



**UNIwersYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Bydgoszcz 2026 r.



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Mgr Dagmara Depka-Radzikowska

**Charakterystyka genotypowa czynników wirulencji i oporności na
karbapenemy klinicznych szczepów *Acinetobacter baumannii*
z oceną metod wykrywania karbapenemaz**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk
o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne**

Promotor:

Prof. dr hab. n. med. Eugenia Gospodarek-Komkowska

Promotor pomocniczy:

Dr n. med. Tomasz Bogiel

Bydgoszcz 2026 r.

Podziękowania

Serdeczne podziękowania składam Promotor niniejszej rozprawy doktorskiej, Pani Profesor dr hab. n. med. Eugenii Gospodarek-Komkowskiej, za nieocenione wsparcie merytoryczne, cenne wskazówki, życzliwość oraz motywację okazywane na każdym etapie realizacji pracy.

Wyrazy wdzięczności kieruję również do Promotora pomocniczego, Pana dr. n. med. Tomasza Bogiel, za wsparcie merytoryczne, inspirację do rozwoju naukowego oraz motywację towarzyszącą mi od początku mojej drogi naukowej.

Dziękuję wszystkim Koleżankom i Kolegom z Katedry Mikrobiologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz z Zakładu Mikrobiologii Klinicznej Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. dr. Antoniego Jurasza w Bydgoszczy za życzliwość, okazaną pomoc, przekazaną wiedzę oraz wsparcie w realizacji badań.

Szczególne podziękowania składam Mężowi, Synkowi i Rodzicom za nieustanną wiarę w moje możliwości, cierpliwość, wyrozumiałość i wsparcie, bez których ukończenie tej pracy nie byłoby możliwe.

SPIS TREŚCI

1.	WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	6
2.	WSTĘP	8
2.1.	Charakterystyka pałeczek <i>Acinetobacter baumannii</i>	8
2.1.1.	Klasyfikacja i rys historyczny	8
2.1.2.	Występowanie i cechy biologiczne	9
2.1.3.	Czynniki wirulencji i patogenezę zakażeń	9
2.1.4.	Mechanizmy oporności na antybiotyki	12
2.1.5.	Mechanizmy oporności na karbapenemy	13
2.1.6.	Epidemiologia i postaci zakażeń wywoływanych przez <i>Acinetobacter baumannii</i>	14
2.1.7.	Leczenie zakażeń wywoływanych przez pałeczki <i>Acinetobacter baumannii</i>	15
3.	CEL BADAŃ	17
4.	WYKAZ PUBLIKACJI TWORZĄCYCH CYKL Z OPISEM BIBLIOGRAFICZNYM	19
5.	MATERIAŁ I METODY BADAWCZE	20
5.1.	Materiał kliniczny	20
5.2.	Identyfikacja i ocena antybiotykowrażliwości pałeczek <i>Acinetobacter baumannii</i>	20
5.3.	Metody stosowane w poszczególnych publikacjach	21
5.4.	Analiza statystyczna	22
6.	OPIS WYNIKÓW UJĘTYCH W PUBLIKACJACH WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU	23
7.	WNIOSKI I PODSUMOWANIE	26
7.1.	Wnioski	26
7.2.	Podsumowanie	26
8.	STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	29
9.	ABSTRACT	31
10.	BIBLIOGRAFIA	33
11.	ŻYCIORYS NAUKOWY	39
12.	KOPIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU	42
12.1.	Publikacja nr 1	42
12.2.	Publikacja nr 2	63
12.3.	Publikacja nr 3	76
13.	OŚWIADCZENIA AUTORA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	89

14. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW	92
15. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ	103

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

CHDL	beta-laktamazy klasy D hydrolizujące karbapenemy (ang. carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamases)
CIM	metoda inaktywacji karbapenemów (ang. carbapenem inactivation method)
CPS	polisacharyd otoczkowy (ang. capsular polysaccharide)
CRAb	szczepy <i>Acinetobacter baumannii</i> odporne na karbapenemy (ang. carbapenem-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i>)
EPS	zewnątrzkomórkowa substancja polimerowa (ang. extracellular polymeric substances)
IS	sekwencje insercyjne (ang. insertion sequences)
LOS	lipooligosacharyd (ang. lipooligosaccharide)
MBL	metalo-beta-laktamazy (ang. metallo-beta-lactamases)
MDR	szczep wieloantybiotykooporny (ang. multidrug-resistant)
MGE	mobilne elementy genetyczne (ang. mobile genetic elements)
NDM-1	New Delhi metalo-beta-laktamaza-1 (ang. New Delhi metallo-beta-lactamase)
OIT	oddział intensywnej terapii
OMP	białka błony zewnętrznej (ang. outer membrane proteins)
OMV	pęcherzyki błony zewnętrznej (ang. outer membrane vesicles)
OXA	oksacylinazy (ang. oxacillinases)
PBP	białka wiążące penicylinę (ang. penicillin binding proteins)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction)
PDR	szczepy odporne na wszystkie antybiotyki (ang. pan-drug-resistant)
real-time PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. real-time polymerase chain reaction)

VAP	zapalenie płuc związane z wentylacją mechaniczną (ang. ventilator-associated pneumonia)
XDR	szczepy o rozszerzonej oporności na antybiotyki (ang. extensively drug resistance)

2. WSTĘP

2.1. Charakterystyka pałeczek *Acinetobacter baumannii*

2.1.1. Klasyfikacja i rys historyczny

Bakterie z rodzaju *Acinetobacter* zostały po raz pierwszy opisane w 1911 r. przez duńskiego mikrobiologa Beijerincka. Wyizolowany wówczas przez siebie drobnoustrój z gleby zaklasyfikował on do rodzaju *Micrococcus* i nadał nazwę *Micrococcus calco-aceticus* [1]. W kolejnych latach taksonomia tych bakterii pozostawała niejasna i przypisywano je do różnych rodzajów, np. *Alcaligenes*, *Mima*, *Moraxella*, *Achromobacter*. W 1954 r. Brisou i Prevot zaproponowali podział rodzaju *Achromobacter* na gatunki zdolne i niezdolne do ruchu; te nieruchliwe nazwali *Acinetobacter* (gr. ακινετος [akinetos] – nie poruszające się) [2]. Nazwa ta została zaakceptowana dopiero w 1968 r., po pojawieniu się publikacji amerykańskiego mikrobiologa Paula Baumanna, która dotyczyła oceny cech odżywczych i biochemicznych oksydazo-ujemnych pałeczek należących do grupy *Mima-Herellea-Acinetobacter*. Na podstawie wyników tych badań naukowcy zaklasyfikowali wszystkie oksydazo-ujemne bakterie z tej grupy do jednego rodzaju, o nazwie wcześniej zaproponowanej przez Brisou i Prevota – *Acinetobacter* [3]. W 1980 r. w „Approved List of Bacterial Names” wymienione zostały dwa gatunki tego rodzaju *A. calcoaceticus* i *A. lwoffii* [4]. Przełom w długiej i złożonej historii nomenklatury rodzaju nastąpił w 1986 r., kiedy Bouvet i Grimont opierając się na badaniach hybrydyzacji DNA-DNA, wyodrębnili 12 genogatunków, z których niektóre otrzymały formalne nazwy gatunkowe, w tym *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii* i *A. lwoffii* [5].

Według współczesnej taksonomii wyróżnia się ponad 100 gatunków należących do rodzaju *Acinetobacter*. Najistotniejszym pod względem klinicznym gatunkiem jest *A. baumannii*, który z uwagi na bliskie pokrewieństwo i trudności związane z różnicowaniem opartym na właściwościach fenotypowych, został zaklasyfikowany do *A. calcoaceticus-baumannii complex*. Ta grupa taksonomiczna obejmuje 6 gatunków: *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* (gatunek genomowy 13TU), *A. seifertii* i *A. lactucae* [6]. W tabeli nr 1 przedstawiono obowiązującą aktualnie klasyfikację gatunku *A. baumannii* [7].

Tabela 1. Klasyfikacja *A. baumannii*

Typ	Klasa	Rząd	Rodzina	Rodzaj	Gatunek
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. baumannii</i>

2.1.2. Występowanie i cechy biologiczne

Pałeczki *A. baumannii* są rozpowszechnione w przyrodzie, występują w wodzie, glebie, na roślinach i w ściekach. Można je również wyizolować ze skóry i jelit zdrowych ludzi lub zwierząt. Są rozpowszechnione w środowisku szpitalnym [8].

A. baumannii to Gram-ujemne ziarniako-pałeczki, czasem tworzące układy popodziałowe w postaci dwoinek. W fazie logarytmicznego wzrostu przyjmują postać pękatych pałeczek, natomiast często w fazie stacjonarnej wykazują kształt kokoidalny (ziarniaków). Wielkość ich komórek waha się między 1,0-1,5 μm x 1,5-2,5 μm . Często podczas barwienia metodą Grama wybarwiają się nieregularnie, co jest cechą typową dla różnych przedstawicieli rodziny *Moraxellaceae* [7,9]. Są nieruchliwe, jednak część szczepów, pomimo braku rzęsek, wykazuje ruch drgający (ang. twitching motility) po powierzchniach stałych, który jest zależny od użycia pili typu IV [10] oraz ruch określany zwrotem „rojny” (ang. swarming) polegający na skoordynowanym, wielokomórkowym przemieszczaniu się bakterii. Zdolność ta pozwala bakteriom na szybkie rozprzestrzenianie się, zwłaszcza w środowisku szpitalnym (np. na cewnikach, powierzchniach urządzeń) i kolonizację nowych nisz [11]. Przedstawiciele gatunku *A. baumannii* nie wytwarzają przetrwalników [9].

Pałeczki należące do rodzaju *Acinetobacter* mają niewielkie wymagania pokarmowe. Są to prototrofy, wyrastają na ubogich podłożach i mogą wykorzystywać wiele różnych związków organicznych jako źródło węgla i energii. Optymalna temperatura wzrostu szczepów *A. baumannii* to 37°C. Optymalne pH do rozwoju wynosi 6,5, jednak mogą wyrastać w zakresie pH 5,0 – 8,0. Na agarze z krwią baranią, po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C tworzą białawe, wypukłe kolonie o średnicy 1,5 – 3 mm. Niektóre szczepy wytwarzające otoczkę wyrastają w postaci śluzowych kolonii [7].

Główne cechy biochemiczne umożliwiające różnicowanie *A. baumannii* z innymi tlenowymi pałeczkami Gram-ujemnymi to: utlenianie glukozy, ksylozy, laktozy oraz brak wytwarzania oksydazy cytochromowej [12].

2.1.3. Czynniki wirulencji i patogenesa zakażeń

Pałeczki *A. baumannii* dysponują czynnikami wirulencji stanowiącymi wyspecjalizowane mechanizmy i struktury, które umożliwiają kolonizację tkanek gospodarza, wywoływanie zakażeń miejscowych i ogólnoustrojowych, unikanie mechanizmów obronnych gospodarza oraz przetrwanie w różnych warunkach środowiskowych. Najbardziej charakterystycznym

składnikiem błony zewnętrznej pałeczek Gram-ujemnych jest lipopolisacharyd, jednak szczepy *A. baumannii* posiadają lipooligosacharyd (LOS), który ma krótszą strukturę oligosacharydową z powodu braku antygeny O w swojej budowie [13]. Wykazano, że występowanie LOS stymuluje wrodzoną odpowiedź immunologiczną gospodarza poprzez aktywację receptora Toll-like 4 [14]. Budowa LOS może zmieniać się w wyniku warunków stresowych i pozwala *A. baumannii* adaptować się do niskich temperatur [15].

Kolejną ważną determinantą zjadliwości jest polisacharyd otoczkowy (ang. capsular polysaccharide, CPS), który stanowi główny składnik otoczki bakteryjnej. Pośredniczy ona w unikaniu mechanizmów odpowiedzi immunologicznej gospodarza przez szczepy *A. baumannii* poprzez ograniczanie interakcji między immunogennymi strukturami powierzchniowymi bakterii, a mechanizmami obronnymi gospodarza. Obecność CPS zwiększa oporność tych bakterii na związki przeciwdrobnoustrojowe, w tym środki dezynfekcyjne [16]. Tolerancja *A. baumannii* na wysuszenie wynika z tzw. strategii „załamania lub rozkwitu” (ang. „bust or boom”), w której przetrwała subpopulacja komórek przeżywa kosztem obumierających komórek. CPS zwiększa ponadto tolerancję na wysuszenie, zapewniając fizyczną barierę ułatwiającą zatrzymywanie wody w komórce [17]. Udowodniono, że hiperwirulentny szczep *A. baumannii* AB5075 wytwarza warstwę CPS dwukrotnie grubszą niż ich mniej zjadliwe odpowiedniki [18].

Spośród czynników determinujących wirulencję pałeczek *A. baumannii* na szczególną uwagę, ze względu na swoje umiejscowienie, zasługują białka błony zewnętrznej (ang. outer membrane proteins, OMP) [19]. Spośród wielu białek OMP, najliczniej występują: OmpA, Omp 33-36 kDa, BauA, CarO, OprD-like, AbuO, TolB, DcaP, Oma87/BamA, NmRmpM, CadF i OprF [19–21]. Są one uwalniane wraz z innymi cząsteczkami tworzącymi błonę zewnętrzną w pęcherzykach błony zewnętrznej (ang. outer membrane vesicles, OMV) [22]. OMP umiejscowione na zewnątrz błony biorą udział w adhezji do komórek gospodarza, ich inwazji, mają również zdolność do aktywacji apoptozy i pełnią rolę w transporcie różnych cząsteczek, w tym antybiotyków do wnętrza komórki bakteryjnej [23]. U szczepów *A. baumannii* w błonie zewnętrznej najliczniej występuje białko OmpA. Fizjologicznie, jak wszystkie OMP, pełni ono rolę kanału porynowego dla małych cząsteczek, które dostają się do wnętrza komórki bakteryjnej. W patomechanizmie zakażenia czynnik ten oddziałuje na komórki układu immunologicznego gospodarza, m.in. poprzez stymulację wytwarzania reaktywnych form tlenu, co prowadzi do wczesnej apoptozy komórek gospodarza [24]. Białko Omp o masie

cząsteczkowej od 33 do 36 kDa (Omp 33-36) to poryna, działająca jako kanał umożliwiający przepływ wody. W komórkach gospodarza białko to indukuje apoptozę poprzez aktywację kaspaz i modulację zjawiska autofagii [25]. Wykrywano specyficzne przeciwciała IgM, IgA, IgG w surowicy wiążące białko Omp 34,4 kDa, co mogłoby wskazywać, że białko to może być markerem diagnostycznym w badaniach serologicznych wykrywających zakażenie o etiologii *A. baumannii* [26]. Wykazano również, że OMV uczestniczą w horyzontalnym transferze genów, w tym genów oporności na antybiotyki, do sąsiednich komórek bakteryjnych [27].

Celem przetrwania w środowisku o ograniczonym dostępie do żelaza niektóre drobnoustroje wykształciły systemy pozyskiwania żelaza – siderofory. Choć opisywane bakterie mogą wytwarzać kilka sideroforów, główny i najlepiej scharakteryzowany siderofor wytwarzany przez pałeczki *A. baumannii* to acinetobaktyna. Geny kodujące białka zaangażowane w biosyntezę (np. *basA*, *basB*, *basC* i *basD*) i transport (np. *bauA*, *bauC*, *bauD*) acinetobaktyny są zlokalizowane w obrębie jednego klastru genowego [25,26]. Wśród szczepów *A. baumannii* opisano różnorodność genetyczną w klastrach genów acinetobaktyny, co może być powiązane ze zróżnicowaną wirulencją przedstawicieli tego gatunku [28,29].

Jednym z głównych czynników pozwalających przetrwać *A. baumannii* w środowisku szpitalnym jest zdolność do wytwarzania biofilmu. Jest to struktura składająca się z drobnoustrojów przylegających do powierzchni otoczonych przez wytworzoną przez nie macierz złożoną z zewnątrzkomórkowej substancji polimerowej (ang. extracellular polymeric substances, EPS) [30]. Taka budowa umożliwia komórkom *A. baumannii* obronę przed działaniem układu odpornościowego oraz unikanie niekorzystnego wpływu środków dezynfekcyjnych czy antybiotyków [31]. Wytwarzanie biofilmu jest złożonym procesem, który można podzielić na 5 głównych etapów:

1. odwracalne przyleganie komórek bakteryjnych do powierzchni,
2. nieodwracalną adhezję za pomocą czynników związanych z powierzchnią komórki,
3. początkowe formowanie się biofilmu indukowane wytwarzaniem macierzy zewnątrzkomórkowej,
4. dojrzewanie biofilmu poprzez ciągły podział komórek bakteryjnych i wytwarzanie dodatkowych EPS,
5. rozproszenie komórek z biofilmu [32].

Każdy z tych etapów jest regulowany przez szereg czynników zewnętrznych i wewnętrznych, m.in.: OMP, pili, fimbrie, system komunikowania się komórek bakterii – quorum sensing, białko Bap [33].

Czynnikami, które wpływają bezpośrednio na strukturę błony komórek gospodarza są enzymy – hemolizyny (bezpośrednie i pośrednie), lipazy, proteazy i fosfolipazy. Szczepy *A. baumannii* mogą wytwarzać fosfolipazy C oraz D. Ich działanie polega na hydrolizie fosfolipidu wchodzącego w skład błony komórkowej eukariontów – fosfatydylocholiny. Hydroliza tego fosfolipidu powoduje zmianę przepuszczalności błony komórkowej gospodarza [34,35].

2.1.4. Mechanizmy oporności na antybiotyki

Pałeczki *A. baumannii* wykazują wysoki poziom oporności na szereg antybiotyków różnych grup chemicznych. Większość szczepów tego gatunku, izolowanych od pacjentów hospitalizowanych, wykazuje fenotyp oporności rozszerzonej na antybiotyki (ang. extensively drug resistance, XDR). Wytwarzane przez drobnoustroje mechanizmy oporności na antybiotyki można podzielić na trzy główne grupy, tj.: kontrolę transportu antybiotyku przez błony biologiczne, zmianę miejsca docelowego działania leków, działanie enzymatyczne zmieniające lub inaktywujące działanie antybiotyku. Pałeczki *A. baumannii* wykształciły wszystkie dotychczas poznane mechanizmy antybiotykooporności, które często współwystępują w obrębie jednego szczepu.

Kontrola transportu antybiotyku może zachodzić poprzez utratę białek porynowych, które tworzą często kanały błonowe dla antybiotyków, co skutkuje zmniejszeniem ich stężenia wewnątrzkomórkowego. Alternatywnie może się to odbywać poprzez nadekspresję pomp wyrzutu (ang. efflux pump), których działanie polega na aktywnym transporcie antybiotyków na zewnątrz komórki bakteryjnej [36,37].

Do zmiany miejsca docelowego działania leków może dochodzić na skutek mutacji genów, które kodują białka będące receptorem dla danego antybiotyku (np. wobec fluorochinolonów mutacje zachodzą w genach kodujących podjednostkę gyrazy DNA i podjednostkę C topoizomerazy). Pałeczki *A. baumannii* wytwarzają ponadto liczne enzymy hydrolizujące beta-laktamy, w szczególności beta-laktamazy o wąskim i rozszerzonym zakresie działania, a także enzymy modyfikujące aminoglikozydy.

Pałeczki *A. baumannii*, ze względu na wyjątkową plastyczność genomu, poprzez rearanżacje genetyczne, zdolne są do nabywania nowych mechanizmów oporności na antybiotyki, np. na drodze horyzontalnego transferu genów. Najprostszymi mobilnymi elementami genetycznymi (ang. mobile genetic elements, MGE), które występują u tego gatunku są sekwencje insercyjne (ang. insertion sequences, IS), które mogą formować transpozony. Bardziej złożonymi MGE, powiązanymi z antybiotykoopornością są integrony, wyspy genomowe i plazmidy [38].

2.1.5. Mechanizmy oporności na karbapenemy

Oporność *A. baumannii* na karbapenemy, które do niedawna były antybiotykami z wyboru w leczeniu zakażeń o tej etiologii, wynika z obecności wielu, często współwystępujących mechanizmów. Utrata białek porynowych, np. CarO, OprD, Omp33-36, zwiększa poziom oporności komórki bakteryjnej na karbapenemy, gdyż tracą one możliwość dyfuzji do miejsca ich docelowego działania, tj. przestrzeni peryplazmatycznej [19].

Kolejnym mechanizmem, którego działanie również polega na obniżaniu stężenia wewnątrzkomórkowego leku, jest nadekspresja pomp wyrzutu. Z opornością na karbapenemy najbardziej powiązana jest pompa wyrzutu AdeABC – należąca do rodziny pomp RND (ang. resistance-nodulation-division) [39]. Składa się ona z trzech komponentów: AdeA – białko fuzyjne błony komórkowej, AdeB – kanał białkowy błony wewnętrznej i AdeC – kanał białkowy błony zewnętrznej [40]. Nadekspresja białka AdeB wynika zazwyczaj z mutacji w genach *adeS* i *adeR*, ale może także być związana z obecnością sekwencji insercyjnej *ISAbal* powyżej genu *adeS* [41,42]. Zdecydowanie mniejsze znaczenie w rozwoju oporności na antybiotyki beta-laktamowe u pałeczek *A. baumannii*, podobnie jak u pozostałych bakterii Gram-ujemnych, ma zmiana struktury grupy białek wiążących penicylinę (ang. penicillin binding proteins, PBP). Oporność na karbapenemy powiązana jest głównie ze zmianami strukturalnymi w cząsteczkach PBP3 [43].

Oporność na karbapenemy u pałeczek *A. baumannii* determinowana jest głównie poprzez wytwarzanie przez te drobnoustroje enzymów hydrolizujących antybiotyki – karbapenemaz. Bakterie te wytwarzają beta-laktamazy wszystkich typów ujętych w klasyfikacji Amblera [44]. Spośród beta-laktamaz klasy A, sporadycznie wykrywano karbapenemazę *Klebsiella pneumoniae* (ang. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) [45]. Największe znaczenie kliniczne wśród beta-laktamaz klasy B (metalo-beta-laktamazy, MBL) wykrywanych u

klinicznych szczepów *A. baumannii* ma New Delhi metalo-beta-laktamaza-1 (ang. New Delhi metallo-beta-lactamase, NDM-1) oraz imipenemaza (ang. imipenemase). Geny kodujące enzym NDM-1 są najczęściej umiejscowione na plazmidach, w związku z tym posiadające je szczepy stanowią istotne zagrożenie epidemiologiczne ze względu na możliwość przekazywania informacji genetycznej na drodze horyzontalnego transferu genów [46]. Mechanizmem warunkującym oporność na karbapenemy u większości szczepów *A. baumannii* jest wytwarzanie beta-laktamaz klasy D hydrolizujących karbapenemy (ang. carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamases, CHDL), nazywanych również oksacylinazami (ang. oxacillinases, OXA). U pałeczek *A. baumannii* najczęściej występują enzymy typu: OXA-23, OXA-24/40 i OXA-58. Geny kodujące ten rodzaj beta-laktamaz mogą być zlokalizowane zarówno w strukturze chromosomu bakteryjnego, jak i plazmidu. Naturalnie występującą oksacylinazą u *A. baumannii*, kodowaną chromosomalnie jest natomiast OXA-51 [47]. CHDL to enzymy serynowe, które wykazują niskie powinowactwo do karbapenemów. Na poziom ekspresji genów *bla_{OXA}* istotnie wpływa występowanie sekwencji promotorowych, insercyjnych [45]. U *A. baumannii* najczęściej występuje sekwencja *ISAba1*. Ponadto elementy IS w obrębie swoich sekwencji kodują enzym transpozazę, co umożliwia horyzontalny transfer genów i wpływa na rozprzestrzenianie się tego mechanizmu oporności pomiędzy szczepami [47].

2.1.6. Epidemiologia i postaci zakażeń wywołanych przez *Acinetobacter baumannii*

Dawniej uważano, że bakterie z rodzaju *Acinetobacter* występują tylko w wilgotnym klimacie. Były one drugą najczęstszą, po pałeczkach z gatunku *Pseudomonas aeruginosa*, przyczyną zapalenia płuc związanego z wentylacją mechaniczną w gwatemalskich szpitalach. Pałeczki *A. baumannii*, mimo, że nie wytwarzają przetrwalników, wykazują zdolność do przetrwania w suchym środowisku, co może sprzyjać ich transmisji poprzez kontakt ze skażonymi powierzchniami (np. klamki, telefony, blaty) w szpitalach. W związku z tą cechą, jak i zdolnością przylegania do polimerów stosowanych w medycynie (szczególnie do rurek tracheostomijnych), pałeczki te od lat 70. XX w. nabrały istotnego znaczenia klinicznego – stanowią ważny czynnik etiologiczny zakażeń szpitalnych również w klimacie umiarkowanym [48].

Pałeczki *A. baumannii* wywołują przede wszystkim zakażenia oportunistyczne. Są czynnikiem etiologicznym m.in.: zapalenia płuc związanego z wentylacją mechaniczną (ang. ventilator-associated pneumonia, VAP), zakażeń ran, zakażeń układu moczowego (szczególnie

u pacjentów cewnikowanych) oraz bakteriemii. Dłuższe okresy hospitalizacji, obniżona skuteczność odpowiedzi immunologicznej pacjenta, oparzenia i obrażenia ciała, długi czas ekspozycji na antybiotyki, stosowanie procedur inwazyjnych, brak wydajnej kontroli zakażeń oraz choroba podstawowa to uznane czynniki ryzyka zakażeń szczepami *A. baumannii* [49]. Część z tych czynników współwystępuje u pacjentów leczonych na oddziałach intensywnej terapii (OIT), dlatego bakterie tego gatunku najczęściej izoluje się od chorych leczonych w jednostkach szpitalnych o tym profilu [50].

Możliwość tworzenia biofilmu i preferencja środowiska wilgotnego prowadzi do kolonizacji respiratorów przez pałeczki *A. baumannii*. Jest to zazwyczaj faza wstępna VAP. Zgodnie z rekomendacjami Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków, pałeczki *A. baumannii* są jednym z głównych czynników etiologicznych późnego VAP, tj. takiego, który pojawia się po upływie 5. doby od rozpoczęcia oddechu zastępczego [51]. Epizody bakteriemii wywołanej przez *A. baumannii* występują najczęściej u pacjentów w stanie krytycznym przyjmowanych na OIT. Objawy kliniczne bakteriemii wywołanej przez *A. baumannii* nie są specyficzne. Najczęstszymi źródłami bakteriemii są cewniki wewnątrznaczyniowe i drogi oddechowe. Zakażenia wewnątrzzpitalne wywołane wieloantybiotykoopornymi (ang. multidrug-resistant, MDR) szczepami *A. baumannii* charakteryzuje wysoki odsetek śmiertelności. W przypadku VAP wynosi on niemal 70%, natomiast ponad 40% w przypadkach bakteriemii [52].

2.1.7. Leczenie zakażeń wywoływanych przez pałeczki *Acinetobacter baumannii*

Zakażenia o etiologii *A. baumannii* są jednym z największych zagrożeń w środowisku szpitalnym na całym świecie ze względu na wysoki odsetek szczepów opornych na działanie leków przeciwbakteryjnych. Wobec tych, które pozostają wrażliwe na antybiotyki, lekiem z wyboru są karbapenemy. Odsetek takich izolatów w Polsce dotyczy jednak zaledwie od kilku do kilkunastu procent. W 2024 r. Światowa Organizacja Zdrowia aktualizując listę drobnoustrojów, dla których kluczowe jest poszukiwanie nowych opcji terapeutycznych, ponownie umieściła na niej pałeczki *A. baumannii* oporne na karbapenemy (ang. carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, CRAB) [53]. Lekiem, który dotychczas był traktowany jako antybiotyk ostatniej szansy w zakażeniach o etiologii *A. baumannii* jest kolistyna. Jej stosowanie podlega jednak pewnym ograniczeniom, gdyż z uwagi na ograniczoną skuteczność zaleca się jej stosowanie jedynie w terapii skojarzonej. Spośród dotychczas znanych leków aktywnych wobec CRAB

skuteczność kliniczną przy stosowaniu wysokich dawek może wykazywać ampicylina z sulbaktamem [54]. Leczenie zakażeń o etiologii CRAB jest niezwykle trudne, dlatego sugeruje się, żeby każdorazowo stosować terapię skojarzoną.

Ze względu na występowanie u pałeczek *A. baumannii* licznych mechanizmów antybiotykooporności konieczne jest poszukiwanie nowych skutecznych leków. W ciągu ostatnich lat na rynku medycznym pojawił się antybiotyk z grupy cefalosporyn – cefiderokol. Struktura sideroforowa tego leku pozwala na wiązanie pozakomórkowego żelaza, co umożliwia jego aktywny transport do przestrzeni peryplazmatycznej [55]. Kolejnym nowym rozwiązaniem jest połączenie sulbaktamu z durlobaktamem, który w Stanach Zjednoczonych jest zarejestrowany do leczenia zapalenia płuc o etiologii CRAB. Jego mechanizm działania opiera się na zastosowaniu nowego inhibitora beta-laktamaz – durlobaktamu, który hamuje działanie CHDL i przywraca aktywność sulbaktamowi pełniącemu jednocześnie funkcję inhibitora beta-laktamaz oraz wykazującemu aktywność wobec pałeczek *Acinetobacter* spp. poprzez wiązanie z białkami PBP, co prowadzi do zaburzania syntezy ściany komórkowej i w konsekwencji do śmierci komórki bakteryjnej.

3. CEL BADAŃ

Na przetrwanie pałeczek *A. baumannii* w środowisku szpitalnym i możliwość zakażenia kolejnych pacjentów wpływa wiele czynników. Po pierwsze, patogenezę zakażeń wywoływanych przez pałeczki *A. baumannii* jest determinowana przez szereg czynników zjadliwości, które umożliwiają patogenom adhezję, inwazję i przetrwanie w środowisku niesprzyjającym dla rozwoju drobnoustrojów. Po drugie, leczenie zakażeń o etiologii *A. baumannii* u pacjentów hospitalizowanych stanowi poważne wyzwanie terapeutyczne. Dotychczas lekami z wyboru stosowanymi w leczeniu tych zakażeń były karbapenemy. W ostatnich latach wśród izolatów szpitalnych notuje się znaczący wzrost liczby szczepów opornych na antybiotyki beta-laktamowe. Oporność na karbapenemy u pałeczek *A. baumannii* warunkowana jest współwystępowaniem różnych mechanizmów oporności. W związku ze zjawiskiem narastającej antybiotykooporności u tych szczepów konieczne jest zastosowanie celowanej oraz jak najbardziej wiarygodnej i szybkiej diagnostyki zakażeń.

