

# KARAKTERIZACIJA PATOGENIH IZOLATA ENTROCOCCUS FAECIUM

---

Živković, Nensi

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:370691>

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

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



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Nensi Živković

**KARAKTERIZACIJA PATOGENIH IZOLATA *ENTEROCOCCUS FAECIUM***

Diplomski rad

Rijeka, 2017.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Nensi Živković

**KARAKTERIZACIJA PATOGENIH IZOLATA *ENTEROCOCCUS FAECIUM***

Diplomski rad

Rijeka, 2017.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin, dipl.sanit.ing.

Diplomski rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad ima \_\_ stranica, \_\_ slika, \_\_ tablice, \_\_ literaturnih navoda.

Najljepša hvala mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Gobin, dipl. san. ing. na stručnim savjetima te strpljenju i pomoći prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem obitelji, prijateljima te kolegama i kolegicama koji su svojim savjetima, razumijevanjem, strpljenjem i podrškom pridonijeli izradi ovog diplomskog rada.

## SAŽETAK

*Enterococcus faecium* gram je pozitivan kok koji se sve češće javlja kao uzročnik urinarnih infekcija u bolničkim sredinama. Njegova virulencija danas predstavlja sve veći problem posebno kad se radi o iz vankomicin rezistentnim sojevima. Cilj ovog rada bio je ispitati osjetljivost pojedinih izolata *E. faecium* na antibiotike te okarakterizirati i prikazati čimbenike virulencije.

Različitim metodama ispitane su karakteristike patogenih izolata: osjetljivost na antibiotike, proteaza, lipaza, želatinaza, katalaza, hidroliza eskulina, pokretljivost, izvanstanična sluz i biofilm, hemoliza, agregacija te rezistencija na lizozim. Dokazano je da kod svih 20 ispitivanih izolata postoji rezistencija na ampicilin i norfloksacin. Proteaza je pristuna u samo jednom ispitivanom izolatu, dok lipazu posjeduje u 75% izolata. Negativan rezultat bilježi se na želatinazu, katalazu, hemolizin ( $\gamma$ -hemoliza) i pokretljivost kod svih izolata. Žuč eskulin su pozitivni te kod produkcije izvanstanične sluzi postoje razlike koje posljedično znače da postoje razlike i u formiranju biofilma. Dokazan je visok postotak agregacije >78% te rezistencije na lizozim, gdje se u najvećem dijelu radi o vankomicin rezistentnim sojevima *E. faecium*.

Zaključno, ispitivani izolati *E. faecium* pokazuju prisutnost nekih od značajnih čimbenika virulencije u kojima je najbitnije istaknuto produciranje izvanstanične sluzi te produkcija biofilma.

**Ključne riječi:** *Enterococcus faecium*, karakterizacija patogenih izolata, čimbenici virulencije, bakterijski enzimi

## SUMMARY

*Enterococcus faecium* is Gram - positive cocci that is increasingly occurring as a cause of urinary infections in hospital area. Today, its virulence presents an increasing problem especially when it comes to vancomycin resistant strains. The aim of this study was to investigate the sensitivity of certain *E. faecium* isolates to antibiotics and characterize and present factors of virulence.

Different methods were used to investigate the characteristics of pathogenic isolates: sensitivity to antibiotics, proteinase, lipase, gelatinase production, catalase, esculin hydrolysis, mobility, slime production and biofilm, haemolysis, aggregation and lysozyme resistance. It has been shown that there is resistance to ampicilin and norfloxacin in all 20 investigated isolates. Proteinases production is only shown in one tested isolate, while lipase has 75% of isolates. Negative results show galetinase, catalase, haemolysin ( $\gamma$ -haemolysis) and mobility in all isolates. Bile esculin are postive and in the slime production there are differences that consequently mean the formation of biofilms. A high percentage of aggregation >78% and lysozyme resistance was demonstrated, with most of vancomycin resistant strains *E. faecium*.

Conclusively, pathogenic isolates *E. faecium* demonstrated the presence of some of the most virulence factors in which the most important is the slime production and production of biofilm. Sesity to antibiotics is most significant in ampicillin and norfloxacin.

**Keywords:** *Enterococcus faecium*, characterization of pathogenic isolates, virulence factors, bacterial enzymes.

# Sadržaj

<b>1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>1</b>
1.1 Opće karakteristike bakterije Enterococcus .....	1
1.2 Fiziologija i habitat .....	2
1.3 Patogeneza i imunost .....	2
1.3.1 Čimbenici virulencije .....	3
1.4 Klinička slika .....	5
1.5 Laboratorijska dijagnostika enterokoka.....	6
1.6 Antimikrobna rezistencija i liječenje .....	8
1.6.1 Intrinzična rezistencija .....	8
1.6.2 Rezistencija na aminoglikozide.....	9
1.6.3 Rezistencija na vankomicin.....	9
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>12</b>
3.1 Materijali .....	12
3.1.1 Pribor i uređaji.....	12
3.1.2 Hranjive podloge i mediji.....	13
3.1.3 Bakterijski soj.....	14
3.2 Metode ispitivanja čimbenika virulencije.....	16
3.2.1 Osjetljivost na antibiotike.....	16
3.2.2 Određivanje proteaze.....	17
3.2.3 Određivanje lipaze.....	18
3.2.4 Određivanje enzima želatinaze.....	19
3.2.5 Određivanje katalaze .....	19
3.2.6 Određivanje hidrolize eskulina.....	20
3.2.7 Određivanje pokretljivosti .....	21
3.2.8 Dokazivanje produkcije izvanstanične sluzi .....	21
3.2.9 Određivanje hemolitičke aktivnosti.....	22
3.2.10 Agregacijski test .....	23
3.2.11 Rezistencija na lizozim.....	24
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>25</b>
4.1 Rezultati osjetljivosti na antibiotike .....	25
4.2 Rezultati određivanja pojedinih enzima .....	27

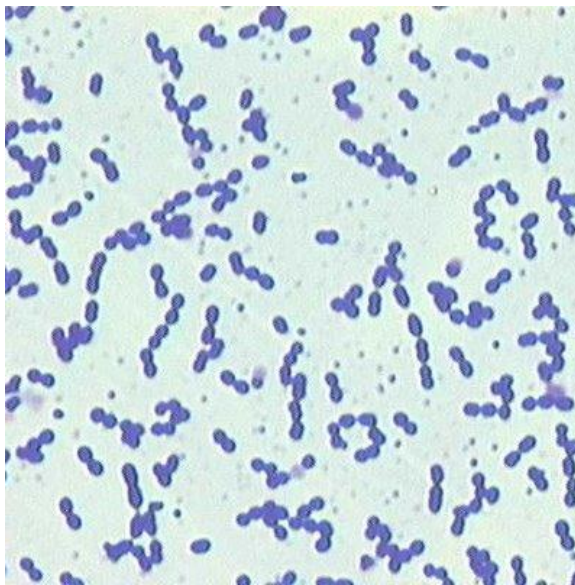


4.3	Određivanje hidrolize eskulina.....	29
4.4	Određivanje pokretljivosti .....	29
4.5	Određivanje produkcije izvanstanične sluzi i biofilma .....	29
4.6	Određivanje hemolize.....	31
4.7	Određivanje agregacije .....	31
4.8	Određivanje lizozima.....	33
4.8.1	Rezultati disk-difuzije metode.....	34
4.8.2	Rezultati agar dilucijske metode .....	34
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>36</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>40</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>41</b>
<b>8.</b>	<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>44</b>

# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

## 1.1 Opće karakteristike bakterije *Enterococcus*

Rod *Enterococcus species*, pripadnik porodice *Enterococcaceae* je gram-pozitivan, na katalazu negativan kok koji se javlja u paru ili kratkom lancu (Slika 1.). Stanice enterokoka uglavnom imaju oblik ovalnih, izduženih koka (1).



**Slika 1.** *Enterococcus faecium*, mikroskopski prikaz bojanja po Gramu

Prethodno (sve do 1984. godine) je bio klasificiran u rod streptokoka, a najčešće vrste dijele neke iste karakteristike. Razlikuje se od spomenutog po tome što većina enterokoka posjeduje antigen grupe D, po Lancefieldovoj. Također, različitost je vidljiva i u DNK i 16S-rRNK te po većoj otpornosti na kemijske i fizikalne utjecaje okoline: termorazistetan je što znači da preživljava pri temperature od 56°C 30 minuta i raste u bujonu koncentracije 6,5% NaCl (1, 2).

*Entereococcus* se vodio kao nepatogena bakterija sve do 1899. kad je prepoznat kao uzročnik bakterijskog endokarditisa. Tijekom proteklog desetljeća, došlo je do globalnog

porasta pojave enterokoknih infekcija. Iako je opisano više od 28 enterokokalnih vrsta, manje od jedne trećine povezano je s infekcijom kod ljudi pa su tako *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* najčešće izolirani što se može objasniti njihovom povećanom virulencijom (3). Veća zastupljenost oboljenja se bilježi u bolničkim sredinama, dok nije isključiva ni vanbolnička sredina, međutim, dovodi se u problem sve veća rezistencija na postojeće antibiotike (1). Već genetski predodređeno su otporni na djelovanje klindamicina i cefalosporina (4).

## **1.2 Fiziologija i habitat**

Sposobnost za rast i preživljavanje u nepovoljnim uvjetima doveli su do široke rasprostranjenosti enterokoka u prirodi. Može ih se pronaći u vodi, tlu, biljkama, hrani i životinjama. Enterokoki dio su normalne flore crijevnog sustava gdje se smatraju najbrojnijim kad se govori o gram-pozitivnim kokima. Upravo probavni sustav je rezervoar iz kojeg dospijevaju u različite organske sustave gdje je među primarnim urogenitalni sustav zbog kratkog puta mogućeg prijelaza. Najčešće se izoliraju *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. durans* i *E. gallinaum*. Rjeđa pojava zabilježena je u sluznici usta, ždrijela, na koži te u spolnom sustavu žene (1).

