

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Petra Fućak

ULOGA CINKA U PREŽIVLJAVANJU I RAZMNOŽAVANJU *F. NOVICIDA*

Diplomski rad

Rijeka, 2020. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Petra Fućak

ULOGA CINKA U PREŽIVLJAVANJU I RAZMNOŽAVANJU *F. NOVICIDA*

Diplomski rad

Rijeka, 2020. godina

Mentor rada: doc. dr. sc. Mateja Ožanič dipl. sanit. ing

Diplomski rad obranjen je dana _____ u/na

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad ima 31 stranu, 9 slika, 1 tablicu, 52 literaturnih navoda.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Mateji Ožanič na savjetima, izdvojenom vremenu, stručnom vodstvu te na korektnom, profesionalnom i ljubaznom odnosu.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Marini Šantić na potpori prilikom izrade ovog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji na podršci i osloncu kroz čitavo vrijeme mojeg studija.

SAŽETAK

Rod *Francisella* pripada porodici *Francisellaceae*, a čine ga vrste *F. tularensis*, *F. novicida*, *F. philomiragia*, *F. noatunensis* i *F. hispaniensis*. *F. tularensis* je gram-negativna, fakultativno unutarstanična bakterija koja kod životinja i ljudi uzrokuje tularemiju. Postoje tri podvrste *F. tularensis* koje uzrokuju bolest kod čovjeka: *tularensis* (tip A), *holarctica* (tip B) i *mediasiatica*. *F. novicida* je genetski vrlo slična *F. tularensis*, međutim rijetko dovodi do infekcija kod čovjeka. Slučajevi bolesti izazvani ovom bakterijom opisani su isključivo kod imunokompromitiranih. *Acanthamoeba castellanii* je slobodno-živuća ameba, široko rasprostranjena u okolišu gdje se ponaša kao oportunistički patogen. Životni ciklus amebe sastoji se od dva stadija, ciste i trofozoita. U povoljnim uvjetima *A. castellanii* je prisutna u stadiju trofozoita, dok se u nepovoljnim fiziološkim uvjetima formira otporna forma koja se naziva cista. *F. tularensis* je pokazala sposobnost unutarstaničnog razmnožavanja u *A. castellanii* te se amebe smatraju potencijalnim rezervoarom ove bakterije unutar vodenog okoliša. Matali poput željeza i mangana neophodni su za rast i razmnožavanje mnogih bakterija prisutnih u prirodnim vodama. Cilj ovog rada bio je opisati ulogu cinka u izvanstaničnom i unutarstaničnom razmnožavanju bakterije *F. novicida* u prirodnim vodama. Kinetika rasta bakterije *F. novicida* ispitana je u uzorcima izvorskih i površinskih voda te unutar amebe *A. castellanii*. Nadalje, istražena je uloga *zur* gena, odgovornog za transport cinka, za rast i razmnožavanje ove bakterije u vodenom okolišu. Rezultati su pokazali kako se *F. novicida* najbolje razmnožava u uzorku vode Zvir II koji je inicijalno sadržavao najviše koncentracije metala. Također, pokazalo se kako bakteriji odgovaraju koncentracije cinka od 0,5 mM i 0,1 mM, dok preniske i previsoke koncentracije cinka inhibiraju rast ove bakterije u vodama. Nadalje, rezultati pokazuju kako je *zur* gen važan za izvanstanično i unutarstanično razmnožavanje bakterije *F. novicida*.

Ključne riječi: *F. novicida*, cink, *A. castellanii*, površinske vode

ABSTRACT

The genus *Francisella* belongs to the family *Francisellaceae* and consists of the species *F. tularensis*, *F. novicida*, *F. philomiragia*, *F. noatunensis* and *F. hispaniensis*. *F. tularensis* is a gram-negative, facultative intracellular bacterium that causes tularemia in animals and humans. There are three subspecies of *F. tularensis* causing disease in humans: *tularensis* (type A), *holarctica* (type B) and *mediasiatica*. *F. novicida* is genetically very similar to *F. tularensis*, however it rarely causes disease in humans. Cases of tularemia caused by this bacterium have been described only in immunocompromised. *Acanthamoeba castellanii* is a free-living amoeba, widespread in the environment where it acts as an opportunistic pathogen. The life cycle of the amoeba consists of two stages, a cyst and a trophozoite. Under favorable conditions *A. castellanii* is present in the trophozoite stage, while under unfavorable physiological conditions a resistant form called a cyst is formed. *F. tularensis* has shown the ability to replicate intracellularly in *A. castellanii*, hence amoebae are considered as a potential reservoir of this bacterium within the aquatic environment. Metals like iron and manganese are essential for the growth and multiplication of many bacteria present in natural waters. The aim of this study was to describe the role of zinc in extracellular and intracellular survival and replication of *F. novicida* in natural waters. The growth kinetics of *F. novicida* was examined in spring and surface water samples and within the amoeba *A. castellanii*. Furthermore, we investigated the importance of the *zur* gene for growth and replication of this bacterium in the aquatic environment. *F. novicida* showed the best replication rate in the Zvir II water sample, which initially contained the highest concentrations of metals. Further, bacteria showed the highest replication in a water samples with zinc concentrations of 0.5 mM and 0.1 mM, while too low and too high zinc concentrations inhibit the

growth of this bacterium in water. Furthermore, the results showed that the *zur* gene is important for extracellular and intracellular replication of *F. novicida*.

Key words: *F. novicida*, zinc, *A. castellanii*, surface waters

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1 Rod <i>Francisella</i>	1
1.1.1 <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> (tip A)	2
1.1.2 <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> (tip B)	2
1.1.3 <i>Francisella novicida</i>	3
1.2 Opće karakteristike bakterija roda <i>Francisella</i>	3
1.2.1 Uvjeti rasta	3
1.2.2 Fiziologija bakterije i faktori virulencije	4
1.3 Patogenza bakterije	5
1.3.1 Unutarstanični život bakterije u makrofazima	5
1.3.2 Unutarstanični život bakterije u amebama	6
1.4 Tularemija	7
1.5 Utjecaj metala na rast <i>F. tularensis</i>	9
1.5.1 Željezo	9
1.5.2 Cink	9
1.6 <i>Acanthamoeba castellanii</i>	10
2. CLJ ISTRAŽIVANJA	14
3. MATERIJALI I METODE	15

3.1. Bakterije.....	15
3.2. Uzorci prirodnih voda.....	15
3.3. Mjerenje koncentracije cinka	15
3.4. Kinetika rasta bakterije <i>F. novicida</i> u uzorcima prirodnih voda	15
3.5. Kinetika rasta bakterije <i>F. novicida</i> u redestiliranoj vodi s dodatkom cinka u različitim koncentracijama.....	16
3.6. Kinetika rasta bakterije <i>F. novicida</i> unutar <i>A. castellanii</i> u mediju sa različitim koncentracijama cinka.....	16
3.7. Statistička obrada podataka.....	17
4. REZULTATI.....	18
4.1 . Kinetika rasta bakterije <i>F. novicida</i> u uzorcima prirodnih voda	18
4.2 Kinetika rasta bakterije <i>F. novicida</i> u redestiliranoj vodi s dodatkom cinka u različitim koncentracijama.....	20
4.3 Kinetika rasta bakterije <i>F. novicida</i> unutar <i>A. castellanii</i> u mediju sa različitim koncentracijama cinka.....	21
5. RASPRAVA.....	22
6. ZAKLJUČAK	25
7. LITERATURA	26

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1 Rod *Francisella*

Rod *Francisella* pripada porodici *Francisellaceae*, a čine ga vrste *F. tularensis*, *F. novicida*, *F. philomiragia*, *F. noatunensis*, *F. hispaniensis* [4]. Vrsta *F. tularensis* se dijeli u tri podvrste, a to su: *tularensis* (tip A), *holarctica* (tip B) i *mediasiatica* [2]. Vrste roda *Francisella* genetski su vrlo slične, ali se razlikuju u virulenciji, geografskoj rasprostranjenosti, mehanizmu patogenosti te biokemijskim osobinama [42]. Važan rezervoar ove bakterije u prirodi su stanice ameba, unutar kojih preživljava i uspješno se razmnožava [7, 10]. Pojedine vrste roda *Francisella* razlikuju se prema stupnju virulencije na životinjskim modelima. Vrste unutar roda moguće je razlikovati pomoću reakcije lančane polimeraze. Razlikovanje podvrsti unutar roda moguće je pomoću gel elektorforeze u promjenjivom električnom poljem.

