

Fenotipska svojstva i otpornost na antibiotike sojeva bakterije *Ralstonia pickettii* iz sustava za ultračistu vodu

Batarilo, Ivanka

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:491893>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ivanka Batarilo

**FENOTIPSKA SVOJSTVA I REZISTENCIJA
NA ANTIBIOTIKE SOJEVA BAKTERIJE
RALSTONIA PICKETTII IZ SUSTAVA ZA
ULTRAČISTU VODU**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ivanka Batarilo

**FENOTIPSKA SVOJSTVA I REZISTENCIJA
NA ANTIBIOTIKE SOJEVA BAKTERIJE
RALSTONIA PICKETTII IZ SUSTAVA ZA
ULTRAČISTU VODU**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Izv. prof. dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček

Zagreb, 2023.



University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Ivanka Batarilo

**PHENOTYPIC PROPERTIES AND
ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *RALSTONIA
PICKETTII* STRAINS FROM HIGH-PURITY
WATER SYSTEMS**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Associate Professor Gordana Maravić Vlahoviček, PhD

Zagreb, 2023

Ova disertacija je izrađena u Odjelu za mikrobiologiju i Odjelu za molekularnu dijagnostiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i na Institutu Ruđer Bošković pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Gordane Maravić Vlahoviček.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Gordani Maravić Vlahoviček na ukazanom povjerenju, prenesenom znanju, beskrajnom strpljenju i nesebičnoj pomoći pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem kolegicama i djelatnicama Odjela za molekularnu dijagnostiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu na pomoći pri izradi ovog rada.

Posebna zahvala svim djelatnicima Odjela za mikrobiologiju Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu na pomoći i tehničkoj podršci, strpljenju i pozitivnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Branki Bedenić na pomoći pri izradi rada.

Zahvaljujem dr. sc. Snježani Kazazić na susretljivosti i velikom angažmanu.

Zahvaljujem na pomoći kod izrade ovoga rada:

Dr. sc. Moniki Šabić

Prof. dr. sc. Jasni Hrenović

Mr. sc. Stjepanu Katiću,

Karmeli Novoselac

Dubravku Šijaku.

Posebna zahvala doc. dr. sc. Ireni Jukić bez čije tehničke i ljudske podrške izrada ovog rada ne bi bila moguća.

Veliko hvala mojoj dragoj obitelji na beskonačnom strpljenju i razumijevanju.

Hvala mojem Zdravku na bezrezervnoj podršci i ljubavi.

Veliko hvala mojem ocu.

Prepusti Gospodinu putove svoje i on će sve voditi! Ps.37

SAŽETAK

Gram-negativna bakterija *Ralstonia pickettii* stvara biofilm u farmaceutskim sustavima za ultračistu i pročišćenu vodu. U slučaju neučinkovite sterilizacije može kontaminirati sterilne otopine za parenteralnu primjenu putem kojih ulazi u bolnički sustav i kolonizira bolnički okoliš i pacijente. Studije o antimikrobnoj osjetljivosti i sustavnom praćenju *R. pickettii* u bolničkom okruženju vrlo su ograničene, posebice na većem broju izolata. Jednako, nevelik je broj istraživanja okolišnih izolata *R. pickettii* uz nestandardizirano testiranje osjetljivosti na antibiotike. Ovo ispitivanje provedeno je s ciljem utvrđivanja svojstava i osjetljivosti na antibiotike izolata *R. pickettii* s područja Republike Hrvatske. U petogodišnjem periodu prikupljen je 81 izolat iz različitih industrijskih sustava za farmaceutsku čistu i ultračistu vodu i laboratorijsku pročišćenu vodu. Osjetljivost na antibiotike ispitana je Epsilometarskim testom (E-testom) i disk difuzijskim (DD) testom. Lančanom reakcijom polimeraze ispitano je prisustvo gena *bla_{OXA22}* i *bla_{OXA60}* za oksacilinaze, gena *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, i *bla_{NDM}* za metalo- β -laktamazu, gena *bla_{OXA48}* za hidrolizirajuću karbapenemazu, gena *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtD* za metil-transferaze i gena *aac(3')-II*, *aac(6')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *ant(2'')* za aminoglikozid-modificirajuće enzyme. Ispitivanje prijenosa gena rezistencije na meropenem i gentamicin s *R. pickettii* na primatelja *E. coli* J53 koja je bila osjetljiva na ta dva antibiotika, a rezistentna na natrijev azid provedeno je metodom konjugacije. Izolati su genotipizirani gel elektroforezom u pulsirajućem polju. Dobiveni rezultati su otkrili različite profile osjetljivosti/rtezistencije. Većina izolata bila je otporna na kolistin, aztreonam, ertapenem, aminoglikozide i meropenem. Visoke stope rezistencije uočene su i kod tikarcilin/klavulanske kiseline, tikarcilina, amoksicilin/klavulanske kiseline i ampicilina. S druge strane ispitivani izolati su pokazali visoke stope osjetljivosti na tetracikline, tigeciklin, trimetoprim-sulfametoksazol, imipenem, cefepime, cefaleksin, cefoksitin, cefotaksim, piperacilin-tazobaktam, ciprofloksacin, ceftazidime i piperacilin. Modificirani Hodge test bio je pozitivan u 51,9% izolata, što bi upućivalo na stvaranje karbapenemaza. Gen *bla_{OXA22}* je otkriven u 37,0% izolata, a gen *bla_{OXA60}* u 80,3% izolata. Tako visoka prisutnost gena *bla_{OXA22}* i *bla_{OXA60}* ukazuje kako "sterilna" voda može predstavljati golemi okolišni rezervoar gena rezistencije koji se, onda primjenom iste, mogu prenijeti u kliničko okruženje i predstavljati prijetnju uspješnom liječenju infekcija. Nisu detektirani geni za metalo- β -laktamaze niti za karbapenemaze kao ni geni za najčešće 16SrRNA metil-transferaze niti za aminoglikozid modificirajuće enzyme. U izolatima je dokazano prisustvo endotoksina. Dokazana je pokretljivost plivanja i trzanja, proizvodnja izvan stanične polimerne supstance te sposobnost proizvodnje biofilma. Gel

elektroforeza s pulsirajućim poljem pokazala je veliku srodnost izolata i identificirana su tri glavna klastera koji sadrže podklaster. *R. pickettii* treba shvatiti ozbiljno kao mogućeg uzročnika nozokomijalnih infekcija kako bi se osigurala odgovarajuća terapija, spriječio razvoj rezistentnih sojeva i pokušala smanjiti mogućnost njezinog preživljavanja u sustavima za čistu, ultra čistu i laboratorijsku pročišćenu vodu.

Ključne riječi: *Ralstonia pickettii*, osjetljivost na antibiotike, *bla*_{OXA22} i *bla*_{OXA60}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, i *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA48}, *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtD*, *aac(3')-II*, *aac(6')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *ant(2'')*, pokretljivost, biofilm, endotoksin.

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Gram-negative bacterium *Ralstonia pickettii* is often isolated from the various areas: from industrial water production systems, soil, animals, plants, and from the oral cavity and upper respiratory tract as part of the commensal flora. It is isolated very often from pharmaceutical water systems where the concentration of nutrients (carbon) is low. It is oligotrophic and, in these conditions, despite low amounts of nutrients, it forms a biofilm. Further reproduction and production of the biofilm takes place at the expense of the dead cells in the biofilm, which, by lysing, release many substances that can be a nutrients source for further cell growth. It colonizes the hospital environment and patients. Therefore, in immunocompromised and seriously ill persons it can cause serious infections, often resistant to antibiotic treatment. *R. picketti* is an opportunistic pathogen of low virulence. It rarely causes infections in healthy individuals but can have high clinical significance. The aim of this research was to study phenotypic properties, sensitivity to antibiotics, detection of resistance genes, and the relatedness of tested isolates collected in a five-year period from different areas of Croatia.

Materials and methods: Eighty-one (81) *Ralstonia pickettii* isolates were obtained during a five-year period (2011-2015), from two different areas in Croatia (area I and area II) and from different sources: two pharmaceutical-industrial ultra-pure water (UPW) systems and three laboratory purified water (LPW) systems. Bacterial isolation from water samples was carried out by the membrane filtration method. The samples were filtered out by 0.45 µm membrane filters, which were then placed on the surface of R₂A and Tryptic soy agar and cultured for 24 hours at 37 °C. Grown colonies that indicated a possible *R. pickettii* were additionally identified based on the microscopic appearance of the cells, and by biochemical tests. All 81 isolates were subsequently confirmed as *R. pickettii* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) and by polymerase chain reaction (PCR) using species specific primers. The reference strain *R. pickettii* ATCC 27511 was used as a control strain.

Antimicrobial susceptibility testing was performed by Kirby-Bauer disc diffusion test (DD) on Mueller Hinton agar (MHA) for 26 antibiotics with antimicrobial discs. E-test was performed to determine minimum inhibitory concentrations (MIC) against 12 antibiotics, ceftazidime, cefepime, ceftriaxone, cefotaxime, imipenem, meropenem, piperacillin-tazobactam, tobramycin, gentamicin, amikacin, netilmicin and ciprofloxacin. Zone diameter and breakpoints were interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antibacterial Susceptibility Testing (EUCAST). Production of carbapenemases, metallo-β-lactamases, and extended spectrum β-lactamases

(ESBL) were assessed phenotypically; modified Hodge test, carbapenem inactivation method (CIM), combined disk test (CDT). The presence of genes *bla*_{OXA22} and *bla*_{OXA60} for oxacillinases, genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, and *bla*_{NDM} for metallo- β -lactamases, gene *bla*_{OXA48} for hydrolyzing carbapenemase, genes *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtD* for methyl-transferases and the genes *aac(3')-II*, *aac(6')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *ant(2'')* for aminoglycoside-modifying enzymes was tested by PCR. Transfer of resistance to meropenem and gentamicin was tested by the broth conjugation method using *E. coli* J53 resistant to sodium azide as a recipient, but sensitive to gentamicin and meropenem. Isolates were genotyped by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). Endotoxin production was tested with Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test. The production of extracellular polymer substance (EPS) by *R. pickettii* was tested on different materials. Biofilm production was investigated by microtiter plate biofilm assay. Motility was tested on nutrient media in a test tube and in Petri dishes with different agar consistencies of 0.3%-1.5%.

Results: Eighty-one (81) isolates collected from pharmaceutical and laboratory water production systems from two different areas of Croatia were phenotypically and biochemically identified as *R. pickettii* and confirmed by MALDI-TOF and PCR.

The results of *R. pickettii* antibiotic susceptibility testing using the disk diffusion method were as follows: high resistance rates were obtained for colistin (100%), aztreonam (96.3%), ertapenem (91.3%), and all aminoglycosides: netilmicin (88.9%), amikacin and tobramycin (87.7%), and gentamicin (86.4%). High resistance rates were also observed with beta-lactam antibiotics of the penicillin group: amoxicillin/clavulanic acid (71.6%), ticarcillin (67.9%), ticarcillin/clavulanic acid (61.7%), and ampicillin (58.0%). Significantly different resistance rates were obtained for piperacillin and piperacillin/tazobactam. Almost all isolates were susceptible to piperacillin and piperacillin/tazobactam, only 2 isolates (2.5%) were resistant, both from area II, label K (K82-1 and K82-2). All 81 isolates (100%) were sensitive to cephalosporin antibiotics ceftriaxone, cefotaxime, cefepime, and most to cephalexin (96.3%), cefoxitin (97.5%) and ceftazidime (81.5%). All 81 isolates (100%) were susceptible to imipenem, tigecycline, tetracycline and trimethoprim-sulfamethoxazole, and almost all to ciprofloxacin (93.8%). Resistance to meropenem was recorded in 29.6% of isolates, while 40.7% of isolates were intermediately sensitive to meropenem. Only 8,6% of the isolates were resistant to chloramphenicol, 40.7% of the isolates were moderately susceptible to chloramphenicol, while half of the isolates (50,6%) were susceptible.

In the E-test, all 81 isolates (100%) were susceptible to piperacillin/tazobactam, ceftriaxone and cefotaxime, 96.3% were susceptible to ciprofloxacin, and three (3.7%) were intermediately

susceptible to ciprofloxacin. 71.6% (58/81) of the isolates were sensitive to imipenem, while 28.4% (23/82) were intermediately sensitive. 67.9% (55/81) of the isolates were sensitive to ceftazidime and 66.7% (54/81) to cefepime. The E-test obtained a high resistance rate to meropenem (95.1%), and aminoglycosides, 85.2% for gentamicin and amikacin each, 86.4% for tobramycin, and 87.7% for netilmicin. Resistance to meropenem obtained in the E-test (95.1%) is significantly higher than the one obtained by the disk diffusion method (29.6%).

Resistance to all four tested aminoglycoside antibiotics was almost uniform. The most frequent phenotype of aminoglycoside resistance was T-G-A-N (tobramycin, gentamicin, amikacin, netilmicin) and was exhibited by 85.2% of the isolates (69/81), and they all were from the same area (area I), from different sources. Only two isolates from the same area, HL28 and HL30, were sensitive to tobramycin, amikacin, and gentamicin and resistant only to netilmicin (phenotype N). On the other hand, all 10 isolates from area II showed the opposite results; eight isolates were sensitive to all four aminoglycoside antibiotics; one isolate was sensitive to tobramycin and netilmicin and intermediately sensitive to gentamicin and amikacin, and one was resistant only to tobramycin and sensitive to the other three aminoglycosides.

No *R. pickettii* isolate showed the production of extended spectrum β -lactamase in the double disc test.

The modified Hodge test was positive in 51.9% (42/81) of isolates, weakly positive in 25.9% (21/81) and negative in 22.2% (18/81) of isolates. All 9 CIM tested isolates were positive.

The CDT was positive in 97.5% isolates (79/81) when meropenem was applied as an indicator disk, whereas 95.1% isolates were negative with imipenem (77/81). Four isolates (4.9%) exhibited positive CDT with both carbapenems. Despite the positive results of the Hodge and CDT tests in 28 isolates, gene encoding carbapenemases (*bla_{OXA48}*) and genes encoding metallo- β -lactamases (*bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, and *bla_{NDM}*) were not detected by molecular testing. The *bla_{OXA60}* gene was detected in 80.3% (65/81) whereas the *bla_{OXA22}* gene was detected in 37.0% (30/81) isolates. All isolates that tested positive for *bla_{OXA22}* were positive for *bla_{OXA60}* as well. Genes *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtD* for methyl-transferases and the genes *aac(3')-II*, *aac(6')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *ant(2'')* for aminoglycoside-modifying enzymes were not detected by PCR.

All tested isolates (81) demonstrated twitching motility on a solid nutrient medium with 1% agar. Swimming motility on semi-solid substrates with 0.3% agar was also demonstrated for all tested isolates both in the test tube and in the Petri dish. Swarming was not proven in any isolate. In this study, the production of EPS in *R. pickettii* was demonstrated. Production of biofilm was confirmed in 37% (30/81) isolates. In this study, it was proven that *R. pickettii* possesses an endotoxin that is thermostable and is released by destroying the bacterial cell at a

high temperature of 136 °C. PFGE revealed three larger clones, each containing subclones that differed in one to three bands.

Conclusion: The results obtained in this study characterize environmental bacterium *R. pickettii* isolated from water systems in Croatia. Its antibiotic resistance, ability to produce EPS and biofilm, types of motilities, ability to produce endotoxin, and finally the relatedness of isolates from different sources from different areas of Croatia were examined.

The antibiotic resistance results of this study are in line with previously published results, the most of isolates were susceptible to most of the tested antibiotics, except for colistin, aminoglycosides, ertapenem, aztreonam and meropenem.

The isolates from different locations clustered together, pointing out to a possible common source. Further comparison with currently unavailable local clinical isolates would be necessary to analyse the driving force for the development of relevant pathogens from typically environmental harmless bacteria. *R. pickettii* should be taken seriously as a possible cause of nosocomial infections to ensure adequate therapy, to prevent the development of resistant strains and to reduce the possibility of *R. pickettii* surviving in clean and ultra clean water systems.

These are extremely valuable data, and it would be useful to collect clinical isolates and test their resistance and compare with the obtained results. It might help in monitoring the change of an environmental bacterium into a potential pathogenic microorganism. It would be equally interesting to conduct a study in which a possible connection of some metabolic problems and conditions with the presence of *R. pickettii* in digestion would be established, because it was observed that *R. pickettii* appears more often in some metabolic conditions (e.g., diabetes, obesity). It would be useful to study biofilm production on different systems, with constant water flow to mimic the aqueous environment of a pharmaceutical water system. Such a test could be additionally carried out with the application of disinfection and sanitation at certain time intervals to determine the optimal removal of biofilm and extend the time of repeated washing and disinfection/sanitization of the system.

Keywords:

Ralstonia pickettii, antibiotic susceptibility, *bla*_{OXA22}, *bla*_{OXA60}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA48}, *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtD*, *aac*(3')-II, *aac*(6')-Ib, *aph*(3')-Ia, *ant*(2''), motility, biofilm, endotoxin.

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
1.1	<i>RALSTONIA PICKETTII</i>	1
1.2	FENOTIPSKA SVOJSTVA	3
1.2.1	Endotoksin	3
1.2.2	Pokretljivost bakterijske stanice	9
1.2.3	Proizvodnja biofilma.....	10
1.2.4	Rezistencija na antibiotike	13
1.2.4.1	Otpornost na staničnoj razini	14
1.2.4.1.1	Biokemija bakterijske rezistencije na antibiotike.....	14
1.2.4.1.2	Genetička osnova bakterijske rezistencije na antibiotike.....	16
1.2.4.2	Otpornost na razini zajednice	16
1.2.4.3	Urođena i stečena rezistencija	17
2	OBRAZLOŽENJE TEME I CILJEVI RADA	19
3	MATERIJALI I METODE.....	21
3.1	Izolati <i>R. pickettii</i>	21
3.2	Popis materijala	22
3.2.1	Gotove komercijalne mikrobiološke podloge i njihove komponente	22
3.2.2	Komercijalni biokemijski testovi	25
3.2.3	Kemikalije, reagensi, dodatci podlogama.....	25
3.2.4	Reagensi za dokazivanje proizvodnje endotoksina (Charles River laboratories, Charleston, SC).....	26
3.2.5	Reagensi za gel elektroforezu u pulsirajućem polju	26
3.2.6	Enzimi, proteini i pripadni puferi.....	27
3.2.7	Standardi molekulskih masa	27
3.2.8	Specifične komercijalne smjese reagensija – kompleti	28
3.2.9	Nukleinske kiseline.....	28
3.2.10	Antibiotici za ispitivanje antibiotske rezistencije.....	29
3.2.10.1	Dijagnostički diskovi natopljeni antibiotikom (Mast Group, UK).....	29
3.2.10.2	Trakice s gradijentom antibiotika za epsilometarski test (Liochem, Italija).....	30
3.2.11	Boje.....	31
3.2.12	Uređaji.....	31
3.2.13	Laboratorijski pribor i potrošni materijal.....	32
3.3	METODE	33
3.3.1	Fenotipska identifikacija <i>R. pickettii</i>	33
3.3.2	Ispitivanje pokretljivosti <i>R. pickettii</i>	34

3.3.2.1	Ispitivanje pokretljivosti u epruveti na SIM agaru	34
3.3.2.2	Ispitivanje oblika pokretljivosti <i>R. pickettii</i>	34
3.3.3	Ispitivanje proizvodnje biofilma kod <i>R. pickettii</i>	35
3.3.3.1	Proizvodnja izvanstaničnih polimernih supstanci	35
3.3.3.2	Ispitivanje stvaranja biofilma u mikrotitarskim pločama s 96-bunarića	35
3.3.4	Ispitivanje proizvodnje endotoksina	37
3.3.5	Identifikacija <i>R. pickettii</i> masenom spektrometrijom	38
3.3.6	Potvrda identifikacije <i>R. pickettii</i> lančanom reakcijom polimeraze	39
3.3.7	Ispitivanje srodnosti izolata <i>R. pickettii</i> elektroforezom u pulsirajućem polju..	40
3.3.7.1	Bakterijski uzorak, izolacija i razgradnja DNA.....	40
3.3.7.2	Razdvajanje fragmenata kromosomske DNA gel elektroforezom u pulsirajućem polju.....	41
3.3.8	Ispitivanje osjetljivosti izolata <i>R. pickettii</i> na antibiotike	41
3.3.8.1	Metoda disk difuzije	41
3.3.8.2	Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika	42
3.3.8.3	Fenotipska detekcija β -laktamaza proširenog spektra metodom dvostrukog diska	43
3.3.8.4	Fenotipska detekcija karbapenemaza	43
3.3.8.5	Fenotipska detekcija metalo- β -laktamaza metodom kombiniranog disk testa	44
3.3.8.6	Fenotipska detekcija rezistencije na aminoglikozide	44
3.3.8.7	Detekcija prijenosa gena za karbapenemaze konjugacijom	45
3.3.9	Detekcija gena rezistencije metodom lančane reakcije polimeraze.....	46
3.3.10	Statistička analiza.....	48
4	REZULTATI.....	49
4.1	IZOLATI <i>R. PICKETTII</i>	49
4.2	FENOTIPSKA SVOJSTVA <i>R. PICKETTII</i>	50
4.2.1	<i>Ralstonia pickettii</i> i pokretljivost	51
4.2.1.1	Ispitivanje pokretljivosti u epruveti	51
1.1.1.1	Ispitivanje pokretljivosti tipa trzanja i plivanja na agaru	55
4.2.2	<i>R. pickettii</i> i biofilm	58
4.2.2.1	Proizvodnja izvanstaničnih polimernih supstanci (IPS).....	58
4.2.2.2	<i>R. pickettii</i> i proizvodnja biofilma.....	59
4.2.3	Ispitivanje proizvodnje endotoksina LAL testom.....	65
4.2.4	Potvrda identifikacije <i>R. pickettii</i>	66
4.2.4.1	Masena spektrometrija.....	66
4.2.4.2	Lančana reakcija polimeraze	66

4.2.4.3	Srodnost izolata <i>R. pickettii</i>	67
4.2.5	Osjetljivost na antibiotike i mehanizmi rezistencije na antibiotike	71
4.2.5.1	Rezultati ispitivanja osjetljivosti na antibiotike metodama disk difuzije ...	71
4.2.5.2	Rezultati ispitivanja osjetljivosti na antibiotike E-testom	74
4.2.5.3	Rezultati testa dvostrukog diska	77
4.2.5.4	Rezultati modificiranog Hodge testa i testa inhibicije karbapenema	77
4.2.5.5	Rezultat testa kombiniranih diskova za detekciju metalo- β -laktamaza.....	79
4.2.5.6	Analiza višestruke aminoglikozidne rezistencije na SAGA ploči.....	79
4.2.5.7	Rezultati testa konjugacije.....	80
4.2.6	Detekcija gena rezistencije lančanom reakcijom polimeraze	80
4.2.6.1	Detekcija bla _{OXA22} i bla _{OXA60}	80
4.2.6.2	Detekcija gena za metalo- β -laktamaze	83
4.2.6.3	Detekcija gena rezistencije na aminoglikozide	84
5	RASPRAVA.....	86
6	ZAKLJUČCI.....	99
7	POPIS LITERATURE	100
	ŽIVOTOPIS	113
	BIBLIOGRAFIJA AUTORA	114
	POPIS KRATICA.....	121
	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	122
	BASIC DOCUMENTATION CARD.....	123

1 UVOD

1.1 RALSTONIA PICKETTII

Ralstonia pickettii je Betaproteobakterija, pripada rodu *Ralstonia* koji je osnovan 1995. godine s ciljem uvrštavanja bakterijskih vrsta *Alcaligenes eutrophus*, *Burkholderia solanacearum* i *Burkholderia pickettii* (1), a 2004. godine dijeli se na dva: rod *Ralstonia* i rod *Wautersia* (tj. već postojeći *Cupriavidus*). *R. pickettii* (prvotno nazvana *Pseudomonas pickettii* pa *Burkholderia pickettii*) ostaje u rodu *Ralstonia* (2). S obzirom na rezultate prosječne istovjetnosti nukleotida (engl. *Average Nucleotide Identity* - ANIb) smatra se da među sojevima *R. pickettii* postoje najmanje dvije podvrste, moguće i dvije vrste *R. pickettii* (3). Vrlo često je izolirana iz najrazličitijih područja: iz sustava za proizvodnju industrijske vode, tla, životinja i biljaka, iz vodenih sustava svemirskih stanica (4), a nađena je i kao dio komenzalne flore usne šupljine i gornjih dišnih puteva (5). Podnosi širok raspon temperatura, 15°C - 42°C (6), može proći kroz pore veličine od 0,2 µm i 0,45 µm o čemu treba razmišljati kod sterilizacije koja se provodi filtracijom (6–9). Opisana je otpornost na neke dezinficijense, poput klorheksidina (10–12), ali i kontaminacija dezinficijensa (13). Izolira se vrlo često iz sustava za proizvodnju farmaceutske vode gdje je niska koncentracija hranjivih tvari (ugljika). Oligotrofna je (14) i u tim uvjetima, unatoč niskim količinama hranjivih tvari, stvara biofilm. Daljnje razmnožavanje i proizvodnja biofilma odvija se na račun uginulih stanica u biofilmu koje liziranjem oslobađaju sadržaj od kojega mnoge oslobođene tvari mogu biti izvor za daljnji rast stanica. Takav rast na liziranim produktima uginulih stanica naziva se kriptični rast (15) i omogućava stanicama nastavak stvaranja biofilma (9,16–18).

R. pickettii je oportunistički patogen niske virulencije. Rijetko uzrokuje infekcije u zdravih osoba, ali može imati visoki klinički značaj. Kroz godine su opisivani smrtni ishodi različitih infekcija čiji uzročnik je bila *R. pickettii*. Prvi smrtni ishod zapsan je 1968. godine. Radilo se o 33-godišnjem muškarcu, narkomanu kod kojeg je ustanovljen endokarditis. Uzročnik je identificiran kao Grupa IVd, a kasnije je identificirana *R. pickettii* (19). Kolonizira bolničku sredinu i pacijente. Stoga u imunokompromitiranih i teško bolesnih osoba može uzrokovati ozbiljne infekcije, često vrlo tvrdokorne u liječenju antibioticima. Često se izolira iz dijaliznih sustava opremljenih cjevovodima od kloriranog polivinil klorida (18), a kolonizira i druge segmente bolničkog okruženja, uključujući i druge hemodijalizne uređaje (20–24), uređaje za potpomognuto disanje (25), produljene i trajne intravaskularne katetere (25–27).

Izolirana je iz mnogih kliničkih uzoraka, ispljuvka, krvi, rane, urina, brisa nosa, brisa uha, cerebrospinalne tekućine (17,28,29). Povezana je sa širokim spektrom bolničkih infekcija kod imunokompromitiranih pacijenata kao što je bakterijemija (21,28,30–34), kod pacijenata s opekotinama (34), pseudobakterijemija (11,13,35), septikemija u odraslih (20), neonatalna sepsa (36,37), septički artritis (38), infekcija umjetnih zglobova (39), osteomijelitis (40), respiratorne infekcije (41), endokarditis (19), infekcije u bolesnika s cističnom fibrozom (42–47). Dovodi se u vezu sa smanjenjem bubrežne funkcije kod pacijenata s ulceroznim kolitisom (48). Nozokomijalna kolonizacija i infekcije *R. pickettii* vrlo su često povezane s uporabom kontaminiranih otopina koje su deklarirane kao sterilne (6,10,18,30,33,34,49–53), a pronađena je i kao kontaminanta boca s hranjivim podlogama za hemokulturu (54).

Uz opisane negativne značajke kolonizacije sustava za vodu, kolonizacije bolničke sredine i uzrokovanja najrazličitijih infekcija *R. pickettii* bi s druge strane mogla imati značajnu ulogu u bio-razgradnji štetnih spojeva i kemikalija koje opterećuju ekosustav i ozbiljno ugrožavaju zdravlje ljudi, životinja, ali i biljni svijet. Razgrađuje neke herbicide (atrazin) (55), klorobenzen koji se koristi u proizvodnji najrazličitijih kemikalija i otapala (56), fenole (57), sinergističkim djelovanjem potpomaže gljive *Pleurotus eryngii* i *Fomitopsis pinicola* u biorazgradnji pesticida DDT (diklor-difenil-trikloretan), hidrofobnog organskog zagađivača koji se može akumulirati u prirodi i takav štetno djelovati na ljude i životinje (58,59). Potencijalno korištenje *R. pickettii* u biotransformaciji i dekolorizaciji otpadnih boja, posebno metilenskog modrila, se istražuje (60).

Ne postoje standardne *in vitro* metode ispitivanja osjetljivosti *R. pickettii* na antibiotike, što može biti izazov za liječenje sve učestalijih slučajeva infekcija na bolničkim odjelima za koje terapija može biti problematična zbog rezistencije na mnoge antibiotike (31). Moglo bi se raditi o intrinzičnoj rezistenciji ili rezistenciji uslijed prisutnosti pokretnih genetičkih elemenata (61). U malom broju studija nađeno je da *R. pickettii* proizvodi kromosomsku, inducibilnu β -laktamazu klase D, OXA-22, odgovornu za otpornost ili smanjenu osjetljivost na aminopeniciline, cefalosporine uskog spektra i aztreonam (62) i β -laktamazu OXA-60 koja hidrolizira imipenem (63,64). Kod *R. pickettii* izolirane iz krvi kineskog pacijenta prvi put su otkrivena dva nova gena klase D β -laktamaza (*bla*_{OXA-898} i *bla*_{OXA-899}) i potvrđen gen rezistencije na sulfonamide *sul2* (65). Neki izolati *R. pickettii* otporni su na kolistin (66). Studije o osjetljivosti na antimikrobne tvari i sustavnom praćenju *R. pickettii* u okolišu i u kliničkim uvjetima vrlo su ograničene, osobito na većem broju izolata (3,61,67). Dostupni podatci se dosta razlikuju, a rezultati ispitivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) antibiotika i osjetljivosti metodom disk difuzije nisu nužno povezani.

R. pickettii raste na svim rutinskim hranjivim podlogama, a za kontrolu ultračiste vode iz sustava za farmaceutsku vodu koristi se prema europskoj farmakopeji R₂A agar, koji je namijenjen za kultivaciju mikroorganizama iz područja s niskom koncentracijom hranjivih tvari. Identifikacija se zasniva na fenotipskim svojstvima: izgledu i boji kolonija, testu oksidaze i biokemijskim testovima.

1.2 FENOTIPSKA SVOJSTVA

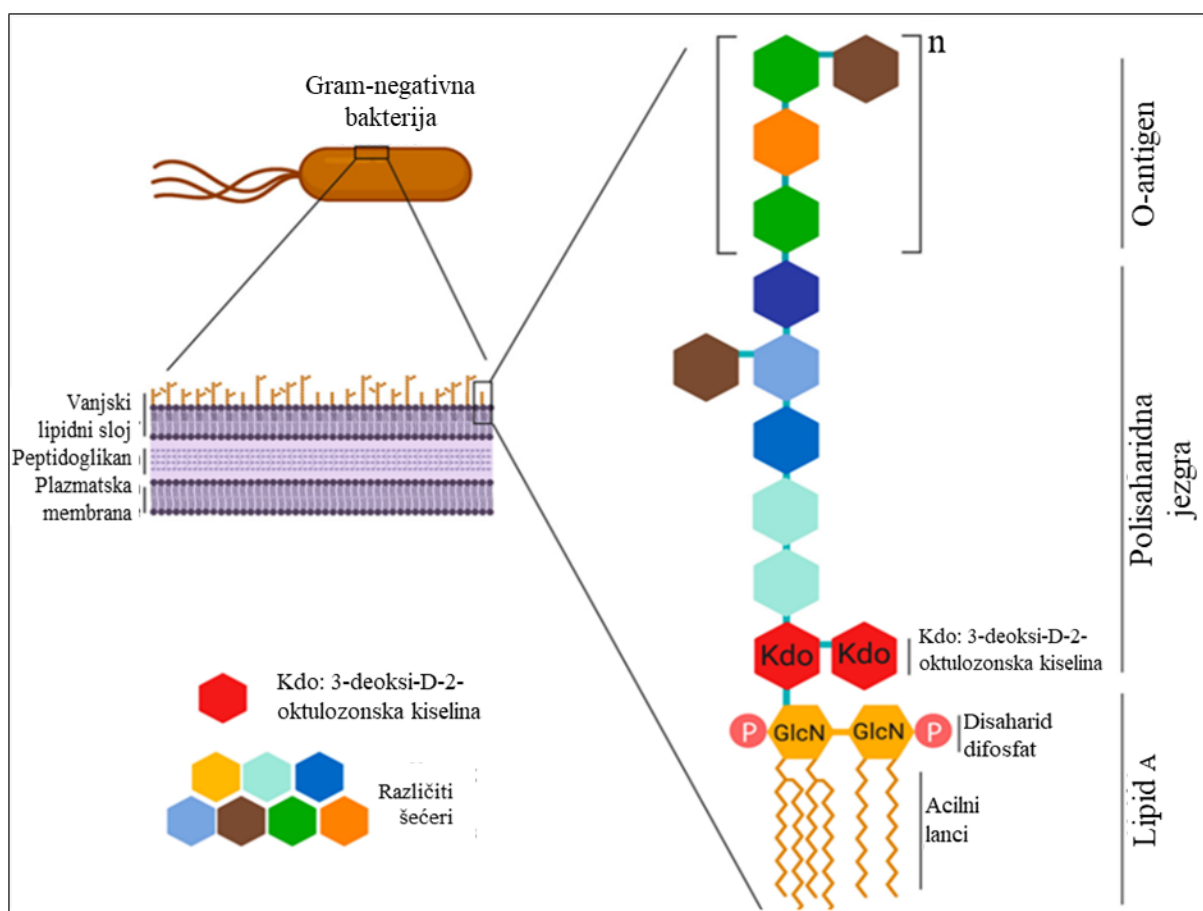
R. pickettii je prvi put opisana 1964. godine u grupi nefermentativnih Gram-negativnih štapića (66). Raste u aerobnoj atmosferi, uz optimalnu temperaturu 30-37°C, varijabilno na 42°C. U mikroskopskom preparatu su to štapići dugi 1 do 5 µm, promjera 0,5 do 1,0 µm. Daje pozitivne reakcije katalaze i oksidaze, pokretna je, ima jedan polarni bič (68). Reakcija lizin- i ornitin-dekarboksilaze je negativna. Oksidacijom proizvodi kiselinu iz glukoze, maltoze, laktoze, ksiloze, L-arabinoze, galaktoze, fruktoze i manoze, a ne proizvodi iz saharoze i adonitola (68,69), ne reducira nitrate u nitrite, nema želatinazu, nema proteazu, ne hidrolizira eskulin (68).

1.2.1 Endotoksin

Endotoksin je glavna komponenta vanjske stanične stijenke većine Gram-negativnih bakterija. Ima strukturnu ulogu, pridonosi staničnoj krutosti povećavajući čvrstoću stanične stijenke, posreduje u kontaktima s vanjskim okolišem koji mogu potaknuti strukturne promjene koje omogućuju život u različitim uvjetima. Nadalje, niska propusnost vanjske membrane djeluje kao barijera za zaštitu bakterija od antimikrobnih spojeva podrijetlom iz domaćina. Oslobađa se dijeljenjem stanice ili kod smrti stanice. Ima vrlo važnu ulogu u izazivanju urođenog imunskog sustava sisavaca, spada u klasu molekula koje prepoznaju receptori imunskog sustava domaćina i nazivaju se molekularni obrasci povezani s mikrobima, molekularni znak invazivnih mikroba (Slika 1). Smatra se primarnim stimulatorom urođenog imuniteta i idealnim kandidatom za ranu detekciju patogena (70). Kod teških infekcija uzrokovanih Gram-negativnim bakterijama, otpuštanje velikih količina endotoksina u krv može uzrokovati masivan upalni odgovor i septički šok koji obično dovodi do zatajenja većine organa i smrti.

Kemijski je to lipopolisaharid (LPS), amfifilna (hidrofilna i lipofilna) makromolekula koja je rezistentna na visoke temperature i stabilna u širokom rasponu pH vrijednosti. Sastoji se od tri

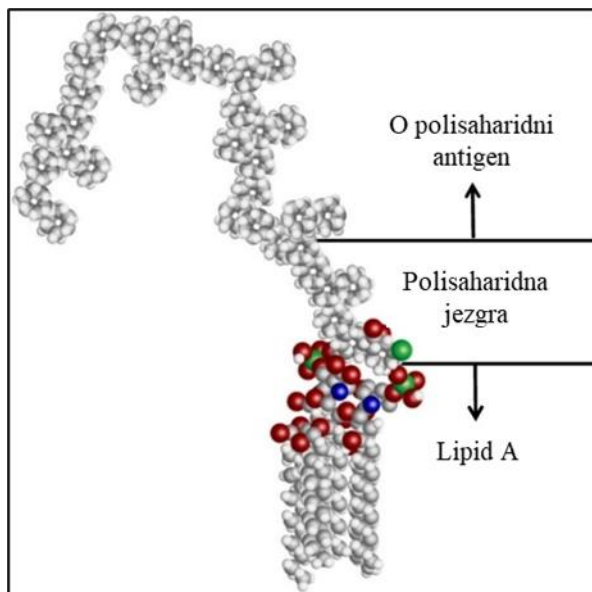
primarne komponente koje se razlikuju po svojoj genetici, strukturi i funkciji (71–74) (Slika 2). Lipidni dio (glikofosfolipid - lipid A) je visoko očuvana molekula i sastoji se od četiri do sedam repova masnih kiselina koje daju svojstvo hidrofobnosti i vežu se na glavnu skupinu od dva fosforilirana N-acetilglukozamina. Lipid A se često naziva i endotoksin i najodgovorniji je za biološke učinke LPS-a. Može izazvati septički šok kod različitih domaćina putem aktivacije monocita i makrofaga koji oslobađaju niz upalnih citokina kao odgovor na invaziju patogena. Endotoksični učinci lipida A pokreću se vezanjem ove komponente na receptore domaćina (engl. *Toll-Like Receptor* 4, TLR 4) i serumske proteine (70). U makrofagima se aktivacijom TLR4 lipidom A pokreće biosinteza različitih medijatora upale kao što su tumor nekrotizirajući faktori i interleukini, a u mononukleocitima i endotelnim stanicama lipid A stimulira tkivne čimbenike upale (71). Lipid A je kovalentno vezan za manje očuvanu središnju polisaharidnu jezgru (engl. *core*), koja je podijeljena na unutarnju jezgru, koja se općenito sastoji od šećera 2-keto-3-deoksioktononske kiseline (Kdo) i L-glicero-D-mano heptoze (Hep), i vanjsku jezgru od heksoza i heksozamina.



Slika 1. Prikaz biokemijske strukture lipopolisaharida u vanjskoj membrani Gram-negativnih bakterija. Slika preuzeta od Mazgaen L, Gurung P (74), uz preinake.

Središnja jezgra se proteže do hipervarijabilnog O-polisaharidnog antigena koji se sastoji od 1-50 podjedinica sačinjenih od 1-7 glikozilnih ostataka. Među različitim bakterijskim serotipovima i vrstama, O-antigen može imati znatniju varijaciju u strukturi i stupnju grananja glikozilnih ostataka. Ova varijabilnost koristi se za klasifikaciju bakterijskog serotipa (73,75,76).

Iako jezgra općenito sadrži dvije jedinice 3-deoksi-D-mano-okt-2-ulozonske kiseline (keto-deoksioktulozonat) kao očuvanu značajku, broj i vrsta šećera (npr. heptoza) koji čine oligosaharide razlikuju se s obzirom na fosfate, aminokiseline i supstituente etanolamina.



Slika 2. Struktura molekularnih komponenti LPS-a
Evolucijski očuvana hidrofobna lipidna A skupina, središnji polisaharid i hipervarijabilni O-polisaharidni antigen. Skupina lipida A može imati više repova masnih kiselina koji učvršćuju LPS u membranu bakterijske stanice, a prepoznaju je proteini receptora domaćina. Slika preuzeta od Loreen R. Stromberg i suradnika (73), uz preinake.

Postoje dva glavna oblika LPS-a, glatki (engl. *Smooth*, S) oblici koji sadrže O-polisaharidne lance s ponavljajućim oligosaharidnim jedinicama koje variraju u duljinama lanaca i hrapavi (engl. *Rough*, R) oblici LPS-a koji nemaju specifičan O-lanac, shematski prikaz organizacije LPS-a kod *E. coli* na slici 3. S-oblik je nositelj virulencija, ali i R-oblik može izazvati imunski odgovor (73). Varijacija O-lanca pripisuje se broju ponavljanja oligosaharida i slijedu/strukturi ponavljajućeg motiva (75,76).

Varijacija među vrstama, a obzirom na lipid A, prvenstveno se temelji na broju masnih kiselina i supstitucijskom obrascu na fosforiliranoj okosnici glukozamin-disaharida. Lipid A je acilirani disaharid i čini hidrofobno sidro LPS-a u vanjskom listiću stanične membrane Gram-negativnih bakterija. Promjene iz potpuno aciliranih lipida A u deacilirane oblike lipida A manifestiraju se u različitim prostornim konfiguracijama zbog varijacija u poprečnim presjecima njihovih hidrofobnih dijelova. Tako, heksa-acilirani lipid A je stožastog izgleda, a

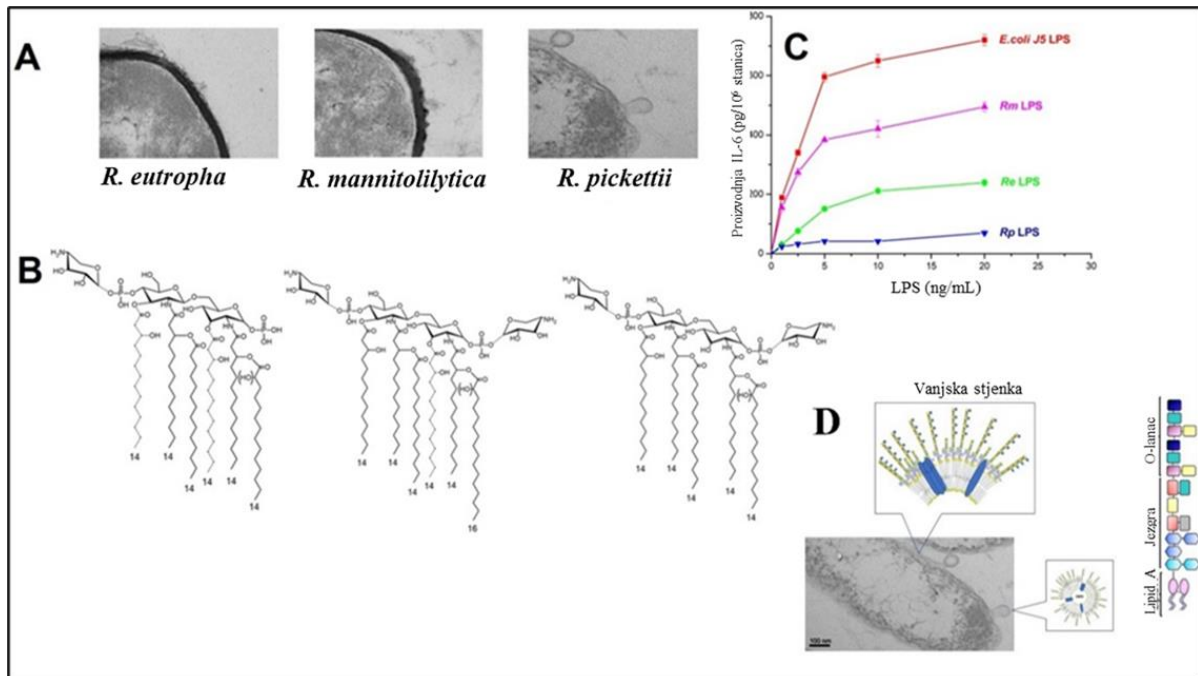
deacilirani oblici imaju tendenciju dobivanja cilindričnih do struktura u obliku obrnutog stošca. Te deacilacije lipida A mogu nametnuti modificirani oblik lipida A koji rezultira promjenom stanične stijenke i stvaranjem mjehurića (vezikula) vanjske bakterijske stijenke (engl. *Outer Membrane Vesicles*, OMV). Mjehurići su liposomalne strukture koje strše, izbočuju stijenku Gram-negativnih bakterija i mogu igrati različite uloge kako kod okolišnih tako i kod patogenih bakterija, ali i simbiota kao što su komunikacija među stanicama (engl. *quorum sensing*), horizontalni prijenos gena, međubakterijsko ubijanje, produkcija toksina, hidroliza polisaharida i olakšani prolaz kroz barijere u ljudskom tijelu. Molekularni mehanizmi koji dovode do stvaranja mjehurića vanjske bakterijske stijenke nisu potpuno definirani. OMV dijeli osnovne komponente s matičnom staničnom stijenkom, uključujući proteine stanične stijenke, fosfolipide i lipopolisaharide. Građa stanične stijenke i mjehurića stanične stijenke je vrlo slična, ali neki autori dopuštaju i moguće razlike u proteinskom sastavu kod nekih bakterija (77).

Ljudska crijevna mikrobiota mijenja se tijekom života, ali mijenja se ovisno o dijeti, unesenoj hrani, bolesnim stanjima. Uočen je porast Gram-negativnih bakterija u probavnom traktu kod pretilih pacijenata kao i u modela miševa s bogatom prehranom. Dolazi do niskog povećanja količine LPS-a u krvi takvih osoba i na modelima miševa (78,79). U bolesnika s metaboličkim bolestima dokazana je prisutnost bakterija iz roda *Ralstonia* i uočeni su, a vezano uz varijacije u lipidu A, različiti imunosni odgovori (79,80).

Struktura lipida A kod *R. pickettii* karakterizirana je kao hipo-acilirani, penta-acil lipid A, zajedno s promjenom šećera arabinozom na N kraju (AraN) na obje fosfatne skupine. Poznato je da i supstitucija s AraN i nedovoljna acilacija pogoduju stvaranju i oslobađanju vezikula vanjske bakterijske membrane. Elektronskom mikroskopijom (Slika 3) pokazano je da debljina bakterijske membrane varira sa strukturama LPS-a i da kratki LPS *R. pickettii*, zajedno s nedovoljnom acilacijom lipida A i promjenama fosfatnih skupina, stvara više mjehurića iz njene tanke opne. Ti mjehurići prolaze kroz crijevnu membranu lakše nego što to mogu učiniti bakterije i oslobađaju više LPS-a u krv. Međutim, pokazalo se da okarakterizirana struktura inducira niske razine citokina, ako ih ima, kao što je prikazano na slici 3, što je također bilo u skladu s razinom upale niskog stupnja opisanom u pretilih pacijenata. Ovo predstavlja novi primjer niske upalne sposobnosti LPS-a koji potječe iz crijevnog mikrobioma, objašnjavajući da ti LPS-i nisu toliko toksični i opasni kao klasične strukture tipa *E. coli* (79).

Aktivnost endotoksina označava se kao jedinice endotoksina (engl. *Endotoxin Unit*, EU). Već male količine endotoksina (< 1 ng) aplicirane intravenozno dovoljne su za aktivaciju imunosnog sustava i mogu potaknuti simptome (81). Općenito, oko 10 EU je ekvivalentno 1

ng endotoksina (82). Najistraživaniji je endotoksin (LPS) kod bakterije *Escherichia coli* i zna se da jedna stanica sadrži 2×10^6 LPS-a što odgovara broju oko 20 femtograma ($1 \text{ fg} = 10^{-15} \text{ g}$) (79).



Slika 3. (A) Debljina stanične stijenke kod tri vrste ralstonija snimljeno elektronskim mikroskopom s (B) njihovim strukturama lipida A gdje je vidljivo da *R. pickettii* ima repove pet masnih kiselina, a ostale dvije ralstonije imaju po šest masnih kiselina, (C) usporedba kapaciteta njihovih LPS IL-6 indukcija i (D) shematski prikaz vanjske membrane *R. pickettii*, s vezikulama vanjske membrane (OMV) i molekularni sastav LPS-a. Slika preuzeta od Caroff M, Novikov A. (79), uz preinake.

Puno je napora uloženo i još uvijek nisu zadovoljeni svi kriteriji kako bi se dobio pouzdan i brz test za detekciju LPS-a koji ne troši biološke resurse. Metode detekcije LPS-a obično su usmjerene na kvantifikaciju lipida A ili njegove biološke aktivnosti, a ne na identifikaciju serogrupe. Iako je ova metoda vrijedna za određivanje kontaminacije endotoksinom u sterilnim injekcijama i implantatima, ona pruža malu vrijednost za dijagnostičku primjenu. Imunotestovi za razlikovanje antigena optimizirani su za detekciju proteinskih antigena i ne uzimaju u obzir amfilnu biokemiju lipoglikana, što uzrokuje nisku osjetljivost i ponovljivost. Detekcija O-antigena klasičnim metodama poput lateks aglutinacije ili imunomagnetske separacije koristi križno reaktivna poliklonska protutijela, što može dovesti do pogrešne identifikacije serogrupe. Imunoenzimski testovi za otkrivanje LPS-a i O-antigena u svrhu identifikacije serogrupe također su razvijeni, ali zahtijevaju opsežnu pripremu uzorka, višestruka protutijela, a ipak pokazuju nespecifične interakcije protutijela. Lančana reakcija polimeraze također je metoda za otkrivanje specifičnih gena za transport LPS-a i biosintezu polisaharida (73).