## **1.3 Patogeneza i imunost**

Enterokoki nisu visoko virulentni mikroorganizmi, odnosno ne izazivaju brz razvoj oboljenja. U infekcijama mekih tkiva nađeni su u mješovitoj flori s drugim intestinalnim mikroorganizmima. Iako patogeneza infekcija uzrokovanim enterokokom nije do kraja razjašnjena, postoje neki od potencijalnih čimbenika virulencije. U posljednje vrijeme, posebna

pažnja se pridaje stvaranju biofila kojeg se izdvaja kao najvažnijeg čimbenika virulencije. Time se posebno ističe važnost enterokoka u urinarnim infekcijama, a također nisu zanemarive ni infekcije povezane s prisutnošću ili ugradnjom umjetnog materijala, u infekcijama endokarda te endodonciji. Iako, dovodi se u pitanje značajnost istog kad se istodobno u uzorku kod bolesnika s peritonitisom, zdjeličnim ili intraabdominalnim infekcijama, nađu mnogo virulentniji uzročnici (npr. enterobakterije) (1).

### 1.3.1 Čimbenici virulencije

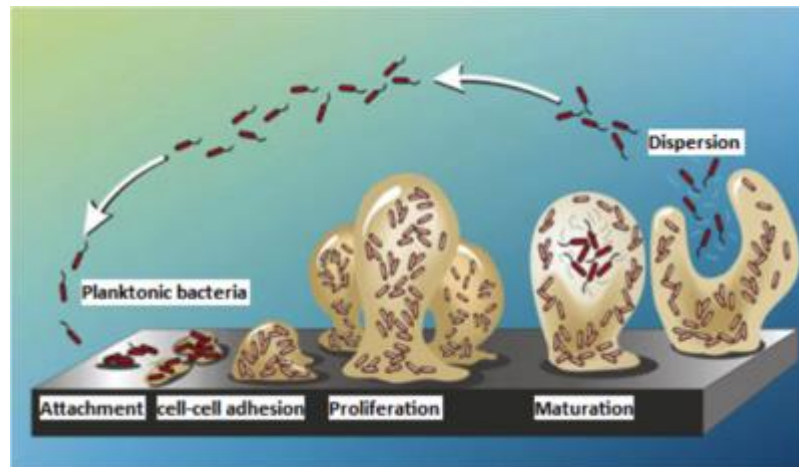
Kako bi došlo do infekcije u imunokompromitiranih osoba bakterije moraju posjedovati različite čimbenike virulencije koji uzrokuju odupiranje nespecifičnim i specifičnim mehanizmima obrane ljudskog organizma. Često posjeduju i čimbenike virulencije koji su odgovorni za oštećenje tkiva i stanica, za njihovu invazivnost i prodor unutar stanica te one koji im omogućuju širenje s mjesta infekcije i preživljavanje (5).

Do oboljenja od infektivnih bolesti dolazi onda kada su mikroorganizmi prisutni u dovoljnom broju da izazovu simptome kao što je upala, odnosno kad nadjačaju obranu organizma. Kad se govori o egzogenim infekcijama, put prijenosa moguć je izravnim ili neizravnim kontaktom preko predmeta, putem uboda igle ili zaraženih vektora te izravnim ili neizravnim putem preko predmeta. Za razliku od egzogene, do endogene infekcije dolazi onda kad uzročnik regrutira između pripadnika normalne mikroflore ljudskog organizma kada postoji predispozicija za to (5).

Glavni čimbenik virulencije *E. faecium* je izvanstanična sluz te one bakterije koje imaju sposobnost velike produkcije sluzi imaju i veći potencijal za stvaranje biofilma. Također ulogu imaju i agregacijska supstancija, proteinska želatinaza, serinska proteaza, Esp (površinski

enterokokni protein, engl. *enterococcal surface protein*), toksin citolizin/hemolizin, enterokokna kapsula, ekstracelularni superoksid i polisaharid stanične stijenke (5, 6).

Biofilm je zajednica mikroorganizama koja je adherirala za površinu supstrata. Bakterije koje imaju sposobnost stvaranja biofilma posjeduju sposobnost disprezije. Također, zaštićene su od negativnih utjecaja okoliša, pokazuju veliku rezistenciju na djelovanje antibiotika i ostalih antibakterijskih čimbenika. Nakon što na početku bakterije adheriraju na supstrat i formiraju zreli biofilm, mikroorganizmi čine samo 15-20%, dok preostali dio, 80 – 85%, čini sluzavi izvanstanični matriks (5, 7). Sastav izvanstanične sluzi je kompleksan i sadrži DNK, polisaharide, proteine i druge komponente te štiti bakterijsku zajednicu (8). Unutar biofilma mikroorganizmi komuniciraju pomoću autoinduktorskih molekula te tako detektiraju da li je dostatan broj mikroorganizama kako bi se aktivirali geni odgovorni za virulenciju što se naziva detekcija kvoruma (eng. quorum sensing) (5).



**Slika 2.** Biofilm

Stvaranje biofilma prisutno je kod infekcija koje su povezane s ugradnjom biomaterijala (npr. endoproteze, kateteri) te kod svih kroničnih infekcija stoga ne čudi povezanost s nastankom većine infekcija danas (5).

Enzim serinska proteaza razgrađuje peptidne veze proteina te presijeca serin koji služi kao nukleofilna aminokiselina na aktivnom mjestu enzima (5).

U sprečavanju učinkovitosti obrane organizma, posebno fagocitoze, važnu ulogu ima postojanje enterokokne kapsule. Sve dok se ne stvore protutijela na sastojke stijenke, ona štiti bakteriju od fagocitoze (5).

Esp protein, kodiran od strane Esp gena, doprinosi kolonizaciji i upornosti enterokoka u infekcijama mokraćnog sustava. Također može biti posrednik u interakciji s primarnim površinama i sudjelovati u formiranju biofilma što značajno pojačava preživljavanje bakterija te može biti uključen u antimikrobnu rezistenciju (9).

Hemolizin je supstancija koji izaziva hemolizu, odnosno raspadanje crvenih krvnih stanica (eritrocita). Na temelju mogućnosti porasta bakterija na krvnom agaru određuje se o kojoj se hemolizi radi. Ako dođe do potpunog liziranja eritrocita na podlozi radi se o potpunoj,  $\beta$ -hemolizi. Neke bakterije ne liziraju eritrocite potpuno, već samo promijene boju okolne krvne podloge u zeleno pa tada govorimo o nepotpunoj,  $\alpha$ -hemolizi. U trećem slučaju može doći i do ne djelovanja na eritrocite pa se tada radi o  $\gamma$ -hemolizi (10).

Agregacija je sposobnost povratnog i privremenog združivanja bakterijskih stanica u veće ili manje formacije. Njihova sposobnost združivanja ovisi i o faktorima okoliša kao što su gustoća medija, dostupnost hranjivih tvari, temperatura, pH i slično (11, 12, 13, 14).

#### **1.4 Klinička slika**

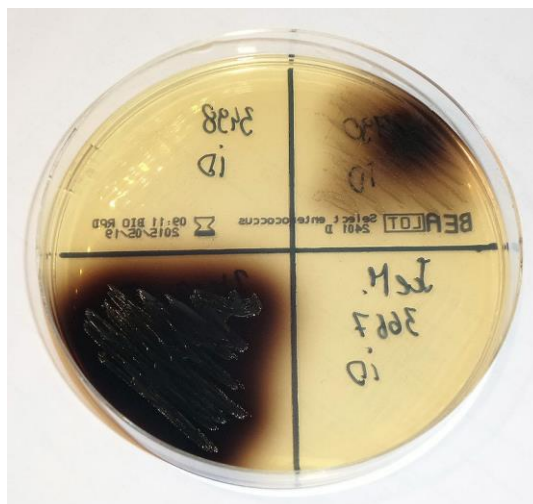
Premda se mogu pronaći kod izvanbolničkih bolesnika, enterokoki su najčešći uzročnici bolničkih infekcija, posebno u jedinicama intenzivnog liječenja zbog rezistencije na antibiotike. Većinu uzrokuju enterokoki koji su dio endogene flore, međutim, dolazi i do prijenosa između

bolesnika. (1) Također bilježi se i česti prijenos preko ruku bolničkog osoblja od kojih neki nose enterokoke u svojim crijevima te putem medicinskih pomagala (15). Najveći rizik prisutan je kod bolesnika koji su podvrgnuti opsežnim abdominalnim operacijama, s invazivnim pomagalicima ili kod onih koji koriste peritonejsku dijalizu. Zbog svoje potencijalne patogenosti osim dominantno mokraćnih infekcija (cistitis, prostatitis), bakterija može izazvati i zdjelične apscese, sepse, infekcije rana i endokarditis. (4)

Kad se govori o urinarnim infekcijama, žene imaju veći rizik od muškaraca i javljaju se opetovano. Urinarni sustav je sterilan, zatvoren i zaštićen od infekcije različitim mehanizmima, a infekcije nerijetko nastaju ascendentnim putem i to su uzrokovane bakterijama koje su dio fiziološke crijevne mikrobiote. Najčešći uzročnik akutnih urinarnih infekcija je *E. coli*, dok se kod kompliciranih urinarnih infekcija javljaju i druge enterobakterije poput *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp. te nefermentirajuće gram - negativne bakterije, *Pseudomonas* spp. i *Acinetobacter* spp. (16). Najčešće izolirana enterokokna vrsta iz humanih uzoraka je *E. faecalis* (80-90% izolata), a zatim slijedi *E. faecium* (5-15%) dok su ostale rjeđe izolirane. (1)

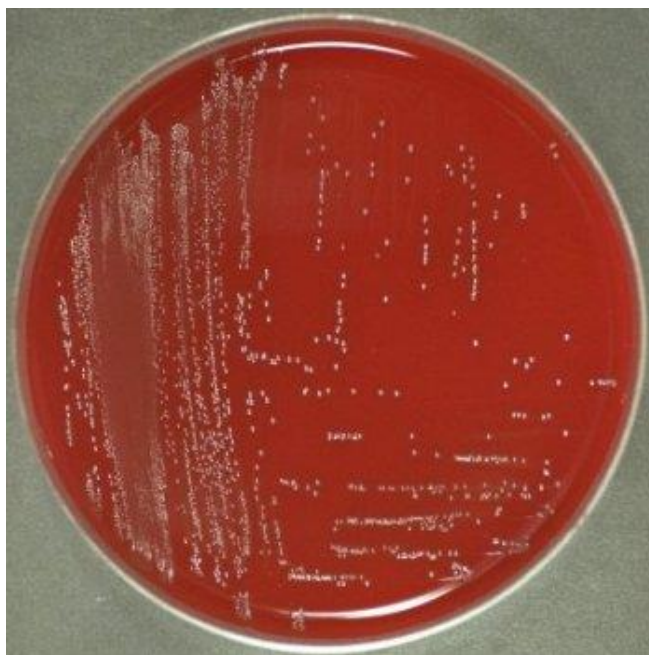
## **1.5 Laboratorijska dijagnostika enterokoka**

Za mikrobiološku dijagnostiku najčešće se uzimaju obrisni ždrijela kod gnojne angine, mokraća, obrisni rana i obrisni iz spolnog sustava žene kod sumnje na infekciju pri čemu se koriste neselektivne podloge. Ovisno o kliničkoj slici uzima se i krv pri sepsi, cerebrospinalni likvor, različiti punktati i eksudati (10). Kad se očekuje porast velikog broja enterobakterija npr. kod uzorka stolice, najčešće se koriste selektivne podloge (1). Rastu u prisutnosti žuči, hidroliziraju eskulin (žuč eskulin pozitivni) što se ispituje na Bile esculin agaru (BEA) (Slika 3.) te dobro rastu u 6,5 % NaCl za razliku od neenterokoknih streptokoka.