Tablica 1. Taksonomija roda *Francisella*

Rod	Vrsta	Podvrsta
<i>Francisella</i>	<i>tularensis</i>	<i>tularensis</i>
		<i>holarctica</i>
		<i>mediasiatica</i>
	<i>novicida</i>	
	<i>hispaniensis</i>	
	<i>philomiragia</i>	
	<i>noatunensis</i>	<i>noatunensis</i>
		<i>orientalis</i>

1.1.1 *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* (tip A)

Francisella tularensis podvrsta *tularensis* (tip A) geografski je rasprostranjena u Sjevernoj Americi te je odgovorna za 70 % slučajeva tularemije kod ljudi. Bakterija je izrazito virulentna za ljude i životinje, a klinička slika bolesti ovisi o infektivnoj dozi i putu infekcije. Prilikom respiratornih infekcija svega 10 bakterija može biti smrtonosno ukoliko se ne liječi [2]. S obzirom na visoki stupanj virulencije te nisku infektivnu dozu, Centar za prevenciju i kontrolu bolesti svrstao je podvrstu *tularensis* u kategoriju A mikroorganizama [2]. Samim time, rad s ovim sojem zahtjeva laboratorije visokog stupnja zaštite

1.1.2 *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* (tip B)

F. tularensis subsp. *holarctica* (tip B) je geografski rasprostranjena na području Europe i Azije. Tip B dovodi do blažeg oblika bolesti, a samim time i do niže stope smrtnosti. Ova podvrsta često je izolirana iz slatkovodnih okruženja [35], a pretpostavlja se kako joj sposobnost preživljavanja u protozoama omogućava opstanak u prirodi. Bolest se na čovjeka najčešće prenosi krpeljima i komarcima [36]. Sa ciljem proizvodnje cijepljiva iz podvrste *holarctica* je početkom 20. stoljeća konstruiran soj živuće vakcine, LVS-soj (engl. live vaccine strain) [37]. Ovaj soj nastao je subkultivacijom bakterije na hranjivom agaru i uzastopnim intraperitonealnim infekcijama miševa te izolacijom bakterija iz tkiva životinja [38]. S obzirom da LVS- soj izaziva bolest kod imunokompromitiranih ljudi, ne koristi se kao cjepivo protiv tularemije.

1.1.3 *Francisella novicida*

F. novicida je genetski vrlo slična vrsti *F. tularensis* [3], međutim rijetko dovodi do infekcija kod čovjeka. Slučajevi bolesti izazvani ovom bakterijom opisani su isključivo kod imunokompromitiranih, a simptomi uključuju groznicu, bolove u mišićima te pneumoniju [1]. Izvor bakterije najčešće je površinska voda. Iako slabo virulentna za čovjeka, ova vrsta je visoko virulentna za životinje, uključujući miševe, voluharice, zečeve te člankonošce [35]. S obzirom na nisku virulenciju kod čovjeka, *F. novicida* se često koristi u laboratoriju prilikom istraživačkog rada [3]. To je ujedno i vrsta koja je korištena prilikom izrade ovog diplomskog rada.

1.2 Opće karakteristike bakterija roda *Francisella*

1.2.1 Uvjeti rasta

Francisella je bakterija koja je vrlo zahtjevna za kultivaciju te se stoga za uzgoj koriste tekući i kruti mediji obogaćeni različitim nutrijentima. *Francisella* se najčešće uzgaja pri 37 °C na agaru s kvaščevim ekstraktom i aktivnim ugljenom (engl. Buffered Charcoal Yeast Extract Agar, BCYE agar), čokoladnom agaru i agaru koji sadrži hemoglobin (engl. Cysteine Heart Agar Base, CHAB). Na krvom agaru vrlo sporo raste, a moguće je vidjeti usku zonu alfa-hemolize. Osim na krutim podlogama, *Francisella* se uspješno razmnožava i u tekućim medijima, kao što je Schaedler i Muller-Hinton bujon. Podvrsta *F. tularensis* subsp. *holartica* je posebno zahtjevna za rast te se kultivira 48-72 sata pri 37 °C uz 5 % CO₂. *F. novicida*, *F. noatunensis* i *F. philomiragia* za rast zahtjevaju manje hranjivih dodataka zbog njihove prilagodbe na okolišne uvjete [2]. Te vrste uspješno rastu nakon inkubacije od 24-48 sati pri 37 °C.

1.2.2 Fiziologija bakterije i faktori virulencije

Francisella je gram negativna, oksidaza negativna i katalaza pozitivna. Ugljikohidrate razgrađuje do kiseline bez stvaranja plina. Razgrađuje dekstrozu, eskulin, manitol, levulozu i glicerol. Također proizvodi H₂S, ali bez stvaranja indola [33].

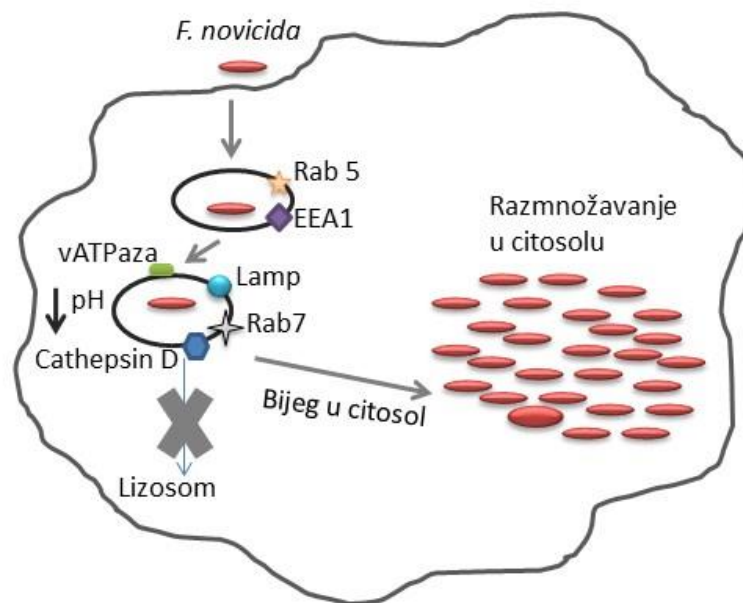
Faktori virulencije *F. tularensis* još uvijek nisu potpuno istraženi. Poznato je da patogeni sojevi posjeduju kapsulu koja pomaže u adherenciji i sprečava fagocitozu. Gubitkom kapsule bakteriji se smanjuje virulencija [39]. *F. tularensis* posjeduje endotoksin, slično kao i druge gram-negativne bakterije.

Otkriveno je da bakterija na svojoj površini posjeduje pile koji imaju veliku ulogu u adherenciji na stanicu domaćina, a važni su i za sekreciju različitih proteina u citosol stanice domaćina. Za razliku od drugih gram negativnih bakterija, lipopolisaharid bakterije *F. tularensis* ne dovodi do značajne aktivacije imunološkog odgovora [39]. Bakterijske vrste *F. novicida* i *F. tularensis* sadrže specifične modifikacije lipida A koje se ne vežu na molekule domaćina te ne izazvaju upalni odgovor [40]. Istraživanja su pokazala kako je za drugačiji imunološki odgovor kod domaćina odgovorna specifična struktura O antigena. Kod bakterije *F. novicida*, O antigen je odgovoran za rezistenciju bakterije na komponente seruma, a kod *F. tularensis* je nužan za njezin unutarstanični opstanak [41].

