacije pripravljenega inokuluma pri OD₅₉₅ 0,2. Nato smo prilagodili motnost suspenzije v fiziološki raztopini na 1,0 McF, kar odraža približno 3×10^8 CFU/mL. Standardizirano suspenzijo smo redčili 1:5 tako, da smo 1 mL suspenzije dodali k 4 mL MHB, kar odraža približno 6×10^7 CFU/mL. Tako pripravljen inokulum smo v volumnu 0,1 mL dodali v vsako epruveto, ki je vsebovala 10 mL MHB z antibiotiki ali brez (kontrola rasti).

Za vsak izolat smo pripravili 7 epruvet, ki so vsebovale:

- 1) 10 mL kationsko prilagojenega Mueller-Hinton bujona,
- 2) 9,8 mL MHB + 0,2 mL antibiotika 1 pri $0,25 \times$ MIK,
- 3) 9,8 mL MHB + 0,2 mL antibiotika 1 pri $0,125 \times$ MIK,
- 4) 9,8 mL MHB + 0,2 mL antibiotika 2 pri $0,25 \times$ MIK,
- 5) 9,8 mL MHB + 0,2 mL antibiotika 2 pri $0,125 \times$ MIK,
- 6) 9,8 mL MHB + 0,1 mL antibiotika 1 in 0,1 mL antibiotika 2 (oba pri $0,25 \times$ MIK),
- 7) 9,8 mL MHB + 0,1 mL antibiotika 1 in 0,1 mL antibiotika 2 (oba pri $0,125 \times$ MIK).

Interpretacija rezultatov

Po 24 urni inkubaciji smo pregledali vse plošče KA in prešteli kolonije. Upoštevali smo le plošče, ki so bile števne in nato izračunali CFU/mL ter \log_{10} za vsako kombinacijo antibiotikov. S pridobljenimi rezultati smo narisali grafe, pri katerih x os predstavlja čas (ure) vzorčenja, y os pa \log_{10} CFU/mL. Na vsakem grafu so narisane krivulje rastne kontrole, posameznega antibiotika in antibiotika v ustrezni kombinaciji.

Sinergija je potrjena v primeru, da zaznamo $\geq 2\text{-}\log_{10}$ zmanjšanje bakterijske rasti pri kombinaciji antibiotikov v primerjavi z najbolj aktivnim uspešnim samostojnim antibiotikom (Slika 5). Antagonizem je potrjen v primeru, da zaznamo $\geq 2\text{-}\log_{10}$ povečanje bakterijske rasti pri kombinaciji antibiotikov v primerjavi z najbolj aktivnim uspešnim samostojnim antibiotikom (Slika 6). Indiferenca je potrjena v primeru, da zaznamo $< 2\text{-}\log_{10}$ povečanje ali zmanjšanje bakterijske rasti pri kombinaciji antibiotikov v primerjavi z najbolj aktivnim uspešnim samostojnim antibiotikom (Sopirala in sod., 2010) ali

kateriokoli drugi izid, ki ne spada v definicijo sinergije ali antagonizma (Bonapace in sod., 2000) (Slika 7).

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE MIK ANTIBIOTIKOV Z METODO DIFUZIJSKEGA GRADIENTA IN Z METODO MIKRODILUCIJE

V raziskavo smo vključili 15 večkratno odpornih bakterijskih izolatov *A. baumannii*. Pri vseh izolatih smo določili MIK za imipenem, kolistin, levofloksacin, polimiksin B in tigeciklin z metodo difuzijskega gradienta in z mikrodilucijo.

Na podlagi vrednosti MIK z mikrodilucijsko metodo smo ugotovili, da so bili vsi bakterijski izolati, razen enega, odporni proti imipenemu. Proti kolistinu je bilo odpornih 10 izolatov, občutljivih je bilo 5. Proti polimiksinu B sta bila odporna dva izolata, občutljivih je bilo 13. Za levofloksacin je bil občutljiv le en izolat. Za tigeciklin po smernicah CLSI ni interpretacije.

Z metodama smo določili različne MIK, kar smo tudi pričakovali. V Preglednici 3 so zbrani rezultati določanja MIK in pripisane interpretacije občutljivosti. Največja razlika med metodama se kaže pri določenih MIK za tigeciklin, kjer smo z mikrodilucijo določili precej višje MIK. Največje odstopanje vrednosti od ostalih opazimo pri izolatu št. 4 pri MIK za kolistin. Pri 3 izolatih smo z obema metodama določili enako MIK za imipenem in pri enem izolatu za polimiksin B. Kategorično neujemanje rezultatov gradientne in dilucijske metode smo ugotovili pri več izolatih. V največ primerih smo z metodo difuzijskega gradienta ugotovili občutljivost, medtem ko smo z mikrodilucijo ugotovili odpornost izolata na antibiotik. To se je zgodilo pri enem izolatu pri imipenemu in pri polimiksinu B in pri 10 izolatih pri kolistinu. Odpornost izolata, ugotovljeno z difuzijsko metodo, in občutljivost izolata z mikrodilucijo smo ugotovili s po enim izolatom pri imipenemu in pri levofloksacinu. Pri določanju občutljivosti izolatov za levofloksacin smo pri 2 izolatih z metodo difuzijskega gradienta določili indiferenco, z mikrodilucijo pa odpornost. En takšen primer smo ugotovili tudi pri polimiksinu B. Določene MIK so se razlikovale v večini primerov za več kot 3 razredčine. Pri nekaterih izolatih smo z metodo difuzijskega gradienta določili višje MIK in z mikrodilucijo nižje, pri nekaterih pa ravno obratno.

Preglednica 3: Pregled in primerjava MIK, določenih z metodo difuzijskega gradienta in z mikrodilucijo pri 15 izolatih *A. baumannii*

Izolat	MIK ($\mu\text{g/mL}$)									
	Metoda difuzijskega gradienta					Mikrodilucija				
	IP	CO	LE	PO	TGC	IP	CO	LE	PO	TGC
1	32 (R)	0,38 (S)	32 (R)	0,5 (S)	6 (ni)	32 (R)	24 (R)	24 (R)	4 (R)	64 (ni)
2	2 (S)	0,094 (S)	4 (I)	0,38 (S)	4 (ni)	1,5 (R)	1,5 (S)	8 (R)	1 (S)	48 (ni)
3	32 (R)	0,094 (S)	32 (R)	0,25 (S)	4 (ni)	24 (R)	1,5 (S)	24 (R)	1,5 (S)	64 (ni)
4	32 (R)	0,75 (S)	32 (R)	3 (I)	6 (ni)	16 (R)	256 (R)	24 (R)	12 (R)	64 (ni)
5	32 (R)	0,125 (S)	32 (R)	0,38 (S)	3 (ni)	32 (R)	2 (S)	8 (R)	0,5 (S)	48 (ni)
6	32 (R)	0,125 (S)	32 (R)	0,38 (S)	4 (ni)	32 (R)	1,5 (S)	12 (R)	0,75 (S)	48 (ni)
7	32 (R)	0,094 (S)	32 (R)	0,38 (S)	8 (ni)	16 (R)	1,5 (S)	>32 (R)	1 (S)	64 (ni)
8	32 (R)	0,094 (S)	32 (R)	0,38 (S)	6 (ni)	16 (R)	8 (R)	24 (R)	0,38 (S)	48 (ni)
9	32 (R)	0,125 (S)	32 (R)	0,5 (S)	6 (ni)	0,38 (S)	4 (R)	12 (R)	1,5 (S)	16 (ni)
10	32 (R)	0,094 (S)	32 (R)	0,38 (S)	4 (ni)	24 (R)	4 (R)	24 (R)	2 (S)	16 (ni)
11	32 (R)	0,125 (S)	32 (R)	0,38 (S)	6 (ni)	24 (R)	3 (R)	24 (R)	1,5 (S)	16 (ni)
12	32 (R)	0,094 (S)	32 (R)	0,38 (S)	4 (ni)	>32 (R)	4 (R)	12 (R)	1,5 (S)	12 (ni)
13	32 (R)	0,125 (S)	32 (R)	0,5 (S)	4 (ni)	>32 (R)	4 (R)	0,19 (S)	2 (S)	16 (ni)
14	32 (R)	0,125 (S)	32 (R)	0,38 (S)	4 (ni)	24 (R)	4 (R)	24 (R)	1,5 (S)	16 (ni)
15	32 (R)	0,125 (S)	6 (I)	0,38 (S)	4 (ni)	16 (R)	3 (R)	12 (R)	1,5 (S)	12 (ni)

IP, imipenem; CO, kolistin; LE, levofloksacin; PO, polimiksin B, TGC, tigeciklin; R, rezistenten; S, občutljiv; I, intermediaren; ni, ni interpretacije.

4.2 DOLOČANJE SINERGISTIČNEGA UČINKA Z NAVZKRIŽNIM SETOM DIFUZIJSKIH GRADIENTOV

V raziskavo smo vključili 15 večkratno odpornih bakterijskih izolatov *A. baumannii*. Pri vseh izolatih smo določili MIK imipenema, kolistina, levofloksacina, polimiksina B in tigeciklina z metodo difuzijskega gradienta. Po določitvi MIK za vsak posamezni antibiotik smo izvedli preverjanje sinergije s pomočjo metode navzkrižnega seta (Slika 2). Pri kombinacijah tigeciklin in kolistin, tigeciklin in imipenem ter tigeciklin in levofloksacin smo testirali 7 bakterijskih izolatov. Pri kombinaciji tigeciklina s kolistinom smo v 6 primerih opazili indiferenco in v enem primeru popolno odsotnost kakršnega koli učinka, torej rezultat, da ni sinergije. Pri ostalih dveh kombinacijah nismo opazili nobenega sinergističnega delovanja dveh antibiotikov. Oznaka »ni učinka« pomeni, da je bakterija prerasla celotno površino agarске plošče, brez pojava inhibicijske cone ob impregniranem membranskem traku.

