

# ČIMBENICI VIRULENCIJE UROPATOGENIH IZOLATA ENTEROCOCCUS FAECALIS

---

**Stojčević, Ivana**

**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:184:855829>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-27**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ivana Stojčević

ČIMBENICI VIRULENCIJE UROPATOGENIH IZOLATA *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Diplomski rad

Rijeka, 2017

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ivana Stojčević

ČIMBENICI VIRULENCIJE UROPATOGENIH IZOLATA *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

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 68 stranica, 15 slika, 7 tablica, 30 literaturnih navoda

*Zahvaljujem se izvr .prof. dr. sc. Ivani Gobin,. na strpljenju i stručnim savjetima te pomoći oko pisanja diplomskog rada.*

*Hvala obitelji, prijateljima i kolegama koji su bili velika podrška.*

## Sažetak

*Enterococcus faecalis* bakterija je kojoj se nedavno počela pridavati pažnja zbog sve učestalijih što hospitalnih što drugih infekcija. Prirodno se nalaze u crijevima čovjeka i životinja. No kada dospiju na mjesto gdje nisu dio prirodne flore mogu izazvati upale. Najčešće govorimo o mokraćnom sustavu gdje kao posljedicu rasta i razmnožavanja uzrokuju urinoinfekt. u ovom smo radu ispitali čimbenike virulencije te osjetljivost na antibiotike enterokoka izoliranih iz urina.

Od čimbenika virulencije ispitivani su enzimi proteaza, lipaza, želatinaza, katalaza; ispitivana je hidroliza eskulina, hemoliza, rezistencija na lizozim, pokretljivost, izvanstanična sluz i biofilm, te agregacija i osjetljivost na antibiotike. Nakon provedenog istraživanja dokazano je da su svi sojevi katalaza negativni, dok su svi eskulin pozitivni. U više od 80% izolata dokazana je  $\gamma$ -hemoliza. Od ostalih enzima proteazu producira 59% izolata, lipazu 95% i želatinazu 70%. Tendenciju stvaranja biofilma i izvanstanične sluzi posjeduje 73% bakterija. Na koncentraciju od 60 mg/ml lizozima osjetljivo je 35% bakterija, dok su na niže koncentracije lizozima (20, 40 mg/ml lizozima) svi izolati rezistentni. Za agregaciju možemo reći da 31% bakterija agregira u postotku većem od 90%. Od antibiotika važno je izdvojiti gentamicin za kojeg postoji rezistencija kod 23% izolata te na norfloksacin 20% izolata.

*E. faecalis* posjeduju više čimbenika virulencije, između kojih bi istaknula produkciju izvanstanične sluzi i biofilma, te njihovu sposobnost razgradnje kolagena u tijelu pomoću enzima želatinaze.

Ključne riječi: virulencija, patogenost, urinoinfekt, *Enterococcus faecalis*

## Summary

*Enterococcus faecalis* bacterium has recently begun to pay attention due to the more frequent hospital infection and other infections. They are naturally found in the intestinal flora of man and animal. But when they reach a place where they are not part of a natural flora can cause inflammation. Most commonly, we are talking about urinary system, which as a result of growth and reproduction cause urine infestation. In this paper, we investigated virulence factors and sensitivity to the antibiotics of enterococci isolated from urine.

Virulence factors who were investigated are protease enzymes, lipases, gelatinases, catalases; hemolysis, lysozyme resistance, mobility, extracellular mucus and biofilm, aggregation and sensitivity to antibiotics. After the study has been shown, all catalase strains are negative, while they are all esculin positive. In more than 80% of isolates,  $\gamma$ -hemolysis has been proven. Of the other enzymes protease is produced by 59% isolates, 95% lipase and 70% gelatinase. The tendency to create biofilm and extracellular mucus has 73% bacteria. At concentrations of 60 mg / ml lysozyme, 35% bacteria are susceptible, while all isolates with lysozyme lower concentration (20, 40 mg/ml lysozyme) are resistant. For aggregation we can say that 31% of bacteria aggregate in percentage more than 90%. Of the antibiotics it is important to distinguish gentamicin with resistance to 23% of isolates and norfloxacin with 20% isolates.

*E. faecalis* possesses several virulence factors, among which the most important are extracellular mucus production and biofilms production, and their ability to degrade collagen in the body by the gelatin enzyme.