1.3 Patogenza bakterije

1.3.1 Unutarstanični život bakterije u makrofazima

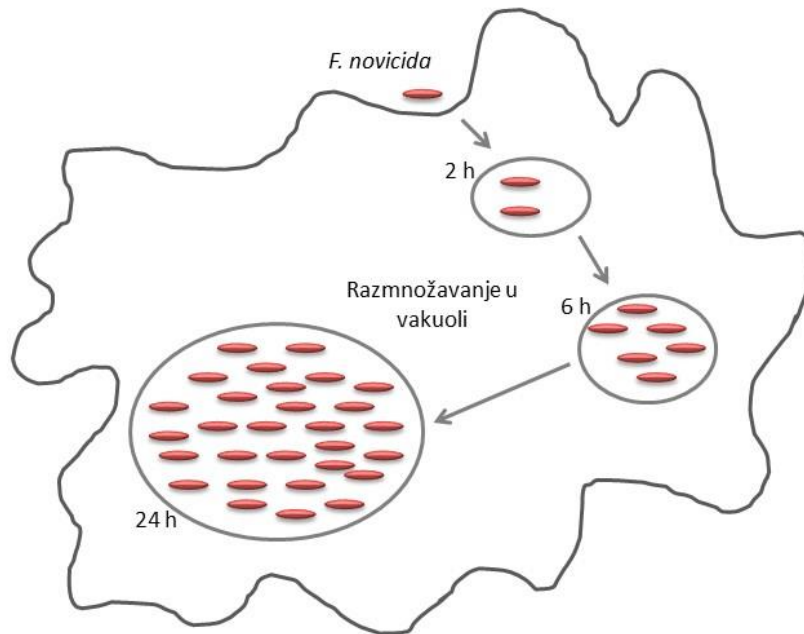
Francisella preživljava i razmnožava se unutar različitih stanica sisavaca, uključujući makrofage, stanice epitela pluća, dendritičke stanice, neutrofile, fibroblaste i hepatocite [13]. *F. tularensis* u stanice makrofaga ulazi pomoću fagocitoze vezujući se na različite površinske receptore. U ranom stadiju nakon fagocitoze bakterija se nalazi se u fagosomu (engl. *Francisella* Containg Phagosome, FCP), koji sazrijeva u rani endosom reguliran proteinom Rab 5 i endosomalnim markerom EEA1. Kasni endosom reguliran je endosomalnim biljezima LAMP-1, LAMP-2, Rab-7 i manoza-6-fosfat. Oko 30-60 minuta nakon infekcije slijedi zakiseljavanje fagosoma djelovanjem vATP-azne protonske pumpe. Nakon toga bakterija bježi u citosol gdje se razmnožava [34]. Nakon 24-48 sati bakterije su najvećim dijelom smještene unutar autofagične vakuole [14].



Slika 1. Unutarstanični život *F. novicida* u stanicama makrofaga. Izvor: Mateja Ozanic, Valentina Marecic, Yousef Abu Kwaik, Marina Santic. *The Divergent Intracellular Lifestyle of Francisella Tularensis in Evolutionarily Distinct Host Cells. Plos Pathogens* 2015. Prilagođeno na hrvatskom jeziku.

1.3.2 Unutarstanični život bakterije u amebama

Slobodno živeće amebe u pravilu se hrane različitim bakterijama, međutim *Francisella* je pokazala sposobnost razmnožavanja u nekoliko vrsta ameba kao što su *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella vermiformis* i *Dictyostelium discoideum* [10]. Unutar stanica ameba bakterija boravi i razmnožava se u vakuolama. Kod prijelazne, izvanstanične faze, bakterija izlazi iz stanica domaćina i ulazi u susjedne stanice ili inficira novog domaćina [15, 16]. Prilikom prelaska bakterije iz okoliša u organizam sisavaca, bakterija je izložena različitim okolišnim uvjetima, a posebno su izražene razlike u temperaturi. Bakterija se različitom ekspresijom gena uspješno prilagođava temperaturnim promjenama [15,16, 17].



Slika 2. Unutarstanični život *F. novicida* u stanicama amebe. Izvor: Mateja Ozanic, Valentina Marecic, Yousef Abu Kwaik, Marina Santic. *The Divergent Intracellular Lifestyle of Francisella Tularensis in Evolutionarily Distinct Host Cells. Plos Pathogens* 2015. Prilagođeno na hrvatskom jeziku.

1.4 Tularemija

Tularemija je zoonoza uzrokovana bakterijom *Francisella tularensis*. Bakterije roda *Francisella* prisutne su u zraku, vodi i tlu, a izolirane su iz 250 životinjskih vrsti, uključujući ribe, ptice, vodozemce, zečeve, vjeverice, voluharice, krpelje i muhe [5, 6]. Čovjek se može zaraziti izravnim kontaktom sa zaraženom životinjom, ugrizom člankonožaca, inhalacijom kontaminiranog aerosola, konzumacijom kontaminirane hrane ili vode. Klinička slika bolesti ovisi o načinu prijenosa i soju bakterije. U Europi i Aziji prisutna je podvrsta *F. tularensis* subsp. *holartica* (tip B), dok je u Sjevernoj Americi zastupljena virulentnija podvrsta, *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tip A). U središnjoj Aziji je prisutna podvrsta *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* [11].

Epidemije tularemije do kojih je došlo zbog konzumacije kontaminirane vode zabilježene su na području Švedske, Španjolske, Finske, Kosova te Turske [25-28].

S obzirom da simptomi tularemije nisu specifični, dijagnostika i liječenje ove bolesti su otežani su u zemljama u kojima se bolest rijetko javlja. Nakon ulaska u organizam čovjeka, *Francisella* se ubrzano razmnožava u stanicama limfnog tkiva. Period inkubacije najčešće traje 3-5 dana, međutim može trajati i do 20 dana. Bolest počinje nespecifičnim simptomima kao što su povišena tjelesna temperatura s glavoboljom, slabošću, tresavicom i umorom. S obzirom da *F. tularensis* posjeduje sposobnost razmnožavanja u raznim tkivima i organima domaćina, dovodi do narušavanja njihove normalne funkcije. Infekcije podvrstama *tularensis* i *holarctica* dovode do sličnih simptoma. Bakterija u organizam čovjeka ulazi na više mjesta i načina te se javljaju različiti oblici bolesti koje dijelimo na unutarnje i vanjske [12]. U vanjske oblike ubrajaju se: glandularni, ulceroglandularni, orofaringealni i okuloglandularni. Unutarnji oblici bolesti uključuju abdominalni, tifoidni i plućni. Ukoliko se plućni oblik ne liječi, smrt se javlja kod 30-60 % oboljelih. Infektivna doza kod respiratorne infekcije je vrlo niska te je dovoljno samo 10 bakterija kako bi se razvila bolest. Zbog visoke smrtnosti i niske infektivne doze, *F. tularensis* se koristila za razvoj biološkog oružja od strane SAD-a, Japana i bivšeg Sovjetskog Saveza [1]. U svijetu trenutno ne postoji licencirano cjepivo protiv tularemije, a antibiotici imaju ograničenu učinkovitost, s obzirom da se infekcija teško dijagnosticira [12].

Na području Republike Hrvatske najveći broj prijavljenih slučajeva tularemije je u sjevernom i središnjem dijelu zemlje, dok se bolest u ostatku zemlje javlja sporadično [32].

1.5 Utjecaj metala na rast *F. tularensis*

Velik broj istraživanja je pokazao kako razlike u koncentracijama različitih metalnih iona imaju velik utjecaj na rast, razmnožavanje i virulenciju bakterija prisutnih u vodenom okolišu [18]. Prethodna istraživanja pokazala su kako su željezo i mangan neophodni za rast i razmnožavanje bakterije *F. tularensis* [19]. Međutim, neki metali poput srebra, žive, bakra, talija i galija imaju nepovoljan utjecaj na razmnožavanje bakterija i stvaranje biofilma [20].

1.5.1 Željezo

Željezo je izuzetno važno za funkcioniranje ljudskog organizma, a pokazalo se kako je neophodno i za rast mnogih bakterija. Željezo je kofaktor različitih enzima koji sudjeluju u metaboličkim procesima bakterija, a niske koncentracije tog metala često dovode do smanjenja virulencije bakterija [22]. *Francisella* koristi različite transportne sustave kako bi osigurala dovoljne količine željeza za svoje metaboličke procese. Ukoliko u stanicama domaćina prevladavaju niske koncentracije željeza, *Francisella* započinje aktivaciju receptora koji sudjeluju u prijenosu željeznih iona, a regulirani su *Fur* genima [17]. Mutanta bakterije *F. tularensis* koja ne sadrži gene odgovorne za transport željeza nema sposobnost razmnožavanja u humanim makrofazima te ne dovodi do pojave bolesti [24].