Na podlagi rezultatov za vse tri kombinacije s tigeciklinom, ki niso pokazale nobenega pozitivnega učinka skupnega delovanja dveh antibiotikov in zaradi velikih težav z dobavo E-testov za tigeciklin smo se odločili, da v nadaljevanju ne bomo testirali ostalih bakterijskih izolatov.

Pri kombinaciji antibiotikov polimiksina B in imipenema smo testirali vseh 15 bakterijskih izolatov. Pri 8 bakterijskih izolatih je bil rezultat kombiniranja indiferenca, pri 7 izolatih ni bilo učinka medsebojnega delovanja antibiotikov, kar smo v Preglednici 4 označili kot »ni učinka«. Za tigeciklin po smernicah CLSI ni interpretacije.

Preglednica 4: Rezultati določanja MIK z metodo difuzijskega gradienta in rezultati metode navzkrižnega seta difuzijskih gradientov za testirane kombinacije antibiotikov pri 15 izolatih *A. baumannii*

Izolat	MIK ($\mu\text{g/mL}$)								
	IP	CO	LE	PO	TGC	TGC/IP	TGC/CO	TGC/LE	PO/IP
1	32 (R)	0,38 (S)	32 (R)	0,5 (S)	6	>256/>32 (ni učinka)	4/0,25 (Ind)	>256/>32 (ni učinka)	0,5/32 (Ind)
2	2 (S)	0,094 (S)	4 (I)	0,38 (S)	4	1,5/1 (Ind)	3/0,047 (Ind)	>256/>32 (ni učinka)	0,25/1,5 (Ind)
3	32 (R)	0,094 (S)	32 (R)	0,25 (S)	4	>256/>32 (ni učinka)	3/0,067 (Ind)	>256/>32 (ni učinka)	0,5/32 (Ind)
4	32 (R)	0,75 (S)	32 (R)	3 (I)	6	>256/>32 (ni učinka)	4/0,5 (Ind)	>256/>32 (ni učinka)	1,5/32 (Ind)
5	32 (R)	0,125 (S)	32 (R)	0,38 (S)	3	>256/>32 (ni učinka)	>256/>256 (ni učinka)	>256/>32 (ni učinka)	1/32 (Ind)
6	32 (R)	0,125 (S)	32 (R)	0,38 (S)	4	>256/>32 (ni učinka)	3/0,064 (Ind)	>256/>32 (ni učinka)	1/32 (Ind)
7	32 (R)	0,094 (S)	32 (R)	0,38 (S)	8	>256/>32 (ni učinka)	6/0,064 (Ind)	>256/>32 (ni učinka)	0,38/32 (Ind)
8	32 (R)	0,094 (S)	32 (R)	0,38 (S)	6	nn	nn	nn	0,38/32 (Ind)
9	32 (R)	0,125 (S)	32 (R)	0,5 (S)	6	nn	nn	nn	>1024/>32 (ni učinka)
10	32 (R)	0,094 (S)	32 (R)	0,38 (S)	4	nn	nn	nn	>1024/>32 (ni učinka)
11	32 (R)	0,125 (S)	32 (R)	0,38 (S)	6	nn	nn	nn	>1024/>32 (ni učinka)
12	32 (R)	0,094 (S)	32 (R)	0,38 (S)	4	nn	nn	nn	>1024/>32 (ni učinka)
13	32 (R)	0,125 (S)	32 (R)	0,5 (S)	4	nn	nn	nn	>1024/>32 (ni učinka)
14	32 (R)	0,125 (S)	32 (R)	0,38 (S)	4	nn	nn	nn	>1024/>32 (ni učinka)
15	32 (R)	0,125 (S)	6 (I)	0,38 (S)	4	nn	nn	nn	>1024/>32 (ni učinka)

IP, imipenem; CO, kolistin; LE, levofloksacin; PO, polimiksin B, TGC, tigeciklin; R, rezistenten; S, občutljiv; I, intermediaren; Ind, indifferenca; nn, ni narejeno.



Slika 2: Prikaz metode navzkrižnega seta difuzijskih gradientov in rezultat testiranja sinergije antibiotikov tigeciklina in kolistina

4.3 DOLOČANJE SINERGISTIČNEGA UČINKA Z METODO ŠAHOVNICE

Da bi ovrednotili učinek kombinacij antibiotikov, smo izračunali vrednost FIC. Na podlagi vrednosti smo določili, ali gre za sinergistični učinek ali je prišlo do indiference ali do antagonizma.

Kot uspešni kombinaciji, pri katerih smo opazili pojav sinergije, sta se izkazali kombinaciji tigeciklina in kolistina ter polimiksina B in imipenema. Kombinacija polimiksina B in imipenema je imela sinergistični učinek pri 7 izolatih, kombinacija tigeciklina in kolistina pa pri 14 izolatih. Kombinacijo antibiotikov pri izolatih, kjer smo v vseh luknjicah še vedno opazili bakterijsko rast in torej nismo določili nobenega skupnega delovanja kombiniranih antibiotikov, smo označili kot »ni učinka« (Preglednica 5).

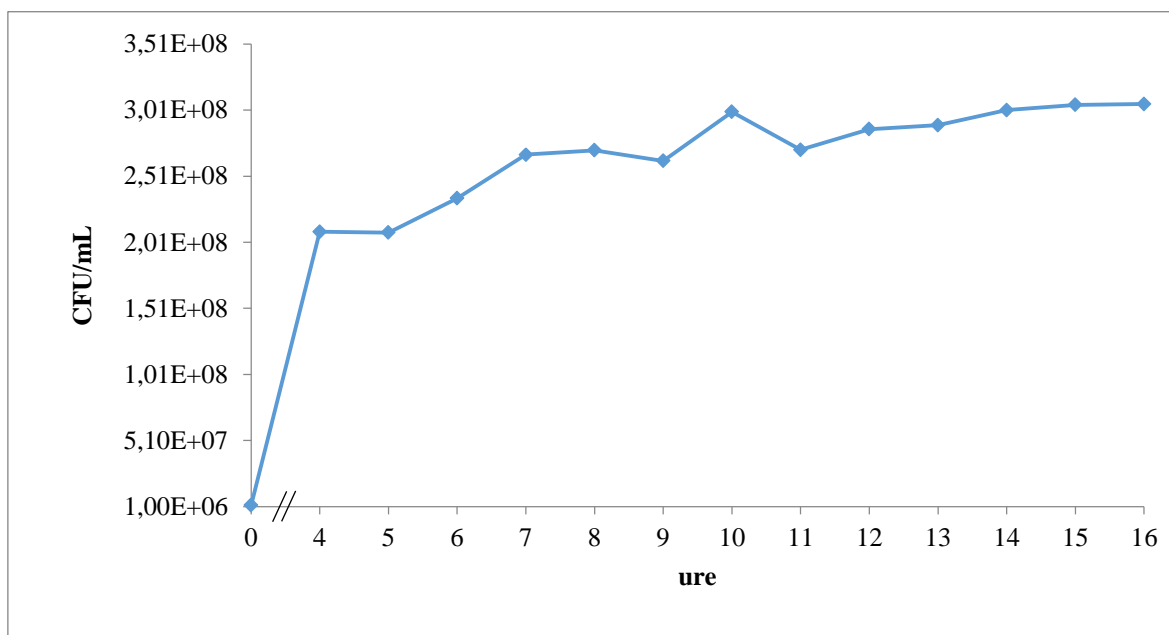
Preglednica 5: Rezultati določanja MIK z mikrodilucijo in rezultati metode šahovnice za vse testirane kombinacije antibiotikov pri 15 izolatih *A. baumannii*

Izolat	MIK ($\mu\text{g/mL}$)								
	IP	CO	LE	PO	TGC	TGC/IP	TGC/CO	TGC/LE	PO/IP
1	32 (R)	24 (R)	24 (R)	4 (R)	64	>64/>32 (ni učinka)	12/1 (Sin)	6/24 (Ind)	4/12 (Ind)
2	1,5 (R)	1,5 (S)	8 (R)	1 (S)	4	4/1,5 (Ind)	8/0,094 (Sin)	4/8 (Ind)	1/0,19 (Ind)
3	24 (R)	1,5 (S)	24 (R)	1,5 (S)	64	6/24 (Ind)	12/0,094 (Sin)	6/24 (Ind)	1/2 (Ind)
4	16 (R)	256 (R)	24 (R)	12 (R)	64	48/12 (Ind)	8/12 (Sin)	6/24 (Ind)	1/4 (Sin)
5	32 (R)	2 (S)	8 (R)	0,5 (S)	48	>48/>32 (ni učinka)	6/0,094 (Sin)	4/8 (Ind)	0,75/3 (Ind)
6	32 (R)	1,5 (S)	12 (R)	0,75 (S)	48	>48/>32 (ni učinka)	12/0,125 (Sin)	12/8 (Ind)	0,75/3 (Ind)
7	16 (R)	1,5 (S)	>32 (R)	1 (S)	64	24/16 (Ind)	12/0,094 (Sin)	>64/>32 (ni učinka)	0,5/12 (Ind)
8	16 (R)	8 (R)	24 (R)	0,38 (S)	48	48/16 (Ind)	12/0,125 (Sin)	24/24 (Ind)	0,5/1,5 (Ind)
9	0,38 (S)	4 (R)	12 (R)	1,5 (S)	16	>16/>0,38 (ni učinka)	2/0,75 (Sin)	>16/>12 (ni učinka)	0,75/0,032 (Ind)
10	24 (R)	4 (R)	24 (R)	2 (S)	16	8/16 (Ind)	1,5/1 (Sin)	16/2 (Ind)	0,75/2 (Sin)
11	24 (R)	3 (R)	24 (R)	1,5 (S)	16	6/16 (Ind)	1,5/0,75 (Sin)	1,5/24 (Ind)	0,5/2 (Sin)
12	>32 (R)	4 (R)	12 (R)	1,5 (S)	12	>12/>32 (ni učinka)	1/1 (Sin)	6/8 (Ind)	0,5/4 (Sin)
13	>32 (R)	4 (R)	0,19 (S)	2 (S)	16	>16/>32 (ni učinka)	12/0,38 (Ind)	16/0,016 (Ind)	0,5/8 (Sin)
14	24 (R)	4 (R)	24 (R)	1,5 (S)	16	6/16 (Ind)	2/0,75 (Sin)	16/2 (Ind)	0,25/8 (Sin)
15	16 (R)	3 (R)	12 (R)	1,5 (S)	12	3/16 (Ind)	1/0,75 (Sin)	12/1,5 (Ind)	0,5/1,5 (Sin)

IP, imipenem; CO, kolistin; LE, levofloksacin; PO, polimiksin B; TGC tigeciklin; R, rezistenten; S, občutljiv; Sin, sinergija; Ind, indiferenca.