**Slika 3.** *Enterococcus* crne kolonije na BEA

PYR su pozitivni i na krvnom agaru su obično nehemolitički (Slika 4.), odnosno, ponekad pokazuju i  $\alpha$ -hemolitičke kolonije koje su u pravilu veće od kolonija streptokoka, promjera 1 do 2 mm. Dobro rastu između 10°C i 45°C, dok streptokoki u pravilu rastu u puno užem rasponu. Također, za razliku od streptokoka, rezistentniji su na penicilin G, a rijetki izolati imaju plazmide za  $\beta$ -laktamaze (15).



**Slika 4.** *E. faecium* hemoliza na krvnom agaru



## 1.6 Antimikrobna rezistencija i liječenje

Važno obilježje enterokoka leži u njihovoj rezistenciji na nekoliko često primjenjivanih antibiotika. Dijeli se na stečenu rezistenciju koja je varijabilna, posljedica mutacija ili akvizicija novih genskih elemenata nošenih na transpozonu ili na plazmidu; i intrinzičnu, koja je prirođena i tipična za sve enterokoke odnosno kromosomom kodirana. Kod osjetljivih izolata i blažih infekcija ampicilin je lijek izbora, međutim, kod težih infekcija (npr. meningitis), primjenjuje se kombinirana terapija s antibioticima (15, 17).

U 2011. godini u Republici Hrvatskoj na ampicilin je bilo rezistentno 2% *E. faecalis* i 81% *E. faecium*, na gentamicin 30% *E. faecalis* i čak 58% *E. faecium*, a na vankomicin (VRE) samo 1% *E. faecalis* i 1% *E. faecium* (1).

Enterokoki su uglavnom endogeni patogeni te je teško provesti prevenciju infekcije. Ako se radi o soju VRE, tada se moraju provesti mjere za izolaciju bolesnika kako ne bi došlo do širenja unutar bolnice (1).

### 1.6.1 Intrinzična rezistencija

Enterokoki su intrinzično rezistentni na penicilinaza-otporne peniciline, cefalosporine i monobaktame. Na aminoglikozide imaju prirođen niski stupanj otpornosti, intermedijarno su rezistentni ili osjetljivi na fluorokinolone te su manje osjetljivi na penicilin i ampicilin od streptokoka (10 do 1000 puta). Inhibicija enterokoka najčešće se postiže  $\beta$ -laktamima (npr. ampicilin), no ne i baktericidni učinak (15).

### **1.6.2 Rezistencija na aminoglikozide**

Kombinirana terapija aminoglikozida i antibiotika koji djeluju na staničnu stijenku bakterija nužna je kod teških infekcija poput endokarditisa. Iako je prethodno spomenuto kako imaju nisku prirodenu rezistenciju na aminoglikozide, u slučaju sinergističkog učinka s beta-laktamskim antibioticima ipak pokazuju osjetljivost. Navedeno nije slučaj kod svih enterokoka pa tako na neke, kod kojih je pokazana visoka razina rezistencije na aminoglikozide, ovaj sinergizam nema učinak. Razlog tome su enterokokni enzimi koji različito modificiraju različite aminoglikozide. Rezistencija na gentamicin predviđa otpornost na druge aminoglikozide osim na streptomycin stoga samo gentamicin ili streptomycin imaju sinergistički učinak s antibioticima koji djeluju na staničnu stijenku. Zbog navedenog, za klinički uspjeh terapije poželjno je testirati izolirane enterokoke na aminoglikozidnu rezistenciju visokog stupnja (7, 18).

### **1.6.3 Rezistencija na vankomicin**

Uz aminoglikozid, glikopeptid vankomicin je prvi alternativni lijek penicilinu za liječenje enterokoknih infekcija. Vankomicinska rezistencija sve je češća u *E. faecium* stoga nisu osjetljivi na sinergistički učinak aminoglikozida i vankomicina (15). Rezistencija je posljedica promjene u prekursorima peptidoglikana i zadebljanja stanične stijenke (1). Postoji sve više vankomicin rezistentnih fenotipova, međutim neki izolati koji su nisko rezistentni na vankomicin, pokazuju pak osjetljivost na teikoplanin. Teikoplanin je glikopeptidni antibiotik koji je sličan vankomicinu, međutim dostupan je samo u Europi, dok u SAD-u nije, a upravo tamo bilježi se sve veća vankomicin rezistencija. Vankomicin rezistentni enterokoki često posjeduju plazmide koji im osiguravaju rezistenciju na aminoglikozide i ampicilin. Stoga u tom

slučaju u liječenju se koriste najnoviji antimikrobni lijekovi kao što su linezolid, daptomicin, kvinupristin-dalfopristin i tigeciklin (15, 19, 20).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada bio je ispitati čimbenike virulencije: proteazu, lipazu, želatinazu, katalazu, hidrolizu eskulina, pokretljivost, biofilm, hemolizu, agregaciju i rezistenciju na lizozim patogenih izolata *Enterococcus faecium*. Također, ispitala se i osjetljivost pojedinih izolata na antibiotike.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Materijali

##### 3.1.1 Pribor i uređaji

- Petrijeve ploče
- Inkubator (Termomedicinski aparati Bodalec i Havočić, Dugo selo – Zagreb, Hrvatska)
- Spektrofotometar (“Eppendorf Biophotometer”, Eppendorf, Njemačka)
- Tresilica (“EV-100”, Tehnica Železniki, Slovenija)
- Automatske pipete:
  - 0,5-10  $\mu$ L (Eppendorf, Njemačka)
  - 2-20  $\mu$ L, 20-100  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L i 100-1000  $\mu$ L “Gilson Pipetman” (Gilson, USA)
  - “Pipsetus-akku” (Hirschmann Laborgerate, Njemačka)
- Plinski plamenik (Poligas OMH)
- Sterilni brisni štapići
- Celulozni diskovi
- Nastavci za automatske pipete (Gilson, USA)
- Epruvete (Eppendorf, Njemačka)
- Mikrobiološke ušice (“eže”)
- Plastične eže
- Centrifuga sa hlađenjem (“Jouan Centrifuge BR4i multifunction”, Thermo Electron Corporation, USA)
  - Mikroepuvete (Eppendorf, Njemačka)
  - Plastične kivete za spektrofotometriju

- Mikroskop ("Olympus IX-51" s digitalnom kamerom Olympus DP71, Olympus, USA)
- Predmetno stakalce (Paul MarienFELD GmbH & Co.KG, Njemačka)

### 3.1.2 Hranjive podloge i mediji

Hranjive podloge i bujoni su korišteni za uzgoj mikroorganizama prema propisanoj recepturi.

- **PBS** (eng. *phosphate buffered saline*)
- **Lizozim** (L3790-1 ML, Lysozyme from chicken egg white, Molecular Biology Tested; Sigma)
- **Krvni agar**

Sastav podloge: 10,0 g/L goveđeg ekstrakta, 10,0 g/L triptoze, 5,0 g/L natrijevog klorida, 15 g/L agar po litri destilirane vode

Sterilizacija hranjivih podloga se provodi autoklaviranjem 15 minuta na 121°C. Kada se podloga ohladi na približno 50°C, aseptički se dodaje 5% sterilna defibrinirana ovčja krv, a pH podloge iznosi 7,4±0,2.

- **Želatina (Kohn-Lautrop)**

200,0 g želatine postepeno se grije do 50°C u 100,0 mL destilirane vode. Na 100,0 mL otopljene želatine doda se 5,0 g životinjskog uglja (*carbo animalis*) u prahu i dobro se promiješa. Izlije se u petrijeve ploče približno 3 mm debeli sloj tek kad se miješanjem ohladila. Dno petrijeve potrebno je namazati vazelinom. Nakon skrućivanja izvaditi cijeli sloj i staviti u 10% formalin 24 sata. Izreže se u kockice veličine 1 cm × 5-8 mm, uvije se u gazu i ispire u

tekućoj vodovodnoj vodi 24 sata. Nakon toga se stavi u bocu širokog grla i prelije do vrha destiliranom vodom i sterilizira u kohu jedan sat.

- **Mueller Hinton agar**

Sastav podloge: 2,0 g goveđeg ekstrakta, 17,5 g kiselog hidrolizat kazeina, 1,5 g škroba, 17,0 agara po litri pročišćene vode

- **Skim milk agar**

U 100,0 mL nutrijent agara dodaje se 12,0 g mlijeka u prahu, pH se namješta na 7

- **Bile esculin agar**

Sastav podloge: 17,0 g/L tripton, 3,0 g/L pepton, 5,0 g/L kvasčevog ekstrakta, 10,0 g/L Oxgall, 5,0 g/L natrijevog klorida, 1,0 g/L eskulina, 0,5 g/L Fe-amonijevog citrata, 0,15 g/L natrijevog azida, 13,0 g/L agara

- **Congo red agar**

Sastav podloge: 37,0 g/L BHI agara, 50,0 g/L saharoze, 0,8 g/L congo red, 10 g/L agara

### 3.1.3 Bakterijski soj

U istraživanju bakterijskog soja uključeno je 20 kliničkih izolata *Enterococcus faecium* (Tablica 1.) koji su prikupljeni u Kliničkom zavodu za kliničku mikrobiologiju iz različitih kliničkih uzoraka pacijenata liječenih u KBC-u u Rijeci. Za identifikaciju izolata koristile su se određene neselektivne, diferencijalne podloge. Uzorak urina nasaduje se na kromogenu podlogu HiCrome UTI (HIMEDIA, India), a ostali uzorci (hemokultura, bris rane, bris rodnice, itd.) na krvni agar. Nakon inkubacije od 24 sata na kromogenoj podlozi porastu male kolonije

plavozelene do plave boje i na taj način se određuje preliminarna diferencijacija koja služi kao smjernica za dodatna potvrдна ispitivanja. Nakon određivanja fermentacije arabinoze i eskulina, krajnja potvrda u identifikaciji određuje se pomoću kartica VITEK 2 GP za uređaj VITEK 2-compact 15 System proizvođača Biomerieux.