1.5.2 Cink

Dosadašnja istraživanja su pokazala da je cink neophodan za razvoj prokariotskih i eukariotskih stanica. Cink je prisutan u svim organima, tkivima te tjelesnim tekućinama sisavaca,

međutim stanice čovjeka koriste različite mehanizme koji onemogućavaju potencijalnim patogenima iskorištavanje tog metala [21]. Cink se unutar stanica nalazi većinom u citosolu i jezgri te je vezan za membrane [19]. Amebe *Acanthamoeba castellanii* i *Dictyostelium discoideum* ubacuju ione cinka u fagosom kako bi brže razgradile fagocitirane bakterije. Istraživanja pokazuju da amebe održavaju niske koncentracije slobodnog unutarstaničnog cinka kako bi spriječile unutarstanično razmnožavanje bakterija [21].

Kod *F. tularensis* uloga cinka u preživljavanju i razmnožavanju je još uvijek neistražena. Pretpostavlja se kako je cink neophodan za adaptaciju *F. tularensis* na različite uvjete unutar vodenog okoliša. Smatra se da cink sudjeluje u procesu formiranja vakuole u stanicama amebe, unutar kojih se *F. tularensis* uspješno razmnožava [21]. *Francisella* unutar stanica sisavaca regulira prijenos cinka aktivacijom gena koji kodiraju različite transportne proteine [21]. Proteini ZupT i ZnuABC izbacuju višak cinka iz bakterijske stanice, dok protein Zur ubacuje cink u bakterijsku stanicu [21]. Mehanizmi iskorištavanja cinka u stanicama amebama su još uvijek neistraženi.

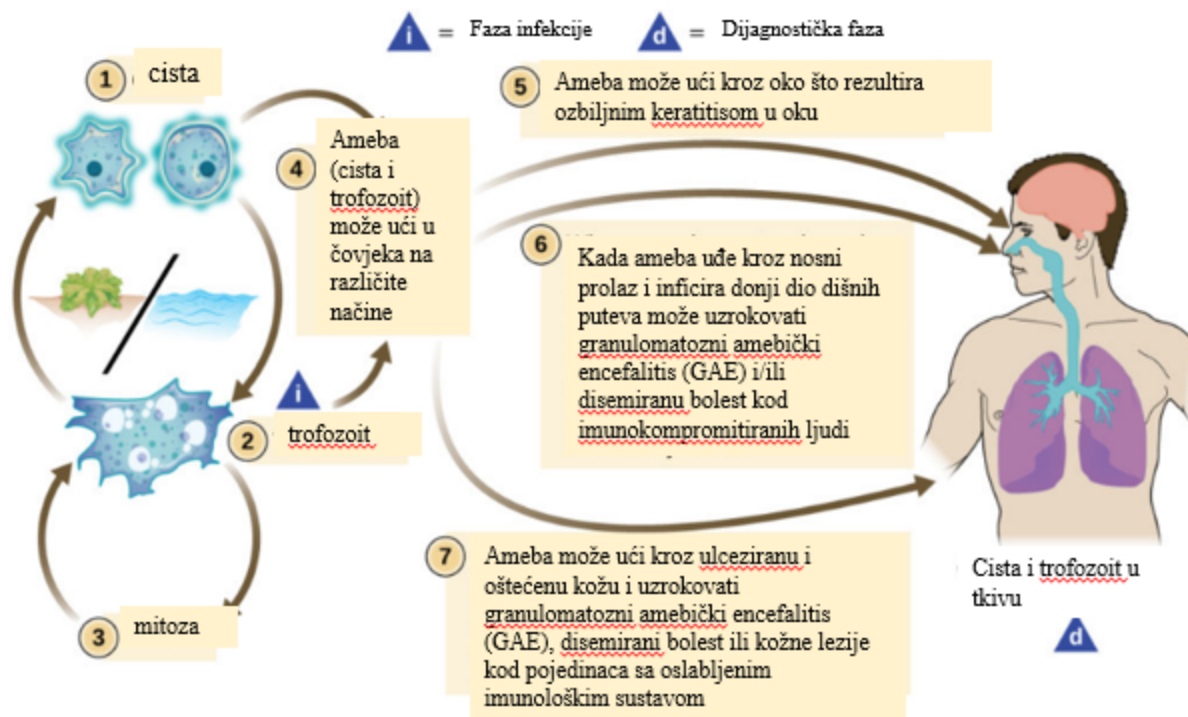
1.6 *Acanthamoeba castellanii*

Velik broj mikroorganizama prisutnih u vodi nema štetnog utjecaja na ljudsko zdravlje, međutim u vodi su prisutni i različiti patogeni, uključujući bakterije, viruse i protozoe. Zbog toga je mikrobiologija površinskih i izvorskih voda iznimno važna.

Acanthamoeba castellanii je slobodno-živeća ameba, široko rasprostranjena u okolišu gdje se ponaša kao oportunistički patogen [29]. Životni ciklus ove amebe sastoji se od dva stadija, ciste i tofozoita. U povoljnim uvjetima, *A. castellanii* se nalazi u stadiju trofozoita, a hrani se

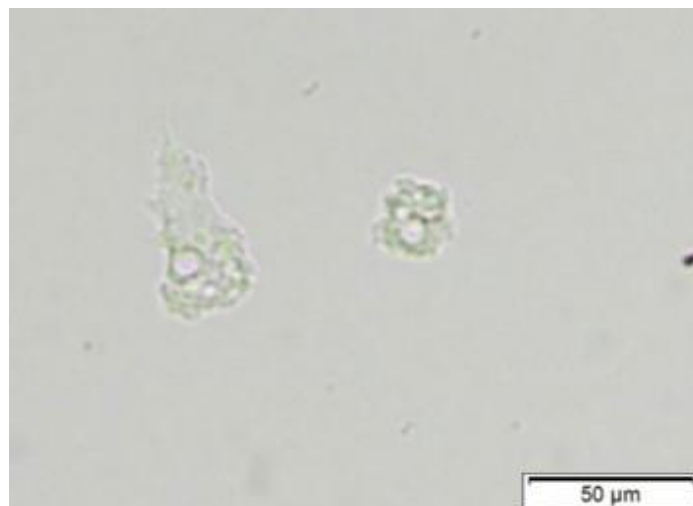
bakterijama, gljivama i algama. U nepovoljnim fiziološkim uvjetima formira se cista koja je otporna na štetne utjecaje iz okoliša i imunološki sustav domaćina. Prilikom infekcije u tijelu domaćina mogu se naći ciste i trofozoiti koji u organizam ulaze putem oštećene kože, nosa i oka. Ameba kod domaćina može izazvati niz bolesti kao što su keratitis i granulomatozni amebički encefalitis [30].

Slobodno-živeće amebe su važan predator u odnosu na bakterije i gljive. Međutim, neki mikroorganizmi su stekli otpornost na amebe te ih nazivamo “ameba otporni mikroorganizmi”. U tu skupinu ubrajaju se bakterije poput *Mycobacterium spp.*, *Coxiella burnetti*, *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila* i *Francisella tularensis* [31]. Navedene bakterije iskorištavaju stanicu amebe za razmnožavanje, zaštitu od štetnih utjecaja iz okoliša te kao vektor za širenje u prirodi [31]. Pretpostavka je da upravo amebe imaju važnu ulogu u prijenosu navedenih bakterija na čovjeka.



Slika 3. Životni ciklus *Acanthamoeba spp.* Izvor:

<https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/protozoan-and-helminthic-infections-of-the-skin-and-eyes/>



Slika 4. *A. castellanii* u formi trofozoita. Izvor: Katedra za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, doc. dr.sc. Mateja Ožanič



Slika 5. *A. castellanii* u formi ciste. Izvor: Katedra za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, doc. dr.sc. Mateja Ožanič

2. CLJ ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovog diplomskog rada bio je otkriti i opisati ulogu cinka u rastu i razmnožavanju bakterije *F. novicida* unutar vodenog okoliša te opisati važnost cinka u interakciji ove bakterije i amebe *A. castellanii*.

Specifični ciljevi:

1. Opisati ulogu iona cinka u izvanstaničnom razmnožavanju *F. novicida* u različitim vodama (sirova izvorska voda, površinske vode).
2. Razjasniti ulogu različitih koncentracija cink iona u preživljavanju i razmnožavanju *F. novicida* u vodama (redestilirana voda).
3. Objasniti ulogu cink iona u unutarstaničnom razmnožavanju *F. novicida* unutar *A. castellanii*.
4. Opisati važnost *zur* gena za razmnožavanje *F. novicida* u vodenom okolišu kao i za razmnožavanje ove bakterije unutar *A. castellanii*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Bakterije

Za izradu ovog diplomskog rada korišten je soj *F. novicida* U112 te izogena *zur* mutanta koja je dobivena ljubaznošću prof. Barbare Mann sa Sveučilišta Virginia; SAD. Bakterije su uzgajane na agaru s kvašćevim ekstraktom i aktivnim ugljenom.