Tekućinskom kromatografijom detektiraju se markeri masnih kiselina, 3-OH masne kiseline, specifične za Gram-negativne bakterije. Razvijena je metoda za procjenu ekvivalentne

količine endotoksina, na temelju *E. coli* koja se koristi kao standard. Manje je osjetljiva od LAL (limulus-amebocitni lizat) testa, ali je manje sklona interferencijama i može se koristiti za detekciju endotoksina u krvi (79).

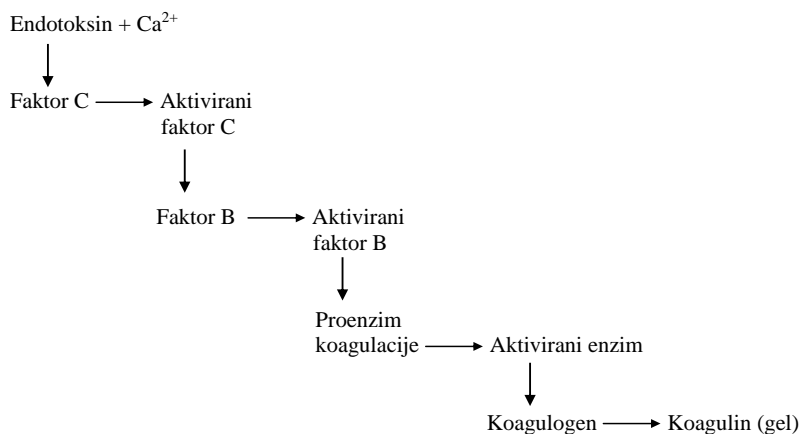
Masena spektrometrija MALDI-TOF (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*; matriksom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom - analizator masa vremenom leta) detektira LPS detekcijom lipida A. Može se koristiti u isto vrijeme za karakterizaciju LPS-a i za dobivanje informacija o bakterijskim rodovima. Poboljšana je u smislu osjetljivosti. Razina osjetljivosti povećana je otkrivanjem molekularnih iona koji odgovaraju ostatku lipida A bakterije *E. coli*, koristeći serijska razrjeđenja bakterijskih kultura, a ne razrjeđenja konačnog koncentriranog ekstrakta lipida A. Ova se metoda može koristiti za karakterizaciju podrijetla otkrivenog LPS-a, kao i sposobnosti bakterije da se odupre polimiksinu prema prisutnosti ili odsutnosti promjena na šećerima fosfatnim skupinama lipida A (79). Karakteristični vrh može se dobiti iz uzorka bakterijske kulture od 1 mL koji sadrži samo 1×10^3 – 1×10^4 živih bakterijskih stanica (engl. *Colony Forming Unit*, CFU) (79). Usporedni eksperimenti koje su objavili drugi autori dali su granicu detekcije od 1×10^5 CFU (83).

Pirogeni test na kuniću bio je prvi odobreni test od strane FDA (engl. *Food and Drug Administration*). Test je kvalitativni, mjerila se koncentracija endotoksina koja je uzrokovala povišenje temperature kod životinje. Bilo kakav temperaturni odgovor značio je prisustvo endotoksina.

Limulus amebocitni lizat (LAL) test je zlatni standard za detekciju lipida A. Godine 1956. otkriveno je da cirkulirajući amebociti iz tjelesne tekućine raka *Limulus polyphemus* (rak bodljaš/potkovičasti rak) aglutiniraju nakon dodavanja endotoksina koji aktivira kaskadnu reakciju proteaze. Budući da su za test bili potrebni lizati amebocita, nazvan je limulus amebocitni lizat (LAL) test. Američka i europska farmakopeja su objavile smjernice za izvođenje LAL testa u ispitivanju endotoksina u sterilnim i biološkim lijekovima. Unatoč nekim izazovima, LAL test je brži, isplativiji i prema nekim ispitivanjima 300 puta osjetljiviji od pirogenog testa na kuniću (70). Varijante LAL testa su gel-ugrušak (engl. *gel-clot*) metoda - turbidimetrijska i kromogena (70,84). Osjetljivost LAL testova ovisi o vrsti uzorka, primijenjenoj metodi i vremenu obrade, kao i faktoru razrjeđenja. Osim toga, sam izvor LAL reagensa bitan je čimbenik, što je očito kada se uspoređuju različite granice detekcije prijavljene za standarde endotoksina.

Gel-clot metoda je farmakopejska metoda i temelji se na geliranju LAL lizata u prisustvu bakterijskih endotoksina (85,86). Lizirani amebociti raka tvore čvrsti gel u reakciji s

bakterijskim endotoksinima u prisustvu Ca^{2+} iona. Bakterijski endotoksin uzrokuje aktivaciju prvog proenzima od serije enzima uključenih u tipičnu kaskadnu reakciju koja uzrokuje transformaciju koagulogena prisutnog u LAL reagensu u želatinozni i netopljivi koagulin (Slika 4).



Slika 4. Enzimska kaskadna reakcija LAL-endotoksin.

Turbidimetrijska (engl. *turbidimetric gel-clot*) metoda može biti kinetička, mjeri vrijeme potrebno za postizanje unaprijed zadane vrijednosti zamućenja u reakcijskoj smjesi i turbidimetrijska metoda krajnje točke (engl. *turbidimetric end-point*) gdje se ispituje kvantitativni odnos između koncentracije endotoksina i zamućenja (apsorbancije) u reakcijskoj smjesi na kraju vremena inkubacije (84).

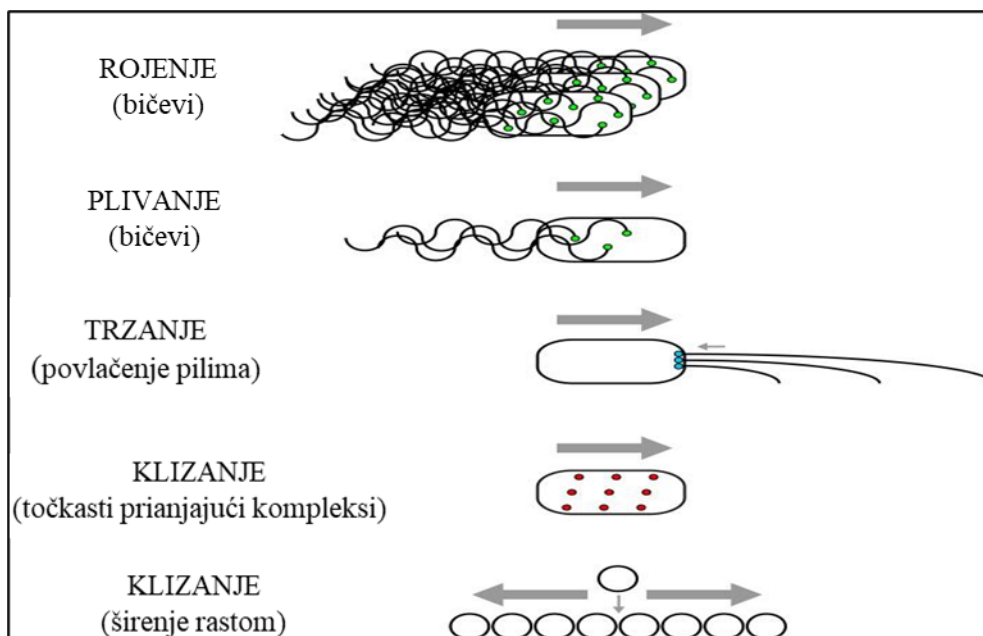
Kromogena metoda prvi put je razvijena 1977. godine, kada je utvrđeno da lizat amebocita hidrolizira specifične sekvence aminokiselina koje sadrže kromatofor pNA (p-nitroanilid). Ova metoda koristi sintetski kromogeni supstrat koji sadrži specifičnu sekvencu aminokiselina, koja oponaša mjesto cijepanja u koagulogenu. LAL aktiviran endotoksinom cijepa ovo mjesto, uzrokujući otpuštanje pNA, što testu daje prepoznatljivu žutu boju (84).

1.2.2 Pokretljivost bakterijske stanice

R. pickettii ima jedan bič na polu stanice (87,88). Često se izolira iz sustava za vodu unutar farmaceutskih postrojenja, javlja se kod bolesnika sa cističnom fibrozom gdje, u zajednici s drugim bakterijama, sudjeluje u infekciji i možebitnoj proizvodnji biofilma. O vrstama pokretljivosti kod *R. pickettii* nema objavljenih radova.

Kod bakterija su opisani različiti oblici pokretljivosti: rojenje, plivanje, trzanje, klizanje preko površine i klizanje preko već poraslog sloja mikroorganizama (engl. *swarming, swimming, twitching, gliding and sliding*) (89). Svaki od ovih oblika pokretljivosti zahtijeva

hranjivu podlogu određene koncentracije agara. Rojenje je višestanično kretanje rotacijom brojnih lateralnih spiralnih bičeva koji su esencijalni za pokretljivost rojenjem, a koje induciraju viskozni medij ili površina 0,5-0,7% agara. Plivanje je kretanje više individualnih jedinki u tekućem mediju s 0,3% agara koju omogućava rotacija polarnog biča stanice (90,91). Pokretljivost trzajem ispituje se na čvrstoj podlozi s 1% agara. Kod te pokretljivosti stanica se pokreće trzanjem uslijed skupljanja i produljivanja (retrakcija i ekstenzija) malih pila (90). Klizanje (engl. *gliding*) je aktivno kretanje koje ne zahtijeva bičeve niti pile nego fokalnu adheziju uz površinu, a drugi oblik kretanja klizanjem je pasivna površinska translokacija (engl. *sliding*) uslijed rasta preko već poraslih kolonija (Slika 5) (89). Proizvodnja biofilma povezana je s pokretljivošću stanica u vidu trzanja za što su potrebni pili tipa IV koji su neophodni za inicijalnu agregaciju stanica i razvoj mikro kolonija (92–94).

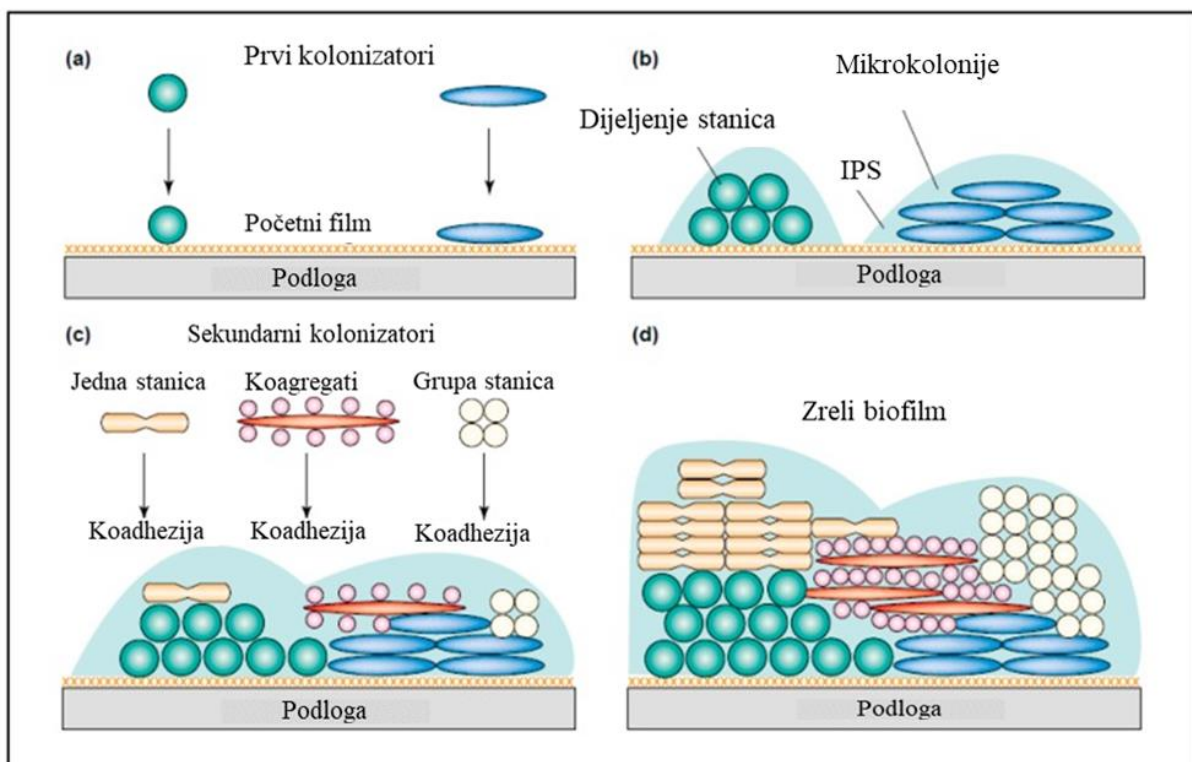


Slika 5. Različiti mehanizmi bakterijske pokretljivosti. Slika preuzeta od Kearns DB (89), uz preinake.

1.2.3 Proizvodnja biofilma

Biofilm je zajednica koju stvara jedna ili više vrsta mikroorganizama na različitim površinama, uključujući živa tkiva, trajna ili privremena medicinska pomagala/materijale, sustave za industrijsku i pitku vodu, ali i prirodne vodene sustave (95). Puno je čimbenika o kojima ovisi stvaranje biofilma, npr. struktura žive / nežive površine, u kakvom mediju je ta površina, režim protoka tekućine, svojstva tekućine, mogućnost stanice za pričvršćivanje / koloniziranje površina, odnos stanice prema površini, okolišni signali, sposobnost stanice za proizvodnju određenih supstanci neophodnih za stvaranje biofilma i dr. (95,96). Planktonske

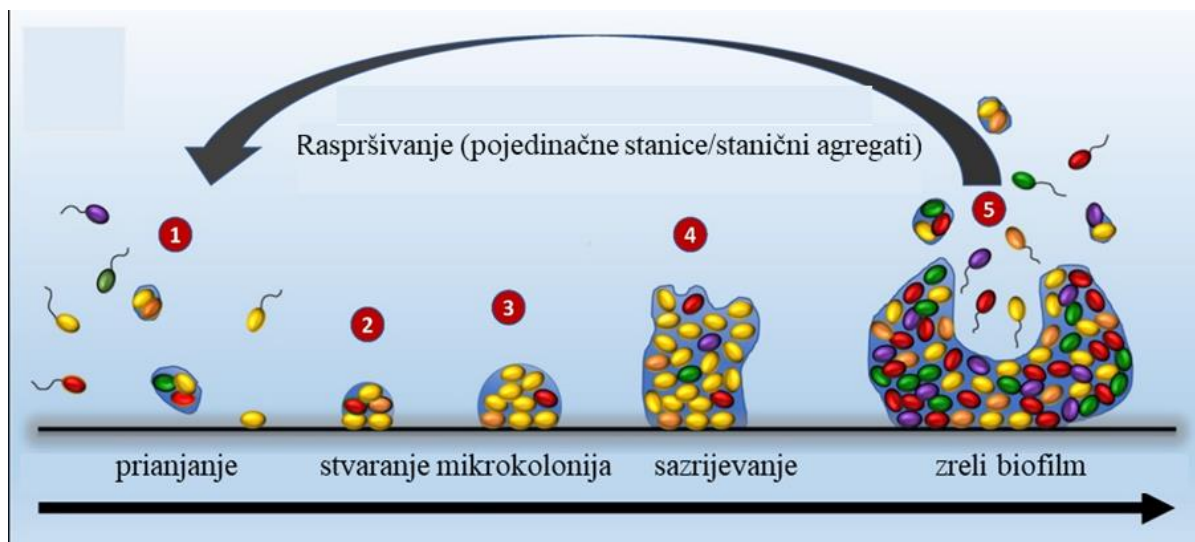
stanice plivaju slobodno u tekućem mediju i ukoliko je površina grublje strukture, ako dolazi do zastoja u protoku tekućine ili već postoje naslage mikroorganizama i / ili sloja nataloženih materijala koji mogu biti podloga, neke se od tih slobodno plutajućih stanica mogu zaustaviti pa i učvrstiti. Što je podloga grublja i hidrofilnija, stanice se lakše hvataju za nju i biofilm se brže razvija, a svaka sljedeća slobodno plutajuća stanica lakše se pričvršćuje na već postojeću nakupinu mikroorganizama stvarajući mikro kolonije. Stanice se dijele izlučujući izvanstaničnu polimernu supstancu (IPS), primarno polisaharidnu, koja izgrađuje trodimenzionalnu strukturu biofilma (Slika 6). Vrlo često struktura biofilma sadrži najrazličitije mikroorganizme između kojih može biti velika kompeticija za hranu, a kada pojedine stanice odumiru postaju dodatni izvor nutrijenata i takav rast naziva se kriptičan (engl. *cryptic growth*) (97–99).



Slika 6. Razvoj biofilma s više vrsta mikroorganizama (plak). (a) Rana kolonizacija različitih bakterijskih vrsta na podlogu, (b) rast i dijeljenje prvih kolonizatora i stvaranje mikrokolonija, (c) proizvodnja izvanstaničnih polimernih supstanci (IPS), ko-adhezija pojedinačnih stanica, grupa stanica i ko-agregata i (d) sazrijevanje biofilma u kojem mogu biti najrazličitije mikrobne vrste. Slika preuzeta od Lof M i suradnika (99), uz preinake.

Biofilm je trodimenzionalna struktura koja raste uz stvaranje kanala ispunjenih tekućinom koji služe za transport hranjivih tvari unutar biofilma. Kako volumen stvorenog biofilma raste, tako se povećava mogućnost odcjepljivanja stanica ali i čitavih dijelova konstrukcije biofilma što postaje izvor nekom drugom biofilmu uslijed lijepljenja na nekom novom mjestu (Slika 7) (100). Najveći dio zajednice čine sesilne, dormantne bakterije koje su biokemijski inertnije i veoma rezistentne na djelovanje antibiotika i različitih dezinfekcijskih

sredstava. Značajna je pojava mutacija kod stanica unutar biofilma, horizontalni prijenos gena te višestruka rezistencija biofilma na terapiju različitim antibioticima, posebice ekspresija mehanizma efluks pumpe za mnoge antibiotike (101). Izgleda da bakterije postaju visoko tolerantne na antibiotike kada su hranjive tvari ograničene. Smatra se da je neaktivnost bakterijskih stanica uzrokovana zaustavljanjem rasta izazvanim gladovanjem ključni mehanizam koji proizvodi toleranciju na antibiotike. Uočeno je da bakterija u uvjetima s ograničenim hranjivim tvarima i biofilmom toleranciju na antibiotike razvija aktivnim odgovorima na gladovanje, a ne pasivnim učincima zaustavljanja rasta.



Slika 7. Stvaranje biofilma. Slobodno plutajuće stanice i agregati stanica lijepe se za podlogu (1), dijele se i rastu u mikrokolonije, (2,3), nastaju velike, gljivolike strukture s kanalima između (4) i kad postanu prevelike odvajaju se slobodne stanice i dijelovi strukture (5) koji ponovo naseljavaju neke druge površine. Slika preuzeta od Penesyan i suradnika (100), uz preinake.

Aktivira se zaštitni mehanizam koji kontrolira odgovor na gladovanje, a u eksperimentu je povezana tolerancija na antibiotike, posredovana tim odgovorom, sa smanjenim razinama oksidativnog stresa u bakterijskim stanicama. Nakon deaktiviranja ovog zaštitnog mehanizma ispitivani biofilmovi su bili višestruko osjetljivi na četiri različite klase antibiotika i značajno je povećana učinkovitost liječenja antibioticima kod eksperimentalnih infekcija (102). Detekcija slobodno plivajućih stanica govori u prilog postojanju biofilma, ali ne ukazuje na njegovu veličinu i raširenost.

Proizvodnja IPS-a neizostavno je svojstvo bakterije koja proizvodi biofilm. Kod ispitivanja proizvodnje biofilma i IPS-a koriste se različiti materijali i različiti mediji, a često i prirodni materijali s grubom površinom. Zbog takvih svojstava često se koristi perlit za kultivaciju i imobilizaciju bakterija, prirodni alumosilikatni materijal koji je po svom sastavu vulkanski kamen / staklo, velike, grube površine i otvorene, lamelarne strukture (94).

R. pickettii izolirana iz biofilma na plastičnim cijevima za pitku vodu proizvodila je homoserin lakton, signalnu molekulu u međustaničnoj komunikaciji (9). Dokazano je prisustvo *R. pickettii* u mješovitom bakterijskom biofilmu u pitkoj vodi na svemirskim letovima (103). U jednoj studiji proizvodnje biofilma kod *R. pickettii* korišten je sustav s protočnim ćelijama (engl. *flow cells*) i dobiveni rezultati su ukazivali kako je bilo vezanja i nakupljanja stanica na površinama ćelija. Dodatno, struktura nastalih tvorbi mijenjala se tijekom promatranog vremena što bi moglo biti dobar pokazatelj za stvaranje biofilma (104). Biofilm *R. pickettii* u sustavima za farmaceutsku vodu uzrokuje probleme čišćenja, dekontaminacije i sterilizacije jer se mogu primijeniti samo neškodljiva sredstva koja ne ostavljaju kemijske rezidue. U studiji ispitivanja dostupnosti vode na međunarodnoj svemirskoj postaji dokazano je da bi se biofilm, kao i broj bakterijskih stanica, u sustavima za pitku vodu mogao učinkovito smanjiti na manje od 1 CFU dekontaminacijom sa 6% vodikovim peroksidom ili kombinacijom 3% vodikovog peroksida i 400 ppb koloidnog srebra (105).

1.2.4 Rezistencija na antibiotike

Za *R. pickettii* ne postoje zadani standardi za procjenu osjetljivosti pa su kod očitavanja rezultata disk difuzije i minimalne inhibitorne koncentracije korišteni standardi za druge bakterije, najčešće standardi za Gram-negativne nefermentativne bakterije (5,31,53,61,67). U malom broju provedenih studija s ispitivanjem osjetljivosti na antibiotike kod *R. pickettii* dobiveni su raznoliki rezultati. *R. pickettii* proizvodi β -laktamaze klase D, oksacilinaze, koje doprinose većoj rezistenciji na karbapeneme (63–65,106). Vrlo česta otpornost na gotovo sve aminoglikozidne antibiotike u prvi mah je upućivala na intrinzičnu rezistenciju, ali rad španjolskih i portugalskih autora daje mogućnost da je ta rezistencija ipak stečeno svojstvo (107,108). U jednom ispitivanju otkriveni su stečeni geni rezistencije u dva slična, ali ne identična soja *R. pickettii* kod istog pacijenta, *aadA2*, *strA*, *ant(2'')-Ia*, *aph(6)-Id*, *cmlA1* i *sul1*. Prva četiri kodiraju rezistenciju na aminoglikozide, *cmlA1* na kloramfenikol i *sul1* na sulfonamide. Geni *aadA2*, *ant(2'')-Ia*, *cmlA1* i *sul1* bili su dio integrona klase I (3).

Bakterijska rezistencija na antibiotike je globalni problem i predstavlja veliku prijetnju ljudskom zdravlju diljem svijeta, gdje prevencija i učinkovito liječenje sve većeg broja patogena postaje teško. Puno je studija s procjenama učinaka rezistencije na učestalost, smrtnost, duljinu boravka u bolnici i troškove zdravstvene skrbi za specifične kombinacije patogena i lijeka na odabranim lokacijama. Jedna od novijih studija s vrlo opsežnom procjenom opterećenja bakterijskom rezistencijom na antibiotike, na temelju prediktivnih statističkih

modela, procjenjuje da je 2019. bilo 4,95 milijuna (3,62–6,57) smrtnih slučajeva povezanih s bakterijskom rezistencijom, od toga 1,27 milijuna (95% UI 0,911–1,71) smrti koje se mogu pripisati bakterijskoj rezistenciji na antibiotike (109). Bakterije i gljivice prirodno koriste antibiotike kao oružje za međusobno ubijanje u natjecanju za prostor i hranu; one to rade više od milijardu godina. To znači da su mikroorganizmi navikli dolaziti u kontakt s antibioticima u okolišu te razvijati i dijeliti mehanizme otpornosti na antibiotike. Naša pretjerana uporaba antibiotika rezultira širenjem i održavanjem ovih promjena. Većina antibiotika koje danas imamo napravljena je po uzoru na one koje su prirodno osmislile gljive i bakterije (110). Način stjecanja otpornosti razlikuje se među različitim vrstama bakterija. Rezistencija bakterija može se promatrati na staničnoj razini i na razini zajednice (110).

1.2.4.1 Otpornost na staničnoj razini

Otpornost na staničnoj razini uključuje različite mehanizme koji se mogu promatrati s biokemijskog i s genetičkog aspekta.

1.2.4.1.1 Biokemija bakterijske rezistencije na antibiotike

Inaktivacija antibiotika je obrambeni mehanizam gdje bakterije proizvode enzime koji modificiraju lijek ili ga razgrađuju procesima koji uključuju hidrolizu, prijenos skupine ili redoks proces. Velik broj antibiotika ima kemijske veze koje su podložne hidrolizi (amidi i esteri). Mnogi enzimi poništavaju djelovanje antibiotika razgradnjom tih veza i često bakterije proizvode enzime koje mogu inaktivirati antibiotike prije nego što dođu do ciljnog mjesta. β -laktamaze su klasične hidrolitičke amidaze koje cijepaju β -laktamski prsten antibiotika penicilina i cefalosporina. Identificirano je najmanje 200 ovih β -laktamaza koje izlučuju različite Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Ostali primjeri hidrolitičkih enzima su esteraze koje uzrokuju otpornost na fosfomicin. Skupina transferaza uključuje najrazličitiji skup enzima koji inaktiviraju antibiotike poput aminoglikozida, rifampicina, kloramfenikola i streptogramina. Kemijska supstitucija događa se dodavanjem acetilne ili fosforilne skupine molekuli antibiotika na periferiji. To zauzvrat utječe na vezanje ovih modificiranih lijekova na ciljno mjesto. Antibiotici se također inaktiviraju redoks procesom. Patogene bakterije dovode do oksidacije ili redukcije lijekova poput tetraciklinskih antibiotika pomoću TetX enzima (110). Sekvestracija antibiotika je inaktivacija antibiotika stvaranjem kompleksa s proteinima koji vežu lijek (engl. *drug-binding proteins*) što sprječava antibiotik da dosegne cilj (111).

Modifikacija ciljnog mjesta za antibiotik je važan mehanizam otpornosti i sprječava pravilno vezanje antibiotika na ciljno mjesto. Ova ciljana mjesta imaju vitalne stanične funkcije

i organizmi neće moći izbjeći antimikrobno djelovanje ako ostanu bez njih. Ponekad postoji mogućnost da dođe do mutacijskih promjena u meti što smanjuje osjetljivost, iako se stanične funkcije zadržavaju (110). Promjene ciljnog mjesta na vanjskoj membrani, kao i promjene propusnosti vanjske stijenke često su udružene s povećanim izbacivanjem (efluksom) antibiotika iz stanice (112).

Peptidoglikan je važna komponenta staničnih stijenki bakterija i izvrsna meta za antibiotike. Enzimi koji su uključeni u sintezu peptidoglikana trebali bi biti dobre mete za selektivnu inhibiciju. Promjena u strukturi peptidoglikana može smanjiti afinitet lijeka za njega. Za glikopeptid vankomicin poznato je da koči sintezu stanične stijenke. Veže se s ostacima koji sadrže C-terminalni acil-D-alanil-D-alanin u prekursorima peptidoglikana. Ciljno mjesto može biti promijenjeno iz D-Ala-D-Ala u D-alanil-D-laktat na C-kraju, što dovodi do inhibicije vezanja vankomicina. Afinitet lijeka za novi kraj je tisuću puta manji od nativnog prekursora peptidoglikana. Otpornost na vankomicin može biti intrinzična ili stečena (110). Ogroman broj antibiotika utječe na različite razine sinteze proteina. Linkozamidi, makrolidi i streptogramin B skupine (MLS) vežu se za 50 S ribosomsku jedinicu i blokiraju proces sinteze proteina. To se događa kod niza Gram-pozitivnih bakterija. Rezistencija na gore navedene antibiotike naziva se MLS (B) tip rezistencije i poznato je da nastaje posttranskripcijskom modifikacijom 50 S RNA. Razvijena rezistencija na makrolidnu skupinu antibiotika rezultat je mutacije u 23 S rRNA koje su blizu mjesta metilacije. Slično, ako dođe do mutacije u 16 S rRNA, to daje otpornost na aminoglikozide (110).

Lijekovi poput fluorokinolona pokazuju interakcije s topoizomerazom IV i DNA-girazom, koje sprječavaju replikaciju i transkripciju DNA. Ako se mutacija dogodi u određenom dijelu strukturnih gena, ona mijenja enzime, čime se sprječava vezanje antibiotika. Osim toga, smanjenje propusnosti vanjske membrane jedan je od vrlo važnih razloga za otpornost na antibiotike jer rezultira smanjenim unosom lijeka. Molekule lijekova prodiru kroz vanjsku membranu putem difuzije kroz porine (mali hidrofilni lijekovi, kao beta-laktami) ili kroz lipidni dvosloj (makrolidi i drugi hidrofobni lijekovi). Kemijski sastav određenog lijeka odlučuje o načinu unosa. Svaka promjena na vanjskoj membrani sigurno će promijeniti brzinu difuzije antibiotika (110,112).

Efluks pumpe su oni membranski proteini koji pomažu u iznošenju antibiotika izvan stanice što rezultira niskom unutar staničnom koncentracijom antibiotika. Obično to utječe na sve klase antibiotika, dok je samo nekoliko efluks pumpi specifično za jedan lijek. Većina efluks pumpi su prijenosnici za više lijekova i sposobne su izbaciti iz stanice širok spektar lijekova koji nisu strukturno povezani i time doprinose stvaranju rezistencije na više lijekova.

Inducibilne efluksne pumpe za više lijekova odgovorne su za otpornost na antibiotike kod mnogih patogena. Vanjska membrana Gram-negativnih bakterija sadrži fosfolipide i lipidni A dio LPS-a. Ovaj sustav usporava prodiranje lijekova i transport kroz staničnu membranu. Način ulaska antibiotika ovisi o kemijskom sastavu stanične stijenke bakterije. Svaka promjena porina dovodi do promjene brzine difuzije antibiotika (110).

1.2.4.1.2 Genetička osnova bakterijske rezistencije na antibiotike

Točkaste mutacije na različitim lokusima bakterijskog kromosoma, koje su ujedno spojive s rastom i razmnožavanjem, mogu rezultirati otpornošću na antibiotike. One su sposobne proizvesti otporne fenotipove uz moguće uključenje velikog broja gena u proces rezistencije zbog različitih pristupa, ciljeva i zaštitnih putova u bakterijskoj stanici (110). Istraživanja su pokazala prisutnost hipermutabilnih sojeva ili mutatora među bakterijama. Svaka stanica u hipermutabilnom stanju raste i razmnožava se, a može izići iz hipermutabilnog stanja u isto vrijeme. Stjecanje fenotipa mutatora može povećati šanse za otpornost na antibiotike (110).

Horizontalni prijenos genetičkog materijala glavni je mehanizam za širenje otpornosti na antibiotike. Geni se prenose nizom mehanizama poput konjugacije, transdukcije ili transformacije. Geni rezistencije se također mogu rekombinacijom ugraditi u kromosome primatelja. Većina bakterija koje pokazuju rezistenciju na tetracikline obično su povezane sa stjecanjem novih gena iz pokretnih elemenata. Otpornost na više lijekova kod bakterija često je rezultat stjecanja gena rezistencije putem pokretnih genetičkih elemenata (110).

1.2.4.2 Otpornost na razini zajednice

Otpornost na razini zajednice objašnjava se sposobnošću toleriranja antibiotika kod mnogih bakterijskih vrsta mnogo prije nego što su ljudi počeli masovno proizvoditi antibiotike za prevenciju i liječenje zaraznih bolesti. Izolirane špilje, jezgre permafrosta i druga okruženja i uzorci koji su sačuvani od antropogene bakterijske kontaminacije mogu pružiti uvid u mehanizme rezistencije koji su prevladavali u eri prije antibiotika (113). Važan pokretač drevne i još uvijek aktualne evolucije mehanizama rezistencije vjerojatno će biti neprestana konkurencija za resurse među mikroorganizmima, uključujući prirodnu proizvodnju sekundarnih metabolita koji su slični mnogim antibioticima koji se danas koriste kao lijekovi. Relativno nedavno uvođenje antibiotika u kliničku primjenu radikalno je promijenilo preduvjete za razvoj i širenje rezistencije pružajući neviđene selekcijske pritiske, posebno na članove mikrobiote ljudi i domaćih životinja, ali i u okolišima jako zagađenim antibioticima

(113). Uočeno je da je tolerancija na okolišni stres veća u bakterijskim zajednicama u usporedbi s pojedinačnim stanicama. Ova se tolerancija očituje i u produženoj rezistenciji na antibiotike. Tisuću puta veća otpornost na antibiotike pronađena je u zajednici biofilma u usporedbi s odgovarajućim bakterijskim planktonskim stanicama. Ova otpornost na razini zajednice ima dodatni učinak na otpornost na staničnoj razini, dajući sinergističku sliku povećane otpornosti. Bakterije postaju vrlo otporne u slučaju ograničenja hranjivih tvari. To bi mogao biti razlog povećane otpornosti stanica u biofilmu jer u dubljim slojevima biofilma stanice mogu doživjeti ograničenje hranjivih tvari. Osim toga, još jedan čimbenik koji pridonosi otpornosti u biofilmu je pojava stanica koje se nazivaju perzisteri (ili i engl. *emerge*). Stanice perzistera pokazuju prilagođeni spori ili nerastući fenotip otporan na sve stresove, uključujući izazove koje nameću antibiotici. Ove postojane stanice mogu pokazati preživljavanje kada ostale stanice nestanu i stvaraju rezervoare preživjelih stanica što može dovesti do ponovne pojave infekcije. Te nove, preživjele stanice i dalje će biti osjetljive na antimikrobno sredstvo. Iako se mehanizam i priroda rezistencije zajednice i rezistencije jedne stanica (perzistera) razlikuju, oni pokazuju sinergistički učinak. Razlika je kod rezistentnih bakterija što će novo izrasle stanice sve biti rezistentne na taj antibiotik (110,114).

1.2.4.3 Urođena i stečena rezistencija

Mehanizmi urođene (intrinzične) rezistencije obično su kodirani kromosomima i uključuju nespecifične efluksne pumpe (koje su vjerojatno evoluirale kao opći odgovor na toksine iz okoliša), inaktivirajuće enzime i mehanizme koji smanjuju propusnost stanične stijenke. Ovi mehanizmi su fiksirani u temeljnom genskom sustavu organizma i u pravilu daju nisku razinu otpornosti na antibiotike u izvornom domaćinu, normalnoj komenzalnoj flori ili bakterijama iz okoliša, ali mogu postati oportunistički patogeni u imunokompromitiranih pacijenata. Intrinzična rezistencija je uvijek izražena unutar vrste (111). Neke bakterije su prirodno rezistentne na određene antibiotike, a neke vremenom postaju otporne, što može biti zbog mutacije ili horizontalnog prijenosa gena. Mutacija koja bi rezultirala otpornošću na antibiotike, može se dogoditi uslijed prekomjerne uporabe antibiotika, ali i slučajno bez prisutnosti antibiotika. Ukoliko takva promjena omogućava mutiranoj bakteriji preživljavanje i daljnje razmnožavanje, onda to svojstvo može napredovati i prerasti u stalno svojstvo bakterije. Horizontalni prijenos gena rezistencije može se odvijati između bakterija iste vrste, ali i između bakterija različite vrste. Među bakterijama se može dogoditi prijenos više mehanizama rezistencije i mogu vrlo brzo postati otporne na mnoge vrste antibiotika – što je

poznato kao otpornost na više lijekova, multipla ili višestruka rezistencija. Zbog toga je iznimno važno uzimati antibiotike samo kada su potrebni (110).

Postoje dokazi da je selektivni pritisak uzrokovan ljudskom aktivnošću u posljednjih 70 godina rezultirao značajnim obogaćivanjem gena otpornosti u bakterijskim populacijama. Jedna studija je usporedila mikrobe iz pre-antibiotske ere s "modernim" okolišnim bakterijama u arhiviranom tlu prikupljenim od 1940. do 2008. u Nizozemskoj i pokazalo se povećanje u velikom broju gena odgovornih za rezistenciju na tetracikline, eritromicin i β -laktamske antibiotike tijekom vremena. Novije hipoteze sugeriraju da raširena uporaba antibiotika može pružiti jaku selekciju za prikupljanje gena otpornosti na antibiotike pokretnim genetičkim elementima (uključujući plazmide, transpozone i integrone) i djeluje kao snažna sila u oblikovanju evolucije mikroorganizama (111).

2 OBRAZLOŽENJE TEME I CILJEVI RADA

Gram-negativna bakterija *Ralstonia pickettii* je oportunistički patogen koji se pojavljuje u farmaceutskim sustavima za ultračistu i pročišćenu vodu. U slučaju neučinkovite sterilizacije može kontaminirati sterilne otopine za parenteralnu primjenu putem kojih ulazi u bolnički sustav i kolonizira bolnički okoliš i pacijente. Studije o antimikrobnoj osjetljivosti i sustavnom praćenju *R. pickettii* u bolničkom okruženju vrlo su ograničene, posebice na većem broju izolata. Jednako, nevelik je broj istraživanja okolišnih izolata *R. pickettii* uz nestandardizirano testiranje osjetljivosti na antibiotike, a podataka o izolatima na području Republike Hrvatske nema. Stoga je svrha ovog istraživanja proširiti spoznaje o bakteriji *Ralstonia pickettii* kako bi se spriječilo njezino širenje te horizontalni prijenos gena za rezistenciju na antibiotike iz okoliša u kliničko okruženje.

Glavni cilj rada je sakupiti i identificirati izolate bakterije *Ralstonia pickettii* iz farmaceutskih postrojenja za ultračistu vodu i uređaja za laboratorijsku pročišćenu vodu s različitih mjesta uzorkovanja i različitih područja Hrvatske, ispitati srodnost i fenotipska svojstva izolata, ispitati njihovu osjetljivost na antibiotike te analizirati prisutnost gena za rezistenciju na β -laktamske i aminoglikozidne antibiotike.

Specifičnih ciljevi rada su:

- identificirati sakupljene izolate biokemijskim testovima, masenom spektrometrijom MALDI-TOF te umnažanjem gena za 16S rRNA lančanom reakcijom polimeraze;
- genotipizacijom ispitati srodnost izolata s različitih mjesta uzorkovanja i različitih područja Hrvatske;
- ispitati mehanizme pokretljivosti potvrđenih izolata;
- ispitati proizvodnju izvanstanične supstance, endotoksina i biofilma;
- ispitati osjetljivost izolata na 26 različitih antibiotika disk difuzijskom metodom;
- ispitati minimalnu inhibitornu koncentraciju antibiotika E-testom;
- lančanom reakcijom polimeraze ispitati prisutnost gena za rezistenciju na β -laktamske antibiotike opisane kod izolata s drugih geografskih područja (*bla*_{OXA22}, *bla*_{OXA60}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} i *bla*_{OXA48});
- lančanom reakcijom polimeraze ispitati prisutnost gena za rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike koji su najčešći kod srodne vrste *Pseudomonas aeruginosa* (*aac*(3')-II, *ant*(2''), *aac*(6')-Ib i *aph*(3')-Ia);

- lančanom reakcijom polimeraze ispitati prisutnost gena *armA*, *rmtA*, *rmtB* i *rmtD* za 16S rRNA metil-transferaze kao noviji mehanizam rezistencije na aminoglikozide nađen i u srodnoj vrsti *Pseudomonas aeruginosa*.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 IZOLATI *R. PICKETTII*

Bakterijski izolati *R. pickettii* (81) dobiveni su iz uzoraka ultra čiste vode (UČV) i laboratorijske pročišćene vode (LPV) iz pet različitih industrijskih pogona (Pm, Pp, HL, GL, K) iz dva geografski različita područja Republike Hrvatske, područje I grad Zagreb i područje II grad Koprivnica. Sakupljanje bakterijskih izolata provedeno je u petogodišnjem periodu (2011.-2015.). Najveći broj izolata, njih 71, sakupljeno je na području I (29 izolata iz uzoraka ultračiste vode iz postrojenja farmaceutske industrije oznake HL, 42 iz uzoraka laboratorijske pročišćene vode od čega 29 izolata s mjesta oznake Pm, 6 s mjesta oznake Pp i 7 izolata iz uzoraka laboratorijske pročišćene vode za potrebe pripreme magistralnih lijekova oznake GL. Na području II – farmaceutska industrija – sustavi za ultračistu vodu, sakupljeno je 10 sojeva, oznake K (Tablica 1). Sakupljeni izolati *R. pickettii* skladišteni su u zamrzivaču za ultraniske temperature na -80 °C (New Brunswick Scientific, Velika Britanija). Za planirana ispitivanja korišteni su materijali i oprema koji su podliježali sustavu kvalitete.

Tablica 1. Izolati bakterije *Ralstonia pickettii* iz dva područja Hrvatske (I i II) i pet mjesta uzorkovanja (Pm, Pp, HL, G i K)

Područje Hrvatske	Mjesto uzorkovanja	Izolati	Uzorak	Broj izolata
I	GL	<i>R. pickettii</i> GL13, GL14, GL54, GL55, GL56, GL77, GL103		7
	Pm	<i>R. pickettii</i> Pm8, Pm20, Pm68, Pm79, Pm80, Pm81, Pm88, Pm89, Pm90, Pm91, Pm92, Pm95, Pm96, Pm104, Pm373, Pm374, Pm375, Pm376, Pm379, Pm381, Pm382, Pm383, Pm384, Pm385, Pm386, Pm387, Pm388, Pm389, Pm390	LPV	29
	Pp	<i>R. pickettii</i> Pp78, Pp83, Pp94, Pp377, Pp378, Pp391		6
	HL	<i>R. pickettii</i> HL15, HL16, HL17, HL18, HL19, HL21, HL22, HL23, HL24, HL25, HL26, HL27, HL28, HL29, HL30, HL31, HL32, HL33, HL34, HL35, HL36, HL93, HL392, HL393, HL394, HL395, HL398, HL399, HL100	UČV	29
II	K	<i>R. pickettii</i> K82-1, K82-2, K84, K85, K97, K98, K99, K100, K101, K102		10
Ukupno				81

UČV - ultračista voda, LPV - laboratorijska pročišćena voda

3.2 POPIS MATERIJALA

3.2.1 Gotove komercijalne mikrobiološke podloge i njihove komponente

- Agar za čuvanje mikroorganizama (engl. *Stock Culture Agar*, Bio-Rad Laboratories, SAD)
- Agar za hranjive podloge (Sigma-Aldrich, Austrija)
- Dvostruki šećer po Kligleru (Oxoid, Engleska)
 - kazein pepton, 10 g/L
 - željezov sulfat, 0,2 g/L
 - glukoza, 1 g/L
 - laktoza, 10 g/L
 - mesni ekstrakt, 3 g/L
 - mesni pepton, 10 g/L
 - fenol crveno, 0,025 g/L
 - natrijev klorid, 5 g/L
 - natrijev tiosulfat, 0,5 g/L
 - ekstrakt kvasca, 3 g/L
 - agar, 12 g/L
 - pH 7,4
- Ekstrakt kvasca (Institut Torlak, Republika Srbija)
- EMB agar (engl. *Eosin Methylene Blue*) (Oxoid, Engleska)
 - pepton, 10 g/L
 - laktoza, 10 g/L
 - dikalij natrijev fosfat, 2 g/L
 - eosin Y, 0,4 g/L
 - metilensko modriilo, 0,065 g/L
 - agar, 15 g/L
 - pH 6,8±0,2
- Hranjiva podloga za ispitivanje pokretljivosti
 - tripton, 10 g/L
 - ekstrakt kvasca, 5 g/L
 - NaCl, 5 g/L

agar 3 g/L (5 g/L, 7 g/L, 10 g/L, 15 g/L)

pH 7,2

- Krvni agar (Columbia agar + 5% ovčje krvi) (BioMerieux, Francuska)

tripton, 12 g/L

enzimski ekstrakt životinjskog tkiva, 5 g/L

ekstrakt kvasca, 3 g/L

goveđi ekstrakt, 3 g/L

škrob, 1 g/L

natrijev klorid, 5 g/L

agar, 13,5 g/L

defibrinirana ovčja krv, 5%

pH 7,3±0,2

- Luria Bertani agar (LB agar) (Becton, Dickinson and Company, SAD)

tripton, 10 g/L

ekstrakt kvasca, 5 g/L

natrijev klorid, 5 g/L

agar, 15 g/L

pH 6,8-7,2

- Luria Bertani bujon (LB bujon) (Becton, Dickinson and Company, SAD)

tripton, 10 g/L

ekstrakt kvasca, 5 g/L

natrijev klorid, 10 g/L

pH 6,8-7,2

- McConkey agar (Oxoid, Engleska)

pepton, 20 g/L

laktoza, 10 g/L

žučne kiseline, 5 g/L

natrijev klorid, 5 g/L

neutralno crveno, 0,075 g/L

agar, 12 g/L

pH 7,4±0,2

- Moždano-srčani bujon (engl. *Brain Heart Infusion (BHI) broth*, Oxoid, Engleska)
 - ekstrakt (infuzija) goveđeg mozga, 200 g/L
 - ekstrakt (infuzija) goveđeg srca, 250 g/L
 - pepton, 10 g/Lglukoza, 2 g/L
 - natrijev klorid, 5 g/L
 - dinatrijev fosfat, 2,5 g/L
 - pH 7,4±0,2
- Mueller-Hinton agar (MH) (BioMerieux, Francuska)
 - pepton, 17,5 g/L
 - mesni ekstrakt, 2 g/L
 - škrob, 1,5 g/L
 - agar, 17 g/L
 - pH 7,3±0,1
- R2A agar (Oxoid, Engleska)
 - ekstrakt kvasca, 0,5 g/L
 - proteoza pepton, 0,5 g/L
 - hidrolizat kazeina, 0,5 g/L
 - glukoza, 0,5 g/L
 - škrob, 0,5 g/L
 - natrijev piruvat, 0,3 g/L
 - dikalijev fosfat, 0,3 g/L
 - magnezijev sulfat, 0,024 g/L
 - agar, 15,0 g/L
 - pH 7,0-7,4
- SIM agar (engl. *Sulfide Indole Motility*, sulfid-indol-pokretljivost) (Becton, Dickinson and Company, SAD)
 - amonijev željezov citrat, 0,2 g/L
 - tripton, 20,0 g/L
 - mesni pepton, 6,6 g/L
 - natrijev tiosulfat, 0,2 g/L
 - agar, 3,0 g/L
 - pH 7,3

- Tripton soja agar (TSA) (BioMerieux, Francuska)
 - tripton, 15 g/L
 - enzimski ekstrakt soje, 5 g/L
 - natrijev klorid, 5 g/L
 - agar, 15 g/L
 - pH 7,3±0,2
- Tioglikolatni bujon za mikrobiologiju (Merck KGaA, Njemačka)
 - tripton, 15 g/L
 - ekstrakt kvasca, 5 g/L
 - glukoza, 5,5 g/L
 - natrijev klorid, 2,5 g/L
 - L-cistin, 0,5 g/L
 - natrijev tioglikolat, 0,5 g/L
 - pH 7,1±0,2

3.2.2 Komercijalni biokemijski testovi

- API[®] 20NE za identifikaciju nefermentativnih bakterija (Biomérieux, Francuska)
- Bactident[®] oksidaza (Merck KGaA, Njemačka)

3.2.3 Kemikalije, reagensi, dodatci podlogama

- Amikacin (Krka, Slovenija)
- Etanol (Kemig d.o.o , RH Hrvatska)
- Etilendiamin tetraoctena kiselina, EDTA (Merck, Njemačka)
- Gentamicin (Krka, Slovenija)
- Jod (Merck, Njemačka)
- Klorovodična kiselina (Merck KGaA, Njemačka)
- Matriks za masenu spektrometriju (engl. *Maldi flexmatrix*, Bruker Daltonik, Njemačka)
- Meropenem (Sandoz, Austrija)
- 70% mravlja kiselina (Sigma Life Sciences, Njemačka)

- Natrijev azid (Sigma Life Sciences, Njemačka)
- Natrijev hidroksid (Sigma Life Sciences, Njemačka)
- Natrijev klorid (Sigma Life Sciences, Njemačka)
- Škrob (Sigma-Aldrich, Irska)
- Tripton (Oxoid, Engleska)
- Želatina (Kemig d.o.o., RH Hrvatska)
- Živin klorid (Merck KGaA, Njemačka)

3.2.4 Reagensi za dokazivanje proizvodnje endotoksina (Charles River laboratories, Charleston, SC)

- Lizat dobiven iz amebocita raka *Limulus polyphemus* – LAL lizat (engl. *Limulus Amebocyte Lysate*, osjetljivosti 0,0625 EU/mL)
- Referentni Standardni Endotoksin (engl. *Referent Standard Endotoxin*, RSE)
- Kontrolni Standardni Endotoksin (engl. *Control Standard Endotoxin*, CSE)
- 0,25 M TRIS, pH 7,2-9,2
- 0,1 M TRIS HCl, pH 8,0
- 0,5 M MgSO₄ u 1,0 M TRIS, pH 6,8-7,6
- Specifični pufer za endotoksin, pH 7.4 – (engl. *Endotoxin Specific Buffer*)
- Sterilna voda za injekcije

3.2.5 Reagensi za gel elektroforezu u pulsirajućem polju

- TEN pufer
 - 0,1 M Tris HCl, pH 8,0 (Sigma-Aldrich, SAD)
 - 0,1 M EDTA, pH 8,0 (Sigma-Aldrich, SAD)
 - 0,15 M natrijev klorid (Kemika, RH Hrvatska)
- EC pufer
 - 6 mM Tris HCl, pH 8,0 (Sigma-Aldrich, SAD)
 - 1 M natrijev klorid (Kemika, RH Hrvatska)
 - 0,1 M EDTA, pH 8,0 (Sigma-Aldrich, SAD)
 - 0,5% Brij-58 (Serva)
 - 0,2% natrijev deoksikolat (Sigma-Aldrich, SAD)
 - 0,5% natrijev laurilsarkozin (Sigma-Aldrich, SAD)

- TE pufer
 - 10 mM Tris HCl, pH 8,0 (Sigma-Aldrich, SAD)
 - 5 mM EDTA, pH 8,0 (Sigma-Aldrich, SAD)
- Lizozim, 100 mg/mL u TE puferu, pH 8,0 (Sigma-Aldrich, SAD)
- Formaldehid (1% formalin) (Kemika, RH Hrvatska)
- ES(P) pufer
 - 0,5 M EDTA, pH 9,6 (Sigma-Aldrich, SAD)
 - 1% natrijev laurilsarkozin (Sigma-Aldrich, SAD)
 - 1 mg/mL proteinaza K (Sigma-Aldrich, SAD)
- PMSF (fenilmetilsulfonilfluorid), 1mM u TE puferu, pH 8,0 (Sigma-Aldrich, SAD)
- TBE pufer (0,5X)
 - 44,5 mM Tris baza (Sigma-Aldrich, SAD)
 - 44,5 mM borna kiselina (Sigma-Aldrich, SAD)
 - 1 mM EDTA, pH 8,0 (Sigma-Aldrich, SAD)
- 1,8% agaroz (engl. *low gelling point* - LGP) u EC puferu (Bio-Rad Laboratories, SAD)
- Agaroz za separacijski gel PFGE (engl. *Pulsed-Field Certified Agarose*, Bio-Rad Laboratories, SAD)
- Tiourea, 50 mM u 0,5 X TBE (Sigma-Aldrich, SAD)

3.2.6 Enzimi, proteini i pripadni puferi

- Restriksijska endonukleaza XbaI (Gibco-BRL, SAD)
- 10x pufer za XbaI (Gibco-BRL, SAD)
- Taq-polimeraza (Invitrogen, SAD)
- 10X pufer za Taq-polimerazu (Invitrogen, SAD)
- Lizozim (Sigma-Aldrich, SAD)
- Proteinaza K (Sigma-Aldrich, SAD)

3.2.7 Standardi molekulskih masa

- Lambda DNA konkatemer, (Sigma-Aldrich, SAD)
- 100 bp DNA Ladder (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, SAD)

3.2.8 Specifične komercijalne smjese reagencija – kompleti

- „QIAamp® DNA Blood Mini Kit“ (Qiagen, Njemačka)

3.2.9 Nukleinske kiseline

- 100 mM DNTP set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Qiagen, Njemačka)
- Nukleotidni sljedovi početnica koje su korištene za detekciju i amplifikaciju gena lančanom reakcijom polimeraze prikazani su u tablici 1 i tablici 2 proizvođač svih početnica: Sigma Aldrich, SAD).