**Tablica 1.** Izolati *E. faecium* koji su korišteni u istraživanju

<b>R. br.</b>	<b>Izolat</b>	<b>Oznaka izolata</b>	<b>Kl. uzorak</b>
<b>1.</b>	<i>E. faecium</i>	3687	<b>Urin</b>
<b>2.</b>	<i>E. faecium</i>	4406	<b>Urin</b>
<b>3.</b>	<i>E. faecium</i>	5271	<b>Hemokultura</b>
<b>4.</b>	<i>E. faecium</i>	46952/2015	<b>Bris drena</b>
<b>5.</b>	<i>E. faecium</i>	46928/2015	<b>Urin</b>
<b>6.</b>	<i>E. faecium</i>	9804	<b>Urin</b>
<b>7.</b>	<i>E. faecium</i>	10745	<b>Urin</b>
<b>8.</b>	<i>E. faecium</i>	15338	<b>Hemokultura</b>
<b>9.</b>	<i>E. faecium</i>	18978	<b>Urin</b>
<b>10.</b>	<i>E. faecium</i>	29512	<b>Bris rodnice</b>
<b>11.</b>	<i>E. faecium</i>	38343	<b>Urin</b>
<b>12.</b>	<i>E. faecium</i>	38412	<b>Urin</b>
<b>13.</b>	<i>E. faecium</i>	57143	<b>Bris rane</b>
<b>14.</b>	<i>E. faecium</i>	57578	<b>Urin</b>
<b>15.</b>	<i>E. faecium</i>	57612	<b>Hemokultura</b>



<b>16.</b>	<i>E. faecium</i>	60336	<b>Urin</b>
<b>17.</b>	<i>E. faecium</i>	62014	<b>Urin</b>
<b>18.</b>	<i>E. faecium</i>	62798	<b>Urin</b>
<b>19.</b>	<i>E. faecium</i>	67423	<b>Urin</b>
<b>20.</b>	<i>E. faecium</i>	69462	<b>Urin</b>

### **3.2 Metode ispitivanja čimbenika virulencije**

U ovom radu korištene su sljedeće metode za ispitivanje čimbenika virulencije: određivanje produkcije proteaze, lipaze, želatinaze, hidrolize eskulina, katalaze, određivanje pokretljivosti, biofilm, hemoliza, agregacija te rezistencija na lizozim. Također ispitana je i osjetljivost na pojedine antibiotike.

#### **3.2.1 Osjetljivost na antibiotike**

Testiranje antimikrobne osjetljivosti provodi se disk difuzijskom metodom (Slika 5.) pomoću antibiotskih diskova u sljedećim koncentracijama: 2,0 µg ampicilin (Bio-Rad), 30,0 µg gentamicin (Bio-Rad), 30,0 µg norfloksacin (Bio-Rad), 10,0 µg imipenem (Bio-Rad), 5,0 µg vankomicin (Bio-Rad), 30,0 µg teikoplanin (Bio-Rad). Suspenzija ispitivanog izolata nanosi se na krvni agar brisnim štapićem nakon čega se na površinu agara postavljaju diskovi natopljeni s navedenim standardiziranim količinama antibiotika. Tijekom inkubacije dolazi do difuzije antibiotika na agar i bakterije rastu ovisno o osjetljivosti. Stvaranje halo zone oko diskova predstavlja rezultat koji se mjeri u milimetrima. Postupak izrade antibiograma proveden je prema važećem EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) standardom koji ažurira i izdaje Europski odbor za testiranje antimikrobne osjetljivosti.

Usporedbom s propisanim graničnim vrijednostima zona inhibicije za određene bakterije određuje se osjetljivost u tri kategorije:

- REZISTENTAN (R, eng. *resistant*) - ispitivana bakterija nije osjetljiva na antibiotik te se ne bi trebao koristiti u liječenju infekcija uzrokovanim tom bakterijom
- UMJERENO OSJETLJIV (I, eng. *intermediate*) – ispitivana bakterija je osjetljiva na povišene koncentracije određenog antibiotika
- OSJETLJIV (S, eng. *susceptible*) – bakterija je osjetljiva na uobičajene doze ispitivanog antibiotika



**Slika 5.** Ispitivanje osjetljivosti *E. faecium* na antibiotike

### 3.2.2 Određivanje proteaze

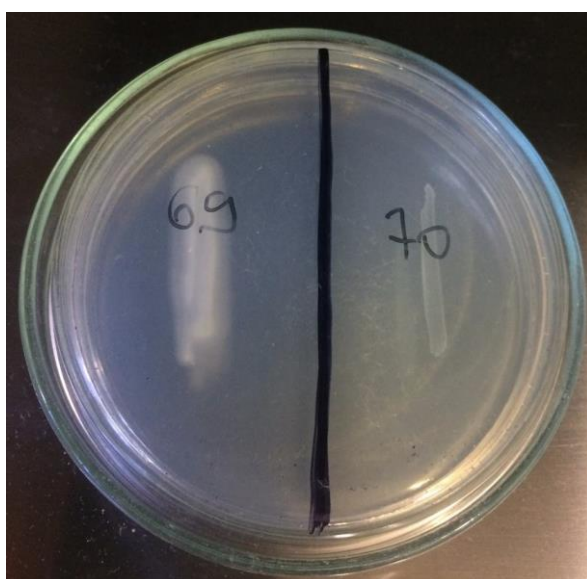
Produkcija enzima proteaze detektira se koristeći Skim milk agar. Bakterijska suspenzija se nanosi ezom kao linija na agar nakon čega se provodi inkubacije na 37°C, 24 i 48 sati. Prisutnost halo zone oko ruba bakterijskih kolonija dokazuje proteinsku aktivnost.



**Slika 6.** Metoda određivanja enzima proteaze na Skim milk agaru

### 3.2.3 Određivanje lipaze

Tween 80 lipaza test radi se koristeći Tween 80 agar. Jednim potezom eze se nasadi bakterijski soj te se inkubira 24 i 48 sati na 37°C. Vidljivost zamućenja uz rub bakterijskog nanosa ukazuje na posjedovanje enzima lipaze koji razgrađuje lipide.



**Slika 7.** Metoda određivanja lipaze

### 3.2.4 Određivanje enzima želatinaze

U epruvetu u kojoj se nalazi 1 mL fiziološke otopine umuti se bakterijski inokulum te se doda želatina veličine 1 cm × 5-8 mm. Inkubacija se provodi 48 sati i tjedan dana na 37°C nakon čega slijedi očitavanje. Razgradnja želatine pri čemu se medij oboja u crno znak je prisutnosti enzima želatinaze.



**Slika 8.** Metoda određivanja želatinaze

### 3.2.5 Određivanje katalaze

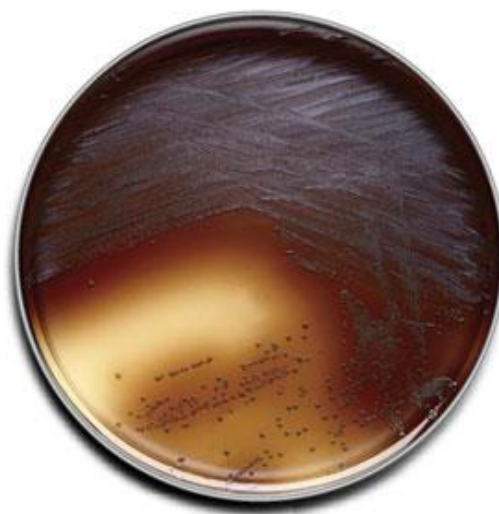
Prisutnost enzima katalaze u bakterijskoj kulturi dokazuje se nanošenjem uzorka plastičnom ezom u kap vodikovog peroksida na predmetno stakalce. Nakon umućenja ako je katalaza prisutna, pojavljuju se mjehurići kisika uslijed djelovanja razgradnje katalazom.



**Slika 9.** Katalaza test

### 3.2.6 Određivanje hidrolize eskulina

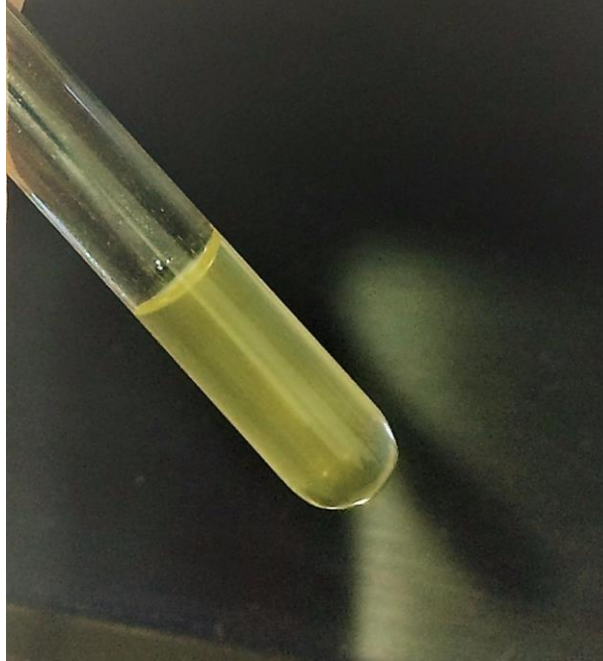
Na Bile Esculin agar ezom se nanosi bakterijska suspenzija ( $10^8$  CFU/mL). Nakon inkubacije od 24 sata na  $37^\circ\text{C}$  očitavaju se rezultati da li su enterokoki žuč eskulin pozitivni odnosno pojava crnih kolonija dokazuje hidrolizu eskulina.