3.2. Uzorci prirodnih voda

Uzorci prirodnih voda prikupljeni su na području Primorsko-goranske županije. Prikupljeni su uzorci sirove izvorske vode (Zvir I, Zvir II i Martinščica) te površinskih voda (rijeke Kupa i Kupic te jezero Bajer).

3.3. Mjerenje koncentracije cinka

Metodom masene spektrometrije (engl. Inductively coupled plasma mass spectrometry – ICP-MS) u uzorcima vode je određena koncentracija iona cinka. Kemijska analiza uzoraka vode provedena je na NZZJZ Primorsko-goranske županije.

3.4. Kinetika rasta bakterije *F. novicida* u uzorcima prirodnih voda

Bakterija *F. novicida* i njena *zur* mutanta inokulirane su u uzorke vode u koncentraciji od 10^6 CFU/ml. Uzorci vode inkubirani su na sobnoj temperaturi, a broj bakterija praćen je tijekom

10 dana. Broj bakterija određen je nasađivanjem deseterostrukih razrjeđenja suspenzije na agar s ugljenom i kvaščevim ekstraktom.

3.5. Kinetika rasta bakterije *F. novicida* u redestiliranoj vodi s dodatkom cinka u različitim koncentracijama

Za ovo istraživanje korištena je redestilirana voda s obzirom da inicijalno sadrži minimalne koncentracije metalnih iona. Pripremljene su vodene otopine različitih koncentracija cinka (0,1 μ M, 0,8 μ M, 0,1 mM, 0,5 mM, 1,0 mM). U pripremljene uzorke vode inokulirana je bakterija *F. novicida* i njena *zur* mutanta u koncentraciji od 10^6 CFU/ml, a uzorci su inkubirani 10 dana pri 26 °C. Kinetika rasta bakterija praćena je nasađivanjem deseterostrukih razrjeđenja suspenzije na BCYE agar te brojanjem poraslih kolonija. Broj bakterija se pratio tijekom 10 dana, u vremenskim periodima od 2, 4, 6, 8 i 10 dana. Redestilirana voda bez dodatka metala korištena je kao negativna kontrola.

3.6. Kinetika rasta bakterije *F. novicida* unutar *A. castellanii* u mediju sa različitim koncentracijama cinka

Unutarstanično razmnožavanje *F. novicida* je praćeno u amebi *A. castellanii*. Stanice su uzgajane u ATCC 30234 mediju sa dodatkom cinka u različitim koncentracijama (0,1 μ M, 0,8 μ M, 0,1 mM, 0,5 mM, 1,0 mM). Amebe su inficirane bakterijama u omjeru 1:10 (10 bakterija na jednu amebu) te centrifugirane 5 minuta pri 1500 okretaja i inkubirane 1 h pri 26 °C. Nakon toga,

izvanstanične bakterije su uklonjene tretmanom pranja pomoću fosfatnog pufera. Amebe su dalje inkubirane pri temperaturi od 26 °C, a rast unutarstaničnih bakterija je praćen u razdobljima od 2, 5, 24, 48 i 72 sata nakon infekcije. Nakon svakog navedenog vremenskog razdoblja membrana ameba je razorena deterdžentom Triton X 100. Broj unutarstaničnih bakterija je određen nasađivanjem deseterostrukih razrjeđenja na BCYE agar. Amebe inficirane bakterijama u mediju bez dodatka cinka koristile su se kao negativna kontrola.

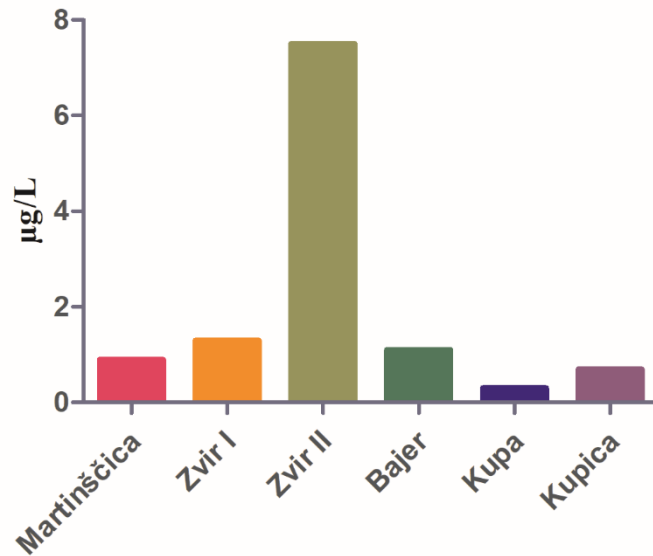
3.7. Statistička obrada podataka

Rezultati su obrađeni računalnim programom za obradu podataka STATISTICA 10. Provjerena je normalnost distribucije svih varijabli. Predviđene povezanosti te njihove statističke značajnosti utvrđene su određivanjem koeficijenta korelacije. Uzorci su analizirani parametrijskim Student t-testom. Povezanost brojčanih podataka utvrđena je računanjem Pearsonovog koeficijenta korelacije. Razinu od $P < 0,05$ smatrana je statistički značajnom i označena zvjezdicom *.