Celem badań włączonych do niniejszego cyklu publikacji była ocena i analiza mechanizmów warunkujących oporność na antybiotyki oraz zdolność do wywoływania zakażeń przez kliniczne szczepy *A. baumannii*, ze szczególnym uwzględnieniem zależności pomiędzy czynnikami wirulencji i mechanizmami oporności na karbapenemy oraz ich analiza w znaczeniu diagnostycznym. W szczególności podjęto próbę:

- określenia powiązań pomiędzy wybranymi genami wirulencji a opornością na karbapenemy,
- oceny znaczenia elementów mobilnych w fenotypowym ujawnieniu oporności na karbapenemy,
- analizy przydatności metod molekularnych w wykrywaniu mechanizmów oporności na karbapenemy.

W poszczególnych publikacjach, realizując powyższe cele, przeprowadzono następujące oceny:

- częstości występowania genów kodujących czynniki biorące udział w patogenezie zakażeń wywoływanych przez szczepy *A. baumannii* niewrażliwe na karbapenemy oraz możliwość ich zastosowania jako markerów genetycznych (**Publikacja nr 1**),
- współwystępowania genów kodujących karbapenemazy klasy D oraz genów kodujących wybrane czynniki zjadliwości (**Publikacja nr 1**),
- występowania genów *bla_{oxa}* wśród izolatów wrażliwych na jeden z karbapenemów tj. meropenem (**Publikacja nr 2**),

- częstości występowania sekwencji insercyjnych wśród izolatów wytwarzających karbapenemazy typu OXA, tj. szczepów *bla*_{OXA-23}-dodatnich (**Publikacja nr 2**),
- parametrów diagnostycznych metod stosowanych w diagnostyce mikrobiologicznej służących do wykrywania beta-laktamaz klasy D (**Publikacja nr 3**).

4. WYKAZ PUBLIKACJI TWORZĄCYCH CYKL Z OPISEM BIBLIOGRAFICZNYM

Publikacja nr 1

Depka Dagmara, Bogiel Tomasz, Rzepka Mateusz i Gospodarek-Komkowska Eugenia.

The prevalence of virulence factor genes among carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter baumannii* clinical strains and their usefulness as potential molecular biomarkers of infection.

Diagnostics 2023, 13: 1–11. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13061036>.

Punktacja MNiSW: 70 pkt.

Impact Factor: 3,0

Publikacja nr 2

Depka Dagmara, Bogiel Tomasz, Rzepka Mateusz i Gospodarek-Komkowska Eugenia.

Insertion sequences within oxacillinases genes as molecular determinants of *Acinetobacter baumannii* resistance to carbapenems — a pilot study.

Microorganisms 2024, 12: 1–12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12102057>.

Punktacja MNiSW: 40 pkt.

Impact Factor: 4,2

Publikacja nr 3

Depka Dagmara, Mikucka Agnieszka, Bogiel Tomasz, Rzepka Mateusz, Zawadka Patryk i Gospodarek-Komkowska Eugenia.

Conventional and real-time PCR targeting *bla_{OXA}* genes as reliable methods for a rapid detection of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains.

Antibiotics 2022, 11: 1–10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040455>.

Punktacja MNiSW: 70 pkt.

Impact Factor: 4,8

Sumaryczna punktacja MNiSW: 180 pkt.

Sumaryczny Impact Factor: 12,0

5. MATERIAŁ I METODY BADAWCZE

5.1. Materiał kliniczny

Szczepy ujęte w badaniach opisanych w poszczególnych publikacjach izolowano od pacjentów leczonych w Szpitalu Uniwersyteckim nr 1 im. dr. Antoniego Jurasza w Bydgoszczy w latach 2017–2023. Badane szczepy pochodziły od pacjentów hospitalizowanych na różnych oddziałach szpitalnych. Szczegółowe dane dotyczące pochodzenia izolatów oraz rozkładu procentowego rodzajów materiału klinicznego, z którego wyodrębniono szczepy, przedstawiono w poszczególnych publikacjach.

5.2. Identyfikacja i ocena antybiotykowrażliwości pałeczek *Acinetobacter baumannii*

Identyfikację gatunkową badanych szczepów przeprowadzano przy użyciu metody spektrometrii mas z desorpcją/ionizacją laserem wspomaganą matrycą i analizatorem czasu przelotu (ang. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS) w aparacie firmy Bruker Daltonik GmbH (Mannheim, Niemcy). Oznaczenie antybiotykowrażliwości badanych szczepów przeprowadzono metodą półautomatyczną w aparacie BD Phoenix™ M50 (panele NMIC-402; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA). Wyniki oceny antybiotykowrażliwości interpretowano zgodnie z wytycznymi Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości Drobnoustrojów (ang. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST). W celu zapewnienia wiarygodnych wyników do kontroli jakości metod oceny antybiotykowrażliwości użyto wzorcowych szczepów *P. aeruginosa* ATCC 27853 i *Escherichia coli* ATCC 25922. Zastosowano klasyfikację pod względem fenotypów oporności na antybiotyki szczepów według następujących definicji:

- szczepy o fenotypie MDR – szczepy odporne na co najmniej trzy spośród badanych antybiotyków, należących do odrębnych grup chemicznych leków przeciwdrobnoustrojowych,
- szczepy o fenotypie XDR – szczepy odporne na wszystkie, z wyjątkiem dwóch grup uwzględnionych leków przeciwdrobnoustrojowych, które mogą wykazywać aktywność wobec szczepów *A. baumannii*,
- szczepy odporne na wszystkie badane antybiotyki (ang. pan-drug-resistant, PDR).

5.3. Metody stosowane w poszczególnych publikacjach

Publikacja nr 1

W celu uzyskania wysokiej jakości materiału genetycznego badanych szczepów pałeczek *A. baumannii* przeprowadzano izolację DNA z zastosowaniem metody kolumnkowej – Genomic Mini kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) zgodnie z instrukcją producenta. Geny kodujące czynniki zjadliwości i karbapenemazy wykrywano przy użyciu łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) z analizą krzywych topnienia DNA w aparacie LightCycler 480 II (Roche, Basel, Szwajcaria) i CFX OPUS 96 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Zastosowanie etapu analizy krzywych topnienia DNA umożliwiło weryfikację uzyskanych wyników poprzez ocenę specyficzności produktów reakcji real-time PCR. Zastosowane startery przedstawiono w tabeli 1 zamieszczonej w publikacji. Dodatkowo, w celu zapewnienia wiarygodności otrzymanych wyników, zastosowano kontrole dodatnie dla poszczególnych genów w postaci DNA wyekstrahowanego z referencyjnych szczepów *A. baumannii* DSMZ 30008 oraz *A. baumannii* DSMZ 102930. Używano również kontrolę ujemną w postaci wody do zastosowań w biologii molekularnej, co pozwalało na wykrycie ewentualnego zanieczyszczenia reakcji real-time PCR.

Publikacja nr 2

Izolację DNA badanych szczepów *A. baumannii* przeprowadzano również przy użyciu zestawu Genomic Mini Kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Obecność genów kodujących karbapenemazy typu OXA wykrywano metodą real-time PCR z analizą krzywych topnienia amplifikowanego DNA. Natomiast sekwencje insercyjne *ISAba1* powyżej genu *bla_{OXA-23}* wykrywano klasyczną reakcją łańcuchową polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR). Produkty tej reakcji rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym podczas elektroforezy w aparacie MINI SUB™ DNA CELL (Bio-Rad, Feldkirchen, Niemcy).

Publikacja nr 3

Karbapenemazy u badanych izolatów wykrywano przy użyciu testów fenotypowych: testu CarbAcineto NP, metody inaktywacji karbapenemów (ang. carbapenem inactivation method, CIM), które wykonywano zgodnie z opublikowanymi procedurami [56,57]. Wytwarzanie karbapenemaz oceniano także przy użyciu metody półautomatycznej przeprowadzanej w aparacie BD Phoenix™ M50 (panele GN-502; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Wszystkie badania wykonywano zgodnie z instrukcją producenta. Geny kodujące karbapenemazy OXA wykrywano natomiast z zastosowaniem reakcji PCR oraz real-time PCR, których metodologie opisano szczegółowo w publikacji.

Izolację materiału genetycznego badanych szczepów wykonywano metodą termiczną zgodnie z opublikowaną procedurą [58]. Uzyskany supernatant wykorzystywano jako matrycę DNA do dalszych analiz. W celu wykrywania genów *bla*_{OXA-40} i *bla*_{OXA-23} przeprowadzano analizy z zastosowaniem technik biologii molekularnej. Reakcję PCR oraz real-time PCR z analizą krzywych topnienia DNA wykonywano z użyciem odpowiednich starterów. Amplifikację w klasycznej metodzie PCR przeprowadzano przy użyciu termocyklera GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) stosując odpowiednie profile temperaturowe. Produkty reakcji PCR rozdzielano metodą elektroforezy w żelu agarozowym w urządzeniu MINI SUB™ DNA CELL (Bio-Rad, Feldkirchen, Niemcy). Zoptymalizowano reakcje real-time PCR z analizą krzywych topnienia DNA z użyciem zestawu zawierającego barwnik interkalujący (HOT FIREPol® EvaGreen®; SolisBiodyne, Tartu, Estonia). Reakcje przeprowadzano w aparacie cobas z480 (Roche, Basel, Szwajcaria).

Jako metodę referencyjną zastosowano test z certyfikacją IVD (ang. *in vitro* diagnostic) eazyplex® SuperBug complete A (Amplex Diagnostics GmbH, Gars am Inn, Niemcy), który wykonywano zgodnie z instrukcją producenta.

5.4. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzano stosując program Statistica™ 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). W celu oceny zależności pomiędzy występowaniem genów kodujących poszczególne czynniki wirulencji a pochodzeniem badanych izolatów wykonano test korelacji rang Spearmana. Natomiast w celu oceny istotności statystycznej różnic w pochodzeniu szczepów oraz zmian w profilach oporności na antybiotyki zastosowano test chi-kwadrat Pearsona oraz dokładny test Fishera. Za statystycznie istotne uznano wartości $p \leq 0,05$. Wartości współczynnika kontyngencji Pearsona wykorzystano do oceny siły korelacji współwystępowania poszczególnych cech oraz pochodzenia szczepów ($p \leq 0,05$).

6. OPIS WYNIKÓW UJĘTYCH W PUBLIKACJACH WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU

Publikacja nr 1

W tej publikacji scharakteryzowano antybiotykooporność 100 klinicznych szczepów *A. baumannii*. Oceniono również u tych bakterii częstość występowania genów kodujących czynniki wirulencji (*bap*, *surA1*, *omp33-36*, *bauA*, *bauS* i *pld*) i genów kodujących najczęściej stwierdzane karbapenemazy typu OXA (*bla_{OXA-23}* i *bla_{OXA-40}*) oraz zależności między ich występowaniem. Charakterystyka powyższych cech miała na celu rozszerzenie wiedzy na temat genetycznych podstaw patogenezы zakażeń wywoływanych przez szczepy MDR oraz identyfikację potencjalnych markerów genetycznych, które mogłyby zostać wykorzystane w szybkiej diagnostyce molekularnej zakażeń o etiologii pałeczek *A. baumannii*.

U wszystkich badanych szczepów wykazano fenotyp oporności typu MDR, z których 6 (6,0%) określono jako PDR. Geny kodujące białko Bap i SurA1 wykryto u wszystkich izolatów ujętych w ocenie, natomiast gen *basD* i *pld* u 99 (99,0%) szczepów. Genów *bauA* i *omp33-36* nie wykryto w badanej grupie szczepów. Obecność genów *bla_{OXA-40}* i *bla_{OXA-23}* wykazano odpowiednio, u 62 (62,0%) i 35 (35,0%) izolatów. Po przeprowadzonej analizie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy obecnością poszczególnych genów wirulencji a obecnością genów wykrywanych karbapenemaz.

W badanej grupie szczepów nie odnotowano jednoznacznej zależności pomiędzy obecnością genów *omp33-36* i *bauA*, a zdolnością do wywoływania zakażeń, co może wskazywać, że czynniki te nie są kluczowymi determinantami patogenezы w badanej populacji *bla_{OXA}*-dodatnich szczepów *A. baumannii*. Stwierdzone współwystępowanie genów *bap* i *surA1* u wszystkich izolatów sugeruje, że mogą one stanowić potencjalne markery molekularne zakażeń wywoływanych przez tę grupę bakterii. Ich przydatność diagnostyczna wymaga jednak dalszych badań. Uzyskane wyniki wskazują ponadto, że w badanym regionie częściej występują karbapenemazy typu OXA-40, co pozostaje zgodne z wynikami wcześniejszych opracowań dotyczących szczepów klinicznych izolowanych w Polsce [59].

Publikacja nr 2

W wymienionej publikacji oceniono występowanie genów kodujących beta-laktamazy klasy D (*bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-40}* i *bla_{OXA-51}*) u 35 klinicznych szczepów *A. baumannii* wrażliwych na jeden z karbapenemów – meropenem. Celem analizy było określenie, w jakim stopniu obecność tych genów koreluje z fenotypową opornością na karbapenemy. Dodatkowo oceniono obecność

sekwencji insercyjnej *ISAbal* zlokalizowanej powyżej genu *bla_{OXA-23}* u 53 szczepów *A. baumannii*.

Obecność genu *bla_{OXA-51}* potwierdzono u wszystkich badanych szczepów ($n=35$). Geny *bla_{OXA-40}* i *bla_{OXA-23}* wykryto odpowiednio, u trzech (8,6%) i dwóch (5,7%) izolatów. W tabeli 6. w publikacji nr 2 przedstawiono antybiotykowrażliwość tych szczepów. U obu izolatów *bla_{OXA-23}*-dodatnich powyżej genu wykryto *ISAbal*. Spośród 53 szczepów *bla_{OXA-23}*-dodatnich u 52 (98,1%) potwierdzono obecność *ISAbal* powyżej genu *bla_{OXA-23}*. Dla jednego szczepu nie uzyskano produktu o oczekiwanej długości 962 pz., natomiast otrzymano amplikon około 1000 pz., co może sugerować rearanżację poszukiwanego genu i wymaga przeprowadzenia dalszych badań pod tym względem.

Uzyskane wyniki wskazują, że sama obecność genów *bla_{OXA}* nie zawsze determinuje fenotypową oporność na karbapenemy. Jednocześnie obecność *ISAbal* w regionie promotora genu *bla_{OXA-23}* jest zjawiskiem powszechnym wśród badanych szczepów i może odgrywać istotną rolę w modulowaniu ekspresji genów oporności. Ponadto otrzymane wyniki sugerują, że karbapenemy mogą wykazywać aktywność wobec szczepów mających geny *bla_{OXA}*, co ma istotne znaczenie w kontekście interpretacji wyników badań mikrobiologicznych w odniesieniu do podejmowanych decyzji terapeutycznych.

Publikacja nr 3

Ze względu na diagnostyczny charakter niniejszego cyklu publikacji, w tej pracy dokonano oceny i porównania parametrów diagnostycznych metod fenotypowych oraz genotypowych stosowanych do wykrywania karbapenemaz klasy D wśród klinicznych izolatów *A. baumannii*. Z uwagi na związek występowania tych enzymów z opornością na karbapenemy, szybka diagnostyka w tym zakresie ma istotne znaczenie kliniczne i epidemiologiczne.

Wszystkie badane szczepy ($n=58$) *A. baumannii* charakteryzowały się wieloantybiotykooopornością, a 54 (93,1%) z nich wykazywało fenotyp XDR. W analizowanej grupie szczepów stwierdzono obecność genów kodujących karbapenemazy typu OXA, przy czym dominującym wariantem był gen *bla_{OXA-40}*, wykrywany u 39 (67,2%) izolatów. Natomiast gen *bla_{OXA-23}* zidentyfikowano u 19 (32,8%) badanych szczepów.

Ocena przydatności metod diagnostycznych wykazała, że zarówno PCR konwencjonalny, jak i real-time PCR charakteryzowały się pełną czułością (100%) w wykrywaniu genów *bla_{OXA}*. Porównywalną skuteczność uzyskano również dla metody CIM oraz

systemu PhoenixTM M50, które wykazały pełną zgodność z metodą referencyjną. Natomiast test CarbAcineto NP cechował się istotnie niższą czułością, wynoszącą 65,5%, co mogło wynikać z subiektywnej oceny wyników oznaczeń oraz trudnej do zauważenia nieuzbrojonym okiem zmiany barwy wskaźnika pH.

Uzyskane wyniki wskazują, że metody molekularne, w tym PCR konwencjonalny oraz real-time PCR, stanowią wiarygodne i szybkie narzędzia diagnostyczne w identyfikacji mechanizmów oporności na karbapenemy u *A. baumannii*, przewyższając pod względem czułości wybrane metody fenotypowe. Zastosowanie metod PCR i real-time PCR umożliwia szybkie wykrywanie szczepów *A. baumannii* opornych na karbapenemy, co może wspierać podejmowanie racjonalnych decyzji terapeutycznych. Skrócenie czasu diagnostyki stwarza możliwość wcześniejszego wdrożenia odpowiedniej antybiotykoterapii, przyczyniając się do ograniczenia rozwoju antybiotykooporności, optymalizacji kosztów leczenia oraz poprawy efektywności opieki zdrowotnej.

7. WNIOSKI I PODSUMOWANIE

7.1. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

- wśród badanych klinicznych szczepów *A. baumannii* powszechnie występują geny powiązane z tworzeniem biofilmu, z czego geny *bap* i *surA1* występują u wszystkich badanych izolatów,
- pomimo relatywnie częstego współwystępowania genów wirulencji i genów karbapenemaz, nie stwierdza się statystycznie istotnych zależności pomiędzy obecnością tych poszczególnych determinant,
- obecność genów kodujących karbapenemazy nie zawsze koreluje z fenotypową opornością na meropenem, co wskazuje na złożony charakter mechanizmów warunkujących oporność na karbapenemy,
- wysoka częstość występowania *ISAba1* wśród izolatów posiadających gen *bla_{OXA-23}* może wskazywać na jej potencjalny udział w kształtowaniu oporności na karbapenemy,
- porównanie metod fenotypowych i molekularnych stosowanych do wykrywania karbapenemaz wykazało zalety diagnostyczne metod molekularnych oraz ograniczenia metod fenotypowych,
- metody molekularne charakteryzują się wyższą czułością niż metody fenotypowe w wykrywaniu karbapenemaz i stanowią wiarygodne narzędzie diagnostyczne w identyfikacji szczepów CRAB,
- opracowana samodzielnie i zwalidowana metoda real-time PCR z analizą krzywych topnienia DNA umożliwia szybkie i wiarygodne wykrywanie genów karbapenemaz u klinicznych szczepów *A. baumannii*.

7.2. Podsumowanie

Cykl publikacji koncentruje się na analizie molekularnych determinant oporności na karbapenemy, ze szczególnym uwzględnieniem genów *bla_{OXA}*, sekwencji insercyjnych związanych z regulacją ekspresji genów kodujących oksacylinazy oraz genów kodujących wybrane czynniki wirulencji u klinicznych szczepów *A. baumannii*. Badania obejmują również opracowaną metodę real-time PCR z analizą krzywych topnienia DNA oraz ocenę przydatności metod konwencjonalnego PCR i real-time PCR w szybkiej diagnostyce szczepów karbapenemoopornych.

Wkład badań w rozwój nauki dotyczy przede wszystkim poszerzenia aktualnej wiedzy na temat zależności pomiędzy obecnością determinant molekularnych a fenotypem oporności na karbapenemy. Uzyskane wyniki wskazują na potencjalnie istotną rolę sekwencji insercyjnych, szczególnie *ISAba1*, w modulowaniu ekspresji genów oksacylinaz i kształtowaniu poziomu oporności szczepów *A. baumannii*. Badania wzbogacają tym samym dotychczasowe rozumienie procesów regulujących ekspresję mechanizmów oporności na antybiotyki i podkreślają znaczenie elementów mobilnych genomu bakterii.

Istotnym elementem naukowym jest analiza obecności wybranych genów wirulencji oraz ich współwystępowania z determinantami antybiotykooporności. Uzyskane wyniki wpisują się w aktualny nurt badań nad kompleksową charakterystyką klinicznych szczepów wieloantybiotykoopornych, uwzględniając zarówno mechanizmy oporności, jak i właściwości związane z wirulencją, tworzeniem biofilmu oraz adaptacją środowiskową.

Wyniki tych badań poszerzają również wiedzę na temat sytuacji epidemiologicznej w lokalnym środowisku szpitalnym, co ma istotne znaczenie w monitorowaniu i przeciwdziałaniu rozprzestrzeniania się szczepów wieloantybiotykoopornych.

Znaczącym aspektem cyklu publikacji jest ocena przydatności metod molekularnych w szybkiej i wiarygodnej diagnostyce zakażeń wywoływanych przez szczepy CRAb. Wyniki badań wskazują, że klasyczny PCR i opracowana samodzielnie metodologia oparta na real-time PCR mogą stanowić wiarygodne i użyteczne narzędzia wspierające identyfikację genów oporności na antybiotyki oraz monitorowanie szczepów szpitalnych w ujęciu epidemiologicznym. Badania wpisują się tym samym w rozwijający się obszar diagnostyki translacyjnej, łączącej badania podstawowe z praktyką kliniczną.

Wartość naukowa badań wynika z aktualności problematyki antybiotykooporności, uznawanej obecnie za jedno z najważniejszych zagrożeń zdrowia publicznego na świecie. Rozwój wiedzy dotyczącej molekularnych mechanizmów oporności na antybiotyki oraz metod ich szybkiej identyfikacji ma kluczowe znaczenie dla skutecznego monitorowania globalnego rozprzestrzeniania się szczepów wieloantybiotykoopornych i opracowywania nowych strategii diagnostycznych i terapeutycznych.

Wyniki badań mają potencjalne znaczenie aplikacyjne przede wszystkim w obszarze diagnostyki mikrobiologicznej, kontroli zakażeń szpitalnych oraz monitorowania występowania szczepów wieloantybiotykoopornych. Jednym z najważniejszych potencjalnych zastosowań praktycznych jest możliwość wykorzystania metod klasycznego PCR i real-time PCR do szybkiej

identyfikacji klinicznych szczepów *A. baumannii*, w tym izolatów wykazujących oporność na karbapenemy. Zoptymalizowana przez zespół badawczy metoda real-time PCR wykorzystująca analizę krzywych topnienia umożliwia uzyskanie wiarygodnych wyników w krótszym czasie (około dwóch godzin), co może sprzyjać wcześniejszemu wdrożeniu ukierunkowanej antybiotykoterapii oraz szybszemu podejmowaniu działań ograniczających transmisję szczepów wieloantybiotykoopornych w środowisku szpitalnym.

Uzyskane wyniki mogą wspierać rozwój nowoczesnych paneli diagnostycznych ukierunkowanych na wykrywanie: genów *bla_{OXA}*, sekwencji insercyjnych związanych z ekspresją oporności czy wybranych genów wirulencji. Takie rozwiązania mogłyby mieć zastosowanie w laboratoriach mikrobiologicznych (medycznych, weterynaryjnych, środowiskowych) oraz ośrodkach monitorowania i kontroli zakażeń. Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do opracowania paneli diagnostycznych bardziej dostosowanych do lokalnej sytuacji epidemiologicznej.

Potencjał aplikacyjny badań obejmuje możliwość wykorzystania uzyskanych danych w działaniach z zakresu kontroli zakażeń szpitalnych i racjonalizacji antybiotykoterapii. Szybsza identyfikacja szczepów CRAB może przyczyniać się do ograniczenia transmisji patogenów alarmowych, zmniejszenia liczby zakażeń szpitalnych oraz poprawy bezpieczeństwa pacjentów.

Istotne znaczenie aplikacyjne mają aspekty edukacyjne i społeczne prowadzonych badań. Upowszechnianie wiedzy dotyczącej molekularnych mechanizmów antybiotykooporności, szerzenia się szczepów wieloantybiotykoopornych oraz znaczenia szybkiej diagnostyki może wspierać działania związane z ochroną zdrowia publicznego i racjonalnym stosowaniem antybiotyków w różnych obszarach (medycyna, hodowla zwierząt, roślin).

Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do dalszych badań obejmujących, analizę ekspresji genów oporności, badania transkryptomiczne i genomowe, sekwencjonowanie całogenomowego DNA szczepów klinicznych, badania dokładnych zależności pomiędzy wirulencją a antybiotykoopornością bakterii.

8. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Jednym z największych wyzwań współczesnej medycyny jest narastająca antybiotykooporność drobnoustrojów. Problem ten dotyczy w szczególności bakterii odpowiedzialnych za zakażenia związane z opieką zdrowotną, które podlegają silnej presji selekcyjnej środowiska szpitalnego. Pałeczki *A. baumannii* są oportunistycznymi patogenami charakteryzującymi się wysokim poziomem oporności na liczne grupy antybiotyków. Do niedawna karbapenemy stanowiły leki z wyboru w leczeniu wywoływanych przez nie zakażeń. Poznanie mechanizmów warunkujących zjadliwość tych drobnoustrojów oraz ich oporność na karbapenemy może przyczynić się do opracowania skuteczniejszych strategii diagnostycznych, terapeutycznych i profilaktycznych, ograniczających rozprzestrzenianie się szczepów antybiotykoopornych.

Celem badań zrealizowanych w publikacjach wchodzących w skład przedstawionego cyklu było scharakteryzowanie na poziomie molekularnym genów związanych z wirulencją oraz mechanizmami oporności na karbapenemy u klinicznych szczepów *A. baumannii*. Ponadto, ze względu na rosnące znaczenie diagnostyki molekularnej w identyfikacji szczepów opornych, oceniono przydatność metod wykrywania mechanizmów oporności na karbapenemy, w tym opracowanej samodzielnie metody real-time PCR opartej na analizie krzywych topnienia produktów amplifikacji genów karbapenemaz.

Przeprowadzone badania wykazały, że wśród klinicznych szczepów *A. baumannii* niewrażliwych na karbapenemy geny wirulencji występowały powszechnie, przy czym najczęściej identyfikowano geny *bap* i *surA1*, co wskazuje na ich potencjalne znaczenie w patogenezie zakażeń wywoływanych przez ten gatunek. Analiza genów kodujących karbapenemazy typu OXA oraz sekwencje insercyjne wykazała, że sama obecność genów *bla_{OXA}* nie zawsze warunkuje fenotypową oporność na karbapenemy. Jednocześnie potwierdzono częste występowanie sekwencji *ISAba1* w regionie promotora genu *bla_{OXA-23}*, co wskazuje na jej potencjalne znaczenie w regulacji ekspresji mechanizmów oporności. Ponadto wykazano wysoką przydatność metod konwencjonalnego PCR oraz real-time PCR w wykrywaniu genów *bla_{OXA}*. Obie metody charakteryzowały się wysoką czułością diagnostyczną i pozwalały na szybką identyfikację szczepów opornych. Uzyskane wyniki podkreślają znaczenie diagnostyki molekularnej w monitorowaniu mechanizmów oporności oraz wspieraniu racjonalnej antybiotykoterapii zakażeń wywoływanych przez *A. baumannii*. Potwierdzają także złożoność mechanizmów warunkujących zjadliwość oraz oporność na karbapenemy u pałeczek *A. baumannii*. Przedstawione dane mają znaczenie naukowe, diagnostyczne i kliniczne oraz

mogą stanowić podstawę do dalszych badań nad patogenezą zakażeń wywoływanych przez ten przedstawicieli tego gatunku, mechanizmami oporności na karbapenemy i rozwojem metod szybkiej diagnostyki molekularnej.

9. ABSTRACT

Antimicrobial resistance of microorganisms is one of the greatest challenges of modern medicine. This issue is particularly relevant to bacteria responsible for healthcare-associated infections, due to the selection pressure present in the hospital environment. *A. baumannii* is an opportunistic pathogen characterized by a high level of resistance to numerous classes of antibiotics. Until recently, carbapenems were the drugs of choice for treating infections caused by *A. baumannii*. Understanding the mechanisms that determine the virulence of these microorganisms and their resistance to carbapenems may contribute to the development of more effective diagnostic, therapeutic, and preventive strategies to limit the spread of antibiotic-resistant strains.

The aim of the studies described in this series of publications was to characterize, at the molecular level, the genes associated with virulence and carbapenem resistance mechanisms in *A. baumannii* clinical strains. Furthermore, due to the growing importance of molecular diagnostics in the identification of resistant strains, the usefulness of methods for detecting carbapenem resistance mechanisms was evaluated, including the self-developed real-time PCR method based on the analysis of melting curves of carbapenemases genes amplification products.

The study demonstrated that virulence genes were widespread among carbapenem-resistant *A. baumannii* clinical strains, with the *bap* and *surA1* genes being the most frequently identified, suggesting their potential role in the pathogenesis of infections caused by this species. Analysis of genes encoding OXA-type carbapenemases and insertion sequences revealed that the presence of *bla*_{OXA} genes does not necessarily determine phenotypic resistance to carbapenems. At the same time, the frequent prevalence of the *ISAba1* in the promoter region of the *bla*_{OXA-23} gene was confirmed, indicating its potential role in the regulation of resistance gene expression.

Furthermore, both conventional PCR and real-time PCR methods proved highly effective for the detection of *bla*_{OXA} genes. These methods presented high diagnostic sensitivity and enabled the rapid identification of resistant strains. The findings highlight the importance of molecular diagnostics in monitoring resistance mechanisms and supporting rational antimicrobial therapy for infections caused by *A. baumannii*. They also emphasize the complexity of the mechanisms underlying virulence and carbapenem resistance among the representatives of the species. The data presented are of scientific, diagnostic, and clinical

significance and may provide a foundation for further research into the pathogenesis of *A. baumannii* infections, the mechanisms of carbapenem resistance, and the development of rapid molecular diagnostic methods.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Beijerinck M. Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. Versl K Ned Akad Wet. 1911;19:1092-103.
2. Brisou J, Prevot AR. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. Ann Inst Pasteur (Paris). 1954;86:722-8.
3. Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). J Bacteriol. 1968;95(5):1520-41. doi:10.1128/jb.95.5.1520-1541.1968.
4. Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA, editors. Approved lists of bacterial names (amended). Washington (DC): ASM Press; 1989. ISBN: 978-1-55581-014-6.
5. Bouvet PJM, Grimont PAD. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. Int J Syst Bacteriol. 1986;36(2):228-40. doi:10.1099/00207713-36-2-228.
6. Schoch CL, Ciufo S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R, Leipe D, McVeigh R, O'Neill K, Robbertse B, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford) 2020;2020:baaa062. doi:10.1093/database/baaa062.
7. Szewczyk E, red. Diagnostyka bakteriologiczna. Wyd. 3. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2019. ISBN 978-83-01-20550-8.
8. Buchhorn de Freitas S, Hartwig DD. Promising targets for immunotherapeutic approaches against *Acinetobacter baumannii*. Microb Pathog. 2022;173:105855. doi:10.1016/j.micpath.2022.105855.
9. *Moraxellaceae* - an overview [Internet] ScienceDirect Topics. Dostępne na: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/moraxellaceae> [cytowano 18.02.2026].
10. Jeong GJ, Khan F, Tabassum N, Kim YM. Motility of *Acinetobacter baumannii*: regulatory systems and controlling strategies. Appl Microbiol Biotechnol. 2024;108(1):3. doi:10.1007/s00253-023-12975-6.