4.4 DOLOČANJE SINERGISTIČNEGA UČINKA Z METODO TIME-KILL

Pred izvajanjem metode time-kill smo izdelali rastno krivuljo za *A. baumannii*. S pomočjo programa Excel smo narisali rastno krivuljo, s katero smo si pomagali določiti pravilen čas za začetek izvajanja metode time-kill, to je med 6. in 7. uro po začetku inkubacije inokuluma (Slika 3).

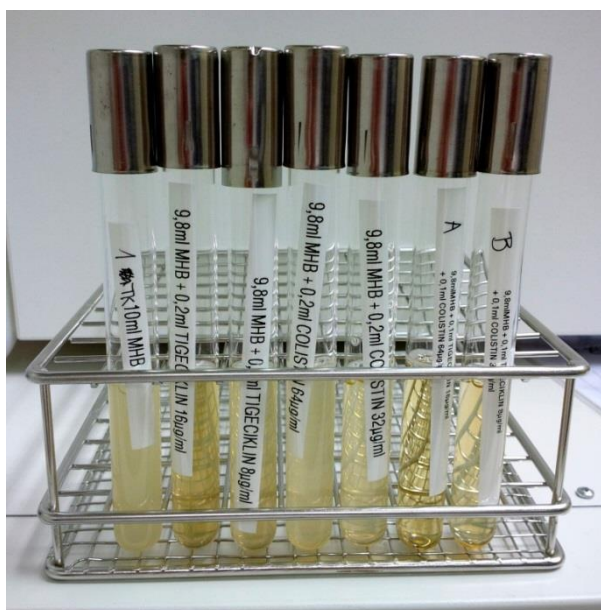


Slika 3: Rastna krivulja bakterije *A. baumannii*

Metoda time-kill nam je služila kot potrditveni test ostalih dveh metod. Zaradi dolgotrajnosti izvajanja, tehnične zahtevnosti in povezanih stroškov izvedbe metode smo sinergistični učinek s to metodo preverjali le pri tistih bakterijskih izolatih in kombinacijah antibiotikov, ki so pri metodi šahovnice pokazali učinek sinergije. Tako smo v raziskavo vključili 14 bakterijskih izolatov za testiranje kombinacije tigeciklina s kolistinom in 7 izolatov za testiranje kombinacije polimiksina B z imipenemom.

Meritve smo zaključili po 24 urah inkubacije. Rezultat različnega delovanja antibiotikov kot samostojnih agensov in v kombinaciji smo lahko opazovali tudi po motnosti/bistrosti reakcijskih epruvt (Slika 4). Sinergistični učinek smo potrdili v primeru, da je bila aktivnost kombinacije antibiotikov opazno večja v zavrtnju bakterijske rasti ($\geq 2\text{-log}_{10}$ zmanjšanje bakterijske rasti pri kombinaciji antibiotikov v primerjavi z najbolj aktivnim uspešnim samostojnim antibiotikom).

Pri kombinaciji tigeciklina s kolistinom smo pri treh bakterijskih izolatih (Preglednica 6) določili sinergijo v primeru, ko smo kombinirali $0,25 \times \text{MIK}$ in $0,125 \times \text{MIK}$ obeh antibiotikov. Pri dveh izolatih (Preglednica 6) smo v primeru kombiniranja antibiotikov pri $0,25 \times \text{MIK}$ določili indifferenco, pri kombiniranju antibiotikov pri $0,125 \times \text{MIK}$ pa sinergijo. Pri izolatu št. 4 smo določili sinergistični učinek pri kombinaciji $0,25 \times \text{MIK}$, pri $0,125 \times \text{MIK}$ pa je prišlo do indifference. V primeru izolata št. 15 smo določili sinergistični učinek pri kombinaciji antibiotikov pri $0,25 \times \text{MIK}$, pri kombinaciji antibiotikov pri $0,125 \times \text{MIK}$ pa je prišlo do antagonističnega delovanja antibiotikov. Grafični prikaz primerov sinergije, antagonizma in indifference za kombinacijo tigeciklina in kolistina prikazujejo Slike 5, 6 in 7. V Preglednicah 6 in 7 je predstavljena aktivnost (v \log_{10} CFU/mL) delovanja kombiniranih antibiotikov v primerjavi z najbolj aktivnim samostojnim antibiotikom.



Slika 4: Motnost/bistrost reakcijskih epruvet pri metodi time-kill po 24 urah inkubacije

Preglednica 6: Rezultati metode time-kill pri kombinaciji tigeciklina s kolistinom za 14 izolatov *A. baumannii*

Izolat	Metoda šahovnice (FIC)	Sprememba bakterijske koncentracije (\log_{10}) pri metodi time-kill	
		$0,25 \times \text{MIK} + 0,25 \times \text{MIK}$	$0,125 \times \text{MIK} + 0,125 \times \text{MIK}$
1	0,27 (Sin)	-0,10 (Ind)	-0,17 (Ind)
2	0,26 (Sin)	-5,20 (Sin)	-8,01 (Sin)
3	0,28 (Sin)	0 (Ind)	-0,78 (Ind)
4	0,22 (Sin)	-7,05 (Sin)	0,023 (Ind)
5	0,22 (Sin)	0 (Ind)	0 (Ind)
6	0,33 (Sin)	-7,81 (Sin)	-8,24 (Sin)
7	0,28 (Sin)	0 (Ind)	-7,87 (Sin)
8	0,38 (Sin)	0 (Ind)	-6,27 (Sin)
9	0,34 (Sin)	+8,13 (Ant)	-0,05 (Ind)
10	0,34 (Sin)	0 (Ind)	0 (Ind)
11	0,34 (Sin)	-7,69 (Sin)	-4,58 (Sin)
12	0,33 (Sin)	0 (Ind)	0 (Ind)
14	0,75 (Sin)	0 (Ind)	0 (Ind)
15	0,75 (Sin)	-8,23 (Sin)	+7,13 (Ant)

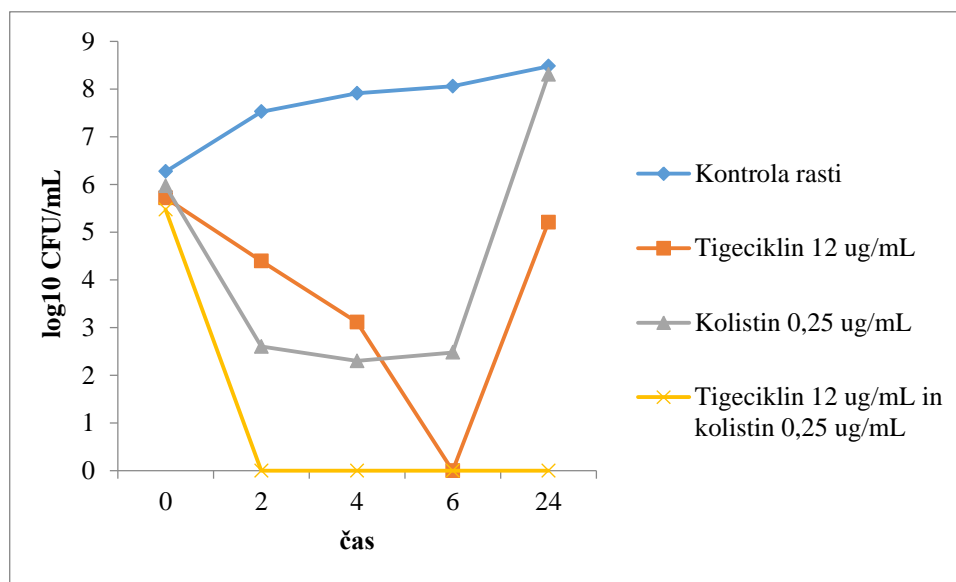
Sin, sinergija; Ind, indiferenca; Ant, antagonizem.

Z metodo time-kill nismo uspeli ugotoviti nobenega primera sinergije za kombinacijo polimiksina B z imipenemom, saj je pri vseh izolatih prišlo do indiferentnega učinka delovanja antibiotikov (Preglednica 7).