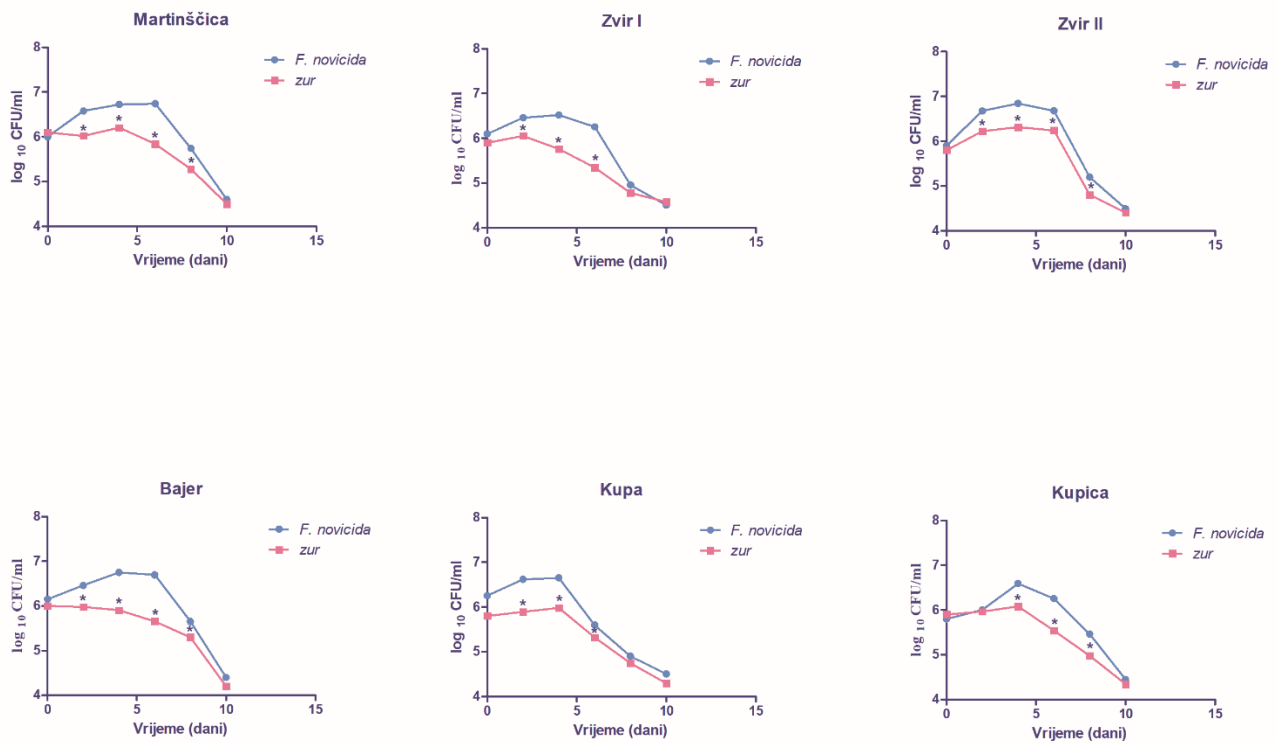
4. REZULTATI

4.1. Kinetika rasta bakterije *F. novicida* u uzorcima prirodnih voda

Kako bi se opisala uloga cinka u izvanstaničnom razmnožavanju bakterije *F. novicida*, sa područja Primorsko-goranske županije prikupljeni su uzorci izvorskih voda (Martinščica, Zvir I i Zvir II) te površinskih voda (Bajer, Kupa i Kupica). U prikupljenim uzorcima vode određena je inicijalna koncentracija cinka metodom atomske spektrofotometrije (slika 6). Nakon toga je u uzorke vode inokulirana bakterija *F. novicida* te njena *zur* mutanta. Broj bakterija u uzorcima vode praćen je tijekom 10 dana pri temperaturi od 26 °C, svakodnevnim nasađivanjem na BCYE agar. Rezultati su pokazali kako uzorak vode Zvir II sadrži značajno više koncentracije cinka u usporedbi sa ostalim uzorcima vode (slika 6). Zanimljivo, *F. novicida* je pokazala najbolju sposobnost razmnožavanja upravo u uzorku vode Zvir II (slika 7). Četvrti dan nakon inokulacije, broj bakterija *F. novicida* u navedenom uzorku iznosio je oko 1×10^7 CFU/ml. Nakon toga broj bakterija u uzorku vode je počeo opadati. U ostalim uzorcima vode broj *F. novicida* je bio nešto niži tijekom promatranog razdoblja. Nadalje, *zur* mutanta je pokazala značajno slabiju sposobnost razmnožavanja u odnosu na divlji soj bakterije *F. novicida*. Možemo zaključiti kako *F. novicida* koristi cink tijekom razmnožavanja u okolišnim vodama te kako je *zur* gen važan za rast ove bakterije (slika 6 i 7). Zvezdicom (*) je označena p vrijednost ($p < 0,05$) koja predstavlja statističku značajnu razliku između divljeg soja *F. novicida* i *zur* mutante. U uzorku Martinščica, Zvir II i Bajer statistički značajna razlika između *F. novicida* i *zur* mutante je uočena 2, 4, 6 i 8 dana nakon inokulacije. U uzorku Zvir I statistički značajna razlika između *F. novicida* i *zur* mutanta je uočena 2, 4 i 6 dana nakon inokulacije. U uzorku Kupa statistički značajna razlika između *F. novicida* i *zur* mutanta je uočena 2 i 4 dana nakon inokulacije, dok je u uzorku Kupica statistički značajna razlika između *F. novicida* i *zur* mutanta uočena 4, 6 i 8 dana nakon inokulacije.



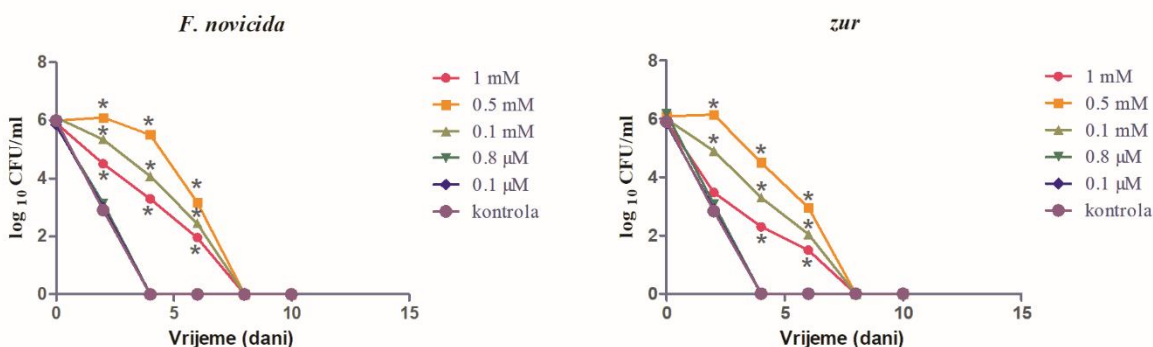
Slika 6. Koncentracija cinka u uzorcima prirodnih voda.



Slika 7. Kinetika rasta bakterije *F. novicida* i *zur* mutante u prirodnim vodama.

4.2 Kinetika rasta bakterije *F. novicida* u redestiliranoj vodi s dodatkom cinka u različitim koncentracijama

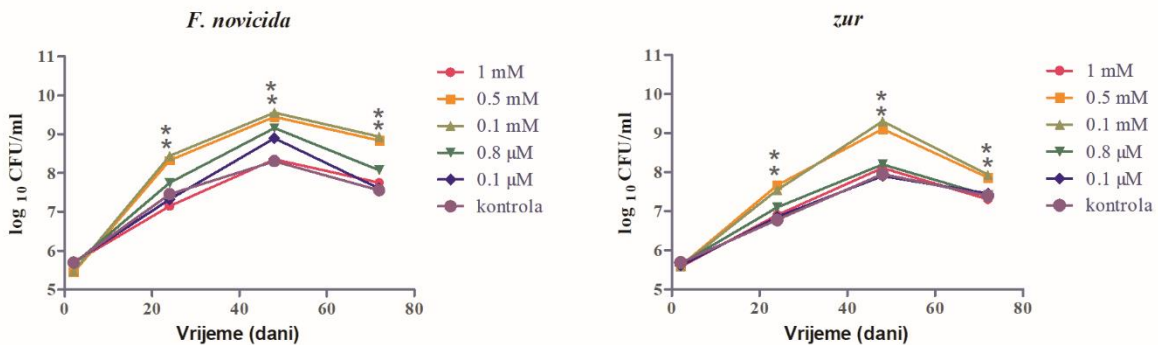
U redestiliranu vodu dodane su različite koncentracije iona cinka (1 mM, 0,5 mM, 0,1 mM, 0,8 μ M i 0,1 μ M), kako bi se pratio utjecaj tog metala na preživljavanje i razmnožavanje *F. novicida*. Bakterije su se najbolje razmnožavale u uzorcima u kojima su dodane srednje koncentracije cinka (0,5 mM, 0,1mM) (slika 8). Za razliku od toga, bakterije su se statistički značajno slabije razmnožavale u vodi sa izrazito niskim i izrazito visokim koncentracijama tog metala (slika 8). Možemo zaključiti kako je cink potreban za rast i razmnožavanje *F. novicida* u vodi, međutim previsoke koncentracije tog metala imaju štetan utjecaj na bakteriju. Redestilirana voda bez dodatka metala korištena je kao kontrola, $p < 0,05$ smatrano je statistički značajno i označeno zvjezdicom*.



Slika 8. Utjecaj različitih koncentracija cinka na rast bakterije *F. novicida* u redestiliranoj vodi.

4.3 Kinetika rasta bakterije *F. novicida* unutar *A. castellanii* u mediju sa različitim koncentracijama cinka

Uloga cinka je ispitana kod unutarstaničnog preživljavanja i razmnožavanja *F. novicida* unutar stanica ameba *A. castellanii*. Amebe su inkubirane u mediju s dodatkom cinka u različitim koncentracijama (1 mM, 0,5 mM, 0,1 mM, 0,8 μ M i 0,1 μ M) te pri temperaturi od 26 °C. Divlji soj bakterije *F. novicida* kao i *zur* mutanta pokazuju značajno najviši unutarstanični porast prilikom inkubacije u mediju sa 0,5 mM i 0,1 mM koncentracijom cinka (slika 9). Pri navedenim koncentracijama, u promatranom periodu od 48 sati nakon infekcije, broj *F. novicida* dostigao je 5×10^9 CFU/ml a *zur* mutanta 2×10^9 CFU/ml. Pri koncentracijama cinka od 1 mM, 0,8 μ M i 0,1 μ M bakterije pokazuju znatno slabiji porast (slika 9). Nadalje, *zur* mutanta je pokazala nešto slabiju sposobnost unutarstaničnog razmnožavanja u usporedbi sa divljim sojem bakterije *F. novicida* (slika 9). Kao kontrola korišten je medij bez dodatka cinka. $P < 0,05$ smatrano je statistički značajno i označeno zvjezdicom *.



Slika 9. Utjecaj različitih koncentracija cinka na rast bakterije *F. novicida* u *A. castellanii*.