11. Wareth G, Pletz MW, Neubauer H, Sprague LD. A rapid method for the detection of motility in *Acinetobacter baumannii* and its association to the existence of the virulence-associated genes *pilA* and *algW*. *Ger J Microbiol.* 2021;1:11-17. doi:10.51585/gjm.2021.3.0009.
12. Kurcik-Trajkovska B. *Acinetobacter* spp. - a serious enemy threatening hospitals worldwide. *Maced J Med Sci.* 2009;2(2):157-62. doi:10.3889/MJMS.1857-5773.2009.0043.
13. Geisinger E, Huo W, Hernandez-Bird J, Isberg RR. *Acinetobacter baumannii*: envelope determinants that control drug resistance, virulence, and surface variability. *Annu Rev Microbiol.* 2019;73:481-506. doi:10.1146/annurev-micro-020518-115714.
14. Boll JM, Tucker AT, Klein DR, Beltran AM, Brodbelt JS, Davies BW, Trent MS. Reinforcing lipid A acylation on the cell surface of *Acinetobacter baumannii* promotes cationic antimicrobial peptide resistance and desiccation survival. *mBio.* 2015;6(3):e00478-15. doi:10.1128/mBio.00478-15.
15. Herrera CM, Voss BJ, Trent MS. Homeoviscous adaptation of the *Acinetobacter baumannii* outer membrane: alteration of lipooligosaccharide structure during cold stress. *mBio.* 2021;12(4). doi:10.1128/mBio.01295-21.
16. Geisinger E, Isberg RR. Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Pathog.* 2015;11(2). doi:10.1371/journal.ppat.1004691.
17. Gayoso CM, Mateos J, Méndez JA, Fernández-Puente P, Rumbo C, Tomás M, Martínez de Ilarduya O, Bou G. Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res.* 2014;13(2):460-476. doi:10.1021/pr400603f.
18. Chin CY, Tipton KA, Farokhyfar M, Burd EM, Weiss DS, Rather PN. A high-frequency phenotypic switch links bacterial virulence and environmental survival in *Acinetobacter baumannii*. *Nat Microbiol.* 2018;3(5):563-569. doi:10.1038/s41564-018-0151-5.
19. Uppalapati SR, Sett A, Pathania R. The outer membrane proteins OmpA, CarO, and OprD of *Acinetobacter baumannii* confer a two-pronged defense in facilitating its success as a potent human pathogen. *Front Microbiol.* 2020;11:589234. doi:10.3389/fmicb.2020.589234.
20. Park YK, Jung SI, Park KH, Kim SH, Ko KS. Characteristics of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. other than *Acinetobacter baumannii* in South Korea. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39(1):81-85. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.08.006.

21. Srinivasan VB, Vaidyanathan V, Rajamohan G. AbuO, a TolC-like outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*, is involved in antimicrobial and oxidative stress resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(2):1236-1245. doi:10.1128/AAC.03626-14.
22. Weng Z, Yang N, Shi S, Xu Z, Chen Z, Liang C, Zhang X, Du X. Outer membrane vesicles from *Acinetobacter baumannii*: biogenesis, functions, and vaccine application. *Vaccines (Basel)*. 2023;12(1):49. doi:10.3390/vaccines12010049.
23. Scribano D, Cheri E, Pompilio A, Di Bonaventura G, Belli M, Cristina M, Sansone L, Zagaglia C, Sarshar M, Palamara AT, et al. *Acinetobacter baumannii* OmpA-like porins: functional characterization of bacterial physiology, antibiotic resistance, and virulence. *Commun Biol*. 2024;7(1):948. doi:10.1038/s42003-024-06645-0.
24. Lucidi M, Visaggio D, Migliaccio A, Capecchi G, Visca P, Imperi F, Zarrilli R. Pathogenicity and virulence of *Acinetobacter baumannii*: factors contributing to fitness in healthcare settings and the infected host. *Virulence*. 2024;15(1):2289769. doi:10.1080/21505594.2023.2289769.
25. Rumbo C, Tomás M, Fernández Moreira E, Soares NC, Carvajal M, Santillana E, Beceiro A, Romero A, Bou G. The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. *Infect Immun*. 2014;82(11):4666-4680. doi:10.1128/IAI.02034-14.
26. Islam AHMS, Singh KKB, Ismail A. Demonstration of an outer membrane protein that is antigenically specific for *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;69(1):38-44. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.09.008.
27. Rumbo C, Fernández-Moreira E, Merino M, Poza M, Mendez JA, Soares NC, Mosquera A, Chaves F, Bou G. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(7):3084-3090. doi:10.1128/AAC.00929-10.
28. Hasan T, Choi CH, Oh MH. Genes involved in the biosynthesis and transport of acinetobactin in *Acinetobacter baumannii*. *Genomics Inform*. 2015;13(1):2-6. doi:10.5808/GI.2015.13.1.2.
29. Dorsey CW, Tomaras AP, Connerly PL, Tolmasky ME, Crosa JH, Actis LA. The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio*

- anguillarum 775 are structurally and functionally related. Microbiology (Reading). 2004;150(Pt 11):3657-3667. doi:10.1099/mic.0.27371-0.
30. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat Rev Microbiol. 2004;2(2):95-108. doi:10.1038/nrmicro821.
 31. Gedefie A, Demsis W, Ashagrie M, Kassa Y, Tesfaye M, Tilahun M, Bisetegn H, Sahle Z. *Acinetobacter baumannii* biofilm formation and its role in disease pathogenesis: a review. Infect Drug Resist. 2021;14:3711-3719. doi:10.2147/IDR.S332051.
 32. Armbruster CR, Parsek MR. New insight into the early stages of biofilm formation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(17):4317-4319. doi:10.1073/pnas.1804084115.
 33. Upmanyu K, Haq QM, Singh R. Factors mediating *Acinetobacter baumannii* biofilm formation: opportunities for developing therapeutics. Curr Res Microb Sci. 2022;3:100131. doi:10.1016/j.crmicr.2022.100131.
 34. Morris FC, Dexter C, Kostoulas X, Uddin MI, Peleg AY. The mechanisms of disease caused by *Acinetobacter baumannii*. Front Microbiol. 2019;10:1601. doi:10.3389/fmicb.2019.01601.
 35. Stahl J, Bergmann H, Göttig S, Ebersberger I, Averhoff B. *Acinetobacter baumannii* virulence is mediated by the concerted action of three phospholipases D. PLoS One. 2015;10(9). doi:10.1371/journal.pone.0138360.
 36. Kyriakidis I, Vasileiou E, Pana ZD, Tragiannidis A. *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms. Pathogens. 2021;10(3):373. doi:10.3390/pathogens10030373.
 37. Scoffone VC, Trespidi G, Barbieri G, Arshad A, Israyilova A, Buroni S. The evolution of antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii* and new strategies to fight it. Antibiotics (Basel). 2025;14(1):85. doi:10.3390/antibiotics14010085.
 38. Cerezales M, Xanthopoulou K, Wille J, Krut O, Seifert H, Gallego L, Higgins PG. Mobile genetic elements harboring antibiotic resistance determinants in *Acinetobacter baumannii* isolates from Bolivia. Front Microbiol. 2020;11:919. doi:10.3389/fmicb.2020.00919.
 39. Roca I, Espinal P, Vila-Farrés X, Vila J. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. Front Microbiol. 2012;3:148. doi:10.3389/fmicb.2012.00148.
 40. Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, Zórawski M, Krawczyk M, Tryniszewska E. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: the role of AdeABC (RND family) efflux pump in

- resistance to antibiotics. *Folia Histochem Cytobiol.* 2008;46(3):257-267. doi:10.2478/v10042-008-0056-x.
41. Nageeb WM, AlHarbi N, Alrehaili AA, Zakai SA, Elfadadny A, Hetta HF. Global genomic epidemiology of chromosomally mediated non-enzymatic carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: on the way to predict and modify resistance. *Front Microbiol.* 2023;14:1271733. doi:10.3389/fmicb.2023.1271733.
 42. Nowak P, Paluchowska P. *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance—role of carbapenemases. *Folia Histochem Cytobiol.* 2016;54(2):61-74. doi:10.5603/FHC.a2016.0009.
 43. Hawkey J, Ascher DB, Judd LM, Wick RR, Kostoulas X, Cleland H, Spelman DW, Padiglione A, Peleg AY, Holt KE. Evolution of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* during a prolonged infection. *Microb Genom.* 2018;4(3). doi:10.1099/mgen.0.000165.
 44. Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980;289(1036):321-331. doi:10.1098/rstb.1980.0049.
 45. De Souza J, D'Espindula HRS, Ribeiro IDF, Gonçalves GA, Pilonetto M, Faoro H. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms, therapeutics, and innovations. *Microorganisms.* 2025;13(7):1501. doi:10.3390/microorganisms13071501.
 46. Ayibieke A, Sato W, Mahazu S, Prah I, Addow-Thompson J, Ohashi M, Suzuki T, Iwanaga S, Ablordey A, Saito R. Molecular characterisation of the NDM-1-encoding plasmid p2189-NDM in an *Escherichia coli* ST410 clinical isolate from Ghana. *PLoS One.* 2018;13(12). doi:10.1371/journal.pone.0209623.
 47. Evans BA, Amyes SGB. OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(2):241-263. doi:10.1128/CMR.00117-13.
 48. Kanafani ZA, Kanj SS. *Acinetobacter* infection: epidemiology, microbiology, pathogenesis, clinical features, and diagnosis. In: Post TW, editor. UpToDate [Internet]. Waltham (MA): UpToDate Inc.; zaktualizowano 22.11.2024 [cytowano 22.02.2026]. Dostępne na: <https://www.uptodate.com>
 49. Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis.* 2006;42(5):692-699. doi:10.1086/500202.
 50. Gulen TA, Guner R, Celikbilek N, Keske S, Tasyaran M. Clinical importance and cost of bacteremia caused by nosocomial multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int J Infect Dis.* 2015;38:32-35. doi:10.1016/j.ijid.2015.06.014.

51. Żukowska A, Hryniewicz W, red. Rekomendacje diagnostyki, terapii i profilaktyki antybiotykowej zakażeń w szpitalu – 2020: materiał przeznaczony dla komitetów terapeutycznych i zespołów ds. antybiotykoterapii polskich szpitali. Wyd. 2. Warszawa: Narodowy Instytut Leków; 2020. ISBN: 978-83-949636-3-7.
52. Duszyńska W, Litwin A, Rojek S, Szczesny A, Ciasullo A, Goździk W. Analysis of *Acinetobacter baumannii* hospital infections in patients treated at the intensive care unit of the University Hospital, Wrocław, Poland: a 6-year, single-center, retrospective study. Infect Drug Resist. 2018;11:629-635. doi:10.2147/IDR.S162232.
53. World Health Organization. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2024 [cytowano 23.02.2026]. Dostępne na: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>
54. Zhang S, Di L, Qi Y, Qian X, Wang S. Treatment of infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Front Cell Infect Microbiol. 2024;14:1395260. doi:10.3389/fcimb.2024.1395260.
55. European Medicines Agency. Fectroja (cefiderocol) [Internet]. Amsterdam: European Medicines Agency; [cytowano 23.02.2026]. Dostępne na: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/fectroja>
56. Dortet L, Poirel L, Errera C, Nordmann P. CarbAcineto NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol. 2014;52(7):2359-2364. doi:10.1128/JCM.00594-14.
57. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. 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. 2015;10(3):e0123690. doi:10.1371/journal.pone.0123690.
58. Abrar S, Vajeelha A, Ul-Ain N, Riaz S. Distribution of CTX-M group I and group III β -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Lahore, Pakistan. Microb Pathog. 2017;103:8-12. doi:10.1016/j.micpath.2016.12.004.
59. Słoczyńska A, Wand ME, Tyski S, Laudy AE. Analysis of *bla*_{CHDL} genes and insertion sequences related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical strains isolated in Warsaw, Poland. Int J Mol Sci. 2021;22(5):2486. doi:10.3390/ijms22052486.

11. ŻYCIORYS NAUKOWY

Dane osobowe

Dagmara Depka-Radzikowska

e-mail: dagmaradepka@cm.umk.pl

Wykształcenie

2022 – obecnie

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy – kształcenie specjalizacyjne dla diagnostów laboratoryjnych w dziedzinie mikrobiologia medyczna

2018 – 2021

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Wydział Farmacji, Biotechnologii Medycznej i Medycyny Laboratoryjnej – studia podyplomowe w zakresie analityki medycznej

2016 – 2018

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Wydział Lekarski – studia magisterskie – **biotechnologia**, specjalność – **biotechnologia medyczna**

2013 – 2016

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Wydział Lekarski – studia licencjackie – **biotechnologia**

Doświadczenie zawodowe

2020 – obecnie

Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, stanowisko: pracownik dydaktyczno-badawczy

2018 – obecnie

Zakład Mikrobiologii Klinicznej, Szpital Uniwersytecki nr 1, im. dr. Antoniego Jurasza w Bydgoszczy, stanowisko: młodszy asystent diagnostyki laboratoryjnej

2017 – 2020

Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, stanowisko: pracownik inżynierjno-techniczny

Działalność naukowa

Łączna liczba publikacji	17
Sumaryczny IF (włączając publikacje stanowiące cykl)	72,621
Sumaryczna punktacja MNiSW (włączając publikacje stanowiące cykl)	1500
Liczba krajowych konferencji naukowych – udział aktywny	7
h-index (wg Scopus)	8

Działalność dydaktyczna

1. Prowadzenie zajęć dydaktycznych w ramach ścieżki zawodowej w latach 2020 – 2023 oraz 2025 – obecnie z przedmiotu diagnostyka mikrobiologiczna dla kierunku analityka medyczna II i III rok (laboratoria i seminaria) oraz praktyczna nauka zawodu dla kierunku analityka medyczna III rok (laboratoria)
2. Prowadzenie zajęć w ramach szkolenia organizowanego przez Krajową Izbę Diagnostów Laboratoryjnych: „Kursy podnoszące kwalifikacje kadry medycznej udzielającej świadczeń zdrowotnych, w tym w związku z chorobą zakaźną, w szczególności COVID-19”, 2023 – Diagnostyka molekularna (zajęcia praktyczne)
3. Prowadzenie zajęć na kursie specjalizacyjnym: „Metody niehodowlane (serologiczne i biologii molekularnej) w diagnostyce mikrobiologicznej” w ramach szkolenia specjalizacyjnego dla diagnostów laboratoryjnych w dziedzinie laboratoryjnej mikrobiologii medycznej, 2025 – Diagnostyka molekularna (zajęcia praktyczne)
4. Prowadzenie zajęć w ramach projektu Agencji Badań Medycznych „Edukacja Medyczna pracowników ochrony zdrowia – INNOWACYJNE STUDIA PODYPLOMOWE”, 2025 – Diagnostyka mikrobiologiczna XXI w. – ekspresja genów (zajęcia praktyczne)

Działalność popularno-naukowa

Organizacja i przeprowadzenie warsztatów w wydarzeniach popularyzujących naukę organizowanych przez Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

1. „Nanogramy niezliczonej wiedzy – diagnostyka molekularna zakażeń wirusem SARS-CoV-2”, Dni Nauki Medicalia, 29–30.03.2023, Bydgoszcz
2. „Jacy drobni przyjaciele żyją w Twoim ciele?” podczas XIII edycji Bydgoskiego Festiwalu Nauki., 20.10.2023, Bydgoszcz

3. „Jak rozpoznać jaka to bakteria? Poznaj metody identyfikacji drobnoustrojów” podczas III edycji Praktycznych Warsztatów dla Uczniów Szkół Ponadpodstawowych, 29.09.2023, Bydgoszcz
4. „Ba(k)terie naszego organizmu” podczas VII edycji Praktycznych Warsztatów dla Uczniów Szkół Ponadpodstawowych, 22.09.2025, Bydgoszcz

Działalność organizacyjna

1. Członek komitetu organizacyjnego III Ogólnopolskiej Konferencji „Drobnoustroje w świecie człowieka – Drobnoustroje oportunistyczne”, 18–19.06.2018, Bydgoszcz

Udział w grantach i projektach badawczych

1. Projekt finansowany ze środków NCN SONATA pt. „Analiza oddechu jako nowatorska metoda diagnozowania respiratorowego zapalenia płuc i monitorowania spersonalizowanej terapii.”, 2020 – 2022 (wykonawca)
2. Badanie oceniające działanie wyrobu medycznego do diagnostyki *in vitro* – system BacterOMIC, pt. „Ilościowa ocena lekowrażliwości drobnoustrojów oraz wykrywanie mechanizmów oporności z zastosowaniem systemu BacterOMIC w odniesieniu do metody referencyjnej.”, 2021 – współpraca z obszarem gospodarczym – firma Bacteromic Sp. z o. o. (wykonawca projektu)

Nagrody

1. Nagroda zespołowa Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowej w 2021 r.

12. KOPIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU

12.1. Publikacja nr 1

Article

The Prevalence of Virulence Factor Genes among Carbapenem-Non-Susceptible *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains and Their Usefulness as Potential Molecular Biomarkers of Infection

Dagmara Depka ^{1,2,*}, Tomasz Bogiel ^{1,2,*}, Mateusz Rzepka ^{1,2} and Eugenia Gospodarek-Komkowska ^{1,2}

¹ Microbiology Department, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 85-094 Bydgoszcz, Poland

² Department of Clinical Microbiology, Antoni Jurasz University Hospital No. 1, 85-094 Bydgoszcz, Poland

* Correspondence: dagmaradepka@cm.umk.pl (D.D.); t.bogiel@cm.umk.pl (T.B.); Tel.: +48-52-585-44-80 (D.D. & T.B.)

Abstract: Healthcare-associated infections caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains are a serious global threat. Therefore, it is important to expand the knowledge on the mechanisms of pathogenicity of these particular bacteria. The aim of this study was to assess the distribution of selected virulence factor genes (*bap*, *surA1*, *omp33-36*, *bauA*, *bauS*, and *pld*) among carbapenem-non-susceptible clinical *A. baumannii* isolates and to evaluate their potential usefulness as genetic markers for rapid diagnostics of *A. baumannii* infections. Moreover, we aimed to compare the virulence genes prevalence with the occurrence of carbapenemases genes. A total of 100 carbapenem-non-susceptible *A. baumannii* clinical isolates were included in the study. The presence of virulence factors and *bla*_{OXA} genes was evaluated by real-time PCR. The occurrence of virulence factors genes was as follows: 100.0% for the *bap* and *surA1* genes, 99.0% for the *basD* and *pld* genes. The *bauA* and *omp33-36* genes were absent among the studied strains. The predominant genes (*bap* and *surA1*) are involved in biofilm formation and their presence among all clinical strains can be applied as a genetic marker to recognize *A. baumannii* infection. High frequencies of the *basD* gene—involved in siderophore biosynthesis and the gene encoding phospholipase D (*pld*)—were also noted among *bla*_{OXA}-positive strains, showing their potential role in a pathogenicity of *bla*_{OXA}-positive *A. baumannii* clinical strains.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; *bla*_{OXA} genes; carbapenem-resistance; HAI; virulence factor genes



Citation: Depka, D.; Bogiel, T.; Rzepka, M.; Gospodarek-Komkowska, E. The Prevalence of Virulence Factor Genes among Carbapenem-Non-Susceptible *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains and Their Usefulness as Potential Molecular Biomarkers of Infection. *Diagnostics* **2023**, *13*, 1036. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13061036>

Academic Editor: Alessandro Russo

Received: 16 January 2023

Revised: 25 February 2023

Accepted: 6 March 2023

Published: 8 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Acinetobacter baumannii are non-fermenting, aerobic Gram-negative rods [1]. Due to their ability to survive in a hospital environment, these bacteria mainly cause healthcare-associated infections (HAIs) [2]. Ventilator-associated pneumonia (VAP) and bacteraemia are the most common infections caused by them, with highest mortality rates [3].

An increasing threat of *A. baumannii* infections is related to a high percentage of antimicrobial-resistant isolates. Therefore, Rice et al. [4] included *A. baumannii* representatives into a group of bacteria known as ESKAPE (among *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* spp.). This acronym describes bacteria that can easily avoid the effects of antimicrobials treatment. Moreover, in 2017, the World Health Organization recognized carbapenem-resistant *A. baumannii* (CRAB) as critical pathogens for which profound research and development of effective drugs are needed [5].

A. baumannii strains possess many intrinsic resistance mechanisms. Moreover, due to the plasticity of their genome, they also easily acquire new mechanisms, such as genes

encoding antibiotic hydrolyzing enzymes [6], with carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamases (CHDLs, oxacillinases) prevailing among these bacteria. Among the aforementioned enzymes, the most prevalent oxacillinases families are chromosomally encoded OXA-51-like and the following enzymes encoded on mobile genetics elements (plasmids, transposons): OXA-23-like, OXA-40/24-like, OXA-58-like, OXA-143-like, and OXA-235-like carbapenemases [7].

The pathogenicity of *A. baumannii* is determined by factors involved in the following processes: bacteria transmission, binding to host structures, human cells damage and invasion [8]. In turn, bacterial viability in the hospital environment is associated the most with *A. baumannii* biofilm formation. Proteins and structures involved in biofilm formation are mainly: pili, outer membrane proteins (surface antigen protein 1—SurA1), and adhesins (biofilm-associated protein—Bap). As it has been previously shown, Bap is involved in intercellular adhesion, ensuring the maturation of biofilm on biotic and abiotic surfaces, with mutations in the *bap* gene causing a weakening of adhesive capacity of *A. baumannii* strains [9].

Bacterial porins are involved in adhesion and they have also been shown to play a crucial role in an apoptosis process. The 33-36-kDa Omp protein (Omp 33-36) is a water channel in *A. baumannii* cells and plays a role in apoptosis and modulates autophagy. The Omp 33-36 is released into the host cells inside the outer membrane vesicles. This protein has also been shown to have an effect on DNA fragmentation in HeLa and Hep-2 cells lines [10,11].

Bacterial cells, during the proceeding infection, have limited access to iron, which is important for their viability. Most bacteria, including *A. baumannii*, obtain iron within siderophores. Acinetobactin is the most important siderophore among *A. baumannii* strains [1]. BauS and BauA proteins are needed for acinetobactin biosynthesis and transport, respectively. These proteins have also been shown to play a vital role in the apoptotic death of epithelial cells [12].

Phosphatidylcholine (PC) is one of the phospholipids that builds the cell membrane of eukaryotic cells; among lung structures, almost 80% of all phospholipids are PC compounds, which is very important due to the localization of the majority of infections (VAP). *A. baumannii* cells synthesize phospholipases (e.g., phospholipase D—PLD) that hydrolyze PC and alter the permeability of the host cell membrane [13,14].

The investigated virulence genes are all chromosomally encoded and play a role in bacterial viability. In the relevant literature, there is a lack of information on the transfer of these genes between species, except for the plasmid-encoded *bla_{OXA}* genes, which can potentially be transferred between bacteria [7].

The aims of the study were to: assess the frequency of the selected virulence genes presence (*bap*, *surA1*, *omp33-36*, *bauA*, *bauS*, and *pld*) involved in pathogenicity of CRAB clinical strains and to evaluate their potential usefulness as genetic markers for rapid diagnostics of *A. baumannii* infections. The objective of the study was also to investigate the prevalence of *bla_{OXA}* genes among these strains and the occurrence of virulence factor genes among strains carrying different oxacillinases genes.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Isolates and Their Origin

The study included 100 CRAB clinical strains. They were all isolated in the Clinical Microbiology Department from different patients hospitalized at University Hospital No. 1 in Bydgoszcz, Poland, between 2017 and 2020. In total, 63 (63.0%) strains were derived from the patients of the Anesthesiology and Intensive Care Unit (for the detailed origin of the strains, see Table S1).

A. baumannii strains were isolated from various clinical specimen types, mainly from respiratory tract infections (RTIs) ($n = 46$) (for the detailed data, see Table S2).

The studied strains were identified using MALDI-TOF MS (Bruker, Mannheim, Germany) in a routine laboratory diagnostic procedure according to the manufacturer's pro-

tol. The MALDI Biotyper software version 4.2.28 was used for bacterial identification. The cut-off scores for identification were as follows: ≥ 1.7 —a reliable identification to the genus level, rate ≥ 1.7 —a reliable identification to the species level. In the current study, scores above 2.0 were reached for every strain. The bacterial test standard (BTS, Bruker, Mannheim, Germany) was used as identification quality control.

The isolates were stored in Brain Heart Infusion (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) with 15% glycerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at -80°C and were grown on MacConkey Agar (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) before the testing.

2.2. Antimicrobial Susceptibility Testing

Antimicrobial susceptibility testing (AST) of the studied isolates was performed with BD Phoenix™ M50 NMIC-402 panels (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) in a routine laboratory diagnostic scheme. The results of AST were interpreted according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing recommendation v 13.0 (EUCAST). *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were used as quality control strains, according to EUCAST recommendations [15].

The classifications of the strains into multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) groups were as follows: MDR—strains resistant to at least three of the tested antimicrobials belonging to separate antibiotic groups, and PDR—strains resistant to all of the tested antimicrobials [16].

2.3. DNA Extraction, Virulence Factor, and *bla*_{OXA} Genes Detection

DNA samples from the investigated *A. baumannii* strains were isolated using the Genomic Mini kit (A&A Biotechnology, Gdansk, Poland) according to the manufacturer's protocol. DNA was stored at -20°C before the examination.

The virulence factors and *bla*_{OXA} genes were detected by real-time PCR with the LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland) and CFX OPUS 96 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The specification of primers used in the study is summarized in Table 1. Final volume of each reaction was 20 μL . The reagents were used as follows: 4 μL of 5 $\times$ HOT FIREPOL® EvaGreen® Mix (SolisBioscience, Tartu, Estonia), 5 μL of molecular biology grade water (EurX, Gdansk, Poland), 5 μL (0.25 μM /reaction) of each primer (Genomed, Warsaw, Poland), and 1 μL of the DNA extracted from the investigated isolates. The following temperature conditions were applied: one cycle at 95°C for 12 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s, annealing temperature (depending on the detected gene, see Table 1) for 20 s, and the final elongation— 72°C for 20 s. The data collection was enabled at each extension step. The melt curve protocol was added afterwards— 95°C for 5 s and 60°C for 1 min—followed by data acquisition at 0.11 $^{\circ}\text{C}$ increments between 60°C and 97°C to confirm the specificity of the amplification product (for the results, see Figures S1–S16). The data collection was enabled continuously at each increment during the temperature change (high-resolution melting).

The DNA extracted from *A. baumannii* DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Germany) 30008 and *A. baumannii* DSMZ 102930 were used as the reference strains (positive controls) for the investigated genes presence (the distribution of virulence factors genes among the references *A. baumannii* strains are shown in Table S3). The molecular biology grade water (EurX, Gdansk, Poland) was used as a negative control (NTC).

Table 1. Sequences of primers applied for virulence genes detection and real-time PCR parameters used in the study.

Gene Detected	Primer Sequences 5'→3'	T _m (°C)	Annealing Temperature (°C)	References
<i>bap</i>	F: AGTTAAAGAAGGGCAAGAAG	47.7	58	[17]
	R: GGAGCACCACCTAACTGA	50.3		
<i>surA1</i>	F: CAATTGGTAGCTGGCGATCA	51.8	58	[18]
	R: TTAGGCGGGACTCAGCTTTT	51.8		
<i>basD</i>	F: CTCTTGCAATGGCAACACCAC	53.8	60	[19]
	R: CCAACGAGACCGCTTATGGT	53.8		
<i>bauA</i>	F: TGGCAAGGTGAAAATGCACG	51.8	60	[20]
	R: GCCGCATATGCCATCAACTG	53.8		
<i>pld</i>	F: CCGTCAATTACGCCAAGCTG	53.8	60	[13]
	R: CTGACGCTACCTGACGGTTT	53.8		
<i>omp33-36</i>	F: ATTAGCCATGACCGGTGCTC	53.8	60	[10]
	R: CCACCCCAAACATGGTCGTA	53.8		
<i>bla_{OXA-40}</i>	F: GGTTAGTTGGCCCCCTTAA	51.8	58	[21]
	R: AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	49.7		
<i>bla_{OXA-23}</i>	F: GATCGGATTGGAGAACCAGA	50.3	58	[21]
	R: ATTTCTGACCGCATTTCCAT	47.7		

F—forward primer, R—reverse primer, T_m—primer melting temperature.

2.4. Statistical Data Analysis

Statistical analysis was performed using the Statistica™ 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) program, using Spearman's rank-order correlation test to investigate the correlation for particular genes' coexistence and the strains origin ($p \leq 0.05$). An interpretation of Spearman's rank-order correlation test was as follows: for $r < 0.2$ —no correlation observed; 0.2–0.4—weak correlation; 0.4–0.7—moderate correlation; 0.7–0.9—strong correlation; >0.9 —very strong correlation.

3. Results

3.1. Antimicrobial Susceptibility

All the tested *A. baumannii* isolates were non-susceptible to carbapenems and showed a high percentage of resistance to most of the antimicrobial agents tested. Except for colistin, the in vitro activity of other antimicrobial agents was relatively low (with about 20% strains susceptible to aminoglycosides). All of the strains belonged to MDR, while 6 (6.0%) were additionally PDR. Antimicrobial susceptibility results of the studied strains are shown in Table 2.

Table 2. Antimicrobial susceptibility of the studied strains ($n = 100$).

Antimicrobial	Number (%) of Strains		
	Susceptible	Susceptible, Increased Exposure	Resistant
Imipenem (IPM)	0 (0.0)	2 (2.0)	98 (98.0)
Meropenem (MEM)	2 (2.0)	1 (1.0)	97 (97.0)
Gentamicin (GEN) ¹	21 (21.9)	0 (0.0)	75 (78.1)
Amikacin (AMK)	17 (17.0)	5 (5.0)	78 (78.0)

Table 2. Cont.

Antimicrobial	Number (%) of Strains		
	Susceptible	Susceptible, Increased Exposure	Resistant
Tobramycin (NN)	22 (22.0)	0 (0.0)	78 (78.0)
Ciprofloxacin (CIP)	0 (0.0)	0 (0.0)	100 (100.0)
Levofloxacin (LEV)	0 (0.0)	0 (0.0)	100 (100.0)
Trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT)	2 (2.0)	0 (0.0)	98 (98.0)
Colistin (COL)	90 (90.0)	0 (0.0)	10 (10.0)

¹ susceptibility to gentamicin was tested on 96 isolates.

3.2. *bla*_{OXA} Genes Presence

Among the studied strains, *bla*_{OXA-40} and *bla*_{OXA-23} were detected in 62 (62.0%) and 35 (35.0%) isolates, respectively. Very strong negative correlation was revealed between the occurrence of both genes ($r = -0.937306$).