**Slika 10.** Enterokoki na BEA agaru

### 3.2.7 Određivanje pokretljivosti

U epruvete u kojima se nalazi 2 mililitra Mueller Hintovog bujona u čvrstom agregatom stanju, ezom se nanosi takni ubod kroz sredinu kako bi se nasadio bakterijski soj. Inkubacija se provodi 24 i 48 sati na 37°C. Pojava tanke bijele linije ili zamućenih “oblačića” kroz sredinu sve do ruba uboda dokaz je nepokretljivosti bakterije.



**Slika 11.** Metoda određivanja pokretljivosti *E. faecium*

### 3.2.8 Dokazivanje produkcije izvanstanične sluzi

Produkcija izvanstanične sluzi i posljedično stvaranje biofilma gdje bakterije adheriraju i međusobno se povezuju očitava se nakon nasađivanja na Congo red agar te inkubacije od 24 sati na 37°C.



**Slika 12.** Izvanstanična sluz i sposobnost stvaranja biofilma *E. faecium*

### 3.2.9 Određivanje hemolitičke aktivnosti

Produkcija enzima hemolizina detektira se na krvnom agaru. Agari se inokuliraju s bakterijskim izolatima i inkubiraju 24 sata na 37°C. Hemolitička aktivnost promatra se kao liza oko bakterijskih kolonija te se na taj način i interpretira rezultat.



**Slika 13.** Hemoliza *E. faecium* na krvnom agaru

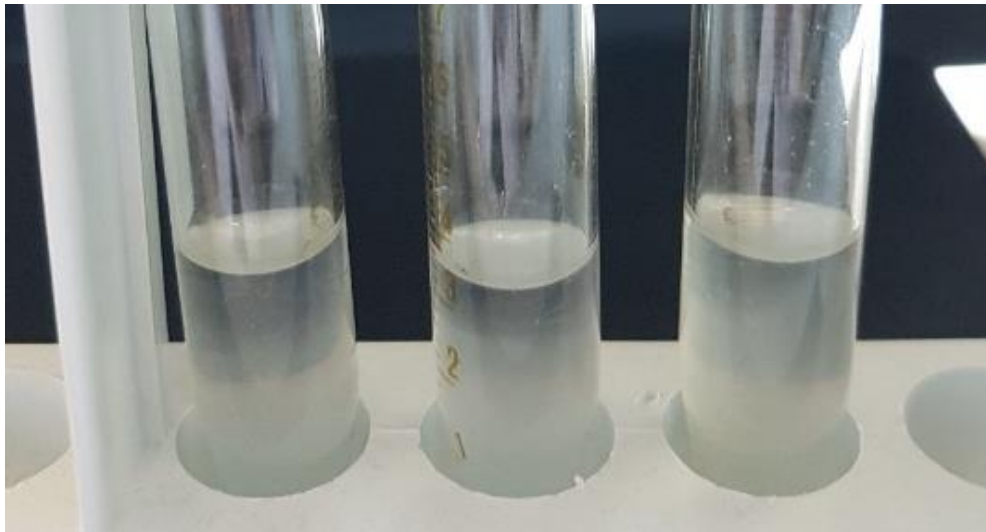
### 3.2.10 Agregacijski test

Agregacijski test provodi se na način da se u epruvetama pripremi 5 mL Mueller Hintonovog bujona i plastičnom ezom doda ispitivani izolat bakterije. Svi uzorci bakterijskih stanica se centrifugiraju na 3500 rpm, 5 minuta, nakon čega se dekantira bujon. Potom se dodaje 10 mL sterilnog PBS za ispiranje i stavlja na tresilicu te ponovo centrifugira na 3500 rpm, 5 minuta. Bujon iz epruveta se dekantira te se dodaje PBS za ispiranje i stavlja na tresilicu. Apsorbancije pažljivo otpipetiranih supernatanata (gornji sloj) izmjere su odmah. Optička gustoća konačne suspenzije pojedinačnih stanica se mjeri na valnoj duljini od 600 nm.

Uzorci u epruvetama ostaju mirovati na ravnoj podlozi, 24 sata na sobnoj temperaturi kako bi agregirali na dno epruvete. Drugi dan se pažljivo otpipetira supernatant i ponovo se mjeri apsorbancija. Postoci agregacije dobiveni su prema formuli:

$$\% \text{ agregacije} = 1 - (A_t/A_0) \times 100$$

gdje  $A_t$  predstavlja izmjerenu apsorbanciju nakon 24 sata, dok  $A_0$  predstavlja nultu apsorbanciju, izmjerenu prvi dan (u 0 sati).



**Slika 14.** Agregacija *E. faecium* nakon 24 sata



### 3.2.11 Rezistencija na lizozim

U ovom radu korištene su dvije metode za dokazivanje rezistencije na lizozim: metoda diska i metoda različitih koncentracija Muller Hintonovog agara s dodatkom lizozima.

Bakterijska suspenzija koja se koristila u ovim metodama ista je konačnoj pripremljenoj suspenziji za očitavanje nulte apsorbancije ( $A_0$ ).

#### 3.2.11.1 Disk-difuzijska metoda

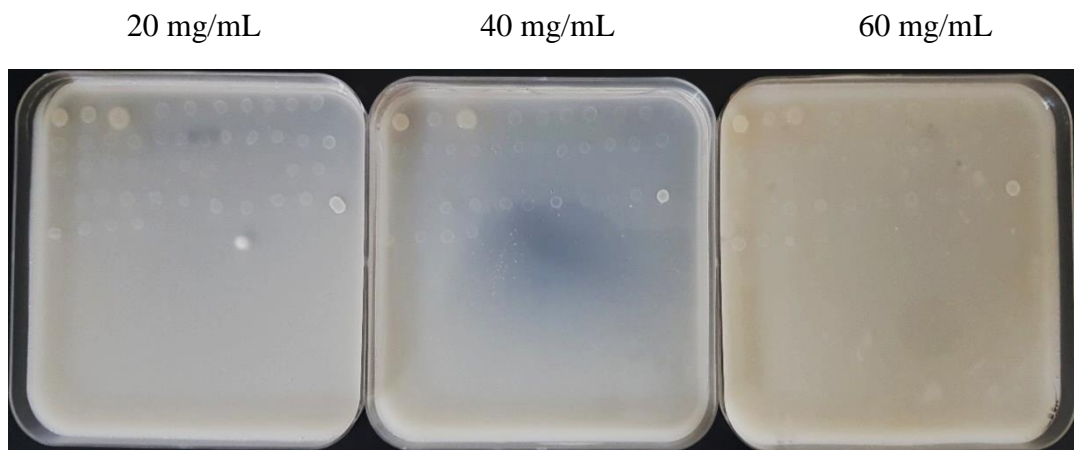
Na Mueller Hintonove ploče brisnim štapićem se nanosi bakterijska suspenzija ispitivanog izolata. Na ploče se potom u pravilim razmacima rasporede celulozni diskovi na koje se nakapa 10,0  $\mu$ L lizozima. Inkubacija se provodi 24 sata na 37°C nakon čega se očitavaju rezultati rezistencije na lizozim.



**Slika 15.** Disk-difuzijska metoda

### 3.2.11.2 Metoda agar dilucije

Na Mueller hintonov agar s dodatkom različitih koncentracija lizozima (20, 40, 60 mg/mL) s automatskom pipetom se nanosi bakterijska suspenzija u kapljicama od 5,0  $\mu$ L u pravilnim razmacima. Nakon inkubacije od 24 sata na 37°C bilježi se rezultat ovisno o porastu bakterije, odnosno, rezistenciji na lizozim.



**Slika 16.** Metoda agar dilucije (Ly 20, 40, 60)

## 4. REZULTATI

Pomoću različitih metoda ispitano je više čimbenika virulencije za 20 izolata *E. faecium*. Također, prikazana je i osjetljivost izolata na pojedine antibiotike. Neki od rezultata razvrstani su u tabličnom obliku i prikazani grafikonom.

### 4.1 Rezultati osjetljivosti na antibiotike

U tablici 2. prikazana je osjetljivost enterokoka na antibiotike: ampicilina, gentamicina, norfloksacina, imipenema, vankomicina, teikoplanina na 20 različitih izolata *E. faecium*. Interpretacija je rađena prema EUCAST vrijednostima te se raspon zona inhibicije očitava prema niže navedenim kriterijima:

- Ampicilin od  $\leq 7$  (R) do  $\geq 10$  (S)
- Gentamicin od  $\leq 7$  (R) do  $\geq 8$  (S)
- Norfloksacin od  $\leq 11$  (R) do  $\geq 12$  (S)
- Imipenem od  $\leq 17$  (R) do  $\geq 21$  (S)
- Vankomicin od  $\leq 11$  (R) do  $\geq 12$  (S)
- Teikoplanin od  $\leq 15$  (R) do  $\geq 16$  (S)

**Tablica 2.** Antimikrobna osjetljivost *E. faecium* na antibiotike

<b>R. br.</b>	<b>Izolat</b>	<b>Oznaka izolata</b>	<b>AM</b>	<b>GE</b>	<b>NOR</b>	<b>IMI</b>	<b>VA</b>	<b>TEC</b>
1.	<i>E. faecium</i>	3687	R	R	R	R	R	R
2.	<i>E. faecium</i>	4406	R	S	R	R	R	R
3.	<i>E. faecium</i>	5271	R	S	R	R	R	R
4.	<i>E. faecium</i>	46952/2015	R	S	R	R	R	R
5.	<i>E. faecium</i>	46928/2015	R	R	R	R	R	R
6.	<i>E. faecium</i>	9804	R	S	R	R	R	R
7.	<i>E. faecium</i>	10745	R	R	R	R	R	R
8.	<i>E. faecium</i>	15338	R	R	R	R	R	R
9.	<i>E. faecium</i>	18978	R	S	R	R	R	R
10.	<i>E. faecium</i>	29512	R	R	R	R	R	R
11.	<i>E. faecium</i>	38343	R	R	R	R	R	R
12.	<i>E. faecium</i>	38412	R	S	R	R	R	R
13.	<i>E. faecium</i>	57143	R	R	R	R	S	S
14.	<i>E. faecium</i>	57578	R	R	R	R	S	S

15.	<i>E. faecium</i>	57612	R	R	R	R	S	S
16.	<i>E. faecium</i>	60336	R	R	R	R	S	S
17.	<i>E. faecium</i>	62014	R	S	R	R	S	S
18.	<i>E. faecium</i>	62798	R	S	R	R	S	S
19.	<i>E. faecium</i>	67423	R	R	R	S	S	S
20.	<i>E. faecium</i>	69462	R	R	R	S	S	S

\*AM=ampicilin, GE=gentamicin, NOR=norfloksacin, IMI=imipenem, VA=vankomicin, TEC=teikoplanin, R=rezistentan,

S=osjetljiv

Potpuna rezistenacija svih 20 izolata pokazana je na djelovanje ampicilina i norfloksacina. U 40% je pokazana osjetljivost na gentamicin. Samo dva izolata *E. faecium* 67423 i 69462 pokazali su osjetljivost na imipenem. Na vankomicin i teikoplanin osjetljivo je 40% izolata te se radi upravo o istima. Vankomicin rezistentni izolati su u 100% slučajeva bili rezistentni na ampicilin, norfloksacin, imipenem i teikoplanin, dok na gentamicin u 50%.