Tablica 2. Početnice korištene za potvrdu roda *Ralstonia* i vrste *Ralstonia pickettii* lančanom reakcijom polimeraze koje su preuzete iz dostupne literature

	Ime početnice	Slijed nukleotida (5'-3')	Ta (°C)	Veličina ampikona (pb)	Ref.
Rod <i>Ralstonia</i>	RalGS-F	CTGGGGTCGATGACGGTA	58	546	(43)
	RalGS-R	ATCTCTGCTTCGTTAGTGGC			
<i>Ralstonia pickettii</i>	Rp-F1	ATGATCTAGCTTGCTAGATTGAT	55	210	(42,46)
	Rp-R1	ACTGATCGTCGCCTTGGTG			

Ta – temperatura sparivanja početnica s kalupom DNA (od eng. „annealing temperature“)

Ref. – referenca

Tablica 3. Početnice korištene za detekciju gena rezistencije bakterije *Ralstonia pickettii* lančanom reakcijom polimeraze koje su preuzete iz dostupne literature

Gen	Ime početnice	Slijed nukleotida (5'-3')	Ta (°C)	Veličina ampikona (pb)	Ref.
<i>bla_{OXA-22}</i>	OXA-22NcoI	AAGGCCGTCTTCCATGGAGGCAAG	55	619	(64)
	OXA-22EcoRI	AGGTTGGCGAATTCGTAGGTC			
<i>bla_{OXA-60}</i>	OXA-60 C	AAGACCCTCGCGTTTGCCGTGGTGG	55	763	(63)
	OXA-60 D	AACTGCTTGCCAGCGGAATGCGC			
<i>armA</i>	armA-F	ATTCTGCCTATCCTAATTGG	55	315	(115)
	armA-R	ACCTATACTTTATCGTCGTC			
<i>rmtA</i>	rmtA-F	CTAGCGTCCATCCTTTCTC	55	635	(115)
	rmtA-R	TTGCTTCCATGCCCTTGCC			
<i>rmtB</i>	rmtB-F	GCTTTCTGCGGGCGATGTAA	55	173	(115)
	rmtB-R	ATGCAATGCCGCGCTCGTAT			
<i>rmtD</i>	rmtD-F	CGGCACGCGATTGGGAAG C	55	401	(115)
	rmtD-R	CGGAAACGATGCGACGAT			
<i>aac(3')-II</i>	aac(3')-II F	ACTGTGATGGGATACGCGTC	60	237	(116)
	aac(3')-II R	CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA			
<i>ant(2'')</i>	ant(2'') F	ATGTTACGCAGCAGGGCAGTCG	60	187	(115)
	ant(2'') R	CGTCAGATCAATATCATCGTGC			
<i>aac(6')-Ib</i>	aac6-Ib F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	60	472	(117)
	aac6-Ib R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT			
<i>aph(3')-Ia</i>	aph(3')-Ia F	ATGGGCTCGCGATAATGTC	58	600	(116)
	aph(3')-Ia R	CTCACCGAGGCAGTTCCAT			
<i>bla_{IMP}</i>	IMP-F	GTTTATGTTTCATACWTCG	45	432	(134)
	IMP-R	GGTTTAAAYAAAACAACCAC			
<i>bla_{VIM}</i>	VIM-F	TTTGGTCGCATATCGCAACG	65	500	(134)
	VIM-R	CCATTCAGCCAGATCGGCAT			
<i>bla_{NDM}</i>	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	52	621	(135)
	NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC			
<i>bla_{OXA-48}</i>	OXA-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	52	438	(135)
	OXA-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG			

3.2.10 Antibiotici za ispitivanje antibiotičke rezistencije

3.2.10.1 Dijagnostički diskovi natopljeni antibiotikom (Mast Group, UK)

- Ampicilin (10 µg)
- Amoksicilin/klavulanska kiselina (20/10 µg)
- Cefaleksin (30 µg)
- Cefoksitin (30 µg)
- Ceftriakson (30 µg)
- Ceftazidim (30 µg)

- Cefepim (30 µg)
- Cefotaksim (30 µg)
- Ertapenem (10 µg)
- Imipenem (10 µg)
- Meropenem (10 µg)
- Piperacilin (10 µg)
- Piperacilin/tazobaktam (100/10 µg)
- Gentamicin (10 µg)
- Amikacin (30 µg)
- Tobramicin (10 µg)
- Netilmicin (30 µg)
- Aztreonam (30 µg)
- Tikarcilin (75 µg)
- Tikarcilin/klavulanska kiselina (75/10 µg)
- Trimetoprim-sulfametoksazol (1,25/23,75 µg)
- Ciprofloksacin (5 µg)
- Tigeciklin (15 µg)
- Tetraciklin (30 µg)
- Kolistin (50 µg)
- Kloramfenikol (50 µg)

3.2.10.2 Trakice s gradijentom antibiotika za epsilometarski test (Liochem, Italija)

- ETEST® Ceftazidim
- ETEST® Cefepim
- ETEST® Ceftriakson
- ETEST® Cefotaksim
- ETEST® Imipenem
- ETEST® Meropenem
- ETEST® Piperacilin/tazobaktam
- ETEST® Tobramicin
- ETEST® Gentamicin
- ETEST® Amikacin
- ETEST® Netilmicin
- ETEST® Ciprofloksacin

3.2.11 Boje

- Metilen plavo (Merck KGaA, Njemačka)
- Alcijan plavo (Fluka Analytical, Njemačka)
- SYBR[®] Green (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Etidijev bromid (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Kristal-violet (Merck KGaA, Njemačka)
- Lugolova otopina (Merck KGaA, Njemačka)
- Karbol fuksin (Merck KGaA, Njemačka)

3.2.12 Uređaji

- Analitička vaga (Mettler Toledo, Švicarska)
- Automatski pipetori (Eppendorf[®], Njemačka)
- Denzimati (Biomerieux, Francuska)
- Dispenzeri (Bio-Rad, Francuska)
- Električni vibrator za 1 epruvetu (Tehtnica EV100, Slovenija)
- Elektromagnetska miješalica s grijaćom pločom (Tehtnica MM 510, Slovenija)
- Gel dokumentacijski sustav „Visave-Q9 Hood“ (UVITEC Cambridge, Velika Britanija)
- Mikrocentrifuga s kivetama od 1,5 ml (Haereus, Njemačka)
- Pumpa za pufer s regulacijom protoka (Bio-Rad Laboratories, SAD)
- Rashladni uređaj za CHEF-Dr III System (Bio-Rad Laboratories, SAD)
- Spektrofotometar (Spectra II, Tecan, Austrija)
- Sustav za membransku filtraciju (Sartorius, Njemačka)
- Švjetlosni mikroskop (ZEISS, Njemačka)
- Termo miješalice (Eppendorf, Njemačka)
- Termostati (Selecta, Španjolska)
- Ultrazvučna kupelj (Thermo Forma, SAD)
- Uređaj za automatsku izolaciju DNA „QIAcube“ (QIAGEN, Njemačka)
- Uređaj za provođenje lančane reakcije polimerazom „2720 Thermal cycler“ (Applied Biosystems, SAD).
- Uređaj za gel elektroforezu u izmjeničnom električnom polju, CHEF-Dr[®] III System (Bio-Rad Laboratories, Francuska)

- Uređaj za gel elektroforezu u izmjeničnom električnom polju GEPS 200/2000 (Elchrom Scientific, Njemačka)
- Uređaj za matriksom potpomognutu ionizaciju desorpcijom laserskog zračenja-analizator masa s vremenom leta, engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight* - MALDI TOF (Bruker Daltonik, Njemačka)
- Uređaj za vizualizaciju DNA pod UV svjetlošću (Elchrom Scientific, Njemačka)
- Digitalna kamera (Canon, Japan)
- Vodena kupelj GFL 1086 (GFL, Njemačka)

3.2.13 Laboratorijski pribor i potrošni materijal

- Epruvete za čuvanje mikroorganizama na niskim temperaturama (engl. *Cryo tubes*, Cryoinsant VWR, Belgium)
- Membrane za membransku filtraciju, promjer pora 0,45 µm (Sartorius, Njemačka)
- Stakleno posuđe (Duran[®], Njemačka)
- Mikrotitarske ploče s 96 bunarića s U- dnom (Kartell, Italija)
- Polipropilenska epruveta za centrifugu volumena 50 mL (Corning, SAD)
- Polipropilenske tubice od 100 µL (Thermo Fisher Scientific, SAD) –
- Polipropilenske tubice od 200 µL (Corning, SAD)
- Polistirenska tubica za centrifugu 1,5 mL (Eppendorf[®], Njemačka)
- Nastavci za pipete (Eppendorf[®], Njemačka)
- Višekratne metalne ploče za masenu spektrometriju (engl. *MPT target plate ground steel*, Bruker Daltonik, Njemačka)

3.3 METODE

3.3.1 Fenotipska identifikacija *R. pickettii*

Uzorci LPV i UČV sakupljeni su u sterilne posude i profiltrirani kroz membrane širine pora 0,45 µm (Sartorius, Njemačka) u aseptičkim uvjetima metodom membranske filtracije na uređaju za membransku filtraciju (Sartorius, Njemačka). Membrane su zatim sterilnom pincetom stavljane na površinu čvrste hranjive podloge; na R2A agar za UČV i na TSA za uzorke LPV (118). Podloge su inkubirane tijekom 24 sata na temperaturi od 37°C u termostatima za kultivaciju mikroorganizama (Selecta, Španjolska). Identifikacija je temeljena na morfologiji poraslih kolonija, mikroskopskom preparatu koji je pregledavan svjetlosnim mikroskopom (Zeiss, Njemačka) pri povećanju 1000X i biokemijskim svojstvima (68). Korišteni su komercijalni biokemijski set testova za nefermentativne bakterije (API® 20 NE, Biomerieux, France) i test trakice za detekciju enzima citokrom-oksidge, kao i test za detekciju proteolitičkih i amilolitičkih svojstva (119).

Komercijalni set testova API® 20 NE se sastoji od 20 mikroepreveta s dehidriranim supstratima. U mikroeprevete se ukapava bakterijska 0,5 McFarland suspenzija prema pisanim uputama. Za ispitivanje fermentacije glukoze, arginin dihidrolaze i prisustva ureaze u kupole bunarića ukapa se mineralno ulje kako bi se postigla anaerobna atmosfera. Rezultat se očitava nakon 24 sata inkubacije i drugo očitavanje nakon 48 sati inkubacije. Pozitivan rezultat manifestira se promjenom boje uslijed ukapavanja indikatorskih reagensa ili zamućenjem u bunariću zbog porasta mikroorganizma. Test oksidge se izvodi na način da se malo bakterijske kulture nanese na trakicu natopljenu s dimetil-p-fenilen diaminom. *R. pickettii* daje vrlo brzo pozitivan rezultat, što dokazuje posjedovanje enzima citokrom oksidge, važnog u lancu prijenosa elektrona do kisika (konačni primatelj elektrona) i njegove redukcije u vodu.

Amilolitička aktivnost *R. picketti* ispitivana je na hranjivom agaru s 1% topljivog škroba. Ispitivani soj nasijan je ubodom na agar i kultiviran tijekom 24 sata na 37°C. Nakon propisane kultivacije otopina joda prelivena je preko površine agara i poraslih kolonija. Jod i škrob zajedno daju modroljubičastu boju, koja se ne pojavljuje oko izraslih kolonija mikroorganizma koji izlučuje amilolitičke enzime (119). Veličina prozirne zone ukazuje na jačinu amilolitičke aktivnosti mikroorganizma. Kao pozitivna kontrola korišten je *Bacillus subtilis* koji proizvodi enzim amilazu, koja razgrađuje škrob oko poraslih kolonija i taj dio ostaje nebojan uslijed vezanja škroba i joda. Ukoliko ispitivani soj ne posjeduje enzim amilazu, jod će obojati škrob u podlozi oko porasle kolonije.

Proteolitička aktivnost *R. pickettii* ispitivana je na hranjivom agaru s 15% želatine. Ispitivani soj nasijan je ubodno na agar i kultiviran 24 sata na 37°C. Nakon propisane kultivacije živin klorid je prelišen preko površine agara i poraslih kolonija. HgCl₂ sa želatinom daje tamnosivu do mliječno bijelu, neprozirnu zonu (119). Prozirna zona oko poraslih kolonija dokazuje da mikroorganizam proizvodi želatinazu, proteazu koja razgrađuje želatinu u okolnoj podlozi. *Bacillus subtilis* proizvodi proteazu i korišten je kao pozitivna kontrola.

3.3.2 Ispitivanje pokretljivosti *R. pickettii*

3.3.2.1 Ispitivanje pokretljivosti u epruveti na SIM agaru

Pokretljivost *R. picketti* ispitivana je na SIM (engl. *Sulfide Indole Motility*) podlozi u epruveti koja zbog niže koncentracije agara (0,3%) ima polučvrstu strukturu i takva omogućava optimalnu detekciju bakterijske pokretljivosti tipa plivanja. Nakon kultivacije od 18-24 sata na 37°C dobro porasla kolonija s krvnog agara je sterilnom ubodnom ušicom nasijana u sredinu SIM agara u epruveti. Tako nasijane epruvete kultivirane su 24 sata na 37°C i nakon toga vizualno pregledane. Pokretne bakterije rasle su difuzno uz ubodnu liniju, ali i u najrazličitijim pravcima što je rezultiralo najrazličitijim oblicima zamućenja. Nepokretne bakterije rasle su samo na površini agara i u ubodnoj liniji uz bistri agar uokolo uboda.

3.3.2.2 Ispitivanje oblika pokretljivosti *R. pickettii*

Pokretljivost tipa plivanja, rojenja i trzanja kod *R. pickettii* ispitivana je nasijavanjem na hranjivu podlogu različite konzistencije s obzirom na koncentraciju agara (98). Pokretljivost plivanja ispitivana je nasijavanjem 24-satne kulture mikroorganizma na sredinu LB hranjive podloge s 0,3% agara. Promjer granice rasta, bakterijska migracija od mjesta nasijavanja, mjeren je nakon 2, 24, 72 i 96 sati inkubacije na 37°C. Kretanje rojenjem ispitivano je na viskoznijem, 0,5-0,7% LB agaru. Tražio se porast u vidu roja stanica s vidljivim rubovima svakog novog vala stanica koje se roje (92). Pokretljivost stanica trzanjem ispitivana je na 1% LB agaru. Ubodnom ušicom ispitivani soj je inokuliran ubodom od površine hranjive podloge do dna Petrijeve ploče, inkubacija je trajala 24 sata na 37°C. Difuzna zona bakterijskog rasta između površnog sloja agara i dna Petrijeve zdjelice bila je mjera trzajne pokretljivosti (91,93,98). Manje bijele zone u sredini predstavljaju stanice koje rastu na površini agara.

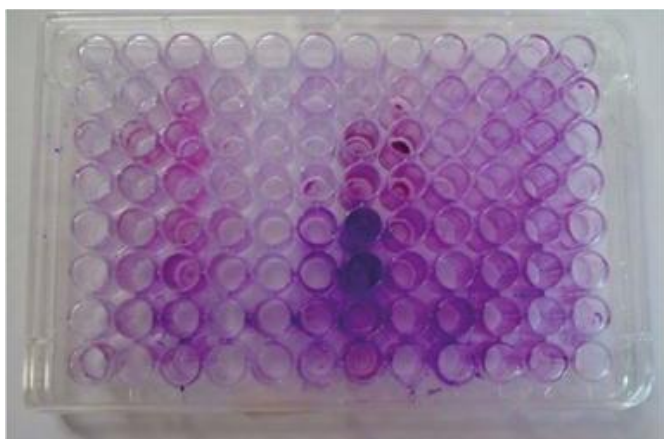
3.3.3 Ispitivanje proizvodnje biofilma kod *R. pickettii*

3.3.3.1 Proizvodnja izvanstaničnih polimernih supstanci

Proizvodnja IPS-a (engl. *extracellular polymeric substance*, EPS) neizostavno je svojstvo bakterije koja proizvodi biofilm. Proizvodnja EPS kod *R. pickettii* ispitivana je kultivacijom u tekućem hranjivom bujonu na kuglicama perlita i na aluminijskoj foliji, u tekućem bujonu bez dodataka drugih nosača i na čvrstoj podlozi. Perlit je prirodni alumosilikatni materijal koji je po svom sastavu vulkanski kamen/staklo, velike, grube površine i otvorene, lamelarne strukture i koristi se u mikrobiologiji za kultivaciju i imobilizaciju bakterija. Nakon kultivacije od 48 sati na 37°C priređeni su mikroskopski preparati s perlita i s aluminijske folije. Prva boja bila je alcijan plavo, a druga karbol fuksin. Alcijan plavo je obojao prisutnu izvanstaničnu tvar koju su stanice stvorile nakon kultivacije od 48 sati, a karbol fuksin je vizualizirao bakterijsku stanicu bojeći je u crveno (94). Paralelno je *R. picketti* kultivirana 24 sata na 37°C u TSB bujonu i na R2A agaru. Iz poraslih kultura priređen je preparat i obojan po Gramu. U preparatu iz tekućeg medija jasno su se vidjele crveno obojane bakterijske stanice i sluzavi materijal uokolo stanica, a u preparatu s čvrste podloge vidjele su se samo bakterijske stanice, obojane crveno.

3.3.3.2 Ispitivanje stvaranja biofilma u mikrotitarskim pločama s 96-bunarića

Proizvodnja biofilma kod sojeva *R. pickettii* ispitivana je jednostavnom statičkom metodom u mikrotitarskoj ploči (120,121). Korištene su mikrotitarske ploče s 96 bunarića s U-dnom (Kartell, Italija) (Slika 8). Tom metodom se detektira rana faza biofilma, a količina stvorenog biofilma mjerena je metodom bojanja bojom kristal-violet (120,121). Neinkulirani bunarići ispunjeni s TSB služili su kao negativna kontrola (slijepa proba - SP).



Slika 8. Analiza proizvodnje biofilma metodom bojanja bojom kristal-violet, preuzeto od Kirmusaoglu, 2019. (122).

Ispitivani su svi izolati *R. pickettii*. Dobro porasla 24-satna kultura *R. pickettii* suspendirana je u tekućem mediju TSB u razrjeđenju 10^6 CFU/mL. Po 100 μ L suspenzije od svakog ispitivanog izolata ukapano je u 8 bunarića. Istovremeno se u 8 bunarića svake mikrotitarske ploče ukapalo po 100 μ l TSB, kao kontrola. Pokrivene ploče su inkubirane na 37°C i bojanje bojom kristal-violet provedeno je nakon 4, 6, 8 i 24 sata. Nakon inkubacije, tekući medij i planktonske bakterije uklonjeni su trostrukim nježnim ispiranjem u kadicama s tekućom vodom. Važno je bilo dobro ukloniti medij i nepričvršćene stanice kako bi se obojale samo stanice u biofilmu pričvršćenom na stijenku bunarića. U svaki bunarić je dodano po 125 μ L 0,1% boje kristal-violet. Ploče su inkubirane 10-15 minuta na sobnoj temperaturi. Višak boje koja nije bila specifično vezana, dva puta je ispran vodom, a zaostali sloj boje na stijenci bunarića predstavlja obojeni biofilm. Sedam sojeva s različitom pokretljivošću tipa plivanja (HL27, HL30, HL32, GL103, Pp378, Pm379, K100) inkubirano je dodatnih 24 sata, ukupno 48 sati.

Kvantifikacija biofilma. U svrhu kvantifikacije proizvedenog biofilma mikrotitarske ploče su 15 minuta ostavljene na zraku kako bi se osušile. U svaki bunarić dodano je 200 μ l 95% etanola. Sadržaj bunarića je promiješan pipetom i 125 μ L je preneseno u nove, optički prozirne mikrotitarske ploče s ravnim dnom. Optička gustoća (engl. *optical density* - OD) je mjerena spektrofotometrijski na valnoj duljini 620 nm (Spectra II, Tecan, Austrija) (122). Neinokulirani bunarići ispunjeni s TSB služili su kao negativna (slijepa) kontrola. Vrijednosti apsorbancije slijepe probe (negativna kontrola) korištene su za određivanje stvaranja biofilma kod izolata ili ne. Bunarići izolata čije su vrijednosti OD veće od OD bunarića sa slijepom probom smatrani su proizvođačima biofilma. Granična vrijednost optičke gustoće (engl. *optical density cut-off value* – ODc) poslužila je za kategorizaciju proizvođača biofilma :

ODc = srednja vrijednost OD negativne kontrole + (3x standardna devijacija (SD) negativne kontrole);

$$OD_{\text{izolata}} = \text{srednja OD izolata} - \text{ODc}.$$

Negativna vrijednost ODc iskazana kao nula ukazuje na izostanak proizvodnje biofilma, a pozitivna vrijednost indicira proizvodnju biofilma. Kod interpretacije rezultata sojevi su podijeljeni u 4 kategorije:

- neproizvođač biofilma (NPB), $OD < ODc$,
- slab proizvođač biofilma (SPB), $ODc < OD < 2 \times ODc$,
- umjeren proizvođač biofilma (UPB), $2 \times ODc < OD < 4 \times ODc$ i
- jak proizvođač biofilma (JPB), $OD > 4 \times ODc$ (122).

3.3.4 Ispitivanje proizvodnje endotoksina

Proizvodnja endotoksina (lipopolisaharida) ispitivana je testom LAL (engl. *Limulus Amebocyte Lysate*) uz praćenje nastanka ugruška u gelu (engl. *gel-clot*) (85,86). Izabrani su 6 izolata iz različitih područja Hrvatske s različitim fenotipom rezistencije na aminoglikozidne antibiotike i različitom proizvodnjom biofilma nakon 24 sata inkubacije, a tri od njih su imala i rezultate proizvodnje biofilma nakon produljene inkubacije od 48 sati. Kao pozitivna kontrola korišten je standardni soj *Escherichia coli*, ATCC 25922. Osjetljivost LAL reagensa iskazuje se u broju jedinica endotoksina u mililitru, EU/mL.

Uzorak *R. picketti* za ispitivanje proizvodnje endotoksina priređen je tako da je bakterijska suspenzija koncentracije 10^6 CFU/mL autoklavirana na 136°C kako bi se bakterijske stanice uništile i oslobodio prisutni endotoksin. LAL test uz praćenje nastanka ugruška u gelu je polu-kvantitativna metoda kojom je uz osjetljivost LAL reagensa od 0,0625 EU/mL određen raspon koncentracije endotoksina ispitivanih izolata, između vrijednosti gdje nema geliranja do prethodnog razrjeđenja na kojem je bilo stvaranje gela. Reakcija se, uz pozitivnu i negativnu kontrolu, odvijala u neutralnom pH području u trajanju od 60 minuta \pm 2 minute, na temperaturi $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ uz pravilno izbalansirane ione Mg^{2+} i Na^+ , uz izbjegavanje vibracija. Kontrolni standardni toksin (CSE) koristi se u koncentraciji 2λ , 1λ , $0,5\lambda$, $0,25\lambda$. Lambda je koncentracija endotoksina potrebna da nastane gel u reakciji s lizatom i označava osjetljivost lizata. Priprema osnovne otopine CSE i serijskih razrjeđenja prikazano je u tablici 4 i tablici 5. U provedenom, opisanom ispitivanju λ je bila 0,0625 EU/ml. Kao pozitivna

Tablica 4. Priprema osnovne otopine CSE koncentracije 1000 EU/mL

5 000 EU/bočici	+	5, 0 mL vode za LAL test	=	1000 EU/mL
-----------------	---	--------------------------	---	------------

Tablica 5. Priprema serije razrjeđenja CSE-a koncentracije 2λ , 1λ , $0,5\lambda$, $0,25\lambda$ iz osnovne otopine CSE konc. 1000 EU/mL

0,5 mL 1000 EU/mL	+	4,5 mL vode za LAL test	=	100 EU/mL
-------------------	---	-------------------------	---	-----------

0,5 mL 100 EU/mL	+	4,5 mL vode za LAL test	=	10 EU/mL
------------------	---	-------------------------	---	----------

0,5 mL 10 EU/mL	+	3,5 mL vode za LAL test	=	1,25 EU/mL	(20λ)
-----------------	---	-------------------------	---	------------	-----------------

0,5 mL 1,25 EU/mL	+	2,0 mL vode za LAL test	=	0,25 EU/mL
-------------------	---	-------------------------	---	------------

1,0 mL 0,25 EU/mL	+	1,0 mL vode za LAL test	=	0,125 EU/mL	(2λ)
-------------------	---	-------------------------	---	-------------	----------------

1,0 mL 0,125 EU/mL	+	1,0 mL vode za LAL test	=	0,0625 EU/mL	(1λ)
--------------------	---	-------------------------	---	--------------	----------------

1,0 mL 0,0625 EU/mL	+	1,0 mL vode za LAL test	=	0,03125 EU/mL	($0,5\lambda$)
---------------------	---	-------------------------	---	---------------	------------------

1,0 mL 0,03125 EU/mL	+	1,0 mL vode za LAL test	=	0,015625 EU/mL	($0,25\lambda$)
----------------------	---	-------------------------	---	----------------	-------------------

kontrola uzorka korišteno je 10 µL kontrolnog standardnog toksina koncentracije 20 λ u 100 µL otopine uzorka, a kao negativna kontrola uzorka korišteno je 100 µL uzorka. Za negativnu kontrolu LAL vode korišteno je 100 µL vode za LAL test. Nakon isteka inkubacije, tijekom vađenja iz termobloka, svaka epruveta je pažljivo okrenuta za 180° i očitana je rezultat. Prisutnost bakterijskih endotoksina određena je na temelju stvaranja čvrstog gela. Čvrsti gel koji ostaje cijeli pri vrhu epruvete i nakon okretanja epruvete za 180° zabilježi se kao pozitivan (+), a odsutnost čvrstog gela koji ne zadržava integritet nakon okretanja epruvete za 180° zabilježi se kao negativan rezultat (-). Istovremeno je ispitivano stvaranje endotoksina kod standardnog soja *E. coli* ATCC 25922, radi usporedbe.

3.3.5 Identifikacija *R. pickettii* masenom spektrometrijom

Identifikacija svih izolata *R. pickettii* (81) dobivena biokemijskim testovima za nefermetativne bakterije potvrđena je primjenom masene spektrometrije MALDI-TOF (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*; matriksom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom - analizator masa vremenom leta) na masenom spektrometru Microflex LT spektrometar masa (Bruker Daltonik, Njemačka) uz računalni program MALDI Biotyper 3.0 (123). Uzorak (pojedinačna kolonija) je sterilnom čačalicom prenesen na označeno mjesto na MALDI ploči dodan je 1 µL 70% mravlje kiseline. Na uzorak posušen na sobnoj temperaturi nanesen je 1 µL matrice za masenu spektrometriju (otopina α-cijano-4-hidroksicimetne kiseline u 50% acetonitrila i 2,5% trifluorooctene kiseline). Tako pripremljeni uzorak je osušen na sobnoj temperaturi. MALDI pločica se unosi u MALDI-TOF spektrometar masa i radi se identifikacija mikroorganizma. MALDI-TOF snimanje biološkog materijala rezultira karakterističnim spektrima masa proteina za svaki mikroorganizam. Identifikacija i klasifikacija mikroorganizma provodi se usporedbom MALDI-TOF spektra nepoznatog uzorka s referentnim spektrima pohranjenim u bazi podataka i obradom pomoću računalnog programa MALDI Biotyper (tzv. spajanje obrazaca ili engl. *pattern matching*).

Maseni spektri su automatski generirani pomoću microflex LT MALDI TOF masenog spektrometra koji je korišten u linearnom pozitivnom načinu unutar raspona mase od 2 000-20 000 Da. Instrument je kalibriran pomoću bakterijskog standardnog testa Bruker.

Dobiveni spektri masa su obrađeni softverskim paketom MALDI Biotyper 3,0, koristeći standardne postavke. Rezultat u računalnom programu MALDI Biotyper je log vrijednost rezultata u rasponu 0-3,0 koji predstavlja vjerojatnost identifikacije izolata, izračunata uspoređivanjem spektra masa nepoznatog izolata s referentnim spektrom u bazi podataka.

Identifikacijski kriteriji postavljeni su sljedećim rezultatima: ocjena od 2.300 do 3.000 upućuje na vrlo vjerojatnu identifikaciju na razini vrste, ocjena od 2.000 do 2.299 upućuje na sigurnu identifikaciju roda s mogućom identifikacijom vrste, ocjena od 1.700 do 1.999 ukazuje na vjerojatnu identifikaciju na razini roda, a rezultat od <1.700 smatra se nepouzdanim. Identifikacija izolata odgovarala je vrsti referentnog soja s najboljim podudaranjem u bazi podataka (123,124).

3.3.6 Potvrda identifikacije *R. pickettii* lančanom reakcijom polimeraze

Izolacija DNA svih 81 izolata *R. pickettii* provedena je na automatiziranom uređaju QIAcube (QIAGEN, Njemačka) uz korištenje standardnih QIAGEN kompleta za izolaciju nukleinskih kiselina na kolonama sa silika-gel membranom. Gotovi kitovi sadrže lizirajući pufer AL, pufer za ispiranje AW1, pufer za ispiranje AW2, pufer za eluciju AE, apsolutni etanol, proteazu i kolone sa silika-gel membranom. Pročišćavanje je provedeno prema uputama proizvođača. Dobiveni eluat s izoliranom DNA pohranjen je na +4°C (125).

Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) provedeno je uz kalup bakterijske DNA i korištenje početnica za umnažanje 16S RNA regije (Tablica 2). Umnažanje je provedeno na PCR uređaju 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems, SAD). Proces umnažanja DNA za potvrdu roda *Ralstonia* i potvrdu vrste *R. pickettii* izvodio se reakcijskom smjesom koja je sadržavala 2,0 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 250 μM svakog od deoksinukleotid trifosfata (Qiagen, Njemačka), 0,4 μM od svake početnice, 1 U Taq-polimeraze (Invitrogen, SAD), 2 μL genomske DNA i dopunjeno ultračistom H₂O do ukupnog volumena 25 μL. Temperaturni uvjeti lančane reakcije polimeraze za potvrdu roda *Ralstonia* bili su sljedeći: početna denaturacija kalupa DNA i termalna aktivacija Taq-polimeraze pri 95°C u trajanju 30 sekundi, zatim amplifikacija PCR produkata u 30 amplifikacijskih ciklusa: (a) denaturacija DNA kalupa 20 sekundi na 94°C, (b) sparivanje početnica i denaturiranog kalupa DNA (engl. *annealing*) 20 sekundi pri 58°C i (c) elongacija u trajanju 40 sekundi pri 72°C. Završna elongacija je trajala 1 minutu na 72°C (43). Umnažanje DNA za potvrdu *R. pickettii* odvijalo se kroz sljedeće temperaturne cikluse: ciklus amplifikacije započeo je inicijalnom denaturacijom 2 minute na 94°C, zatim je slijedilo 30 amplifikacijskih ciklusa: od 1 minute na 93°C, 1 minute na 55°C i 1 minute na 72°C. Završna elongacija je trajala 10 minuta na 72°C (42). Negativna kontrola je korištena kod svakog eksperimenta i uključivala je sve komponente reakcijske miksture osim kalupa DNA.

Ulomci DNA umnoženi PCR-om detektirani su na sustavu za elektroforezu GEPS 200/2000 (Elchrom Scientific, Njemačka). Molekularni biljeg nanosio se na gel paralelno s uzorkom pri svakoj elektroforezi za procjenu veličine PCR produkata, tj. specifičnosti umnožavanja. Korišteno je 50 mL 1,5% gela u koji je tijekom pripreme dodan 1 μ L etidijevog bromida. Nakon što su uzorci nanoseni, gel je priključen na izvor istosmjerne struje (APC Scientific, Švicarska). Zbog negativnog naboja molekula DNA, elektroforeza se odvijala u smjeru od katode prema anodi pri 120 V i 980 mA, oko 45-60 minuta. Etidijev bromid interkalira se u strukturu DNA pa PCR produkti postaju vidljivi kada se obasjaju UV-svjetlošću pri 312 nm na UV transluminatoru (Elchrom Scientific, Njemačka). Gel je dokumentiran pomoću sustava UVIsave-Q9 Hood-gel (UVITEC Cambridge, Velika Britanija) i veličina umnoženog PCR produkta uspoređena je s vrpčama standarda molekulskih masa.

3.3.7 Ispitivanje srodnosti izolata *R. pickettii* elektroforezom u pulsirajućem polju

Srodnost svih prikupljenih i identificiranih izolata *R. pickettii* s različitim lokacija u Republici Hrvatskoj ispitivana je metodom elektroforeze u pulsirajućem polju (engl. *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE) (126,127). Izolati su ugrađeni u agarozu gdje su stanice razgrađene i kromosomska DNA oslobođena. Rezultati su obrađeni u programu GelCompare II[®] (Applied Maths NV, Belgija) i napravljen je računalni dendrogram sličnosti DNA profila na osnovu kojega je interpretirana srodnost izolata (128).

3.3.7.1 Bakterijski uzorak, izolacija i razgradnja DNA

Od čiste, 24-satne kulture s krvnog agara priređena je suspenzija u TEN puferu u koncentraciji stanica 10^9 CFU/mL te je 1 mL centrifugiran 2 minute pri 10 000 g. Stanice su tretirane u 1% formalinu za inaktivaciju DNAze te dva puta isprane u TEN puferu, resuspendirane u 300 μ L EC puferu, a zatim temperirane na 45 °C. Dodano je 10 μ L lizozima (100 mg/mL u puferu TE) i 300 μ L 1,8% LGP agaroze (temperirane na 55° C) i suspenzija je kratko promiješana. Brzo je otpipetirano po 50 μ L takve stanično-agarozne suspenzije u kalupe za razlijevanje gela i ostavljeno najmanje 10 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se agarozna skrutnula i započelo djelovanje lizozima. Formirani gelovi iz kalupa su preneseni u titracijske ploče s puferom EC gdje su potpuno uronjeni u pufer inkubirani 1 sat na 37 °C. Nakon toga su u puferu ESP inkubirani na 56 °C preko noći, a zatim još 1 sat na 37 °C u PMSF puferu u titracijskim pločama za inaktivaciju Proteinaze K. Agarozni gelovi su 2 puta isprani u puferu TE i ostavljeni 30 minuta na 4 °C između svake izmjene. Neposredno prije razgradnje DNA

restriksijskom endonukleazom XbaI gelovi su isprani (ekvilibrirani) restriksijskim puferom i inkubirani tijekom 30 minuta na 4 °C. Za razgradnju DNA u gelovima korištena je smjesa restriksijskog enzima, pufera i vode (200 µL smjese sadrži 2 µL restriksijskog enzima XbaI, u 20 µL 10x pufera i 178 µL vode). Gelovi su inkubirani bez miješanja 5 sati u vodenoj kupelji na 37 °C. Nakon završetka inkubacije gelovi su prebačeni u prethodno ohlađeni (4°C) pufer TBE te ostavljeni nekoliko minuta da se stisnu radi lakšeg postavljanja u bunariće za odjeljivanje.

3.3.7.2 *Razdvajanje fragmenata kromosomske DNA gel elektroforezom u pulsirajućem polju*

Otopljena agarozna (200 ml 1,0%-tnog agaroznog gela u puferu TBE) ohlađena je na 50°C i izlivena na nivelirani podložak za gel. Nakon skrtnjavanja gel je prebačen u kadicu za elektroforezu s 0,5xTBE puferom s tioureom prethodno ohlađenim na 12°C. Elektroforeza je provedena u sustavu CHEF DR III (Bio-Rad, Francuska) uz jakost električnog polja 5,6 V/cm, vrijeme pulsiranja 1 – 24 sekunde, kut pulsiranja 120° u trajanju 19 sati na temperaturi 12° C.

Nakon završetka elektroforeze fragmenti kromosomske DNA vizualizirani su uz SYBR® Green pri UV svjetlošću valne duljine 254 nm, uspoređeni su sa standardom molekularnih masa i gel je fotografiran digitalnom kamerom (Canon, Japan) povezanom s računalom uz UV transiluminator. Rezultati su obrađeni u programu GelCompare II® (Applied Maths NV, Belgija).

3.3.8 **Ispitivanje osjetljivosti izolata *R. pickettii* na antibiotike**

3.3.8.1 *Metoda disk difuzije*

Ispitivanje osjetljivosti svih izolata *R. pickettii* na 26 antibiotika provedena je metodom disk difuzije prema Kirby-Baueru s papirnatim diskovima natopljenim antibioticima: ampicilin (AMP 20 µg), amoksisicilin/klavulanska kiselina (AMC 20/10 µg), cefaleksin (CN 30 µg), cefoksitin (FOX 30 µg), ceftazidime (CAZ 30 µg), cefepime (FEP 30 µg), ceftriaxone (CRO 30 µg), cefotaxime (CTX 30 µg), ertapenem (ETP 10 µg), imipenem (IMP 10 µg), meropenem (MEM 10 µg), piperacilin (PIP 10 µg), piperacilin-tazobaktam (TZP 100/10 µg), tikarcilin (TIC 75 µg), tikarcilin/klavulanska kiselina (TCC 75/10 µg), aztreonam (ATM 30 µg), tobramicin (TM 10 µg), gentamicin (GN 10 µg), amikacin (AN 30 µg), netilmicin (NET 30 µg), ciprofloksacin (CIP 5 µg), trimetoprim-sulfametoksazol (SXT 1,25/23,75 µg), tetraciklin

(TE 30 µg), tigeciklin (TGC 15 µg), kolistin (CL 50 µg) i kloramfenikol (C 30 µg). Najveći broj ispitivanih antibiotika, njih 16, bio je iz skupine beta-laktamskih antibiotika (β-laktami); penicilinski (aminopenicilini - ampicilin, karboksipenicilini - tikarcilin i ureidopenicilini - piperacilin.), cefalosporinski (1. generacije - cefaleksin, druge generacije - cefoksitin, treće generacije - ceftriakson, ceftazidim i cefotaksim, četvrte generacije - cefepim), karbapenemi (ertapenem, imipenem i meropenem), monobaktam (aztreonam) i kombinacije s β-laktamskim inhibitorima (amoksicilin/klavulanska kiselina, piperacilin/tazobaktam, tikarcilin/klavulanska kiselina). Testirana je i osjetljivost na četiri aminoglikozidna antibiotika (gentamicin, amikacin, tobramicin i netilmicin), jedan tetraciklin i njemu sličan tigeciklin, po jedan sulfonamid (trimetoprimom-sulfametoksazol), fluorokinolon (ciprofloksacin), kloramfenikol i kolistin.

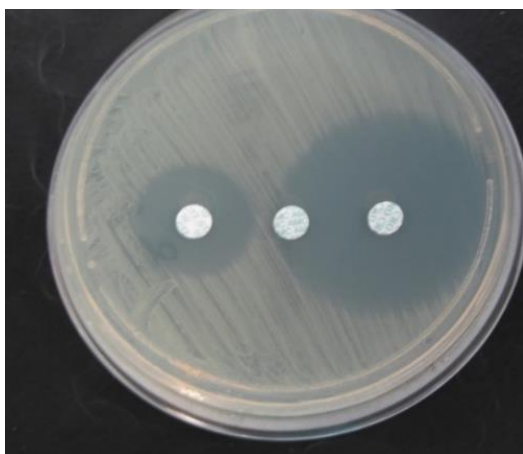
Za ispitivanje osjetljivosti koristila se 24-satna kultura *R. pickettii* od koje je priređena bakterijska suspenzija zamućenja 0,5 McFarlanda, što odgovara koncentraciji stanica $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Suspenzija je ravnomjerno nanescena na površinu Mueller-Hinton agara (MH agar) i nakon desetak minuta stavljeni su diskovi antibiotika. Nakon kultivacije na 37°C u trajanju od 24 sata očitane su zone inhibicije oko svakog pojedinog diska s antibiotikom. Kako za *R. pickettii* nema smjernica za očitavanje zone inhibicije rezultati su očitani i interpretirani prema CLSI smjernicama (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) za *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Burkholderia spp.* *Enterobacteriaceae* i EUCAST smjernicama (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) za kolistin za *Acinetobacter spp.* (129,130).

3.3.8.2 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je najniža koncentracija antibiotika koja sprječava vidljiv rast bakterije. Osjetljivost svih izolata testirana je određivanjem MIK vrijednosti koristeći E-test („MIC test Strip“, Liochem, Italija) za 12 antibiotika: ceftazidim, cefepim, ceftriakson, cefotaksim, imipenem, meropenem, piperacilin-tazobaktam, tobramicin, gentamicin, amikacin, netilmicin i ciprofloksacin. Bakterijska suspenzija je priređena od 24-satne kulture *R. pickettii* kao i za disk-difuzijsku metodu, nanescena ravnomjerno na površinu MH agara, nakon čega su nanescene E-trakice s koncentracijskim gradijentom antibiotika. Nakon kultivacije na 37°C preko noći očitana je rezultat i MIK je interpretiran prema CLSI-smjernicama za vrste roda *Pseudomonas*, *Acinetobacter* i *Burkholderia* (129).

3.3.8.3 Fenotipska detekcija β -laktamaza proširenog spektra metodom dvostrukog diska

Metodom sinergizma dvaju diskova, amoksicilina s klavulanskom kiselinom i cefalosporinskih antibiotika treće generacije (ceftazidima i ceftriaksona), ispitivana je proizvodnja beta-laktamaza proširenog spektra (engl. *Extended Spectrum Beta Lactamase*, ESBL). Na MH agar razmazana je 0,5 McFarland suspenzija ispitivanog soja. Na ploču su stavljeni diskovi CAZ30 – AMC20/10 – CRO 30 na međusobnoj udaljenosti od 20 mm (od središta do središta diskova). Nakon inkubacije 37°C u trajanju 18-24 sata očitana je zona inhibicije oko diskova, odnosno prisutnost sinergizma između diskova (Slika 9). Najmanji znak sinergizma smatra se pozitivnim testom tj. izolat proizvodi ESBL.



Slika 9. Detekcija ESBL soja metodom dvostrukog diska (negativan rezultat).

3.3.8.4 Fenotipska detekcija karbapenemaza

Modificirani Hodge test korišten je za detekciju izolata *R. pickettii* koji proizvode karbapenemaze, uz napomenu da modificirani Hodge test ne pruža informaciju o vrsti karbapenemaze (131). Svi izolati *R. pickettii* su bili uključeni u ovo ispitivanje, a test je izveden tako da je *E. coli*, ATCC 25922, osjetljiva na antibiotik meropenem nasijana je na površinu MH agara u suspenziji gustoće 0,5 McFarlanda (10^8 CFU/ml) kako bi se dobio konfluentni rast. Na sredinu je stavljen disk meropenema od čijeg ruba su inokulirani ispitivani sojevi *R. pickettii* linearno prema rubu ploče. Nakon kultivacije na 37°C u trajanju 24 sata pregledan je rast indikatorskog soja prema disku meropenema uz liniju nasijanih izolata *R. pickettii*. Porast *E. coli* uz crtu nasijanu s *R. pickettii* (vidljiva deformacija inhibicijske zone oko diska meropenema u obliku lista djeteline) govori u prilog posjedovanja enzima koji hidroliziraju karbapenema. Izolati *R. pickettii* koji su omogućili rast indikatorskog soja do 3 mm prema

karbapenemskom disku zabilježeni su kao slabo pozitivni, oni s rastom većim od 3 mm označeni su kao pozitivni, dok su negativni bili izolati kod kojih nije bilo deformacije inhibicijske zone.

Metoda inhibicije karbapenema (engl. *Carbapenemase Inhibition Method-CIM*) je dodatna metoda kojom je ispitivano prisustvo karbapenemaza kod 9 izabranih izolata *R. pickettii* (132). Izolati su izabrani s obzirom na rezultate dobivene u Hodge testu, četiri izolata su bila Hodge pozitivna, tri slabo pozitivna i dva Hodge negativna. Disk meropenema je inkubiran 2 sata u gustoj suspenziji ispitivanog izolata, potom je ušicom stavljen na MH agar inokuliran osjetljivim sojem *E. coli*. Ploča je inkubirana preko noći i potom pregledana. Kod soja koji proizvodi karbapenemaze, meropenem će biti inaktiviran i osjetljiva *E. coli* će rasti. Test se smatra pozitivnim ukoliko je zona inhibicije oko meropenema manja od 14 mm ili ukoliko kolonije rastu unutar zone inhibicije (133). Soj koji ne proizvodi karbapenemaze neće inaktivirati meropenem i zona inhibicije bit će veća od 14 mm.