*bla*_{OXA} genes were not detected in three (3.0%) isolates. These were the only CRAB strains without already known carbapenemases that were available during the study and therefore included in the study. One of them was susceptible, with increased exposure to imipenem and meropenem, while the second one was susceptible, with increased exposure to imipenem and susceptible to meropenem. The distribution of susceptibility profiles for the investigated strains is shown in Table 3. Twenty antimicrobial susceptibility profiles were distinguished. The profile of susceptibility to colistin was the only one (44.0%) that was most prevalent, regardless of the *bla*_{OXA} genes detected.

Table 3. Distribution of susceptibility profiles and oxacillinases genes among *A. baumannii* strains included into the study ($n = 100$).

Profile	IPM	MEM	GEN ¹	AMK	NN	CIP	LEV	SXT	COL	<i>bla</i> _{OXA}	Number (%) of Strains ($n = 100$)
I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	<i>bla</i> _{OXA-23}	24 (24.0)
II	R	R	R	R	R	R	R	R	S	<i>bla</i> _{OXA-40}	20 (20.0)
III	R	R	S	R	R	R	R	R	S	<i>bla</i> _{OXA-40}	10 (10.0)
IV	R	R	R	S	S	R	R	R	S	<i>bla</i> _{OXA-40}	9 (9.0)
V	R	R	S	S	S	R	R	R	S	<i>bla</i> _{OXA-40}	4 (4.0)
VI	R	R	R	I	R	R	R	R	S	<i>bla</i> _{OXA-40}	4 (4.0)
VII	R	R	R	R	S	R	R	R	S	<i>bla</i> _{OXA-23}	4 (4.0)
VIII	R	R	S	R	R	R	R	R	S	<i>bla</i> _{OXA-23}	4 (4.0)
IX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>bla</i> _{OXA-23}	3 (3.0)
X	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<i>bla</i> _{OXA-40}	3 (3.0)
XI	R	R	R	S	S	R	R	R	R	<i>bla</i> _{OXA-40}	2 (2.0)
XII	R	R	R	R	R	R	R	R	S	-	1 (1.0)
XIII	R	R	R	R	R	R	R	S	S	<i>bla</i> _{OXA-40}	1 (1.0)
XIV	R	R	R	S	S	R	R	R	S	<i>bla</i> _{OXA-23}	1 (1.0)
XV	R	R	R	R	S	R	R	R	S	<i>bla</i> _{OXA-40}	1 (1.0)
XVI	R	R	S	R	R	R	R	R	R	<i>bla</i> _{OXA-40}	1 (1.0)
XVII	I	I	R	R	R	R	R	R	S	-	1 (1.0)
XVIII	I	S	R	R	R	R	R	R	S	-	1 (1.0)
XIX	R	S	S	S	S	R	R	R	R	<i>bla</i> _{OXA-40}	1 (1.0)
XX	R	R	S	I	R	R	R	R	S	<i>bla</i> _{OXA-40}	1 (1.0)
XXI ¹	R	R		R	R	R	R	R	S	<i>bla</i> _{OXA-23}	3 (3.0)
XXII ¹	R	R		R	R	R	R	S	S	<i>bla</i> _{OXA-40}	1 (1.0)

¹ susceptibility to gentamicin was tested on 96 isolates, R—resistant (pink boxes), I—susceptible, increased exposure (yellow boxes), S—susceptible (green boxes), IPM—imipenem, MEM—meropenem, GEN—gentamicin, AMK—amikacin, NN—tobramycin, CIP—ciprofloxacin, LEV—levofloxacin, SXT—trimethoprim/sulfamethoxazole, COL—colistin.

There was a weak positive correlation between the presence of the *bla*_{OXA-23} gene and the strains' origin from RTI cases ($r = 0.24819$). The *bla*_{OXA-40}-positive isolates were derived statistically more often from other sites of infections—very weak positive correlation ($r = 0.22818$). The detailed prevalence of the *bla*_{OXA} genes in *A. baumannii* in relation to the strains' origin is shown in Table 4.

Table 4. The occurrence of *bla*_{OXA} genes in *A. baumannii* with respect to strains' origin.

Clinical Material	<i>bla</i> _{OXA-40}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-40/23} -Negative	Total ($n = 100$)
RTI	23 (50.0%)	22 (47.8%)	1 (2.2%)	46 (46.0%)
Other origin ¹	39 (72.2%)	13 (24.1%)	2 (3.7%)	54 (54.0%)

¹ wound infections/pus, invasive infections, urinary tract infections, body fluids, tissue, granulation tissue, vascular catheter (for detailed data, see Table S2).

3.3. Virulence Factor Genes Presence and Co-Existence

The prevalence of virulence factors genes was as follows: 100 (100.0%) for the *bap* and *surA1* genes, 99 (99.0%) for the *basD* and *pld* genes. The *bauA* and *omp33-36* genes were not detected among the studied strains. Table 5 shows the occurrence of virulence factors genes with relation to the detected carbapenemase gene.

Table 5. The occurrence of virulence factor genes among *A. baumannii* strains included in the study ($n = 100$).

	Number (%) of Strains with a Particular Virulence Factor Gene					
	<i>bap</i>	<i>surA1</i>	<i>basD</i>	<i>bauA</i>	<i>pld</i>	<i>omp33-36</i>
<i>bla</i> _{OXA-40} ($n = 62$)	62 (100.0)	62 (100.0)	62 (100.0)	0 (0.0)	62 (100.0)	0 (0.0)
<i>bla</i> _{OXA-23} ($n = 35$)	35 (100.0)	35 (100.0)	34 (97.1)	0 (0.0)	34 (97.1)	0 (0.0)
<i>bla</i> _{OXA-40/23} -negative ($n = 3$)	3 (100.0)	3 (100.0)	3 (100.0)	0 (0.0)	3 (100.0)	0 (0.0)

There were no statistically significant differences between the detected carbapenemase gene and the particular virulence factor gene presence (Spearman's rank-order correlation below 0.2). The only difference was shown for the two *bla*_{OXA-23}-positive isolates, one of which was absent for the *basD* gene, while the other lacked the *pld* gene.

4. Discussion

HAIs caused by CRAB are a global problem due to limited therapeutic options for their treatment. *A. baumannii* strains are persistent in the hospital environment due to the development of resistance mechanisms to disinfection and a high survival rate in dry environments [22]. The CRAB strains account for almost 90% of *A. baumannii* infections in some countries, mostly in southern Europe and Asia [23]. Moreover, the European Center for Disease Prevention and Control report in 2021 highlights the increased isolation rate of *Acinetobacter* spp., mainly *A. baumannii* complex representatives, during the two years of the pandemic (2020–2021). The reason might have been that more patients were mechanically ventilated in the aforementioned time period due to Coronavirus disease [24].

A. baumannii strains frequently exhibit antimicrobial susceptibility profiles categorized as MDR or even PDR. In our study, six (6.0%) of the isolates were PDR. Resistance to carbapenems is often connected with lack of susceptibility to other groups of antibiotics (e.g., fluoroquinolones) [25]. In our study, 100% of CRABs were simultaneously resistant to fluoroquinolones, only about 20% of isolates were susceptible to aminoglycosides, which correlates with the reports of other researchers [26,27]. Therefore, the only treatment option for the infections with this etiology is often colistin [28]. This is in concordance with the results of our study, with the most prevalent antimicrobial susceptibility profile consisting of the strains exclusively susceptible to colistin.

The overuse of antibiotics, such as carbapenems, results in CRAB selection [29]. The most prevalent mechanisms of carbapenem resistance among *A. baumannii* isolates are CHDLs, with OXA-23 occurring the most often among *A. baumannii* worldwide [30,31]. Meanwhile, the results of our study showed that in our region, OXA-40-positive isolates are dominant, which is consistent with other studies conducted in Poland [32]. In our study, no isolates were simultaneously positive for both tested *bla*_{OXA} genes.

The main factor in the early stages of pathogenicity and persistence of *A. baumannii* strains is biofilm formation. Bap is a factor involved in biofilm synthesis, but also in an adhesion to epithelial cells and abiotic surfaces [33]. The results of our study show that all *A. baumannii* isolates carried the *bap* gene, which makes this gene useful as one of the markers of *A. baumannii* infections. Our findings are similar to the results obtained by Monfared et al. [34]. They have also shown that the bacteria lacking the *bap* gene are incapable of biofilm synthesis. Of note, the isolates used in this study were derived from specific clinical specimens (mostly broncho-alveolar lavage and wound swabs) where the biofilm formation is crucial for an infection initiation.

The outer membrane protein also involved in biofilm formation, adhesion, and serum resistance is a surface antigen protein 1 (*surA1*) [18]. Liu et al. described that 100.0% of MDR and 83.3% of non-MDR *A. baumannii* isolates carry the *surA1* gene [20]. The results of the aforementioned study are similar with our observations; all the tested isolates were positive for the *surA1* gene, also making this gene a potential biomarker of infections with this etiology.

Interestingly, due to the fact that the presence of the *bap* and *surA1* genes is noted in all of the clinical strains, they can be altogether used as a genetic marker to confirm *A. baumannii* infection, with an application using molecular biology methods, however, this observation requires further research.

Outer membrane protein 33-36 (*omp 33-36*) is involved in adherence, invasion, and cytotoxicity to human epithelial cells [10,11]. The previous study showed that the decrease expression of Omp33-36 could be also associated with imipenem resistance [35]. None of the *A. baumannii* tested in this study possessed this gene, but all were non susceptible to imipenem. In turn, other researchers have shown that there is no statistically significant difference in the frequency of this gene among CARb and non-CARb strains [20].

Phospholipase D is an enzyme involved in serum resistance and invasion due to hydrolysis of phospholipids which build the host cell membrane [13]. Phospholipase D cleaves off a head group of phospholipids and could interfere with the immune system response [1]. The results of our study indicate a high prevalence of the *pld* gene (99.0%) among CRAB strains, which is similar to the results of the previous study [20]. Therefore, it has been concluded that phospholipase D may play an important role in the pathogenesis of *A. baumannii* infections.

The system of iron acquisition in *A. baumannii* is based on the production of low-molecular iron-specific chelators—siderophores. The best known siderophore, produced by *A. baumannii* strains, is acinetobactin. The biosynthesis of acinetobactin is accomplished by the proteins BasA–D and BasF–J [36]. Siderophores enter the bacterial cell in an active transport way, for which appropriate receptors on the cell membrane are needed, e.g., BauA is a receptor for acinetobactin. One of the previous studies showed a high prevalence of gene encoding BauA (*bauA*) especially among MDR isolates [37]. Our results are contradictory—no isolates with the *bauA* gene were detected. In turn, the *basD* gene was detected in 99.0% of isolates and this is in line with the results of other studies, showing *basD* more often (92.0%) than *bauA* (62.5%) among MDR isolates [20]. Porbaran et al. [38] showed the prevalence of *basD* and *bauA* in a lower percentage of *A. baumannii* isolates among 12.5% and 15.2%, respectively. This is more concordant with the results of our study. They also showed a strong correlation between the prevalence of metallo-beta-lactamases and AmpC genes and the occurrence of genes involved in the iron/siderophore uptake system. The genes encoding the acinetobactin metabolism protein are normally located within the Acinetobactin Cluster, meanwhile Eijkelkamp et al. [39] described that the *A. baumannii*

SDF isolate lacks the Acinetobactin gene cluster. This may be one of the explanations why the *bauA* gene was not detected among any of the isolates included into our study.

All the investigated genes encode proteins involved in the viability and pathogenicity of *A. baumannii*. In this study, we only examined the pathogenic potential of the tested strains, however, evaluating the presence of these genes among clinical *A. baumannii* isolates gives better insight into their molecular characteristics. A potential importance of particular genes as biomarkers of these pathogens was also underlined, however, more research is needed to investigate the actual significance of these virulence factors, for example, the ability to biofilm synthesis or assessing the expression levels of the genes studied.

A limitation of this study was that only carbapenem-non-susceptible *A. baumannii* strains were considered. However, they are definitely the most prevalent isolates worldwide and therefore the most promising study objects. Nevertheless, in order to complete the data on the distribution of virulence factor genes, it would be preferable to investigate carbapenem-susceptible isolates also. However, due to such widespread presence of MDR and PDR *A. baumannii* isolates, the multidrug-susceptible strains are currently not easily reachable.

To the best of our knowledge, this is the first work showing the prevalence of virulence factors genes in terms of the presence of *bla*_{OXA} genes among *A. baumannii* isolates derived from patients hospitalized in Poland. Definite further studies on this issue are necessary, e.g., genes presence confirmation by DNA sequencing, testing for more clinically threatening beta-lactamases such as OXA-48 or NDM-1. However, there are no statistically significant differences or obvious correlations between the presence of virulence factor genes and *bla*_{OXA} genes. Comparing the result of our study to the studies of other researchers, it can be concluded that the *omp33-36* and *bauA* genes are not essential for the pathogenesis of infections caused by *bla*_{OXA}-positive *A. baumannii* clinical isolates, at least for the infections localized in the sites considered in the present study.

5. Conclusions

The most prevalent virulence factors genes among studied *A. baumannii* isolates are the *bap* and *surA1* genes. These genes, especially their co-existence, could be used as biomarkers for the diagnostics of *A. baumannii* infections. A high percentage of the gene encoding a protein involved in the biosynthesis of the siderophore (acinetobactin)—*basD* is also observed among *A. baumannii*. Meanwhile, the *bauA* gene—encoding the transport protein for acinetobactin is absent among carbapenem-non-susceptible isolates. Therefore, there is a possibility of another pathway for the siderophore transport for this particular group of *A. baumannii* strains.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/diagnostics13061036/s1>, Table S1: The origin of *Acinetobacter baumannii* (*n* = 100) clinical strains used in the study (units); Table S2: The origin of *Acinetobacter baumannii* (*n* = 100) strains included in the study (specimen types); Table S3: The distribution of virulence factors genes among the reference *Acinetobacter baumannii* strains; Figure S1: Picture of amplification curves showing results of real-time PCR for the *bap* gene detection—LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland); Figure S2: An example of picture showing melting peaks of the real-time PCR product specificity for the *bap* gene—LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland); Figure S3: Picture of amplification curves showing results of real-time PCR for the *surA1* gene detection—LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland); Figure S4: An example of picture showing melting peaks of the real-time PCR product specificity for the *surA1* gene—LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland); Figure S5: Picture of amplification curves showing results of real-time PCR for the *basD* gene detection—LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland); Figure S6: An example of picture showing melting peaks of the real-time PCR product specificity for the *basD* gene—LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland); Figure S7: Picture of amplification curves showing results of real-time PCR for the *bauA* gene detection—CFX OPUS 96 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA); Figure S8: An example of picture showing melting peaks of the real-time PCR product specificity for the *bauA* gene—CFX OPUS 96 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA); Figure S9: Picture of amplification curves showing results of real-time

PCR for the *pld* gene detection—CFX OPUS 96 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA); Figure S10: An example of picture showing melting peaks of the real-time PCR product specificity for the *pld* gene—CFX OPUS 96 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA); Figure S11: Picture of amplification curves showing results of real-time PCR for the *omp33-36* gene detection—CFX OPUS 96 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA); Figure S12: An example of picture showing melting peaks of the real-time PCR product specificity for the *omp33-36* gene—CFX OPUS 96 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA); Figure S13: Picture of amplification curves showing results of real-time PCR for the *bla_{OXA-40}* gene detection—LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland); Figure S14: An example of melting peaks picture showing specificity of the real-time PCR product for the *bla_{OXA-40}* gene—LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland); Figure S15: Picture of amplification curves showing results of real-time PCR for the *bla_{OXA-23}* gene detection—LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland); Figure S16: An example of picture showing melting peaks of the real-time PCR product specificity for the *bla_{OXA-23}* gene—LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland).

Author Contributions: Conceptualization, D.D.; methodology, D.D. and T.B.; software, D.D.; validation, D.D.; formal analysis, D.D. and M.R.; investigation, D.D.; resources, D.D. and T.B.; data curation, D.D. and M.R.; writing—original draft preparation, D.D.; writing—review and editing, D.D., T.B., M.R. and E.G.-K.; visualization, D.D.; supervision, T.B. and E.G.-K.; project administration, D.D.; funding acquisition, D.D. and T.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was financially supported by Nicolaus Copernicus University funds for the basic research activity of the Microbiology Department Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Poland (PDB WF 839).

Institutional Review Board Statement: This study was approved by the Bioethics Committee of the Nicolaus Copernicus University in Toruń functioning at Collegium Medicum in Bydgoszcz; Approval Code: KB 560/2022.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on a reasonable request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lee, C.-R.; Lee, J.H.; Park, M.; Park, K.S.; Bae, I.K.; Kim, Y.B.; Cha, C.-J.; Jeong, B.C.; Lee, S.H. Biology of *Acinetobacter Baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 55. [CrossRef] [PubMed]
2. Antunes, L.C.S.; Visca, P.; Townner, K.J. *Acinetobacter baumannii*: Evolution of a Global Pathogen. *Pathog. Dis.* **2014**, *71*, 292–301. [CrossRef]
3. Ballouz, T.; Aridi, J.; Afif, C.; Irani, J.; Lakis, C.; Nasreddine, R.; Azar, E. Risk Factors, Clinical Presentation, and Outcome of *Acinetobacter baumannii* Bacteremia. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 156. [CrossRef]
4. Rice, L.B. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESCAPE. *J. Infect. Dis.* **2008**, *197*, 1079–1081. [CrossRef]
5. Tacconelli, E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; Harbarth, S.; Mendelson, M.; Monnet, D.L.; Pulcini, C.; Kahlmeter, G.; Kluytmans, J.; Carmeli, Y.; et al. Discovery, Research, and Development of New Antibiotics: The WHO Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria and Tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 318–327. [CrossRef]
6. Poirel, L.; Naas, T.; Nordmann, P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 24–38. [CrossRef]
7. Poirel, L.; Nordmann, P. Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and Epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* **2006**, *12*, 826–836. [CrossRef]
8. Doi, Y.; Murray, G.L.; Peleg, A.Y. *Acinetobacter baumannii*: Evolution of Antimicrobial Resistance—Treatment Options. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **2015**, *36*, 85–98. [CrossRef]
9. Longo, F.; Vuotto, C.; Donelli, G. Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol.* **2014**, *37*, 119–127.
10. Rumbo, C.; Tomás, M.; Fernández Moreira, E.; Soares, N.C.; Carvajal, M.; Santillana, E.; Beceiro, A.; Romero, A.; Bou, G. The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 Porin Is a Virulence Factor That Induces Apoptosis and Modulates Autophagy in Human Cells. *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 4666–4680. [CrossRef]
11. Smani, Y.; Dominguez-Herrera, J.; Pachón, J. Association of the Outer Membrane Protein Omp33 with Fitness and Virulence of *Acinetobacter baumannii*. *J. Infect. Dis.* **2013**, *208*, 1561–1570. [CrossRef]

12. Gaddy, J.A.; Arivett, B.A.; McConnell, M.J.; López-Rojas, R.; Pachón, J.; Actis, L.A. Role of Acinetobactin-Mediated Iron Acquisition Functions in the Interaction of *Acinetobacter baumannii* Strain ATCC 19606T with Human Lung Epithelial Cells, Galleria Mellonella Caterpillars, and Mice. *Infect. Immun.* **2012**, *80*, 1015–1024. [CrossRef] [PubMed]
13. Jacobs, A.C.; Hood, I.; Boyd, K.L.; Olson, P.D.; Morrison, J.M.; Carson, S.; Sayood, K.; Iwen, P.C.; Skaar, E.P.; Dunman, P.M. Inactivation of Phospholipase D Diminishes *Acinetobacter baumannii* Pathogenesis. *Infect. Immun.* **2010**, *78*, 1952–1962. [CrossRef] [PubMed]
14. Stahl, J.; Bergmann, H.; Göttig, S.; Ebersberger, L.; Averhoff, B. *Acinetobacter baumannii* Virulence Is Mediated by the Concerted Action of Three Phospholipases D. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0138360. [CrossRef] [PubMed]
15. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters Version 13.0, Valid from 2023-01-01. Available online: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.0_Breakpoint_Tables.pdf (accessed on 10 February 2023).
16. Magiorakos, A.-P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; et al. Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 268–281. [CrossRef]
17. Badmasti, F.; Siadat, S.D.; Bouzari, S.; Ajdary, S.; Shahcheraghi, E. Molecular detection of genes related to biofilm formation in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical settings. *J. Med. Microbiol.* **2015**, *64* Pt 5, 559–564. [CrossRef]
18. Liu, D.; Liu, Z.-S.; Hu, P.; Cai, L.; Fu, B.-Q.; Li, Y.-S.; Lu, S.-Y.; Liu, N.-N.; Ma, X.-L.; Chi, D.; et al. Characterization of Surface Antigen Protein 1 (SurA1) from *Acinetobacter baumannii* and Its Role in Virulence and Fitness. *Vet. Microbiol.* **2016**, *186*, 126–138. [CrossRef]
19. Dorsey, C.W.; Tomaras, A.P.; Connerly, P.L.; Tolmasky, M.E.; Crosa, J.H.; Actis, L.A. The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related. *Microbiology* **2004**, *150* Pt 11, 3657–3667. [CrossRef]
20. Liu, C.; Chang, Y.; Xu, Y.; Luo, Y.; Wu, L.; Mei, Z.; Li, S.; Wang, R.; Jia, X. Distribution of Virulence-Associated Genes and Antimicrobial Susceptibility in Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates. *Oncotarget* **2018**, *9*, 21663–21673. [CrossRef]
21. Woodford, N.; Ellington, M.J.; Coelho, J.M.; Turton, J.F.; Ward, M.E.; Brown, S.; Amyes, S.G.B.; Livermore, D.M. Multiplex PCR for Genes Encoding Prevalent OXA Carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2006**, *27*, 351–353. [CrossRef]
22. Nguyen, M.; Joshi, S.G. Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*, and Their Importance in Hospital-Acquired Infections: A Scientific Review. *J. Appl. Microbiol.* **2021**, *131*, 2715–2738. [CrossRef]
23. Ma, C.; McClean, S. Mapping Global Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and Recent Vaccine Development to Tackle It. *Vaccines* **2021**, *9*, 570. [CrossRef]
24. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial Resistance in the EU/EEA (EARS-Net)—Annual Epidemiological Report for 2021. Available online: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2021> (accessed on 10 February 2023).
25. Vázquez-López, R.; Solano-Gálvez, S.G.; Juárez Vignon-Whaley, J.J.; Abello Vaamonde, J.A.; Padró Alonzo, L.A.; Rivera Reséndiz, A.; Muleiro Álvarez, M.; Vega López, E.N.; Franyuti-Kelly, G.; Álvarez-Hernández, D.A.; et al. *Acinetobacter baumannii* Resistance: A Real Challenge for Clinicians. *Antibiotics* **2020**, *9*, 205. [CrossRef] [PubMed]
26. Castilho, S.R.A.; Godoy, C.S.D.M.; Guilarte, A.O.; Cardoso, J.L.; André, M.C.P.; Junqueira-Kipnis, A.P.; Kipnis, A. *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Patients in Intensive Care Units in Goiânia, Brazil: Molecular and Drug Susceptibility Profiles. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0176790. [CrossRef]
27. Bahador, A.; Farshadzadeh, Z.; Raoofian, R.; Mokhtaran, M.; Pourakbari, B.; Pourhajibagher, M.; Hashemi, F.B. Association of virulence gene expression with colistin-resistance in *Acinetobacter baumannii*: Analysis of genotype, antimicrobial susceptibility, and biofilm formation. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2018**, *17*, 24. [CrossRef]
28. Jain, M.; Sharma, A.; Sen, M.K.; Rani, V.; Gaiind, R.; Suri, J.C. Phenotypic and Molecular Characterization of *Acinetobacter baumannii* Isolates Causing Lower Respiratory Infections among ICU Patients. *Microb. Pathog.* **2019**, *128*, 75–81. [CrossRef]
29. Yang, P.; Chen, Y.; Jiang, S.; Shen, P.; Lu, X.; Xiao, Y. Association between antibiotic consumption and the rate of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria from China based on 153 tertiary hospitals data in 2014. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2018**, *7*, 137. [CrossRef]
30. Ramírez, M.S.; Bonomo, R.A.; Tolmasky, M.E. Carbapenemases: Transforming *Acinetobacter baumannii* into a Yet More Dangerous Menace. *Biomolecules* **2020**, *10*, 720. [CrossRef]
31. Vahhabi, A.; Hasani, A.; Rezaee, M.A.; Baradaran, B.; Hasani, A.; Kafil, H.S.; Soltani, E. Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from Northwest Iran: High Prevalence of OXA Genes in Sync. *Iran. J. Microbiol.* **2021**, *13*, 282–293. [CrossRef]
32. Słoczyńska, A.; Wand, M.E.; Tyski, S.; Laudy, A.E. Analysis of BlaCHDL Genes and Insertion Sequences Related to Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains Isolated in Warsaw, Poland. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2486. [CrossRef]
33. Brossard, K.A.; Campagnari, A.A. The *Acinetobacter baumannii* Biofilm-Associated Protein Plays a Role in Adherence to Human Epithelial Cells. *Infect. Immun.* **2012**, *80*, 228–233. [CrossRef]

34. Monfared, A.M.; Rezaei, A.; Poursina, E.; Faghri, J. Detection of Genes Involved in Biofilm Formation in MDR and XDR *Acinetobacter baumannii* Isolated from Human Clinical Specimens in Isfahan, Iran. *Arch. Clin. Infect. Dis.* **2019**, *14*, e85766. [\[CrossRef\]](#)
35. Uppalapati, S.R.; Sett, A.; Pathania, R. The Outer Membrane Proteins OmpA, CarO, and OprD of *Acinetobacter baumannii* Confer a Two-Pronged Defense in Facilitating Its Success as a Potent Human Pathogen. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 589234. [\[CrossRef\]](#)
36. Hasan, T.; Choi, C.H.; Oh, M.H. Genes Involved in the Biosynthesis and Transport of Acinetobactin in *Acinetobacter baumannii*. *Genom. Inf.* **2015**, *13*, 2–6. [\[CrossRef\]](#)
37. Aghajani, Z.; Rasooli, I.; Mousavi Gargari, S.L. Exploitation of Two Siderophore Receptors, BauA and BfnH, for Protection against *Acinetobacter baumannii* Infection. *Apmis* **2019**, *127*, 753–763. [\[CrossRef\]](#)
38. Porbaran, M.; Tahmasebi, H.; Arabestani, M. A Comprehensive Study of the Relationship between the Production of β -Lactamase Enzymes and Iron/Siderophore Uptake Regulatory Genes in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Microbiol.* **2021**, *2021*, e5565537. [\[CrossRef\]](#)
39. Eijkelkamp, B.A.; Hassan, K.A.; Paulsen, I.T.; Brown, M.H. Investigation of the Human Pathogen *Acinetobacter baumannii* under Iron Limiting Conditions. *BMC Genom.* **2011**, *12*, 126. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Table S1. The origin of *Acinetobacter baumannii* (*n* = 100) clinical strains used in the study (units).

Clinic/Unit	Number (%) of strains
Anesthesiology and Intensive Care	63 (63.0)
Liver and General Surgery	11 (11.0)
Cardiology	6 (6.0)
Nephrology, Hypertension and Internal Medicine	5 (5.0)
Vascular Surgery and Angiology	3 (3.0)
Geriatrics	3 (3.0)
Endocrinology and Diabetology	2 (2.0)
Anaesthesiology and Intensive Care with Cardiac Anaesthesiology Division	2 (2.0)
Vascular Surgery	2 (2.0)
Rehabilitation	1 (1.0)
Cardiac Surgery	1 (1.0)
Chronic Wounds Care	1 (1.0)

Table S2. The occurrence of *bla*_{OXA} genes in *A. baumannii* with respect to strains' origin.

Clinical material	Number (%) of strains	<i>bla</i> _{OXA-40} (%)	<i>bla</i> _{OXA-23} (%)
Bronchoalveolar lavage	41 (41.0)	21 (51.2)	19 (46.3)
Wound swabs	25 (25.0)	18 (72.0)	6 (24.0)
Blood	10 (10.0)	7 (70.0)	3 (30.0)
Urine	6 (6.0)	4 (66.7)	1 (16.7)
Peritoneal swabs	3 (3.0)	3 (100.0)	0 (0.0)
Pus	3 (3.0)	2 (66.7)	1 (33.3)
Vascular catheter	2 (2.0)	1 (50.0)	1 (50.0)
Tissue	2 (2.0)	2 (100.0)	0 (0.0)
Respiratory tract secretion	2 (2.0)	1 (50.0)	1 (50.0)
Peritoneal fluid	1 (1.0)	1 (100.0)	0 (0.0)
Sputum	1 (1.0)	0 (0.0)	1 (100.0)
Cerebrospinal fluid	1 (1.0)	1 (100.0)	0 (0.0)
Pleural fluid	1 (1.0)	1 (100.0)	0 (0.0)
Tracheal swab	1 (1.0)	0 (0.0)	1 (100.0)
Granulation tissue	1 (1.0)	0 (0.0)	1 (100.0)

Table S3. The distribution of virulence factors genes among the reference *Acinetobacter baumannii* strains.

	<i>bap</i>	<i>surA1</i>	<i>basD</i>	<i>bauA</i>	<i>pld</i>	<i>omp33-36</i>
DSM 102930	+	+	+	-	+	+
DSM 30008	+	+	+	+	+	-

(+) – presence of a particular gene; (-) – absence of a particular gene; DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Germany

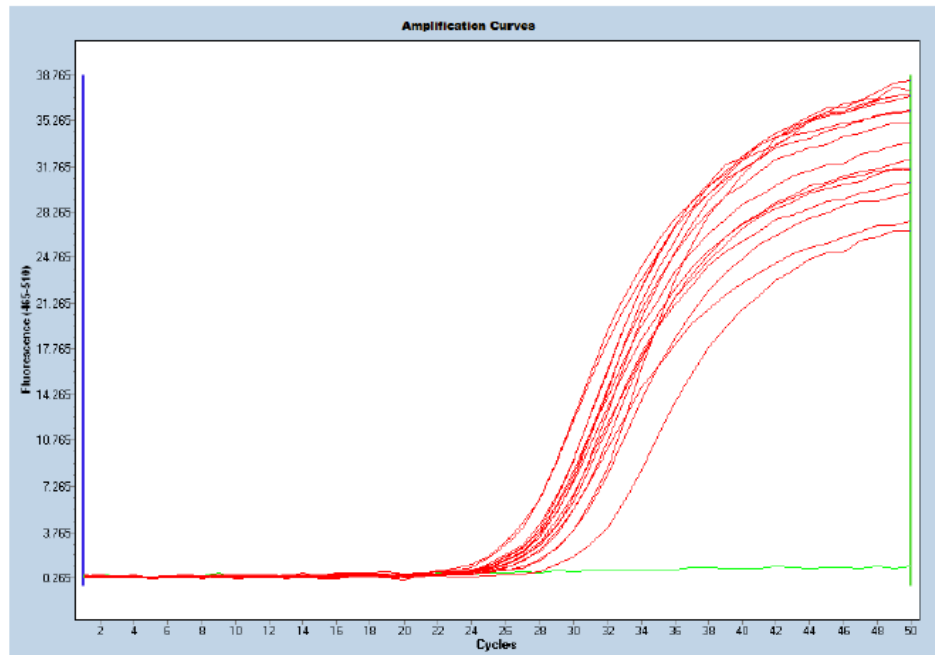


Figure S1. Picture of amplification curves showing results of real-time PCR for the *bap* gene detection – LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland); red lines – positive results, including positive control; green line – negative control.