5. RASPRAVA

Istraživanja su dokazala da *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tip A), *F. tularensis* subsp. *holarctica* (tip B), te *F. novicida* uspješno preživljavaju u bočatoj vodi uz odgovarajuću temperaturu [45]. Okolišni faktori imaju veliki utjecaj na rast i preživljavanje bakterija, a dijele se na biotičke i abiotičke. Abiotički faktori su: hranjive tvari, voda, temperatura, pH, UV zračenje, dok su biotički faktori: sposobnost pribavljanja hrane, prisutnost drugih mikroba te stvaranje biofilma u okolišu [46]. U dosadašnjim istraživanjima je utvrđeno da se *F. novicida* ne razmnožava u morskoj vodi, ali preživljava tijekom razdoblja od 10 dana. U ovom istraživanju najveći broj bakterija je zabilježen u izvorskoj vodi 4 dana nakon inokulacije, dok u kasnijim periodima broj bakterija u uzorcima vode opada. Prateći kinetiku rasta, naši rezultati dokazuju da se *F. novicida* najbolje razmnožava u uzorku Zvir II (izvorska voda) koja inicijalno sadrži najvišu koncentraciju cinka [47].

Različiti metalni ioni imaju veliki utjecaj na rast i razmnožavanje bakterija u vodi. Neki od njih, poput cinka i željeza direktno sudjeluju u proizvodnji energije i umnožavanju DNA [19]. Svojim prisustvom ili odsustvom metali mogu utjecati na ishod patogeneze različitih bakterija. Nakon fagocitoze, unutarstanične bakterije se u makrofagima nalaze unutar membranama obavijenih fagosoma. Ukoliko unutarstanične bakterije ne posjeduju unutarstanični mehanizam preživljavanja, fagosomi se počinju spajati sa lizosomom, te započinje njihova razgradnja. Iz tog razloga većina unutarstaničnih bakterija treba hranjive tvari poput željeza, kako bi mogle rasti i razmnožavati se unutar stanica domaćina [50]. Nadalje, u jednom američkom istraživanju znanstvenici su povezali razine željeza s virulencijom bakterije *F. tularensis* LVS i ustanovili da je bakterija virulentnija pri višim koncentracijama željeza, dok je pokazala znatno slabiju virulenciju pri nižim koncentracijama tog metala [51].

Prijašnja istraživanja pokazuju kako koncentracija cinka također ima veliku ulogu u rastu i razmnožavanju bakterija, posebno onih koje imaju sposobnost unutarstaničnog razmnožavanja [49]. Stanice domaćina često posjeduju različite mehanizme kojima ograničavaju dostupnost cinka za bakterije. Međutim, visoke koncentracije cinka ne pogoduju bakterijama koje se nalaze inkapsulirane u fagosomima unutar makrofaga [49]. U ovom istraživanju *F. novicida* se nije razmnožavala u uzorcima bez dodatka cinka, što pokazuje kako je taj metal esencijalan za rast i razmnožavanje ove bakterije. Također, rezultati ovog diplomskog rada su pokazali da previsoke koncentracije cinka imaju štetan utjecaj na rast bakterije *F. novicida* u okolišnim vodama kao i unutarstanično u *A. castellanii*. U skladu sa istraživanjima provedenim sa drugim metalima, možemo zaključiti kako cink pogoduje rastu bakterija *Francisella*, međutim previsoke koncentracije tog metala djeluju toksično.

Nadalje, kod transporta cinka važnu ulogu ima transportni Zur protein. Američki znanstvenici su proveli istraživanje kako bi identificirali mehanizam unosa cinka kod bakterije *F. novicida*. Proveli su transkriptno sekvencioniranje divljeg tipa i *zur* mutante. Utvrđeno je da su samo tri gena odgovorna za transport cinka. Istraživana je i važnost cinka kod sojeva *Salmonella enterica* kod koje su uklonili *ZnuA* gen, te su na taj način smanjili sposobnost razmnožavanja u mediju koji ne sadrži cink. U skladu s ovim fenotipom, *ZnuA* protein se akumulira u bakterijama koje se uzgajaju u mediju koji ne sadrži cink. Ustanovljeno je da *ZnuA* mutanta ima manju sposobnost razmnožavanja u epitelnim stanicama i fagocitima. Također je uočeno da *Salmonella* koristi *znuABC* gen kako bi omogućila dostupnost cinka [52]. Slično tome, u ovom istraživanju ispitana je važnost *zur* gena koji kodira Zur transportni protein bakterije *F. novicida*, odgovoran za transport cinka iz okoliša. U usporedbi sa divljim sojem bakterije *F. novicida*, ispitali smo sposobnost razmnožavanja *zur* mutante u okolišnim vodama kao i unutarstanično u *A. castellanii*.

Zur mutanta je pokazala statistički značajno slabiju sposobnost razmnožavanja u prirodnim vodama i u *A. castellanii*, što ukazuje na izuzetnu važnost ovog gena za rast i razmnožavanje bakterije *F. novicida*.

U skladu sa istraživanjima provedenim sa drugim metalima, rezultati ovog rada pokazuju kako su metalni ioni neophodni, ali i potencijalno toksični za unutarstanične patogene. Samim time, koncentracija različitih metalnih iona bitna je za rast i razmnožavanje unutarstaničnih patogena. Međutim, neke bakterije, poput *Francisella*, prilagodile su se različitim okolišnim i unutarstaničnim uvjetima na način da su razvile mehanizme kojima razinu metala u svom mikrookolišu održavaju unutar za njih prihvatljivih koncentracija.

6. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti slijedeće:

1. Cink je neophodan za razmnožavanje bakterije *F. novicida* unutar vodenog okoliša.
2. Cink je neophodan za unutarstanično razmnožavanje bakterije *F. novicida* u *A. castellanii*.
3. Previsoke koncentracije cinka inhibiraju preživljavanje *F. novicida* u vodama i u *A. castellanii*.
4. *Zur* gen ima važnu ulogu u preživljavanju i razmnožavanju bakterije *F. novicida* u okolišu i u *A. castellanii*.

7. LITERATURA

- [1] Birdsell DN, Stewart T, Vogler AJ, Lawaczeck E, Diggs A, Sylvester TL, et al. *Francisella tularensis* subsp. *novicida* isolated from a human in Arizona. *BMC Res Notes*. 2009
- [2] Kelava I, Marecic V, Fucak P, Ivek E, Kolaric D, Ozanic M, Mihelcic M, Santic M. Optimisation of External Factors for the Growth of *Francisella novicida* within *Dictyostelium discoideum*. *BioMed Research International*. 2020
- [3] Sullivan JT, Jeffery EF, Shannon JD, Ramakrishnan G. Characterization of the siderophore of *Francisella tularensis* and role of *fslA* in siderophore production. *J Bacteriol*. 2006
- [4] Colquhoun DJ, Larsson P, Duodu S, Forsman M. The Family Francisellaceae. *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2014
- [5] Centers for Disease C, Prevention. Tularemia--Oklahoma, 2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2001
- [6] Staples JE, Kubota KA, Chalcraft LG, Mead PS, Petersen JM. Epidemiologic and molecular analysis of human tularemia, United States, 1964-2004. *Emerg Infect Dis*. 2006
- [7] Abd H, Johansson T, Golovliov I, Sandstrom G, Forsman M. Survival, and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol*. 2003
- [8] Mahajan UV, Gravgaard J, Turnbull M, Jacobs DB, McNealy TL. Larval exposure to *Francisella tularensis* LVS affects fitness of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *FEMS Microbiol Ecol*. 2011
- [9] Forsman M, Henningson EW, Larsson E, Johansson T, Sandstrom G. *Francisella tularensis* does not manifest virulence in viable but non-culturable state. *FEMS Microbiol Ecol*. 2000