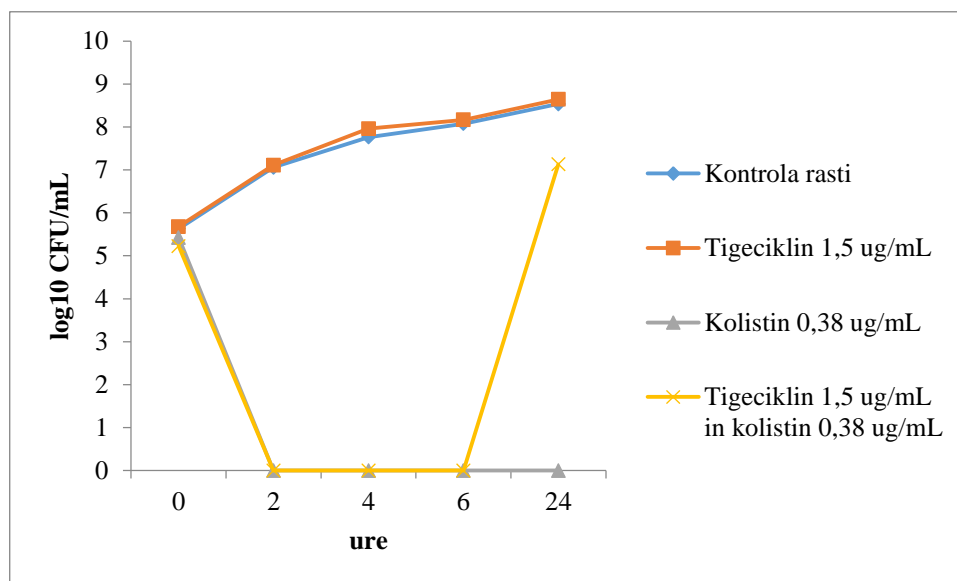
Preglednica 7: Rezultati metode time-kill pri kombinaciji polimiksina B z imipenemom za 7 izolatov *A. baumannii*

Izolat	Metoda šahovnice (FIC)	Sprememba bakterijske koncentracije (\log_{10}) pri metodi time-kill	
		$0,25 \times \text{MIC} + 0,25 \times \text{MIC}$	$0,125 \times \text{MIC} + 0,125 \times \text{MIC}$
4	0,33 (Sin)	-0,14 (Ind)	-0,27 (Ind)
10	0,46 (Sin)	0 (Ind)	0 (Ind)
11	0,42 (Sin)	0 (Ind)	0 (Ind)
12	0,46 (Sin)	0 (Ind)	0 (Ind)
13	0,47 (Sin)	-0,18 (Ind)	-0,12 (Ind)
14	0,50 (Sin)	0 (Ind)	0 (Ind)
15	0,43 (Sin)	0 (Ind)	0 (Ind)

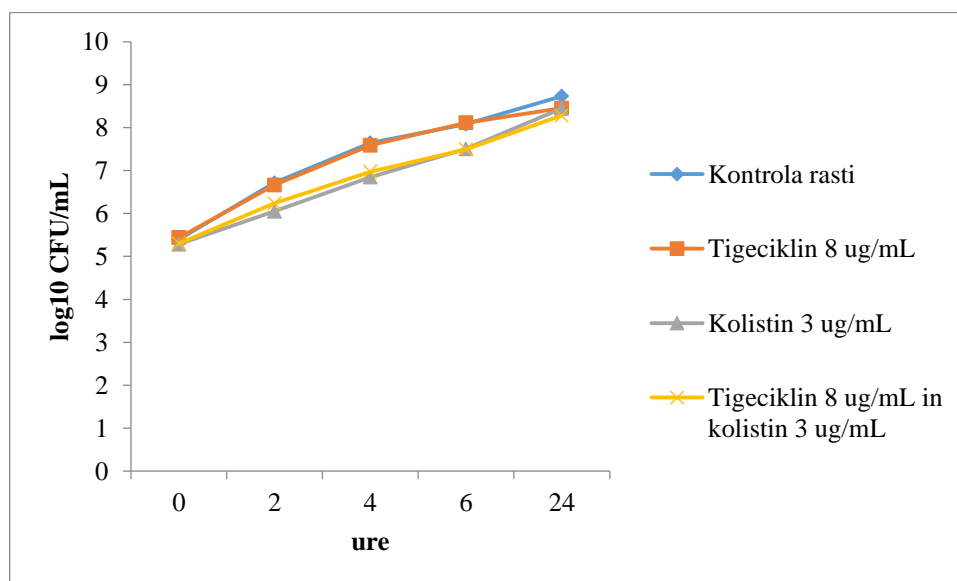
Sin, sinergija; Ind, indiferenca.



Slika 5: Primer sinergije tigeciklina s kolistinom pri izolatju *A. baumannii*



Slika 6: Primer antagonizma tigeciklina s kolistinom pri izolatu *A. baumannii*



Slika 7: Primer indiference tigeciklina in kolistina pri izolatu *A. baumannii*

4.5 PRIMERJAVA METOD ZA DOLOČANJE SINERGISTIČNEGA UČINKA ANTIBIOTIKOV

V Preglednici 8 so zbrani rezultati vseh treh metod preverjanja sinergističnega delovanja antibiotikov, ki smo jih uporabili v naši raziskavi. Oznaka »ni učinka« pri metodi navzkrižnega seta difuzijskih gradietnov pomeni, da je bakterija prerasla celotno površino agarске plošče, brez pojava inhibicijske cone ob membranskem traku E-testa. Pri metodi šahovnice pa oznaka »ni učinka« označuje primere, v katerih smo v popolnoma vseh luknjicah opazili bakterijsko rast.

Pri nobenem izolatu nismo določili sinergističnega učinka antibiotikov z vsemi tremi metodami. Pri 3 izolatih smo sinergijo, določeno z metodo šahovnice, potrdili pri obeh kombinacijah MIK antibiotikov metode time-kill. Pri 2 izolatih smo sinergistični učinek antibiotikov določili z metodo šahovnice in z eno od kombinacij MIK antibiotikov metode time-kill. Pri 12 izolatih smo z metodo šahovnice določili sinergistični učinek antibiotikov, ki ga z metodo time-kill nismo potrdili. Ugotovili smo indiferentni učinek. Pri enem izolatu smo z metodo šahovnice pri kombinaciji tigeciklina in kolistina določili sinergijo, z metodo time-kill pa smo pri kombinaciji antibiotikov pri $0,25 \times \text{MIK}$ določili sinergijo, pri kombinaciji antibiotikov pri $0,125 \times \text{MIK}$ pa antagonizem. Podoben pojav pri isti kombinaciji antibiotikov smo še zasledili pri primeru, ko sinergističnega učinka z metodo time-kill nismo potrdili, ampak smo ugotovili indiferenco pri eni kombinaciji antibiotikov, pri drugi kombinaciji pa antagonizem.

Preglednica 8: Primerjava rezultatov testiranja sinergije z metodo navzkrižnega seta difuzijskih gradientov, metodo šahovnice in metodo time-kill pri 15 izolatih *A. baumannii*

Izolat	Kombinacija antibiotikov	Navzkrižni set	Metoda šahovnice	Sprememba bakterijske koncentracije (\log_{10}) pri metodi time-kill	
		FIC indeks	FIC indeks	$0,25 \times \text{MIC} + 0,25 \times \text{MIC}$	$0,125 \times \text{MIC} + 0,125 \times \text{MIC}$
1	TGC + LVX	ni učinka	1,09 (Ind)	nn	nn
	TGC + IP	ni učinka	ni učinka	nn	nn
	TGC + CO	1,32 (Ind)	0,27 (Sin)	-0,10 (Ind)	-0,17 (Ind)
	POB + IP	2 (Ind)	1,38 (Ind)	nn	nn
2	TGC + LVX	ni učinka	1,08 (Ind)	nn	nn
	TGC + IP	0,875 (Ind)	1,08 (Ind)	nn	nn
	TGC + CO	1,25 (Ind)	0,26 (Sin)	-5,20 (Sin)	-8,01 (Sin)
	POB + IP	1,41 (Ind)	1,13 (Ind)	nn	nn
3	TGC + LVX	ni učinka	1,09 (Ind)	nn	nn
	TGC + IP	ni učinka	1,09 (Ind)	nn	nn
	TGC + CO	1,43 (Ind)	0,28 (Sin)	0 (Ind)	-0,78 (Ind)
	POB + IP	3 (Ind)	0,75 (Ind)	nn	nn
4	TGC + LVX	ni učinka	1,09 (Ind)	nn	nn
	TGC + IP	ni učinka	1,25 (Ind)	nn	nn
	TGC + CO	1,33 (Ind)	0,22 (Sin)	-7,05 (Sin)	-0,02 (Ind)
	POB + IP	1,5 (Ind)	0,33 (Sin)	-0,14 (Ind)	-0,27 (Ind)
5	TGC + LVX	ni učinka	1,08 (Ind)	nn	nn
	TGC + IP	ni učinka	ni učinka	nn	nn
	TGC + CO	ni učinka	0,22 (Sin)	0 (Ind)	0 (Ind)
	POB + IP	3,63 (Ind)	1,59 (Ind)	nn	nn
6	TGC + LVX	ni učinka	0,92 (Ind)	nn	nn
	TGC + IP	ni učinka	ni učinka	nn	nn
	TGC + CO	1,26 (Ind)	0,33 (Sin)	-7,81 (Sin)	-8,24 (Sin)
	POB + IP	3,63 (Ind)	1,09 (Ind)	nn	nn
7	TGC + LVX	ni učinka	ni učinka	nn	nn
	TGC + IP	ni učinka	1,38 (Ind)	nn	nn
	TGC + CO	1,43 (Ind)	0,28 (Sin)	0 (Ind)	-7,87 (Sin)
	POB + IP	2 (I)	0,88 (Ind)	nn	nn
8	TGC + LVX	ni učinka	1,5 (Ind)	nn	nn
	TGC + IP	ni učinka	2 (Ind)	nn	nn
	TGC + CO	nn	0,38 (Sin)	0 (Ind)	-6,27 (Sin)
	POB + IP	2 (Ind)	1,41 (Ind)	nn	nn

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 8: Primerjava rezultatov testiranja sinergije z metodo navzkrižnega seta difuzijskih gradientov, metodo šahovnice in metodo time-kill pri 15 izolatih *A. baumannii*