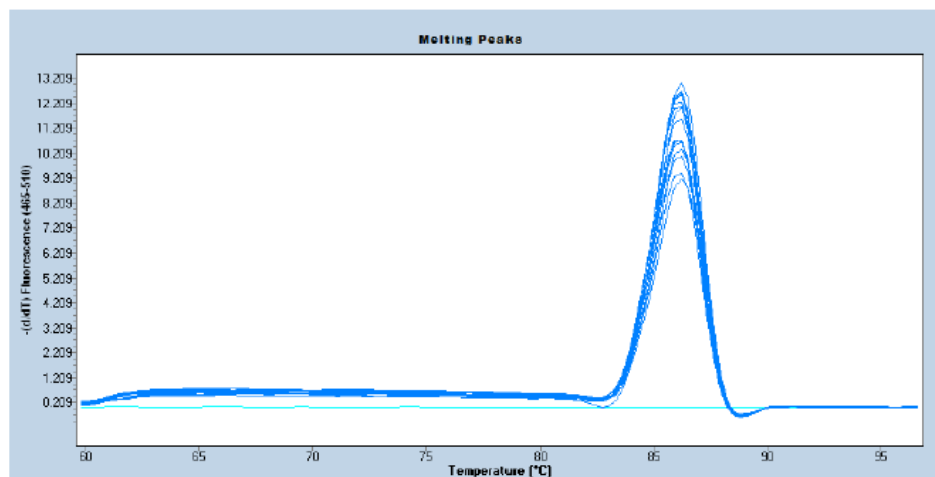


Figure S2. An example of picture showing melting peaks of the real-time PCR product specificity for the *bap* gene – LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland); dark blue lines – positive results, including positive control, showing specificity of the amplified product; light blue line – negative control.

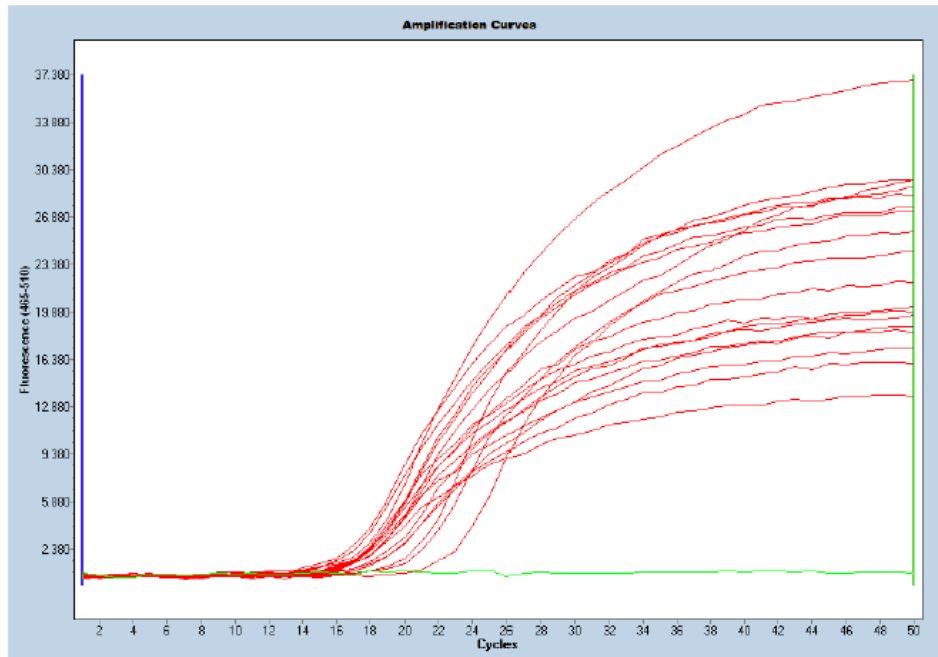


Figure S3. Picture of amplification curves showing results of real-time PCR for the *surA1* gene detection – LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland); red lines – positive results, including positive control; green line – negative control.

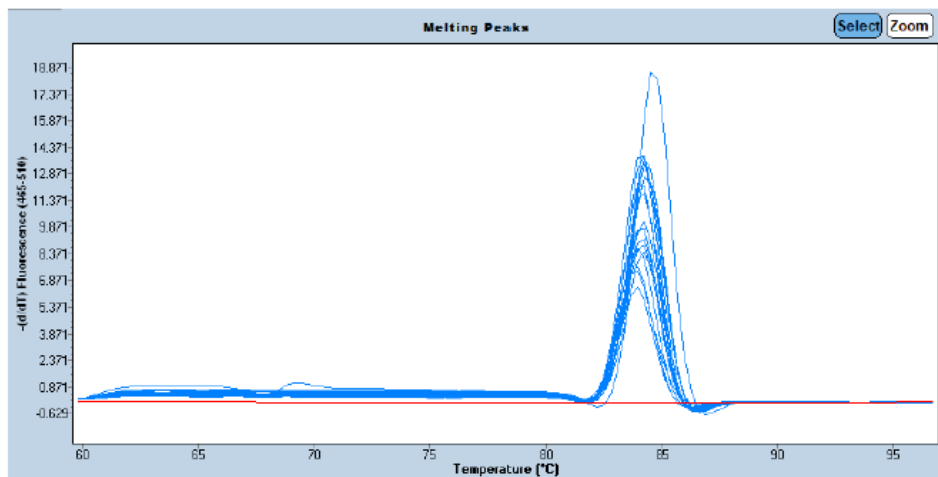


Figure S4. An example of picture showing melting peaks of the real-time PCR product specificity for the *surA1* gene – LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland); blue lines – positive results, including positive control, showing specificity of the amplified product; red line – negative control.

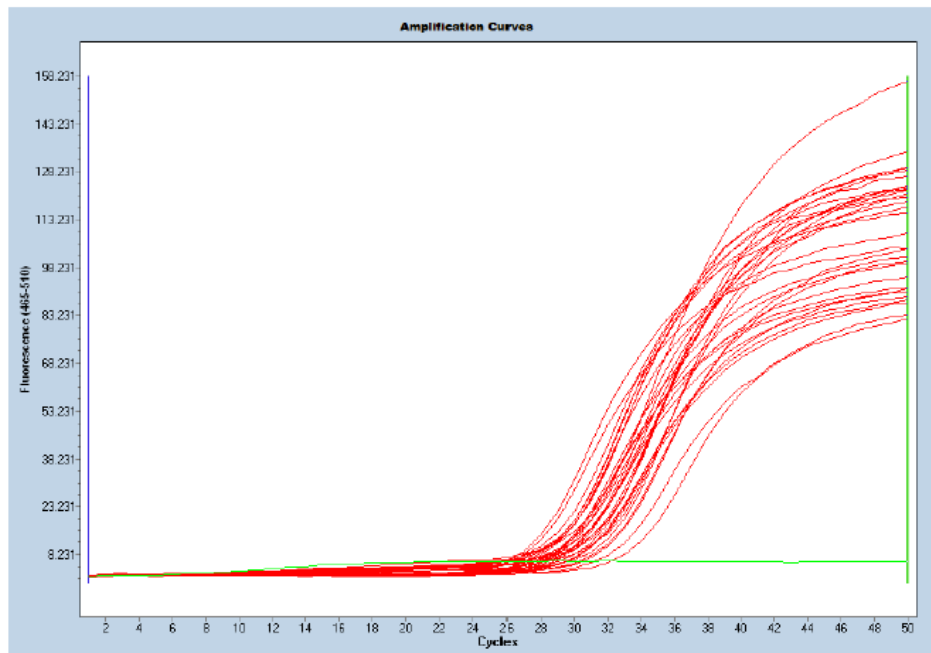


Figure S5. Picture of amplification curves showing results of real-time PCR for the *basD* gene detection – LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland); red lines – positive results, including positive control; green line – negative control.

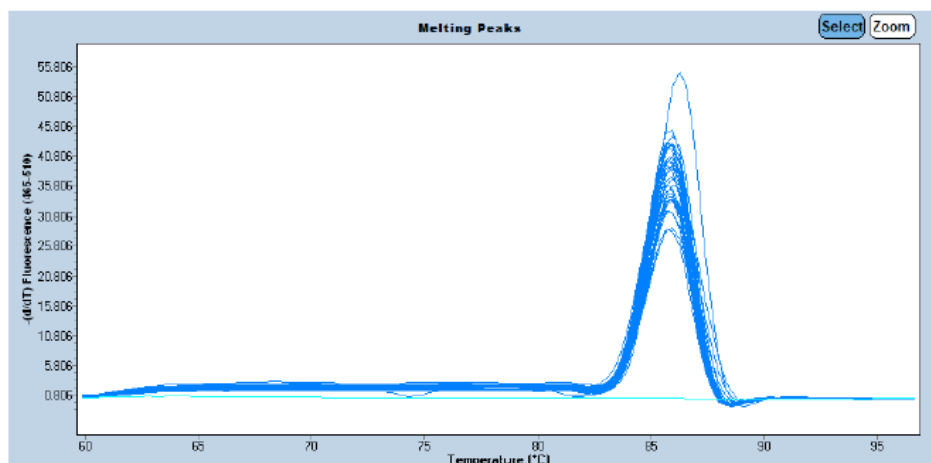


Figure S6. An example of picture showing melting peaks of the real-time PCR product specificity for the *basD* gene – LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland); dark blue lines – positive results, including positive control, showing specificity of the amplified product; light blue line – negative control.

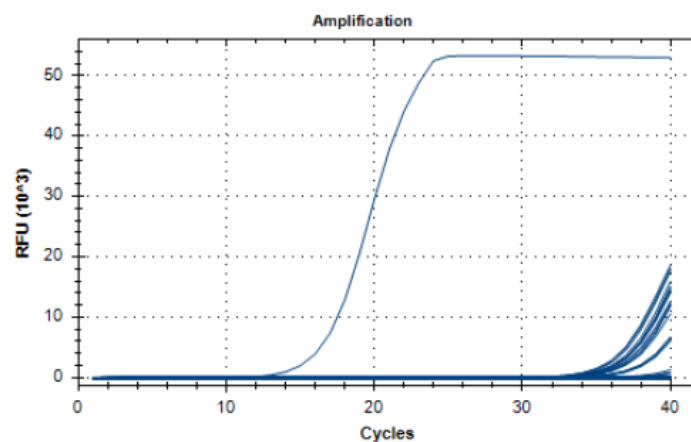


Figure S7. Picture of amplification curves showing results of real-time PCR for the *bauA* gene detection – CFX OPUS 96 (Bio-Rad, Hercules, United States); an amplification curve with Cycle threshold (Ct) around 16th cycle – positive control; the remaining curves – negative results.

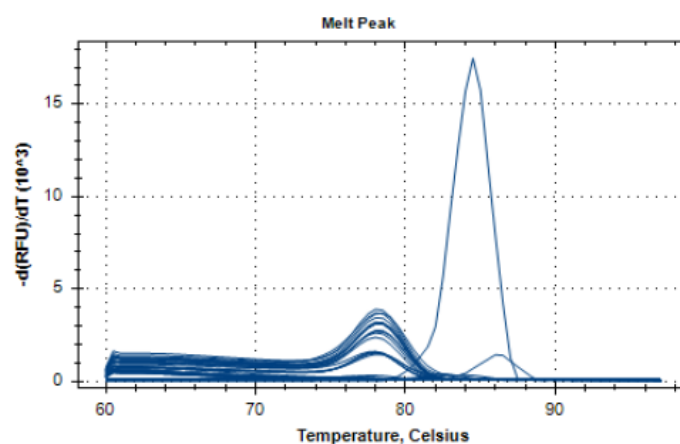


Figure S8. An example of picture showing melting peaks of the real-time PCR product specificity for the *bauA* gene – CFX OPUS 96 (Bio-Rad, Hercules, United States), the peak with melting point at 84.5°C – positive control showing specificity of the amplified product, the remaining lines – negative results.

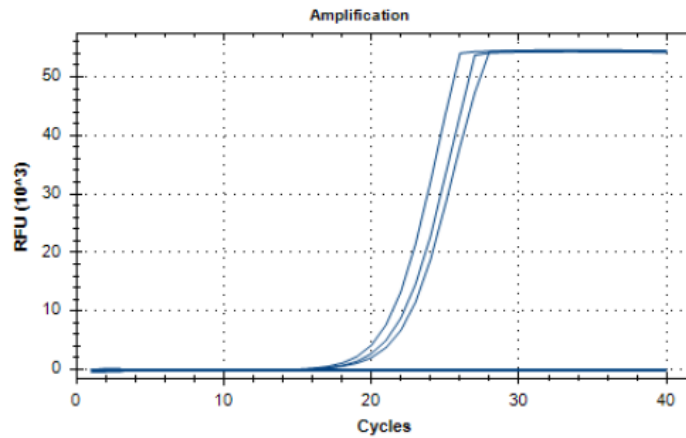


Figure S9. Picture of amplification curves showing results of real-time PCR for the *pld* gene detection – CFX OPUS 96 (Bio-Rad, Hercules, United States); amplification curves with Ct around 21st cycle – positive results, including positive control; the remaining curves – negative results.

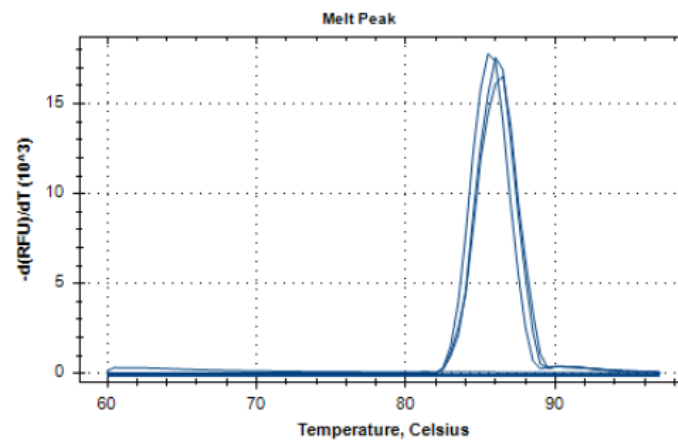


Figure S10. An example of picture showing melting peaks of the real-time PCR product specificity for the *pld* gene – CFX OPUS 96 (Bio-Rad, Hercules, United States); the peaks with melting point at 86°C – positive results showing specificity of the amplified product, the remaining lines – negative results.

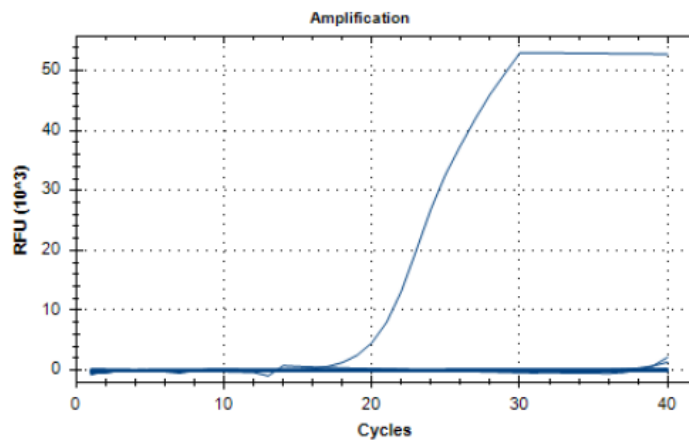


Figure S11. Picture of amplification curves showing results of real-time PCR for the *omp33-36* gene detection – CFX OPUS 96 (Bio-Rad, Hercules, United States); an amplification curve with Ct around 21st cycle – positive control; the remaining curves – negative results.

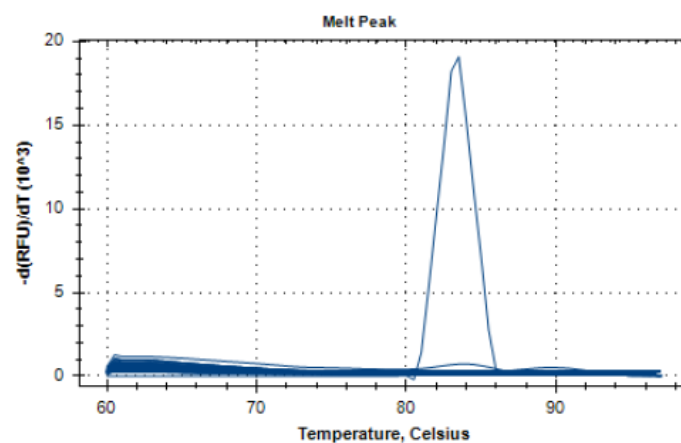


Figure S12. An example of picture showing melting peaks of the real-time PCR product specificity for the *omp33-36* gene – CFX OPUS 96 (Bio-Rad, Hercules, United States); the peak with melting point at 83.5°C – positive control showing specificity of the amplified product, the remaining lines – negative results.

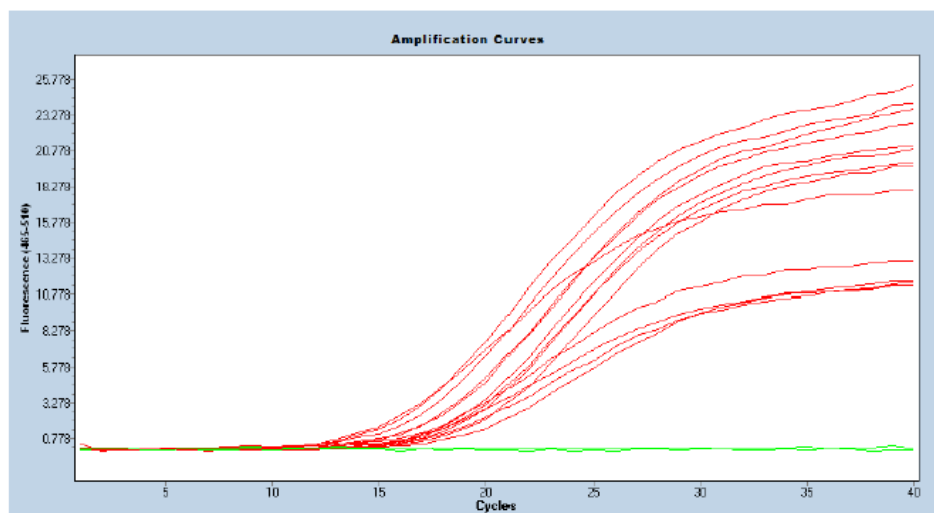


Figure S13. Picture of amplification curves showing results of real-time PCR for the *bla_{OXA-40}* gene detection – LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland); red lines – positive results, including positive control; green lines – negative results.

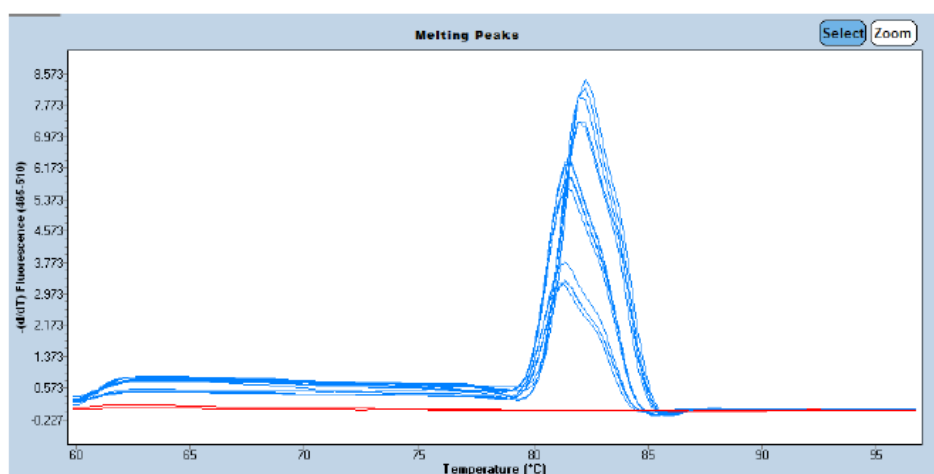


Figure S14. An example of melting peaks picture showing specificity of the real-time PCR product for the *bla_{OXA-40}* gene – LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland); blue lines – positive results, including positive control, showing specificity of the amplified product; red lines – negative results.

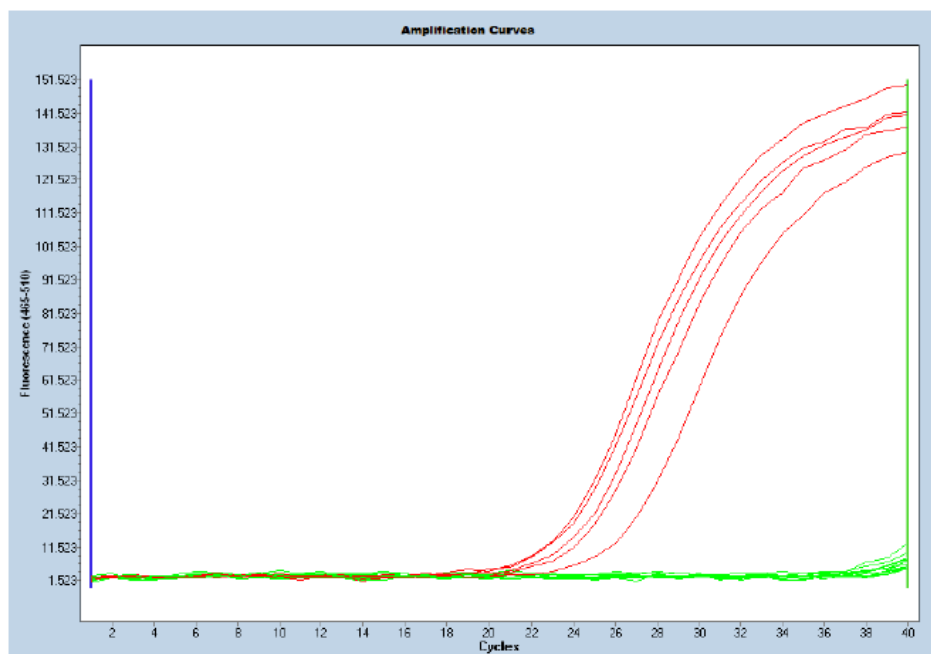


Figure S15. Picture of amplification curves showing results of real-time PCR for the *bla*_{OXA-23} gene detection – LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland); red lines – positive results, including positive control; green lines – negative results.

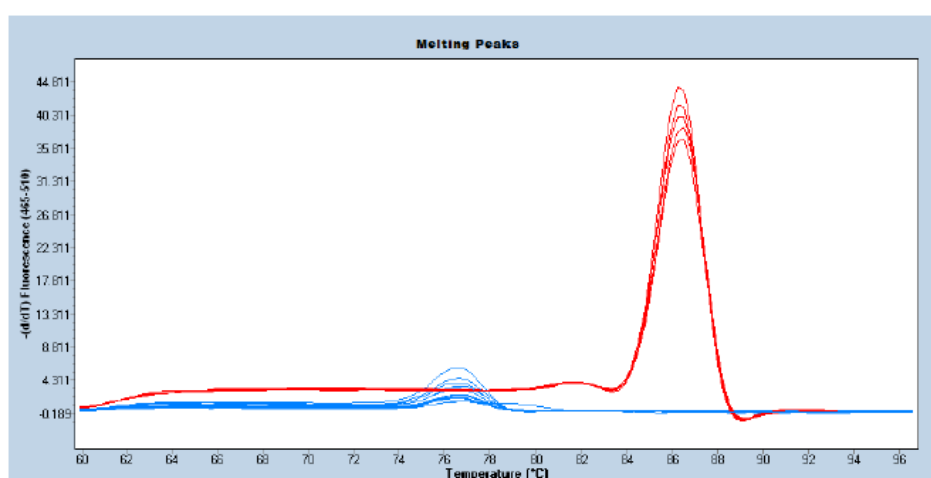


Figure S16. An example of picture showing melting peaks of the real-time PCR product specificity for the *bla*_{OXA-23} gene – LightCycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland); red lines – positive results, including positive control, showing specificity of the amplified product; blue lines – negative results.

12.2. Publikacja nr 2

Article

Insertion Sequences within Oxacillinases Genes as Molecular Determinants of *Acinetobacter baumannii* Resistance to Carbapenems—A Pilot Study

Dagmara Depka ^{1,2,*} , Tomasz Bogiel ^{1,2,*} , Mateusz Rzepka ^{1,2}  and Eugenia Gospodarek-Komkowska ^{1,2}

¹ Microbiology Department, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 85-094 Bydgoszcz, Poland; dagmaradepka@cm.umk.pl (D.D.); mateusz.rzepka@cm.umk.pl (M.R.); gospodareke@cm.umk.pl (E.G.-K.)

² Department of Clinical Microbiology, Antoni Jurasz University Hospital No. 1, 85-094 Bydgoszcz, Poland

* Correspondence: t.bogiel@cm.umk.pl; Tel: +48-52-585-44-80

Abstract: Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* is one of the major problems among hospitalized patients. The presence of multiple virulence factors results in bacteria persistence in the hospital environment. It facilitates bacterial transmission between patients, causing various types of infections, mostly ventilator-associated pneumonia and wound and bloodstream infections. *A. baumannii* has a variable number of resistance mechanisms, but the most commonly produced are carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases (CHDLs). In our study, the presence of *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40} and *bla*_{OXA-51} genes was investigated among 88 clinical isolates of *A. baumannii*, including 53 (60.2%) strains resistant to both carbapenems (meropenem and imipenem) and 35 (39.8%) strains susceptible to at least meropenem. Among these bacteria, all the isolates carried the *bla*_{OXA-51} gene. The *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-40} genes were detected in two (5.7%) and three (8.6%) strains, respectively. Among the OXA-23 carbapenemase-producing *A. baumannii* strains ($n = 55$), insertion sequences (*ISAb1*) were detected upstream of the *bla*_{OXA-23} gene in fifty-two (94.5%) carbapenem-resistant and two (3.6%) meropenem-susceptible isolates. *A. baumannii* clinical strains from Poland have a similar antimicrobial resistance profile as those worldwide, with the presence of *ISAb1* among *bla*_{OXA-23}-positive isolates also being quite common. Carbapenem resistance among *A. baumannii* strains is associated with the presence of CHDLs, especially when insertion sequences are present.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; carbapenem resistance; insertion sequences; molecular basis of antimicrobial resistance; oxacillinases



Citation: Depka, D.; Bogiel, T.; Rzepka, M.; Gospodarek-Komkowska, E. Insertion Sequences within Oxacillinases Genes as Molecular Determinants of *Acinetobacter baumannii* Resistance to Carbapenems—A Pilot Study. *Microorganisms* **2024**, *12*, 2057. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12102057>

Academic Editor: Branka Bedenic

Received: 4 September 2024

Revised: 2 October 2024

Accepted: 8 October 2024

Published: 12 October 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Acinetobacter baumannii belong to glucose-non-fermentative, non-motile, non-fastidious, aerobic Gram-negative coccobacilli. They are a part of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*A. baumannii* complex (Acb, consisting of *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, and *Acinetobacter* genomic species 3 and *Acinetobacter* genomic species 13TU (Tjømberg and Ursing)—two of the most clinically relevant genospecies in the Acb complex), associated with a number of infections in clinical practice [1]. Antimicrobial resistance among Gram-negative rods currently is a major global healthcare threat [2,3]. Carbapenem-resistant *A. baumannii* is one of the most frequently isolated pathogens from hospitalized patients, especially in intensive care units (ICUs) worldwide [4,5].

A. baumannii are isolated from various types of infections, mostly ventilator-associated pneumonia (VAP), wounds, skin and soft tissue, urinary tract infections, meningitis and bloodstream infections [6–8]. The presence of multiple virulence factors (e.g., biofilm formation) results in bacteria persistence in the hospital environment and facilitates transmission between patients [9,10]. Nosocomial infections caused by *A. baumannii* are also the most

prevalent among critically ill patients, as their risk factors include prolonged hospital stays, advanced age, invasive procedure application and mechanical ventilation introduction [11].

The choice of an effective treatment for infections with *A. baumannii* etiology is very difficult. *A. baumannii* rods are naturally resistant to ampicillin, amoxicillin (and its combination with clavulanic acid), cefazolin, cefotaxime, ceftriaxone, aztreonam, ertapenem, trimethoprim and fosfomycin [12]. Hence, *A. baumannii* has been included in the ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* spp.) group of pathogens that has been described to emphasize the ability of these pathogens to avoid antimicrobial effect [13]. Of note, carbapenems (imipenem, meropenem) are often used in empirical therapy when infection with Gram-negative coccobacilli is suspected. According to various reports, up to 90% of *A. baumannii* strains derived from patients with different kinds of infections are unfortunately resistant to carbapenems [4,14].

A. baumannii has three main antibiotic resistance mechanisms: (i) control of antimicrobial transportation through bacterial membranes, (ii) modification of antibiotic targets and (iii) enzymatic inactivation of the antimicrobials [3,15]. However, the structure of their cells and the plasticity of the genome additionally enable the acquisition of new resistance mechanisms, e.g., genes encoding enzymes that hydrolyze antibiotics—mostly β -lactamases.

All four classes of β -lactamases (according to Ambler's classification) have been identified among *A. baumannii* isolates, including a large number of carbapenem-hydrolyzing enzymes (carbapenemases). *A. baumannii* isolates produce various types of carbapenemases: KPC, GES, NDM, VIM, IMP and SIM [6,15]. However, the most common are carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase groups (CHDLs, oxacillinases—OXA). The major oxacillinases families found in *A. baumannii* isolates are as follows: OXA-51 (chromosomally encoded), OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143 and OXA-235.

The most widespread resistance mechanisms among *A. baumannii* worldwide are OXA-23-like carbapenemases [16,17]. The location of the genes encoding these enzymes in *A. baumannii* relates to mobile genetic elements (i.e., transposons and insertion sequences, IS) [18,19].

CHDLs are enzymes with relatively weak activity that hydrolyze carbapenems with low efficiency. An occurrence of IS, additional nucleotide sequences upstream of *bla*_{OXA}-like genes, promotes the expression of these genes [18]. The most prevalent IS among *A. baumannii* genomes are: IS_{Aba1}, IS_{Aba2}, IS_{Aba3} or IS₁₈, and they occur along with transposases genes and could be transferred between *A. baumannii* strain genomes [20]. IS_{Aba1} is the most common IS among *A. baumannii* isolates and occurs in association with *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51} and *bla*_{OXA-58} genes. The genome of these bacteria also contains genetic structures covering important resistance genes—transposons (Tn). Three transposons have been described as related with *bla*_{OXA-23}—Tn2006, Tn2007 and Tn2008. The structure of transposons is based on the presence of a resistance gene flanked by insertion sequences, e.g., in Tn2006, the *bla*_{OXA-23} gene is flanked by two copies of the insertion sequence IS_{Aba1}, which are located in opposite directions [21].