#### 4.2 Rezultati određivanja pojedinih enzima

U tablici 3. prikazani su rezultati čimbenika virulencije koji se odnose na sposobnost produkcije enzima kod izolata *E. faecium*.

**Tablica 3.** Enzimi prisutni kod *E. faecium*

R. br.	Izolat	Oznaka izolata	Proteaza		Lipaza		Želatinaza		Katalaza
			1 d	2 d	1 d	2 d	2 d	1 tj	
1.	<i>E. faecium</i> VRE	3687	-	-	-	+	-	-	-
2.	<i>E. faecium</i> VRE	4406	-	-	-	-	-	-	-
3.	<i>E. faecium</i> VRE	5271	-	-	-	-	-	-	-

4.	<i>E. faecium</i> VRE	46952/2015	-	-	-	+	-	-	-
5.	<i>E. faecium</i> VRE	46928/2015	-	-	-	-	-	-	-
6.	<i>E. faecium</i> VRE	9804	-	-	-	+	-	-	-
7.	<i>E. faecium</i> VRE	10745	-	-	-	+	-	-	-
8.	<i>E. faecium</i> VRE	15338	-	-	-	+	-	-	-
9.	<i>E. faecium</i> VRE	18978	-	-	-	+	-	-	-
10.	<i>E. faecium</i> VRE	29512	-	-	-	-	-	-	-
11.	<i>E. faecium</i> VRE	38343	-	-	-	+	-	-	-
12.	<i>E. faecium</i> VRE	38412	-	-	-	+	-	-	-
13.	<i>E. faecium</i>	57143	-	-	-	+	-	-	-
14.	<i>E. faecium</i>	57578	-	-	-	+	-	-	-
15.	<i>E. faecium</i>	57612	+	+	-	+	-	-	-
16.	<i>E. faecium</i>	60336	-	-	-	-	-	-	-
17.	<i>E. faecium</i>	62014	-	-	-	+	-	-	-
18.	<i>E. faecium</i>	62798	-	-	-	+	-	-	-
19.	<i>E. faecium</i>	67423	-	-	-	+	-	-	-
20.	<i>E. faecium</i>	69462	-	-	-	+	-	-	-

\*žuto su označeni pozitivni rezultati produkcije enzima

Do porasta bakterijskog izolata, došlo je samo kod izolata *E. faecium* 57612 gdje se bilježi pozitivan rezultat što znači da taj izolat posjeduje enzim proteazu koji razgrađuje protein. Svi ostali izolati pokazali su negativan rezultat bez vidljivog porasta bakterija na agaru.

Od 20 ispitivanih izolata *E. faecium*, u 75% slučajeva je došlo do razgradnje lipida tek nakon 48 sati inkubacije na 37°C.

Svi izolati su pokazali negativan rezultat na želatinazu i katalazu, međutim važno je napomenuti da se u 10% izolata (*E. faecium* 3687 i 57578) pojavljuje blaga reakcija koja se opisuje kao lažno pozitivna.

#### **4.3 Određivanje hidrolize eskulina**

Nakon inkubacije od 24 sata na 37°C svih 20 izolata, *E. faecium* daje pozitivan rezultat što je dokaz hidrolize eskulina (žuč eskulin su pozitivni).

#### **4.4 Određivanje pokretljivosti**

Kroz ispitivanu metodu pokazalo se da svi ispitivani izolati nisu pokretljivi.

#### **4.5 Određivanje produkcije izvanstanične sluzi i biofilma**

Ovom metodom dobiveni su rezultati izvanstanične sluzi i biofilma na Congo red agaru. U tablici 4. prikazani su rezultati za pojedini izolat.

**Tablica 4.** Produkcija izvanstanične sluzi i sposobnost stvaranja biofilma izolata *E. faecium* na Congo red agaru

R.br	Izolat	Oznaka izolata	Biofilm	
			Opis kolonija	Očitavanje rezultata
1	<i>E. faecium</i> VRE	3687	Crne kolonije	++*
2	<i>E. faecium</i> VRE	4406	Crne kolonije	++
3	<i>E. faecium</i> VRE	5271	Crne kolonije	++
4	<i>E. faecium</i> VRE	46952/2015	Crne kolonije	++
5	<i>E. faecium</i> VRE	46928/2015	Crne kolonije	++
6	<i>E. faecium</i> VRE	9804	Crne kolonije	++
7	<i>E. faecium</i> VRE	10745	Crne kolonije	++
8	<i>E. faecium</i> VRE	15338	Crne kolonije	++
9	<i>E. faecium</i> VRE	18978	Crne kolonije	++
10	<i>E. faecium</i> VRE	29512	Crne kolonije	++
11	<i>E. faecium</i> VRE	38343	Smeđe kolonije s halo zonom	+*
12	<i>E. faecium</i> VRE	38412	Crne kolonije	++
13	<i>E. faecium</i>	57143	Crne kolonije	++
14	<i>E. faecium</i>	57578	Smeđe kolonije s halo zonom	+
15	<i>E. faecium</i>	57612	Smeđe kolonije s halo zonom	+
16	<i>E. faecium</i>	60336	Smeđe kolonije s halo zonom	+
17	<i>E. faecium</i>	62014	Crne kolonije	++
18	<i>E. faecium</i>	62798	Crne kolonije	++
19	<i>E. faecium</i>	67423	Crne kolonije	++

<b>20</b>	<i>E. faecium</i>	69462	Smeđe kolonije s halo zonom	+
-----------	-------------------	-------	-----------------------------	---

\*crne kolonije ++, smeđe s halo zonom +, vankomicin rezistentan =VRE

Postoje razlike u produkciji izvanstanične sluzi te ih možemo prikazati u dva slučaja: crne kolonije i smeđe s halo zonom. U 25% izolata prikazane su smeđe kolonije s halo zonom, dok je u 75% vidljiv porast crnih kolonija. Porast enterokoka u obliku crnih kolonija ukazuje na sposobnost velike produkcije sluzi što posljedično znači da te bakterije imaju veći potencijal za stvaranje biofilma.

#### 4.6 Određivanje hemolize

U istraživanju je dobiveno da su svi ispitivani izolati nehemolitički, odnosno, da se radi o  $\gamma$ -hemolizi.

#### 4.7 Određivanje agregacije

Kako bismo odredili postotak agregacije pojedinih izolata *E. faecium*, odredili smo vrijednosti apsorbancije u razmaku od 24 sata. U tablici 5. su prikazane vrijednosti apsorbancija te izračun postotka agregacije pojedinih izolata. Grafički rezultat agregacije je prikazan na slici 17.

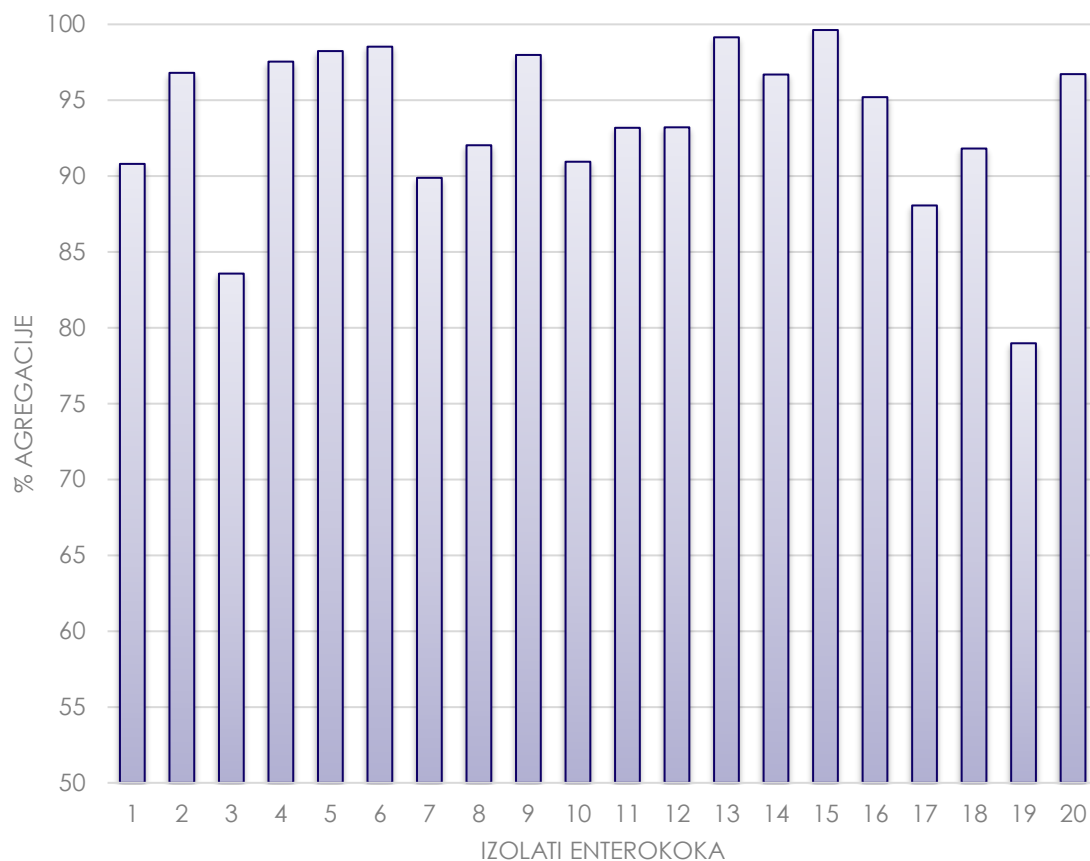
**Tablica 5.** Agregacija izolata *E. faecium*