3.3.8.5 Fenotipska detekcija metalo- β -laktamaza metodom kombiniranog disk testa

Od svih ispitivanih izolata (81) pripremljene su bakterijske suspenzije gustoće 0,5 McFarlanda i svaka suspenzija je razmazana na jedan MH agar. Potom su na površinu svakog MH agara stavljena po dva diska s meropenemom i dva diska s imipenemom. Zatim je na jedan disk s meropenemom i jedan disk s imipenemom nakapano po 10 μ L 0,5 M EDTA koja inhibira karbapenemaze. Ukoliko izolat proizvodi metalo- β -laktamaze, nakon kultivacije 24 sata na 37 °C, zone inhibicije oko diskova MEM+EDTA i IMP+EDTA bit će jednake ili veće od 7 mm od zona inhibicije oko diskova MEM, odnosno IMP.

3.3.8.6 Fenotipska detekcija rezistencije na aminoglikozide

Dobiveni rezultati rezistencije na aminoglikozidne antibiotike za sve izolate (81) u metodi disk difuzije i E-testu potvrđena je metoda kultivacije na superaminoglikozidnoj ploči, eozin-metilen plavi agar (engl. *Eosine-Methylen Blue agar* – EMB agar) s dodatkom antibiotika amikacina i gentamicina, svaki u koncentraciji po 30 μ g/mL. Na toj tzv. superaminoglikozidnoj (SAGA) selektivnoj podlozi lako se razlikuje porast bakterija koje fermentiraju laktozu (crne kolonije) i onih koje ne fermentiraju laktozu (bezbojne ili svijetle kolonije boje lavande) (134). Antibiotici za sprječavanje rasta gram-pozitivnih bakterija i gljiva (vankomicin i amfotericin) nisu dodavani u podlogu jer se radilo s čistim kulturama *R. pickettii*. Superaminoglikozidna podloga uspješno detektira multirezistentne izolate koji imaju gene za kodiranje metil-transferaza koje su odgovorne za metilaciju na 16S rRNA u 30 S podjedinici

ribosoma. Ti geni se nalaze na plazmidima i odgovorni su, uglavnom, za križnu rezistenciju na više aminoglikozidnih antibiotika. Jednako tako, SAGA ploča će otkriti rezistenciju na amikacin i gentamicin uzrokovanu djelovanjem nekog od aminoglikozid-modificirajućeg enzima ili njihove kombinacije; nukleotidiltransferaze (ANT), fosfotransferaze (APH) i acetiltransferaze (AAC) (134). Test se izvodio tako da su EMB ploče s antibioticima nasijane sa 100 μL bakterijske suspenzije 10^3 CFU/mL. Ploče nasijane ispitivanim izolatima kultivirane su na 37°C tijekom 18 sati, pregledane su na porast i ukoliko nije bilo porasta ploča je inkubirana do 48 sati kako bi se definitivno zaključilo da nema porasta. Rezistentne bakterije su rasle na površini ploče, a osjetljive nisu.

3.3.8.7 Detekcija prijenosa gena za karbapenemaze konjugacijom

Konjugacija je horizontalni način prijenosa gena između srodnih, ali i različitih vrsta bakterija. Neophodan je bliski kontakt između stanice davatelja i stanice primatelja. Konjugacija se odvija putem konjugativnih pila preko kojih plazmidi s genima rezistencije prelaze iz stanice davatelja u stanicu primatelja koja nema te gene. Ispitano je kod svih 81 izolata jesu li geni rezistencije na karbapeneme kod *R. pickettii* na plazmidima i mogu li ti plazmidi biti preneseni na bakterije osjetljive na karbapeneme. Prijenos gena rezistencije na meropenem i gentamicin testiran je metodom konjugacije u bujonu uz uporabu soja *E. coli* J53 otpornog na natrijev azid (NaN_3) kao primatelja (recipijent). Sojevi davatelja i primatelja su kultivirani u tripton soja bujonu na 37°C tijekom 24 sata uz potresanje od 50 rpm. Drugi dan su zajedno kultivirani 100 μL suspenzije primatelja i 50 μL suspenzije davatelja u 5 mL bujona 24 sata na 37°C , bez potresanja. Suspenzije su treći dan serijski razrijeđene do 10^{-8} CFU/mL. Koristila se McConkey podloga (u nastavku podloga) s dodavanjem antibiotika, meropenem (MEM), gentamicin (GN) i NaN_3 . Davatelj je rezistentan na MEM i GN, a osjetljiv na NaN_3 , a primatelj je osjetljiv na MEM i GN, a rezistentan na NaN_3 . Po 50 μL suspenzije davatelja u razrjeđenju 10^{-6} i 10^{-8} nasijano je na podlogu s 1 mg/L MEM. 50 μL nerazrijeđene suspenzije nasijano je na podlogu s 100 mg/L NaN_3 za provjeru rasta. Po 50 μL miješane suspenzije (davatelj + primatelj) nasijano je u razrjeđenju 10^{-2} i 10^{-4} na podlogu s MEM+ NaN_3 . Razrjeđenje 10^{-8} nasijano je na podlogu s MEM i na podlogu s NaN_3 za provjeru rasta davatelja i primatelja. 50 μL 10^{-6} i 10^{-8} razrjeđenja primatelja nasijano je na podlogu s NaN_3 , a nerazrijeđena suspenzija primatelja na podlogu s MEM. Paralelno je izveden i postupak s korištenjem antibiotika gentamicina.

Davatelj bi trebao porasti na podlozi s MEM i GN ali ne na podlozi s NaN_3 , a primatelj obrnuto, trebao bi porasti na podlozi s NaN_3 , ali ne na podlozi s MEM i GN. Transkonjuganti

bi trebali biti selektirani na kombiniranoj ploči koja sadržava meropenem (1 mg/L) i natrijev azid (100 mg/L) i ploči koja sadržava gentamicin (1mg/l) i natrijev azid (100mg/L), a frekvencija konjugacije bi se računala tako da bi se broj transkonjuganata koji je porastao na kombiniranoj ploči podijelio s brojem stanica davatelja na GN i MEM pločama (135,136).

3.3.9 Detekcija gena rezistencije metodom lančane reakcije polimeraze

Za detekciju gena rezistencije na antibiotike korištena je DNA izolirana na automatiziranom uređaju QIAcube (QIAGEN, Njemačka) uz korištenje standardnih QIAGEN kompleta za izolaciju nukleinskih kiselina na kolonama sa silika-gel membranom (poglavlje 1.2.6). Korištene početnice navedene su u tablici 2.

Svi izolati *R. pickettii* (81) testirani su metodom lančane reakcije polimeraze na prisustvo gena koji kodiraju β -laktamaze iz Amblerove klase D, *bla*_{OXA22} i *bla*_{OXA60} (63,64). Reakcijska smjesa je sadržavala 2,0 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 250 μ M svakog od deoksinukleotid trifosfata (Qiagen, Njemačka), 0,4 μ M od svake početnice, 1 U Taq-polimeraze (Invitrogen, SAD), 2 μ L genomske DNA i dopunjena ultračistom H₂O do ukupnog volumena 25 μ L. Postavljeni su sljedeći uvjeti termalnih ciklusa: početna denaturacija na temperaturi od 96 °C 5 minuta, zatim 30 ciklusa sa (a) denaturacijom DNA kalupa pri 96 °C 30 sekundi, (b) sparivanjem početnica i denaturiranog kalupa DNA pri 55 °C 30 sekundi i (c) elongacijom na 72 °C 1 minutu. Završna elongacija odvijala se na 72 °C u trajanju 5 minuta. Nakon toga je slijedilo hlađenje reakcije na 4 °C.

Na 27 izolata (HL16, HL17, HL18, HL19, Pm20, HL21, HL22, HL30, HL31, HL32, GL54, GL55, Pm68, Pp78, Pm79, Pm80, Pp83, K85, K99, K100, K102, GL103, Pm104, Pm376, Pp377, Pm386, HL395) ispitano je posjedovanje gena rezistencije na karbapeneme; metalo- β -laktamaze (B klasa po Ambleru) *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, i *bla*_{NDM} te OXA-48, karbapenem - hidrolizirajuća β -laktamaza klase D. Izolati su izabrani tako da su bila zastupljena sva područja uzorkovanja, deset izolata bilo je iz područja HL, sedam područje Pm, četiri izolata iz područja K, po tri iz područja Pp i GL. Izabrani izolati imali su različite fenotipske profile rezistencije na karbapeneme. Za lančanu reakciju polimeraze pripremljena je reakcijska smjesa od dva mikrolitra bakterijske DNA dodana u 50 μ L reakcijske smjese koja je sadržavala 10 mM/L Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM/L KCl, 1,5 mM/L MgCl₂, 0,125 mM/L svakog deoksinukleotid trifosfata (dNTP), 10 μ M/L od svake početnice i 2 U Taq-polimeraze. Umnažanje se odvijalo u 30 ciklusa u sljedećim uvjetima za *bla*_{VIM} i *bla*_{IMP}: početna denaturacija na 95 °C 30 sekundi, sparivanje početnica 1 minutu na temperaturi 66 °C za *bla*_{VIM} i 45 °C za *bla*_{IMP}, 1 minuta na 72

°C i završna elongacija 10 minuta na 72 °C (137); za *bla*_{NDM} i *bla*_{OXA-48}: početna denaturacija 10 minuta na 94 °C i 36 ciklusa od 30 sekundi na 94 °C, 40 sekundi na 52 °C i 50 sekundi na 72 °C i 5 minuta na 72 °C za završnu elongaciju. Analiza PCR produkata izvedena je elektroforezom u 2% agaroznom gelu (138).

Dvadeset i devet izolata (Pm8, GL13, GL14, HL16, HL17, Pm20, HL28, HL30, HL34, Pm68, GL77, Pp78, K82-1, K82-2, Pp83, K84, K85, Pm88, Pm92, Pp94, Pm95, K97, K98, K99, K100, K101, K102, GL103, Pp391) je testirano na prisustvo gena koji kodiraju gene za 16S rRNA metil-transferaze *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtD* i gene za aminoglikozid-modificirajuće enzime, *aac(3')-II*, *aac(6')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *ant(2'')*. Birani su izolati s različitih područja, izolati s visokim MIK-om na aminoglikozide, ali i izolati osjetljivi na aminoglikozide, te s različitim fenotipom rezistencije na aminoglikozide uz porast ili ne na superaminoglikozidnoj ploči.

PCR amplifikacija je provedena za svaki gen u ukupnom volumenu reakcijske smjese od 50 µL koji je sadržavao 50 ng DNA, 25 pM svake početnice, 100 µM dNTP-a i 2 U Taq-polimeraze (139) uz korištenje različitih temperaturnih uvjeta za svaki set početnica. Uvjeti ciklusa za detekciju gena *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtD* bili su: početna denaturacija na temperaturi od 96 °C 5 minuta, zatim 30 ciklusa na 96 °C 30 sekundi, 55 °C u trajanju 30 sekundi, 72 °C 1 minutu te završna elongacija na 72 °C 5 minuta (115), a za detekciju gena za aminoglikozid-modificirajuće enzime, *aac(3')-II*, *aac(6')-Ib*, *ant(2'')* sljedeći: početna denaturacija na temperaturi od 94 °C 2,5 minute, zatim 30 ciklusa na 94 °C 25 sekundi, 60 °C 25 sekundi, 72 °C 30 sekundi te završna elongacija na 72 °C 2 minute. Za gen *aph(3')-Ia* provedena je početna denaturacija na temperaturi od 94 °C u trajanju 2,5 minute, zatim 30 ciklusa na 94 °C 25 sekundi, 58 °C 25 sekundi, 72 °C 40 sekundi te završna elongacija na 72 °C 2 minute (116,117). Početnice korištene za detekciju navedenih gena prikazane su u tablici 2. Negativna kontrola je korištena kod svakog eksperimenta i uključivala je sve komponente reakcijske smjese osim kalupa DNA.

Svi PCR produkti detektirani su na sustavu za elektroforezu GEPS 200/2000 (Elchrom Scientific, Njemačka). Molekularni biljeg nanosio se na gel paralelno s uzorkom pri svakoj elektroforezi za procjenu veličine PCR produkata, tj. specifičnosti umnožavanja. Korišteno je 50 mL 1,5% gela u koji je tijekom pripreme dodan 1 µL etidijevog bromida. Nakon što su uzorci nanoseni, gel je priključen na izvor istosmjerne struje (APC Scientific, Švicarska). Zbog negativnog naboja molekula DNA, elektroforeza se odvijala u smjeru od katode prema anodi pri 120 V i 980 mA oko 45-60 minuta. Etidijev bromid interkalira se u strukturu DNA pa PCR produkti postaju vidljivi kada se obasjaju UV-svjetlošću pri 312 nm na UV transluminatoru (Elchrom Scientific, Njemačka). Gel je dokumentiran pomoću sustava UVIsave-Q9 Hood-gel

(UVITEC Cambridge, Velika Britanija) i veličina umnoženog PCR produkta uspoređena je s vrpčama standarda molekulskih masa.

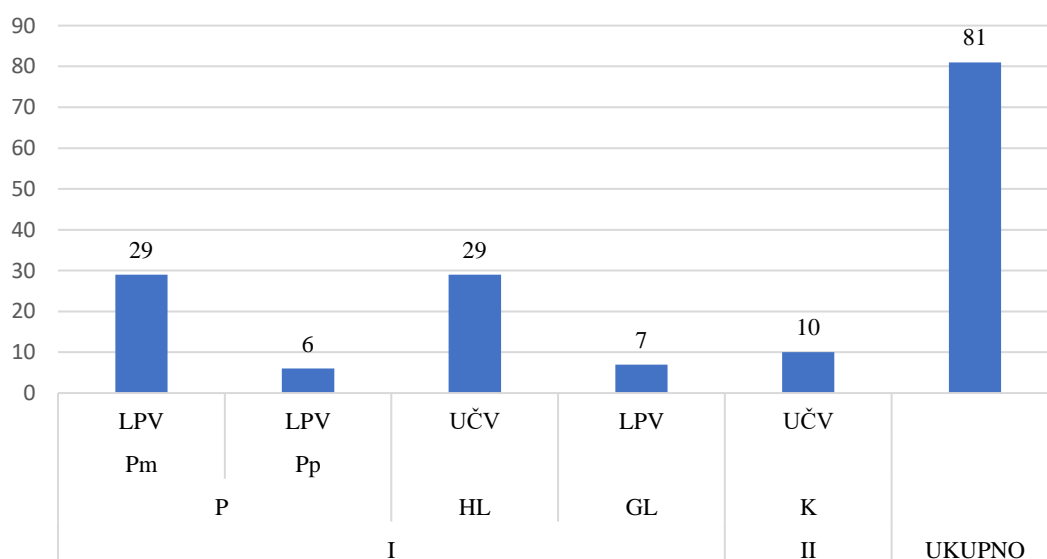
3.3.10 Statistička analiza

Usporedba zastupljenosti izolata rezistentnih na pojedine antibiotike po područjima, zastupljenost pojedinih gena rezistencije, proizvodnja biofilma s obzirom na određenu rezistenciju i posjedovanje određenih gena između skupina izolata s različitog područja provedena je χ^2 -testom. Za analizu podataka o pokretljivosti plivanja kroz različito vrijeme i proizvodnju biofilma korišten je t-test.

4 REZULTATI

4.1 IZOLATI *R. PICKETTII*

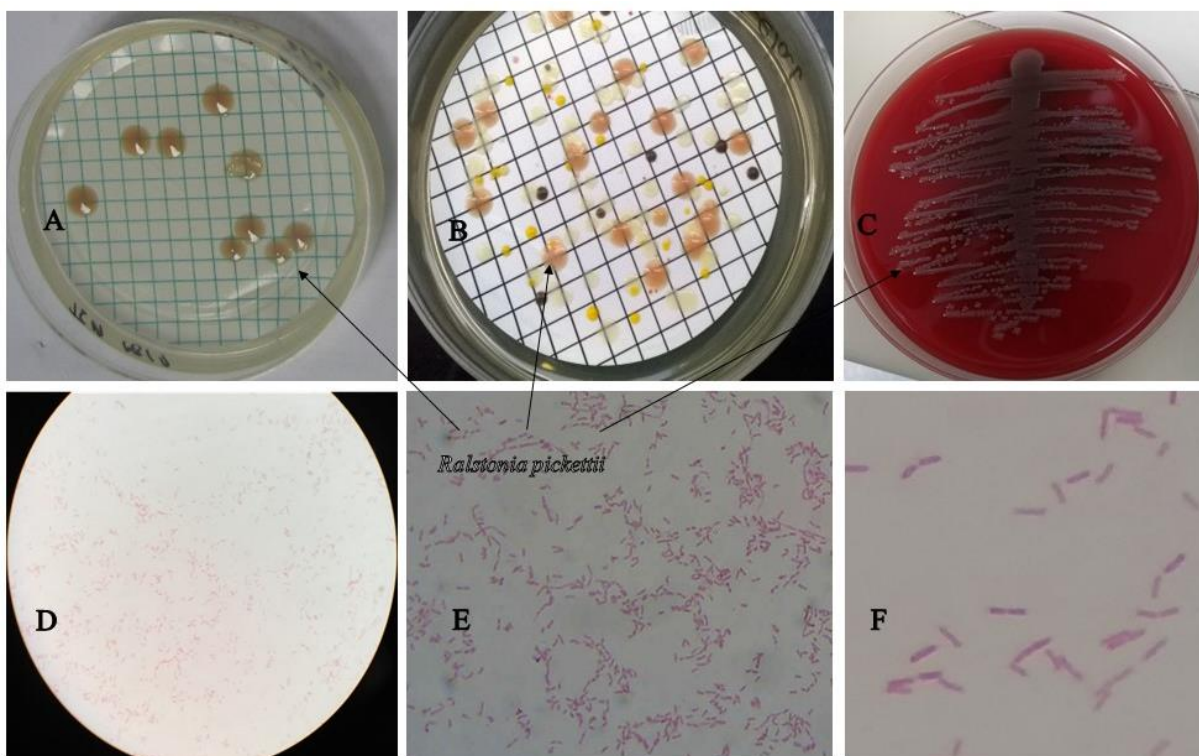
U studiju su uključeni 81 izolat bakterije *R. pickettii* dobiveni tijekom rutinskih kontrola postrojenja za farmaceutsku ultračistu vodu (UČV) i laboratorijsku pročišćenu vodu (LPV) s dva geografska područja u RH. Metodom membranske filtracije, a prema europskoj farmakopeji, uzorci ispitivane vode nasijavani su na triptik soja agar (TSA) i/ili R₂A agar. Kolonije koje su izgledom ukazivale na moguću *R. pickettii* dalje su identificirane prema izgledu stanica u mikroskopskom preparatu i biokemijskim testovima, komercijalnim i tzv. kućnim (engl. *in house*) testovima. Izolati su potvrđeni MALDI-TOF masenom spektrometrijom i lančanom reakcijom polimeraze uz specifične početnice za rod *Ralstonia* i početnice za vrstu *R. pickettii*. Na području grada Zagreba (područje I) sakupljeno je najviše izolata *R. pickettii*, njih 71 (87,7%), dok je 10 (12,3%) izolata *R. pickettii* s područja ravničarske Hrvatske iz područja II. Ispitano je 39 (48,2%) uzoraka UČV i 42 (51,8%) uzorka LPV. Na području I sakupljeno je 29 izolata iz postrojenja za proizvodnju ultračiste farmaceutske vode oznake HL i 42 izolata iz uzoraka laboratorijske pročišćene vode, od čega 29 izolata s mjesta Pm, 6 izolata s mjesta uzorkovanja oznake Pp i 7 izolata iz uzoraka LPV za potrebe pripreme magistralnih lijekova oznake GL. Svi izolati *R. pickettii* s područja II bili su iz uzoraka ultračiste vode. Raspodjela izolata po područjima, mjestima uzorkovanja i vrsti uzorkovane vode prikazana je na slici 10 i u tablici 3.



Slika 10. Udio izolata *R. pickettii* prema geografskim područjima (I i II), mjestima uzorkovanja (Pm, Pp, HL, GL i K) i vrsti uzorka vode (UČV - ultračista voda, LPV - laboratorijska pročišćena voda).

4.2 FENOTIPSKA SVOJSTVA *R. PICKETTII*

Fenotipska svojstva su ispitivana na svim izolatima (81) uključenima u ovu studiju. *R. pickettii* je Gram-negativna štapičasta bakterija. Dobro raste na svim hranjivim podlogama. Za kultivaciju iz uzoraka UČV korištena je, prema europskoj farmakopeji, podloga R₂A agar koja je predviđena za kultivaciju mikroorganizama iz područja s niskim nutrijentima, a za kultivaciju iz LPV triptik soja agar (TSA). Nakon kultivacije u trajanju 18-24 sata na 37°C kolonije *R. pickettii* rasle su na membranskim filtrima kao sjajne, vlažne, lagano konveksne, svijetlo smeđe i/ili smeđe do prljavo roze boje, promjera 0,5-2 mm, a na krvnom agaru rasle su u vidu sjajnih sivih kolonija. U mikroskopskom preparatu bojenom po Gramu vidjeli su se mali, nježni Gram negativni štapići, veličine od 0,8 – 2 µm x 0,3 µm (Slika 11).



Slika 11. *R. pickettii*. Svjetlo smeđe / prljavo roze kolonije na membranskom filtru; čista kultura (A), mješovita kultura (B) i čista kultura sivih, vlažnih kolonija na krvnom agaru (C). Gram-negativni štapići u mikroskopskom preparatu uz povećanje 1000x (D), 2000x (E) i 4000x (F).

Na podlozi s dvostrukim šećerom po Kligleru (glukoza i laktoza) *R. pickettii* raste u obliku sitnih, nježnih, vlažnih kolonija na crvenoj podlozi jer ne fermentira prisutne šećera što rezultira zadržavanjem crvene boje podloge. *R. pickettii* daje brzu reakciju oksidaze, znak da posjeduje enzim citokrom-oksidadzu, koji će u prisutnosti atmosferskog kisika katalizirati oksidaciju fenilendiamina iz testa do tamnoljubičaste boje indofenola. U komercijalnom biokemijskom setu testova API[®] 20 NE *R. pickettii* daje pozitivnu reakciju redukcije nitrata u

nitrite, daje pozitivnu reakciju asimilacije glukoze, arabinoze, kalijevog glukonata, kaprilne kiseline, malata (jabučne kiseline) i trinatrijevog citrata. Negativan rezultat dobiven je u reakciji fermentacije glukoze, ne proizvodi indol iz triptofana, nema arginin-dihidrolazu, ureazu, β -glukozidazu (ne hidroliza eskulin), želatinazu (proteazu), β -galaktozidaza, ne asimilira D-manozu, D-manitol, N-acetil-glukozami, D-maltozu, adipinsku kiselinu i fenil-octenu kiselinu (Slika 12).



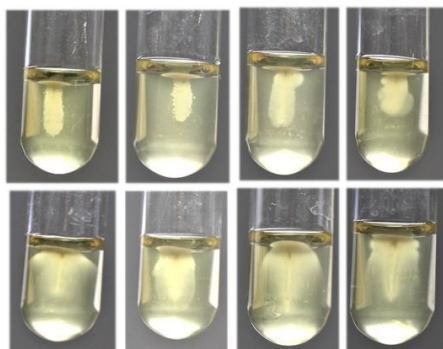
Slika 12. Biokemijski API® 20 NE test, *R. pickettii* pozitivne (zamućenje) i negativne (bistro) reakcije.

Amilolitička i proteolitička svojstva izolata *R. pickettii* ispitana su dodatno na podlogama sa škrobom za detekciju amilaza, odnosno sa želatinom za detekciju proteaza. Jod koji je dodan na porasle kolonije obojao je škrob koji se nalazio u podlozi jer *R. pickettii* ne posjeduje amilazu koja bi razgradila škrob. Negativna je bila reakcija i u testu ispitivanja proteolitičkih svojstava *R. pickettii* u hranjivoj podlozi s želatinom.

4.2.1 *Ralstonia pickettii* i pokretljivost

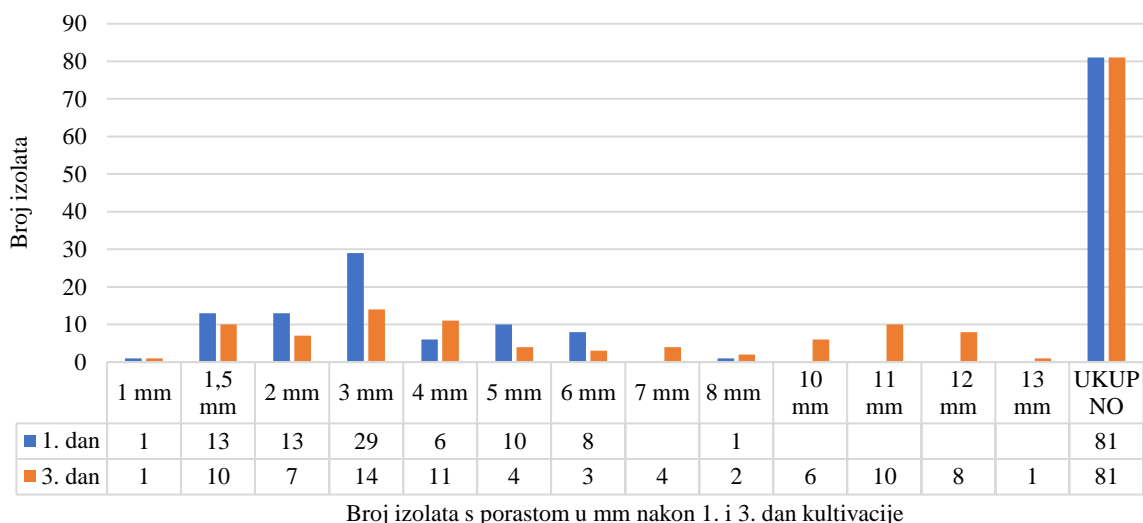
4.2.1.1 Ispitivanje pokretljivosti u epruveti

Pokretljivost plivanja *R. pickettii* ispitana je u SIM hranjivoj podlozi u epruveti s nižom koncentracijom agara (0,3%), a ispitivana je u epruveti zbog mogućnosti praćenja pojave zamućenja i mjerenja udaljenosti zamućenja od ubodne linije u mm, nakon kultivacije od 24 sata i nakon 72 sata. Svi izolati su pokazali određeni stupanj pokretljivosti i vidjeli su se najrazličitiji oblici zamućenja, od ravnomjernoga, preko nepravilnog do lepezastoga (Slika 13).



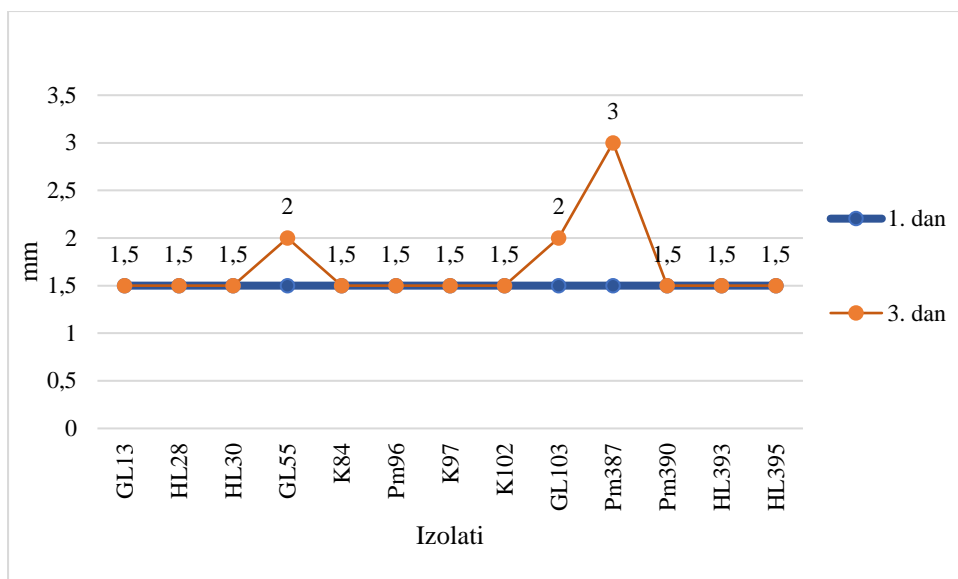
Slika 13. Pokretljivost *R. pickettii* u epruveti - različiti oblici zamućenja.

Prateći pokretljivost nakon prvog i potom nakon trećeg dana kultivacije uočen je značajno veći broj izolata s većom udaljenošću od ubodne linije nakon trećeg dana kultivacije. Već prvi dan kultivacije 67% (54) izolata je postiglo udaljenost 3 i više mm od ubodne linije, a treći dan 78% (63) izolata. Kod najvećeg broja izolata bilo je značajno povećanje početnog zamućenja nakon trećeg dana inkubacije i stanice su, zahvaljujući svojoj pokretljivosti, nastanjivale područja udaljenija od ubodne linije (Slika 14, Tablica 6).



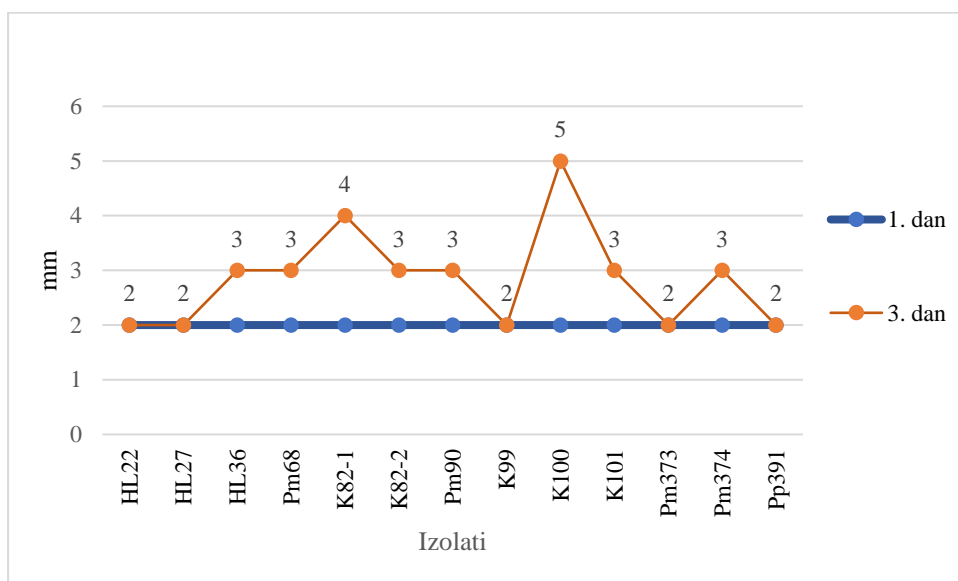
Slika 14. Pokretljivost *R. pickettii* u epruveti – broj izolata *R. pickettii* s porastom u mm nakon prvog i trećeg dana kultivacije.

Samo kod malog broja izolata nije bilo povećanja početne udaljenosti. Kod izolat HL 17 nije bilo velikog porasta nakon 24 sata kultivacije, porastao je samo 1 mm od ubodne linije i ta udaljenost nije se promijenila niti nakon tri dana kultivacije. 13 izolata (GL13, HL28, HL30, GL55, K84, Pm96, K97, K102, GL103, Pm387, Pm390, HL393, HL395) pokazali su zamućenje 1,5 mm od ubodne linije prvi dan kultivacije, a narednih tri dana inkubacije njih 10 su ostali na istim vrijednostima, dok su izolati GL55 i GL103 napravili dodatni pomak za 0,5 mm, a izolat Pm387 za 1,5 mm, ukupno 3 mm. Unatoč slaboj pokretljivosti u epruveti njih 7 (HL30, K84, K97, K102, GL103, Pm387, PM390) odnosno 5 po izračunu ODc (HL30, K84, GL103, Pm387, PM390) su proizveli biofilm, a dva su nakon kultivacije od 48 sati promijenila i svoj status, izolat HL30 je iz NPB prešao u SPB, a izolat GL103 iz SPB u UPB (Slika 15, Tablica 6).



Slika 15. Pokretljivost u epruveti – usporedba udaljenosti treći dan kultivacije kod izolata koji su prvi dan napravili udaljenost od 1,5 mm.

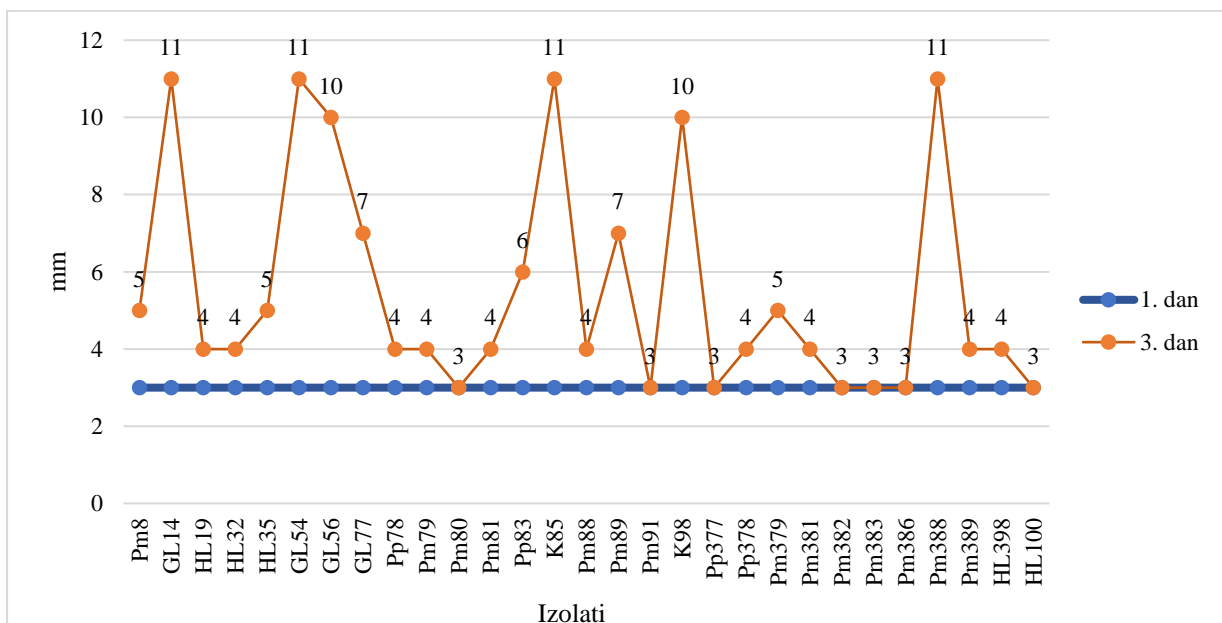
Velika većina izolata je nakon dulje kultivacije značajno povećala udaljenost od ubodne linije. Od 13 izolata koji su prvi dan kultivacije napravili zamućenje u širini 2 mm od ubodne crte, treći dan kultivacije svoje zamućenje je povećalo njih 6 za 1, 2 i 3 mm (Slika 16).



Slika 16. Pokretljivost *R. pickettii* u epruveti – usporedba udaljenosti treći dan kultivacije kod izolata koji su prvi dan napravili udaljenost od 2 mm.

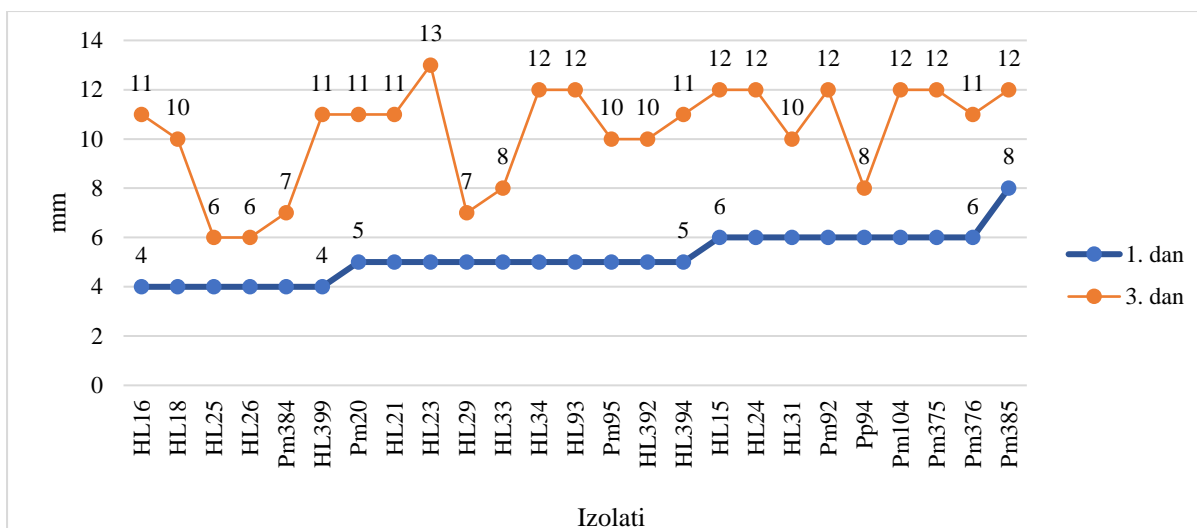
Od 5 sojeva koji su tvorili biofilm (K99, K101, Pm373, Pm374, Pp391) tri nisu napravila pomak nakon trećeg dana kultivacije (K99, Pm373, Pp391), a dva su se pomakla samo za 1 mm (K101, Pm374), od 2 mm na 3 mm udaljenosti od ubodne linije (Tablica 6). Udaljenosti 3 mm od ubodne linije prvi dan kultivacije bila je kod 29 izolata, a treći dan samo njih 7 nije povećalo udaljenost. Ostalih 22 izolata povećalo je udaljenost, od 1 mm njih 10, od 2 mm njih

tri, jedan izolat za 3 mm, dva izolata za 4 mm, dva za 7 mm i četiri izolata za 8 mm (Slika 17). U toj grupi, 16 izolata nisu proizveli biofilm, tri izolata su bili umjereni proizvođači biofilma (GL54, Pm386, Pm388), s time da izolat Pm386 nije nakon trećeg dana kultivacije povećao prvotnu udaljenost od 3 mm, a druga dva su je povećali na 11 mm. Preostalih 11 izolata bili su slabi proizvođači biofilma (GL14, Pm79, Pp83, Pm91, K98, Pp377, Pp378, Pm379, Pm382, Pm383, Pm389) i samo su dva (K98 i GL14) značajno povećali udaljenost od ubodne linije, sa 3mm prvi dan na 10, odnosno 11 mm treći dan. Ostalih 9 izolata ili se nisu uopće pomaknuli od 3 mm dalje (Pm91, Pp377, Pm382, Pm383) ili su se pomakli za 1 mm (Pm79, Pp378, Pm389), 2mm (Pm379) ili 3mm (Pp83). Podatci su prikazani u tablici 6.



Slika 17. Pokretljivost *R. pickettii* u epruveti – usporedba udaljenosti treći dan kultivacije kod izolata koji su prvi dan napravili udaljenost 3 mm.

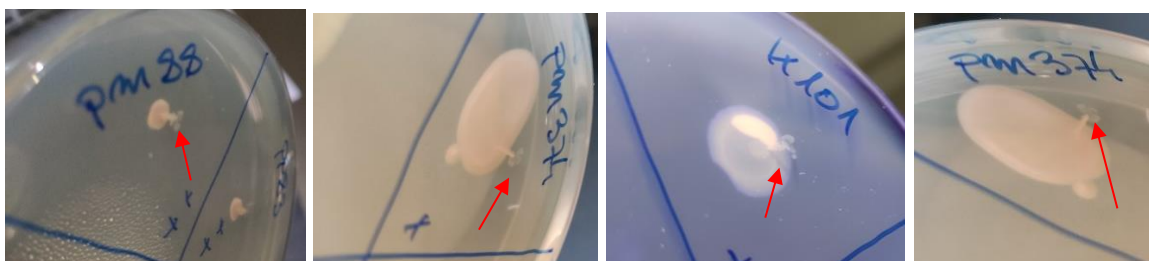
Izolati koji su već prvi dan pokazali veliku pokretljivost, 4, 5, 6 i 8 mm od ubodne linije, pokazali su dodatnu, veliku pokretljivost nakon tri dana kultivacije (Slika 18). Niti jedan izolat nije ostao na vrijednosti od prvog dana. U ovoj skupini od 25 izolata s velikom pokretljivošću već nakon dana kultivacije bila su samo tri proizvođača biofilma, tri slaba (HL33, Pm92 i Pm385) i jedan umjereni proizvođač biofilma (Pm384).



Slika 18. Pokretljivost *R. pickettii* u epruveti - usporedba udaljenosti treći dan kultivacije kod izolata koji su prvi dan napravili udaljenost od 4, 5, 6 i 8 mm.

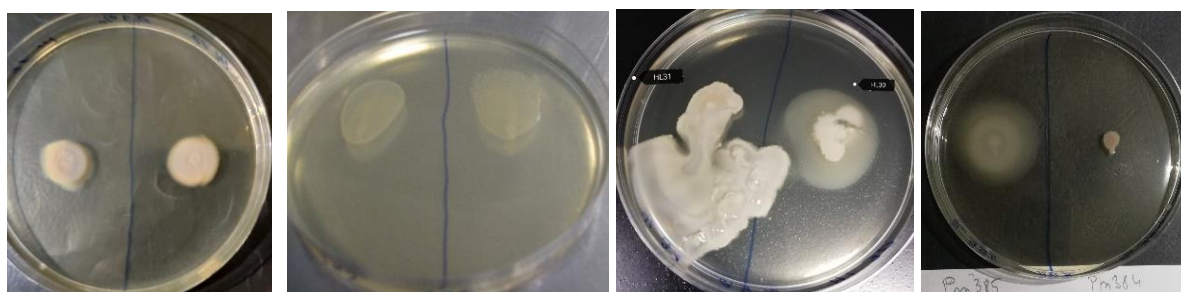
1.1.1.1 Ispitivanje pokretljivosti tipa trzanja i plivanja na agaru

Svi izolati pokazali su pokretljivost trzajućeg tipa (engl. *twitching*) koji je neophodan za stvaranje biofilma (Slika 19).



Slika 19. Pokretljivost *R. pickettii* tipa trzanja.

Pokretljivost tipa plivanja (engl. *swimming*) ispitivana je u hranjivom, polučvrstom / polutekućem mediju s 0,3% agara u Petrijevoj ploči (Slika 20) i već nakon dva sata kultivacije samo 12,3% (10/81) izolata nije pokazalo nikakvu pokretljivost. Nakon 24 sata kultivacije



Slika 20. Pokretljivost *R. pickettii* tipa plivanja.

samo se dva izolata nisu se pomakla postranično od ubodnog mjesta. Narednih dana svi izolati su se pomakli 6 ->30 mm (Tablica 6). U skupini izolata koji su proizvodili biofilm nije uočena

povezanost s povećanom pokretljivošću plivanja. Među proizvođačima biofilma bilo je izolata koji nisu pokazali preveliku pokretljivost plivanja izraženu u milimetrima, ali bilo je i onih vrlo pokretljivih (Tablica 6).

Tablica 6. Rezultati ispitivanja različitih tipova pokretljivosti i proizvodnje biofilma

Izolati	Pokretljivost u epruveti		Pokretljivost plivanja - 0,3% agar				Pokretljivost trzanja	Biofilm nakon	
	1. dan	3. dan	2 sata	24 sata	72 sata	96 sati		24 sata	48 sati
	mm	mm	mm	mm	mm	mm			
Pm8	3	5	1	20	25	30	+	NPB	
GL13	1,5	1,5	1	22	30	30	+	NPB	
GL14	3	11	1	2	5	10	+	<u>SPB</u>	
HL15	6	12	3	6	15	29	+	NPB	
HL16	4	11	3	9	15	30	+	NPB	
HL17	1	1	1	7	17	28	+	NPB	
HL18	4	10	0	30	30	30	+	NPB	
HL19	3	4	0	30	30	30	+	NPB	
Pm20	5	11	2	5	18	45	+	NPB	
HL21	5	11	1,5	5	10	24	+	NPB	
HL22	2	2	1,5	5	17	29	+	NPB	
HL23	5	13	1	30	30	30	+	NPB	
HL24	6	12	2,5	10	16	20	+	NPB	
HL25	4	6	0	30	30	30	+	NPB	
HL26	4	6	1	5	12	25	+	NPB	
HL27	2	2	1	10	17	29	+	NPB	NPB
HL28	1,5	1,5	1,5	3	6	12	+	<u>SPB</u>	
HL29	5	7	1,5	4	9	15	+	NPB	
HL30	1,5	1,5	1	9	15	32	+	NPB	<u>SPB</u>
HL31	6	10	2	30	30	30	+	NPB	
HL32	3	4	1	7	12	18	+	NPB	NPB
HL33	5	8	1	4	9	15	+	<u>SPB</u>	
HL34	5	12	1	5	13	25	+	NPB	
HL35	3	5	0	3	7	14	+	NPB	
HL36	2	3	1	4	7	11	+	NPB	
GL54	3	11	1	5	8	18	+	<u>UPB</u>	
GL55	1,5	2	2	4	9	15	+	NPB	
GL56	3	10	2	6	10	23	+	NPB	
Pm68	2	3	3	11	12	14	+	NPB	
GL77	3	7	0	12	16	20	+	NPB	
Pp78	3	4	1,5	6	9	11	+	NPB	
Pm79	3	4	2	9	10	12	+	<u>SPB</u>	
Pm80	3	3	2,5	5	30	30	+	NPB	
Pm81	3	4	1,5	5	9	12	+	NPB	
K82-1	2	4	2	10	12	18	+	NPB	
K82-2	2	3	2	12	15	24	+	NPB	

Tablica 6 - nastavak

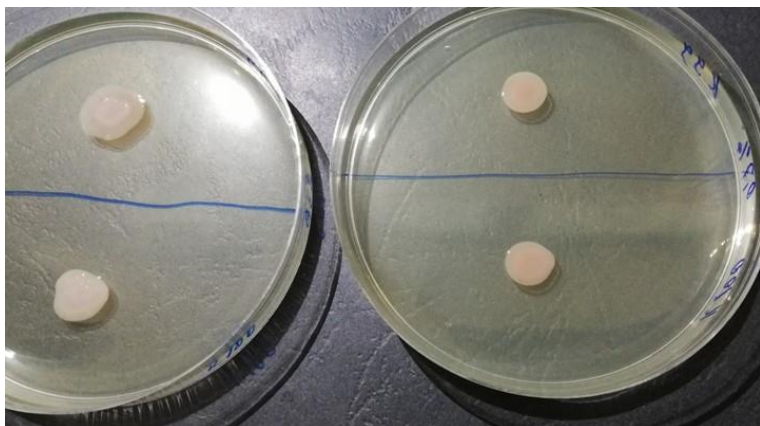
Pp83	3	6	4	4	6	9	+	<u>SPB</u>	
K84	1,5	1,5	4	6	10	25	+	<u>SPB</u>	
K85	3	11	2,5	7	15	29	+	NPB	
Pm88	3	4	0	3	6	9	+	NPB	
Pm89	3	7	3	4	7	16	+	NPB	
Pm90	2	3	5	5	7	10	+	NPB	
Pm91	3	3	3	3	8	20	+	<u>SPB</u>	
Pm92	6	12	12	12	15	25	+	<u>SPB</u>	
HL93	5	12	1,5	5	12	21	+	NPB	
Pp94	6	8	2	6	10	15	+	NPB	
Pm95	5	10	2	3	7	9	+	NPB	
Pm96	1,5	1,5	3	10	30	30	+	NPB	
K97	1,5	1,5	0	5	9	20	+	<u>SPB</u>	
K98	3	10	2,5	10	15	29	+	<u>SPB</u>	
K99	2	2	2,5	7	11	25	+	<u>SPB</u>	
K100	2	5	0	5	9	16	+	NPB	<u>SPB</u>
K101	2	3	1,5	5	10	20	+	<u>SPB</u>	
K102	1,5	1,5	0	10	30	30	+	<u>SPB</u>	
GL103	1,5	2	0	7	10	15	+	<u>SPB</u>	<u>UPB</u>
Pm104	6	12	1	6	11	22	+	NPB	
Pm373	2	2	2	7	9	15	+	<u>SPB</u>	
Pm374	2	3	2	30	30	30	+	<u>SPB</u>	
Pm375	6	12	2	6	15	40	+	NPB	
Pm376	6	11	0,5	8	30	30	+	NPB	
Pp377	3	3	2,5	7	10	15	+	<u>SPB</u>	
Pp378	3	4	2	6	7	11	+	<u>SPB</u>	<u>UPB</u>
Pm379	3	5	0,5	7	8	13	+	<u>SPB</u>	<u>UPB</u>
Pm381	3	4	3	6	9	15	+	NPB	
Pm382	3	3	2	5	7	12	+	<u>SPB</u>	
Pm383	3	3	2	7	8	10	+	<u>SPB</u>	
Pm384	4	7	2,5	7	7	11	+	<u>UPB</u>	
Pm385	8	12	2	17	32	45	+	<u>UPB</u>	
Pm386	3	3	1	30	30	30	+	<u>UPB</u>	
Pm387	1,5	3	1,5	5	7	10	+	<u>SPB</u>	
Pm388	3	11	2	25	30	30	+	<u>UPB</u>	
Pm389	3	4	2,5	6	8	10	+	<u>SPB</u>	
Pm390	1,5	1,5	2	7	8	12	+	<u>SPB</u>	
Pp391	2	2	3	10	10	15	+	<u>SPB</u>	
HL392	5	10	2,5	9	14	20	+	NPB	
HL393	1,5	1,5	3	9	15	25	+	NPB	
HL394	5	11	2	5	9	10	+	NPB	
HL395	1,5	1,5	2	30	30	30	+	NPB	
HL398	3	4	2	6	10	10	+	NPB	
HL399	4	11	0	30	30	30	+	NPB	
HL100	3	3	2	15	16	20	+	NPB	

NPB - neproizvođač biofilma ($OD < OD_c$)

SPB - slabi proizvođač biofilma ($OD_c < OD < 2 \times OD_c$)

UPB - umjereni proizvođač biofilma ($2 \times OD_c < OD < 4 \times OD_c$).