The aim of this study was to determine the occurrence of *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40} and *bla*_{OXA-51} genes among *A. baumannii* strains susceptible to one of the carbapenems (meropenem) and to examine the occurrence of IS_{Aba1} upstream of the *bla*_{OXA-23} gene among *bla*_{OXA-23}-positive *A. baumannii* clinical isolates with their present impact on the carbapenem-resistance phenotype.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Isolates Origin and Their Selection Criteria

In total, 35 *A. baumannii* clinical isolates, susceptible to meropenem, and 53 carbapenem-resistant (both imipenem and meropenem) *bla*_{OXA-23}-positive *A. baumannii* were included in this study.

The species identification of the tested strains was determined using a MALDI-TOFMS instrument (Bruker, Mannheim, Germany) and MALDI Biotyper software (version 4.2.28), according to the manufacturer's instructions. In order to ensure intra-laboratory quality control of identification during investigation, the bacterial test standard (BTS, Bruker, Mannheim, Germany) was used. For all the studied strains, an identification coefficient of ≥ 2.0 was obtained, which indicates a reliable assignment to the species.

Initially, all the tested strains were also checked for the presence of clinically important carbapenemase genes (types NDM, VIM, KPC, IMP, OXA-181 and OXA-48) using a commercially available kit (eazyplex® SuperBug complete, AmplexDiagnostics GmbH, Gars-Bahnhof, Germany), and their results were negative for each isolate. Strain selection was set to include only isolates with a carbapenem resistance mechanism resulting at most from the presence of OXA-like enzymes. Therefore, the criteria for including isolates in this study were at most the presence of oxacillinases as the only one possible among the already known broad-spectrum beta-lactamases.

The isolates were stored in Brain Heart Infusion (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) with an addition of 15% glycerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at -80°C . Before testing, they were grown on MacConkey Agar (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) at 37°C for 24 h and re-passaged.

The *A. baumannii* DSMZ 102930 strain, purchased from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Germany, served as the carbapenemase-positive control isolate, while the *A. baumannii* DSMZ 30008 isolate served as the carbapenemase-negative control strain. *Escherichia coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection); *P. aeruginosa* ATCC 27853 and both *A. baumannii* DSMZ isolates were also applied for the quality control of the applied methods.

2.2. Antimicrobial Susceptibility Testing

Antimicrobial susceptibility testing (AST) of the studied isolates was performed in duplicate using a BD Phoenix™ M50 instrument (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) using BD Phoenix™ NMIC-402 panels (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA). The first AST was carried out as part of a routine laboratory diagnostic scheme and the second for research purposes, obtaining the same results each time.

Briefly, a dedicated AST indicator and 25 μL of 0.5 McFarland bacterial suspension were added into Mueller–Hinton broth (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA). These suspensions were subsequently added to panels that were placed in a BD Phoenix™ M50 instrument, and the results were obtained automatically after less than 18 h. They were interpreted according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing recommendation v. 13.0 (EUCAST) [22]. Quality control of AST was ensured by using the reference strains *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *E. coli* ATCC 25922, also according to EUCAST recommendations.

The classification of the resistance phenotypes of the strains was as follows: multidrug-resistant (MDR)—strains resistant to at least three of the tested antimicrobial agents belonging to separate antibiotic groups; extensively drug-resistant (XDR)—strains resistant to all the tested antimicrobial agents except for two antimicrobial groups; pan-drug-resistant (PDR)—strains resistant to all the tested antimicrobials.

2.3. DNA Extraction

The tested and control *A. baumannii* strains were initially plated on MacConkey Agar (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) for 24 h at 37°C and harvested afterwards for DNA isolation. DNA samples from the investigated strains were isolated using the kit for genomic DNA purification from various sources—Genomic Mini kit (A&A Biotechnology, Gdansk, Poland) according to the manufacturer's protocol. DNA was stored at -20°C before the testing.

2.4. PCR Analysis

2.4.1. bla_{OXA} Gene Detection and High-Resolution Melting Analysis

Real-time PCR parameters and primers characterized in Table 1 were used to detect bla_{OXA} genes. The reactions were performed in a LightCycler 480 II thermal cycler (Roche, Basel, Switzerland). The final volume of each reaction was 20 µL, each consisting of 5 µL of molecular biology grade water (EurX, Gdansk, Poland), 5 µL (0.25 µM/reaction) of each primer as previously described [19,23] (Genomed, Warsaw, Poland), 4 µL of 5× HOT FIREPOL® EvaGreen® Mix (SolisBioscience, Tartu, Estonia) and 1 µL of DNA of the strains included in this study. The following real-time PCR conditions were established: one cycle at 95 °C for 12 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s, annealing temperature at 58 °C for 20 s, and the final elongation with data collection at 72 °C for 20 s. Finally, the melting curve of the DNA amplification products was determined (95 °C for 5 s and 60 °C for 1 min, data acquisition at 0.11 °C increments between 60 °C and 97 °C) to confirm the specificity of the detected genes.

Table 1. Sequences of primers applied for bla_{OXA} and ISAbal-bla_{OXA-23} gene detection and PCR parameters used in the study.

Gene Detected	Primer Sequences 5'→3'	T _m (°C)	Annealing Temperature (°C)	Product Length (bp)	References
bla _{OXA-40}	F: GGTAGTTGCCCTTAA	51.8	58	246	[23]
	R: AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	49.7			
bla _{OXA-23}	F: GATCGGATTGGAGAACCAGA	50.3	58	501	[23]
	R: ATTCTGACCGCATTTCCAT	47.7			
bla _{OXA-51}	F: TAATGCTTTGATCGGCCTTG	49.7	58	353	[23]
	R: TGGATTGCACTTCATCTTGG	49.7			
ISAbal-bla _{OXA-23}	F: AATCACAAGCATGATGAGCG	49.7	54	962	[19]
	R: CATTCTGACCGCATTTCCAT	50.5			

The data collection was enabled continuously at each increment during the temperature change (high-resolution melting variant). All the described real-time PCR procedures were initially performed as a standard PCR to confirm the specificity of the results and the product size confirmation using their standard electrophoretic separation in agarose gels (an applied procedure as described below).

2.4.2. ISAbal-bla_{OXA-23} Gene Detection

A PCR assay for the detection of ISAbal-bla_{OXA-23} was performed using the primers shown above (Table 1). The final volume of the PCR was 25 µL. The following reagents (all Promega, Walldorf, Germany) were used: MgCl₂—2.5 mM; dNTPs—1 mM; polymerase GoTaq—1 U/reaction; primers—200 pM; 1.5× concentrated polymerase buffer and 2 µL of a DNA template. An amplification of the target gene was performed using a Mastercycler® Pro (Eppendorf, Hamburg, Germany). The reaction was performed according to the following conditions: one cycle at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 25 s, 54 °C for 40 s and 72 °C for 50 s with a final elongation at 72 °C for 6 min. The PCR reaction products were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gel (Bio-Rad, Feldkirchen, Germany) in a 1× concentrated Tris-Boric Acid-EDTA (TBE, Bio-Rad, Feldkirchen, Germany) running buffer at 9 V/cm for 1 h in a MINI SUB™ DNA CELL (Bio-Rad, Feldkirchen, Germany) device.

2.5. Data Analysis

Statistical analysis was performed using the Statistica™ 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) program. Pearson's chi-squared test and Fisher's exact test were car-

ried out to assess whether the differences in the strains' origins and whether the changes in antibiotic resistance profiles were statistically significant. p -value of ≤ 0.05 was considered as statistically significant.

χ contingency coefficient values were used to investigate the strength of correlation for particular features' coexistence and the strains' origins ($p \leq 0.05$). An interpretation of χ contingency coefficient correlation test was as follows: for χ : 0—no relationship; ± 0.01 – ± 0.19 —none or insignificant relationship; ± 0.2 – ± 0.29 —a weak relationship; ± 0.3 – ± 0.39 —a moderate relationship; ± 0.4 – ± 0.69 —a strong relationship; ± 0.7 or higher—a very strong relationship.

3. Results

3.1. Bacterial Strains Origin

All of the tested strains were isolated between 2017 and 2023 from various patients (one strain per patient only) hospitalized at the University Hospital No. 1 in Bydgoszcz, Poland. The isolates were derived mainly from Anesthesiology and the Intensive Care Unit (ICU), and of them, 22.9% ($n = 8$) and 79.2% ($n = 42$) were susceptible and resistant to carbapenems, respectively. Tables 2 and 3 show the detailed origin of *A. baumannii* clinical isolates used in this study.

Table 2. The detailed origin of meropenem-susceptible *A. baumannii* clinical strains used in this study (clinics/departments) ($n = 35$).

Clinic/Department	Strain Number (%)
Department of Anesthesiology and Intensive Care	8 (22.8%)
Clinical Unit of Anesthesiology and Intensive Care with Cardiac Anesthesiology Division	7 (20.0%)
Department of Cardiology	3 (8.6%)
Department of Neurology	3 (8.6%)
Department of General, Oncologic and Pediatric Urology	2 (5.7%)
Department of Liver and General Surgery	2 (5.7%)
Department of Nephrology, Hypertension and Internal Medicine	2 (5.7%)
Department of Otolaryngology and Laryngological Oncology with Audiology and Phoniatrics Unit	2 (5.7%)
Department of Dermatology, Sexually Transmitted Diseases and Immunodermatology	1 (2.9%)
Department of Emergency Medicine	1 (2.9%)
Department of Endocrinology and Diabetology	1 (2.9%)
Department of Orthopedics and Traumatology	1 (2.9%)
Department of Transplantation and General Surgery	1 (2.9%)
Chronic Wound Care	1 (2.9%)

Table 3. The origin of all *bla*_{OXA-23}-positive *A. baumannii* clinical strains used in this study (clinics/departments) ($n = 53$).

Clinic/Department	Strain Number (%)
Department of Anesthesiology and Intensive Care	42 (79.2%)
Department of Endocrinology and Diabetology	3 (5.7%)
Department of Cardiology	2 (3.8%)
Department of Geriatrics	2 (3.8%)
Department of Liver and General Surgery	2 (3.8%)
Department of Cardiac Surgery	1 (1.9%)
Department of Rehabilitation	1 (1.9%)

Figures 1 and 2 show the detailed origin of *A. baumannii* strains used in this study with respect to clinical specimen type. Apart from four strains derived from a tracheostomy swab, an ear swab and organ preservation fluid, regardless of group belonging and strain characteristics, all the remaining bacterial strains were isolated from various types of infections, mainly from the cases of respiratory tract infections, wound swabs and blood samples.

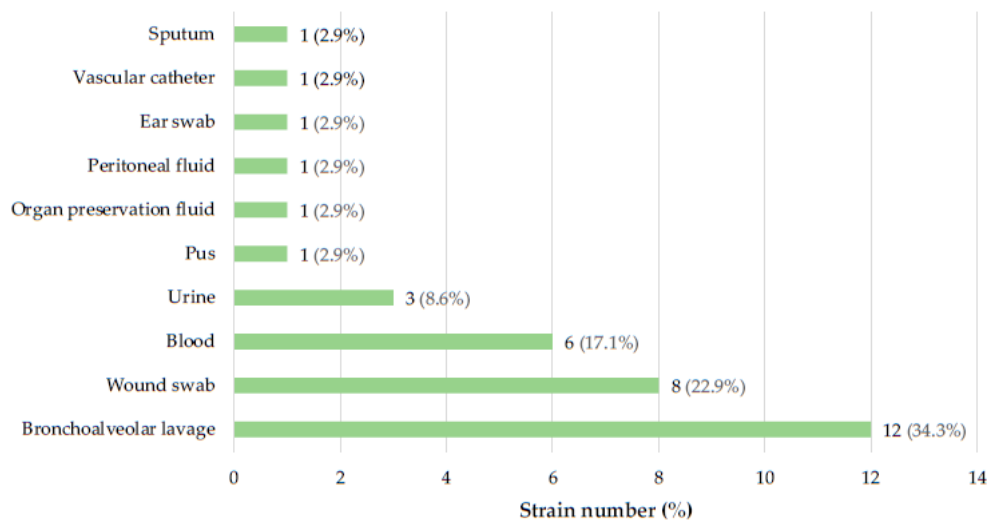


Figure 1. The origin of meropenem-susceptible *A. baumannii* strains used in this study, with respect to clinical specimen type ($n = 35$).

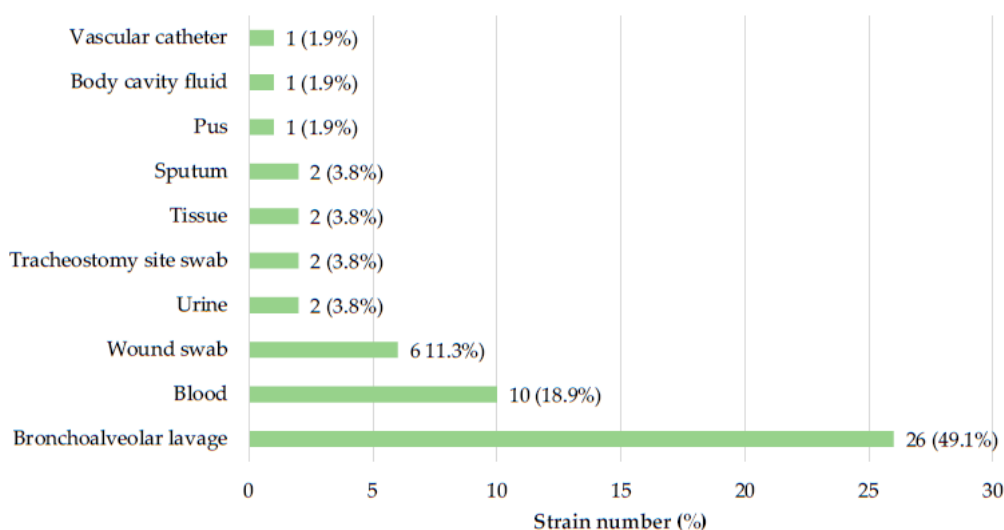


Figure 2. The detailed origin of *bla*_{OXA-23}-positive *A. baumannii* strains used in this study, with respect to clinical specimen type ($n = 53$).

3.2. Bacterial Strains Antimicrobial Susceptibility

Table 4 shows the antimicrobial susceptibility testing results among 35 meropenem-susceptible *A. baumannii* isolates. All of the strains, resistant simultaneously to quinolones and trimethoprim/sulfamethoxazole ($n = 12$, 34.3%), were also classified as multidrug-resistant (MDR) isolates. The majority of these strains were susceptible to colistin ($n = 33$, 94.3%). Nearly half ($n = 16$, 45.7%) of the isolates were susceptible with increased exposure to ciprofloxacin.

Table 4. Antimicrobial susceptibility of *A. baumannii* meropenem-susceptible isolates ($n = 35$).

Antimicrobial	Number (%) of Strains		
	Susceptible	Susceptible, Increased Exposure	Resistant
IMP	30 (85.7)	2 (5.7)	3 (8.6)
MEM	35 (100)	0	0
TOB	25 (71.4)	0	10 (28.6)
AMK	28 (80.0)	1 (2.9)	6 (17.1)
CIP	7 (20.0)	16 (45.7)	12 (34.3)
LEV	23 (65.7)	0	12 (34.3)
SXT	22 (62.9)	0	13 (37.1)
COL	33 (94.3)	0	2 (5.7)

IMP—Imipenem, MEM—Meropenem, TOB—Tobramycin, AMK—Amikacin, CIP—Ciprofloxacin, LEV—Levofloxacin, SXT—Trimethoprim/sulfamethoxazole, COL—Colistin.

Antimicrobial susceptibility testing for carbapenem-resistant *bla*_{OXA-23}-positive *A. baumannii* isolates also revealed the majority of isolates susceptible to colistin ($n = 43$, 86.8%). All of the tested isolates were resistant to carbapenems and quinolones (Table 5). All of the studied isolates were classified as extensively drug-resistant (XDR), and among these, nine (25.7%) isolates were pan-drug-resistant (PDR). Some of the strains were susceptible to amikacin and tobramycin exclusively—one (1.9%) and five strains (9.4%), respectively (Table 5).

Table 5. Antimicrobial susceptibility of carbapenem-resistant *bla*_{OXA-23}-positive *A. baumannii* ($n = 53$).

Antimicrobial	Number (%) of Strains		
	Susceptible	Susceptible, Increased Exposure	Resistant
IMP	0	0	53 (100)
MEM	0	0	53 (100)
TOB	5 (9.4)	0	48 (90.6)
AMK	1 (1.9)	0	52 (98.1)
CIP	0	0	53 (100)
LEV	0	0	53 (100)
SXT	0	2 (3.7)	51 (96.2)
COL	42 (79.2)	0	11 (20.8)

IMP—Imipenem, MEM—Meropenem, TOB—Tobramycin, AMK—Amikacin, CIP—Ciprofloxacin, LEV—Levofloxacin, SXT—Trimethoprim/sulfamethoxazole, COL—Colistin.

A very strong relationship ($\chi^2 = 0.768$, $p < 0.05$) was found between the occurrence of MDR *A. baumannii* isolates and the presence of the *bla*_{OXA-23} gene. Meanwhile, there was no statistical relationship between colistin resistance and the presence of the *bla*_{OXA-23} gene ($p > 0.05$).

3.3. Presence of *bla*_{OXA} Genes among Meropenem-Susceptible *A. baumannii* Isolates

In total, 35 *A. baumannii* strains were tested for the presence of *bla*_{OXA} genes. Among these bacteria, 100% of the isolates carried the *bla*_{OXA-51} gene. The *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-40} genes were detected only in two (5.7%) and three (8.6%) isolates, respectively. *ISAbal* fragments were detected upstream of *bla*_{OXA-23} in both isolates. Table 6 shows the drug susceptibility of *A. baumannii* isolates with confirmed *bla*_{OXA} gene presence. Two of the isolates were susceptible to imipenem. In addition, four of the studied strains were MDR.

Table 6. Antimicrobial susceptibility among meropenem-susceptible *A. baumannii* isolates carrying *bla*_{OXA} genes (n = 5).

Specimen Origin	Unit	Gene Detected	<i>ISAbal</i>	IMP	MEM	TOB	AMK	CIP	LEV	SXT	COL
Bronchoalveolar lavage	ICU	<i>bla</i> _{OXA-23}	+	R	S	R	S	R	R	R	S
Wound swab	ICU	<i>bla</i> _{OXA-23}	+	S	S	R	S	R	R	R	S
Pus	ICU	<i>bla</i> _{OXA-40}	n/a	R	S	S	S	R	R	R	R
Urine	ICU	<i>bla</i> _{OXA-40}	n/a	S	S	S	S	I	S	S	S
Vascular catheter	NEU	<i>bla</i> _{OXA-40}	n/a	R	S	R	S	R	R	R	S

S—susceptible, I—susceptible with increased exposure, R—resistant, ICU—Anesthesiology and Intensive Care Unit, NEU—Department of Neurology, IMP—Imipenem, MEM—Meropenem, TOB—Tobramycin, AMK—Amikacin, CIP—Ciprofloxacin, LEV—Levofloxacin, SXT—Trimethoprim/sulfamethoxazole, COL—Colistin, +—positive result, n/a—not applicable.

3.4. Presence of *ISAbal-bla*_{OXA-23} among Carbapenem-Resistant *A. baumannii* Isolates (n = 53)

ISAbal were altogether detected upstream of *bla*_{OXA-23} genes in 52 (98.1%) isolates. In the remaining *A. baumannii* strains, a PCR product with a different product length was detected. The only negative isolate for *ISAbal-bla*_{OXA-23} with a product length of more than 962 bp was classified as XDR and was also susceptible to colistin. This mentioned *A. baumannii* isolate was isolated from bronchoalveolar lavage collected from an ICU patient.

A moderate relationship ($\chi = 0.526$, $p < 0.05$) was found between multidrug resistance and strains' origins—the ones derived from ICU patients.

4. Discussion

Infections caused by multidrug-resistant bacteria are an alarming problem worldwide [24,25], although the last few decades have been associated with a great development in medicine. In developed countries, access to healthcare systems is evident, but this is associated with an excessive drug uptake, use of biomaterials and invasive procedures that often cause nosocomial infections [26,27].

At the beginning of antibiotic therapy implementation, it was unpredictable that 70 years later, bacteria resistant to all treatment options would emerge [28]. In 2017, the World Health Organization published a list of priority pathogens for research and the development of new antibiotics, in which it was emphasized that carbapenem-resistant *A. baumannii* strains are a critical pathogen [29]. However, the understanding of the molecular basis of bacterial antimicrobial drug resistance is of fundamental importance in terms of their elimination purpose. Therefore, we aimed to decipher the carbapenem-resistant determinants resulting from insertion sequence presence among MDR *A. baumannii* clinical strains.

A. baumannii forms biofilms on both biotic and abiotic surfaces, facilitating survival on medical devices, hospital surfaces, etc. [6]. This is one of the reasons why these bacteria cause a number of VAP infections. In our study, most of the *A. baumannii* isolates (n = 38, 43.2%) were derived from specimens collected from the respiratory tract—bronchoalveolar lavage. Other researchers have also demonstrated the significant importance of *A. baumannii* strains on the development of respiratory tract infection, emphasizing VAP. Bandić-Pavlović et al. (2020) showed that 23.7% (n = 23) of *A. baumannii* isolates are associated with VAP infections, and 87.0% (n = 20) among them belong to XDR strains [30].

Antimicrobial susceptibility testing among meropenem-susceptible isolates included in this present study shows that most of the antibiotics tested still had *in vitro* activity against *A. baumannii*, but even among those isolates, 12 (34.3%) were MDR and 16 (45.7%) were susceptible with increased exposure to ciprofloxacin. It shows that among these isolates, a choice of the appropriate therapy is also difficult. The hospital environment favors the persistence of MDR, often carbapenem-resistant strains [4,14,31].

Meanwhile, a global threat is the spread of carbapenem-resistant isolates among patients in hospitals. In this study, all the carbapenem-resistant isolates were classified as XDR, including recognition of nine (25.7%) of them as PDR isolates. The occurrence of carbapenem resistance is often associated with resistance to other antibiotic groups. All ($n = 53$, 100%) of the carbapenem-resistant *bla*_{OXA-23}-positive *A. baumannii* strains included in this study were additionally resistant to quinolones. Moreover, other researchers have also shown that ciprofloxacin and levofloxacin combination is not a good choice for a treatment due to widespread resistance to fluoroquinolones among *A. baumannii* representatives [32].

The last-resort therapy with colistin is often the only treatment option for *A. baumannii* infections, yet, in our study, 11 (20.8%) strains were resistant to this antimicrobial also. Other studies have also shown worrying results regarding the emergence of colistin-resistant *A. baumannii* strains [33]. Almutairi et al. (2022) showed, as an actual necessity, the *in vitro* synergistic effect of using colistin with other antimicrobials, e.g., with vancomycin, rifamycin or beta-lactam, which is a quite surprising, however interesting and promising observation [34].

The focus of our study was carbapenemases, which are the most prevalent among *A. baumannii* bacteria worldwide: *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40} and *bla*_{OXA-51}. OXA-like enzymes are considered relatively weak enzymatic carbapenem hydrolyzers. Therefore, in our study, meropenem-susceptible isolates of *A. baumannii* were also tested for the presence of *bla*_{OXA}-like genes. In all of the tested strains, *bla*_{OXA-51} genes were present. This gene is an intrinsic representative of oxacillinases, localized in the chromosomal genome as has been previously described [35]. This gene has also been successfully used as a genetic marker for *A. baumannii* identification in a previous study [36]. *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-40} genes were not detected among a number of isolates ($n = 30$, 85.7%) in this study, with only two (5.7%) and three (8.6%) *A. baumannii* strains being positive for *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-40} genes, respectively. Three of these isolates were imipenem-resistant but two of them were surprisingly susceptible to both carbapenems. In both *bla*_{OXA-23}-positive isolates, *ISAbal* was detected. Noteworthy, one *ISAbal*-*bla*_{OXA-23}-positive isolate was also susceptible to imipenem. These results indicate the necessity of investigating the presence of various resistance mechanisms among *A. baumannii* or different expression levels among *ISAbal*-*bla*_{OXA-23} genes for the phenotypic emergence of carbapenem resistance.

Analyzing isolates sensitive to meropenem, the authors identified isolates that presented the *bla*_{OXA-40} gene and the *ISAbal*-*bla*_{OXA-23} set of genotypes associated with resistance to meropenem. This interesting fact could be elucidated by the investigation of possible differences in the mentioned gene sequences or expression levels for these genes between sensitive and resistant isolates. Hence, the suggested approach could explain the fact that even though these bacteria had genes associated with resistance, they were sensitive to the mentioned carbapenem. Therefore, in the next research step, the authors are planning to perform the DNA sequencing of the mentioned genes for the selected strains and to determine their relative expression levels. Through real-time PCR assays of the resistance genes found in isolates sensitive to meropenem, a comparison of them with those found in resistant strains should be possible. This could shed more light on the problem, providing more robust and obvious observations and conclusions.

The authors of this research paid attention the most to the strain selection and made an effort to choose non-repeatable strains for this analysis, e.g., only one strain per patient, different antimicrobial susceptibility profiles (if possible), different patient locations at the time of specimen collection and relatively long time periods between the strains' isolations. However, we cannot be sure that the isolates are unique in molecular meaning and it

would be beneficial to perform clonality testing, using multilocus sequence typing and comparative whole-genome sequencing in the ongoing research. In addition, it is planned to detect the molecular basis of resistance to antibiotics other than carbapenems.

Other researchers have shown that additional genetic elements, such as ISs, are needed to enhance the ability to hydrolyze carbapenems due to ISs acting as promoters of *bla*_{OXA}-like gene expression. Several types of IS have been described so far, with IS*Aba1*, IS*Aba2*, IS*Aba3*, IS*Aba4*, IS*Aba9*, IS*Aba10*, IS18 and IS*Aba825* among them, and IS*Aba1* as one of the most common in *A. baumannii* [21]. The presence of IS*Aba1* among *bla*_{OXA-23}-positive isolates is also rather common. This has been also confirmed in our study, showing 98.1% (*n* = 52) of isolates carried IS*Aba1* upstream of the *bla*_{OXA-23} gene. These results are in consistence with some other research studies. Słoczyńska et al. (2021) showed the presence of IS*Aba1*-*bla*_{OXA-23} among 100% (*n* = 39) of the studied strains [19], while in 2015, Bahador et al. (2015) showed the occurrence of IS*Aba1* upstream of the *bla*_{OXA-23} gene in 67% (*n* = 34) of isolates only [37]. In this present study, for one isolate, an IS*Aba1* upstream *bla*_{OXA-23} gene was found but with a different product length. More research, e.g., DNA sequencing is needed to clarify the sequence of this particular product, but it is possible that there are more IS*Aba1* repeats in the genome of this particular isolate or that some genetic insertion within gene sequence appeared. Another limitation of this study was that the whole genome sequencing of the strains studied was not conducted to better characterize the isolates.

A. baumannii is one of the major nosocomial pathogens, causing severe infections in critically ill patients, hospitalized mostly within ICUs. Carbapenem-resistant *A. baumannii*-involved infections showed a significant association with length of ICU stay, increased treatment costs and antibiotic use [38]. Other studies have shown that *Acinetobacter* spp. infections represent 7.9% of VAP in the ICUs [39]. In this study, we showed that the isolation of *A. baumannii* from ICU had a moderate relationship with multidrug resistance among the strains of this species. Moreover, the resistance to carbapenems has been shown to also be associated with resistance to other treatment options. This was also described by Konca et al. (2021) in their study, showing *A. baumannii* clinical isolates resistant to all the treatment options, except for colistin and trimethoprim/sulfamethoxazole [40].

The characterization of isolates and epidemiological studies are also very important to track the transmission of *A. baumannii* between patients, especially in intensive care units. In this aspect, education, control and compliance with hygiene rules by staff are extremely important. Therefore, the comprehensive understanding of the molecular basis of carbapenem resistance is of great importance.

5. Conclusions

Carbapenem resistance among *A. baumannii* strains is a complex problem but is most often associated with the presence of CHDL, especially in the presence of IS. The clinical implications of these findings include the fact that the isolation of *bla*_{OXA}-positive *A. baumannii* strains does not exclude completely the possibility of using carbapenems (or at least meropenem) in the treatment of infections caused by some such strains. Furthermore, in some cases, carbapenems with laboratory-proven in vitro activity should be considered active drugs against strains, regardless of the presence of insertion sequences in their DNA. However, in the case of empirical therapy for infections caused by strains with a high risk of oxacillinases presence, some other antimicrobial options should be considered safer (e.g., combination with aminoglycosides or colistin) and used successfully.

Although among the meropenem-susceptible isolates, only *bla*_{OXA-51} genes are identified, we show that it is important to monitor the susceptibility of *A. baumannii* isolates to antimicrobial agents and to study the molecular basis of resistance mechanisms, especially among endemic outbreaks. Of note, within *A. baumannii* isolates, the different expression levels of the IS*Aba1*-*bla*_{OXA-23} genes may influence the phenotypic manifestation and emergence of carbapenem resistance. Moreover, the same antimicrobial susceptibility pattern between the strains may result from a combination of different molecular determinants.

The presence of IS*Aba1* among *bla*_{OXA-23}-positive isolates is rather common. Although carbapenem-resistant *A. baumannii* clinical strains from Poland have a similar antimicrobial resistance profile as worldwide, this study demonstrated the need to investigate the presence of various bases and modes of these particular resistance mechanisms.

Author Contributions: Conceptualization, D.D.; Data curation, D.D. and M.R.; Formal analysis, D.D. and M.R.; Funding acquisition, D.D. and T.B.; Investigation, D.D.; Methodology, D.D. and T.B.; Project administration, D.D.; Resources, D.D. and T.B.; Software, D.D. and T.B.; Supervision, T.B. and E.G.-K.; Validation, D.D. and T.B.; Visualization, D.D.; Writing—original draft, D.D. and T.B.; Writing—review and editing, D.D., T.B., M.R. and E.G.-K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was financially supported by Nicolaus Copernicus University funds for the basic research activity of the Microbiology Department Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Poland (PDB WF 839).