R.br	Izolat	Oznaka izolata	A	A nakon 24h	Agregacija/%
<b>1</b>	<i>E. faecium</i> VRE	3687	0,913	0,084	90,79956188
<b>2</b>	<i>E. faecium</i> VRE	4406	0,938	0,03	96,80170576



<b>3</b>	<i>E. faecium</i> VRE	5271	0,846	0,139	83,56973995
<b>4</b>	<i>E. faecium</i> VRE	46952/2015	0,936	0,023	97,54273504
<b>5</b>	<i>E. faecium</i> VRE	46928/2015	0,964	0,017	98,23651452
<b>6</b>	<i>E. faecium</i> VRE	9804	1,087	0,016	98,52805888
<b>7</b>	<i>E. faecium</i> VRE	10745	0,761	0,077	89,88173456
<b>8</b>	<i>E. faecium</i> VRE	15338	0,276	0,022	92,02898551
<b>9</b>	<i>E. faecium</i> VRE	18978	0,793	0,016	97,98234552
<b>10</b>	<i>E. faecium</i> VRE	29512	1,071	0,097	90,94304388
<b>11</b>	<i>E. faecium</i> VRE	38343	0,953	0,065	93,17943337
<b>12</b>	<i>E. faecium</i> VRE	38412	0,928	0,063	93,2112069
<b>13</b>	<i>E. faecium</i>	57143	0,819	0,007	99,14529915
<b>14</b>	<i>E. faecium</i>	57578	0,393	0,013	96,69211196
<b>15</b>	<i>E. faecium</i>	57612	0,801	0,003	99,62546816
<b>16</b>	<i>E. faecium</i>	60336	0,625	0,03	95,2
<b>17</b>	<i>E. faecium</i>	62014	0,335	0,04	88,05970149
<b>18</b>	<i>E. faecium</i>	62798	0,684	0,056	91,8128655
<b>19</b>	<i>E. faecium</i>	67423	0,547	0,115	78,976234
<b>20</b>	<i>E. faecium</i>	69462	0,914	0,03	96,71772429

\* VRE= vankomicin rezistentan



**Slika 17.** Agregacija izolata *E. faecium*. Pokus je ponovljen dva puta i navedene su srednje vrijednosti rezultata. Naveden je redni broj izolata koji su izlistani u tablici 5.

Na slici 17. vidljiv je raspon postotaka agregacije između 78,87% i 99,15%. Možemo zaključiti da nije bilo razlike između osjetljivih i vankomicin rezistentnih (VRE) izolata.

#### 4.8 Određivanje lizozima

Provedene su dvije metode za utvrđivanje rezistencije na lizozim: disk-difuzijska metoda i metoda agar dilucije.

#### 4.8.1 Rezultati disk-difuzije metode

Postavljanjem diskova na ploču s lizozimom gdje je bila nanešena suspenzija bakterija nije došlo do vidljivih rezultata. Zbog neučinovitosti ove metode, dalje se provodila metoda agar dilucije.

#### 4.8.2 Rezultati agar dilucijske metode

U tablici 6. prikazani su rezultati rezistencije na lizozim.

**Tablica 6.** Rezistencija *E. faecium* na lizozim

R.br	Izolat	Oznaka izolata	Ly 20	Ly 40	Ly 80
			mg/mL		
1	<i>E. faecium</i> VRE	3687	-	-	-
2	<i>E. faecium</i> VRE	4406	-	-	-
3	<i>E. faecium</i> VRE	5271	-	-	-
4	<i>E. faecium</i> VRE	46952/2015	-	-	-
5	<i>E. faecium</i> VRE	46928/2015	-	-	-
6	<i>E. faecium</i> VRE	9804	-	-	-
7	<i>E. faecium</i> VRE	10745	-	-	-
8	<i>E. faecium</i> VRE	15338	-	-	-
9	<i>E. faecium</i> VRE	18978	-	-	-
10	<i>E. faecium</i> VRE	29512	-	-	-
11	<i>E. faecium</i> VRE	38343	-	-	-
12	<i>E. faecium</i> VRE	38412	-	-	-
13	<i>E. faecium</i>	57143	+	+	+

<b>14</b>	<i>E. faecium</i>	57578	-	-	-
<b>15</b>	<i>E. faecium</i>	57612	-	+	+
<b>16</b>	<i>E. faecium</i>	60336	-	+	+
<b>17</b>	<i>E. faecium</i>	62014	-	-	-
<b>18</b>	<i>E. faecium</i>	62798	-	-	-
<b>19</b>	<i>E. faecium</i>	67423	-	-	-
<b>20</b>	<i>E. faecium</i>	69462	-	-	-

\*žuto su označeni pozitivni rezultati osjetljivosti na lizozim

Većina ispitivanih izolata pokazala je rezistenciju na lizozim. Vidljivo je da su svi *E. faecium* VRE rezistentni na lizozim te se može očitati rast bakterija na podlozi. Također, negativan rezultat je prikazan i kod 75% *E. faecium*. U slučaju *E. faecium* 57143 na sve tri koncentracije vidljiva je osjetljivost na lizozim. Dok kod *E. faecium* 57612 i 60336 tek u koncentracijama od 40 i 60 mg/mL se bilježi pozitivan rezultat osjetljivosti što znači da je 37,5% *E. faecium* osjetljivo na lizozim u spomenutim koncentracija, a svega 12,5% (1 izolat) kod koncentracije od 20 mg/mL.

## 5. RASPRAVA

Za razliku od streptokoka, enterokoki pokazuju veću otpornost na fizikalne i kemijske utjecaje (termorezistentan je i raste u bujonu koncentracije 6,5% NaCl) što je dovelo do sve veće rasprostranjenosti u okolišu. Također, razlikuje se od streptokoka i u DNK i 16S-rRNK (1). Iako su najčešći uzročnici akutnih urinarnih infekcija *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp. te nefermentirajuće gram negativne bakterije, *Pseudomonas* spp. i *Acinetobacter* spp., enterokoki su sve više zapaženi kao uzročnici infekcija koje su pretežito vezane za bolničke sredine (16).

Enterokoki su dio normalne flore probavnog sustava, stoga je on i rezervoar iz kojeg dospijevaju u druge sustave. Najčešće se radi o urinarnom sustavu zbog mogućnosti kratkog puta prijelaza (1). Kako bi došlo do infekcije enterokoki moraju posjedovati različite čimbenike virulencije, a s obzirom da nema puno istraživanja koja su provedena na temu *E. faecium* odlučili smo upravo zato ispitati karakteristike pojedinih izolata.

Cilj ovog rada bio je analizirati različita svojstva uključujući osjetljivost na antibiotike te virulenciju i karakteristike odgovorne za rast i preživljavanje: proteazu, lipazu, želatinazu, katalazu, hidrolizu eskulina, pokretljivost, biofilm, hemolizu, agregaciju i rezistenciju na lizozim.

Enterokoki posjeduju već genetsku predodređenost za otpornost na pojedine antibiotike (15), a u ovom istraživanju ispitana je osjetljivost na ampicilin, gentamicin, norfloksacin, imipenem, vankomicin, teikoplanin. Potpuna rezistenacija svih 20 izolata pokazana je na djelovanje ampicilina i norfloksacina. U 40% je pokazana osjetljivost na gentamicin te također na vankomicin i teikoplanin gdje se radi upravo o istim izolatima. Samo dva izolata *E. faecium* 67423 i *E. faecium* 69462 pokazali su osjetljivost na imipenem. Vankomicin rezistentni izolati

su u 100% slučajeva bili rezistentni na ampicilin, norfloksacin, imipenem i teikoplanin, dok na gentamicin u 50%. Baylan i suradnici u svom radu su ispitali 59 *E. faecium* kliničkih izolata te je dokazao da je 74,2% rezistentno na gentamicin (21).

Skoro svi bakterijski izolati pokazali su nepostojanje proteaze gdje nema vidljivog porasta bakterija na agaru. Do porasta bakterijskog soja je došlo samo kod izolata *E. faecium* 57612 gdje se bilježi pozitivan rezultat, što znači da taj soj posjeduje enzim proteazu koji razgrađuje protein. Prema Peter A. i Mathew J. koji su u svom istraživanju koristili 52 ispitivana klinička izolata, kod njih 20 (38,5%) je zabilježena prisutnost proteaze. Također, u istom istraživanju provedeno je ispitivanje izolata koji su uzeti iz vode te se u tom slučaju navodi 20%-tna produkcija proteaze, dok kod *E. faecium* izoliranih iz pilećeg fecesa 6,15%, a iz ljudskog 5,6% (3).

Od 20 ispitivanih izolata *E. faecium*, u 75% slučajeva je došlo do razgradnje lipida tek nakon 48 sati inkubacije na 37°C. Istraživanje Peter A. i Mathew J. je prikazalo prisutnost kod 26 kliničkih izolata od ispitivanih 52 što govori o 50% izolata koji posjeduju lipazu. Kod izolata iz pilećeg fecesa zabilježeno je 18,5%, a ljudskog 47,2%, dok se u vodi bilježi 23% (3). U drugom istraživanju, Elsner i suradnici ispitali su 89 izolata *E. faecalis* i 24 izolata *E. faecium* iz uzorka krvi te su usporedili kako je postotak lipaze bio 35% naprema 4% (22).

Svi izolati u ovom istraživanju su pokazali negativan rezultat na želatinazu i katalazu. Peter A. i Mathew J. u radu prikazuju na želatinazu pozitivan 21 klinički izolat, 40,4% od ispitivanih *E. faecium*. U vodi se navodi 10%, a u pilećem fecesu 3,1% te u ljudskom 5,6% (3). Također su Elsner i suradnici ispitivali želatinazu gdje su svi izolati bili negativni (22).

Ispitivani izolati pokazali su se nehemolitički, odnosno da se radi o  $\gamma$ -hemolizi kao što je navedeno i u istraživanju Elsner i suradnika (22). U istraživanju koje su proveli Peter A. i Mathew J., prikazana je pozitivna hemoliza, 25% kod kliničkih izolata, 5,6% kod ljudskih

fecesa te 8% iz vode, dok je kod pilećeg fecesa također negativna (3). Puno veći postotak hemolize bilježi se kod *E. faecalis* što je dokazano u istraživanju kojeg su proveli Furumura i suradnici. Ispitivali su 32 klinička izolata te su u 75% slučajeva bili pozitivni (23).