Key words: virulence, pathogenicity, urine infection , *Enterococcus faecalis*

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1 Rod <i>Enterococcus</i> .....	2
1.2. <i>Enterococcus faecalis</i> .....	3
1.2.1. Opće karakteristike .....	3
1.2.2 Patogeneza .....	4
1.2.3 Stvaranje biofilma i izvanstanične sluzi .....	4
1.2.4 Antimikrobna rezistencija .....	5
1.2.5. Rezistencija na vankomicin .....	6
1.2.6 Klinička slika .....	7
1.2.7. Dijagnostika .....	8
1.2.8 Ekologija .....	9
1.3. Infekcije mokraćnih puteva .....	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	12
3. MATERIJAL I METODE .....	13
3.1. Materijali .....	13
3.1.1. Hranjive podloge i mediji .....	14
3.1.2. Bakterijski sojevi .....	16
3.2. Metode ispitivanja .....	21
3.2.1. Određivanje proteaze .....	21
3.2.2. Određivanje lipaze .....	22
3.2.3. Određivanje želatinaze .....	23
3.2.4. Određivanje katalaze .....	24
3.2.5. Određivanje hemolize .....	25
3.2.6. Dokazivanje produkcije izvanstanične sluzi .....	26
3.2.7. Rezistencija na lizozim .....	27
3.2.8. Određivanje pokretljivosti .....	29
3.2.9. Hidroliza eskulina .....	30
3.2.10. Određivanje agregacije bakterija (autoagregacija) .....	31



3.2.11. Osjetljivost na antibiotike .....	32
4. REZULTATI.....	33
4. 1. Rezultati određivanja enzima.....	35
4. 2. Određivanje hemolize .....	38
4. 3. Produkcija biofilma i izvanstanične sluzi .....	39
4. 4. Rezistencija na lizozim .....	42
4.5. Pokretljivost .....	45
4.6. Određivanje hidrolize eskulina .....	45
4.7. Određivanje agregacije .....	45
4.8. Rezultati osjetljivosti na antibiotike.....	48
5. RASPRAVA .....	53
6. ZAKLJUČAK.....	55
7. LITERATURA .....	57
8. ŽIVOTOPIS.....	60

## 1. UVOD

*Enterococcus faecalis* bakterija je kojoj se nedavno počela pridavati pažnja zbog sve učestalijih što hospitalnih što drugih infekcija. Preko 100 sojeva bakterija čine ovu skupinu. Oni su oportunistički patogeni koji uzrokuju infekcije uslijed pada čovjekova imuniteta. Prirodno se nalaze u crijevima čovjeka i životinja. No kada dospiju na mjesto gdje nisu dio prirodne flore mogu izazvati upale. Najčešće govorimo o mokraćnom sustavu gdje kao posljedicu rasta i razmnožavanja uzrokuju urinoinfekt. Takve upale najčešće se javljaju kod imunokompromitiranih osoba, starijih osoba te žena zbog anatomije urinarnog trakta. Kako i zašto do toga dolazi nalazimo odgovore u njihovim svojstvima virulencije. Koje svojstvo i u kolikoj mjeri ga posjeduju otkrivaju njihovu patogenost.

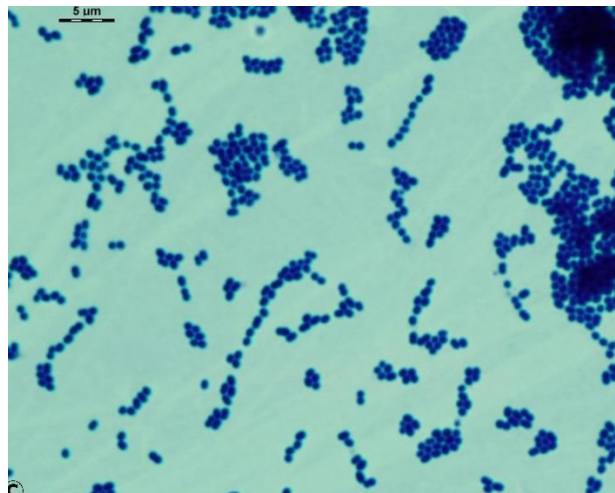
Sojevi *Escherichia coli* sa specifičnim faktorima vezanja za prijelazni epitel mjehura i uretera čine 75 do 95% slučajeva svih slučajeva infekcija urinarnog sustava. Preostali gram-negativni urinarni patogeni obično su druge enterobakterije, tipično *Klebsiella* ili *Proteus mirabilis*, a ponekad i *Pseudomonas aeruginosa*. Među gram-pozitivnim bakterijama, *Staphylococcus saprophyticus* je izoliran u 5 do 10% bakterijskih infekcija. Nakon čega sljede gram-pozitivni bakterijski izolati *Enterococcus faecalis* (1).