Institutional Review Board Statement: This study was approved by the Bioethics Committee of the Nicolaus Copernicus University in Toruń functioning at Collegium Medicum in Bydgoszcz; Approval Code: KB 560/2022; Approval Date: 22 November 2022.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Lin, M.F.; Lan, C.Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World J. Clin. Cases* **2014**, *2*, 787–814. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Dijkshoorn, L.; Nemec, A.; Seifert, H. An Increasing Threat in Hospitals: Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 939–951. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Peleg, A.Y.; Seifert, H.; Paterson, D.L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21*, 538–582. [\[CrossRef\]](#)
- Protic, D.; Pejovic, A.; Andjelkovic, D.; Djukanovic, N.; Savic, D.; Piperac, P.; Markovic Denic, L.; Zdravkovic, M.; Todorovic, Z. Nosocomial Infections Caused by *Acinetobacter baumannii*: Are We Losing the Battle? *Surg. Infect.* **2016**, *17*, 236–242. [\[CrossRef\]](#)
- Antunes, L.C.S.; Visca, P.; Townner, K.J. *Acinetobacter baumannii*: Evolution of a Global Pathogen. *Pathog. Dis.* **2014**, *71*, 292–301. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Lee, C.-R.; Lee, J.H.; Park, M.; Park, K.S.; Bae, I.K.; Kim, Y.B.; Cha, C.-J.; Jeong, B.C.; Lee, S.H. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 55. [\[CrossRef\]](#)
- Wu, F.; Hu, R. Risk Factors for Pneumonia Caused by Antimicrobial Drug-Resistant or Drug-Sensitive *Acinetobacter baumannii* Infections. *Medicine* **2020**, *99*, e21051. [\[CrossRef\]](#)
- Ballouz, T.; Aridi, J.; Afif, C.; Irani, J.; Lakis, C.; Nasreddine, R.; Azar, E. Risk Factors, Clinical Presentation, and Outcome of *Acinetobacter baumannii* Bacteremia. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 156. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Depka, D.; Bogiel, T.; Rzepka, M.; Gospodarek-Komkowska, E. The Prevalence of Virulence Factor Genes among Carbapenem-Non-Susceptible *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains and Their Usefulness as Potential Molecular Biomarkers of Infection. *Diagnostics* **2023**, *13*, 1036. [\[CrossRef\]](#)
- Liu, C.; Chang, Y.; Xu, Y.; Luo, Y.; Wu, L.; Mei, Z.; Li, S.; Wang, R.; Jia, X. Distribution of Virulence-Associated Genes and Antimicrobial Susceptibility in Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates. *Oncotarget* **2018**, *9*, 21663–21673. [\[CrossRef\]](#)
- Morris, F.C.; Dexter, C.; Kostoulas, X.; Uddin, M.I.; Peleg, A.Y. The Mechanisms of Disease Caused by *Acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1601. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Abbott, I.; Cerqueira, G.M.; Bhuiyan, S.; Peleg, A.Y. Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Laboratory Challenges, Mechanistic Insights and Therapeutic Strategies. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2013**, *11*, 395–409. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Rice, L.B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESCAPE. *J. Infect. Dis.* **2008**, *197*, 1079–1081. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Custovic, A.; Smajlovic, J.; Tihic, N.; Hadzic, S.; Ahmetagic, S.; Hadzagic, H. Epidemiological Monitoring of Nosocomial Infections Caused by *Acinetobacter baumannii*. *Med. Arch.* **2014**, *68*, 402–406. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kyriakidis, I.; Vasileiou, E.; Pana, Z.D.; Tragiannidis, A. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens* **2021**, *10*, 373. [\[CrossRef\]](#)

16. Grisold, A.J.; Luxner, J.; Bedenić, B.; Diab-Elschahawi, M.; Berkold, M.; Wechsler-Fördös, A.; Zarfel, G.E. Diversity of Oxacillinases and Sequence Types in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* from Austria. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 2171. [CrossRef]
17. Poirel, L.; Naas, T.; Nordmann, P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 24–38. [CrossRef]
18. Turton, J.F.; Ward, M.E.; Woodford, N.; Kaufmann, M.E.; Pike, R.; Livemore, D.M.; Pitt, T.L. The Role of ISAb₁ in Expression of OXA Carbapenemase Genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *258*, 72–77. [CrossRef]
19. Słoczyńska, A.; Wand, M.E.; Tyski, S.; Laudy, A.E. Analysis of BlaCHDL Genes and Insertion Sequences Related to Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains Isolated in Warsaw, Poland. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2486. [CrossRef]
20. Nguyen, A.T.; Pham, S.C.; Ly, A.K.; Nguyen, C.V.V.; Vu, T.T.; Ha, T.M. Overexpression of BlaOXA-58 Gene Driven by ISAb₃ Is Associated with Imipenem Resistance in a Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolate from Vietnam. *Biomed. Res. Int.* **2020**, *2020*, 7213429. [CrossRef]
21. Pagano, M.; Martins, A.F.; Barth, A.L. Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Braz. J. Microbiol.* **2016**, *47*, 785–792. [CrossRef] [PubMed]
22. Eucast: Clinical Breakpoints and Dosing of Antibiotics. Available online: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints (accessed on 25 August 2023).
23. Woodford, N.; Ellington, M.J.; Coelho, J.M.; Turton, J.F.; Ward, M.E.; Brown, S.; Amyes, S.G.B.; Livemore, D.M. Multiplex PCR for Genes Encoding Prevalent OXA Carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2006**, *27*, 351–353. [CrossRef] [PubMed]
24. Exner, M.; Bhattacharya, S.; Christiansen, B.; Gebel, J.; Goroncy-Bernes, P.; Hartmann, P.; Heeg, P.; Ilshner, C.; Kramer, A.; Larson, E.; et al. Antibiotic Resistance: What Is so Special about Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria? *GMS Hyg. Infect. Control* **2017**, *12*, Doc05. [CrossRef]
25. Bassetti, M.; Peghin, M.; Vena, A.; Giacobbè, D.R. Treatment of Infections Due to MDR Gram-Negative Bacteria. *Front. Med.* **2019**, *6*, 74. [CrossRef]
26. Ajmal, S.; Athar Hashmi, F.; Imran, I. Recent Progress in Development and Applications of Biomaterials. *Mater. Today Proc.* **2022**, *62*, 385–391. [CrossRef]
27. Llor, C.; Bjerrum, L. Antimicrobial Resistance: Risk Associated with Antibiotic Overuse and Initiatives to Reduce the Problem. *Ther. Adv. Drug Saf.* **2014**, *5*, 229–241. [CrossRef] [PubMed]
28. Falagas, M.E.; Bliotidis, I.A.; Kasiakou, S.K.; Samonis, G.; Athanassopoulou, P.; Michalopoulos, A. Outcome of Infections Due to Pandrug-Resistant (PDR) Gram-Negative Bacteria. *BMC Infect. Dis.* **2005**, *5*, 24. [CrossRef]
29. WHO Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed. Available online: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed on 18 August 2023).
30. Bandić-Pavlović, D.; Zah-Bogović, T.; Žižek, M.; Bielen, L.; Bratić, V.; Hrbač, P.; Slačanac, D.; Mihaljević, S.; Bedenić, B. Gram-negative bacteria as causative agents of ventilator-associated pneumonia and their respective resistance mechanisms. *J. Chemother.* **2020**, *32*, 344–358. [CrossRef]
31. Jabeen, F.; Khan, Z.; Sohail, M.; Tahir, A.; Tipu, I.; Saleem, H.G.M. Antibiotic Resistance Pattern of *Acinetobacter baumannii* Isolated From Bacteremia Patients In Pakistan. *J. Ayub Med. Coll. Abbottabad* **2022**, *34*, 95–100. [CrossRef]
32. Lob, S.H.; Hoban, D.J.; Sahm, D.F.; Badal, R.E. Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2016**, *47*, 317–323. [CrossRef]
33. Elham, B.; Fawzia, A. Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii* Isolated from Critically Ill Patients: Clinical Characteristics, Antimicrobial Susceptibility and Outcome. *Afr. Health Sci.* **2019**, *19*, 2400–2406. [CrossRef]
34. Almutairi, M.M. Synergistic activities of colistin combined with other antimicrobial agents against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0270908. [CrossRef]
35. Evans, B.A.; Amyes, S.G.B. OXA β -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, *27*, 241–263. [CrossRef] [PubMed]
36. Turton, J.F.; Woodford, N.; Glover, J.; Yarde, S.; Kaufmann, M.E.; Pitt, T.L. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 2974–2976. [CrossRef] [PubMed]
37. Bahador, A.; Raoofian, R.; Pourakbari, B.; Taheri, M.; Hashemizadeh, Z.; Hashemi, F.B. Genotypic and Antimicrobial Susceptibility of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*: Analysis of ISAb₁ Elements and BlaOXA-23-like Genes Including a New Variant. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1249. [CrossRef]
38. Jiang, Y.; Ding, Y.; Wei, Y.; Jian, C.; Liu, J.; Zeng, Z. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: A challenge in the intensive care unit. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 1045206. [CrossRef]
39. Kalanuria, A.A.; Ziai, W.; Mirski, M. Ventilator-Associated Pneumonia in the ICU. *Crit. Care* **2014**, *18*, 208. [CrossRef]
40. Konca, C.; Tekin, M.; Geyik, M. Susceptibility Patterns of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Indian J. Pediatr.* **2021**, *88*, 120–126. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

12.3. Publikacja nr 3



Article

Conventional and Real-Time PCR Targeting *bla*_{OXA} Genes as Reliable Methods for a Rapid Detection of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains

Dagmara Depka ^{*}, Agnieszka Mikucka, Tomasz Bogiel, Mateusz Rzepka, Patryk Zawadka and Eugenia Gospodarek-Komkowska

Microbiology Department, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 85-094 Bydgoszcz, Poland; a.mikucka@cm.umk.pl (A.M.); bogiel.tomasz@wp.pl (T.B.); mateusz.rzepka@cm.umk.pl (M.R.); patrzawa@gmail.com (P.Z.); gospodareke@cm.umk.pl (E.G.-K.)

* Correspondence: dagmaradepka@cm.umk.pl; Tel.: +48-52-585-44-80



Citation: Depka, D.; Mikucka, A.; Bogiel, T.; Rzepka, M.; Zawadka, P.; Gospodarek-Komkowska, E.

Conventional and Real-Time PCR Targeting *bla*_{OXA} Genes as Reliable Methods for a Rapid Detection of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains. *Antibiotics* **2022**, *11*, 455. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040455>

Academic Editor: Eleonora Nicolai

Received: 27 February 2022

Accepted: 24 March 2022

Published: 28 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, particularly those producing carbapenemases, are spread worldwide. A reliable detection of carbapenemases is essential to choose the appropriate antimicrobial therapy and, consequently, prevent the dissemination of carbapenem-resistant strains. The aim of this study is to examine the molecular basis of the carbapenem resistance mechanism and estimation of conventional PCR and real-time PCR usefulness for the detection of oxacillinases when compared to phenotypic carbapenemases detection. The following methods were evaluated: the CarbAcineto NP test, Carbapenem Inactivation Method, CPO panels of semiautomated antimicrobial susceptibility testing method on the BD Phoenix™ M50 system, conventional Polymerase Chain Reaction and real-time PCR. The eazypex® SuperBug complete A assay was used as the reference method. Among the tested strains, 39 (67.2%) carried the *bla*_{OXA-40} gene, while the *bla*_{OXA-23} gene was noted amongst 19 (32.8%) isolates. The diagnostic sensitivities of the studied assays were as follows: CarbAcineto NP—65.5%; CIM—100%; CPO—100%; conventional PCR—100%; real-time PCR—100%.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; carbapenemases; carbapenem-resistant; OXA-like beta-lactamases; OXA-like carbapenemases; OXA-23; OXA-40; resistance to carbapenems

1. Introduction

Acinetobacter baumannii are Gram-negative nonfermenting rods, an etiological factor of opportunistic infections among hospitalized patients [1,2]. This species mostly causes respiratory and urinary tract infections and bacteremia. The mentioned rods may also be involved in meningitis, bacterial endocarditis and eye, skin and soft tissue infections [3]. *A. baumannii* strains are often multidrug-resistant (MDR); therefore, the treatment of infections of this etiology is often quite problematic and frequently requires the inclusion of “salvage therapy” [4].

A. baumannii strains have a number of intrinsic resistance mechanisms, e.g., *Acinetobacter*-derived cephalosporinases (ADC) and OXA-51-like beta-lactamases. They are naturally resistant to ampicillin and amoxicillin and its combination with clavulanic acid, cefazolin, cefotaxime, ceftioxaone, aztreonam, ertapenem, trimethoprim and fosfomicin [5].

Additionally, the *A. baumannii* genome may contain pathogenicity islands and plasmids, which determine the presence of genes encoding enzymes that hydrolyze different antibiotics, such as beta-lactamases (e.g., carbapenemases) [6]. Class A, B and D carbapenemases (according to Ambler's classification) are the enzymes usually detected among these bacteria. The most prevalent amongst them are class D beta-lactamases, including Carbapenem-Hydrolyzing class D Beta-Lactamases (CHDLs and oxacillinases). The following oxacillinases groups have been previously identified among *A. baumannii*

strains: OXA-51-like, OXA-23-like, OXA-40-like, OXA-58-like, OXA-143-like and OXA-235-like [7,8]. CHDLs usually present a weak hydrolytic activity of carbapenems, unless other resistance mechanisms are involved simultaneously, including efflux pumps, the loss of porins or other properties connected with the presence of insertion sequences (ISs) in their genome [8].

ISs have been detected upstream of *bla*_{OXA} genes. They serve as particular gene promoters, which lead to their overexpression [9]. ISs have the ability to relocate within the bacterial genome because the transposase enzyme gene can also be found in their structure. IS*Aba1* insertion sequences are the most commonly identified in *A. baumannii* genomes. It has been previously detected upstream of *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-40-like} or *bla*_{OXA-58-like} genes [9]. In turn, *bla*_{OXA-58-like} genes occur more frequently within a different IS, called *Aba3* [10].

The reliable detection of carbapenemases is essential to prevent the spread of carbapenem-resistant strains and to choose the appropriate antimicrobial therapy [11]. Therefore, the aim of this study is to evaluate the molecular basis of the carbapenem resistance mechanism among *A. baumannii* strains and the evaluation of conventional PCR and real-time PCR usefulness for the detection of oxacillinases when compared to phenotypic detection methods. The following methods were evaluated: CarbAcine to NP, the Carbapenem Inactivation Method (CIM), CPO panels (Carbapenemase-Producing Organisms, CPO—GN-502 Panels, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) of semiautomated antimicrobial susceptibility testing (AST) method on the BD Phoenix™ M50 system, and molecular biology-based approach: conventional Polymerase Chain Reaction (PCR), real-time PCR and eazyplex® SuperBug complete A assay (AmplexDiagnostics GmbH, Gars am Inn, Germany) accompanied with the Genie® II device (OptiGene). The latter, the in vitro diagnostic (IVD)-certified kit, was chosen to be dedicated to MDR Gram-negative rods and used as the reference method. It is a molecular assay based on the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) real-time PCR method, which determines the presence of the most clinically important carbapenemases genes (KPC, NDM, VIM, OXA-48, OXA-23, OXA-40 and OXA-58) in bacteria cultures or directly in clinical specimen samples [12].

2. Results

2.1. Antimicrobial Susceptibility

A. baumannii strains presented a high percentage of resistance to all of the examined antimicrobials. All of the studied isolates ($n = 58$) were also resistant to both of the carbapenems. A total of 54 (93.1%) isolates was extensively drug-resistant (XDR), and 4 (6.9%) were pandrug-resistant (PDR). Most of the strains were susceptible to colistin only (91.4%; $n = 53$) (Table 1).

Table 1. Antimicrobial susceptibility profiles of the tested isolates ($n = 58$).

Antimicrobial	Resistant Strains ($n = 58$) Number (%)
Imipenem	58 (100%)
Meropenem	58 (100%)
Gentamicin	43 (74.1%)
Amikacin	55 (94.8%)
Tobramycin	56 (96.6%)
Ciprofloxacin	58 (100%)
Levofloxacin	58 (100%)
Trimethoprim/sulfamethoxazole	57 (98.3%)
Colistin	5 (8.6%)

2.2. Results of the Reference Method of Carbapenemase Genes Detection

Among the examined strains, 39 (67.2%) carried the *bla*_{OXA-40} gene, while the *bla*_{OXA-23} gene was noted among 19 (32.8%) isolates using the eazyplex® SuperBug complete A assay.

2.3. Results Comparison

Using CPO panels, the antimicrobial susceptibility profiles of all the studied strains were investigated, while classes of beta-lactamases were not determined for five (8.6%) of them (Table 2). Three of these isolates in the reference methods were *bla*_{OXA-40}-positive and two were *bla*_{OXA-23}-positive. Using the molecular biology-based approach, 100% (*n* = 58) of the strains were classified into a particular class of beta-lactamases.

Table 2. Detection of a particular carbapenemase class by phenotypic and genotypic methods.

Assay	No. of Isolates Positive for a Particular Class of Beta-Lactamases/ Strains Number (%)
CPO	Class D carbapenemase 53/58 (91.4%)
Real-time PCR	58/58 (100%)
Conventional PCR	58/58 (100%)

The sensitivity of the studied assays is presented in Table 3. Among the 20 negative results obtained in the CarbAcineto NP test, 12 (60.0%) isolates were *bla*_{OXA-23}-positive and 8 (40.0%) *bla*_{OXA-40}-positive, with an application of the reference method.

Table 3. Number of isolates producing carbapenemases detected by the tested methods compared to the reference method.

Assay	No. of Positive Results of Carbapenemase Detection/Strains Number (%)
CarbAcineto NP	38/58 (65.5%) *
CIM	58/58 (100%)
CPO	58/58 (100%)
Real-time PCR	58/58 (100%)
Conventional PCR	58/58 (100%)

* statistically significant difference *p* > 0.05.

In one isolate, the *bla*_{OXA-23} gene was detected using molecular methods (conventional PCR and real-time PCR), as opposed to the reference method, in which the *bla*_{OXA-40} gene was detected. The carbapenemases genes/classes were correctly determined in the remaining 57 (98.3%) isolates (see Figures 1 and 2 for the conventional PCR and Figures 3 and 4 for the real-time PCR results).

The time required to obtain the culture was the same for all the methods, but a further detection time varied significantly with the methods tested: the application of phenotypic methods required approximately 2 h, 18 h and 20 h for CarbAcineto NP, CPO and CIM, respectively. The real-time PCR results were obtained after approximately 2 h, while by conventional PCR after 3 h.

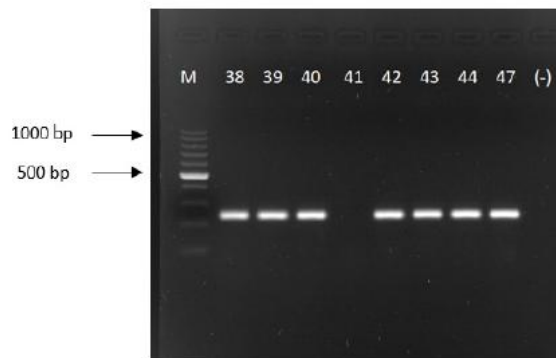


Figure 1. Picture of an electrophoretic gel showing the PCR amplicons for *bla*_{OXA-40} gene; product size of 246 bp (M—DNA size marker 100–1000 bp; 38–44—numbers of the examined strain positive for *bla*_{OXA-40} gene except for number 41; 47—positive control; (–)—negative PCR control).

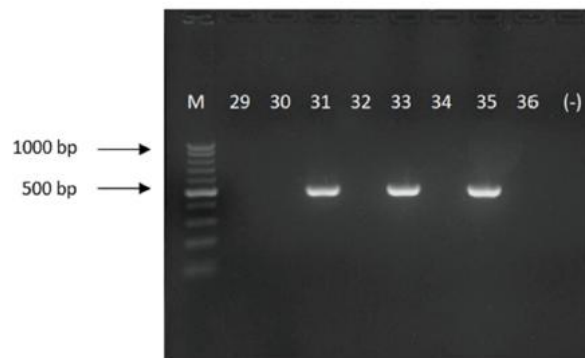


Figure 2. Picture of an electrophoretic gel showing the PCR amplicons for *bla*_{OXA-23} gene; product size of 501 bp (M—DNA size marker 100–1000 bp; 29–36—numbers of the examined strain, with 31, 33 and 35 positive for *bla*_{OXA-23} gene; (–)—negative PCR control).

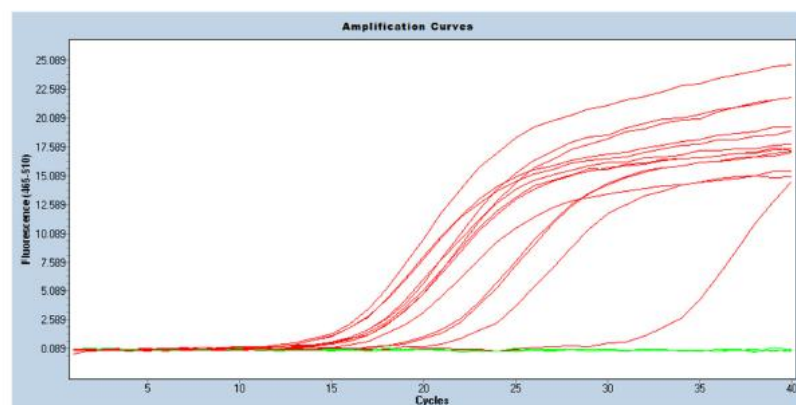


Figure 3. Picture of amplification curves showing results of real-time PCR for *bla*_{OXA-40} gene (red curves—positive results; green curves—negative results).

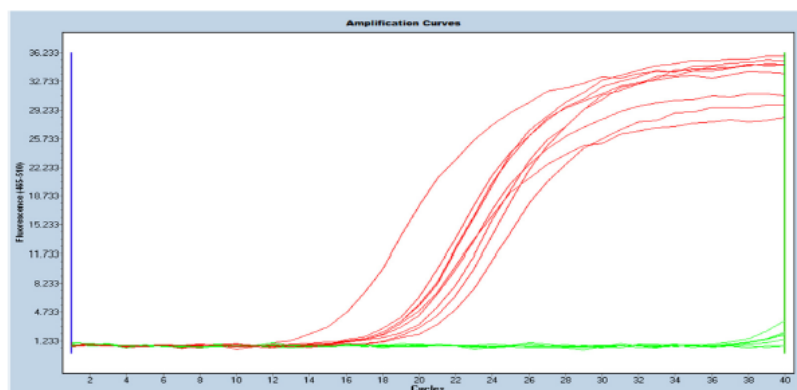


Figure 4. Picture of amplification curves showing results of real-time PCR for *bla*_{OXA-23} gene (red curves—positive results; green curves—negative results).

3. Discussion

Infections caused by *A. baumannii*, most often resulting from MDR strains, are a global threat and cause serious treatment difficulties [2,13,14]. Carbapenems are usually the drugs of choice in the treatment of *A. baumannii* infections. However, the high plasticity of the *A. baumannii* genome allows for the easy acquisition of resistance genes, as well as those encoding enzymes that hydrolyze carbapenems [15]. The scientific literature underlines that the most common acquired carbapenem resistance mechanisms among *A. baumannii* isolates are class D beta-lactamases [13,16], which is in accordance with the results of our study (all of the strains synthesized OXA-like enzymes).

It is of great importance to trace the spread and dissemination of CHDLs [17,18]. As there is no selective inhibitor for CHDL and there is no possibility of a selective phenotypic determination of these carbapenemases producers among *A. baumannii* isolates, different methods are used to detect the mechanisms of enzymatic resistance to carbapenems. In this study, five methods of CHDL detection were evaluated: CarbAcineto NP, CIM, panels compatible with the BD Phoenix™ M50 system (CPO Panels, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), conventional Polymerase Chain Reaction and real-time PCR. The IVD-certified eazyplex® SuperBug complete A assay (AmplexDiagnostics GmbH, Gars am Inn, Germany), which allows for the detection of the most important beta-lactamases genes amongst Gram-negative rods, was used as a reference method.

CarbAcineto NP is a phenotypic test that detects the hydrolysis of carbapenem (imipenem), so it does not specify a type of carbapenemase [19]. In the present study, the sensitivity of this method, compared with the reference test, reached 65.5% ($n = 38$). Dortet et al., in turn, showed a high sensitivity and specificity of this method: 94.7% and 100%, respectively [19]. In other studies performed in Poland among *Acinetobacter* spp. ($n = 58$), the isolates' sensitivity to CarbAcineto NP was 88.9%. In total, 46 (79.3%) of the strains in the mentioned study were CHDL producers [20]. In the present study, the corresponding value reached 100%. Taking into account that oxacillinases usually present a weak hydrolytic activity of carbapenems, even a slight color change should be considered as a positive result. It is unlikely for the CarbaNP results obtained for other Gram-negative rods, for which the color change is usually more significant. The highest advantage of this method is relatively the shortest time to obtain results, compared to the remaining tested methods. However, an interpretation of the CarbAcineto NP test results is sometimes quite difficult.

CIM is another phenotypic method, for which, in the present study, positive results were obtained for all ($n = 58$) of the examined strains. It showed a higher sensitivity than the CarbAcineto NP test, possibly due to the clear, simple and objective results interpretation

criteria. CIM results are based on the measurement of the size of the bacterial growth inhibition zones. Results similar to ours were also obtained in another study, in which the sensitivity of CIM was 88.1% ($n = 37$) among CHDL-positive *A. baumannii* strains ($n = 42$) [21]. The opposite results were obtained by Simner et al., in which the sensitivity of the CIM test was 29.0%, but for the mCIM version, the corresponding value was 71.0% [22]. These results arose from the incubation time of the meropenem disc (CIM-2 h, mCIM-4 h) in bacterial suspensions. Thus, in our study, the incubation time was also extended to 4 h to increase the sensitivity of the results.

For a better understanding of phenotypic methods, it should be noted that CHDLs are synthesized at a low level by bacteria which do not provide the efficient carbapenem hydrolytic effect [23]. A particular advantage of phenotypic methods is the ability to determine the actual presence of carbapenemase and confirm in vitro the hydrolysis of carbapenem by the synthesized enzyme.

For all of the studied isolates, carbapenemases were detected using CPO panels (sensitivity 100%, $n = 58$); additionally, for 91.4% of the strains ($n = 53$), the beta-lactamase class was also determined correctly. These results were similar to those obtained in previous studies. Whitley et al. showed that out of 70 carbapenemase-producing *A. baumannii*, 91.7% were true positive [24]. Other studies also showed a sensitivity of 100% for the detection of carbapenemases with CPO panels, while 88.6% of the AST profiles were correctly classified to a particular beta-lactamases class [25]. An advantage of CPO panels is the simultaneous determination of antimicrobial susceptibility and automatic classification of beta-lactamases class. This allows for a faster detection of a particular resistance mechanism and choice of the appropriate therapeutic option at an earlier stage of the infection.

Since the cost of methods used in routine practice is one of the most important factors in selecting tests for use in a particular laboratory, a comparison of the compared methods was also summarized. CarbAcineto NP, CIM, the conventional PCR and real-time PCR were relatively inexpensive (around 1–2 EUR per strain, using the mentioned reagents). CPO panels were the most expensive, with a cost of around 6 EUR per strain (all calculations excluded the cost of the reference strains).

The detection time was another important factor of the chosen laboratory procedure. Results could be obtained in the shortest and comparable time using CarbAcineto NP, conventional and real-time PCR. The detection time for CIM and CPO panels was approximately 18–20 h, but in the CPO panel, the detection of carbapenemases was performed simultaneously with the antimicrobial susceptibility testing.

One of the biggest limitations of the study was that when describing or comparing the efficacy of the methods of carbapenemases synthesis, carbapenemase-negative isolates should have been included, as well as positive ones. We only applied the carbapenemase-negative reference strain as quality control in each method. The second was that we only investigated a limited number of 58 strains, because our goal was to use the uniform group of strains with similar susceptibility profiles and with the confirmed synthesis of oxacillinases. In our region, as well as in our unit, OXA-23 and OXA-40 producers are the most often isolated from clinical material. Moreover, this study was planned for the reliable detection of CHDL enzymes. Therefore, the strains with other resistance mechanisms were neither available nor the main topic of the study.

This study demonstrated that CHDL detection using molecular biology-based methods is the most reliable. The results obtained by the conventional PCR and real-time PCR showed the highest sensitivity in the determination of a carbapenemase type. In one isolate, another *bla*_{OXA} gene was detected, which may indicate the heterogeneity of a given strain, coculture or a simple laboratory mistake. Studies by other authors also show a high sensitivity of the PCR (100%) applied for this particular purpose [26]. We preceded the real-time PCR by thermal DNA isolation. Thus, using our approach for the detection of the carbapenemases gene, results could be obtained in an even shorter amount of time (up to 2 h for the laboratories working around the clock). The difference in time to obtain the results between the conventional PCR (3 h) and real-time PCR (2 h) resulted from

the necessity for the electrophoretic separation of amplicons to visualize the results in conventional PCR. Nevertheless, molecular methods are probably the most reliable and the fastest tools to detect carbapenemases. This is of particular clinical and epidemiological importance.

4. Conclusions

OXA-like enzymes were the most prevalent carbapenemases amongst *A. baumannii* isolates, but could not be precisely and easily determined with the application of phenotypic methods. In contrast, only phenotypic methods allowed the determination of the actual in vitro hydrolysis of an antibiotic. However, their sensitivity may be lower due to a decreased enzyme synthesis level. The CPO panels presented the ability to evaluate the susceptibility of the strains to several antimicrobial agents simultaneously in one panel as routine procedure and, additionally, to detect carbapenemases types at the same time. In turn, molecular methods allowed for the determination of a specific gene encoding CHDLs and presented the highest sensitivity and specificity for that particular purpose. In summary, the compared methods are applicable for the detection of CHDLs, but require an experienced investigator to obtain an appropriate read out of the results (e.g., CarbAcineto NP test). However, the sensitivity of the investigated methods may be lower and the carbapenemases assignment may be less reliable when compared to molecular biology-based methods.

5. Materials and Methods

5.1. Bacterial Strains and Their Origin

This study involved 58 *A. baumannii* strains, each isolated from a different patient of Antoni Jurasz University Hospital No. 1 in Bydgoszcz, Poland, between 2017 and 2019. In total, 40 (69.0%) were derived from the patients of the Anesthesiology and Intensive Care Unit (for the detailed origin of the strains, see Table S1).

The examined strains were isolated from various clinical specimens. The majority, 26 (44.8%), of *A. baumannii* strains were derived from bronchoalveolar lavage samples, and 13 (22.4%) from wound swabs (Table S2).

A. baumannii DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Germany) 30008 (carbapenemase-negative control strain) and *A. baumannii* DSMZ 102930 (carbapenemase-positive control for phenotypic tests) were used as the quality control strains for the applied methods. *Escherichia coli* ATCC (American Type Culture Collection) 25922 was applied for CIM test as an indicator strain.

5.2. Antimicrobial Susceptibility

Antimicrobial susceptibility tests (AST) were determined with BD Phoenix™ M50 NMIC-402 panels (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) in a routine laboratory diagnostic scheme. The results of AST were interpreted according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing recommendation v 10.0 (EUCAST, 2020) [27].

5.3. Carbapenemases and Carbapenemase Genes Detection

Five methods (CarbAcineto NP, Carbapenem Inactivation Method, BD Phoenix™ M50 with GN-502 panels, conventional PCR and real-time PCR) were performed to evaluate carbapenemases or their gene presence among the studied strains.