Pokretljivost tipa rojenja (engl. *swarming*) ispitivana je na 0,7% agaru i nije dokazana niti kod jednog izolata (Slika 21).

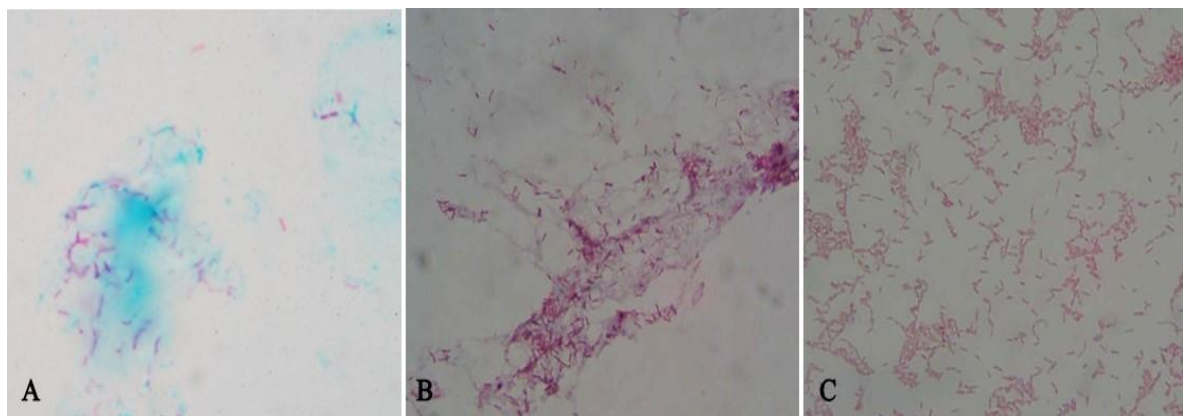


Slika 21. Pokretljivost tipa rojenja nije dokazana kod ispitivanih izolata *R. pickettii*.

4.2.2 *R. pickettii* i biofilm

4.2.2.1 *Proizvodnja izvanstaničnih polimernih supstanci (IPS)*

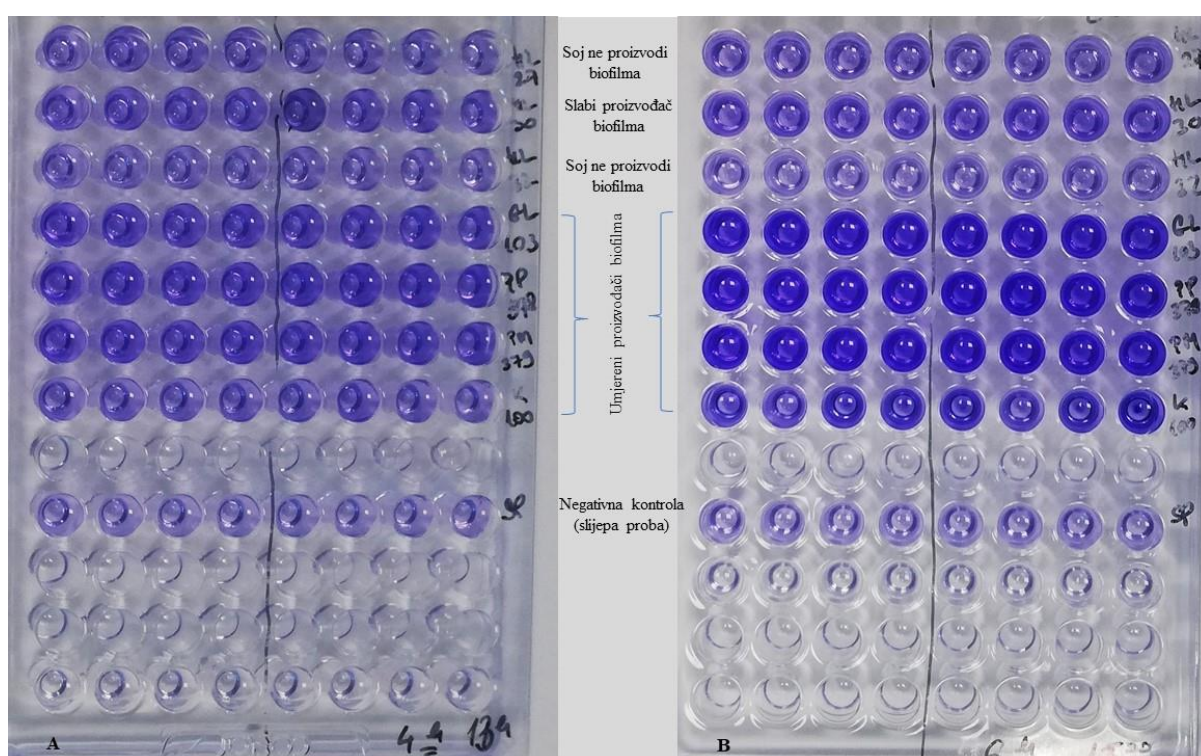
R. pickettii je stvarala izvanstaničnu polimernu tvar sluzave konzistencije nakon 48 sati na perlitu i u običnom TSB bujonu, a nije stvarala na aluminijskoj foliji niti na čvrstoj hranjivoj podlozi. U mikroskopskim preparatima načinjenim od materijala s perlita jasno su bile vidljive bakterijske stanice obojane crveno i područja obojano plavo koja su predstavljala IPS koju su stanice stvorile nakon kultivacije od 48 sati. U preparatima s aluminijske folije nije bilo vidljivih tragova IPS-a. U Gram preparatu iz TSB-a jasno su bile vidljive crveno obojane bakterijske stanice i crveno obojani sluzavi materijal uokolo stanica, a u preparatu s čvrste podloge vidjele su se samo bakterijske stanice, obojane crveno (Slika 22).



Slika 22. Mikroskopski izgled *R. pickettii* kultivirane na perlitu (A), u TSB-u (B) i na R2A agaru (C). Kultivacijom na perlitu (A) *R. pickettii* proizvodi IPS (plavo IPS, crveno stanice), isto tako i u tekućem mediju (crvene stanice i crvena IPS) (B), dok na čvrstoj podlozi ne proizvodi IPS (C).

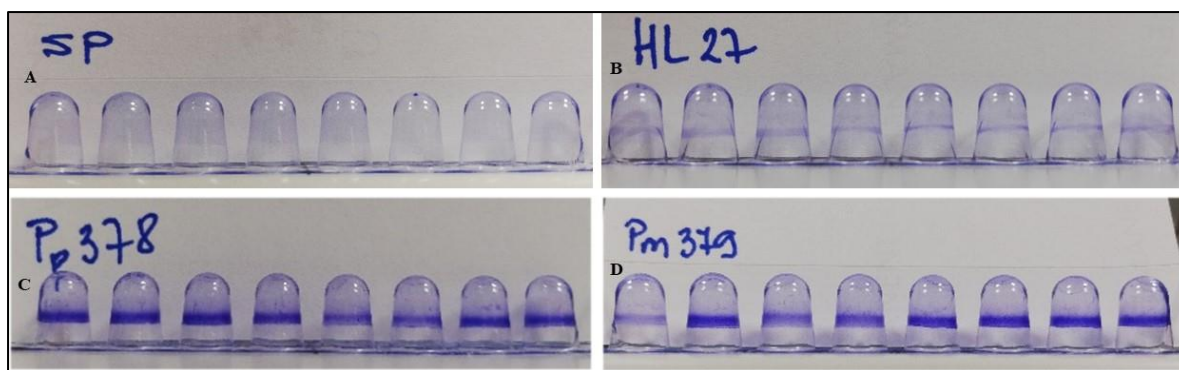
4.2.2.2 *R. pickettii* i proizvodnja biofilma

Ispitivanje proizvodnje biofilma provedeno je kod svih sakupljenih izolata, metodom mikrotitarske ploče. Svi izolati *R. pickettii* ispitani su četverostruko na proizvodnju biofilma koji je kvantificiran bojenjem kristal-violetom i mjerenjem optičke gustoće pri 620 nm nakon inkubacije od 4 h, 6h, 8 h i 24 h na 37 °C. Na slici 23 prikazana je mikrotitarska ploča s negativnom kontrolom i primjerima izolata koji nisu proizvodili biofilm (HL27 i HL32), te izolat slabi proizvođač biofilma (HL30) i primjerima izolata umjerenih proizvođača biofilma (GL100, GL103, Pp378, Pm379) nakon kultivacije u trajanju 4 sati (A) i nakon inkubacije od 6 sati (B).



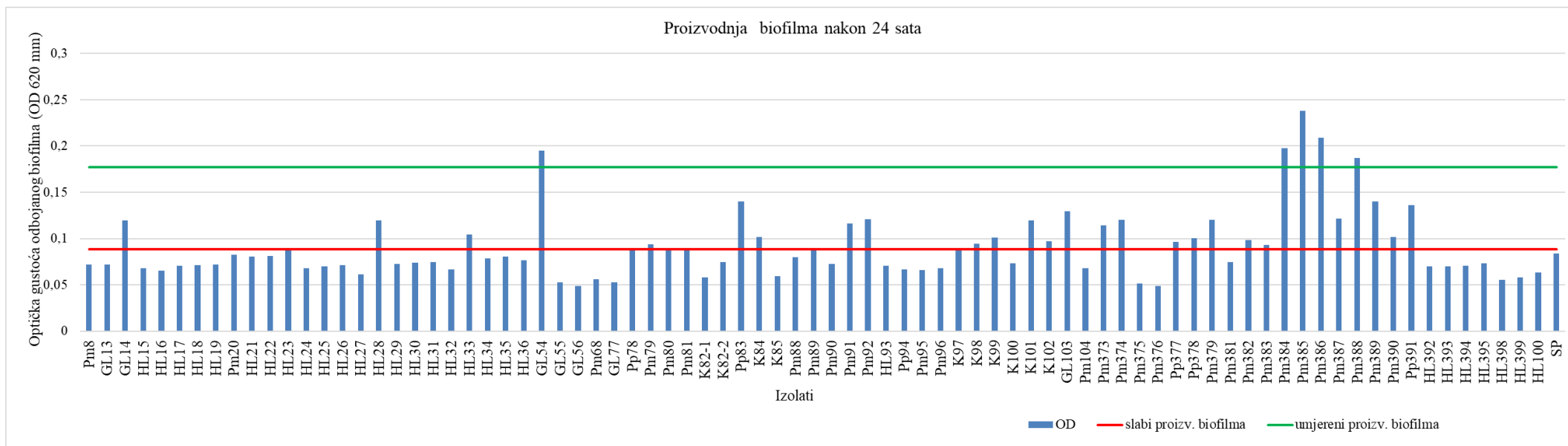
Slika 23. Proizvodnja biofilma u mikrotitarskim pločama, nakon 4 sata kultivacije (A) i nakon 6 sati kultivacije (B).

Nakon uklanjanja tekućeg sadržaja i planktonskih bakterijskih stanica iz bunarića fotografirani su bunarići i tragovi boje u području formiranja biofilma. Na slici 24 prikazane su stijenske bunarića u kojima je bila negativna kontrola (SP) i ne vide se tragovi stvaranja biofilma (A). Izolat HL27 nije proizvođač biofilma prema izračunu optičke gustoće, ali slabi tragovi boje na mjestu stvaranja biofilma u odnosu na stijenske bunarića s negativnom kontrolom vidljive su oku i to govori u prilog početnog stvaranja biofilma (B). Izolati Pp378 i Pm379 su umjereni proizvođača biofilma što jasno pokazuje vidljivi trag boje stijenkama bunarića (C i D).



Slika 24. Stjenke bunarića negativne kontrole (A), neproizvođača biofilma (B) i umjerenih proizvođača biofilma (C i D).

Bunarići izolata čije su vrijednosti OD veće od OD bunarića sa slijepom probom smatrani su proizvođačima biofilma (122), a koristeći graničnu vrijednost optičke gustoće (OD_c) za kategorizaciju proizvođača biofilma dobiveni su, nakon kultivacije od 24 sata, sljedeći rezultati; 63% izolata (51/81) nije proizvodilo biofilm, 30,9% (25/81) izolata bili su u skupini slabih proizvođača, a 6,2% (5/81) izolata bili su umjereni proizvođači biofilma (Tablica 7, Slika 25).



Slika 25. Proizvodnja biofilma kod izolata *R. pickettii* nakon 24 sata kultivacije na 37°C, optička gustoća (OD) kvantificirana spektrofotometrijski na 620 nm nakon bojanja kristal-violetom. Ispod plave crte su neproizvođači biofilma (NPB), između crvene i zelene crte su slabi proizvođači biofilma (SPB), a iznad zelene su umjereni proizvođači biofilma (UPB).

Tablica 7. Rezultati proizvodnje biofilma *R. pickettii* nakon 24 sata

Izolati	FENOTIP rezistencije	Bunarići / optička gustoća (OD 620nm)				SV OD	ODc	2*Odc	4*Odc	Biofilm nakon 24 sata	
		T-G-A-N	1	2	3		4	SPB	UPB		JPB
I	Pm8	R-R-R-R	0,071	0,069	0,074	0,073	0,072	0,089	0,177	0,355	NPB
I	GL13	R-R-R-R	0,065	0,069	0,071	0,082	0,072	0,089	0,177	0,355	NPB
I	GL14	R-R-R-R	0,101	0,126	0,118	0,132	0,119	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
I	HL15	R-R-R-R	0,065	0,067	0,071	0,068	0,068	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL16	R-R-R-R	0,063	0,067	0,064	0,067	0,065	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL17	R-R-R-R	0,07	0,074	0,068	0,071	0,071	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL18	R-R-R-R	0,069	0,071	0,073	0,072	0,071	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL19	R-R-R-R	0,072	0,067	0,072	0,076	0,072	0,089	0,177	0,355	NPB
I	Pm20	R-R-R-R	0,097	0,082	0,069	0,081	0,082	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL21	R-R-R-R	0,08	0,077	0,079	0,085	0,080	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL22	R-R-R-R	0,075	0,085	0,082	0,083	0,081	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL23	R-R-R-R	0,095	0,083	0,088	0,083	0,087	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL24	R-R-R-R	0,066	0,07	0,071	0,066	0,068	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL25	R-R-R-R	0,068	0,069	0,069	0,073	0,070	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL26	R-R-R-R	0,074	0,072	0,069	0,07	0,071	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL27	R-R-R-R	0,062	0,06	0,061	0,062	0,061	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL28	S-S-R-R	0,159	0,103	0,097	0,118	0,119	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
I	HL29	R-R-R-R	0,078	0,076	0,067	0,068	0,072	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL30	S-S-R-R	0,071	0,08	0,07	0,075	0,074	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL31	R-R-R-R	0,079	0,071	0,069	0,08	0,075	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL32	R-R-R-R	0,064	0,073	0,065	0,064	0,067	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL33	R-R-R-R	0,085	0,089	0,074	0,168	0,104	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
I	HL34	R-R-R-R	0,087	0,082	0,072	0,073	0,079	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL35	R-R-R-R	0,083	0,078	0,085	0,076	0,081	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL36	R-R-R-R	0,078	0,073	0,079	0,077	0,077	0,089	0,177	0,355	NPB
I	GL54	R-R-R-R	0,184	0,138	0,229	0,228	0,195	0,089	0,177	0,355	<u>UPB</u>
I	GL55	R-R-R-R	0,056	0,053	0,05	0,052	0,053	0,089	0,177	0,355	NPB
I	GL56	R-R-R-R	0,054	0,049	0,046	0,045	0,049	0,089	0,177	0,355	NPB
I	Pm68	R-R-R-R	0,058	0,06	0,057	0,05	0,056	0,089	0,177	0,355	NPB
I	GL77	R-R-R-R	0,069	0,052	0,046	0,044	0,053	0,089	0,177	0,355	NPB
I	Pp78	R-R-R-R	0,09	0,087	0,086	0,091	0,089	0,089	0,177	0,355	NPB
I	Pm79	R-R-R-R	0,107	0,095	0,081	0,092	0,094	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
I	Pm80	R-R-R-R	0,094	0,094	0,074	0,086	0,087	0,089	0,177	0,355	NPB
I	Pm81	R-R-R-R	0,098	0,093	0,081	0,076	0,087	0,089	0,177	0,355	NPB
II	K82-1	S-S-S-R	0,064	0,064	0,054	0,05	0,058	0,089	0,177	0,355	NPB
II	K82-2	S-R-R-R	0,088	0,075	0,07	0,065	0,075	0,089	0,177	0,355	NPB
I	Pp83	R-R-R-R	0,147	0,143	0,135	0,135	0,140	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
II	K84	S-S-R-R	0,096	0,134	0,094	0,083	0,102	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
II	K85	S-R-R-R	0,061	0,059	0,06	0,058	0,060	0,089	0,177	0,355	NPB
I	Pm88	R-R-R-R	0,074	0,083	0,088	0,074	0,080	0,089	0,177	0,355	NPB

Tablica 7. - nastavak

I	Pm89	R-R-R-R	0,091	0,102	0,088	0,068	0,087	0,089	0,177	0,355	NPB
I	Pm90	R-R-R-R	0,074	0,081	0,073	0,061	0,072	0,089	0,177	0,355	NPB
I	Pm91	R-R-R-R	0,117	0,119	0,122	0,106	0,116	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
I	Pm92	R-R-R-R	0,119	0,111	0,119	0,135	0,121	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
I	HL93	R-R-R-R	0,088	0,065	0,066	0,062	0,070	0,089	0,177	0,355	NPB
I	Pp94	R-R-R-R	0,071	0,066	0,067	0,063	0,067	0,089	0,177	0,355	NPB
I	Pm95	R-R-R-R	0,069	0,067	0,067	0,061	0,066	0,089	0,177	0,355	NPB
I	Pm96	R-R-R-R	0,073	0,066	0,067	0,066	0,068	0,089	0,177	0,355	NPB
II	K97	S-S-S-S	0,086	0,087	0,094	0,093	0,090	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
II	K98	S-S-R-S	0,105	0,092	0,092	0,089	0,095	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
II	K99	S-S-S-S	0,099	0,102	0,103	0,101	0,101	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
II	K100	S-S-S-S	0,075	0,076	0,072	0,069	0,073	0,089	0,177	0,355	NPB
II	K101	S-S-S-S	0,121	0,12	0,116	0,121	0,120	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
II	K102	R-S-S-S	0,103	0,107	0,09	0,087	0,097	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
I	GL103	R-R-R-R	0,124	0,129	0,129	0,135	0,129	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
I	Pm104	R-R-R-R	0,064	0,065	0,071	0,071	0,068	0,089	0,177	0,355	NPB
I	Pm373	R-R-R-R	0,108	0,101	0,13	0,117	0,114	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
I	Pm374	R-R-R-R	0,132	0,135	0,118	0,097	0,121	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
I	Pm375	R-R-R-R	0,059	0,053	0,05	0,044	0,052	0,089	0,177	0,355	NPB
I	Pm376	R-R-R-R	0,054	0,051	0,046	0,043	0,049	0,089	0,177	0,355	NPB
I	Pp377	R-R-R-R	0,099	0,092	0,09	0,104	0,096	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
I	Pp378	R-R-R-R	0,095	0,122	0,093	0,092	0,101	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
I	Pm379	R-R-R-R	0,105	0,109	0,144	0,123	0,120	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
I	Pm381	R-R-R-R	0,075	0,071	0,081	0,07	0,074	0,089	0,177	0,355	NPB
I	Pm382	R-R-R-R	0,108	0,105	0,097	0,084	0,099	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
I	Pm383	R-R-R-R	0,095	0,096	0,084	0,096	0,093	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
I	Pm384	R-R-R-R	0,214	0,19	0,204	0,183	0,198	0,089	0,177	0,355	<u>UPB</u>
I	Pm385	R-R-R-R	0,166	0,156	0,164	0,467	0,238	0,089	0,177	0,355	<u>UPB</u>
I	Pm386	R-R-R-R	0,269	0,21	0,186	0,171	0,209	0,089	0,177	0,355	<u>UPB</u>
I	Pm387	R-R-R-R	0,181	0,13	0,101	0,075	0,122	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
I	Pm388	R-R-R-R	0,218	0,203	0,177	0,15	0,187	0,089	0,177	0,355	<u>UPB</u>
I	Pm389	R-R-R-R	0,163	0,142	0,139	0,117	0,140	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
I	Pm390	R-R-R-R	0,11	0,105	0,104	0,088	0,102	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
I	Pp391	R-R-R-R	0,16	0,148	0,116	0,12	0,136	0,089	0,177	0,355	<u>SPB</u>
I	HL392	R-R-R-R	0,081	0,073	0,067	0,059	0,070	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL393	R-R-R-R	0,082	0,071	0,063	0,063	0,070	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL394	R-R-R-R	0,08	0,074	0,064	0,064	0,071	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL395	R-R-R-R	0,093	0,07	0,069	0,062	0,074	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL398	R-R-R-R	0,06	0,053	0,055	0,053	0,055	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL399	R-R-R-R	0,065	0,064	0,055	0,049	0,058	0,089	0,177	0,355	NPB
I	HL100	R-R-R-R	0,073	0,059	0,059	0,063	0,064	0,089	0,177	0,355	NPB
SP			0,089	0,078	0,078	0,089	0,084	0,089	0,177		

T-G-A-N – tobramicin, gentamicin-amikacin-netilmicin

SV OD – srednja vrijednost optičkih gustoća dobivenih u 4 bunarića za svaki izolat

NPB – neproizvođač biofilma (OD < ODc); NPB < 0,089

SPB – slabi proizvođač biofilma (ODc < OD < 2x ODc); SPB= 0,089-0,177

UPB – umjereni proizvođač biofilma (2x ODc < OD < 4x ODc); UPB= 0,177-0,355.

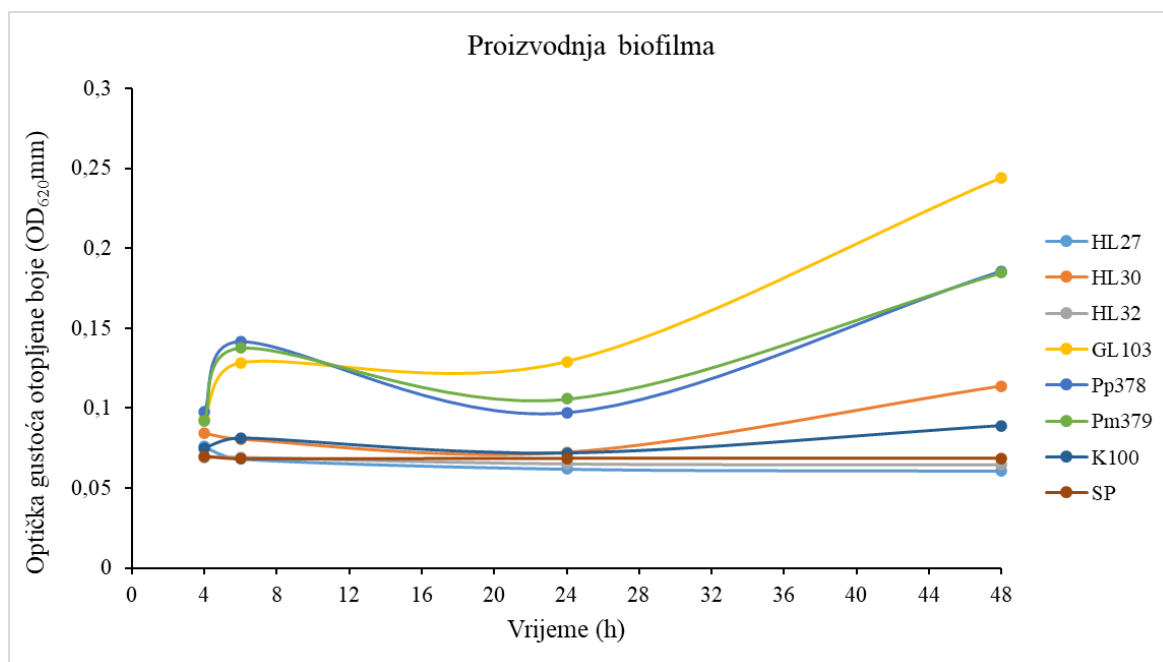
Za dodatnih sedam izolata (HL27, HL30, HL32, K100, GL103, Pp378, Pm379), slabije pokretnih u testu pokretljivosti u epruveti, različitim rezultatima pokretljivosti u obliku plivanja i s pokretljivošću u obliku trzanja promatran je razvoj biofilma daljnjih 24 sata, do ukupno 48 sati inkubacije. Za svaki taj izolat napravljena su razrjeđenja u dvije epruvete i iz svake je ukapano u četiri bunarića, svaki izolat testiran je osmerostruko. Htjelo se vidjeti hoće li se tijekom vremena dogoditi promjena statusa proizvođača biofilma u smislu prelaska iz neproizvođača u slabog proizvođača, iz slabog u umjerenog proizvođača ili eventualno iz umjerenog u jakog proizvođača biofilma. Kod dva izolata (HL27 i HL32) nije se dogodila promjena, izolati su zadržali prvotni status neproizvođača biofilma i nakon 48 sati kultivacije, dva izolata (HL30 i K100) su iz neproizvođača prešli u slabe proizvođače biofilma i tri izolata (GL102, Pp378 i Pm379) su iz slabih proizvođača prešli u umjerene proizvođače biofilma (Tablica 8).

Tablica 8. Prikaz rezultata stvaranja biofilma za 7 izolati *R. pickettii* unutar 48 sati, s različitim pokretljivostima

Izolat	Pokretljivost u epruveti		Pokretljivost plivanja 0,3% agar				Pokretljivost trzanje	Biofilm	
	24 sata	48 sati	2 sata	24 sata	72 sata	96 sati		24 sata	48 sati
	mm	mm	mm	mm	mm	mm			
HL27	2	2	1	10	17	29	+	NPB	NPB
HL30	1,5	1,5	1	9	15	32	+	NPB	SPB
HL32	3	4	1	7	12	18	+	NPB	NPB
K100	2	5	0	5	9	16	+	NPB	SPB
GL103	1,5	2	0	7	10	15	+	SPB	UPB
Pp378	3	4	2	6	7	11	+	SPB	UPB
Pm379	3	5	0,5	7	8	13	+	SPB	UPB

NPB - neproizvođač biofilma, SPB - slabi proizvođač biofilma, UPB - umjereni proizvođač biofilma.

Vrijednosti optičke gustoće kroz promatrano vrijeme kod izolata koji proizvode biofilm ukazuju da postoji rana faza rasta do 8 sati koja onda pada da bi do 48 sati opet rasla (Slika 26).



Slika 26. Razvoj biofilma do 24 sata i potom do konačnih 48 sati inkubacije kod 7 izabranih izolata (HL27, HL30, HL32, GL103, Pp378, Pm379, K100), SP-slijepa proba.

4.2.3 Ispitivanje proizvodnje endotoksina LAL testom

Proizvodnja endotoksina testirana je na 6 izabranih izolata iz različitih područja Hrvatske s različitim fenotipom rezistencije na aminoglikozidne antibiotike i različitom proizvodnjom biofilma. Među izabranima, njih 5 nisu proizvodili biofilm unutar 24 sata, a izolat GL103 je proizvodio i kategoriziran je kao slabi proizvođač biofilma. Kod tri izolata, HL27, HL30 i GL103 promatrana je proizvodnja biofilma nakon produljene inkubacije od 48 sati i jedan neproizvođač biofilma (HL30) prešao je u slabog proizvođača, a izolat GL103 je iz slabog proizvođača biofilma prešao u umjerenog (Tablica 9). Kao pozitivna kontrola korišten je standardni soj *E. coli*, ATCC 25922.

Tablica 9. Fenotip rezistencije *R. pickettii* i proizvodnja biofilma izolata testiranih na prisustvo endotoksina

Izolati	Pm20	HL27	HL30	K85	K99	GL103
Fenotip T-G-A-N	R-R-R-R	R-R-R-R	S-S-S-R	S-I-I-S	S-S-S-S	R-R-R-R
Proizvođač biofilma	24 sata	Ne	Ne	Ne	Ne	Slabi
	48 sati	-	Ne	Slabi	-	-

T-tobramicin, G-gentamicin, A-amikacin, N-netilmicin, „-“, nije testirano.

Dobiveni su sljedeći rezultati (Tablica 10):

- koncentracija endotoksina manja od 0,5 EU/mL za izolate HL27 i GL103;
- koncentracija endotoksina manja od 1,0 EU/mL za izolate *E. coli* i K85;
- koncentracija endotoksina manja od 2,0 EU/mL kod izolata K99;
- koncentracija endotoksina manja od 4,0 EU/mL kod izolata Pm20, HL30.

Tablica 10. Koncentracije endotoksina dobivenih LAL metodom kod *E. coli* i izolata *R. pickettii*

Uzorak	<i>E. coli</i>	Pm 20	HL 27	HL 30	K 85	K 99	GL 103	Konc. endotoksina (EU/mL)
Razrjeđenje								
original	+	+	+	+	+	+	+	0,0625
1:2	+	+	+	+	+	+	+	0,125
1:4	+	+	+	+	+	+	+	0,25
1:8	+	+	-	+	+	+	-	0,5
1:16	-	+	-	+	-	+	-	1
1:32	-	+	-	+	-	-	-	2
1:64	-	-	-	-	-	-	-	4

Uzorak (-) ima manje endotoksina nego što je koncentracija reagensa u tom razrjeđenju, uzorak (+) sadrži koncentraciju endotoksina kolika je osjetljivost lizata u tom koraku ili više.

Ispitivani izolati proizvodili su endotoksin u koncentracijama približnim onima kod *E. coli*, izolati HL27 i GL103 nešto niže koncentracije, izolati Pm20, HL30 i K99 više i izolat K85 istu koncentraciju.

4.2.4 Potvrda identifikacije *R. pickettii*

4.2.4.1 Masena spektrometrija

Svi izolati potvrđeni su MALDI-TOF masenom spektrometrijom kao *R. pickettii* s identifikacijskom ocjenom 2300 do 3000, što je visoka potvrda vrste, dodatno su potvrđeni lančanom reakcijom polimeraze i dalje su uključeni u nastavak ispitivanja.

4.2.4.2 Lančana reakcija polimeraze

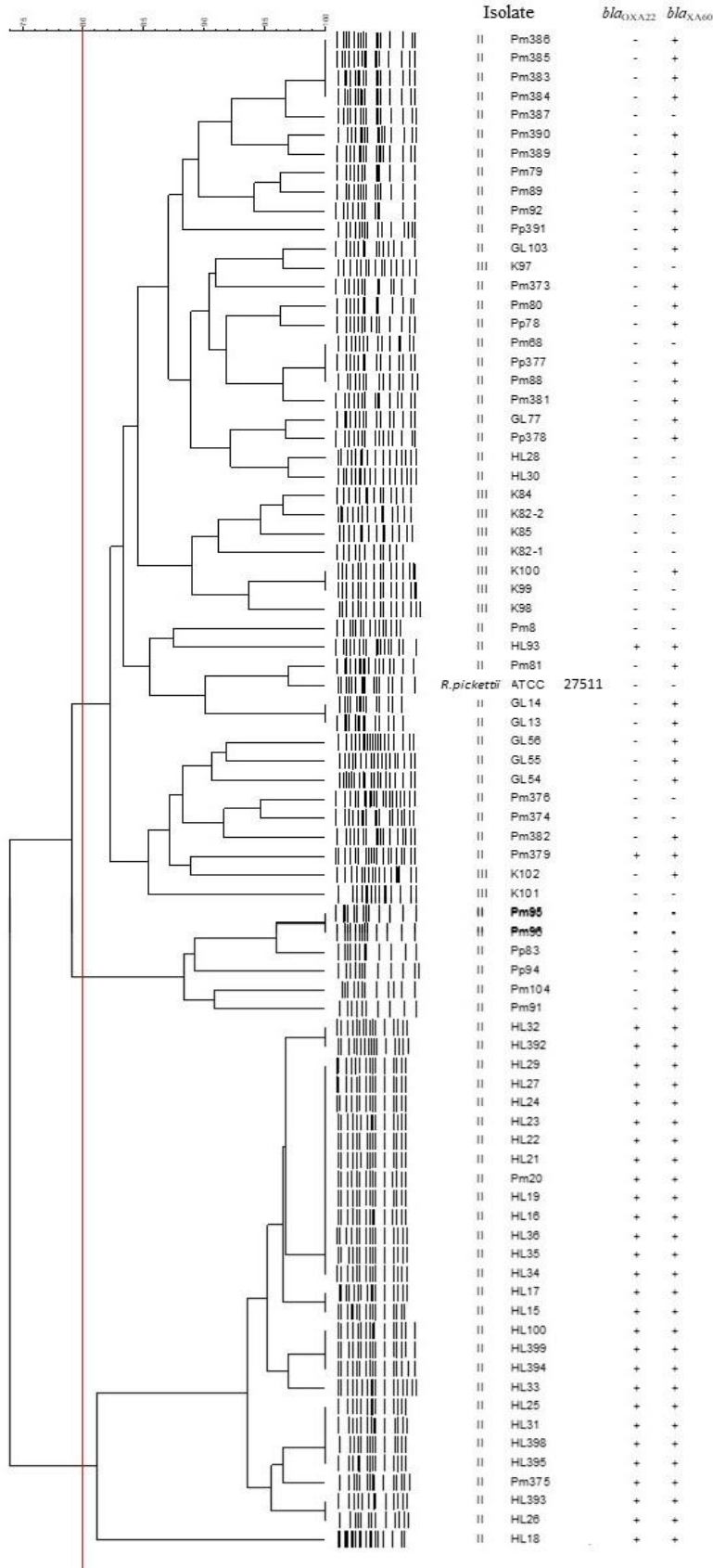
Svi izolati (81) *R. pickettii* potvrđeni su metodom lančane reakcije polimeraze uz primjenu specifičnih početnica za 16S rRNA koje odgovaraju rodu *Ralstonia* i vrsti *R. pickettii*.

4.2.4.3 Srodnost izolata *R. pickettii*

Srodnost izolata *R. pickettii* ispitana je gel-elektroforezom u pulsirajućem polju (engl. *pulse-field gel electrophoresis*, PFGE). Dobiveni su rezultati koji su hijerarhijskim grupiranjem sa sličnošću od $\geq 80\%$ formirali tri glavna klastera, a svaki klaster imao je podklaster (Slika 27). Zbog slabije vizualizacije fragmenata DNA, izolati Pm90 i Pm388 nisu bili uključeni u analizu dendrograma. U prvom klasteru (A) bilo je najviše izolata (45/79), od Pm386 do K101, koji su bili raspoređeni u pet podklastera. Standardni soj *R. pickettii* ATCC 27511 nalazio se u ovom prvom klasteru u četvrtom podklasteru. Prvi podklaster sadržavao je 11 izolata dobivenih iz sustava za laboratorijsku pročišćenu vodu, 10 s mjesta uzorkovanja Pm i jedan s mjesta uzorkovanja Pp. Drugi podklaster je sadržavao 13 izolata, grupiranih u tri skupine koji su se razlikovali u jednoj do tri vrpce. Tu su bili zastupljeni izolati *R. pickettii* dobiveni iz uzoraka LPV i UČV iz oba područja i iz svih mjesta uzorkovanja. U trećem podklasteru bilo je sedam izolata iz uzoraka UČV, svi s područja I. Tvorili su dvije skupine s malim razlikama i u svakoj je bio jedan izolat samac (engl. *singleton*) (K85 i K98). Četvrti podklaster činili su izolati s mjesta uzorkovanja Pm, HL, GL, od čega četiri izolata dobiveni iz LPV (Pm8, Pm81, GL 13, GL14) i jedan izolat iz UČV HL93. Peti podklaster imao je 9 izolata dobivenih iz LPV (GL54, GL55, GL56, Pm374, Pm376, Pm379, Pm382) i UČV (K101 i K102). Tvorili su tri para i tri samca. Parove su tvorili gotovo identični GL55 i GL56, Pm374 i Pm376 i zadnji par Pm379 i K102.

Izolati Pm95, Pm96, Pp83, Pp94, Pm104 i Pm91 bili su raspoređeni u drugi klaster. Unutar drugog klastera identificiran je podklaster s tri gotovo identična izolata (Pm95, Pm96 i Pp83), dok su tri izolata bili samci (Pp94, Pm104, Pm91).

U trećem klasteru je bila velika podskupina od 16 gotovo identičnih izolata, od kojih je 12 potpuno identičnih (HL29 do HL 34), a ostala četiri činila su dva para, HL32 i HL392 i par HL17 i HL15. Manji podklaster sastojao se od tripleta HL100, HL399, HL394 i samca HL33. Preostali izolati činili su skupinu od četiri vrlo slična izolata (HL25, HL31, HL396 i HL385), par HL393 i HL26 i jedan izolat HL375. Izolat HL18 je bio samac (nije bio povezan s ostalima).



Slika 27. PFGE dendrogram koji prikazuje srodnost 79 izolata *R. pickettii* iz različitih područja (II – područje I; III – područje II) i mjesta uzorkovanja (Pm, Pp, HL, GL, K). Izolati nisu bili identični, ali su mnogi bili usko povezani sa sličnošću vrpce od >80%.

U tablici 11 je prikazan broj izolata po klasterima prema području i mjestu uzorkovanja, prisustvu *bla_{oxa22}* i *bla_{oxa60}* gena, proizvodnji biofilma i fenotipu aminoglikozidne rezistencije. U klasteru A je najviše izolata (45/81), tu su svi izolati s područja II, njih 10 oznake K, zatim s područja I svi izolati oznake GL (7/7), gotovo svi Pm izolati (21/27), četiri Pp izolata i samo tri izolata s mjesta uzorkovanja HL (3/29). Kod 29 izolata u A klasteru dokazano je prisustvo *bla_{oxa60}* gena, dva izolata su imala i *bla_{oxa22}* i *bla_{oxa60}* gen, kod 14 izolata nije dokazan ni jedan od tih gena. U istom klasteru su 33 izolata rezistentna na sva četiri aminoglikozidna antibiotika (tobramicin, gentamicin, amikacin, netilmicin – profil TGAN). Tu su se našli i svi izolati osjetljivi na sva četiri aminoglikozidna antibiotika (9/79). Svi osjetljivi izolati bili su s područja II, jednako i izolat K102 koji je bio rezistentan samo na tobramicin, a osjetljiv na ostala tri ispitivana aminoglikozida. U istom A klasteru su bila dva jedina izolata (HL28 i HL30) iz područja I koja su bili osjetljivi na tri aminoglikozidna antibiotika tobramicin, gentamicin, amikacin, a rezistentni na netilmicin. U klasteru A su bili gotovo svi izolati koji su proizvodili biofilm (28/31) i manji broj onih koji nisu proizvodili biofilm (17/48).

U klasteru B bilo je samo 6 izolata, svi s područja I, s mjesta uzorkovanja Pm bila su 4 izolata i 2 s mjesta uzorkovanja Pp. Četiri izolata su imala samo *bla_{oxa60}* gen, a dva nisu imala niti jedan OXA gen. Četiri izolata nisu proizvodila biofilm, dva su bila slabi proizvođači biofilma i svih 6 su imala TGAN fenotip. U trećem klasteru bilo je 28 izolata i najveći broj (26/29) je s mjesta uzorkovanja HL, samo 2 s mjesta uzorkovanja Pm. Kod svih 28 izolata dokazano je prisustvo *bla_{oxa22}* i *bla_{oxa60}* gena. Samo je jedan izolat proizvodio biofilm, a ostalih 27 nisu. Svi su bili rezistentni na sva četiri ispitivana aminoglikozidna antibiotika.

Tablica 11. Broj izolata *R. pickettii* po klasterima, prema posjedovanju *bla_{OXA22}* *bla_{OXA60}* gena, proizvodnji biofilma i fenotipu aminoglikozidne rezistencije

Klaster	Podklaster	GL (n=7)	Pm (n=27)	Pp (n=6)	HL (n=29)	K (n=10)	Izolat (n=79)	<i>bla_{OXA22}</i> <i>bla_{OXA60}</i> (n=30)	samo <i>bla_{OXA60}</i> (n=33)	bez OXA gena (n=16)	NPB (n=48)	SPB (n=24)	UPB (n=7)	TGAN R (n=67)	TGAN S (n=9)	N R (n=2)	T R (n=1)
A	1.	0	10	1	0	0	11	0	10	1	1	7	3	11	0	0	0
	2.	2	5	3	2	1	13	0	10	3	6	5	2	10	1	2	0
	3.	0	0	0	0	7	7	0	1	6	3	4	0	0	7	0	0
	4.	2	2	0	1	0	5	1	3	1	4	1	0	5	0	0	0
	5.	3	4	0	0	2	9	1	5	3	3	4	2	7	1	0	1
	Ukupno	7	21	4	3	10	45	2	29	14	17	21	7	33	9	2	1
B	1.	0	2	1	0	0	3	0	1	2	2	1	0	3	0	0	0
	2.	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
	3.	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
	4.	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
	Ukupno	0	4	2	0	0	6	0	4	2	4	2	0	6	0	0	0
C	1.	0	1	0	15	0	16	16	0	0	16	0	0	16	0	0	0
	2.	0	0	0	4	0	4	4	0	0	3	1	0	4	0	0	0
	3.	0	1	0	7	0	8	8	0	0	8	0	0	8	0	0	0
	Ukupno	0	2	0	26	0	28	28	0	0	27	1	0	28	0	0	0

HL, GL, Pm, Pp, - mjesta uzorkovanja na području I; K – mjesto uzorkovanja na području II

TGAN - tobramicin, gentamicin, amikacin, netilmicin; N - netilmicin, T- tobramicin, R - rezistentan; S – osjetljiv

K85 ima fenotip S-I-I-S i nalazi se klasteru A3

4.2.5 Osjetljivost na antibiotike i mehanizmi rezistencije na antibiotike

4.2.5.1 Rezultati ispitivanja osjetljivosti na antibiotike metodama disk difuzije

Rezultati ispitivanja osjetljivosti *R. pickettii* na antibiotike metodom disk difuzije prikazani su u tablici 12 uz prikaz područja od kuda su izolati dobiveni. Svi izolati (100%) su bili osjetljivi na imipenem, tigeciklin, tetraciklin i trimetoprim-sulfametoksazol, a gotovo svi na ceftriakson (98,8%), cefepim (98,8%), piperacilin/tazobaktam (97,5%), cefoksitin (97,5%), cefaleksin (96,3%), a veliki broj na ciprofloksacin (93,8%) i cefotaksim (90,1%). Osjetljivost na piperacilin je iskazalo 88,9% izolata, a nešto manji broj i na ceftazidim (81,5%). Na kloramfenikol je bilo 50,6% izolata osjetljivo, 40,7% intermedijarno osjetljivo i 8,6% rezistentno. S druge strane, svi izolati (100%) su bili rezistentni na kolistin. Vrlo visoke stope rezistencije dobivene su kod aztreonama (96,3%), ertapenema (91,3%), svih aminoglikozida: netilmicin (88,9%), amikacin i tobramicin (87,7%) i gentamicin (86,4%). Dosta visoke stopa rezistencije bile su kod β -laktamskih antibiotika penicilinske skupine: amoksicilin/klavulanska kiselina (71,6%), tikarcilin (67,9%), tikarcilin/klavulanska kiselina (61,7%) i ampicilin (58,0%). Rezistenciju na meropenem iskazalo je 29,6% izolata, a 40,7% izolata bilo je intermedijarno osjetljivo na meropenem.

Tablica 12. Profil rezistencije izolata *R. pickettii* dobivenih metodom disk difuzije; distribucija po područjima iz kojih su izolati dobiveni

Antibiotik*	R	I	S	Disk μg	<i>Ralstonia pickettii</i> (n=81)			R /I/ S izolati po područjima i izvorima				
					R	I	S	područje I (n=71)			područje II (n=10)	
					No (%)	No (%)	No (%)	HL (n=29)	Pm (n=29)	Pp (n=6)	GL (n=7)	K (n=10)
Ampicilin	≤13	14-16	≥17	10	47 (58,0%)	20 (24,7%)	14 (17,3%)	14 /12/ 3	20 /4/ 5	6 /0/ 0	3 /1/ 3	4 /3/ 3
Amoksicilin / klavulanska kis.	≤13	14-17	≥18	20/10	58 (71,6%)	17 (20,0%)	6 (7,4%)	12 /13/ 4	26 /2/ 1	6 /0/ 0	6 /1/ 0	8 /1/ 1
Tikarcilin	≤15	16-23	≥24	75	55 (67,9%)	24 (29,6%)	2 (2,5%)	12 /17/ 0	24 /4/ 1	6 /0/ 0	4 /2/ 1	9 /1/ 0
Tikarcilin / klavulanska kis.	≤15	16-23	≥24	75/10	50 (61,7%)	25 (30,9%)	6 (7,4%)	7 /21/ 1	24 /2/ 3	6 /0/ 0	4 /1/ 2	9 /1/ 0
Piperacilin	≤14	15-20	≥21	100	2 (2,5%)	7 (8,6%)	72 (88,9%)	0 /3/ 26	0 /2/ 27	0 /1/ 5	0 /0/ 7	2 /1/ 7
Piperacilin/ tazobaktam	≤14	15-20	≥21	100/10	2 (2,5%)	0	79 (97,5%)	0 /0/ 29	0 /0/ 29	0 /0/ 6	0 /0/ 7	2 /0/ 8
Ertapenem	≤15	16-18	≥19	10	74 (91,3%)	5 (6,2%)	2 (2,5%)	27 /2/ 0	25 /2/ 2	6 /0/ 0	7 /0/ 0	9 /1/ 0
Imipenem	≤15	16-18	≥19	10	0	0	81 (100%)	0 /0/ 29	0 /0/ 29	0 /0/ 6	0 /0/ 7	0 /0/ 10
Meropenem	≤15	16-18	≥19	10	24 (29,6%)	33 (40,7%)	24 (29,6%)	1 /12/ 16	13 /12/ 4	6 /0/ 0	1 /3/ 3	3 /6/ 1
Aztreonam	≤15	16-21	≥22	30	78 (96,3%)	3 (3,7%)	0	27 /2/ 0	28 /1/ 0	6 /0/ 0	7 /0/ 0	10 /0/ 0
Cefaleksin	≤19	20-22	≥23	30	2 (2,5%)	1 (1,2%)	78 (96,3%)	0 /0/ 29	0 /0/ 29	0 /0/ 6	0 /1/ 6	2 /0/ 8
Cefoksitin	≤14	15-17	≥18	30	2 (2,5%)	0	79 (97,5%)	0 /0/ 29	0 /0/ 29	0 /0/ 6	0 /0/ 7	2 /0/ 8
Ceftriakson	≤13	14-20	≥21	30	0	1 (1,2%)	80 (98,8%)	0 /0/ 29	0 /0/ 29	0 /0/ 6	0 /0/ 7	0 /1/ 9
Ceftazidim	≤14	15-17	≥18	30	11 (13,6%)	4 (4,9%)	66 (81,5%)	0 /0/ 29	2 /1/ 26	0 /1/ 5	4 /0/ 3	5 /2/ 3
Cefotaksim	≤14	15-22	≥23	30	0	8 (9,9%)	73 (90,1%)	0 /1/ 28	0 /2/ 27	0 /1/ 5	0 /0/ 7	0 /4/ 6
Cefepime	≤14	15-17	≥18	30	0	1 (1,2%)	80 (98,8%)	0 /0/ 29	0 /0/ 29	0 /0/ 6	0 /0/ 7	0 /1/ 9
Gentamicin	≤12	13-14	≥15	10	70 (86,5%)	1 (1,2%)	10 (12,3%)	27 /1/ 1	29 /0/ 0	6 /0/ 0	7 /0/ 0	1 /0/ 9

Tablica 12. - nastavak

Amikacin	≤14	15-16	≥17	30	71 (87,7%)	0	10 (12,3%)	27 /0/ 2	29 /0/ 0	6 /0/ 0	7 /0/ 0	2 /0/ 8
Tobramicin	≤12	13-14	≥15	10	71 (87,7%)	1 (1,2%)	9 (11,1%)	27 /0/ 2	29 /0/ 0	6 /0/ 0	7 /0/ 0	2 /1/ 7
Netilmicin	≤12	13-14	≥15	30	72 (88,9%)	0	9 (11,1%)	28 /0/ 1	29 /0/ 0	6 /0/ 0	7 /0/ 0	2 /0/ 8
Tigeciklin	≤11	12-14	≥15	30	0	0	81 (100%)	0 /0/ 29	0 /0/ 29	0 /0/ 6	0 /0/ 7	0 /0/ 10
Tetraciklin	≤11	12-14	≥15	30	0	0	81 (100%)	0 /0/ 29	0 /0/ 29	0 /0/ 6	0 /0/ 7	0 /0/ 10
Trimetoprim- sulfametoksazol	≤10	11-15	≥16	1,25/23,75	0	0	81 (100%)	0 /0/ 29	0 /0/ 29	0 /0/ 6	0 /0/ 7	0 /0/ 10
Ciprofloksacin	≤15	16-20	≥21	5	2 (2,5%)	3 (3,7%)	76 (93,8%)	1 /0/ 28	0 /3/ 26	0 /0/ 6	0 /0/ 7	1 /0/ 9
Kloramfenikol	≤12	13-17	≥18	30	7 (8,6%)	33 (40,7%)	41 (50,6%)	5 /13/ 11	0 /14/ 15	1 /2/ 3	0 /2/ 5	1 /2/ 7
Kolistin	≤10	-	≥11	50	81 (100%)	0	0	29 /0/ 0	29 /0/ 0	6 /0/ 0	7 /0/ 0	10 /0/ 0

*Korištene su zone inhibicije za *P. aeruginosa*, za *Acinetobacter spp* i enterobakterije, CLSI, 2018., EUCAST 2019.