Izolat	Kombinacija antibiotikov	Navzkrižni set	Metoda šahovnice	Sprememba bakterijske koncentracije (\log_{10}) pri metodi time-kill	
		FIC indeks	FIC indeks	$0,25 \times \text{MIC} + 0,25 \times \text{MIC}$	$0,125 \times \text{MIC} + 0,125 \times \text{MIC}$
9	TGC + LVX	nn	ni učinka	nn	nn
	TGC + IP	nn	ni učinka	nn	nn
	TGC + CO	nn	0,31 (Sin)	+8,13 (Ant)	-0,05(Ind)
	POB + IP	ni učinka	0,58 (Ind)	nn	nn
10	TGC + LVX	nn	1,08 (Ind)	nn	nn
	TGC + IP	nn	1,17 (Ind)	nn	nn
	TGC + CO	nn	0,34 (Sin)	0 (Ind)	0 (Ind)
	POB + IP	ni učinka	0,46 (Sin)	0 (Ind)	0 (Ind)
11	TGC + LVX	nn	1,09 (Ind)	nn	nn
	TGC + IP	nn	1,04 (Ind)	nn	nn
	TGC + CO	nn	0,34 (Sin)	-7,69 (Sin)	-4,58 (Sin)
	POB + IP	ni učinka	0,42 (Sin)	0 (Ind)	0 (Ind)
12	TGC + LVX	nn	1,17 (Ind)	nn	nn
	TGC + IP	nn	ni učinka	nn	nn
	TGC + CO	nn	0,33 (Sin)	0 (Ind)	0 (Ind)
	POB + IP	ni učinka	0,46 (Sin)	0 (Ind)	0 (Ind)
13	TGC + LVX	nn	1,08 (Ind)	nn	nn
	TGC + IP	nn	ni učinka	nn	nn
	TGC + CO	nn	0,85 (Ind)	nn	nn
	POB + IP	ni učinka	0,47 (Sin)	-0,18 (Ind)	-0,12 (Ind)
14	TGC + LVX	nn	1,08 (Ind)	nn	nn
	TGC + IP	nn	1,04 (Ind)	nn	nn
	TGC + CO	nn	0,31 (Sin)	0 (Ind)	0 (Ind)
	POB + IP	ni učinka	0,42 (Sin)	0 (Ind)	0 (Ind)
15	TGC + LVX	nn	1,13 (Ind)	nn	nn
	TGC + IP	nn	1,25 (Ind)	nn	nn
	TGC + CO	nn	0,33 (Sin)	-8,23 (Sin)	+7,13 (Ant)
	POB + IP	ni učinka	0,43 (Sin)	0 (Ind)	0 (Ind)

IP, imipenem; CO, kolistin; LE, levofloksacin; PO, polimiksin B, TGC, tigeciklin; Sin, sinergija; Ind, indiferenca; Ant, antagonizem; nn, ni narejeno.

5 RAZPRAVA

Bakterija *A. baumannii* je ubikvitaren patogen, sposoben povzročanja okužb v domačem in v bolnišničnem okolju. V zadnjem času je *A. baumannii* zaradi dobro razvitih mehanizmov odpornosti proti antibiotikom postal glavni povzročitelj izbruhov bolnišničnih okužb. Velik problem za bolnišnične okužbe predstavlja zaradi svoje sposobnosti preživetja v okolju. Ugotovili so namreč, da je možno *A. baumannii* izolirati iz posteljnih letev tudi 9 dni po odpustitvi okuženega bolnika iz bolnišnice. S tem so se pojavila predvidevanja, da je bolnišnična oprema možni sekundarni rezervoar bakterije *A. baumannii* (Fournier in Richet, 2006).

Vedno večja nepremišljena in nenadzorovana uporaba antibiotikov prispeva velik delež k pojavu večkratno odpornih bakterij. Bakterije zelo hitro razvijejo nove mehanizme obrambe pred antibiotiki. Bolnišnično okolje je ugodno za razvoj večkratno odpornih bakterij, saj je uporaba različnih antibiotikov široka, obenem je zagotovljen hiter prenos bakterij preko nepazljivega bolnišničnega osebja, predmetov in samih bolnikov.

Že naravno je bakterija *A. baumannii* odporna proti številnim antibiotikom. Po smernicah EUCAST (angl. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) so za zdravljenje okužb, ki jih povzročajo občutljivi sevi *A. baumannii*, uporabni imipenem, meropenem, doripenem, ciprofloksacin in levofloksacin ter trimetoprim-sulfametoksazol (Giske in sod., 2013; Štrumbelj in sod., 2013). Kolistin se uporablja kot rezervni antibiotik (Maragakis in Perl, 2008)

Nekateri mehanizmi odpornosti proti antibiotikom, ki jih ima *A. baumannii*, so enaki mehanizmom pri drugih po Gramu negativnih bakterijah. Vendar pa je nekatere determinante odpornosti težko določiti v rutinskem laboratoriju. Zaradi tega je še težje zaježiti prenos determinant, odgovornih za odpornost bakterije in jim je omogočeno lažje širjenje. Kakorkoli gledamo, izgleda, da je *A. baumannii* že zelo dobro prilagojen okolju moderne medicine in povečanemu številu imunokomprimiranih bolnikov, ki dobivajo veliko količino širokospektralnih antibiotikov (Poirel in Bonnin, 2011). Največji problem pri *A. baumannii* niso njegovi virulentni dejavniki, temveč sposobnost hitrega pridobivanja različnih rezistenčnih determinant (Pirš in sod., 2013).

Vloga kombiniranega antibiotičnega zdravljenja je predvsem pokriti vrzel pomanjkanja učinkovitih antibiotikov kot samostojnih učinkovin in s tem doprinesiti k uspešnejšemu zdravljenju in manjšemu pojavu odpornih izolatov.

V raziskavo smo vključili 15 bakterijskih izolatov bakterije *A. baumannii*, osamljenih pri bolnikih, ki so bili hospitalizirani v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani. V postopku laboratorijskega dela je bila vsem izolatom določena občutljivost za nabor antibiotikov, primernih za zdravljenje okužb z *A. baumannii*. Občutljivost za antibiotike je bila določena z disk difuzijo ali z metodo difuzijskega gradienta. Vseh 15 izolatov je bilo odpornih proti imipenemu, ceftazidimu, piperacilinu s tazobaktamom, ciprofloksacinu, gentamicinu in amikacinu. Proti ampicilinu s sulbaktamom je bilo odpornih 14 izolatov, proti levofloksacinu pa 13 izolatov. Proti trimetoprim-sulfametoksazolu je bilo odpornih prvih 8 izolatov, ostalih 7 je bilo občutljivih. Vsi izolati so bili občutljivi za kolistin, razen enega, št. 4. Izolati niso bili testirani za občutljivost na meropenem in doripenem.

5.1 DOLOČANJE SINERGISTIČNEGA UČINKA KOMBINACIJE TIGECIKLINA IN LEVOFLOKSACINA

Z metodo navzkrižnega seta difuzijskih gradientov nismo zaznali nobenega učinka medsebojnega delovanja omenjenih antibiotikov. Vsi izolati, razen dveh, so bili visoko odporni proti levofloksacinu. MIK se v kombinaciji niso spremenile oz. je bila bakterija popolnoma odporna proti obema antibiotikoma, kar se je kazalo po preraščanju bakterije ob vseh robovih z antibiotikom impregnirane membrane.

Z mikrodilucijsko metodo smo določili občutljivost izolatov za levofloksacin in tigeciklin. MIK obeh antibiotikov tigeciklina (razpon 12 do 64 $\mu\text{g/mL}$) in levofloksacina (razpon 8 do 24 $\mu\text{g/mL}$) so bile visoke. Pri kombinaciji antibiotikov so se zmanjšale predvsem MIK tigeciklina, MIK levofloksacina so ostale enake ali je prišlo do manjšega zmanjšanja MIK. Izračun vrednosti FIC je pokazal, da je pri vseh izolatih prišlo do indiference, torej ni zadostnih razlik med delovanjem samostojnega antibiotika in kombinacijo antibiotikov. Naša pričakovanja, da se bodo MIK v kombinaciji zmanjšale, so bila potrjena, vendar niso ustrezala kriterijem sinergističnega učinka.

Ker pri metodi šahovnice nismo ugotovili sinergije, izolatov zaradi zahtevnosti in zamudnosti postopka nismo testirali z metodo time-kill. Principe in sod. (2009) so sicer z metodo šahovnice določili sinergistični učinek omenjenih antibiotikov, vendar potrditveni test z metodo time-kill ni dal pozitivnih rezultatov, saj je bila opažena rast bakterije po 24 urah.

5.2 DOLOČANJE SINERGISTIČNEGA UČINKA KOMBINACIJE TIGECIKLINA IN IMIPENEMA

Najprej smo za preverjanje sinergističnega učinka z metodo navzkrižnega seta difuzijskih gradientov določili občutljivost za tigeciklin in imipenem prvih 7 izolatov. Po izvedbi navzkrižnega seta difuzijskih gradientov nismo zaznali nobenega učinka medsebojnega delovanja antibiotikov, torej nismo ugotovili sinergije in tudi ne indifferenec. Na osnovi teh rezultatov in velikih težav z dobavo E-testov za tigeciklin smo se odločili, da ne bomo testirali ostalih 8 izolatov.