5.4. Phenotypic Tests

CarbAcineto NP: a full inoculation loop (10 µL) of the overnight culture of the examined strain was collected from Columbia Agar with 5% Sheep Blood (CAB, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) plates and suspended in two 1.5 mL tubes (named A and B) each containing 100 µL of 5 M NaCl and pH indicator (phenol red). B tube was supplemented with imipenem at the final concentration of 6 mg/mL (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany). Both solutions were then incubated at 37 °C for a maximum of

2 h. An optical read-out of the color change of each solution was conducted afterwards. Carbapenemase activity was detected by a color change (red to orange/yellow) of phenol red in the B tube and the absence of color changes in the A tube [19].

CIM: a full inoculation loop (10 µL) of the overnight culture of the tested strain was suspended in 1.5 mL tube containing 400 µL of a distilled water. The meropenem disc (10 µg) (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) was added afterwards. The suspension with meropenem disc was incubated for 4 h at 35 °C. After the incubation step, the meropenem disc was removed from suspension and placed on Mueller–Hinton agar (MHA, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) plate inoculated with carbapenem-susceptible *E. coli* ATCC 25922. The culture was incubated for 18 h at 35 °C. The CIM results were interpreted based on the inhibition zone diameter size and considered positive if ≤ 17 mm, indeterminate if 18–19 mm, and negative if ≥ 20 mm [28].

BD Phoenix™ M50 with GN-502 panels (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA): AST indicator and 25 µL of bacterial suspension prepared initially in the dedicated solution (both provided by a manufacturer, BD Phoenix™ ID Broth) were added into Mueller–Hinton broth (MHB, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). The panels were inoculated with these suspensions subsequently and placed in BD Phoenix™ M50 device. The results with their interpretation were obtained automatically within 18 h.

5.5. Molecular Biology-Based Approach

5.5.1. DNA Template Extraction

A loopful (1 µL) of an overnight culture of bacteria was added to 300 µL of pure molecular biology-grade water (EurX, Gdańsk, Poland) and boiled for 10 min in 100 °C in 1.5 mL tube. The bacterial suspension was then vortexed and centrifuged at 12,800 rpm for 1 min. The supernatant was used for the reaction as DNA template, as previously described by Abrar et al. [29].

5.5.2. Conventional “In House” PCR for the Detection of *bla*_{OXA} Genes

PCR assay was performed using the primers described previously by Woodford et al. [30] for *bla*_{OXA-40}: F: 5'-GGTTAGTIGGCCCTTAAA-3'; R: 5'-AGTTGAGCGAAAAGGGGATT-3' (product size—246 bp); for *bla*_{OXA-23}: F: 5'-GATCGGATTGGAGAACCAGA-3'; R: 5'-ATTCTGACCGCATTTCAT-3' (product size—501 bp) (both manufactured by Genomed, Warsaw, Poland). The final volume of the PCR was 25 µL. The following reagents (all Promega, Walldorf, Germany) were used: MgCl₂—2.5 mM; dNTPs—1 mM; polymerase GoTaq—1 U/reaction; primers—200 pM, 1.5 × concentrated polymerase buffer and 2 µL of a DNA template. An amplification of each target gene was performed using a GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Both reactions were performed according to the following conditions: 1 cycle at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 25 s, 52 °C for 40 s, and 72 °C for 50 s with a final elongation at 72 °C for 6 min. The PCR reaction products were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gel (Bio-Rad, Feldkirchen, Germany) in a 1 × Tris-Boric Acid-EDTA (TBE, Bio-Rad, Feldkirchen, Germany) running buffer at 9 V/cm for 1 h in a MINI SUB™ DNA CELL (Bio-Rad, Feldkirchen, Germany) device.

Real-time PCR was performed using the same primers. The final volume of the reaction was 20 µL. Reagents per reaction were used as follows: 4 µL of 5 × HOT FIREPOL® EvaGreen® (SolisBioscience, Tartu, Estonia), 5 µL of molecular biology grade water (EurX, Gdańsk, Poland), 5 µL of each primers (0.25 µM/reaction) and 1 µL of a DNA template. The following conditions were applied: 1 cycle at 95 °C for 12 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s, 58 °C for 20 s, and the final elongation—72 °C for 20 s. Data collection was enabled at each extension step. The melt curve protocol was added afterwards—95 °C for 5 s and 60 °C for 1 min—, followed by data acquisition at 0.11 °C increments between 60 °C and 97 °C to confirm the specificity of the amplification product (for the results, see Figure S1). Data collection was enabled continuously at each increment during the temperature change (high-resolution melting). Reactions were performed on cobas z480 analyzer (Roche, Basel, Switzerland).

eazyplex® SuperBug complete A assay (AmplexDiagnostics GmbH, Gars am Inn, Germany), performed according to manufacturers' instruction, was used as a reference method.

5.6. Data Analysis

The data were analyzed by comparison of the results with the reference assay. The results were assessed in three categories: detection of enzyme/carbapenemase, assignment to a carbapenemase class and differentiation to the type of carbapenemase. Statistical analysis of the results was performed using chi-square test.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics11040455/s1>, Table S1: the origin of *A. baumannii* ($n = 58$) strains used in the present study, Table S2: the origin of *A. baumannii* ($n = 58$) strains used in the present study with respect to clinical specimen type, Figure S1: an example of melting curves and melting peaks picture showing specificity of the real-time PCR product for *bla_{OXA-23}* gene.

Author Contributions: Conceptualization, A.M.; Data curation, D.D. and P.Z.; Formal analysis, D.D., T.B. and M.R.; Funding acquisition, A.M. and T.B.; Investigation, D.D., M.R. and P.Z.; Methodology, D.D., A.M. and T.B.; Project administration, D.D., A.M. and T.B.; Resources, A.M. and T.B.; Software, D.D., T.B. and M.R.; Supervision, E.G.-K.; Validation, D.D., A.M. and T.B.; Writing—original draft, D.D.; Writing—review and editing, D.D., A.M., T.B., M.R., P.Z. and E.G.-K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: This research was financially supported by Nicolaus Copernicus University funds for the basic research activity of the Microbiology Department Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Poland (PDB WF 839).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Dijkshoorn, L.; Nemec, A.; Seifert, H. An Increasing Threat in Hospitals: Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 939–951. [CrossRef] [PubMed]
2. Protic, D.; Pejovic, A.; Andjelkovic, D.; Djukanovic, N.; Savic, D.; Piperac, P.; Markovic Denic, L.; Zdravkovic, M.; Todorovic, Z. Nosocomial Infections Caused by *Acinetobacter baumannii*: Are We Losing the Battle? *Surg. Infect.* **2016**, *17*, 236–242. [CrossRef] [PubMed]
3. Antunes, L.C.S.; Visca, P.; Towner, K.J. *Acinetobacter Baumannii*: Evolution of a Global Pathogen. *Pathog. Dis.* **2014**, *71*, 292–301. [CrossRef]
4. Custovic, A.; Smajlovic, J.; Tihic, N.; Hadzic, S.; Ahmetagic, S.; Hadzagic, H. Epidemiological Monitoring of Nosocomial Infections Caused by *Acinetobacter baumannii*. *Med. Arch.* **2014**, *68*, 402–406. [CrossRef]
5. Abbott, I.; Cerqueira, G.M.; Bhuiyan, S.; Peleg, A.Y. Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Laboratory Challenges, Mechanistic Insights and Therapeutic Strategies. *Expert Rev. Anti-Infect.* **2013**, *11*, 395–409. [CrossRef] [PubMed]
6. Nguyen, M.; Joshi, S.G. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*, and their importance in hospital-acquired infections: A scientific review. *J. Appl. Microbiol.* **2021**, *131*, 2715–2738. [CrossRef] [PubMed]
7. Shin, B.; Park, W. Antibiotic Resistance of Pathogenic *Acinetobacter* Species and Emerging Combination Therapy. *J. Microbiol.* **2017**, *55*, 837–849. [CrossRef]
8. Ramirez, M.S.; Bonomo, R.A.; Tolmasky, M.E. Carbapenemases: Transforming *Acinetobacter baumannii* into a Yet More Dangerous Menace. *Biomolecules* **2020**, *10*, 720. [CrossRef] [PubMed]
9. Turton, J.F.; Ward, M.E.; Woodford, N.; Kaufmann, M.E.; Pike, R.; Livermore, D.M.; Pitt, T.L. The Role of ISAbal in Expression of OXA Carbapenemase Genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *258*, 72–77. [CrossRef]
10. Nguyen, A.T.; Pham, S.C.; Ly, A.K.; Nguyen, C.V.V.; Vu, T.T.; Ha, T.M. Overexpression of *bla_{OXA-58}* Gene Driven by ISAbal3 Is Associated with Imipenem Resistance in a Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolate from Vietnam. *Biomed. Res. Int.* **2020**, *2020*, 7213429. [CrossRef]

11. Bedenić, B.; Plečko, V.; Sardelić, S.; Uzunović, S.; Godić Torkar, K. Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria: Laboratory Detection and Clinical Significance. *BioMed. Res. Int.* **2014**, *2014*, e841951. [CrossRef] [PubMed]
12. National Institute for Health and Care Excellence. Eazyplex SuperBug Kits for Detecting Carbapenemase-producing Organisms. Available online: <https://www.nice.org.uk/advice/mib94/resources/eazyplex-superbug-kits-for-detecting-carbapenemase-producing-organisms-pdf-63499468392133#:~:text=One%20study%20reported%20that%20the,sequencing%20results%20for%20clinical%20isolates> (accessed on 18 March 2022).
13. Peleg, A.Y.; Seifert, H.; Paterson, D.L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21*, 538–582. [CrossRef]
14. Cai, Y.; Chai, D.; Wang, R.; Liang, B.; Bai, N. Colistin Resistance of *Acinetobacter baumannii*: Clinical Reports, Mechanisms and Antimicrobial Strategies. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 1607–1615. [CrossRef]
15. Imperi, F.; Antunes, L.C.S.; Blom, J.; Villa, L.; Iacono, M.; Visca, P.; Carattoli, A. The Genomics of *Acinetobacter baumannii*: Insights into Genome Plasticity, Antimicrobial Resistance and Pathogenicity. *IUBMB Life* **2011**, *63*, 1068–1074. [CrossRef]
16. Słoczyńska, A.; Wand, M.E.; Tyski, S.; Laudy, A.E. Analysis of blaCHDL Genes and Insertion Sequences Related to Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains Isolated in Warsaw, Poland. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2486. [CrossRef] [PubMed]
17. Anane, Y.A.; Apalata, T.; Vasaikar, S.; Okuthe, G.E.; Songca, S. Molecular Detection of Carbapenemase-Encoding Genes in Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates in South Africa. *Int. J. Microbiol.* **2020**, *2020*, 7380740. [CrossRef]
18. Mugnier, P.D.; Poirel, L.; Naas, T.; Nordmann, P. Worldwide Dissemination of the bla_{OXA-23} Carbapenemase Gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 35–40. [CrossRef] [PubMed]
19. Dortet, L.; Poirel, L.; Errera, C.; Nordmann, P. CarbAcineto NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Acinetobacter* Spp. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 2359–2364. [CrossRef]
20. Literacka, E.; Herda, M.; Baraniak, A.; Żabicka, D.; Hryniewicz, W.; Skoczyńska, A.; Gniadkowski, M. of the Carba NP Test for Carbapenemase Detection in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* Spp. and *Acinetobacter* Spp., and Its Practical Use in the Routine Work of a National Reference Laboratory for Susceptibility Testing. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2017**, *36*, 2281–2287. [CrossRef]
21. Bogiel, T.; Rzepka, M.; Gospodarek-Komkowska, E. An Application of Imipenem Discs or P. Aeruginosa ATCC 27853 Reference Strain Increases Sensitivity of Carbapenem Inactivation Method for Non-Fermenting Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics* **2021**, *10*, 875. [CrossRef]
22. Simner, P.J.; Opene, B.N.A.; Chambers, K.K.; Naumann, M.E.; Carroll, K.C.; Tamma, P.D. Carbapenemase Detection among Carbapenem-Resistant Glucose-Nonfermenting Gram-Negative Bacilli. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, *55*, 2858–2864. [CrossRef] [PubMed]
23. Poirel, L.; Naas, T.; Nordmann, P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D β-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 24–38. [CrossRef]
24. Whitley, V.; Kircher, S.; Gill, T.; Hindler, J.A.; O'Rourke, S.; Cooper, C.; Tulpule, A.; Denys, G.A. Multicenter Evaluation of the BD Phoenix CPO Detect Test for Detection and Classification of Carbapenemase-Producing Organisms in Clinical Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *58*, e01752-19. [CrossRef]
25. Thomson, G.; Turner, D.; Brasso, W.; Kircher, S.; Guillet, T.; Thomson, K. High-Stringency Evaluation of the Automated BD Phoenix CPO Detect and Rapidec Carba NP Tests for Detection and Classification of Carbapenemases. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, *55*, 3437–3443. [CrossRef] [PubMed]
26. Mentasti, M.; Prime, K.; Sands, K.; Khan, S.; Wootton, M. Rapid Detection of OXA-23-like, OXA-24-like, and OXA-58-like Carbapenemases from *Acinetobacter* Species by Real-Time PCR. *J. Hosp. Infect.* **2020**, *105*, 741–746. [CrossRef]
27. EUCAST: Previous Versions of Documents. Available online: https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/previous_versions_of_documents/ (accessed on 17 January 2022).
28. Literacka, E. Wykrywanie karbapenemaz u pałeczek Enterobacterales, *Pseudomonas* spp. i *Acinetobacter* spp. Test CIM. 2019. Available online: https://korid.nih.gov.pl/pdf/CIM%20-%20KORLD_2019.pdf (accessed on 17 January 2022).
29. Abrar, S.; Vajeeha, A.; Ul-Ain, N.; Riaz, S. Distribution of CTX-M Group I and Group III β-Lactamases Produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Lahore, Pakistan. *Microb. Pathog.* **2017**, *103*, 8–12. [CrossRef]
30. Woodford, N.; Ellington, M.J.; Coelho, J.M.; Turton, J.F.; Ward, M.E.; Brown, S.; Amyes, S.G.B.; Livermore, D.M. Multiplex PCR for Genes Encoding Prevalent OXA Carbapenemases in *Acinetobacter* Spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2006**, *27*, 351–353. [CrossRef]

Table S1. The origin of *A. baumannii* (n = 58) strains used in the present study.

Clinic/Unit	Strains number (%)
Anesthesiology and Intensive Care	40 (69.0%)
Cardiology and Internal Diseases	5 (8.6%)
Liver Surgery and General Surgery	4 (6.9%)
Vascular Surgery and Angiology	4 (6.9%)
Other*	5 (8.6%)

* one strain isolated from each of the following: Cardiac Surgery, Intensive Unit of Cardiac Surgery, Geriatrics, Endocrinology and Rehabilitation Clinics

Table S2. The origin of *A. baumannii* (n = 58) strains used in the present study with respect to clinical specimen type.

Clinical material	Strains number (%)
Bronchoalveolar lavage	26 (44.8%)
Wound swabs	13 (22.4%)
Blood	7 (12.1%)
Urine	3 (5.2%)
Vascular catheter	2 (3.4%)
Peritoneal swabs	2 (3.4%)
Other*	5 (8.6%)

* one strain was isolated from each of the following: cerebrospinal fluid, pus, tissue sample, discharge from respiratory tract, granulation tissue

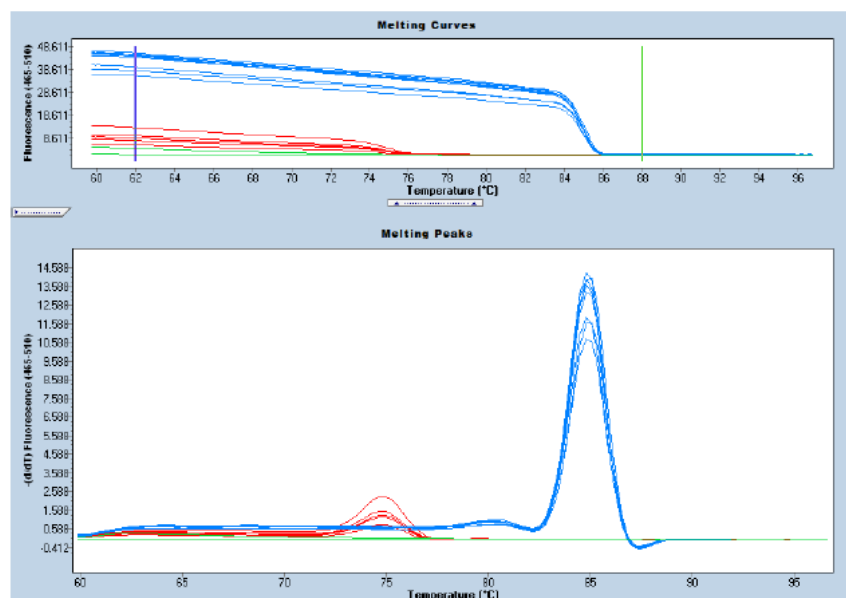


Figure S1. An example of melting curves and melting peaks picture showing specificity of the real-time PCR product for *bla_{OXA-23}* gene (blue lines).

13. OŚWIADCZENIA AUTORA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

załącznik nr 1b do Uchwały RD 66/2024 z dnia 26.06.2024r

Opis merytoryczny udziału w publikacji wieloautorskiej celem podjęcia właściwej uchwały dotyczącej potwierdzenia spełnienia wymagań, o których mowa w art. 186 ust. 1 pkt 3 lit. a i b Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018, w przypadku publikacji wieloautorskich

Dagmara Depka-Radzikowska
Imię i nazwisko kandydata

Bydgoszcz, data 10.06.2026 r.

Dotyczy publikacji:

Dane publikacji:

Depka Dagmara, Bogiel Tomasz, Rzepka Mateusz i Gospodarek-Komkowska Eugenia
The prevalence of virulence factor genes among carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter baumannii* clinical strains and their usefulness as potential molecular biomarkers of infection.
Diagnostics 2023, 13: 1-11

Dane bibliometryczne IF: 3,0; Liczba cytowań: 8; Punkty MNiSW: 70

Mój merytoryczny udział ww. publikacji jest następujący:

- pomysł i zaprojektowanie eksperymentu,
- przeprowadzenie badań,
- walidacja wyników,
- analiza uzyskanych wyników,
- przygotowanie manuskryptu,
- przekazanie manuskryptu do czasopisma (jako autor korespondencyjny).

Mój udział procentowy wynosi: 65%


Kierownik
Katedry Mikrobiologii
prof. dr hab. Eugenia Gospodarek-Komkowska
(pieczęć imienna i podpis promotora)


(kandydat)

załącznik nr 1b do Uchwały RD 66/2024 z dnia 26.06.2024r

Opis merytoryczny udziału w publikacji wieloautorskiej celem podjęcia właściwej uchwały dotyczącej potwierdzenia spełnienia wymagań, o których mowa w art. 186 ust. 1 pkt 3 lit. a i b Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018, w przypadku publikacji wieloautorskich

Dagmara Depka-Radzikowska
Imię i nazwisko kandydata

Bydgoszcz, data 10.06.2026 r.

Dotyczy publikacji:

Dane publikacji:

Depka Dagmara, Bogiel Tomasz, Rzepka Mateusz i Gospodarek-Komkowska Eugenia
Insertion sequences within oxacillinases genes as molecular determinants of *Acinetobacter baumannii* resistance to carbapenems — a pilot study.
Microorganisms 2024, 12: 1-12

Dane bibliometryczne IF: 4,2; Liczba cytowań: 1; Punkty MNiSW: 40

Mój merytoryczny udział ww. publikacji jest następujący:

- pomysł i zaprojektowanie eksperymentu,
- przeprowadzenie badań,
- walidacja wyników,
- analiza uzyskanych wyników,
- przygotowanie manuskryptu.

Mój udział procentowy wynosi: 50%

Kierownik
Katedry Mikrobiologii
.....
prof. dr hab. Eugenia Gospodarek-Komkowska
(pieczęć instytucji i podpis promotora)

Depka - Radzikowska
.....
(kandydat)

załącznik nr 1b do Uchwały RD 66/2024 z dnia 26.06.2024r

Opis merytoryczny udziału w publikacji wieloautorskiej celem podjęcia właściwej uchwały dotyczącej potwierdzenia spełnienia wymagań, o których mowa w art. 186 ust. 1 pkt 3 lit. a i b Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018, w przypadku publikacji wieloautorskich

Dagmara Depka-Radzikowska
Imię i nazwisko kandydata

Bydgoszcz, data 10.06.2026 r.

Dotyczy publikacji:

Dane publikacji:

Depka Dagmara, Mikucka Agnieszka, Bogiel Tomasz, Rzepka Mateusz, Zawadka Patryk i
Gospodarek-Komkowska Eugenia

Conventional and real-time PCR targeting *bla_{OXA}* genes as reliable methods for a rapid
detection of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains.

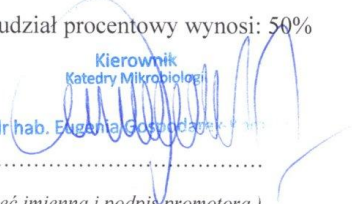
Antibiotics 2022, 11: 1–10

Dane bibliometryczne IF: 4,8; Liczba cytowań: 10; Punkty MNiSW: 70

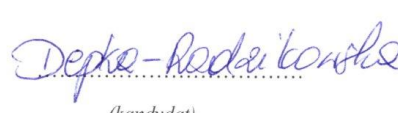
Mój merytoryczny udział ww. publikacji jest następujący:

- zaprojektowanie części badań,
- udział w przeprowadzeniu badań,
- walidacja wyników,
- analiza uzyskanych wyników,
- przygotowanie manuskryptu,
- przekazanie manuskryptu do czasopisma (jako autor korespondencyjny).

Mój udział procentowy wynosi: 50%


Kierownik
Katedry Mikrobiologii
prof. dr hab. Eugenia Gospodarek-Komkowska

(pieczęć imienna i podpis promotora)



(kandydat)

14. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW

*Załącznik nr 5 do uchwały Nr 38 Senatu UMK z dnia 26 września 2023 r.
w sprawie postępowania o nadanie stopnia doktora
na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu*

Toruń, dnia 09.06.2026 r.

Dr n.med. Tomasz Bogiel

Katedra Propedeutyki Medycyny i Profilaktyki Zakażeń

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Depka Dagmara, Bogiel Tomasz, Rzepka Mateusz i Gospodarek-Komkowska Eugenia, 2023, The prevalence of virulence factor genes among carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter baumannii* clinical strains and their usefulness as potential molecular biomarkers of infection. *Diagnostics*, 13: 1-11, mój udział polegał na udziale w projektowaniu zastosowanych metod, wsparciu merytorycznym podczas realizacji badań oraz recenzji i korekcie manuskryptu na etapie przygotowania publikacji.

Mój udział w powstaniu pracy wynosi 20%.



.....
(podpis)

Toruń, dnia 10.06.2026 r.

Mgr Mateusz Rzepka
Katedra Mikrobiologii

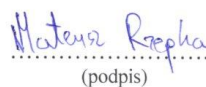
**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Depka Dagmara, Bogiel Tomasz, Rzepka Mateusz i Gospodarek-Komkowska Eugenia, 2023, The prevalence of virulence factor genes among carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter baumannii* clinical strains and their usefulness as potential molecular biomarkers of infection. *Diagnostics*, 13: 1-11, mój udział polegał na wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników oraz na recenzji i korekcie manuskryptu na etapie przygotowania publikacji.

Mój udział w powstaniu pracy wynosi 10%.


(podpis)

Toruń, dnia 10.06.2026 r.

Prof. dr hab. n. med. Eugenia Gospodarek-Komkowska
Katedra Mikrobiologii

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Depka Dagmara, Bogiel Tomasz, Rzepka Mateusz i Gospodarek-Komkowska Eugenia, 2023, The prevalence of virulence factor genes among carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter baumannii* clinical strains and their usefulness as potential molecular biomarkers of infection. *Diagnostics*, 13: 1-11, mój udział polegał na recenzji i korekcie manuskryptu na etapie przygotowania publikacji.

Mój udział w powstaniu pracy wynosi 5%.

Kierownik
Katedry Mikrobiologii
prof. dr hab. Eugenia Gospodarek-Komkowska
.....
(podpis)

Toruń, dnia 09.06.2026 r.

Dr n.med. Tomasz Bogiel
Katedra Propedeutyki Medycyny i Profilaktyki Zakażeń

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Depka Dagmara, Bogiel Tomasz, Rzepka Mateusz i Gospodarek-Komkowska Eugenia, 2024,
Insertion sequences within oxacillinases genes as molecular determinants of *Acinetobacter baumannii* resistance to carbapenems — a pilot study. *Microorganisms*, 12: 1-12, mój udział polegał na udziale w projektowaniu zastosowanych metod, wsparciu merytorycznym podczas realizacji badań, recenzji i korekcie manuskryptu na etapie przygotowania publikacji oraz zgłoszeniu manuskryptu do czasopisma.

Mój udział w powstaniu pracy wynosi 25%.

 **PODPIS ZAUFANY**
TOMASZ
BOGIEL
09.06.2026 10:12:15 GMT+0200
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

.....
(podpis)

Toruń, dnia 10.06.2026 r.

Mgr Mateusz Rzepka
Katedra Mikrobiologii

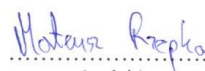
**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Depka Dagmara, Bogiel Tomasz, Rzepka Mateusz i Gospodarek-Komkowska Eugenia, 2024,
Insertion sequences within oxacillinases genes as molecular determinants of *Acinetobacter baumannii* resistance to carbapenems — a pilot study. *Microorganisms*, 12: 1-12, mój udział polegał na wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników oraz na recenzji i korekcie manuskryptu na etapie przygotowania publikacji.

Mój udział w powstaniu pracy wynosi 20%.


(podpis)

Toruń, dnia 10.06.2026 r.

Prof. dr hab. n. med. Eugenia Gospodarek-Komkowska
Katedra Mikrobiologii

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Depka Dagmara, Bogiel Tomasz, Rzepka Mateusz i Gospodarek-Komkowska Eugenia, 2024,
Insertion sequences within oxacillinases genes as molecular determinants of *Acinetobacter*
baumannii resistance to carbapenems — a pilot study. *Microorganisms*, 12: 1-12, mój udział polegał
na recenzji i korekcie manuskryptu na etapie przygotowania publikacji.

Mój udział w powstaniu pracy wynosi 5%.

Kierownik
Katedry Mikrobiologii
prof. dr hab. Eugenia Gospodarek-Komkowska
.....
(podpis)

Toruń, dnia 10.06.2026 r.

Dr n. med. Agnieszka Mikucka
Katedra Mikrobiologii

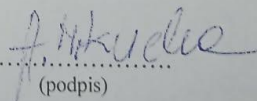
**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Depka Dagmara, Mikucka Agnieszka, Bogiel Tomasz, Rzepka Mateusz, Zawadka Patryk i Gospodarek-Komkowska Eugenia, 2022, Conventional and real-time PCR targeting *bla_{OXA}* genes as reliable methods for a rapid detection of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *Antibiotics*, 11: 1–10, mój udział polegał na opracowaniu koncepcji badań, wsparciu merytorycznym podczas realizacji badań, recenzji i korekcie manuskryptu na etapie przygotowania publikacji.

Mój udział w powstaniu pracy wynosi 15%.

.....

(podpis)

Toruń, dnia 09.06.2026 r.

Dr n.med. Tomasz Bogiel
Katedra Propedeutyki Medycyny i Profilaktyki Zakażeń

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Depka Dagmara, Mikucka Agnieszka, Bogiel Tomasz, Rzepka Mateusz, Zawadka Patryk i Gospodarek-Komkowska Eugenia, 2022, Conventional and real-time PCR targeting *bla_{OXA}* genes as reliable methods for a rapid detection of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains. Antibiotics, 11: 1–10, mój udział polegał na udziale w projektowaniu zastosowanych metod, wsparciu merytorycznym podczas realizacji badań oraz recenzji i korekcie manuskryptu na etapie przygotowania publikacji.

Mój udział w powstaniu pracy wynosi 10%.

 **PODPIS ZAUFANY**
**TOMASZ
BOGIEL**
09.06.2026 10:15:52 GMT+0200
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

.....
(podpis)

Toruń, dnia 10.06.2026 r.

Mgr Mateusz Rzepka
Katedra Mikrobiologii

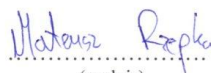
**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Depka Dagmara, Mikucka Agnieszka, Bogiel Tomasz, Rzepka Mateusz, Zawadka Patryk i Gospodarek-Komkowska Eugenia, 2022, Conventional and real-time PCR targeting *bla_{OXA}* genes as reliable methods for a rapid detection of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *Antibiotics*, 11: 1–10, mój udział polegał na wykonaniu analizy statystycznej uzyskanych wyników oraz na recenzji i korekcie manuskryptu na etapie przygotowania publikacji.

Mój udział w powstaniu pracy wynosi 5%.


(podpis)

Toruń, dnia 10.06.2026 r.

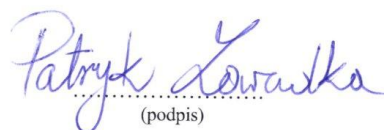
Mgr Patryk Zawadka
Katedra Histologii i Embriologii

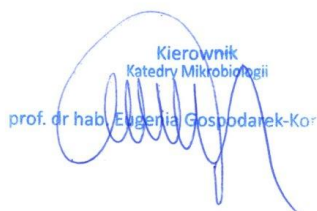
**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Depka Dagmara, Mikucka Agnieszka, Bogiel Tomasz, Rzepka Mateusz, Zawadka Patryk i Gospodarek-Komkowska Eugenia, 2022, Conventional and real-time PCR targeting *bla_{OXA}* genes as reliable methods for a rapid detection of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains. Antibiotics, 11: 1–10, mój udział polegał na przeprowadzeniu części badań, opracowaniu części uzyskanych wyników oraz recenzji i korekcie manuskryptu na etapie przygotowania publikacji. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 15%.


(podpis)


Kierownik
Katedry Mikrobiologii
prof. dr hab. Eugenia Gospodarek-Kor

Toruń, dnia 10.06.2026 r.

Prof. dr hab. n. med. Eugenia Gospodarek-Komkowska
Katedra Mikrobiologii

**Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Depka Dagmara, Mikucka Agnieszka, Bogiel Tomasz, Rzepka Mateusz, Zawadka Patryk i Gospodarek-Komkowska Eugenia, 2022, Conventional and real-time PCR targeting *bla_{OXA}* genes as reliable methods for a rapid detection of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *Antibiotics*, 11: 1–10, mój udział polegał na recenzji i korekcie manuskryptu na etapie przygotowania publikacji.

Mój udział w powstaniu pracy wynosi 5%.

Kierownik
Katedry Mikrobiologii

prof. dr hab. Eugenia Gospodarek-Komkowska
.....
(podpis)

15. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ

Badania prowadzono zgodnie z decyzjami Komisji Bioetycznej nr KB 573/2019 oraz KB 560/2022.