4.2.5.2 Rezultati ispitivanja osjetljivosti na antibiotike E-testom

U tablici 13 prikazani su rezultati dobiveni E-testom. Svi izolati (100%) bili su osjetljivi na piperacilin/tazobaktam, ceftriakson i cefotaksim, 96,3% bilo je osjetljivo na ciprofloksacin, a tri (3,7%) bila su intermedijarno osjetljiva na ciprofloksacin. Na imipenem je bilo osjetljivo 71,6% i intermedijarno osjetljivo 28,4%. Na ceftazidim je bilo osjetljivo 67,9% izolata i na cefepim 66,7%. E-testom je dobivena visoka stopa rezistencije na meropenem (95,1%), i aminoglikozide, od 85,2% kod gentamicina i amikacina preko 86,4% za tobramicin do 87,7% na netilmicin. U istoj tablici su prikazani i rezultati dobiveni disk difuzijom za iste antibiotike radi usporedbe rezultata tih dvije metode. Usporedbom DD i E-testa uočava se dobra podudarnost rezultata, značajno se razlikuju samo rezultati za meropenem i ceftazidima

Tablica 13. Profil rezistencije izolata *R. pickettii* dobivenih E-testom, usporedba s rezultatima disk difuzije

Antibiotik	Metoda	<i>Ralstonia pickettii</i> (n=81)			Broj rezistentnih/intermed/osjetljivih izolata*				
		R	I	S	područje I			područje II	
		No (%)	No (%)	No (%)	HL (n=29)	Pm (n=29)	Pp (n=6)	GL (n=7)	K (n=10)
Piperacilin-tazobaktam	DD	2 (2,5%)	0	79 (97,5%)	0 /0/ 29	0 /0/ 29	0 /0/ 6	0 /0/ 7	2 /0/ 8
	E-test	0	0	81 (100%)	0 /0/ 29	0 /0/ 29	0 /0/ 6	0 /0/ 7	0 /0/ 10
Imipenem	DD	0	0	81 (100%)	0 /0/ 29	0 /0/ 29	0 /0/ 6	0 /0/ 7	0 /0/ 10
	E-test	0	23 (28,4%)	58 (71,6%)	0 /15/ 14	0 /4/ 25	0 /1/ 5	0 /2/ 5	0 /1/ 9
Meropenem	DD	24 (29,6%)	33 (40,7%)	24 (29,6%)	1 /12/ 16	13 /12/ 4	6 /0/ 0	1 /3/ 3	3 /6/ 1
	E-test	77 (95,1%)	0	4 (4,9%)	29 /0/ 0	27 /0/ 2	6 /0/ 0	6 /0/ 1	9 /0/ 1
Ceftriakson	DD	0	1 (1,2%)	80 (98,8%)	0 /0/ 29	0 /0/ 29	0 /0/ 6	0 /0/ 7	0 /1/ 9
	E-test	0	0	81 (100%)	0 /0/ 29	0 /0/ 29	0 /0/ 6	0 /0/ 7	0 /0/ 10
Ceftazidim	DD	11 (13,6%)	4 (4,9%)	66 (81,5%)	0 /0/ 29	2 /1/ 26	0 /1/ 5	4 /0/ 3	5 /2/ 3
	E-test	6 (7,4%)	20 (24,7%)	55 (67,9%)	0 /2/ 27	2 /7/ 20	1 /0/ 5	1 /3/ 3	2 /8/ 0
Cefotaksim	DD	0	8 (9,9%)	73 (90,1%)	0 /1/ 28	0 /2/ 27	0 /1/ 5	0 /0/ 7	0 /4/ 6
	E-test	0	0	81 (100%)	0 /0/ 29	0 /0/ 29	0 /0/ 6	0 /0/ 7	0 /0/ 10
Cefepim	DD	0	1 (1,2%)	80 (98,8%)	0 /0/ 29	0 /0/ 29	0 /0/ 6	0 /0/ 7	0 /1/ 9
	E-test	1 (1,2%)	26 (32,1%)	54 (66,7%)	0 /3/ 26	0 /12/ 17	0 /3/ 3	1 /3/ 3	0 /5/ 5
Gentamicin	DD	70 (86,5%)	1 (1,2%)	10 (12,3%)	27 /1/ 1	29 /0/ 0	6 /0/ 0	7 /0/ 0	1 /0/ 9
	E-test	69 (85,2%)	1 (1,2%)	11 (13,6%)	27 /0/ 2	29 /0/ 0	6 /0/ 0	7 /0/ 0	0 /1/ 9
Amikacin	DD	71 (87,7%)	0	10 (12,3%)	27 /0/ 2	29 /0/ 0	6 /0/ 0	7 /0/ 0	2 /0/ 8
	E-test	69 (85,2%)	1 (1,2%)	11 (13,6%)	27 /0/ 2	29 /0/ 0	6 /0/ 0	7 /0/ 0	0 /1/ 9
Tobramicin	DD	71 (87,7%)	1 (1,2%)	9 (11,1%)	27 /0/ 2	29 /0/ 0	6 /0/ 0	7 /0/ 0	2 /1/ 7
	E-test	70 (86,4%)	0	11 (13,6%)	27 /0/ 2	29 /0/ 0	6 /0/ 0	7 /0/ 0	1 /0/ 9
Netilmicin	DD	72 (88,9%)	0	9 (11,1%)	28 /0/ 1	29 /0/ 0	6 /0/ 0	7 /0/ 0	2 /0/ 8
	E-test	71 (87,7%)	0	10 (12,3%)	29 /0/ 0	29 /0/ 0	6 /0/ 0	7 /0/ 0	0 /0/ 10
Ciprofloksacin	DD	2 (2,5%)	3 (3,7%)	76 (93,8%)	1 /0/ 28	0 /3/ 26	0 /0/ 6	0 /0/ 7	1 /0/ 9
	E-test	0	3 (3,7%)	78 (96,3%)	0 /0/ 29	0 /2/ 27	0 /0/ 6	0 /0/ 7	0 /1/ 9

*Korištena je granična vrijednost rezistencije/zone inhibicije za *P. aeruginosa* (tablica 2B-1) osim za ceftriakson i cefotaksim gdje je korištena vrijednost za *Acinetobacter spp* (tablica 2B-2), CLSI, 2018.

Rezistencija na meropenem dobivena u metodi E-testom (95,1%) značajno je viša od one dobivene metodom disk difuzije (29,6%). Kod ceftazidima je u DD dobiveno više osjetljivih izolata (81,5%), samo 4,9% intermedijarno osjetljivih i 13,6% rezistentnih za razliku E-testa gdje bilo 67,9% osjetljivih, znatno više (24,7%) intermedijarno osjetljivih i 7,4% rezistentnih. Takve varijacije u rezultatima dobivenim kod testiranja osjetljivosti ovim dvjema metodama opisali su i drugi autori (61).

Dobivena je gotovo je uniformna rezistencija za sva četiri ispitivana aminoglikozidna antibiotika. Najučestaliji fenotip aminoglikozidne rezistencije bio je T-G-A-N (tonbramicin, gentamicin, amikacin, netilmicin) i iskazalo ga je 85,2% izolata (69/81). Svi su bili s područja I, iz različitih izvora i niti jedan s područja II. Dva izolata područje I, HL28 i HL30, bili su osjetljivi na tobramicin, amikacin i gentamicin i rezistentni samo na netilmicin (fenotip N). Izolati s područja II, s druge strane, pokazali su obrnute rezultata, osam izolata (9,9%) je bilo osjetljivo na sva četiri aminoglikozidna antibiotika (K82-1, K82-2, K84, K97, K98, K99, K100, K101) jedan je bio osjetljiv na tobramicin i netilmicin i intermedijarno osjetljiv na gentamicin i amikacin (K85), a jedan (K102) bio je rezistentan samo na tobramicin, a osjetljiv na ostala tri aminoglikozida (Tablica 14).

Distribucija izolata prema zonama inhibicije u mm (DD) i prema vrijednostima MIK-ova u μg (E-test) prikazana je na slici 28 i slici 29 ako je uočiti u kojem području se grupiraju izolati za svaki pojedini antibiotik/grupu antibiotika s obzirom na rezistenciju, odnosno osjetljivost. Na slici 28 su uz distribuciju izolata prema zonama inhibicije prikazane i vrijednosti zona inhibicije u mm za rezistentne (R) izolate, intermedijarno osjetljive (I) i osjetljive (S) izolate uz prikazanu vrijednost sadržaja aktivne tvari antibiotika u mikrogramima. Na slici 29 su prikazane granične vrijednosti MIK-a za svaki antibiotik, zatim raspon vrijednosti MIK-a unutar kojega su se nalazili svi izolati. Prikazane su vrijednost minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika unutar koje je bilo inhibirano 50% testiranih izolata (MIK_{50}) i vrijednost minimalne inhibitorne koncentracija antibiotika unutar koje je bilo inhibirano 90% ispitivanih izolata (MIK_{90}) (61).

Tablica 14. Rezultati Hodge testa, fenotip aminoglikozidne rezistencije, prisustvo *bla*_{OXA22} i *bla*_{OXA60} gena kod *R. pickettii*

Područje	Izolat	Mod. Hodge	T-G-A-N fenotip	<i>bla</i> _{OXA22}	<i>bla</i> _{OXA60}	Područje	Izolat	Mod. Hodge	T-G-A-N fenotip	<i>bla</i> _{OXA22}	<i>bla</i> _{OXA60}
I	Pm8	+	R-R-R-R	-	-	I	Pm90	++	R-R-R-R	-	+
I	GL13	-	R-R-R-R	-	+	I	Pm91	++	R-R-R-R	-	+
I	GL14	-	R-R-R-R	-	+	I	Pm92	++	R-R-R-R	-	+
I	HL15	+	R-R-R-R	+	+	I	HL93	++	R-R-R-R	+	+
I	HL16	++	R-R-R-R	+	+	I	Pp94	++	R-R-R-R	-	+
I	HL17	++	R-R-R-R	+	+	I	Pm95	++	R-R-R-R	-	-
I	HL18	++	R-R-R-R	+	+	I	Pm96	++	R-R-R-R	-	-
I	HL19	++	R-R-R-R	+	+	II	K97	++	S-S-S-S	-	-
I	Pm20	++	R-R-R-R	+	+	II	K98	++	S-S-S-S	-	-
I	HL21	+	R-R-R-R	+	+	II	K99	+	S-S-S-S	-	-
I	HL22	++	R-R-R-R	+	+	II	K100	+	S-S-S-S	-	+
I	HL23	+	R-R-R-R	+	+	II	K101	-	S-S-S-S	-	-
I	HL24	+	R-R-R-R	+	+	II	K102	++	R-S-S-S	-	+
I	HL25	+	R-R-R-R	+	+	I	GL103	++	R-R-R-R	-	+
I	HL26	+	R-R-R-R	+	+	I	Pm104	-	R-R-R-R	-	+
I	HL27	-	R-R-R-R	+	+	I	Pm373	+	R-R-R-R	-	+
I	HL28	+	S-S-S-R	-	-	I	Pm374	+	R-R-R-R	-	-
I	HL29	-	R-R-R-R	+	+	I	Pm375	+	R-R-R-R	+	+
I	HL30	++	S-S-S-R	-	-	I	Pm376	+	R-R-R-R	-	-
I	HL31	++	R-R-R-R	+	+	I	Pp377	++	R-R-R-R	-	+
I	HL32	++	R-R-R-R	+	+	I	Pp378	++	R-R-R-R	-	+
I	HL33	-	R-R-R-R	+	+	I	Pm379	++	R-R-R-R	+	+
I	HL34	-	R-R-R-R	+	+	I	Pm381	++	R-R-R-R	-	+
I	HL35	++	R-R-R-R	+	+	I	Pm382	++	R-R-R-R	-	+
I	HL36	++	R-R-R-R	+	+	I	Pm383	++	R-R-R-R	-	+
I	GL54	+	R-R-R-R	-	+	I	Pm384	++	R-R-R-R	-	+
I	GL55	+	R-R-R-R	-	+	I	Pm385	++	R-R-R-R	-	+
I	GL56	-	R-R-R-R	-	+	I	Pm386	++	R-R-R-R	-	+
I	Pm68	-	R-R-R-R	-	+	I	Pm387	++	R-R-R-R	-	-
I	GL77	++	R-R-R-R	-	+	I	Pm388	++	R-R-R-R	-	+
I	Pp78	++	R-R-R-R	-	+	I	Pm389	+	R-R-R-R	-	+
I	Pm79	++	R-R-R-R	-	+	I	Pm390	-	R-R-R-R	-	+
I	Pm80	++	R-R-R-R	-	+	I	Pp391	-	R-R-R-R	-	+
I	Pm81	++	R-R-R-R	-	+	I	HL392	-	R-R-R-R	+	+
II	K82-1	-	S-S-S-S	-	-	I	HL393	-	R-R-R-R	+	+
II	K82-2	-	S-S-S-S	-	-	I	HL394	-	R-R-R-R	+	+
I	Pp83	++	R-R-R-R	-	+	I	HL395	++	R-R-R-R	+	+
II	K84	-	S-S-S-S	-	-	I	HL398	++	R-R-R-R	+	+
II	K85	+	S-I-I-S	-	-	I	HL399	-	R-R-R-R	+	+
I	Pm88	++	R-R-R-R	-	+	I	HL100	-	R-R-R-R	+	+
I	Pm89	++	R-R-R-R	-	+						

Hodge pozitivni (++) , slabo pozitivni (+) i negativni (-) izolati

Tablica 15. Rezultati Hodge i CIM testa

Izolat	HL16	HL17	HL21	HL28	Pm81	Pp94	Pm373	Pm391	HL392
Hodge test	++	++	+	+	++	++	+	-	-
CIM test	+	+	+	+	+	+	+	+	+

CIM test - test inhibicije karbapenema test.

4.2.5.5 Rezultat testa kombiniranih diskova za detekciju metalo- β -laktamaza

U testu kombiniranih diskova gdje je zona inhibicije oko istih diskova morala biti ≥ 7 mm oko diska s EDTA kako bi se rezultat smatrao pozitivnim dobivena je zona inhibicije veća od 7 mm kod četiri ista izolata za oba karbapenema (GL14, Pp78, HL395, HL399). Gotovo svi izolati (79/81) dali su pozitivan rezultat u kombinaciji MEM i MEM+EDTA, dok je većina izolata bila negativna u kombinaciji IMP i IMP+EDTA, kao što je prikazano u tablici 16.

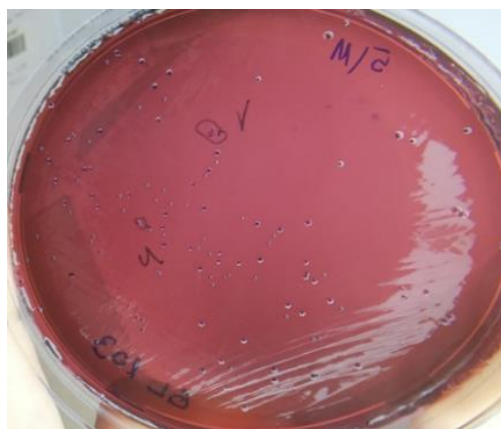
Tablica 16. Rezultati testa kombiniranih diskova s EDTA za detekciju MBL-a

Rezultat	CDT IMI+EDTA	CDT MEM+EDTA
Pozitivni	4	79
Negativni	77	2

CDT - kombinirani disk test.

4.2.5.6 Analiza višestruke aminoglikozidne rezistencije na SAGA ploči

Metodom kultivacije na superaminoglikozidnoj ploči, eozin-metilen plavi agar s dodatkom antibiotika amikacina i gentamicina, mogu se otkriti i potvrditi izolati rezistentni na aminoglikozidne antibiotike što je potvrđeno i u ovom radu. Izolati fenotipa T-G-A-N (69/81) i dva izolata fenotipa N rasli su na SAGA ploči, a izolati osjetljivi na sve testirane aminoglikozide (9/81) i izolat rezistentan na tobramicin (fenotip T) nisu porasli (Slika 31).



Slika 31. Porast *R. pickettii* HL27 na SAGA ploči.

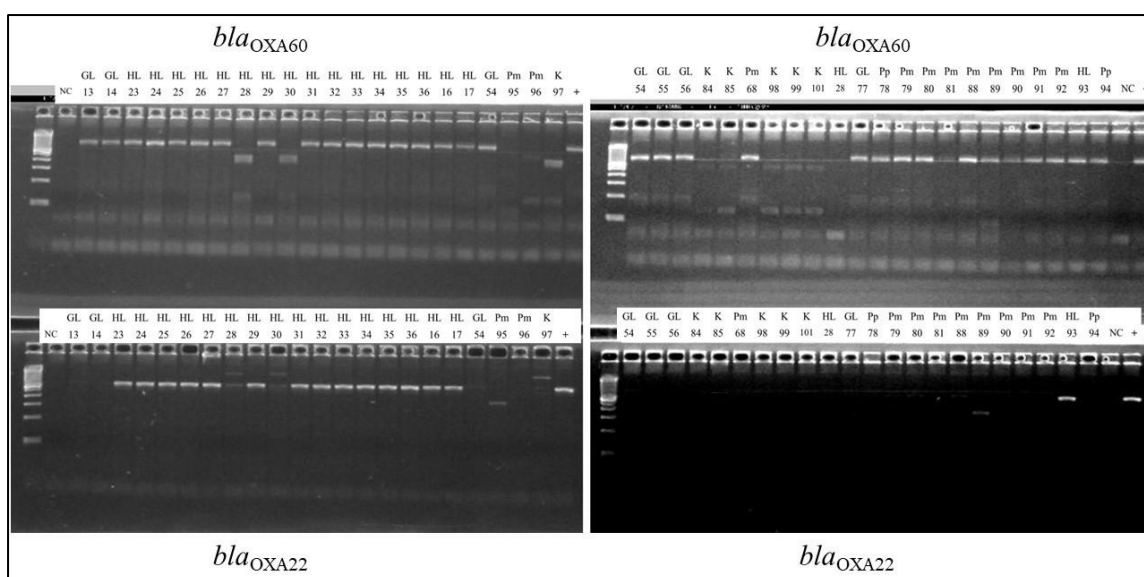
4.2.5.7 Rezultati testa konjugacije

Prijenos rezistencije na meropenem i gentamicin testiran je metodom konjugacije u bujonu uz uporabu *E. coli* J53 rezistentne na natrijev azid kao recipijenta, a osjetljiva na gentamicin i meropenem. Sa 16 sojeva *R. pickettii* rezistentnih na meropenem (HL15, HL18, HL22, HL25, HL27, HL28, HL33, HL34, HL35, Pm20, K82-2, K98, G114, GL54, GL56, G1103) iz različitih područja i 15 izolata rezistentnih na gentamicin iz izvora Pm, Pp i HL (Pm384, Pm385, Pm386, Pm387, Pm388, Pm389, Pm390, Pp391, HL392, HL393, HL394, HL395, HL398, HL399, HL100) izveden je test konjugacije. Svi testirani transkonjuganti ostali su osjetljivi na meropenem i gentamicin, nije bilo porasta na kombiniranim pločama koje su sadržavale natrijev azid-meropenem te natrijev azid-gentamicin.

4.2.6 Detekcija gena rezistencije lančanom reakcijom polimeraze

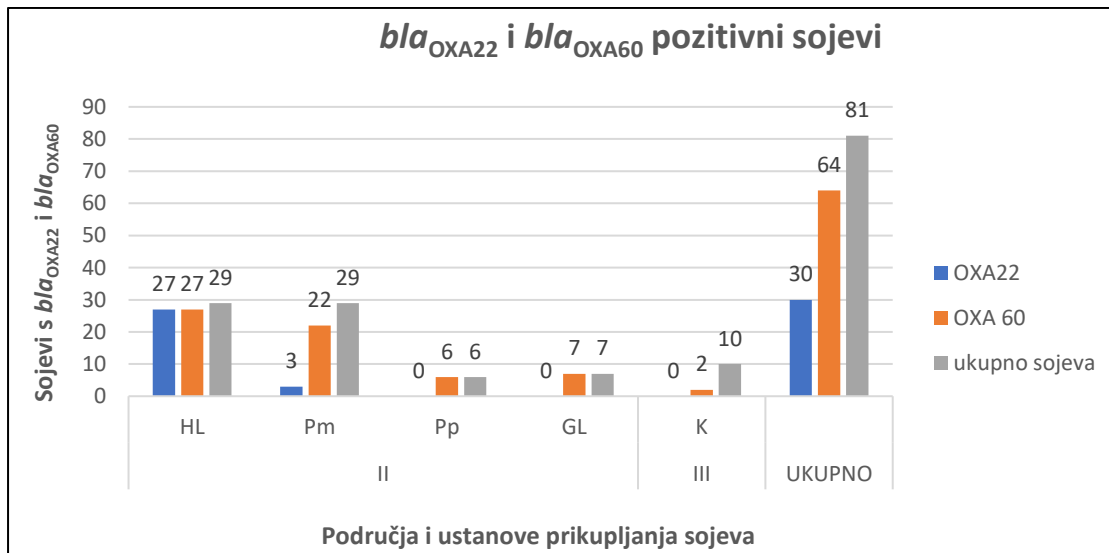
4.2.6.1 Detekcija *bla_{OXA22}* i *bla_{OXA60}*

Geni *bla_{OXA60}* i *bla_{OXA22}* umnoženi su u lančanoj reakciji polimeraze na kalupu genomske DNA izolata pomoću specifičnih početnica. Gen *bla_{OXA60}* otkriven je u 80,3% (65/81), a gen *bla_{OXA22}* u 37,0% (30/81) izolata. Svi izolati koji su bili pozitivni na *bla_{OXA22}* također su bili pozitivni na *bla_{OXA60}* (Slika 32). Gen *bla_{OXA22}* detektiran je u gotovo svih HL sojeva (27/29) i u tri izolata iz skupine Pm (3/29). Nije detektiran niti u jednom izolatu s mjesta uzorkovanja Pp, GL i K. Gen *bla_{OXA60}* detektiran je u svim izolatima u kojih je izoliran *bla_{OXA22}*



Slika 32. Prikaz dijela rezultata detekcije *bla_{OXA60}* (amplikon 763 pb) i *bla_{OXA22}* (amplikon 619 pb) metodom lančane reakcije polimeraze.

i još kod 35 drugih izolata; u svih šest Pp, svih sedam GL izolata, u 2/10 K izolata i u 10/29 Pm izolata (Tablica 14, Slika 33). Kod 16 izolata nije dokazan niti jedan gen, a bili su iz različitih područja i mjesta uzorkovanja. U HL izolatima dva nisu imala niti jedan gen (2/29), u Pm izolata njih šest (6/29) i osam u K izolata (8/10).



Slika 33. Prisustvo gena *bla*_{OXA22} i *bla*_{OXA60} u izolatima prema području u kojem su izolirani.

Tablica 17 prikazuje usporedbe antibiotske osjetljivosti izolata *R. pickettii* dobivene DD i E-testom s obzirom na odsustvo gena *bla*_{OXA22} i *bla*_{OXA60}, posjedovanje gena *bla*_{OXA22} i *bla*_{OXA60} i izolata koji su imali samo *bla*_{OXA60} gen. Zbog prisustva gena *bla*_{OXA22} i *bla*_{OXA60} bilo je za očekivati veću stopu izolata rezistentnih na β -laktamske antibiotike, ali rezultati su pokazali drugačiju sliku. Za statističku analizu korišten je χ -kvadrat test. Nije uočena statistički značajna razlika u osjetljivosti na β -laktamske antibiotike između izolata koji sadrže *bla*_{OXA22} i *bla*_{OXA60} gene. Međutim, postojala je statistički značajna razlika u osjetljivosti antibiotika na aminoglikozide između ovih skupina, budući da je izraženija rezistencija na te antibiotike uočena u prisutnosti *bla*_{OXA22} i *bla*_{OXA60}. Rezultati E-testa pokazali su da izolati bez gena *bla*_{OXA22} i *bla*_{OXA60} imaju nižu stopu rezistencije na aminoglikozide (37,5% za tobramicin, gentamicin i amikacin i 50% za netilmicin). Stopa rezistencije u izolatima pozitivnim samo na *bla*_{OXA60} bila je 97,14% za tobramicin i 94,29% za tri ostala aminoglikozida, dok je stopa rezistencije u *bla*_{OXA22}/*bla*_{OXA60} pozitivnim izolatima bila 100% za sve aminoglikozide ($p < 0,05$).

U tablici 18 su prikazani rezultati ispitivanja osjetljivosti na antibiotike testirane samo DD metodom za iste skupine izolata kao u tablici 17 (skupina izolata bez *bla*_{OXA22} i *bla*_{OXA60}, skupina izolata s ta dva gena i skupina izolata koji su imali samo *bla*_{OXA60} gen). Vidi se kako

rezistencija na ampicilin raste s 31,25% kod izolata bez *bla_{OXA22}* i *bla_{OXA60}* gena, preko 53,3% kod izolata s oba gena do 74,3% kod izolata koji imaju samo *bla_{OXA60}* gen.

Tablica 17. Rezultati i usporedbe osjetljivosti na antibiotike dobivene disk difuzijom i E-testom kod izolata *R. pickettii* s i bez *bla_{OXA22}* i *bla_{OXA60}* gena

Antibiotik	Metoda	<i>bla_{OXA22}</i> i <i>bla_{OXA60}</i> neg. (n=16)			<i>bla_{OXA22}</i> i <i>bla_{OXA60}</i> poz. (n=30)			<i>bla_{OXA60}</i> poz. (n=35)		
		R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)
Pipercilin /tazobaktam	DD	12,5	0	87,5	0	0	100	0	0	100
	E-test	0	0	100	0	0	100	0	0	100
Imipenem	DD	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	E-test	0	6,25	93,75	0	50	50	0	20	80
Meropenem	DD	18,75	56,25	25	6,66	43,33	50	54,28	31,42	14,28
	E-test	93,75	0	6,25	100	0	0	91,43	0	8,57
Ceftriakson	DD	0	6,25	93,75	0	0	100	0	0	100
	E-test	0	0	100	0	0	100	0	0	100
Ceftazidim	DD	25	18,75	56,25	3,33	0	96,66	17,14	2,86	80
	E-test	12,5	56,25	31,25	0	0	100	11,42	31,43	57,14
Cefotaksim	DD	0	25	75	0	0	100	0	11,43	88,57
	E-test	0	0	100	0	0	100	0	0	100
Cefepim	DD	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	E-test	0	43,75	56,25	0	16,66	83,33	2,86	40	57,14
Gentamicin	DD	37,5	6,25	56,25	100	0	0	97,14	0	2,86
	E-test	37,5	6,25	56,25	100	0	0	94,29	0	5,71
Amikacin	DD	43,75	0	56,25	100	0	0	97,14	0	2,86
	E-test	37,5	6,25	56,25	100	0	0	94,29	0	5,71
Tobramicin	DD	43,7	6,25	50	100	0	0	97,14	0	2,86
	E-test	37,5	0	62,5	100	0	0	97,14	0	2,86
Netilmicin	DD	50	0	50	100	0	0	97,14	0	2,86
	E-test	50	0	50	100	0	0	94,29	0	5,71
Ciprofloksacin	DD	0	12,5	87,5	0	0	100	0	8,57	91,43
	E-test	0	12,5	87,5	0	0	100	0	2,86	97,14

Zanimljivi su rezultati za amoksicilin/klavulanska kiselina gdje je visoka stopa rezistencije kod izolata bez ta dva gena (62,5%9), niža je kod izolata koji imaju *bla_{OXA22}* i *bla_{OXA60}* gene (46,7%), a značajno viša kod izolata koji imaju samo *bla_{OXA60}* gen (97,14%). Kod tikarcilin/klavulanske kiseline se dogodila slična situacija, od visoke stope rezistencije kod izolata bez ta dva gena (68,7%), niža rezistencija kod izolata s oba gena (30%) do još više rezistencije kod izolata s *bla_{OXA60}* genom (85,71%). I kod tikarcilina je najniža stopa rezistencije kod izolata koji su posjedovali oba gena, *bla_{OXA22}* i *bla_{OXA60}* (40%), ali gotovo identične stope rezistencije kod skupine izolata bez tih gena (75%) i skupine izolata s *bla_{OXA60}* genom (74,3%). Kod ertapenema je visoka stopa rezistencija u sve tri skupine izolata, ali raste

od 75% rezistentnih u skupine bez *bla*_{OXA22} i *bla*_{OXA60} gena, preko 86,7% rezistentnih u skupini s oba gena do 97,4% rezistentnih u skupini izolata s *bla*_{OXA60} genom.

Tablica 18. Rezultati testiranja osjetljivosti dobivene disk difuzijom kod izolata *R. pickettii* s i bez *bla*_{OXA22} i *bla*_{OXA60} gena

Antibiotik	Metoda	<i>bla</i> _{OXA22} i <i>bla</i> _{OXA60} neg. (n=16)			<i>bla</i> _{OXA22} i <i>bla</i> _{OXA60} poz. (n=30)			<i>bla</i> _{OXA60} poz. (n=35)		
		R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)
Ampicilin	DD	31,25	31,25	37,5	53,3	36,7	10	74,3	11,4	14,3
Amoksisilin/ klavulanska kis.	DD	62,5	25	12,5	46,7	40	13,3	97,14	2,86	0
Tikarcilin	DD	75	0	25	40	60	0	74,3	20	5,7
Tikarcilin/ klavulanska kis.	DD	68,75	12,5	18,75	30	70	0	85,71	5,71	8,57
Piperacillin	DD	12,5	6,25	81,25	0	10	90	0	8,57	91,43
Ertapenem	DD	75	12,5	12,5	86,7	13,3	0	97,14	2,86	0
Aztreonam	DD	93,75	6,25	0	93,33	6,67	0	100	0	0
Cefaleksin	DD	12,5	0	87,5	0	0	100	0	2,9	97,1
Cefoksitin	DD	12,5	0	87,5	0	0	100	0	0	100
Tigeciklin	DD	0	0	100	0	0	100	0	0	100
Tetraciklin	DD	0	0	100	0	0	100	0	0	100
Trimetoprim- sulfametoksazol	DD	0	0	100	0	0	100	0	0	100
Kloramfenikol	DD	6,25	37,5	56,25	13,3	46,7	40	5,7	37,14	57,14
Kolistin	DD	100	0	0	100	0	0	100	0	0

U sve tri skupine izolata bila je visoka stopa rezistencije na aztreonam, u skupini bez *bla*_{OXA22} i *bla*_{OXA60} gena 93,75% izolata je bilo rezistentno, u skupini s oba gena bilo je nešto malo manje rezistentnih (93,33%), a u skupini s *bla*_{OXA60} genom svi izolati su rezistentni (100%). Na cefaleksin i cefoksitin je bilo rezistentno samo 12,5% izolata u skupini bez *bla*_{OXA22} i *bla*_{OXA60} gena. Prisustvo gena *bla*_{OXA22} i *bla*_{OXA60}, a jednako i odsustvo istih gena nije utjecalo na 100% osjetljivost izolata na tigeciklin, tetraciklin i trimetoprim-sulfametoksazol. Stopa rezistencije na kloramfenikol je bila niska, 6,25% kod izolata bez *bla*_{OXA22} i *bla*_{OXA60} gena pa 13,3% kod izolata s oba gena i najniža (5,7%) kod izolata s *bla*_{OXA60} genom.

4.2.6.2 Detekcija gena za metalo-β-laktamaze

Za ispitivanje prisustva gena za metalo-β-laktamaze (MBL) i karbapenem hidrolizirajuće β-laktamaze kod *R. pickettii* izabrano je 27 izolata iz različitih područja i s različitim rezultatima modificiranog Hodge testa i CDT-a. Od izabranih izolata 18 je bilo pozitivnih (++), 7 slabo pozitivnih (+) i dva izolata su bila negativna (-) u Hodge testu. U testu

kombiniranih diskova s MEM+EDTA samo jedan soj (Pm68) bio je negativan, ostali su bili pozitivni dok je u kombinaciji diskova IMP+EDTA njih 25 bilo negativno i samo dva pozitivna. Metodom lančane reakcije polimeraze dobiveni su negativni rezultati na prisustvo gena koji kodiraju najčešće metalo- β -laktamaze (MBL) i karbapenem hidrolizirajuće β -laktamaze kod nefermentativnih bakterija (*bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}* i *bla_{OXA48}*) (Tablica 19).

Tablica 19. Rezultati detekcije gena koji kodiraju karbapenemaze (*bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}* i *bla_{OXA48}*) u odnosu na rezultate fenotipskih testova Mod. Hodge, IMI+EDTA i MEM+EDTA

Izolot	Mod. Hodge	IMI+EDTA	MEM+EDTA	<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{IMP}</i> ,	<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{OXA48}</i>
HL16	++	-	+	-	-	-	-
HL17	++	-	+	-	-	-	-
HL18	++	-	+	-	-	-	-
HL19	++	-	+	-	-	-	-
Pm20	++	-	+	-	-	-	-
HL21	+	-	+	-	-	-	-
HL22	++	-	+	-	-	-	-
HL30	++	-	+	-	-	-	-
HL31	++	-	+	-	-	-	-
HL32	++	-	+	-	-	-	-
GL54	+	-	+	-	-	-	-
GL55	+	-	+	-	-	-	-
Pm68	-	-	-	-	-	-	-
Pp78	++	+	+	-	-	-	-
Pm79	++	-	+	-	-	-	-
Pm80	++	-	+	-	-	-	-
Pp83	++	-	+	-	-	-	-
K85	+	-	+	-	-	-	-
K99	+	-	+	-	-	-	-
K100	+	-	+	-	-	-	-
K102	++	-	+	-	-	-	-
GL103	++	-	+	-	-	-	-
Pm104	-	-	+	-	-	-	-
Pm376	+	-	+	-	-	-	-
Pp377	++	-	+	-	-	-	-
Pm386	++	-	+	-	-	-	-
HL395	++	+	+	-	-	-	-

Mod Hodge = modificirani Hodge test; - / + / ++ = negativan / slabo pozitivan / pozitivan rezultat
 IMI+EDTA, MEM+EDTA = test kombiniranih diskova
 (IMI-imipenem, MEM-neropenem, EDTA-etilendiamin tetraoctena kiselina).

4.2.6.3 Detekcija gena rezistencije na aminoglikozide

Prisustvo gena koji kodiraju aminoglikozid-modificirajuće enzime *aac(3')-II*, *aac(6')-I*, *ant(2'')*, *aph(3')-I*, a najčešće se detektiraju kod *Pseudomonas aeruginosa*, ispitano je kod 29 izolata *R. pickettii*. Ispitana je i prisutnost gena za ribosomske metil-transferaze koje modificiraju vezno mjesto antibiotika (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtD*). Izabrani su izolati s različitim područja i s različitim fenotipom rezistencije i različitim vrijednostima MIK-ova za

aminoglikozide. Od tih izolata, njih 15 imalo je MIK amikacina veći od 128, a 17 izolata je imalo MIK tobramicina, gentamicina i netilmicina veći od 128. Sedamnaest izolata bilo je rezistentno na sva 4 aminoglikozidna antibiotika, fenotip rezistencije T-G-A-N i MIK-ovi su bili u rasponu 64 - >256. S druge strane 8 izolata bilo je osjetljivo na sva četiri ispitivana antibiotika s MIK-ovima 1-32, a izolat K85 je bio osjetljiv na tobramicin i netilmicin, a intermedijarno je bio osjetljiv na gentamicin i amikacin s MIK-ovima 2-32 µg/ml. Izolati HL28 i HL30 bili su rezistentni na netilmicin s MIK-om >256, a osjetljivi na tobramicin, gentamicin i amikacin. Izolat K102 s malim MIK-om od 48 bio je rezistentan na tobramicin, a osjetljiv na ostala tri aminoglikozidna antibiotika. Niti kod jednog ispitivanog izolata nisu otkriveni traženi geni (Tablica 20).

Tablica 20. Rezultat ispitivanja prisustva gena za aminoglikozid-modificirajuće enzime i gena za 16 S rRNA metil-transferaze s obzirom na rezultate Hodge test i fenotipa aminoglikozidne rezistencije

Izolat	MIK tob	MIK gen	MIK amik	MIK net	fenotip rezist. na aminoglikoz.	SAGA porast	Aminoglikozid-modificirajući enzimi				16 S rRNA metil-transferaze			
							<i>aac</i> (3')-II	<i>aac</i> (6')-I	<i>ant</i> (2'')	<i>aph</i> (3')-I	<i>armA</i>	<i>rmtA</i>	<i>rmtB</i>	<i>rmtD</i>
Pm8	>256	>256	64	64	T G A N	da	-	-	-	-	-	-	-	-
GL13	>256	>256	256	>256	T G A N	da	-	-	-	-	-	-	-	-
GL14	>256	>256	64	64	T G A N	da	-	-	-	-	-	-	-	-
HL16	>256	>256	256	256	T G A N	da	-	-	-	-	-	-	-	-
HL17	>256	>256	256	256	T G A N	da	-	-	-	-	-	-	-	-
Pm20	>256	>256	>256	>256	T G A N	da	-	-	-	-	-	-	-	-
HL28	3	1	8	>256	N	NE	-	-	-	-	-	-	-	-
HL30	2	2	8	>256	N	NE	-	-	-	-	-	-	-	-
HL34	>256	>256	>256	>256	T G A N	da	-	-	-	-	-	-	-	-
Pm68	>256	>128	>128	>128	T G A N	da	-	-	-	-	-	-	-	-
GL77	>128	>128	>128	>128	T G A N	da	-	-	-	-	-	-	-	-
Pp78	>128	>128	>128	>128	T G A N	da	-	-	-	-	-	-	-	-
K82-1	3	4	8	2	-	NE	-	-	-	-	-	-	-	-
K82-2	4	4	8	1	-	NE	-	-	-	-	-	-	-	-
Pp83	>128	>128	>128	>128	T G A N	da	-	-	-	-	-	-	-	-
K84	3	4	8	2	-	NE	-	-	-	-	-	-	-	-
K85	3	8	32	2	-	NE	-	-	-	-	-	-	-	-
Pm88	>256	>128	>128	>128	T G A N	da	-	-	-	-	-	-	-	-
Pm92	>256	>128	>128	>128	T G A N	da	-	-	-	-	-	-	-	-
Pp94	>256	>128	>128	>128	T G A N	da	-	-	-	-	-	-	-	-
Pm95	>256	>128	>128	>128	T G A N	da	-	-	-	-	-	-	-	-
K97	3	2	8	1	-	NE	-	-	-	-	-	-	-	-
K98	4	4	8	2	-	NE	-	-	-	-	-	-	-	-
K99	3	4	4	1	-	NE	-	-	-	-	-	-	-	-
K100	1,5	4	8	1	-	NE	-	-	-	-	-	-	-	-
K101	1,5	2	4	1	-	NE	-	-	-	-	-	-	-	-
K102	48	4	4	1	T	da	-	-	-	-	-	-	-	-
GL103	>256	>128	>128	>128	T G A N	da	-	-	-	-	-	-	-	-
Pp391	>256	>128	>128	>128	T G A N	da	-	-	-	-	-	-	-	-

SAGA + = porast na superaminoglikozidnom agaru

TGAN = tobramicin, gentamicin, amikacin, netilmicin rezistencija.

5 RASPRAVA

U ovom radu su analizirani izolati bakterije *Ralstonia pickettii* koji su prikupljeni tijekom petogodišnjeg perioda iz uzoraka vode farmaceutskih industrijskih sustava za proizvodnju ultračiste i pročišćene vode i iz aparata za proizvodnju laboratorijske pročišćene vode tijekom redovitog nadzora tih sustava. Sustavi su redovito prani i provedena je sanitacija sredstvima koja ne ostavljaju rezidue i nisu štetna za ljudsko zdravlje. Ovisno o protokolima, primjenjivana je vruća para, peroctena kiselina, vodikov peroksid, a gdje je to moguće i ultravioletno svjetlo. Ta sredstva su vrlo učinkovita za planktonske stanice, a kombinacija vodikovog peroksida i peroctene kiseline trebala bi dati biološku redukciju od 6 log₁₀ ciklusa (140). Međutim, uočeno je da se bakterije, unatoč opisanom redovitom pranju i sanitaciji kompletnog sustava, nakon kratkog perioda bez porasta počinju ponovo pojavljivati u ispitivanim uzorcima vode. U početnim uzorcima mali broj, a svako sljedeće uzorkovanje sve veći i veći broj bakterija. Kako se *R. pickettii* gotovo redovito pojavljivala u uzorcima, odlučeno je i sakupljani su izolati iste bakterije i iz drugih farmaceutskih postrojenja s različitih područja Republike Hrvatske kako bi se usporedila svojstva i eventualne razlike s obzirom na područje od kuda voda potječe. Cilj istraživanja bio je ispitati fenotipska svojstva sakupljenih izolata, proizvodnju supstanci koje bi govorile u prilog invazivnosti i patogenosti, sposobnost proizvodnje biofilma i osjetljivost / rezistenciju na antibiotike za izolati s područja Republike Hrvatske. Također je istraženo utječe li vrsta vode, odnosno geografske značajke područja od kuda je ulazna voda, na svojstva ispitivane bakterije. Provedena je usporedba rezultata rezistencije na antibiotike dobivenih u ovom radu s objavljenim rezultatima drugih istraživača.

Tijekom pet godina sakupljani su bakterijski izolati koji su svojim fenotipskim svojstvima (izgled i boja kolonija, test oksidaze) ukazivali na moguću bakteriju *R. pickettii*. Farmaceutska postrojenja iz kojih su sakupljani uzorci ultračiste vode bila su smještena na tri različita geografska područja Republike Hrvatske, područje I je bilo grad Zagreb, područje II sjeverna Hrvatska ravničarski kraj i područje III sjeverno priobalno područje. Aparati za proizvodnju laboratorijske pročišćene vode nalazili su se na području I.

Metodom membranske filtracije, a prema europskoj farmakopeji, uzorci vode kultivirani su na hranjivim podlogama TSA i R₂A agaru. Sve tipične, sjajne, svijetlo smeđe, prljavo roze, prozirne kolonije koje su bile jasno vidljive nakon kultivacije od 24 sata na 37°C i koje su davale brzi pozitivan test oksidaze s pojavom plave boje na papirnoj trakici već unutar 1-2 sekunde i u Gram preparatu bili Gram-negativni štapići dalje su testirani na

biokemijska svojstva. Sakupljeno je bilo 103 izolata koji su komercijalnim biokemijskim testom API® 20NE Biomerieux identificirani kao *R. pickettii*.

Daljnja potvrda dobivenih izolata metodom masene spektrometrije MALDI-TOF identificirala je samo 81 izolat kao *R. pickettii*, 9 izolata su identificirani kao *R. insidiosa* (7 izolata iz područja III i 2 izolata s područja I), 4 kao *R. mannitolilytica* (područje I), a kod preostalih 9 sojeva od ulaznih 103 nije dobiven zadovoljavajući rezultat (bez vršnih vrijednosti ili nepouzdana identifikacija). Svi izolati identificirani masenom spektrometrijom kao *R. pickettii* potvrđeni su i umnažanjem fragmenata 16S rRNA metodom lančane reakcije polimeraze i svi su bili iz područja I i područja II, grad Zagreb i područje sjeverne ravničarske Hrvatske. Kako niti jedan izolat iz područja III nije bio potvrđen kao *R. pickettii* tako su svi isključeni iz studije.

Masena spektrometrija je već opisana kao sigurna metoda za identifikaciju Gram-negativnih mikroorganizama i jednako uspješno je diskriminirala soj *R. pickettii* od *R. insidiosa* i *R. mannitolilytica* (123,141–143), što je potvrđeno i kod ispitivanih izolata. Komercijalni sustav za biokemijsku identifikaciju API 20NE (BioMérieux, Francuska) u ovom radu nije dao pouzdanu identifikaciju, što je već je opisano (52). Ta nepouzdanost je bila dosta velika, od 103 izolata koje je API identificirao kao *R. pickettii*, samo njih 81 potvrđeni su metodama masene spektrometrije i PCR-om, koje su jednakovrijedne metode i preporučuju se u kliničkoj dijagnostici, posebno kod pacijenata s cističnom fibrozom kako bi se izbjegla pogrešna identifikacija vrsta roda *Ralstonia* i *Burkholderia cepacia* kompleksa (42). Svi potvrđeni izolati bili su uključeni u daljnja ispitivanja opisana u ovom radu.

Komercijalnim biokemijskim setom testova (API® 20 NE) dobiven je biokemijski profil za izolate *R. pickettii* koji su bili predmet istraživanja ovog rada. Pozitivne reakcije su dobivene kod redukcije nitrata u nitrite, asimilacije glukoze, arabinoze, kalijevog glukonata, kaprilne kiseline, malata (jabučne kiseline) i trinatrijevog citrata, a negativan rezultat dobiven je u reakciji fermentacije glukoze, ne proizvodi indol iz triptofana, nema arginin-dihidrolazu, ureazu, β-glukozidazu (ne hidroliza eskulin), želatinazu (proteazu), β-galaktozidaza, ne asimilira D-manozu, D-manitol, N-acetil-glukozami, D-maltozu, adipinsku kiselinu i fenil-octenu kiselinu. Dobiveni rezultat za ureazu je moguće lažno negativan jer neki sojevi *R. pickettii* proizvode taj enzim (88). Ureaza je enzim koji katalizira hidrolizu ureu u amonijak i karbon dioksid (karbamat) i doprinosi preživljavanju bakterija povećanjem pH okoliša, oštećuje epitelne stanice gastrointestinalnog i urinarnog trakta i kod određenih bakterija je čimbenik virulencije (144,145), ali kod *R. pickettii* nije navedena kao čimbenik virulencije. Ispitivani izolati nisu proizvodili enzime hemolizin i želelinazu koji su odgovorni za nekrotične

i hemoragične efekte. *R. pickettii* nema visok patogeni potencijal i nisu opisani značajni virulentni čimbenici (3). Uglavnom ne uzrokuje infekcije u zdravih osoba, ali je opisana infekcija rane poslije operacije štitnjače kod inače zdrave osobe (146). S druge strane, može igrati značajnu ulogu kod hospitaliziranih bolesnika, bilo kao uzročnik infekcije, bilo kao kolonizator kako bolesnika tako i bolničke sredine. Često je izolirana kod bolesnika s cističnom fibrozom, kod pacijenata na potpomognutoj respiraciji i kod dijaliziranih pacijenata što govori u prilog njenoj sposobnosti da kod bolesnika s oslabljenim imunskim sustavom izazove kolonizaciju i infekciju. S druge strane, ne tako rijetki slučajevi kontaminacije „sterilnih“ otopina i lijekova, kontaminacije sustava za dijalizu, kontaminacije sustava za potpomognutu respiraciju, zatim kolonizacija pacijenata s cističnom fibrozom govore u prilog njenoj sklonosti mjestima, živim i neživim, s vlažnim područjima. Sklona je preživljavanju u biofilmu, a jedna od pretpostavki razvoju biofilma je sposobnost proizvodnje izvanstanične supstance što je u ovom radu ispitano i dokazano kod svih izolata *R. pickettii*. Proizvodnja IPS-a je dokazana u tekućem mediju i na perlitu, prirodnom materijalu, a nije dokazana na aluminijskoj foliji. Proizvodnja IPS-a doprinosi njenom opstanku i razmnožavanju u nepovoljnim uvjetima i sposobnosti preživljavanja u području s niskom koncentracijom nutrijenata, a tako i unutar biofilma što omogućava kolonizaciju i zadržavanje unutar bolničkog okoliša i samih pacijenata.