MIK posameznih antibiotikov, določenih z metodo mikrodilucije, smo primerjali z MIK, dobljenimi pri metodi šahovnice. Pri imipenemu je le v treh primerih prišlo do zmanjšanja MIK, kar predstavlja 20 % izolatov, medtem ko se je pri tigeciklinu v kombinaciji MIK zmanjšala pri 8 izolatih, kar predstavlja 53 %. Vendar zmanjšanje ni bilo dovolj veliko, da bi zadostilo kriterijem za sinergistični učinek. V šestih primerih ni bilo nobenega učinka medsebojnega delovanja antibiotikov, v devetih primerih smo določili indifferenco. Sopirala s sod. (2010) je z metodo šahovnice ugotovila sinergistični učinek in indifferenco tigeciklina v kombinaciji z imipenemom. Pri 4 od 8 izolatov *A.baumannii* so ugotovili indifferenco, pri enem izolatu so ugotovili sinergijo. Pri 4 izolatih so sinergijo ugotovili z metodo time-kill.

Tako kot pri kombinaciji tigeciklina z levofloksacinom, tudi pri kombiniranju tigeciklina z imipenemom z metodo šahovnice nismo določili sinergije. Ker nam je metoda time-kill služila kot potrditveni test za zaznano sinergijo z metodama navzkrižnega seta difuzijskega gradienta in metodo šahovnice, v tem primeru sinergističnega učinka nismo preverjali.

5.3 DOLOČANJE SINERGISTIČNEGA UČINKA KOMBINACIJE TIGECIKLINA IN KOLISTINA

Najprej smo določili MIK za vseh 15 izbranih izolatov *A. baumannii* z metodo difuzijskega gradienta, nato smo testirali prvih 7 izolatov z metodo navzkrižnega seta difuzijskih gradientov. Po odčitavanju rezultatov nismo ugotovili nobenega primera sinergije. Na podlagi dobljenih rezultatov in zaradi težav z dobavo E-testov za tigeciklin smo se odločili, da v nadaljevanju ne bomo testirali preostalih 8 izolatov.

Pri kombiniranju tigeciklina s kolistinom smo ugotovili prve primere sinergističnega učinka z metodo šahovnice. Sinergijo smo določili pri 14 izolatih, pri enem smo določili indifferenco. Povprečje vrednosti FIC je znašalo 0,32. Največje zmanjšanje MIK smo opazili pri tigeciklinu, kjer so se vrednosti s 64 $\mu\text{g/mL}$ zmanjšale tudi na 6 $\mu\text{g/mL}$ v kombinaciji. Tudi pri kolistinu smo opazili občutno zmanjšanje MIK po kombiniranju antibiotikov.

Z metodo time-kill smo pri treh izolatih potrdili sinergijo pri obeh kombinacijah koncentracij antibiotikov. Pri ostalih izolatih je bila uspešna, v smislu dokaza sinergije, le ena kombinacija ($0,25 \times \text{MIK}$ ali $0,125 \times \text{MIK}$ antibiotikov) določene koncentracije antibiotikov. Zanimivo je, da je pri izolatih št. 7 in 8 do sinergističnega učinka prišlo pri kombinaciji z nižjimi koncentracijami antibiotikov. Pri višji koncentraciji smo ugotovili indifferenco. Nasprotno smo pri izolatih št. 4 sinergistični učinek ugotovili pri kombinaciji višjih koncentracij antibiotikov, medtem ko je pri kombinaciji $0,125 \times \text{MIK}$ antibiotikov prišlo do indifference. V primeru izolata št. 15 smo določili sinergijo pri višjih koncentracijah kombinacij antibiotikov, pri nižjih koncentracijah pa je prišlo do antagonističnega medsebojnega delovanja antibiotikov. Antagonistično delovanje antibiotikov smo ugotovili tudi pri izolatih št. 9, ko smo kombinirali antibiotike pri $0,125 \times \text{MIK}$.

Pestrost rezultatov nam potrjuje dejstvo, da je vsak izolat poseben in drugače dovzeten za različna tretiranja z antibiotiki.

Tigeciklin v več študijah navajajo kot uspešen antibiotik za zdravljenje okužb s po Gramu pozitivnimi in po Gramu negativnimi patogeni, vključujoč večkratno odporne bakterije (Petersen in sod., 2005). Kolistin je rezervni antibiotik, ki je bil iz redne uporabe umaknjen

zaradi morebitnih toksičnih učinkov. Ker pa za mnoge okužbe z *A. baumannii* ni druge možnosti, kolistin znova prihaja v uporabo za zdravljenje. Študije so pokazale, da je *A. baumannii* visoko občutljiv za polimiksin B in kolistin (Diez in sod., 2004). Tudi v našem primeru se je ta kombinacija antibiotikov pokazala kot izredno uspešna. Kombiniranje drugih antibiotikov s kolistinom ima več prednosti. Kolistin namreč omogoči boljšo učinkovitost delovanja drugih antibiotikov. Zaradi sinergije kolistina z drugim antibiotikom tudi ni potrebna visoka koncentracija kolistina in je njegova uporaba zato varnejša in še vedno dovolj učinkovita (Gordon in sod., 2010).

5.4 DOLOČANJE SINERGISTIČNEGA UČINKA KOMBINACIJE POLIMIKSINA B IN IMIPENEMA

Metoda za preverjanje sinergističnega učinka z metodo navzrkižnega seta difuzijskih gradientov tudi v tem primeru ni bila uspešna. Testirali smo vseh 15 izolatov. Pri odčitavanju rezultatov pri nobenem izolatu nismo zaznali značilne cone zaviranja rasti. Pri 8 izolatih smo določili indifferenco, pri ostalih 7 ni bilo zaznanega nobenega učinka. Do enakih zaključkov sta prišla tudi Wareham in Bean (2006) v svoji študiji sinergije, ko s pomočjo metode navzkrižnega seta difuzijskih gradientov ni določil sinergističnega učinka antibiotikov.

Z metodo šahovnice pa smo dobili drugačne rezultate. Pri 7 izolatih je prišlo do sinergističnega delovanja kombinacije antibiotikov. Povprečne vrednosti FIC je bilo 0,43. V vseh primerih je prišlo do večjega zmanjšanja MIK imipenema. Pri ostalih 8 izolatih smo ugotovili indifferenco. Rezultate smo preverili še s potrditveno metodo time-kill.

Sinergističnega učinka z metodo time-kill v primeru kombinacije polimiksina B z imipenemom nismo potrdili pri nobenem izolatu, pri vseh smo ugotovili indifferenco.

Rezultate metode šahovnice lahko interpretiramo na več načinov, kar je lahko vzrok za neujemanje rezultatov med metodama šahovnice in time-kill v naši raziskavi. Bonapace in sod. (2002) so v svoji raziskavi navedli štiri možne metode interpretacije rezultatov metode šahovnice in pokazali, da z različnim pristopom dobimo različne rezultate. Problem je tudi ta, da v posameznih raziskavah ne navajajo katero metodo odčitavanja so uporabili, zato je primerjava rezultatov lahko zavajajoča.

Tako kot kolistin tudi polimiksin B spada med zaviralce delovanja celične membrane in deluje na precej podoben način. Tudi polimiksin B je bil umaknjen iz uporabe in se zdaj zaradi velikega pojava večkratno odpornih sevov *A. baumannii* vrača.

Sinergistični učinek med kolistinom ali polimiksinom B in karbapenemskim antibiotikom, kot je imipenem, lahko dosežemo le, če je odpornost izolata proti karbapenemu nizka (Wareham in Bean, 2006) in kadar je bakterijska odpornost proti karbapenemu povezana z deficitom proteinov v porinah (Yoon in sod., 2003). Naša raziskava potrjuje trditev o neuspešnosti sinergističnega učinka pri izolatih z visoko odpornostjo proti imipenemu. Pri 13 testiranih izolatih smo namreč določili MIK z mikrodolucijo, ki je znašal $\geq 16 \mu\text{g/mL}$. Nasprotno z našimi rezultati je Yoon s sod. (2003) z metodo time-kill ugotovil sinergijo kombinacije polimiksina B z imipenemom pri 7 od 8 izolatov.

5.5 PRIMERJAVA METOD ZA DOLOČANJE SINERGISTIČNEGA UČINKA KOMBINACIJE ANTIBIOTIKOV

Za rutinsko preverjanje sinergističnega učinka bi bila najbolj uporabna metoda, ki nam da zanesljive in natančne rezultate v najkrajšem možnem času. Žal pa še nobena izmed metod, ki so trenutno razvite, ne ponuja te možnosti. Vsaka metoda ima namreč nekaj pozitivnih in negativnih lastnosti, ki se jim ne moremo izogniti.

Sinergijo lahko s pomočjo metode navzkrižnega seta difuzijskih gradientov določamo na več načinov. Izbrali smo enega izmed njih, ki je bil največkrat preizkušen v drugih študijah. Glede na rezultate naše raziskave je določanje sinergije z metodo navzkrižnega seta difuzijskih gradientov najmanj uspešno. Ugotovili nismo niti enega primera sinergističnega učinka, tudi v primeru, ko smo ga z drugima metodama zanesljivo dokazali. Več študij je že pokazalo, da določanje sinergije pri *A. baumannii* s pomočjo metode navzkrižnega seta difuzijskih gradientov ni uspešno (Bonapace in sod., 2000; Tan in sod., 2010; Cetin in sod., 2013). Čeprav si želimo, da bi ravno ta metoda dajala najboljše in zanesljive rezultate, temu ni tako. Metoda je namreč najbolj enostavna in tudi najhitrejša, saj rezultate dobimo v enem dnevu.