Dvije su vrste enterokoka dio normalne fiziološke crijevne flore čovjeka i životinja, *E. faecalis* (90-95%) i *Enterococcus faecium* (5-10%). No u 90% slučajeva infekcije urinarnog trakta izaziva *E. faecalis* (2). S obzirom da su prirodno nastanjeni u crijevnoj flori čovjeka, lako uzorkuju infekcije kada iz crijevne flore pređu na mjesta gdje inače ne obitavaju, poput abdomena ili urinarnog trakta. Infekcije koje uzrokuju enterokoki su sljedeće: infekcije urinarnog trakta,

endokarditis, bakterijemije, infekcije vezane sa postavljanjem katetera te abdominalne infekcije. Problem nastaje kod liječenja infekcija ovakvog tipa jer nakon 2003. godine primjećen je porast kliničkih izolata enterokoka koji su rezistentni na više antibiotika (3).

### 1.1 Rod *Enterococcus*

Rod *Enterococcus* velika su grupa mliječno kiselih bakterija reda *Firmicutes*. Oni su gram pozitivne bakterije koje se najčešće pojavljuju u obliku diplokoka ili kratkih lanaca (slika 1). Zbog sličnih fizičkih karakteristika teško ih je pod mikroskopom razlikovati od streptokoka. Do 1984. godine zapravo su ih i svrstavali u grupu streptokoka D, kada analizom ustanovilo da su to dva odvojena roda. Enterokoki su fakultativno anaerobni organizmi, što znači da mogu preživjeti u kisikom bogatim i kisikom siromašnim uvjetima. Iako nisu sposobni stvarati spore, mogu preživljavati širok raspon okolišnih uvjeta kao što su visoke temperature (do 45°C), pH u rasponu od 4.5-10, te visoke koncentracije soli (4, 5).

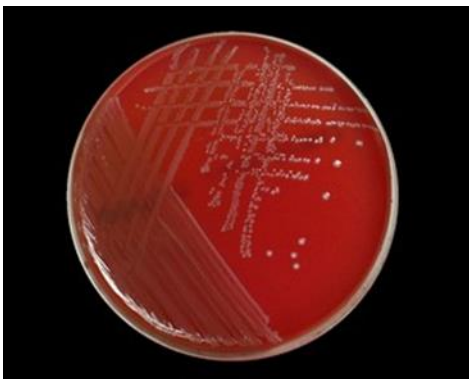


**Slika 1.** Mikroskopski prikaz *Enterococcus faecalis*

## 1.2. *Enterococcus faecalis*

### 1.2.1. Opće karakteristike

*E. faecalis* je gram pozitivna, nepokretna bakterija. Ima sposobnost fermentiranja glukoze ali bez proizvodnje plina, i u principu je katalaza negativna bakterija. Može producirati blagu katalazu reakciju na krvnom agaru. Pokazuje porast na agarima bez posebnih uvjeta što dokazuje da je fakultativni anaerob. Sposobni su katabolizirati različite izvore energije poput glicerola, laktata, citrata, arginina, te velikog broja keto kiselina. Karakteristični su enterokoki pa tako preživljavaju teške okolišne uvjete poput visokih koncentracija soli i visokog pH. Ne smeta im prisutnost žučnih soli, detergenta, etanola i teških metala. Osim toga, temperaturni raspon koji im odgovara za rast je od 10 do 45°C, te preživljavaju temperature od 60 °C čak 30 minuta (5).



**Slika 2.** Porast *E. faecalis* na krvnom agaru **Slika 3.** Porast *E. faecalis* na Columbia agaru

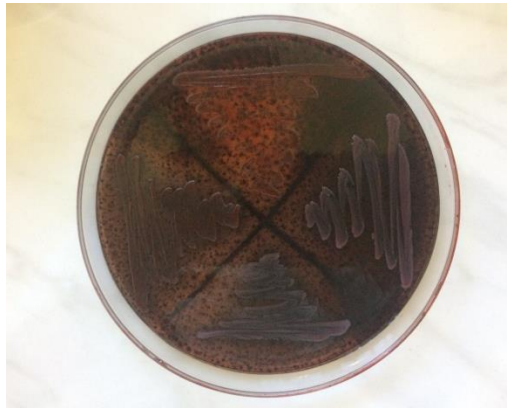
*E. faecalis* na krvnom agaru raste kao sivo- bijele kolonije, okrugloga oblika te su kolonije sluzave i sjajne (slike 2. i 3.).