Kroz provedeno istraživanje, svi izolati su pokazali negativan rezultat u ispitivanju pokretljivosti.

Produkcija izvanstanične sluzi i biofilma važan su faktor kod patogenih izolata *E. faecium*. Porast enterokoka u obliku crnih kolonija ukazuje na sposobnost velike produkcije sluzi. Kao posljedica se javlja veći potencijal bakterija za stvaranje biofilma čime se omogućava prijanjenje na površinu. Formiranje biofilma ispitivanih izolata testirano je na Congo red agaru. U 75% vidljiv je porast crnih kolonija te se može reći da se u 73% radi o vankomicin rezistentnim izolatima. Također postoji razlika u 25% gdje su prikazane smeđe kolonije s halo zonom. Kroz istraživanje koje su proveli Peter A. i Mathew J., biofilm je u 57,7% bio pozitivan kod kliničkih izolata. Također, u 50,9% kod ljuskog fecesa, 30% kod pilećeg te 43% u vodi (3). U istraživanju kojeg su proveli Di Rosa i suradnici dokazana je povezanost biofilma i Esp-a, ali samo u kliničkim izolatima, dok kod *E. faecalis* to nije slučaj (24).

Razlika u agregaciji osjetljivih i vankomicin rezistentnih izolata nije vidljiva te se raspon vrijednosti kretao između 78,87% i 99,15%.

Većina ispitivanih izolata pokazala je rezistenciju na lizozim. Svi izolati *E. faecium* VRE su pokazali rezistentnost na lizozim što je vidljivo porastom bakterija na podlozi. Rezistentnost je također dokazana i kod 75% *E. faecium*. Na sve tri ispitivane koncentracije vidljiva je osjetljivost samo u slučaju *E. faecium* 57143. U koncentracijama od 40 i 60 mg/mL pozitivan rezultat osjetljivosti bilježi se i kod *E. faecium* 57612 i 60336. U konačnici se može zaključiti da 37,5% *E. faecium* pokazuje osjetljivost na lizozim u koncentracijama od 40 i 60 mg/mL, a svega 12,5% (1 izolat) kod koncentracije od 20 mg/mL.

Sposobnost preživljavanja enterokoka u bolničkom okruženju, posebno kad se radi o bolničkoj opremi treba uzeti u obzir s obzirom na potencijal ovih bakterija za stvaranje biofilma. Pojavom vankomicin rezistentnih izolata u bolnici bilo bi poželjno poduzeti stroge kontrolne i nadzorne mjere za ograničenje širenja potencijalno štetne bakterije.



## 6. ZAKLJUČAK

Prema gore navedenim rezultatima može se zaključiti da ispitivani izolati *E. faecium* pokazuju prisutnost nekih od čimbenika virulencije. Najvažniji za istaknuti je produkcija izvanstanične sluzi te stvaranje biofilma u 75% kliničkih izolata koji su najvećim djelom i vankomicin rezistentni. Hemoliza, želatinaza, katalaza su negativni, a dokazana je i njihova nepokretljivost. Također, dokazano je da su gotovo svi osim jednog izolata proteaza negativni. Imaju značajnu sposobnost agregacije, međutim nije zabilježena razlika između vankomicin rezistentnih *E. faecium* i osjetljivih izolata. Lizozimska rezistencija nije značajno izražena te su većinom osjetljivi na sve koncentracije.

S obzirom na njihovo preživljavanje u nepovoljnim uvjetima i produkciju izvanstanične sluzi i biofilma možemo zaključiti da su mjere predostoržnosti i sanacije neophodne u bolničim sredinama.

## 7. LITERATURA

1. Kalenić, S., i suradnici. (2013). Medicinska mikrobiologija. Medicinska naklada, Zagreb, 140– 143
2. Fisher, K., Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. 155 (6): 1749-1757
3. Peter, A., Mathew, J. (2015). Studies on the isolates of Enterococci form different sources. School of biosciences Mahatma Gandhi University, Kottayam, Kerala, India (chapter 4, summary, conclusion)
4. Mlinarić Galinović, G., Ramljak Šešo, M., i suradnici. (2003). Specijalna medicinska mikrobiologija i parasitologija. Udžbenik visoke zdravstvene škole, Zagreb, 10-12
5. [https://www.researchgate.net/profile/Jasmina\\_Vranes2/publication/256941950\\_Patogeneza\\_bakterijskih\\_infekcija/links/02e7e524167619455c000000/Patogeneza-bakterijskih-infekcija.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Jasmina_Vranes2/publication/256941950_Patogeneza_bakterijskih_infekcija/links/02e7e524167619455c000000/Patogeneza-bakterijskih-infekcija.pdf) (Pristupljeno: Kolovoz, 2017.)
6. Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284: 1318-1322
7. Donlan, R. M., Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(2): 167-193
8. Abee, T., Kovács, A. T., Kuipers, O. P., Van Der Veen, S. (2011). Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 22 (2): 172–9
9. Baldisseretto Comerlato, C., Costa Carvalho de Resende, M., Caierao, J., i Alves d'Azevedo, P. (2013). Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*.

10. Kalenić, S., Mlinarić Missoni, E. (1993). Medicinska bakteriologija i mikrobiologija. Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 171-172, 189
11. Fletcher, M. (1987). How do bacteria attach to solid surfaces?. *Microbiol Sci.* 4: 133-136
12. Frece, J. (2007). Synbiotic effect of bacteria: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 and *Enterococcus faecium* L3. Disertation, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb.
13. Kos B et al. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiolog*, 94: 981-987
14. Bourgeau, G., McBride, B. C. (1976). Dextran-Mediated Interbacterial Aggregation between and Actinomyces Viscosus. *Infection and Immunity*, 13: 1228-1234
15. Jawetz, Melnick, Adelberg (2005). Medicinska mikrobiologija, 26. izdanje (1. hrvatsko izdanje), Placebo d.o.o., Split, 222-224
16. Kučišec Tepeš N., Bejuk D. i sur. (2000). Europske upute za analizu urina, Hrvatski liječnički zbor, Zagreb
17. Cookson, B. (2005). Clinical significance of emergence of bacterial antimicrobial resistance in the hospital environment. *J. Appl. Microbiol.* 99: 989-996
18. Chow, J. W. (2000). Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clin. Infect. Dis.* 31 (2): 586-589
19. Cetinkaya, Y., Falk, P., Glen Mayhall C.G. (2000). Vancomycin-Resistant Enterococci, *Clinical Microbiology Reviews*, 13: 686-707
20. Bonten, M. J., Willems, R., Weinstein, R. A. (2001). Vancomycin-resistant enterococci: why are they here and where do they come from? *Lancet Infect. Dis.* 1 (5): 314-325
21. Baylan, O., Nazik, H., Cital, B.E., Turan, D., Ongen, B., Ozyurt, M., Acikel, C.H., Haznadaroglu, T. (2011) The relationship between antibiotic resistance and virulence factors in urinary Enterococcus isolates. *Journal Article, English Abstract*, 430-445

22. Elsner, H. A., Sobottka, I., Mack, D., Claussen, M., Laufs, R., Wirth, R. (2000). Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19 (1): 39-42
23. Furumura, M. T., Figueiredo, P. M. S., Carbonell, G. V., Darini, A. L., Yano, T. (2006) Virulence associated characteristics of *E. faecalis* strains isolated from clinical sources. *Braz. J. of Microbiol.* 37: 230-236
24. Di Rosa, R., Creti, R., Venditti, M., D'Amelio, R., Arciola, C. R., Montanaro, L., Baldassarri, L. (2006). Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 256 (1): 145-150
25. Slika 1. <https://www.klejonka.info/2017eimage-enterococcus-gram-stain.awp>  
(Pristupljeno: Kolovoz, 2017.)
26. Slika 2. [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Biofilms\\_and\\_Human\\_Implants](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Biofilms_and_Human_Implants)  
(Pristupljeno: Kolovoz, 2017.)
27. Slika 3. [https://en.wikipedia.org/wiki/Bile\\_esculin\\_agar#/media/File:Bile\\_esculin\\_agar.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Bile_esculin_agar#/media/File:Bile_esculin_agar.jpg)  
(Pristupljeno: Kolovoz, 2017.)
28. Slika 4. [http://atlas.sund.ku.dk/microatlas/food/bacteria/Enterococcus\\_faecium/](http://atlas.sund.ku.dk/microatlas/food/bacteria/Enterococcus_faecium/)  
(Pristupljeno: Kolovoz, 2017.)
29. Slika 8. <https://www.fishersci.com/shop/products/bd-bbl-prepared-plated-media-bacteroides-bile-esculin-agar-bbe-bacteroides-bile-esculin-agar-bbe-10-pk/121836>  
(Pristupljeno: Kolovoz, 2017.)

## 8. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODACI

Ime i prezime	Nensi Živković
Adresa	Kurirski put 2a, 51 000 Rijeka
Elektronička pošta, Web adresa	<a href="mailto:nz.nensizivkovic@gmail.com">nz.nensizivkovic@gmail.com</a>
Datum i mjesto rođenja	16.04.1993., Rijeka
Državljanstvo	Hrvatsko

### ŠKOLOVANJE

#### DODATNI PODACI

Datum	Rujan 2011. – Rujan 2015.
Mjesto	Rijeka
Ustanova	Medicinski fakultet
Zvanje	Prvostupnik sanitarnog inženjerstva

#### **Sudjelovanje o organizaciji međunarodnih skupova:**

- “Šesta nacionalne konferencija o sigurnosti i kakvoći pčelinjih proizvoda – novi horizonti
- “Peta nacionalna konferencija o sigurnosti i kakvoći pčelinjih proizvoda – više od proizvodnje”, Opatija, 10. Travnja 2015.
- “CroViwo – Croatian Virus Workshop”, Rijeka, 14.11.2014.

#### **Sudjelovanje u radu na studentskim projektima:**

- Aktivno sudjelovanje na studentskom projektu “Čiste ručice” 2013. i 2014. godine

#### **Ostali poslovi:**

- 2014.-danas: Wings tim koordinator za Hrvatsku, Red Bull Adria d.o.o., 10 000 Zagreb