Najbolj široko uporabljeni *in vitro* metodi za preverjanje interakcij med protibakterijskimi učinkovinami sta metoda šahovnice, kjer računamo vrednost FIC in kinetika metode time-

kill. Obe metodi se izvajata v tekočem mediju. Najpogosteje se uporablja metoda šahovnice, ki je hitrejša in manj tehnično zahtevna kot metoda time-kill. Izvedba celotnega testiranja bakterijskega izolata z metodo šahovnice traja dva dni. Prvi dan določimo MIK vsakega antibiotika. Pomeni, da si moramo pripraviti različne koncentracije antibiotikov, kar je prvi korak, ki nam vzame nekoliko več časa. Ko po 24 urah odčitamo rezultate, moramo določiti nov obseg koncentracij, ki jih želimo testirati v kombinaciji in tako ponovno pripraviti antibiotike. Najboljše je, da se koncentracije antibiotikov pripravijo na isti dan uporabe. S tem se izognemo shranjevanju v hladilniku, kar lahko neugodno vpliva na delovanje nekaterih antibiotikov in na nerealne rezultate. Odčitavanje rezultatov je enostavno in hitro. Preverimo v katerih luknjicah mikrotitrne ploščice opazimo odsotnost rasti in odčitamo koncentracije antibiotikov ter izračunamo vrednost FIC. Pomanjkljivost metode je slaba ponovljivost in merjenje le bakteriostatičnega efekta. Slaba ponovljivost testa kot tudi testiranje bakteriostatičnega antibiotika v kombinaciji z baktericidnim antibiotikom je morda vzrok za precenjeno določanje sinergije. MIK, določena z metodo mikrodilucije, ki je potem uporabljena pri metodi time-kill, velikokrat ne rezultira v sinergiji, ki je določena z metodo šahovnice. Tudi ta podatek nam pove, da metoda šahovnice ni popolnoma zanesljiva (Petersen in sod., 2005).

Zaradi večje zanesljivosti je nujno potrebno rezultate, pridobljene z metodo šahovnice, preveriti s še bolj dinamično interakcijo, ki jo zagotavlja kinetika metode time-kill. Metoda time-kill je najbolj tehnično zahtevna in časovno zamudna. Tako kot pri metodi šahovnice je tudi pri tej metodi potrebno določiti MIK za posamezni antibiotik. To lahko storimo z mikro- ali z makrodilucijo. Ko določimo MIK, moramo določiti koncentracije antibiotikov, katerih sinergistični učinek želimo preveriti. Glede na standardni protokol (Garcia, 2010) smo v naši raziskavi kombinirali $0,25 \times \text{MIK}$ in $0,125 \times \text{MIK}$ antibiotikov, lahko pa bi se odločili tudi za drugačne koncentracije (Garcia, 2010). Pri metodah šahovnice in time-kill moramo ustrezno pripraviti inokulum. Še posebej je to časovno zamudno pri metodi time-kill, saj moramo bakterijo ujeti v njeni logaritemski fazi rasti. V ta namen moramo predhodno določiti rastno krivuljo za izbrano bakterijo. Da bakterija *A. baumannii* doseže logaritemsko rast, je potrebno od 6 do 7 ur, kar moramo upoštevati pri načrtovanju testa. Določiti moramo tudi ure vzorčenja med potekom testa. Vsa ta opravila nam vzamejo veliko časa, porabimo tudi veliko materiala: od epruvet, tekočih gojišč, antibiotikov,

agarskih plošč in še česa. Rezultate dobimo tretji dan po pregledu vseh plošč, izračunu CFU/mL, ki ga pretvorimo v \log_{10} CFU/mL in izrisu ustreznega grafa. Metoda je torej zelo zamudna, nam pa poda najbolj zanesljive rezultate.

Metode za preverjanje sinergističnega učinka antibiotikov niso standardizirane za interpretacijo, zato je primerjava rezultatov različnih metod otežena (Pankey in Ashcraft, 2008).

S primerjavo rezultatov večih metod lahko ugotovljamo ujemanje rezultatov. Ujemanje med metodama je določeno s tem, da obe metodi prikažeta enak rezultat, neujemanje pa, da ena metoda prikaže sinergijo, druga pa antagonizem. Vse druge možnosti opredelimo kot manjša neujemanja (Bonapace in sod., 2000).

Z rezultati metode navzkrižnega seta difuzijskih gradientov se ne ujemajo rezultati metod šahovnice in time-kill. Med metodama šahovnice in time-kill smo pri določanju sinergije polimiksina B z imipenemom ugotovili manjša neujemanja, in sicer smo z metodo šahovnice določili sinergijo, z metodo time-kill pa indiferenco v vseh primerih. Rezultati metode šahovnice in metode time-kill so se ujemali v 35,7 %, ko smo tudi z metodo time-kill potrdili sinergijo. Neujemanje smo ugotovili v 76,2 %, ko smo z metodo time-kill dokazali antagonistični učinek antibiotikov ali indiferenco in ne sinergije kot metoda šahovnice.

Tan in sod. (2011) so v svoji raziskavi ugotovili ujemanje rezultatov vseh treh metod le pri enem od 48 izolatov, pri dveh izolatih so ugotovili ujemanje med metodama šahovnice in time-kill. Bonapace in sod. (2000) so ugotovili 51 % ujemanje rezultatov metod šahovnice in time-kill. Med metodama šahovnice in metodo navzkrižnega seta difuzijskih gradientov pa so ugotovili 63 % ujemanje rezultatov. Tudi Sopirala in sod. (2010) so v svoji raziskavi ugotovili, da metoda navzkrižnega seta difuzijskih gradientov najboljše korelira z metodo šahovnice, saj so se rezultati ujemali v 27 primerih od skupno 32. Tan in sod. (2007) podobno kot mi, niso ugotovili nobenega ujemanja rezultatov med metodama navzkrižnega seta difuzijskih gradientov in time-kill.

Določanje sinergističnega učinka kombinacije antibiotikov je torej v veliki meri odvisno od metode, s katero sinergijo preverjamo.

6 SKLEPI

- Dokazali smo, da lahko posamezni antibiotik, proti kateremu je bakterija razvila odpornost, v kombinaciji z drugim antibiotikom *in vitro* uspešno učinkuje proti bakteriji.
- Kombinacija tigeciklina in kolistina je imela najboljši sinergistični učinek proti slovenskim izolatom večkratno odporne bakterije *A. baumannii*.
- Metoda navzkrižnega seta difuzijskih gradientov ni zanesljiva za določanje sinergističnega učinka kombinacije antibiotikov.
- Za določanje sinergističnega učinka kombinacije antibiotikov sta primerni metodi šahovnice in time-kill. Rezultati obeh metod niso popolnoma primerljivi.

7 POVZETEK

Eden izmed glavnih mejnikov v medicini je zagotovo odkritje prvega antibiotika leta 1928. Od tedaj naprej se je močno povečala sinteza antibiotikov z različnim načinom delovanja in sposobnostjo delovanja na bakterije. Obenem pa so se že začeli pojavljati odporni bakterijski sevi. Če je bila na začetku večina bakterij občutljiva za nove antibiotike, je danes slika povsem drugačna. Vedno več bakterij je večkratno odpornih proti antibiotikom in prenos determinant za odpornost je hiter in učinkovit. Zato je predvsem pomembna smotrna uporaba antibiotikov in pravočasno odkrivanje odpornih izolatov.

Tudi bakterija *A. baumannii* sodi med večkratno odporne bakterije, ki si lastijo veliko različnih mehanizmov odpornosti, obenem pa imajo tudi naravno selektivno prednost, zaradi same organiziranosti bakterijske celice. Ker je bakterija *A. baumannii* odporna proti skoraj vsem dosegljivim antibiotikom, se vpeljuje antibiotično kombinacijsko zdravljenje od katerega se veliko pričakuje. Obstajajo pozitivni in negativni učinki kombinacijskega zdravljenja, vendar glede na to, da farmacevtske družbe niso zainteresirane za razvoj novih antibiotikov, ta možnost še največ obeta v boju proti okužbam. Zaradi pomanjkanja delujočih antibiotikov v uporabo znova prehajajo starejši antibiotiki, ki so zaradi svojega toksičnega delovanja bili umaknjeni iz seznama antibiotikov, primernih za zdravljenje okužb. Med te spadata polimiksin B in kolistin, ki tudi kot samostojna agensa uspešno zavirata nadaljnjo rast *A. baumannii*.

V raziskavi smo preverjali sinergistični učinek štirih različnih kombinacij antibiotikov pri 15 izolatih večkratno odporne bakterije *A. baumannii*. Sinergijo smo določali s tremi različnimi metodami: z metodo navzkrižnega seta difuzijskega gradienta, z metodo šahovnice in z metodo time-kill.

Najbolj obetajoča kombinacija je bila kombinacija antibiotikov tige ciklina in kolistina. Sinergijo smo v tem primeru z metodo time-kill potrdili pri 7 izolatih. Z metodo šahovnice se je kazal uspeh kombinacije polimiksina B in imipenema, pri kateri pa sinergističnega učinka z metodo time-kill nismo potrdili. Najmanj uspešna je bila metoda navzkrižnega seta difuzijskih gradientov, s katero nismo določili nobenega sinergističnega učinka.

Primerjali smo tudi samo izvedbo in zahtevnost metod. Metoda šahovnice in metoda time-kill sta tehnično zahtevni in dolgo trajajoči za vsakodnevno uporabo. Zaradi tega bi metoda

navzkrižnega seta difuzijskih gradientov bila najbolj ustrezna, saj je enostavna in najhitrejša.

V Sloveniji preverjanje sinergističnega delovanja antibiotikov za bakterijo *A. baumannii* ni vpeljana v rutinsko delo in se zato tudi ne uporablja za zdravljenje.