- [10] Santic M, Ozanic M, Semic V, Pavokovic G, Mrvcic V, Kwaik YA. Intra-Vacuolar Proliferation of *F. Novicida* within *H. Vermiformis*. *Front Microbiol*. 2011
- [11] Maraha B, Hajer G, Sjödin A, Forsman M, Paauw A, Roeselers G, Verspui E, Frenay I, Notermans D, de Vries M, Reubsaet F. Indigenous Infection with *Francisella tularensis holartica* in the Netherlands. *PubMed Central* 2013
- [12] Newstead SL, Gates AJ, Hartley MG, Rowland CA, Williamson ED, Lukaszewski RA. Control of Intracellular *Francisella tularensis* by Different Cell Types and the Role Of Nitric Oxide. *PubMed Central*. 2014
- [13] Bachert BA, Biryukov SS, Chua J, Rodriguez SA, Toothman Jr. RG, Cote CK, Klimko CP, Hunter M, Shoe JL, Williams JA, Kuehl KA, Biot FV, Bozue JA. A *Francisella novicida* Mutant, Lacking the Soluble Lytic Transglycosylase *Slt*, Exhibits Defects in Both Growth and Virulence. *PubMed Central*. 2019
- [14] Chong A, Celli J. The *Francisella* intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. *Front Microbiol*. 2010
- [15] Fuller JR, Kijek TM, Taft-Benz S, Kawula TH. Environmental and intracellular regulation of *Francisella tularensis ripA*. *BMC Microbiol*. 2009
- [16] Hazlett KR, Cirillo KA. Environmental adaptation of *Francisella tularensis*. *Microbes Infect*. 2009
- [17] Moreau GB, Qin A, Mann BJ. Zinc Acquisition Mechanisms Differ between Environmental and Virulent *Francisella* Species. *J Bacteriol*. 2018

- [18] Manske C, Hilbi H. Metabolism of the vacuolar pathogen *Legionella* and implications for virulence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014
- [19] Ma L, Terwilliger A, Maresso AW. Iron and zinc exploitation during bacterial pathogenesis. *Metallomics.* 2015
- [20] Valappil SP, Higham SM. Antibacterial effect of gallium and silver on *Pseudomonas aeruginosa* treated with gallium-silver-phosphate-based glasses. *Biomed Mater Engl.* 2014
- [21] Ribeiro NS, Dos Santos FM, Garcia AWA, Ferrareze PAG, Fabres LF, Schrank A, et al. Modulation of Zinc Homeostasis in *Acanthamoeba castellanii* as a Possible Antifungal Strategy against *Cryptococcus gattii*. *Front Microbiol.* 2017
- [22] James BW, Mauchline WS, Fitzgeorge RB, Dennis PJ, Keevil CW. Influence of iron-limited continuous culture on physiology and virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.* 1995
- [23] Borella P, Montagna MT, Romano-Spica V, Stampi S, Stancanelli G, Triassi M, et al. *Legionella* infection risk from domestic hot water. *Emerg Infect Dis.* 2004
- [24] Meibom KL, Charbit A. *Francisella tularensis* metabolism and its relation to virulence. *Front Microbiol.* 2010
- [25] de Carvalho IL, Escudero R, Garcia-Amil C, Falcao H, Anda P, Nuncio MS. *Francisella tularensis*, Portugal. *Emerg Infect Dis.* 2007
- [26] Eliasson H, Lindback J, Nuorti JP, Arneborn M, Giesecke J, Tegnell A. The 2000 tularemia outbreak: a case-control study of risk factors in disease-endemic and emergent areas, Sweden. *Emerg Infect Dis.* 2002
- [27] Gurcan S. Epidemiology of tularemia. *Balkan Med J.* 2014

- [28] Meric M, Sayan M, Dundar D, Willke A. Tularaemia outbreaks in Sakarya, Turkey: case-control and environmental studies. Singapore Med J. 2010
- [29] Lazuana T, Astuty H, Sari IP. Effect of Cellulase Enzyme Treatment on Cyst Wall Degradation of *Acanthamoeba* sp. PubMed Central 2019
- [30] Cabral FM, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. Agents of Disease in Humans. Clinical Microbiology Reviews. 2003
- [31] Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. Clin Microbiol Rev. 2004
- [32] Golubić Dragutin, Habrun Boris. Tularemija u Republici Hrvatskoj od 1997.-2004.godine / Suvremeno liječenje infektivnih bolesti Knjiga sažetaka Osijek, Hrvatska. 2005.
- [33] Lalošević V. Mikrobiologija za studente veterinarske medicine. Novi Sad, Poljoprivredni fakultet. 2011
- [34] Ozanic M, Marecic V, Abu Kwaik Y, Santic M. The Divergent Intracellular Lifestyle of *Francisella tularensis* in Evolutionarily Distinct Host Cells. PLoS Pathog. 2015
- [35] Sjöstedt, A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. New York Academy of Sciences. 2007
- [36] Willke A, Meric M, Grunow R, Sayan M, Finke EJ, Splettstosser W, et al. An outbreak of oropharyngeal tularaemia linked to natural spring water. Journal of medical microbiology. 2009
- [37] Green M, Choules G, Rogers D, Titball RW. Efficacy of the live attenuated *Francisella tularensis* vaccine (LVS) in a murine model of disease. Vaccine. 2005

- [38] Eigelsbach HT, Downs CM. Prophylactic effectiveness of live and killed tularemia vaccines. I. Production of vaccine and evaluation in the white mouse and guinea pig. J w. 1961
- [39] Clemens, D. L., Lee, B. Y. & Horwitz, M. A. Francisella tularensis enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. Infect Immun. 2005
- [40] Melillo A, Sledjeski DD, Lipski S, Wooten RM, Basrur V, Lafontaine ER. Identification of a Francisella tularensis LVS outer membrane protein that confers adherence to A549 human lung cells. FEMS microbiology letters. 2006
- [41] Barel M, Hovanessian AG, Meibom K, Briand JP, Dupuis M, Charbit A. A novel receptor - ligand pathway for entry of Francisella tularensis in monocyte-like THP-1 cells: interaction between surface nucleolin and bacterial elongation factor Tu. BMC microbiology. 2008
- [42] Svensson, K., Larsson, P., and Johansson, D. Evolution of Subspecies of Francisella tularensis. J. Bacteriol. 2005
- [43] Staples, J. E. Epidemiologic and molecular analysis of human tularemia, United States, Emerg. Infect. Dis. 2006
- [44] Ožanič M, Marečić V, Gobin I, Šantić M. Intracellular life of *Francisella* and *Legionella* within amoebae cells. Medicina fluminensis. 2016
- [45] Berrada, Z., L., Telford, S., R. Survival of Francisella tularensis Type A in Brackish water. Arch. Microbial. 2011
- [46] Hur, HG. et.al. Environmental Escherichia coli: ecology and public health implicationsa review. 2017

- [47] Semic V, Brezovec M, Lazaric I, Santic M. Ekologija, domaćini i vektori bakterije *Francisella tularensis*. Medicina. 2009
- [48] Moreau GB, Qin A, Mann BJ. Zinc Acquisition Mechanisms Differ between Environmental and Virulent *Francisella* Species. Journal of Bacteriology. 2017
- [49] Mikhaylina A, Ksibe AZ, Scanion DJ, Blindauer CA. Bacterial zinc uptake regulator proteins and their regulans. PubMed. 2018
- [50] Sicairos NI, Reyes-Cortes R, Guadrón-Llanos AM, Madueña-Molina J, Leon-Sicairos C, Canizalez-Román A. Strategies of Intracellular Pathogens for Obtaining Iron from the Environment. BioMed Research International. 2015
- [51] Fletcher JR, Crone DD, Wehrly TD, Martens CA, Basio CM, Jones BD. The Ability to Acquire Iron is Inversely Related to Virulence and the Protective Efficacy of *Francisella tularensis* Live Vaccine strain. Front Microbiol. 2018
- [52] Ammendola S, Pasquali P, Pistoia C, Petrucci P, Petrarca P, Rotilio G, Battistoni A. High-Affinity Zn²⁺ Uptake System ZnuABC Is Required for Bacterial Zinc Homeostasis in Intracellular Environments and Contributes to the Virulence of *Salmonella enterica*. American Society for Microbiology. 2007

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 09. travnja 1996. godine u Rijeci. Državljanica sam Republike Hrvatske. Osnovnu školu „Trsat“ završila sam 2011. godine. Iste godine upisala sam „Salezijansku klasičnu gimnaziju s pravom javnosti“ koju sam završila 2015. godine. Iste godine upisala sam Prediplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Godine 2018. upisala sam diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu. Godine 2019. sudjelovala sam na kongresu zaštite zdravlja-Sanitas i Kongresu okolišnog zdravlja kao pasivni sudionik, a iste godine sudjelovala sam i na projektu „Čiste ručice“. Aktivno sam sudjelovala na trećem kongresu zaštite zdravlja „Sanitas“ koji se održao 2020. godine