R. pickettii je prvi put prepoznata kao uzrok infekcije daleke 1968. godine, tijekom vremena su opisivane sporadične infekcije, ali tada još uvijek nije nosila to ime. Godine 1995. osnovan je rod *Ralstonia* kako bi se udomile / klasificirale vrste poznate kao *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas pickettii* (1). U taj rod su uvrštene mnoge vrste, a među i njima *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia mannitolilytica* i *Ralstonia insidiosa* koje su bile i najčešći izolati u prikazanom istraživanju, a međusobno su i najbliži. *Ralstonia pickettii* je prvotno nosila ime *Pseudomonas pickettii*, nakon toga *Burkholderia pickettii*, a *Ralstonia mannitolilytica* je bila poznata kao *R. pickettii* biovar 3/'thomasi' (147). Naziv *Ralstonia insidiosa* sp. nov. predložen je za izolate slične *Ralstonia pickettii* na temelju analize sekvence 16S rDNA, hibridizacije DNA-DNA, analize proteina cijele stanice, biokemijske karakterizacije i analiza temeljenih na PCR-u (148).

Za proizvodnju biofilma je, uz proizvodnju IPS-a, potrebna i pokretljivost bakterije i to pokretljivost tipa trzanja (engl. *twitching*). Pokretljivost je važan čimbenik, kako za proizvodnju biofilma i širenje u okoliš u neživim ekosustavima u prisustvu vode, tako i u živim sustavima, posebno kod bolesnika u bolničkim sredinama. *R. pickettii* je pokretna zahvaljujući perifernom, polarnom biču koji je pokretač plivanja u tekućini (149). S obzirom na vrstu pokretljivosti koja je ispitivana u ovom radu korištene su hranjive podloge s odgovarajućim

koncentracijama agara. Kod svih ispitivanih izolata (81) dokazana je pokretljivost tipa trzanja na čvrstoj podlozi s 1% agara. Pokretljivost tipa plivanja na polučvrstim podlogama s 0,3% agara dokazana je, također, za sve ispitivane izolate i u epruveti i u Petrijevoj zdjelici uz praćenje postignute udaljenosti u mm u epruveti prvi i treći dan, a u Petrijevoj zdjelici nakon inkubacije od 2 sata potom nakon 24 sata, 72 i 96 sati. Dobivena je statistički značajna razlika u vrijednosti postignute udaljenosti plivanjem u epruveti prvi i treći dan ($p < 0,05$), jednako za razliku udaljenosti plivanjem u agaru u Petrijevoj zdjelici 2 sata i 24 sata nakon nasijavanja, kao i između 24 sata i 72 sat nakon nasijavanja. S duljim vremenom inkubacije dobivala se veća udaljenost od mjesta inokulacije.

Ovaj rad je i započet zbog pretpostavke da gotovo stalno pojavljivanje *R. pickettii* u uzorcima vode u kontroliranim industrijskim postrojenjima znači i postojanje biofilma u tim sustavima. U ovom radu je dokazana proizvodnja IPS-a i pokretljivost *R. pickettii*, kako pokretljivost trzanja tako i plivanja. S obzirom da su to svojstva potrebna za proizvodnju biofilma, očekivano je bilo i svojstvo proizvodnje biofilma kod svih izolata. Međutim, proizvodnja biofilma nije dokazana kod svih izolata. U ovom radu je dokazana proizvodnja biofilma kod 37% (30/81) izolata *R. pickettii*. Među proizvođačima biofilma su izolati iz svih područja i izolati s različitim fenotipom aminoglikozidne rezistencije. Uočeno je da produljenjem inkubacije izolati mijenjaju status od neproizvođača u slabe proizvođače, a neki iz slabih u umjerene proizvođače biofilma. Nije uočeno da pokretljivost plivanja u epruveti i u Petrijevoj zdjelici ima utjecaja na proizvodnju biofilma. Kao primjer, izolati HL27 i HL30 su pokazali vrlo diskretnu pokretljivost u epruveti nakon 24 sata koja se nije povećala niti nakon 48 sati, ali su pokazali značajno veću pokretljivost u agaru u Petrijevoj ploči. Niti jedan nije proizvodio biofilm nakon 24 sata. Nakon 48 sati biofilm je proizveo samo izolat HL30 i stekao status slabog proizvođača biofilma. Izolat HL27, prema zadanom izračunu, nije proizvodio biofilm iako se na stijenkama bunarića jasno uočavao trag boje koji je ukazivao na začetke stvaranja biofilma. Sljedeći primjer, kod izolata HL32 i K100 pokretljivost u epruveti bila je bolja nakon 48 sati, a pokretljivost u Petrijevoj ploči nešto lošija nego u prva dva izolata i niti jedan nije proizvodio biofilm. S druge strane, izolat GL103 sa slabom pokretljivošću u epruveti, s pozitivnom pokretljivošću u Petrijevoj zdjelici, ali ne tako dobrom kao kod prva dva izolata, stvarao je biofilm već nakon 24 sata, jednako kao i izolati Pp378 i 379. Nije dobivena statistički značajna razlika u pokretljivosti u epruveti između sojeva koji ne proizvode biofilm i koji su proizvođači biofilma, neovisno o duljini inkubacije ($p_{\text{prvi dan}} = 0,062$, $p_{\text{treći dan}} = 0,052$). Statistički značajna razlika nije zabilježena niti kod plivanja nakon 2 sata ($p=0,178$), međutim značajnije

veći radijusi plivanja zabilježeni su kod sojeva koji nisu proizveli biofilm u prvih 24 sata nego nakon 96 sati inkubacije ($p=0,013$).

U jednoj studiji je uočeno da sojevi rezistentni na aminoglikozidne antibiotike povećavaju sposobnost stvaranja biofilma za 2-4 puta kod nižih MIK-ova za aminoglikozide i 5-11 puta za najviše ispitane aminoglikozidne MIK-ove u usporedbi sa sojevima osjetljivim na aminoglikozide (150). Pretpostavka je bila da bi se sposobnost stvaranja biofilma mogla povezati s proizvodnjom polisaharidne kapsule koja olakšava prijanjanje na površine i stvaranje biofilma. Stoga se pretpostavilo da bi povećana sposobnost stvaranja biofilma mogla biti posljedica vidljive prekomjerne proizvodnje polisaharidne kapsule u prisutnosti subinhibitorne koncentracije gentamicina. Hipoteza u toj studiji nije dokazana jer metoda korištena za promatranje stvaranja kapsule nije bila dovoljno osjetljiva (150).

Odmah na početku ovog istraživanja uočena je visoka rezistencija na aminoglikozidne antibiotike koja je potvrđena i MIK-om. S obzirom na objavljeno da izolati rezistentni na aminoglikozide bolje proizvode biofilm (150), u ovom radu je istražena proizvodnja biofilma kod svih ispitivanih izolata *R. pickettii* u odnosu na profil rezistencije na četiri aminoglikozidna antibiotika (tobramicin, gentamicin, amikacin i netilmicin). Od svih izolata koji su bili rezistentni na sva četiri testirana aminoglikozidna antibiotika (69/71) njih 23 su proizveli biofilm, a 46 nisu proizveli biofilm. S druge strane, u skupini izolata osjetljivih na aminoglikozide (9) bilo je 5 proizvođača i 4 neproizvođača biofilma. Nije bilo statistički značajne povezanost između rezistencije na aminoglikozide i proizvodnje biofilma. Niti izolat K85 koji je bio smanjene osjetljivosti na gentamicin i amikacin nije proizvodio biofilm. Kod dva izolata rezistentna na netilmicin i osjetljiva na tri ostala aminoglikozidna antibiotika, jedan je (HL28) proizvodio biofilm, a drugi HL30 nije. Izolat K102 je bio rezistentan na tobramicin i osjetljiv na ostale aminoglikozide i proizvodio je biofilm. Dakle, svi ispitivani izolati su proizveli IPS, posjedovali su pokretljivost trzanja i bilo je za očekivati kako će oni svi u ispitivanju pokazati i svojstvo proizvodnje biofilma, ali se to u ovom radu nije dogodilo. Jedan dio izolata je proizveo biofilm, kod određenog broja izolata biofilm je proizveden nakon produljene inkubacije. Vidjelo se da pokretljivost plivanja i rezistencija na aminoglikozide ne utječe značajno na proizvodnju biofilma. Pretpostavka je da bi svi izolati u drugačijim uvjetima ili s produljenjem inkubacije počeli proizvoditi biofilm jer je uočeno da su i oni izolati koji po izračunu nisu proizvođači biofilma ipak ostavljaju trag boje na stjenkama bunarića i vrlo vjerojatno su to bili početci stvaranja biofilma.

U ovom radu je dokazano da *R. pickettii* s područja RH proizvodi lipopolisaharid (endotoksin) koji je termostabilan i oslobađa se uništavanjem bakterijske stanice visokom

temperaturom od 136°C. Jednako je dokazano prisustvo endotoksina kod izolata koji su proizveli biofilm kao i kod onih koji nisu te kod izolata s različitim fenotipom rezistencije na aminoglikozidne antibiotike. Zbog posjedovanja endotoksina *R. pickettii* ima sve predispozicije da iz jedne obične okolišne bakterije i oportunističkog patogena pređe u vrlo problematičan bolnički soj. U prilog tome govore i opisane teške infekcije s *R. pickettii* od kojih su neke bile i fatalne.

Dobiven je zanimljiv rezultat proizvodnje biofilma kod izolata koji su posjedovali gene *bla_{OXA22}* i *bla_{OXA60}* i izolata koji su posjedovali samo gen *bla_{OXA60}*. 30 izolata su posjedovali oba gena, samo dva od njih su proizvela biofilm, a 28 njih nisu. U skupini izolata sa samo *bla_{OXA60}* genom (35) bilo je 20 izolata proizvođača biofilma i 15 neproizvođača. Od 15 izolata koji nisu posjedovali niti *bla_{OXA22}* niti *bla_{OXA60}* gen njih 8 je proizvelo biofilm, a 7 izolata nije proizvelo. Postojala je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u proizvodnji biofilma kod izolata koji su imali samo *bla_{OXA60}* gen u odnosu na one izolate s oba gena, a s druge strane nije bilo statistički značajne razlike u stvaranju biofilma između onih izolata koji nisu posjedovali *bla_{OXA22}* i *bla_{OXA60}* i izolata koji su posjedovali *bla_{OXA60}* gen. Nameće se zaključak da je, možda, gen *bla_{OXA22}* blokirao proizvodnju biofilma kod izolata koji su ga posjedovali.

Tijekom ispitivanja osjetljivosti na antibiotike korištene su dvije metode, disk difuzija i E-test, a rezultati su interpretirani prema CLSI standardu za Gram-negativne nefermentirajuće bakterije i enterobakterije ovisno o ispitivanim antibioticima i EUCAST standard za kolistin za *Acinetobacter spp.* jer za testiranje osjetljivosti *R. pickettii* ne postoji standardizirani postupak. Tako je i u objavljenim, ali dosta rijetkim studijama osjetljivost *R. pickettii* testirana na različite antibiotike, počesto i na antibiotike koji se, u pravilu, ne primjenjuju za liječenje infekcija uzrokovanih Gram-negativnim nefermentirajućim bakterijama i smatralo se da su ti mehanizmi rezistencije uglavnom urođeni (107). Rezultati prikazani u ovom radu gotovo su potpuno u skladu s prethodno objavljenim rezultatima koji pokazuju visoke stope osjetljivosti na trimetoprim- sulfametoksazol, tetraciklin, ciprofloksacin, cefalosporine prve skupine (151), cefotaksim (61,152), piperacilin-tazobaktam i ceftriakson (153), donekle smanjenu osjetljivost na ceftazidim (153,154), te ujednačenu rezistenciju na aztreonam (32) i tikarcilin-klavulanat (44) i potpunu rezistenciju na kolistin (151). U ovom radu zabilježena je značajno viša stopa rezistencije na meropenem u usporedbi s već objavljenim rezultatima (95,1% naspram 13,2% - 50,0%) (61,153,154), a imipenem je pokazao značajno veću antimikrobnu aktivnost. Niti jedan izolat nije bio rezistentan na imipenem u usporedbi s meropenemom kod kojeg su zabilježene stope rezistencije od 29,6% u metodi DD do 95,1% u E-testu.

Teško je objasniti visoke stope osjetljivosti na imipenem dobivene u ovom radu s obzirom da je imipenem bolji supstrat za oksacilinaze u usporedbi s meropenemom. Smanjena osjetljivost na meropenem u ovom radu mogla bi biti posljedica prisutnosti kromosomskih oksacilinaza ili nekih drugih mehanizama poput nepropusnosti vanjske membrane ili efluksa (61).

Uočeno je djelomično neslaganje rezultata dobivenih E-testom i DD testom. Dobivena je statistički značajna razlika u rezultatima ta dva testa za ceftazidim, cefepim, imipenem i meropenem. Najveća nepodudarnost rezultata u ta dva testa dobivena je za antibiotik meropenem. Metodom E-testa dobivena je veća stopa rezistencije, 95,1% (77/81) u odnosu na stopu rezistentnih izolata dobivenih metodom DD gdje je samo 29,6% (24/81) izolata bilo rezistentno na meropenem. S druge strane, u E-testu niti jedan izolat nije bio intermedijarno osjetljiv na meropenem dok je metodom DD dobiveno 40,7% izolata sa smanjenom, intermedijarnom osjetljivošću. Svi ti smanjeno osjetljivi izolati dobiveni u DD metodi su kod E-testa prepoznati kao rezistentni. Značajno manji broj osjetljivih dobiven je u E-testu, 4,9% u odnosu na 29,6% u DD testu. Najveće neslaganje rezultata za meropenem bio je u skupini izolata s prisustvom oba gena, *bla_{OXA22}* i *bla_{OXA60}*. U toj skupini izolata u E-testu svi su bili rezistentni, a u DD testu samo 6,6% su bili rezistentni, a 43,3% smanjeno osjetljivi i 50% izolata su bili osjetljivi. Slična neslaganja između rezultata dobivenih ovim navedenim testovima opisana su i kod drugih autora (61,155,156). Velika podudarnost rezultata E-testa i DD testa dobivena je kod sva četiri aminoglikozidna antibiotika; po jedan rezistentan izolat više bio je u DD testu za gentamicin (70 rezistentnih izolata u DD, 69 u E-testu), tobramicin (71 u DD testu u odnosu 70 u E-test) i netilmicin (72 u DD u odnosu 71 u E-testu), a kod amikacina u DD testu su dobivena 72 rezistentna izolata i u E-testu 69 rezistentnih. Dosta visoka podudarnost rezultata dobivenih u DD metodi i E-testu uočena je za ceftriakson, piperacilin-tazobaktam i ciprofloksacin.

Ispitana je prisutnost gena za OXA β -laktamaze i obzirom na njihovo prisustvo ispitivani izolati su grupirani u grupu izolata bez *bla_{OXA22}* i *bla_{OXA60}* gena, grupu izolata koji su imali samo *bla_{OXA60}* gen i grupu izolata s oba gena. Nisu se posebno ispitivali izolati sa samo *bla_{OXA22}* genom jer su svi izolati koji su imali gen *bla_{OXA22}* imali i *bla_{OXA60}* gen. Beta-laktamaze klase D, također poznate kao oksacilinaze ili β -laktamaze tipa OXA mogu doprinijeti visokoj razini otpornosti na karbapeneme kod Gram-negativnih bacila. Prema podacima iz objavljenih studija izolati s potvrđenim genom *bla_{OXA22}* trebali bi biti rezistentniji ili smanjene osjetljivosti na aminopeniciline, cefalosporine uskog spektra i aztreonam.

U ovom radu je dobiveno da su u grupi 30 izolata koji su imali oba gena i *bla*_{OXA22} i *bla*_{OXA60}, njih 53,3% bili su rezistentni na ampicilin, 36,7% su bili smanjeno, intermedijarno, osjetljivi, a 10% izolata je bilo osjetljivo na ampicilin. Iznenađujuće je da je kod izolata koji su posjedovali samo *bla*_{OXA60} gen bilo više rezistentnih na ampicilin (74,3%), intermedijarno osjetljivih bilo je 11,4% i nešto veći broj izolata, njih 14,3%, bilo je osjetljivo na ampicilin. Osjetljivost izolata na ampicilin kod kojih nisu otkriveni ovi geni bila je gotovo ravnomjerno raspoređena; osjetljivih je bilo nešto više od trećine (37,5%), rezistentnih i intermedijarno osjetljivih gotovo jednako (po 31,25%). S druge strane, zanimljiv je rezultat dobiven za amoksicilin s klavulanskom kiselinom u grupi ispitivanih izolata koji su posjedovali oba gena, dakle uz *bla*_{OXA60} i *bla*_{OXA22} gen, njih 30% bili su rezistentni, a ostalih 70% smanjene osjetljivosti, za razliku grupe izolata koji nisu posjedovali niti jedan gen za OXA β-laktamaze gdje je dobiven veći broj rezistentnih izolata (62,5%), a u grupi izolata koji su posjedovali samo *bla*_{OXA60} gen udio rezistentni je bio još veći 97,14% uz samo 2,86% intermedijarno osjetljivih. Slična slika rezistencije dobivena je i kod drugog antibiotika s klavulanskom kiselinom, tikarcilina. I kod tikarcilina s klavulanskom kiselinom najviše rezistentnih bilo u grupi izolata s *bla*_{OXA60} genom (njih 85,7%). Dobiveni rezultati za amoksicilin s klavulanskom kiselinom i tikarcilin s klavulanskom kiselinom djelomično koreliraju s objavljenim inhibicijskim studijama koje su mjerile 50% inhibitornu koncentraciju (IC₅₀) i pokazale su da je OXA-22 β-laktamaza bila parcijalno inhibirana klavulanskom kiselinom (62).

Nije dobivena potvrda smanjene osjetljivosti na uskospektralne cefalosporine, jer u skupini izolata s *bla*_{OXA22} genom i *bla*_{OXA60} niti jedan izolat nije pokazivao rezistenciju na cefaleksin, dok je u grupi bez tih gena bilo 12,5% rezistentnih (2/16) i u grupi sa samo *bla*_{OXA60} genom bio je 2,9% rezistentnih (1/35).

S druge strane, dobivena je visoka rezistencija na aztreonam. Rezistencija na aztreonam nije se gotovo uopće razlikovala između izolata bez *bla*_{OXA22} i *bla*_{OXA60} gena i onih sa oba, odnosno sa samo *bla*_{OXA60}. U skupini izolata bez tih gena 93,75% ih je bilo rezistentnih, a 6,2% intermedijarno osjetljivih, u skupini s oba gena bilo je 93,33% rezistentnih i 6,67% intermedijarno osjetljivih, a u skupini izolata sa samo *bla*_{OXA60} genom svi izolati (100%) su bili rezistentni na aztreonam. Visoka stopa rezistencije (91,3%) dobivena je i na ertapenem. Visoki udio rezistentnih na antibiotik ertapenem bio je u sve tri skupine izolata, a najveći broj rezistentnih bio je u skupini izolata s genom *bla*_{OXA60}. Gotovo identičan stupanj rezistencije dobiven je za antibiotik meropenem.

Kod izolat *R. pickettii* s genom *bla*_{OXA60} nije uočena značajnija rezistencija na imipenem u odnosu na druge dvije grupe. Metodom disk difuzije dobivena je 100% osjetljivost na

imipenem u sve tri grupe izolata, a rezultati dobiveni E-testom neznatno su se razlikovali po tim grupama. Tako su u grupi izolata bez *bla*_{OXA22} i *bla*_{OXA60} gena gotovo svi (93,75%) bili osjetljivi na imipenem, samo 6,25% izolata je bilo smanjeno, intermedijarno osjetljivo. U grupi izolata sa samo *bla*_{OXA60} genom bilo je 80% osjetljivih i 20% smanjeno osjetljivih, a u grupi s oba gena, pola izolata (50%) je bilo osjetljivo, a 50% intermedijarno osjetljivo. Kako OXA-60 β-laktamaza hidrolizira imipenem (63) bilo je za očekivati da izolati s genom *bla*_{OXA60} u ovoj studiji pokažu veću rezistenciju, odnosno smanjenu osjetljivost na imipenem. Dogodilo se da je u grupi izolata s oba gena, *bla*_{OXA22} i *bla*_{OXA60}, veći broj smanjeno osjetljivih nego u skupini sa samo *bla*_{OXA60} genom kao da je gen *bla*_{OXA22} pridonio smanjenju osjetljivosti na imipenem. Rezultati dobiveni u ovom radu nisu pokazali očekivanu ujednačenu visoku rezistenciju na β-laktamske antibiotike s obzirom na prisustvo gena za OXA tip β-laktamaze kod izolata, ali slični rezultati su i ranije opisani. Mogući razlog može biti nefunkcionalna β-laktamaza ili nekih drugi mehanizama (3).

Negativan rezultat dobiven je u fenotipskom testu za detekciju β-laktamaza širokoga spektra, a u prilog tom rezultatu govori i smanjena osjetljivost na kombinaciju antibiotika amoksisicilina i tikarcilina s klavulanskom kiselinom, koja bi trebala smanjiti / ukloniti djelovanje eventualno prisutnih ESBL-a.

Karbapenemi su parenteralni baktericidni lijekovi s izuzetno širokim spektrom djelovanja na različite skupine bakterija, jednako dobro i na Gram-negativne. U fenotipskim testovima za metalo-β-laktamaze, modificiranom Hodge testu i testu kombiniranih diskova (CDT) s meropenemom kao indikatorskim diskom, dobiven je visoki udio izolata s pozitivnim rezultatom. U CDT-u s imipenemom kao indikatorom dobiven je negativan rezultat za većinu izolata što je koreliralo s negativnim PCR rezultatima za prisustvo metalo-β-laktamaza u ispitivanim izolatima *R. pickettii*. Dobivena razlika između pozitivnih fenotipskih MBL rezultata i onih negativnih s imipenemom kao indikatorom i negativnih PCR rezultata za metalo-β-laktamaze može se objasniti već opisanim lažno pozitivnim fenotipskim MBL testiranjem kod *P. aeruginosa*, *A. baumannii* i nekih drugih nefermentativnih bakterija. Moguće objašnjenje je da u prisutnosti EDTA oksacilinaza prelazi u manje aktivno stanje, što rezultira povećanjem zone inhibicije i dobivanjem lažno pozitivnog rezultata (157–160). U Hrvatskoj se redovito prati rezistencija najvažnijih/najučestalijih patogenih kliničkih izolata i objavljuju se godišnja izvješća s podacima o rezistenciji tih patogena (161). U ovom radu su uspoređeni rezultati objavljeni za Gram-negativne bakterije, nefermentore *P. aeruginosa* i *A. baumannii*, u 2021. godini i rezultati dobiveni u ovom radu za rezistenciju *R. pickettii*. Dobiveni su, ovisno o vrsti bakterije i antibiotiku, ponegdje slični, ali za neke antibiotike i različiti

rezultati. *R. pickettii* je pokazala visoku rezistenciju na ertapenem (91,3%) koji se u rutini niti ne testira kod *P. aeruginosa* i *A. baumannii* zbog poznate visoke rezistencije. U ovom radu nije dobiven niti jedan rezistentan izolat *R. pickettii* na imipenem za razliku 29% rezistentnih kod *P. aeruginosa* i 94% kod *A. baumannii*. Stopa rezistencije *R. pickettii* na meropenem (95,1% u E-testu) je bila između stopa rezistencije *P. aeruginosa* (21%) i *A. baumannii* (94%). Iz navedenih rezultata mogao bi se izvesti zaključak kako bi *R. pickettii*, u ovom radu dokazano vrlo osjetljiva na imipenem, vrlo lako mogla razviti/iskazati rezistenciju na imipenem ukoliko bi bila u doticaju s ovim bakterijama, što nije nemogući scenarij s obzirom na njenu prisutnost u bolničkom okruženju, posebno kolonizaciji kod pacijenata s cističnom fibrozom.

Khajuria i sur. objavili su otkriće VIM-2 metalo- β -laktamaze kod *R. pickettii* koja je uspješno konjugirana na osjetljivu *E. coli* (162). Stoga je u ovom radu ispitano prisustvo gena za metalo- β -laktamaze (*bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, i *bla_{NDM}*) u izolatima *R. pickettii*, ali nisu dobiveni pozitivni rezultati, jednako kao niti za karbapenemazu OXA-48.

Visoka stopa rezistencija na aminoglikozidne antibiotike tijekom početnog ispitivanja osjetljivosti *R. pickettii* u ovom radu bila je vrlo intrigantna. Upućivala je, u prvi mah, na moguću intrinzičnu rezistenciju na koju su sumnjali i drugi autori (107). Zbunjujuće je bilo to što su na području I gotovo svi izolati (69/71) bili rezistentni, a izolati s područja II gotovo svi (8/10) bili osjetljivi na sva četiri ispitivana aminoglikozidna antibiotika (tobramicin, gentamicin, amikacin i netilmicin). Uz to je jedan izolat s područja II bio smanjeno osjetljiv na gentamicin i amikacin, dok je drugi bio rezistentan na tobramicin, a osjetljiv na ostala tri aminoglikozidna antibiotika. Dobivena je statistički značajna razlika u osjetljivosti na aminoglikozidne antibiotike izolata područja II u odnosu na osjetljivost izolata s područja I uz $p < 0,05$. I drugi autori su uočili da fenotip aminoglikozidne rezistencije kod *R. pickettii* varira unutar vrste što sugerira da bi rezistencija mogla biti ipak stečena (107).

Izolati *R. pickettii* ispitivani u ovom radu dobiveni iz sustava za vodu, najvjerojatnije su bili dijelovi biofilma pa to donekle može pojasniti i visoku rezistenciju, posebno na neke antibiotike. Uočeno je već ranije kako su bakterije u biofilmu puno rezistentnije nego planktonske stanice (163). I kako je već opisano, rezistencija na aminoglikozidne antibiotike kod Gram-negativnih bakterija uzrokovana je često proizvodnjom aminoglikozid-modificirajućih enzima i 16S rRNA metil-transferaza (134,156,164) pa je i u ovom radu ispitano prisustvo tih gena u sakupljenim izolatima *R. pickettii*. Izabrane su početnice za najčešće gene kod *P. aeruginosa*, predstavnika porodice u kojoj je nekada bila smještena i *R. pickettii* i jedan dio početnica za te gene kod *E. coli*. Korištene su početnice za *aac(3')-II*, *aac(6')-I*, *ant(2'')*, *aph(3')-I*, *armA*, *rmtA*, *rmtB* i *rmtD* gene. Izabrani su i potom testirani izolati

R. pickettii s visokim, ali i izolati s malim MIK-om za aminoglikozidne antibiotike, izolati s različitim područja i s različitim fenotipom aminoglikozidne rezistencije. Nije dokazano u ovoj studiji prisustvo tih gena kod ispitivanih izolata *R. pickettii*.

Strateva i autori su ispitivali prisustvo 16S rRNA metil-transferaza, odnosno gena *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC* i *rmtD* metodom PCR-a kod *R. pickettii* izolirane od pacijenta u sepsi, a s visokom rezistencijom na aminoglikozidne antibiotike. Nisu dobili potvrdni rezultat (20). U drugom objavljenom članku opisano je prisustvo gena *rmtB* kod *R. pickettii* izolirane iz uzorka rane (165). Smatra se da su ti geni uglavnom smješteni na mobilnim elementima bakterije i mogućnost stjecanja zahtijeva bliski kontakt bakterije davatelja i bakterije primatelja tih gena. U radu objavljenom 2021. godine otkriveno je da su geni *aadA2*, *ant(2')-Ia*, *cmlA1* i *sul1* kod *R. pickettii* izolirane iz uzoraka pacijenta dio integrona klase I (3). Razlog negativnog rezultata u ispitivanju tih gena može biti nefunkcionalnost tih gena jer ispitivani izolati nisu bili izloženi antibioticima u svom staništu, u gotovo sterilnim uvjetima, pa nije bilo ekspresije gena. Druga mogućnost je da ispitivani izolati, baš zbog svog obitavanja u tim kontroliranim uvjetima nisu dolazili u kontakt s drugim mikroorganizmima od kojih bi preuzeli te gene, jer se ti geni nalaze na mobilnim elementima kod velikog broja bakterija. Važno je napomenuti da u ovom trenutku ne postoje eksperimentalni rezultati koji bi potvrdili da Gram-negativne bakterije s područja Republike Hrvatske sadrže gene za 16 S rRNA metil-transferaze koji uzrokuju rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike. U opsežnoj studiji kliničkih sojeva enterobakterija otpornih na karbapeneme, metodom PCR ispitana je prisutnost gena *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD* i *npmA* i pokazano je da ovi geni nisu bili prisutni u ispitanim izolatima. Stoga je vjerojatno da niti sojevi *R. pickettii* istraživani u ovom radu nisu bili u mogućnosti horizontalnim prijenosom primiti te gene (166). Moguće je također, da je u pitanju neki drugi mehanizam, možda propusnost stanične stijenke ili aktivno izbacivanje antibiotika iz stanice, čime su i drugi autori znali objašnjavati negativne rezultate ovakvih testiranja (156,167).

Usporedbom rezultata rezistencije Gram-negativnih bakterija, nefermentora, na aminoglikozidne antibiotike iz godišnje objave za Hrvatsku i rezistencije izolata *R. pickettii* iz ovoga rada uočava se da je značajno viša stopa rezistencije na amikacin i gentamicin kod *R. pickettii* (87,7% i 86,50%) u odnosu na stopu rezistencije kod kliničkog izolata *P. aeruginosa* (6%, gentamicin se ne testira) i nešto je niža od stope rezistencije kod kliničkog izolata *A. baumannii* (90% i 93%). Razlikovali su se i rezultati za ciprofloksacin. Niti jedan izolat *R. pickettii* nije bio rezistentan na ciprofloksacin, dok je kod *P. aeruginosa* bilo rezistentno 20% izolata, a kod *A. baumannii* 96% izolata. Slični rezultati dobiveni su za cefalosporinski antibiotik ceftazidim, gdje je rezistentno bilo 6% izolata *R. pickettii* i 15% izolata *P.*

aeruginosa. Sličan omjer je dobiven je za piperacin/tazobaktam, kod *R. pickettii* 2% rezistentnih izolata, a 9% kod *P. aeruginosa*. To potvrđuje da *R. pickettii* ima potencijala za izmjenu gena rezistencije u kontaktu s drugim bakterijama.

PFGE-om je utvrđena velika srodnost ispitivanih izolata uz grupiranje u 3 velika klastera od kojih je najveći imao 45 izolata s oba područja i statistički značajna razlika u proizvodnji biofilma u odnosu na druga dva klastera koji su bili brojčano manji. Taj najveći klaster, klaster A, zanimljiv je i zbog rezultata ispitivanja osjetljivosti na antibiotike. Klaster A čine izolati iz oba područja Hrvatske i izolati iz svih mjesta uzorkovanja, njihova srodnost je dosta visoka, ali dobivena je značajna statistička razlika u rezultatima ispitivanja osjetljivosti na aminoglikozidne antibiotike. Gotovo svi izolati s područja II (9/10) bili su osjetljivi na sva četiri ispitivana aminoglikozidna antibiotika dok su s područja I samo dva izolata bili osjetljiva na tri aminoglikozidna antibiotika, tobramicin, gentamicin i amikacin, a rezistentni na netilmicin. Svi ostali izolati područja I bili su rezistentni na sva četiri aminoglikozidna antibiotika.

Analizom rezultata ispitivanja osjetljivosti na antibiotike s obzirom na područje od kuda su izolati dobiveni, statistički značajna razlika u rezultatima dobivena je za sva četiri aminoglikozidna antibiotika uz vrlo mali p. Na području II svi izolati su bili osjetljivi na gotovo sve aminoglikozidne antibiotike, a na području I samo dva izolata (2/71). Nije bilo statistički značajne razlike u osjetljivosti izolata s različitih područja na imipenem, ciprofloksacin, piperacilin-tazobaktam, ceftrijakson. Kod testiranih β -laktamskih antibiotika, statistički značajna razlika je dobivena kod ceftazidima i cefepima kod usporedbe rezistentnih i osjetljivih izolata, ali se ta razlika gubi kad se grupi osjetljivih izolata dodaju i intermedijarno osjetljivi izolati. Znači, važno je otkriti inetrmedijarno osjetljive izolate i odrediti učinkovitu dozu u svrhu postizanje kliničkog odgovora.

R. pickettii nije invazivna bakterija, oportunistički je patogen i može predstavljati veliki problem, financijski posebno za farmaceutsku industrijsku, isto tako financijski i posebice zdravstveni za bolnice i zdravstvene sustave, a kod imunokompromitiranih bolesnika i životno ugrožavajuće infekcije. *R. pickettii* stoga treba shvatiti ozbiljno kao mogućeg uzročnika nozokomijalnih infekcija kako bi se osigurala odgovarajuća terapija, spriječio razvoj rezistentnih sojeva i pokušala smanjiti mogućnost preživljavanja *R. pickettii* u sustavima čiste i ultra čiste vode.

R. pickettii može biti izvor gena rezistencije za druge mikroorganizme s kojima dođe u doticaj, jednako tako može razviti nove mehanizme rezistencije zbog urođenih potencijala uslijed selekcijskog pritiska ili razmjenom genetičkog materijala s drugim bakterijama. Uočeno

je i da povećana koncentracija cinka i bakra u otpadnim vodama može selektirati rezistentne sojeve *R. pickettii* (168).

R. pickettii ima ogroman biotehnološki značaj u niši bioremedijacije i pokazalo se da ima sposobnost razgradnje mnogih ksenobiotičkih zagađivača, poput trikloroetilena i toluena, koji se ispuštaju u okoliš različitim industrijskim metodama. Pretpostavlja se da bi u okvirima ultračiste vode mikroskopski organizmi mogli imati mogućnost čišćenja iz polimera u plastičnim cijevima. Dobro podnosi veće koncentracije živih i neživih kontaminanti, brzo se prilagođava povišenim koncentracijama metala zbog snažne duplikacije gena i horizontalnog prijenosa nekoliko vrsta gena za rezistenciju (169).

Provedenim ispitivanjem dobiveni su podatci koji karakteriziraju okolišne izolate *R. pickettii*, točnije izolate iz vodenog miljea. Dobiveni su rezultati rezistencije na antibiotike za izolate *R. pickettii* iz različitih područja Hrvatske. To su iznimno vrijedni podatci i bilo bi korisno sakupiti i kliničke izolate i ispitati njihovu rezistenciju. Time bi se omogućilo i praćenje mogućeg mijenjanja okolišnog u potencijalno patogeni mikroorganizam. Jednako zanimljivo bi bilo provesti studiju u kojoj bi se ustanovila moguća veza nekih metaboličkih problema i stanja s prisutnošću *R. pickettii* u probavi jer je uočeno da se *R. pickettii* češće pojavljuje kod nekih metaboličkih stanja (npr. dijabetes, debljina). Korisno bi bilo proučiti proizvodnju biofilma na drugačijim sustavima, sa stalnim protokom vode kako bi se oponašalo vodeno okruženje sustava za farmaceutsku vodu. Takvo ispitivanje bi se moglo dodatno provesti uz primjenu dezinfekcije i sanitacije u određenim vremenskim intervalima kako bi se odredilo optimalno uklanjanje biofilma i produljilo vrijeme ponovnih pranja i dezinfekcije/sanitacije sustava.

6 ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih ispitivanja, dobivenih rezultata i rasprave može se zaključiti sljedeće:

- *Ralstonia pickettii* s područja Hrvatske je, za sada, dobro osjetljiva na veliki broj antibiotika što može biti smjer za empirijsku terapiju;
- Svi ispitivani izolati su osjetljivi na imipenem, trimetoprim-sulfametoksazol, tetraciklin i tigeciklin, a vrlo dobro osjetljivi na piperacilin/tazobaktam;
- *R. pickettii* s područja Hrvatske je visoko rezistentna na kolistin, aztreonam i ertapenem;
- Rezistencija *R. pickettii* na aminoglikozidne antibiotike nije intrinzična, izolati s područja I visoko su rezistentni na gentamicin, amikacin, tobramicin i netilmicin uz razliku od područja II gdje su gotovo svi izolati osjetljivi na te iste antibiotike;
- Rezistencija na aminoglikozidne antibiotike kod *R. pickettii* s područja Hrvatske nije uzrokovana genima *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC* i *rmtD* za 16SrRNA metil-transferaze niti genima za aminoglikozid-modificirajuće enzime *aac(3')-II*, *aac(6')-I*, *ant(2'')*, *aph(3')-I*;
- Za rezistenciju *R. pickettii* na meropenem nisu odgovorni geni za metalo- β -laktamaze; *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, i *bla_{NDM}* niti gen za oksacilinazu *bla_{OXA48}* koja spada u klasu D;
- Dokazano je prisustvo *bla_{OXA22}* i *bla_{OXA60}* gena u *R. pickettii* s područja Hrvatske, što bi moglo biti objašnjenje za rezistenciju na ertapenem i meropenem, ali nije popraćeno očekivanom rezistencijom na imipenem i uskospektralne cefalosporine;
- *R. pickettii* pokazuje pokretljivost u obliku plivanja i trzanja;
- *R. pickettii* s područja Hrvatske proizvodi biofilm u uvjetima testa, ali bi vjerojatno s korekcijama uvjeta (dulja inkubacija, protok tekućine, promjena podloge i slično) ta proizvodnja bila obilnija;
- *R. pickettii* nije klasični patogen, ali zbog svojstva proizvodnje izvanstanične supstance, proizvodnje biofilma, posjedovanja gena rezistencije i zbog izražene rezistencije na pojedine antibiotike može biti važan oportunistički patogen;
- *R. pickettii* ima toksigeni potencijal, posjeduje endotoksin u količini gotovo jednakoj količini kod *E. coli*, što u uvjetima infekcije može biti važan čimbenik virulencije;
- Izolati s različitih lokacija grupirani su zajedno, što upućuje na srodnost, odnosno ukazuje na mogući zajednički izvor.

7 POPIS LITERATURE

1. Yabuuchi E, Kosako Y, Ikuya Y, Hisako H, Nishiuchi Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* Gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) Comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Comb. Nov. And *Ra. Microbiol Immunol.* 39:897–904.
2. Vaneechoutte M, Kämpfer P, De Baere T, Falsen E, Verschraegen G. 2004. *Wautersia* gen. nov., a novel genus accomodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia [Pseudomonas] syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54:317–327.
3. Fluit A, Bayjanov J, Aguilar M, et al. 2021. Characterization of clinical *Ralstonia* strains and their taxonomic position. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 114:1721–1733.
4. Song B, Leff LG. 2005. Identification and characterization of bacterial isolates from the Mir space station. *Microbiol Res.* 160:111–117.
5. Stelzmueller I, Biebl M, Wiesmayr S, et al. 2006. *Ralstonia pickettii* - Innocent by bystander or a potential threat? *Clin Microbiol Infect.* 12:99–101.
6. Anderson RL, Bland LA, Favero MS, et al. 1985. Factors associated with *Pseudomonas pickettii* intrinsic contamination of commercial respiratory therapy solutions marketed as sterile. *Appl Environ Microbiol.* 50:1343–1348.
7. Sundaram S, Auriemma M, Howard G, Brandwein H, Leo F. 1999. Application of membrane filtration for removal of diminutive bioburden organisms in pharmaceutical products and processes. *PDA J Pharm Sci Technol.* 53:186–201.
8. Sundaram S, Lewis M, Eisenhuth J, Howard JG, Larson B. 2007. Method For Qualifying Microbial Removal Performance of 0.1 Micron Rated Filters PART IV: Retention of *Hydrogenophaga pseudoflava* (ATCC 700892) and *Ralstonia pickettii* (ATCC 700591) by 0.2 and 0.22 µm Rated Filters. *Mater Sci Technol.* 23:556–560.
9. Adley C, Ryan MP, Pembroke JT. 2005. *Ralstonia pickettii*: biofilm formation in high purity water. In: McBain AJ, Allison DG, Pratten J, Spratt Da, Upton M VJ, editor. *Biofilms Persistence and ubiquity.* Biofilm Club: Cardiff; p. 151–162.
10. Kahan A, Philippon A, Paul G, et al. 1983. Nosocomial infections by chlorhexidine solution contaminated with *Pseudomonas pickettii* (Biovar VA-1). *J Infect.* 7:256–263.
11. Verschraegen G, Claeys G, Meeus G, Delanghe M. 1985. *Pseudomonas pickettii* as a cause of pseudobacteremia. *J Clin Microbiol.* 21:278–279.

12. Maroye P, Doermann HP, Rogues AM, Gachie JP, Mégraud F. 2000. Investigation of an outbreak of *Ralstonia pickettii* in a paediatric hospital by RAPD. *J Hosp Infect.* 44:267–272.
13. Barbut F, Kosmann M-J, Lalande V, et al. 2006. Outbreak of *Ralstonia pickettii* Pseudobacteremia Among Patients With Hematological Malignancies. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 27:642–644.
14. Fry JC. 1990. Oligotrophs. In: Edwards CA, editor. *Microbiology of Extreme Environments.* Oxford: Alden Press; p. 93–116.
15. McAlister MB, Kulakov LA, O’Hanlon JF, Larkin MJ, Ogden KL. 2002. Survival and nutritional requirements of three bacteria isolated from ultrapure water. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 29:75–82.
16. Kulakov LA, McAlister MB, Ogden KL, Larkin MJ, O’Hanlon JF. 2002. Analysis of bacteria contaminating ultrapure water in industrial systems. *Appl Environ Microbiol.* 68:1548–1555.
17. Benkstein KD, Da Silva SM, Lin NJ, Ripple DC. 2019. Evaluating changes to *Ralstonia pickettii* in high-purity water to guide selection of potential calibration materials for online water bioburden analyzers. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 46:1469–1478.
18. Dombrowsky M, Kirschner A, Sommer R. 2013. PVC-piping promotes growth of *Ralstonia pickettii* in dialysis water treatment facilities. *Water Sci Technol.* 68:929–933.
19. Orme J, Rivera-Bonilla T, Loli A, Blattman NN. 2015. Native Valve Endocarditis due to *Ralstonia pickettii*: A Case Report and Literature. *Case Rep Infect Dis.* 2015:1–4.
20. Strateva T, Kostyanev T, Setchanova L. 2012. *Ralstonia pickettii* sepsis in a hemodialysis patient from Bulgaria. *Brazilian J Infect Dis.* 16:400–401.
21. Tejera D, Limongi G, Bertullo M, Cancela M. 2016. *Ralstonia pickettii* bacteremia in hemodialysis patients: A report of two cases. *Rev Bras Ter Intensiva.* 28:195–198.
22. Thet MK, Pelobello MLF, Das M, et al. 2019. Outbreak of nonfermentative Gram-negative bacteria (*Ralstonia pickettii* and *Stenotrophomonas maltophilia*) in a hemodialysis center. *Hemodial Int.* 23:83–89.
23. Anversa L, Romani CD, Caria ES, et al. 2022. Quality of dialysis water and dialysate in haemodialysis centres: Highlight for occurrence of non-fermenting gram-negative bacilli. *J Appl Microbiol.* 132:3416–3429.
24. Borges CRM, Lascowski KMS, Filho NR, Pelayo JS. 2007. Microbiological quality of

- water and dialysate in a haemodialysis unit in Ponta Grossa-PR, Brazil. *J Appl Microbiol.* 103:1791–1797.
25. Vincenti S, Quaranta G, De Meo C, et al. 2014. Non-fermentative gram-negative bacteria in hospital tap water and water used for haemodialysis and bronchoscope flushing: Prevalence and distribution of antibiotic resistant strains. *Sci Total Environ.* 499:47–54.
 26. Raveh D, Simhon A, Gimmon Z, Sacks T, Shapiro M. 1993. Infections Caused by *Pseudomonas pickettii* in Association with Permanent Indwelling Intravenous Devices: Four Cases and a Review. *Clin Infect Dis.* 17:877–880.
 27. Pasticci MB, Baldelli F, Camilli R, et al. 2005. Pulsed field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA molecular characterization of *Ralstonia pickettii* isolates from patients with nosocomial central venous catheter related bacteremia. *New Microbiol.* 28:145–149.
 28. Nasir N, Sayeed MA, Jamil B. 2019. *Ralstonia pickettii* Bacteremia: An Emerging Infection in a Tertiary Care Hospital Setting. *Cureus.* 11:7–11.
 29. Basso M, Venditti C, Raponi G, et al. 2019. A case of persistent bacteraemia by *Ralstonia mannitolilytica* and *Ralstonia pickettii* in an intensive care unit. *Infect Drug Resist.* 12:2391–2395.
 30. Woo PCY, Wong SYY, Yuen K. 2002. *Ralstonia pickettii* bacteraemia in a cord blood transplant recipient. *New Microbiol.* 25:97–102.
 31. Purabi Barman SSRP. 2014. *Ralstonia Pickettii* Bacteremia. *J Infect Dis Ther.* 2:2–4.
 32. Ryan MP, Adley CC. 2014. *Ralstonia* spp.: Emerging global opportunistic pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 33:291–304.
 33. Steinmann J, Buer J, Dusse F, et al. 2014. Ausbruch mit *Ralstonia pickettii* durch kontaminierte Magnesium-Ampullen Outbreak with *Ralstonia pickettii* caused by contaminated magnesium vials. *Dtsch Medizinische Wochenschrift.* 139:323–326.
 34. Lin TC, Wu RX, Chiu CC, et al. 2018. The clinical and microbiological characteristics of infections in burn patients from the Formosa Fun Coast Dust Explosion. *J Microbiol Immunol Infect.* 51:267–277.
 35. T'Sjoen G, Verschraegen G, Steyaert S, Vogelaers D. 2001. Vermijdbare "Febris e Causa Ignota" door *Ralstonia pickettii* bacteriemie. *Acta Clin Belg.* 56:51–54. *Acta Clin Belg.* 56:51–54.
 36. Vitaliti SM, Maggio MC, Cipolla D, Corsello G, Mammina C. 2008. Neonatal sepsis caused by *Ralstonia pickettii*. *Pediatr Infect Dis J.* 27:283.

37. Sharma D, Sharma P, Soni P, Gupta B. 2017. *Ralstonia picketti* neonatal sepsis: A case report. BMC Res Notes. 10:28.
38. Zellweger C, Bodmer T, Täuber MG, Mühlemann K. 2004. Failure of ceftriaxone in an intravenous drug user with invasive infection due to *Ralstonia picketti*. Infection. 32:246–248.
39. Birlutiu RM, Roman MD, Cismasiu RS, et al. 2017. Sonication contribution to identifying prosthetic joint infection with *Ralstonia picketti*: A case report and review of the literature. BMC Musculoskelet Disord. 18:1–7.
40. Wertheim WA, Markovitz DM. 1992. Osteomyelitis and Intervertebral Discitis Caused by *Pseudomonas pickettii*. J Clin Microbiol. 30:2506–2508.
41. Waugh JB, Granger WM, Gaggar A. 2010. Incidence, relevance and response for *Ralstonia* respiratory infections. Clin Lab Sci. 23:99–106.
42. Coenye T, Vandamme P, Lipuma JJ. 2002. Infection by *Ralstonia* species in cystic fibrosis patients: Identification of *R. pickettii* and *R. mannitolilytica* by polymerase chain reaction. Emerg Infect Dis. 8:692–696.
43. Coenye T, Spilker T, Reik R, Vandamme P, LiPuma JJ. 2005. Use of PCR analyses to define the distribution of *Ralstonia* species recovered from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 43:3463–3466.
44. Prior AR, Gunaratnam C, Humphreys H. 2017. *Ralstonia* species – do these bacteria matter in cystic fibrosis? Paediatr Respir Rev. 23:78–83.
45. Green HD, Bright-Thomas R, Kenna DT, et al. 2017. *Ralstonia* infection in cystic fibrosis. Epidemiol Infect. 145:2864–2872.
46. LiPuma JJ, Dulaney BJ, McMenamin JD, et al. 1999. Development of rRNA-Based PCR Assays for Identification of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates Recovered from Cystic Fibrosis Patients. J Clin Microbiol. 37:3167.
47. Hutchison ML, Bonell EC, Poxton IR, Govan JRW. 2000. Endotoxic activity of lipopolysaccharides isolated from emergent potential cystic fibrosis pathogens. FEMS Immunol Med Microbiol. 27:73–77.
48. Kim JM, Rim JH, Kim DH, et al. 2021. Microbiome analysis reveals that *Ralstonia* is responsible for decreased renal function in patients with ulcerative colitis. Clin Transl Med. 11:322.
49. Lai HW, Shen YH, Chien LJ, et al. 2016. Outbreak of *Ralstonia pickettii* bacteremia caused by contaminated saline solution in Taiwan. Am J Infect Control. 44:1191–1192.
50. McNeil MM, Solomon SL, Anderson RL, et al. 1985. Nosocomial *Pseudomonas*

- pickettii* colonization associated with a contaminated respiratory therapy solution in a special care nursery. J Clin Microbiol. 22:903–907.
51. Labarca JA, Trick WE, Peterson CL, et al. 1999. A multistate nosocomial outbreak of *Ralstonia pickettii* colonization associated with an intrinsically contaminated respiratory care solution. Clin Infect Dis. 29:1281–1286.
 52. Ryan MP, Pembroke JT, Adley CC. 2006. *Ralstonia pickettii*: A persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. J Hosp Infect. 62:278–284.
 53. Choudhury H, Jindal A, Pathengay A, Flynn HW. 2015. An outbreak of *Ralstonia pickettii* endophthalmitis following intravitreal methotrexate injection. Clin Ophthalmol. 9:1117–1120.
 54. Boutros N, Gonullu N, Casetta A, et al. 2002. *Ralstonia pickettii* traced in blood culture bottles. J Clin Microbiol. 40:2666–2667.
 55. Mandelbaum RT, Sadowsky MJ, Wackett LP. 2008. Chapter 22 - Microbial Degradation of s-Triazine Herbicides. In: The Triazine Herbicides. Elsevier; p. 301–328.
 56. Zhang LL, Leng SQ, Zhu RY, Chen JM. 2011. Degradation of chlorobenzene by strain *Ralstonia pickettii* L2 isolated from a biotrickling filter treating a chlorobenzene-contaminated gas stream. Appl Microbiol Biotechnol. 91:407–415.
 57. Al-Zuhair S, El-Naas MH. 2012. Phenol Biodegradation by *Ralstonia pickettii* extracted from petroleum refinery oil sludge. Chem Eng Commun. 199:1194–1204.
 58. Purnomo AS, Maulianawati D, Kamei I. 2019. *Ralstonia pickettii* Enhance the DDT Biodegradation by *Pleurotus eryngii*. J Microbiol Biotechnol. 29:1424–1433.
 59. Purnomo AS, Sariwati A, Kamei I. 2020. Synergistic interaction of a consortium of the brown-rot fungus *Fomitopsis pinicola* and the bacterium *Ralstonia pickettii* for DDT biodegradation. Heliyon. 6:1–8.
 60. Purnomo AS, Asranudin, Prasetyoko D, Azizah YDN. 2021. The Biotransformation and Biodecolorization of Methylene Blue by Xenobiotic Bacterium *Ralstonia pickettii*. Indones J Chem. 21:1418–1430.
 61. Ryan MP, Adley CC. 2013. The antibiotic susceptibility of water-based bacteria *Ralstonia pickettii* and *Ralstonia insidiosa*. J Med Microbiol. 62:1025–1031.
 62. Nordmann P, Poirel L, Kubina M, Casetta A, Naas T. 2000. Biochemical-genetic characterization and distribution of OXA-22, a chromosomal and inducible class D β -lactamase from *Ralstonia (Pseudomonas) pickettii*. Antimicrob Agents Chemother. 44:2201–2204.