8 VIRI

- Bantar C., Schell C., Posse G., Limansky A., Ballerini V., Mobilia L. 2007. Comparative time-kill study of doxycycline, tigecycline, sulbactam, and imipenem against several clones of *Acinetobacter baumannii*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 61: 309-314
- Bonapace C.R., White R.L., Friedrich L.V., Bosso J.A. 2000. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 38: 43-50
- Bonapace C.R., Bosso J.A., Friedrich L.V., White R.L. 2002. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 44: 363-366
- Bonomo R.A., Szabo D. 2006. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*, 43, Suppl.: S49-S56
- Cetin E.S., Tekeli A., Ozseven A.G., Us E., Aridogan B.C. 2013. Determination of *in vitro* activities of polymyxin B and rifampin in combination with ampicillin/sulbactam or cefoperazone/sulbactam against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* by the E-test and checkerboard methods. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 66: 463-468
- CLSI. 2013. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Third Informational Supplement, M100-S23. Winkler M. A. (ed.). Wayne, Pennsylvania, Clinical and Laboratory Standards Institute: 206 str.
- Diez A.I.D., Perez M.A.B., Bouza J.M.E, Gomez A.A., Rodriguez P.G., Gomez M.A.M., Domingo A.O. Rodriguez-Torres A. 2004. Susceptibility of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex to imipenem, meropenem, sulbactam and colistin. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23: 487-493
- Fouad M., Attia A.S. Tawakkol W.M., Hashem A.M. 2013. Emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring the OXA-23 carbapenemase in intensive care units of Egyptian hospitals. *International Journal of Infectious Diseases*, 17: e1252-e1254

- Fournier P.E., Richet H. 2006. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clinical Infectious Diseases*, 42: 692-699
- Gales C.A., Jones N.R., Sader S.H. 2011. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: result from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66: 2070-2074
- Garcia L.S. (ed.). 2010. *Clinical microbiology procedures handbook*. Vol. 2. 3rd ed. Washington, DC, ASM Press: 5.10.2.1-5.10.3.6
- Gayoso C.M., Mateos J., Méndez J.A., Fernández-Puente P., Rumbo C., Tomás M., Martínez de Ilarduya O., Bou G. 2013. Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Proteome Research*, 13: 460-476
- Giske C., Martinez-Martinez L., Canton R., Stefani S., Skov R., Glupczynski Y., Nordmann P., Wootton M., Miriagou V., Simonsen G. S., Zemlickova H., Cohen-Stuart J., Gniadkowski M. 2013. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0. Växjö, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: 40 str. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf (maj 2014)
- Gordon N.C., Png K., Wareham D.W. 2010. Potent synergy and sustained bactericidal activity of a vancomycin-colistin combination versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 12: 5316-5322
- Haddad F.A., Van Horn K., Carbonaro C., Agüero-Rosenfeld M., Wormser G.P. 2005. Evaluation of antibiotic combinations against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* using the E-test. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 24: 577-579
- Kempf M., Rolain J.M. 2012. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39: 105-114

- Kiratisin P., Apisarnthanarak A., Kaewdaeng S. 2010. Synergistic activities between carbapenems and other antimicrobial agents against *Acinetobacter baumannii* including multidrug-resistant and extensively drug-resistant isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36: 243-246
- Kotnik V. 2002. Antibiotiki in kemoterapevtiki. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 225-228
- Li Y.J., Pan C.Z., Zhao Z.W., Zhao Z.X., Chen H., Lu W.B. 2013. Effect of a combination of amlodipine and imipenem on 42 clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* obtained from a teaching hospital in Guangzhou, China. *BMC Infectious Diseases*, 13: 548, doi: 10.1186/1471-2334-13-548: 9 str.
- Liofilchem. 2012. MIC test strip technical sheet synergy testing MTS31. Rev 4. Roseto degli Abruzzi, Liofilchem s.r.l.: 2 str.
http://www.liofilchem.net/login.area.mic/technical_sheets/MTS31.pdf (maj 2014)
- Madigan T.M., Martinko M.J., Dunlap V.P., Clark P.D. 2009. *Brock biology of microorganisms*. 12th ed. San Francisco, Pearson Education, Inc.: 1061 str.
- Magiorakos P.A., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T., Monnet D.L. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18: 268-281
- Maragakis L.L., Perl T.M. 2008. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clinical Infectious Diseases*, 46: 1254-1263
- Markogiannakis A., Fildisis G., Tsiplakou S., Ikonomidis A., Koutsoukou A., Pournaras S., Manolis N.E., Baltopoulos G., Tsakris A. 2008. Cross-transmission of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal strains causing episodes of sepsis in a trauma intensive care unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 29: 410-417

- Mohajeri P., Farahani A., Feizabadi M.M., Ketabi H., Abiri R., Najafi F. 2013. Antimicrobial susceptibility profiling and genomic diversity of *Acinetobacter baumannii* isolates: A study in western Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 3: 195-202
- Moland S.E., Craft W.D., Hong S.G., Kim S.Y., Hachmeister L., Sayed D.S., Thomson K.S., 2008. *In vitro* activity of tigecycline against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and selection of tigecycline-amikacin synergy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 8: 2940-2942
- Munoz-Price L.S., Weinstein R.A. 2008. *Acinetobacter* infection. *New England Journal of Medicine*, 358: 1271-1281
- Müller-Premru M. 2002. Nefermentativni po Gramu negativni bacili. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 225-228
- Pankey G.A., Ashcraft D.S. 2008. The detection of synergy between meropenem and polymyxin B against meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii* using E-test and time-kill assay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 63: 228-232
- Pankuch G.A., Seifert H., Appelbaum P.C. 2010. Activity of doripenem with and without levofloxacin, amikacin, and colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 67: 191-197
- Peleg A.Y., Seifert H., Paterson D.L. 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21, 3: 538-582
- Petersen P.J., Labthavikul P., Jones C.H., Bradford P.A. 2005. *In vitro* antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 573-576
- Pirš M., Cerar Kišek T., Logar M., Mrvič T., Seme K., Mueller-Premru M., Križan Hergouth V., Švent-Kučina N., Štravs T., Al Nawas M., Štrumbelj I., Ribič H., Harlander T., Zdolšek B., Lorenčič Robnik S., Tomič V., Kavčič M., Mirković T., Lejko Zupanc T. 2013. Karbapenemaze pri *Acinetobacter baumannii* – izbruh v

- Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana in prenosi v druge bolnišnice. *Medicinski razgledi*, 52, Suppl. 6: 149-159
- Poirel L., Nordmann P. 2006. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 12: 826-836
- Poirel L., Bonnin A. 2011. Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. *Life*, 63: 1061-1067
- Principe L., D'Arezzo S., Capone A., Petrosillo N., Visca P. 2009. *In vitro* activity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8: 18, doi: 10.1186/1476-0711-8-18: 10 str.
- Revathi G., Siu L.K., Lu P.L., Huang L.Y. 2013. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in East Africa. *International Journal of Infectious Diseases*, 17: e1255-e1258
- Seme K. 2002. Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, *Medicinski razgledi*: 439-446
- Singh H., Thangaraj P., Chakrabarti A. 2013. *Acinetobacter baumannii*: A brief account of mechanisms of multidrug resistance and current and future therapeutic management. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7: 2602-2605
- Sopirala M.M., Mangino J.E., Gebreyes W.A., Biller B., Bannerman T., Balada-Llasat J.M., Pancholi P. 2010. Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 11: 4678-4683
- Srinivasan V.B., Rajamohan G., Pancholi P., Stevenson K., Tadesse D., Patchanee P., Marcon M., Gebreyes W.A. 2009. Genetic relatedness and molecular characterization of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in central Ohio, USA. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8: 21, doi: 10.1186/1476-0711-8-21: 10 str.

- Štrumbelj I., Mueller-Premru M., Pirš M., Seme K. 2013. Odpornost izbranih po Gramu negativnih bakterij – na pragu poantibiotične dobe. *Medicinski razgledi*, 52, Suppl. 6: 99-108
- Tamma P.D., Cosgrove S.E., Maragakis L.L. 2012. Combination therapy for treatment of infections with Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 25: 450-470
- Tan T.Y., Ng L.S., Tan E., Huang G. 2007. *In vitro* effect of minocycline and colistin combinations on imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60: 421-423
- Tan T.Y., Lim T.P., Lee W.H., Sasikala S., Hsu L.Y., Kwa A.L. 2011. *In vitro* antibiotic synergy in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: the effect of testing by time-kill, checkerboard, and Etest methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55: 436-438
- Van Looveren M., Goossens H., ARPAC Steering Group. 2004. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 684-704
- Vila J., Marti S., Sanchez-Cespedes J. 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59: 1210-1215
- Wareham D.W., Bean D.C. 2006. *In-vitro* activity of polymyxin B in combination with imipenem, rifampicin and azithromycin versus multidrug resistant strains of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemases. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 5:10, doi: 10.1186/1476-0711-5-10: 5 str.
- Yoon J., Urban C., Terzian C., Mariano N., Rahal J.J. 2003. *In vitro* double and triple synergistic activities of polymyxin B, imipenem and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 753-757

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Katji Seme, ki mi je omogočila opravljanje magistrske naloge v njenem laboratoriju, hvala za strokovne nasvete in vodenje in za vse prijazne pogovore.

Hvala tudi recenzentki prof. dr. Sonji Smole Možina za korekten in hiter pregled naloge.

Najlepša hvala vsem sodelavcem Laboratorija za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Z vami je bilo delo lažje in zabavnejše. Hvala za vso vaše podeljeno znanje, za vaše nasvete, sproščene pogovore in da ste mi polepšali vsak delovni dan in sem z veseljem prihajala na delo. Še enkrat hvala Antoniji, Marji, Petri, Poloni in Juretu.

Največja zahvala pa je namenjena mojim staršem in bratu Milanu, ki so mi omogočili študij in vse obštudijske dejavnosti. Brez vaše podpore, svetovanja in spodbude ne bi zmogla.

Hvala tudi Blažu. S tabo je vse lažje.

Hvala prijateljicam Marini, Kristini in Nini za vso spodbudo in čudovito prijateljstvo že od gimnazijskih let.

Hvala tudi sošolcem Maruši, Katki, Petri in Dimitriju za novo stkana prijateljstva in lepa študentska leta.