63. Girlich D, Naas T, Nordmann P. 2004. OXA-60, a chromosomal, inducible, and imipenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Ralstonia pickettii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:4217–4225.
64. Girlich D, Naas T, Nordmann P. 2006. Regulation of class D β -lactamase gene expression in *Ralstonia pickettii*. *Microbiology.* 152:2661–2672.
65. Jiang T, Xu J, He F. 2020. Genotypic and phylogenetic characterisation of a clinical *Ralstonia pickettii* strain carrying two novel OXA allelic variants, blaOXA-898 and blaOXA-899, isolated from a bloodstream infection in China. *J Glob Antimicrob Resist.* 21:46–48.
66. Pickett MJ, Greenwood JR. 1980. A study of the Va-1 group of pseudomonads and its relationship to *Pseudomonas pickettii*. *J Gen Microbiol.* 120:439–446.
67. Sader HS, Jones RN. 2005. Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents.* 25:95–109.
68. Murray PR, Baron EJ, Jorgenson JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. 2003. *Manual of clinical microbiology.* ASM Press. Elsevier;
69. Riley PS, Weaver RE. 1975. Recognition of *Pseudomonas pickettii* in the clinical laboratory: biochemical characterization of 62 strains. *J Clin Microbiol.* 1:61–64.
70. Stromberg LR, Mendez HM, Mukundan H. 2017. Detection Methods for Lipopolysaccharides: Past and Present. In: *Escherichia coli - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications.* InTech;
71. Raetz CRH, Whitfield C. 2002. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu Rev Bioch.* 71:635–700.
72. Le Brun AP, Clifton LA, Halbert CE, et al. 2013. Structural Characterization of a Model Gram-Negative Bacterial Surface Using Lipopolysaccharides from Rough Strains of *Escherichia coli*. *Biomacromolecules.* 14:2014–2022.
73. Stromberg LR, Hengartner NW, Swingle KL, et al. 2016. Membrane Insertion for the Detection of Lipopolysaccharides: Exploring the Dynamics of Amphiphile-in-Lipid Assays. *PLoS One.* 11:e0156295.
74. Mazgaeen L, Gurung P. 2020. Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems. *Int J Mol Sci* 2020, Vol 21, Page 379. 21:379.
75. De Castro C, Parrilli M, Holst O, Molinaro A. 2010. Microbe-Associated Molecular Patterns in Innate Immunity: Extraction and Chemical Analysis of Gram-Negative Bacterial Lipopolysaccharides. *Methods Enzymol.* 480:89–115.
76. Tinte MM, Steenkamp PA, Piater LA, Dubery IA. 2020. Lipopolysaccharide

- perception in *Arabidopsis thaliana*: Diverse LPS chemotypes from *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas campestris* trigger differential defence-related perturbations in the metabolome. *Plant Physiol Biochem.* 156:267–277.
77. Elhenawy C, Bording-Jorgensen W, Valguarnera M, et al. 2016. LPS remodeling triggers formation of outer membrane vesicles in *Salmonella*. *MBio.* 7:940–956.
 78. Thursby E, Juge N. 2017. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J.* 474:1823.
 79. Caroff M, Novikov A. 2020. Lipopolysaccharides: structure, function and bacterial identifications. *OCL.* 27:1–10.
 80. Zhang-Sun W, Tercé F, Burcelin R, et al. 2019. Structure function relationships in three lipids A from the *Ralstonia* genus rising in obese patients. *Biochimie.* 159:72–80.
 81. Schaumberger S, Ladinig A, Reisinger N, Ritzmann M, Schatzmayr G. 2014. Evaluation of the endotoxin binding efficiency of clay minerals using the *Limulus* Amebocyte lysate test: an in vitro study. *AMB Express.* 4:1.
 82. Wengiong S, Xianting D. 2015. Methods of Endotoxin Detection. *J Lab Autom.* 20:354–364.
 83. Leung LM, Fondrie WE, Doi Y, et al. 2017. Identification of the ESKAPE pathogens by mass spectrometric analysis of microbial membrane glycolipids. *Sci Rep.* 7:1–10.
 84. Wheeler A. 2017. Comparing Endotoxin Detection Methods. *Pharm Technol.* 41:58–62.
 85. Bacterial endotoxins test. 2012. In: <85> Second Supplement to USP 35-NF 30. p. 5625–5629.
 86. Bacterial endotoxins. 2019. In: European pharmacopoeia Strasbourg. Council of Europe; p. 161–168.
 87. Reimer LC, Sardà Carbasse J, Koblitiz J, et al. 2022. BacDive in 2022: The knowledge base for standardized bacterial and archaeal data. *Nucleic Acids Res.* 50:741–746.
 88. *Ralstonia pickettii* K-288 | Type strain | DSM 6297, ATCC 27511, CIP 73.23, JCM 5969, NCTC 11149, CCUG 3318, LMG 5942, BCRC 14820, CECT 330, CGMCC 1.1807, IAM 13530, ICPB 3981, NBRC 102503, NCIMB 13142, VTT E-981068 | BacDiveID:2085. doi 101093/nar/gkab961.
 89. Kearns DB. 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol.* 8:634.
 90. Corral J, Sebastià P, Coll NS, et al. 2020. Twitching and Swimming Motility Play a

- Role in *Ralstonia solanacearum* Pathogenicity. mSphere. 5:e00740-19.
91. Darzins A. 1993. The pilG gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* pilus production and twitching motility, is homologous to the enteric, single-domain response regulator CheY. J Bacteriol. 175:5934–5944.
 92. Ghelardi E, Salvetti S, Ceragioli M, et al. 2012. Contribution of Surfactin and SwrA to Flagellin Expression, Swimming, and Surface Motility in *Bacillus subtilis*. Appl Environ Microbiol. 78:6540.
 93. Shi W, Sun H. 2002. Type IV pilus-dependent motility and its possible role in bacterial pathogenesis. Infect Immun. 70:1–4.
 94. Ivanković T, Hadad U, Kushmaro A, et al. 2020. Capillary bacterial migration on non-nutritive solid surfaces. Arh Hig Rada Toksikol. 71:251–260.
 95. Donlan RM. 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerg Infect Dis. 8:881.
 96. Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, Call DR. 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol. 69:7336–7342.
 97. Watnick P, Kolter R. 2000. Biofilm, city of microbes. J Bacteriol. 182:2675–2679.
 98. Pompilio A, Piccolomini R, Picciani C, et al. 2008. Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility. FEMS Microbiol Lett. 287:41–47.
 99. Lof M, Janus MM, Krom BP. 2017. Metabolic Interactions between Bacteria and Fungi in Commensal Oral Biofilms. J Fungi 2017, Vol 3, Page 40. 3:40.
 100. Penesyan A, Paulsen IT, Kjelleberg S, Gillings MR. 2021. Three faces of biofilms: a microbial lifestyle, a nascent multicellular organism, and an incubator for diversity. npj Biofilms Microbiomes 2021 71. 7:1–9.
 101. Butt A, Khan A. 2015. Antibiotics Resistance of Bacterial Biofilms. Middle East J Bus. 10:38–45.
 102. Nguyen D, Joshi-Datar A, Lepine F, et al. 2011. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. Science (80-). 334:982–986.
 103. Yang J, Barrila J, Ott CM, et al. 2021. Longitudinal characterization of multispecies microbial populations recovered from spaceflight potable water. npj Biofilms Microbiomes. 7:70.
 104. Yang F. 2006. Study of *Ralstonia pickettii* Biofilm Structure Formed in A Flow Cell. p. 1–36.

105. Wong WC, Dudinsky LA, Garcia VM, Ott CM, Castro VA. 2010. Efficacy of various chemical disinfectants on biofilms formed in spacecraft potable water system components Efficacy of various chemical disinfectants on biofilms formed in spacecraft potable water system components. *Biofouling*. 26:583–586.
106. Nordmann P. 2010. Gram-negative bacteria with resistance to carbapenems. *Med Sci*. 26:950–959.
107. Vaz-Moreira I, Tamames J, Luis Martínez J, Manaia CM. 2016. Draft Genome Sequences of Two *Ralstonia pickettii* Strains with Different Aminoglycoside Resistance Phenotypes. *Genome Announc*. 4:1257–1273.
108. Ferro P, Vaz-Moreira I, Manaia CM. 2019. Association between gentamicin resistance and stress tolerance in water isolates of *Ralstonia pickettii* and *R. mannitolilytica*. *Folia Microbiol (Praha)*. 64:63–72.
109. Murray CJ, Shunji Ikuta K, Sharara F, et al. 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 399:629–655.
110. Siddiqui S. 2019. Resistance in Pathogenic Microorganisms. In: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier; p. 183–191.
111. Peterson E, Kaur P. 2018. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Front Microbiol*. 9:2928.
112. Delcour AH. 2009. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *Biochim Biophys Acta*. 5:808–816.
113. Larsson DGJ, Flach CF. 2022. Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol* 2022. 20:257–269.
114. Reygaert WC. 1900. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol*. 4:482–501.
115. Doi Y, Arakawa Y. 2007. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis*. 45:88–94.
116. Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, et al. 2004. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob Agents Chemother*. 48:3996–4001.
117. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. 2006. Prevalence in the United States of *aac(6′)-Ib-cr* Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. 50:3953.
118. Sterility. 2019. In: *European pharmacopoeia Strasbourg*. Council of Europe; p. 175–

- 178.
119. De Veras BO, Dos Santos YQ, Diniz KM, Carelli GSC, Dos Santos EA. 2018. Screening of protease, cellulase, amylase and xylanase from the salt-tolerant and thermostable marine *Bacillus subtilis* strain SR60. *F1000Research*. 7:1704.
 120. O'Toole GA. 2011. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *J Vis Exp*. 47:2437.
 121. Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA. 2005. Growing and Analyzing Static Biofilms. *Curr Protoc Microbiol*. :Chapter 1:Unit-1B.1.
 122. Kırmusaoglu S. 2019. The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents. In: *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*. IntechOpen.84411;
 123. Degand N, Carbonnelle E, Dauphin B, et al. 2008. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 46:3361–3367.
 124. Fernández-Olmos A, García-Castillo M, Morosini MI, et al. 2012. MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 11:59–62.
 125. Liu L, Coenye T, Burns JL, et al. 2002. Ribosomal DNA-directed PCR for identification of *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* recovered from sputum samples from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 40:1210–1213.
 126. Gibson JR, Sutherland K, Owen RJ. 1994. Inhibition of DNase activity in PFGE analysis of DNA from *Campylobacter jejuni*. *Lett Appl Microbiol*. 19:357–358.
 127. Singer RS, Sisco WM, Carpenter TE. 2004. Exploration of biases that affect the interpretation of restriction fragment patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 42:5502–5511.
 128. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V., et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 33:2233–2239.
 129. Wayne P. 2018. Clinical and Laboratory Standards Institute, M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 28th Edition, CLSI, Wayne, PA.
 130. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 8.0, 2018.
 131. Ribeiro VB, Linhares AR, Zavascki AP, Barth AL. 2014. Performance of quantification of modified Hodge test: An evaluation with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing enterobacteriaceae isolates. *Biomed Res Int*. 2014:13930.

132. Uechi K, Tada T, Shimada K, Kuwahara-arai K. 2017. A Modified Carbapenem Inactivation Method, CIMTris, for Carbapenemase Production in *Acinetobacter* and *Pseudomonas* Species. 55:3405–3410.
133. Van Der Zwaluw K, De Haan A, Pluister GN, et al. 2015. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a simple and low-cost alternative for the carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-negative rods. PLoS One. 10(3):e0123690.
134. Nordmann P, Mazé A, Culebras E, et al. 2018. A culture medium for screening 16S rRNA methylase-producing pan-aminoglycoside resistant Gram-negative bacteria. Diagn Microbiol Infect Dis. 91:118–122.
135. Elwell L, Falkow S. 1986. The characterization of R plasmids and the detection of plasmid-specified genes. In: Lorain V, ed Antibiotics in Laboratory Medicine. 2nd ed. Baltimor: MD: Williams and Wilkins; p. 683–721.
136. Li R, Lin D, Chen K, Wong MHY, Chen S. 2015. First detection of AmpC β -lactamase blaCMY-2 on a conjugative IncA/C plasmid in a *Vibrio parahaemolyticus* isolate of food origin. Antimicrob Agents Chemother. 59:4106–4111.
137. Amudhan M, Sekar U, Kamalanathan A, Balaraman S. 2012. bla(IMP) and bla(VIM) mediated carbapenem resistance in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species in India. J Infect Dev Ctries. 6:757–762.
138. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagn Microbiol Infect Dis. 70:119–123.
139. Kim JY, Park YJ, Kwon HJ, et al. 2008. Occurrence and mechanisms of amikacin resistance and its association with β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: a Korean nationwide study. J Antimicrob Chemother. 62:479–483.
140. Mazzola PG, Martins AMS, Penna TCV. 2006. Chemical resistance of the gram-negative bacteria to different sanitizers in a water purification system. BMC Infect Dis. 6:1–11.
141. Cloud JL, Harmsen D, Iwen PC, et al. 2010. Comparison of traditional phenotypic identification methods with partial 5' 16S rRNA gene sequencing for species-level identification of nonfermenting gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 48:1442–1444.
142. Jhung MA, Sunenshine RH, Noble-Wang J, et al. 2007. A National Outbreak of *Ralstonia mannitolilytica* Associated With Use of a Contaminated Oxygen-Delivery Device Among Pediatric Patients. Pediatrics. 119:1061–1068.
143. Ryan MP, Pembroke JT, Adley CC. 2011. Genotypic and phenotypic diversity of

- Ralstonia pickettii* and *Ralstonia insidiosa* isolates from clinical and environmental sources including High-purity Water. Diversity in *Ralstonia pickettii*. BMC Microbiol. 11:194.
144. Collins CM, D’Orazio SEF. 1993. Bacterial ureases: structure, regulation of expression and role in pathogenesis. Mol Microbiol. 9:907–913.
 145. Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. 1995. Molecular biology of microbial ureases. Microbiol Rev. 59:451–480.
 146. Zhou L, Qin W, Liang Z, Wei H, Wu X. 2021. A Rare Case of *Ralstonia pickettii* Infection in a Patient Undergoing Thyroid Surgery. Jundishapur J Microbiol. 14:119418.
 147. De Baere T, Steyaert S, Wauters G, et al. 2001. Classification of *Ralstonia pickettii* biovar 3/’ thomasii’ strains (pickett 1994) and of new isolates related to nosocomial recurrent meningitis as *Ralstonia mannitolytica* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 51:547–558.
 148. Coenye T, Goris J, De Vos P, Vandamme P, LiPuma JJ. 2003. Classification of *Ralstonia pickettii*-like isolates from the environment and clinical samples as *Ralstonia insidiosa* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 53:1075–1080.
 149. McCarter LL. 2004. Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. J Mol Microbiol Biotechnol. 7:18–29.
 150. Mayhua FPF. 2019. Ecology and antimicrobial resistance of *Ralstonia* spp. in the urban water cycle, PhD Thesis. Universidade Católica Portuguesa.
 151. Ferro P, Vaz-Moreira I, Manaia CM. 2021. Evolution of gentamicin and arsenite resistance acquisition in *Ralstonia pickettii* water isolates. Res Microbiol. 172:103790.
 152. Pickett MJ, Dimech W, Hellyar A. 1994. Typing of strains from a single-source outbreak of *Pseudomonas pickettii*. J Clin Microbiol. 32:1132–1133.
 153. Morad Asaad A, Zayed Al-Ayed MS, Ansar Qureshi M. 2013. Emergence of unusual nonfermenting Gram-negative nosocomial pathogens in a Saudi hospital. Jpn J Infect Dis. 66:507–511.
 154. Gales AC, Jones RN, Andrade SS, Sader HS. 2005. Antimicrobial susceptibility patterns of unusual nonfermentative gram-negative bacilli isolated from Latin America: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). Mem Inst Oswaldo Cruz. 100:571–577.
 155. Gomez-Garces JL, Aracil B, Gil J. 2009. Comparison between agar dilution and three other methods for determining the susceptibility of 228 clinical isolates of non-

- fermenting gram-negative rods. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 27:331–337.
156. Vaziri F, Peerayeh SN, Nejad QB, Farhadian A. 2011. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes (aac (69)-I, aac (69)-II, ant (20)-I, aph (39)-VI) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinics.* 66:1519–1522.
 157. Villalón P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, et al. 2013. Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo- β -lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain. *J Antimicrob Chemother.* 68:550–553.
 158. Simner PJ, Opene BNA, Chambers KK, et al. 2017. Carbapenemase detection among nonfermenting gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 55:2858–2864.
 159. Tenover FC, Nicolau DP, Gill CM. 2022. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* –an emerging challenge. *Emerg Microbes Infect.* 11:811–814.
 160. Ratkai C, Quinteira S, Grosso F, et al. 2009. Controlling for false positives: Interpreting MBL Etest and MBL combined disc test for the detection of metallo- β -lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 64:657–658.
 161. Tambić Andrašević A, Tambić T, Žmak L, et al. 2021. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2021. g. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske.
 162. Khajuria A, Praharaj AK, Grover N, Kumar M. 2014. Emergence of VIM-2 metallo-beta-lactamase producing *Ralstonia pickettii* clinical isolate in India. *Indian J Med Microbiol.* 32:191–193.
 163. Bolard A. 2019. Identification of novel regulatory pathways involved in non-enzymatic resistance to aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa*, PhD Thesis. Université Bourgogne Franche-Comté.
 164. Haldorsen BC, Simonsen GS, Sundsfjord A, Samuelsen Ø. 2014. Increased prevalence of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Norway is associated with the acquisition of AAC(3)-II and AAC(6')-Ib. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 78:66–69.
 165. Heang V, Hout B, Prouty MG, et al. 2014. Detection of qnrVC and rmtB genes from a multidrug-resistant *Ralstonia pickettii* wound infection isolate in Cambodia. *Int J Antimicrob Agents.* 44:84–85.
 166. Jelić M. 2018. Mehanizmi rezistencije na antibiotike enterobakterija otpornih na karbapeneme, PhD Thesis. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:737644>;

167. Vanhoof R, Nyssen H., Van Bossuyt E, Hannecart-pokorni E. 1999. Aminoglycoside resistance in Gram-negative blood isolates from various hospitals in Belgium and the Grand Duchy of Luxembourg. Aminoglycoside Resistance Study Group. *J Antimicrob Chemother.* 44:483–488.
168. Becerra-Castro C, Machado AR, Vaz-Moreira I, Manaia CM. 2015. Assessment of copper and zinc salts as selectors of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Sci Total Environ.* 530–531:367–372.
169. Bradu P, Biswas A, Nair C, et al. 2022. *Environmental Science and Pollution Research* Recent advances in green technology and Industrial Revolution 4.0 for a sustainable future. 1:1–32.

ŽIVOTOPIS

Ivanka Batarilo je rođena 3. rujna 1960. u Bugojnu, Bosna i Hercegovina, gdje je završila osnovno i srednjoškolsko obrazovanje. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirala je 1986. godine. U periodu 1996.-2000. specijalizira Medicinsku mikrobiologiju s parazitologijom.

Od 2001. do kolovoza 2003. osniva mikrobiološki laboratorij u Zavodu za javno zdravstvo Ličko-Senjske županije u Gospiću, a od 2003. započinje s osnivanjem Odjela za mikrobiologiju u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu u Zagrebu gdje radi do danas na mjestu voditelja. Osim rutinskog rada sudjeluje u validacijama metoda i u izobrazbi zaposlenih djelatnika.

Vanjski je suradnik Banka Tkiva za područje mikrobiološke sigurnosti pohranjenog humanog tkiva.

Sudjelovala je u izradi Smjernica za rad Hrvatskog embriološkog društva. Aktivno sudjeluje na domaćim i međunarodnim znanstvenim i stručnim skupovima te tečajevima trajne edukacije.

Nakon sudjelovanja u pet tečaja European Compliance Academy (ECA) dobila je certifikat Quality Control Manager.

Članica je Hrvatskog mikrobiološkog društva, Hrvatskog društva kliničke mikrobiologije, Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog katoličkog liječničkog društva, Hrvatskog liječničkog zbora.

BIBLIOGRAFIJA AUTORA

POPIS OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

1. Batarilo I, Maravić-Vlahoviček G, Bedenić B, Kazazić S, Bingulac- Popović J, Slade-Vitković M, Katić S, Jukić I. Oxacillinases and antimicrobial susceptibility of *Ralstonia pickettii* from pharmaceutical water systems in Croatia. Letters in applied microbiology, 75 (2022), 1; 103-113 doi:10.1111/lam.13711.
2. Slade-Vitković M, Bedenić B, Bielen L, Batarilo I, Kibel S, Maravić-Vlahoviček G. In vitro killing of multidrug/ extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* by fosfomycin alone or in combination with antipseudomonal antibiotics, J Chemother, (2022),1-12. doi: 10.1080/1120009X.2022.2108247. [Online ahead of print]
3. Tominac Trcin M, Zdraveva E, Dolenc T, Vrgoč Zimić I, Bujić Mihica M, Batarilo I, Dekaris I, Blažević V, Slivac I, Holjevac Grgurić T, et al. Poly(ϵ -caprolactone) Titanium Dioxide and Cefuroxime Antimicrobial Scaffolds for Cultivation of Human Limbal Stem Cells. Polymers, 12 (2020), 8; 1758, 26 doi:10.3390/polym12081758.
4. Vuk T, Barišić M, Hećimović A, Rukavina L, Batarilo I, Šarlija D, Jukić I. Bacterial contamination of blood products at the Croatian Institute of Transfusion Medicine: results of eleven year monitoring. Transfusion medicine, 1 (2012) doi:10.1111/j.1365-3148.2012.01190.
5. Jukić I, Bingulac-Popović J, Đogić V, Hećimović A, Babić I, Batarilo I, Maglov Č, Šturm D. Evaluation of ABO blood groups as a risk factor for myocardial infarction. Blood Transfusion, 10 (2012), 3; 321-489 doi:10.2450/2012.0065-12.

KONGRESNA PRIOPĆENJA

1. Slade M, Bielen L, Bader N, Maravić-Vlahoviček G., Batarilo I, Bedenić B. The in vitro effect of fosfomycin alone and in combination with antipseudomonal antibiotics on inhibition and disruption of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, European congress for clinical microbiology and infectious diseases, Copenhagen, Knjiga sažetaka (2023), 636/P0955, (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
2. Slade M, Bader N, Bielen L, Batarilo I, Kibel S, Maravić-Vlahoviček G. Bedenić B. Synergistic activity of fosfomycin in combination with antipseudomonal antibiotics against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* with various resistance phenotypes, European

- congress for clinical microbiology and infectious diseases, Lisabon, Portugal, Knjiga sažetaka (2022), P0778, (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
3. Puljić D, Zekušić M, Vučemilo T, Jularić A, Skoko M, Bujić Mihica M, Vrgoč Zimić I, Dolenc T, Vidović D, Babić S, Batarilo I. i suradnici. Tkivno bankarstvo: obrada spongioznog koštanog tkiva dobivenog iz glave femura živih darivatelja, Hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem Pula, Zbornik sažetaka (2022) str. 260-261 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).
 4. Zekušić M, Bujić Mihica M, Dolenc T, Skoko M, Jularić A, Puljić D, Vrgoč Zimić I, Boranić M, Tomičić H, Kljenak A, Batarilo I. et al. Clinical application of cultured keratinocytes as advanced therapy medicinal products: a twenty-year experience in Croatia, 12th ISABS CONFERENCE on Forensic and Anthropological Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, Dubrovnik, Book of abstract (2022) str. 213-213 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
 5. Mia S, Batarilo I, Gulan Harcet J, Ljubičić J, Jukić I. Skrining koncentrata trombocita prikupljenih aferezom u periodu od studenog 2019. do rujna 2021. – rezultati, 8. Hrvatski transfuziološki kongres, Zagreb, Liječnički vjesnik (2021), str. 90-91 (predavanje, domaća recenzija, sažetak, stručni).
 6. Slade M, Batarilo I, Vuk T, Jukić I. Može li krvni pripravak biti uzrokom infekcije? Bakterijska kontaminacija krvnih pripravaka - rezultati praćenja u HZTM za period 2008.- CROCMID 2019. Split, Knjiga sažetaka (2019), str. 178-178 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).
 7. Batarilo, Ivanka; Slade, Mia; Jukić, I. Pregledom sedimenta urina do dijagnoze enterobijaze među članovima obitelji - Prikaz slučaja, CROCMID 2019. Split, Knjiga sažetaka (2019) str. 304-304 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).
 8. Dolenc T, Bujić Mihica M, Vrgoč Zimić I, Batarilo I, Ulamec M, Rac D, Puljić Z, Rukavina L, Demirović A, Tominac Trein M. Introducing a new tissue banking activity - processing of cadaveric skin, 28th Congress of European Association of Tissue and Cell Banks, Leiden, Abstract Book (2019) str. 70-71 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
 9. Đidara I, Batarilo I, Rukavina L. Mikrobiološka kontrola radnog okoliša u svrhu smanjivanja rizika bakterijske kontaminacije krvnih pripravaka, 12. međunarodni kongres HDMSARIST-a, Šibenik, Knjiga sažetaka (2019), (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).

10. Batarilo I, Maravić-Vlahoviček G, Bedenić B, Bingulac Popović J, Slade M, Đogić V, Kazazić S, Jukić I. Susceptibility to β -lactam antibiotics and presence of blaOXA22 and blaOXA60 genes in *Ralstonia pickettii* strains in Croatia, CESAR, Sv. Martin na Muri, Knjiga sažetaka (2018) str. 101-101 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
11. Slade M, Batarilo I, Jukić I. *Enterobacter cloacae* u koncentratu trombocita 7. Hrvatski transfuziološki kongres, Zagreb, Liječnički vjesnik, (2017) str. 38-39 (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni).
12. Đidara I, Batarilo I, Slade M, Rukavina L, Šnajder-Šajatović M, Jukić I. Kontrola radne okoline u Odsjeku za savjetovanje, uzimanje i transport krvi, rezultati petogodišnjeg praćenja, 6. Stručni sastanak medicinskih sestara i tehničara u transfuzijskoj medicini; Biograd n/m, Knjiga sažetaka, (2017), (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni).
13. Tominac Trein M, Barčot Z, Škarić I, Kralj R, Grbavac J, Batarilo I, Vrgoč I, Dolencec T, Munjiza A. Initial Experience with the First Application of Allogenic Skin Grafts for Acute Burns in Croatia, European Burns Association (EBA), Barcelona, Abstract book (2017) (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
14. Rukavina L, Batarilo I, Slade M, Đidara I, Šnajder-Šajatović M. Metode i obrada uzoraka iz Banke tkiva, 7. Hrvatski kongres laboratorijske dijagnostike s međunarodnim sudjelovanjem, Poreč, Knjiga sažetaka (2017), (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni).
15. Batarilo I, Slade M, Strauss Patko M, Liker M, Jukić I. The most common isolates of microbiological environmental monitoring in the blood production department in the Croatian Institute of transfusion medicine, ISBT, Copenhagen, Vox Sanguinis (2017), str. 181-181 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).
16. Kušnjer A, Batarilo I, Rukavina L, Štilinović M. Mikrobiološko opterećenje pročišćene vode korištene u proizvodnji parenteralnih pripravaka u farmaceutskoj djelatnosti Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, Šibenik, Knjiga sažetaka (2016). str. 80-80 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).
17. Jurakovic-Loncar N, Safic H, Dogic V, Bingulac-Popovic J, Stojic Vidovic M, Miletic Lovric M, Batarilo I, Strauss-Patko M, Jukic I. Hepatitis B window period infection in blood donor detected by id-nat testing: case report, ISBT 2016, Dubai, Vox Sanguinis (2016) str. 170-170 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, ostalo).
18. Batarilo I, Saftić R, Gulan Harcet J, Strauss Patko M, Slade M, Jukić I. Can *Staphylococcus epidermidis* from blood products be dangerous for patients subjected to arthroplasty? The importance of communication between blood bank and clinician, ISBT, London, Vox sanguinis (2015) str. 109-109 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, ostalo).

19. Vrgoc I, Bujic M, Dolenc T, Zmis G, Jevak M, Tominac Trcin M, Batarilo I. Viable Environmental Monitoring (EM) of ATMP Production Facility at Tissue Bank, UHC Sestre milosrdnice, 25th Congress of European Association of Tissue Banks, Split, Abstract book (2015) (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
20. Vuk T, Očić T, Batarilo I, Balija M, Šarlija D, Jukić I. The risk of transfusion transmitted bacterial infections in Croatia – results of fourteen-year survey. 16th International Haemovigilance seminar (2014), Blood transfusion (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
21. Slade M, Batarilo I, Cipek V, Maglov Č. Mikrobiološki nadzor radne okoline u odsjeku za savjetovanje, uzimanje i transport krvi (DUT). 6. Hrvatski kongres hematologa i transfuziologa, Liječnički vjesnik (2014), Rovinj, Hrvatska, (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni).
22. Batarilo I. Čisti i kontrolirani prostori - Osoblje. 6. Hrvatski kongres hematologa i transfuziologa, Liječnički vjesnik (2014) Rovinj, Hrvatska, (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni).
23. Rukavina L, Batarilo I, Mikrobiološka kontrola okoliša u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, 6. Hrvatski kongres hematologa i transfuziologa, Liječnički vjesnik (2014) Rovinj, Hrvatska, (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni).
24. Štilinović M, Batarilo I, Šalov J, Lovre R, Piškor J, Vojvoda E, Đidara I, Schenner S, Jukić I. Mikrobiološka kontrola uvjeta rada u odsjeku za mikrobiologiju u farmaceutskoj djelatnosti HZTM-a, 2. kongres zdravstvenih radnika za medicinsko-laboratorijsku djelatnost, Zagreb, Knjiga sažetaka (2014), (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni).
25. Batarilo I, Strauss Patko M, Maglov Č, Jukić I. Microbiological environmental monitoring in blood components production department and blood collection department, ISBT 2012, Cancun, Vox sanguinis (2012) str. 178-178 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).
26. Hajtić K, Batarilo I, Rukavina L. Biološki indikatori u kontroli sterilizacije, 4. Hrvatski kongres laboratorijske dijagnostike, Opatija, Knjiga sažetaka (2012), (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni).
27. Vojvoda E, Hajtić K, Rukavina L, Cipek V, Batarilo I. Mikrobiološki nadzor radne okoline u Odsjeku za savjetovanje, uzimanje i transport krvi, 5. hrvatski kongres hematologa i transfuziologa, Zagreb, Liječnički vjesnik (2012) str. str. 188-188 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).

28. Batarilo I. Praćenje čistih i kontroliranih prostora, 5. hrvatski kongres hematologa i transfuziologa, Liječnički vjesnik 134 (2012), str. 145-145 (međunarodna recenzija, ostalo, stručni).
29. Vuk T, Batarilo I, Hećimović A, Jukić I, Lažno pozitivni rezultati mikrobiološkog ispitivanja krvnih pripravaka primjenom sustava Bact/Alert, 5. hrvatski kongres hematologa i transfuziologa, Liječnički vjesnik 134 (2012), str. 149-149 (poster, domaća recenzija, sažetak, ostalo).
30. Jukić I, Bingulac Popović J, Đogić V, Hećimović A, Babić I, Batarilo I, Maglov Č, Ispitivanje ABO krvne grupe kao čimbenika rizika za infarkt miokarda, 5. hrvatski kongres hematologa i transfuziologa, Liječnički vjesnik 134 (2012), str. 77-78 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).
31. Balija M, Herceg M, Očić T, Vuk T, Jukić I, Babić I, Batarilo I, Bingulac-Popović J, Bosanac I, Đogić V, et al. Koraci u razvoju i implementaciji nacionalnog informatičkog sustava e-Delphyn, 5. hrvatski kongres hematologa i transfuziologa, Liječnički vjesnik 134 (2012) (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni).
32. Vuk T, Barišić M, Hećimović A, Rukavina L, Batarilo I, Jukić I, Bakteriološka kontrola krvnih pripravaka u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu - 11-godišnjeg praćenja, 5. hrvatski kongres hematologa i transfuziologa, Liječnički vjesnik 134 (2012) . str. 70-71 (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni).
33. Batarilo I, Šarlija D, Straus-Patko M, Jukić I. Rezultati mikrobiološkog nadzora u Odsjeku za proizvodnju krvnih pripravaka Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, 5. Hrvatski kongres hematologa i transfuziologa, Zagreb, Liječnički vjesnik (2012), (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni).
34. Batarilo I, Šarlija D, Straus-Patko M, Jukić I. Results of Microbiological Environmental Monitoring of Blood Production Department in Croatian Institute of Transfusion Medicine, ISBT 2011, Lisabon, Vox Sanguinis, str. 228-228 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).
35. Batarilo I, Šarlija D, Vuk T, Jukić I, The Role of Microbiology Laboratory in the Environmental Monitoring Program on Blood Collection and Blood Components Production - Experience Acquired at Croatian Institute of Transfusion Medicine, 12th International Haemovigilance Seminar, Dubrovnik, Blood Transfusion (2010) str. 52-53 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).

36. Kušnjer A, Sokolić K, Batarilo I, Šarlija D. Ispitivanje sterilnosti (steritest) parenteralnih otopina u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, kongres HLU, Šibenik, Knjiga sažetaka (2010), (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni).
37. Glamuzina I, Batarilo I, Šarlija D, Rukavina L, Vuković I. Postupak mikrobiološkog ispitivanja uzoraka krvi i krvnih pripravaka na prisustvo bakterija u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, 2. međunarodni kongres HDMSARIST, Šibenik, Knjiga sažetaka (2010), (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni).
38. Batarilo I, Šarlija D, Vuk T, Jukić I. Microbiological Control of Personnel Hands - Swab or Finger Prints, XIXth Regional Congress eastern mediterranean & Europe, Cairo, Vox Sanguinis (2009) str. 97-97 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
39. Rukavina L, Sokolić K, Vuković I, Glamuzina I, Kušnjer A, Batarilo I. Mikrobiološka kontrola uvjeta aseptičkog rada, 2. kongres hrvatske udruge lab. medicine, Mali Lošinj, Knjiga sažetaka (2009) str. 29-29 (poster, domaća recenzija, sažetak, ostalo).
40. Batarilo I, Kušnjer A, Šarlija D, Jukić I. Prikaz Odjela za mikrobiologiju u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, - 1. kongres hrvatske udruge laboratorijske medicine, Rovinj, Knjiga sažetaka (2008) str. 48-48 (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni).
41. Bingulac-Popović J, Đogić V, Babić I, Hundrić-Hašpl Ž, Mratinović-Mikulandra J, Batarilo I, Balija M, Jukić I. Distribution of weak D Types in Croatian Population, ISBT 2008, Vox Sanguinis (2008) str. 210-210 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
42. Vuk T, Batarilo I, Šarlija D, Balija M, Jukić I. False-positive blood cultures during bacterial screening of blood components using bact/alert system, ISBT 2008, Vox Sanguinis (2008) str. 308-308 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
43. Vuk T, Batarilo I, Balija M, Jukić I. Rezultati mikrobiološke kontrole koncentrata trombocita u HZTM 1999-2006, 4. hrvatski kongres hematologa i transfuziologa, Opatija, Liječnički vjesnik (2007), str. 91-91 (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni).
44. Glamuzina I, Vuković I, Rukavina L, Batarilo I, Tomislav V, Šarlija D, Jukić I, Usporedba dviju metoda mikrobiološke kontrole ruku, 4. hrvatski kongres hematologa i transfuziologa, Opatija, Liječnički vjesnik (2007), str. 123-123 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, ostalo).
45. Batarilo I, Sviben M, Horvat-Krejči, Dubravka; Puzović, Marko; Šarlija, Dorotea; Jukić Irena, *Acanthamoeba* in Conveyor Moistening Water, Power of microbes in industry and environment, Zadar, Knjiga sažetaka (2007). str. 91-91 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).

46. Barišić Z, Sardelić S, Zoranić V, Batarilo I, Carev M, Punda-Polić V. Species identification and antibiotic susceptibility of clinical isolates of enterococci isolated from hospitalized patients and outpatients in Split and Dalmatia County, ECCMID 1999, Berlin Clinical Microbiology and Infection, 5 (1999), str. 325-325 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

POPIS KRATICA

- ANI** – Average Nucleotide Identity (prosječna istovjetnost nukleotida)
- CFU** – Colony Forming Unit (jedinica za formiranje kolonija)
- CIM** – Carbapenemase Inhibition Method (metoda inhibicije karbapenemazom)
- CLSI** – Clinical and Laboratory Standards Institute (Institut za kliničke i laboratorijske standarde)
- CNS** – Central Nervous System (središnji živčani sustav)
- CSE** – Control Standard Endotoxin (kontrolni standardni endotoksin)
- DD** – Disk difuzija
- EARSS** – European Antimicrobial Resistance Surveillance System (europski sustav za nadgledanje rezistencije na antibiotike)
- EMB agar** -Eosine-Methylen Blue agar (agar s eozinom i metilenskim plavim)
- EPS** – Extracellular Polymeric Substance (IPS – izvanstanična polimerna supstanca)
- ESBL** – Extended Spectrum Beta Lactamase (beta-laktamaze proširenog spektra)
- EU** – Endotoxin Unit (jedinica endotoksina)
- EUCAST** – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Europski odbor za antimikrobno ispitivanje osjetljivosti)
- FDA** – Food and Drug Administration (uprava za hranu i lijekove)
- JPB** – Jaki proizvođač biofilma
- LAL** – Limulus Amebocyte Lysate test (test lizata amebocita raka bodljaša)
- LPG** – Low Gelling Point (niska točka geliranja)
- MALDI-TOF** – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (matriksom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom - analizator masa vremenom leta)
- MDR** – Multi Drug Resistance (otpornost na više lijekova)
- MIK** – Minimalna inhibitorna koncentracija
- NPB** – Neproizvođač biofilma
- OD** – Optical Density (optička gustoća)
- OD_c** – Optical Density Cut-off value (prijelomna točka optičke gustoće)
- OMV** – Outer Membrane Vesicles (opna vanjske stijenke)
- PBP** – Penicillin Binding Protein (protein koji veže penicilin)
- PCR** – Polymerase Chain Reaction (lančana reakcija polimeraze)
- PFGE** – Pulsed-Field Gel Electrophoresis (gel elektroforeza u pulsirajućem polju)
- R** – Rough (hrapavo)
- RSE** – Referent Standard Endotoxin (referentni standardni endotoksin)
- S** - Smooth (glatko)
- SIM** – Sulfide Indole Motility (sulfid indol pokretljivost)
- SPB** – Slabi proizvođač biofilma
- TLR** – Toll-Like Receptor (receptor domaćina)
- TTSS** – Type III Secretion System (sekrecijski sustav tipa III)
- UPB** – Umjereni proizvođač biofilma

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

FENOTIPSKA SVOJSTVA I OTPORNOST NA ANTIBIOTIKE SOJEVA BAKTERIJE *RALSTONIA PICKETTII* IZ SUSTAVA ZA ULTRAČISTU VODU

Ivanka Batarilo

SAŽETAK

Studije o antimikrobnoj osjetljivosti i sustavnom praćenju *Ralstonia pickettii* u bolničkom okruženju vrlo su ograničene jednako kao i istraživanja okolišnih izolata *R. pickettii*, posebice na većem broju izolata. Ispitivanje rezistencije *R. pickettii* na antibiotike nije standardizirano. Ovo ispitivanje provedeno je s ciljem utvrđivanja svojstava i osjetljivosti na antibiotike izolata *R. pickettii* s područja Republike Hrvatske. U petogodišnjem periodu prikupljen je 81 izolat s dva geografska područja RH, iz različitih industrijskih sustava za farmaceutsku ultračistu vodu i laboratorijsku pročišćenu vodu. Osjetljivost na antibiotike ispitana je E-testom i disk difuzijskim testom. Lančanom reakcijom polimeraze ispitano je prisustvo gena *bla_{OXA22}* i *bla_{OXA60}* za oksacilinaze, gena *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, i *bla_{NDM}* za metalo- β -laktamazu, gena *bla_{OXA48}* za hidrolizirajuću karbapenemazu, gena *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtD* za 16S rRNA metil-transferaze i gena *aac(3')-II*, *aac(6')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *ant(2'')* za aminoglikozid-modificirajuće enzime. Metodom konjugacije nije dokazan prijenos gena rezistencije na meropenem i gentamicin s *R. pickettii* na primatelja *E. coli* J53 koja je bila osjetljiva na ta dva antibiotika, a rezistentna na natrijev azid. Gel elektroforezom u pulsirajućem polju dobivena je velika srodnost izolata i identificirana su tri glavna klastera koji sadrže podklastera. Dobiveni su različiti profili osjetljivosti/otpornosti. Većina izolata bila je otporna na kolistin, aztreonam, ertapenem, aminoglikozide i meropenem. Visoke stope rezistencije uočene su i kod tikarcilin/klavulanske kiseline, tikarcilina, amoksisicilin/klavulanske kiseline i ampicilina. S druge strane ispitivani izolati su pokazali visoke stope osjetljivosti na tetracikline, tigeciklin, trimetoprim-sulfametoksazol, imipenem, cefepime, cefaleksin, cefoksitin, cefotaksim, piperacilin-tazobaktam, ciprofloksacin, ceftazidime i piperacilin. Modificirani Hodge test bio je pozitivan u 51,9% izolata. Gen *bla_{OXA22}* je otkriven u 37,0% izolata, a gen *bla_{OXA60}* u 80,3% izolata. Tako visoka prisutnost gena *bla_{OXA22}* i *bla_{OXA60}* ukazuje kako "sterilna" voda može predstavljati golemi rezervoar gena rezistencije koji se, onda primjenom iste, mogu prenijeti u kliničko okruženje i predstavljati prijetnju uspješnom liječenju infekcija. Nisu detektirani geni za metalo- β -laktamaze, karbapenemaze, najčešće 16S rRNA metil-transferaze niti za aminoglikozid-modificirajuće enzime. U izolatima je dokazano prisustvo endotoksina. Dokazana je pokretljivost plivanja i trzanja, proizvodnja izvan stanične polimerne supstance te sposobnost proizvodnje biofilma. *R. pickettii* treba shvatiti ozbiljno kao mogućeg uzročnika nozokomijalnih infekcija kako bi se osigurala odgovarajuća terapija, spriječio razvoj rezistentnih sojeva i smanjila mogućnost njezinog preživljavanja u sustavima za čistu, ultra čistu i laboratorijsku pročišćenu vodu.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 121 stranica, 33 slike, 20 tablica, 169 literaturnih navoda; izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Ralstonia pickettii*, osjetljivost na antibiotike, *bla_{OXA22}* i *bla_{OXA60}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, i *bla_{NDM}*, *bla_{OXA48}*, *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtD*, *aac(3')-II*, *aac(6')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *ant(2'')*, pokretljivost, biofilm, endotoksin

Mentor: Dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček, izvanredni profesor, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Ivan Kosalec, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Prof. dr. sc. Ana-Marija Domijan, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Dr. sc. Jasna Bingulac Popović, znanstvena savjetnica, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb

Rad prihvaćen: 3.srpnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral Thesis

PHENOTYPIC PROPERTIES AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *RALSTONIA PICKETTII* STRAINS FROM HIGH-PURITY WATER SYSTEMS

Ivanka Batarilo

SUMMARY

Studies on antimicrobial susceptibility and systematic monitoring of *Ralstonia pickettii* in the hospital environment are very limited, as well as research on environmental isolates of *R. pickettii*, especially on a larger number of isolates. The aim of this study was to determine the properties and antibiotic susceptibility of *R. pickettii* isolates from the Republic of Croatia. In a five-year period, 81 isolates were collected from two geographical areas of the Republic of Croatia, from different industrial systems for pharmaceutical ultrapure water and laboratory purified water. Susceptibility to antibiotics was tested by E-test and disk diffusion test. The presence of genes *bla*_{OXA22} and *bla*_{OXA60} for oxacillinases, genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, and *bla*_{NDM} for metallo- β -lactamase, gene *bla*_{OXA48} for hydrolyzing carbapenemase, genes *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtD* for 16S rRNA methyltransferases and genes *aac(3')-II*, *aac(6')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *ant(2'')* for aminoglycoside-modifying enzymes was tested by polymerase chain reaction. The modified Hodge test was positive in 51.9% of the isolates. The *bla*_{OXA22} gene was detected in 37.0%, and *bla*_{OXA60} gene in 80.3% isolates. Genes for metallo- β -lactamases, carbapenemases, the most common 16S rRNA methyl-transferases and aminoglycoside modifying enzymes were not detected. The conjugation method did not detect transfer of resistance genes to the meropenem and gentamicin from *R. pickettii* to the recipient *E. coli* J53, which was sensitive to those two antibiotics and resistant to sodium azide. Pulsed-field gel electrophoresis showed high relatedness of the isolates and three major clusters containing subclusters were identified. Different susceptibility/resistance profiles were detected. Most isolates were resistant to colistin, aztreonam, ertapenem, aminoglycosides and meropenem. High rates of resistance were also observed for ticarcillin/clavulanic acid, ticarcillin, amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin. On the other hand, the tested isolates showed high susceptibility rates to tetracycline, tigecycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, imipenem, cefepime, cephalexin, cefoxitin, cefotaxime, piperacillin-tazobactam, ciprofloxacin, ceftazidime and piperacillin. High presence of *bla*_{OXA22} and *bla*_{OXA60} genes indicates that "sterile" water can represent a large reservoir of resistance genes. When such water is used in clinical setting, it could pose a threat to the successful treatment of infections. The presence of endotoxin was detected. Swimming and twitching motility, the production of extracellular polymeric substances and the ability to produce biofilms were confirmed. *R. pickettii* should be taken seriously as a possible cause of nosocomial infections to ensure adequate therapy, to prevent the development of resistant strains and to reduce the survival of *R. pickettii* in clean and ultra clean water systems.

Thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 121 pages, 33 figures, 20 tables, 169 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Ralstonia pickettii*, antibiotic susceptibility, *bla*_{OXA22} and *bla*_{OXA60}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA48}, *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtD*, *aac(3')-II*, *aac(6')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *ant(2'')*, motility, biofilm, endotoxin

Supervisor: Gordana Maravić Vlahoviček, **Ph.D.**, Associate Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb

Reviewers: Ivan Kosalec, **Ph.D.**, Full professor Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb
Ana-Marija Domijan, **Ph.D.**, Full professor Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb
Jasna Bingulac Popović, **Ph.D.**, Scientific advisor, Croatian institute of Transfusion Medicine

Thesis accepted: 3st July 2023