### **1.2.2 Patogeneza**

*E. faecalis* uzročnik je endokarditisa, septikemije, meningitisa te urinarnih infekcija. Postoji par faktora virulencije koji su zaslužni za patogenost ove bakterije te im omogućavaju rast i razmnožavanje u domaćinu te istovremeno napadanje i oštećivanje organizma domaćina. Nekoliko je proteina, enzima (proteaza, lipaza, hemolizin, želatinaza) i polisaharidnih kapsula uključeno u čimbenike virulencije zbog kojih preživljavaju polimorfonuklerne leukocite i makrofage, koji čine prvu crtu obrambenog mehanizma ljudskog organizma. Uz to, poznato je da posjeduju fizičke obrambene mehanizme za preživljavanje različitih okolišnih uvjeta kao i rezistentnost na neke antibiotske pripravke. Osim toga rezistentni su na lizozim, imaju sposobnost stvaranja biofilma i imaju tendenciju da agregiraju (6, 4).

### **1.2.3 Stvaranje biofilma i izvanstanične sluzi**

Sadržaj hranjivih tvari medija rasta, poput glukoze, seruma, dostupnosti željeza i CO<sub>2</sub>, osmolarnosti, pH i temperature, utječu na proizvodnju biofilma među različitim bakterijama. Ugljikohidratni metabolizam regulira proizvodnju biofilma između različitih gram-pozitivnih bakterija, uključujući *E. faecalis*. Zabilježeno je uključivanje enterokoknih površinskih proteina u formiranju biofilma u prisutnosti veće koncentracije glukoze. Promjene u osmotskoj snazi također utječu na formiranje biofilma u *E. faecalis*. Istraživanje je pokazalo da je proizvodnja biofilma izlaganjem srednjoj ili visokoj osmolarnosti (2-3% natrijevog klorida) prošla bez utjecaja na rast bakterija. Što sugerira da *E. faecalis* prati okoliš i modulira formiranje biofilma kao odgovor na specifične uvjete (7).

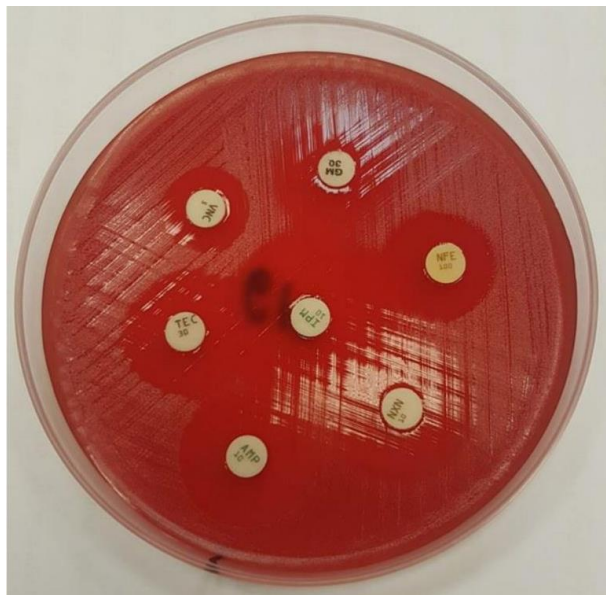


**Slika 4.** Stvaranje izvanstanične sluzi *E. faecalis* na Congo red agaru

Porast bakterije *E. faecalis* na Congo red agaru tipično se razvrstava u dvije skupine, kolonije smeđe boje ili crne sa halo zonom ili crvene kolonije. Crvene kolonije bez pojave halo zone znače da ispitivani soj ne stvara izvanstaničnu sluz te vjerojatno ima manju sposobnost stvaranja biofilma.

#### **1.2.4 Antimikrobna rezistencija**

*E. faecalis* rezistentan je na dosta lijekova koji se obično koriste u tretiranju bakterijskih infekcija poput aminoglikozida, cefalosporina, penicilina. Osim toga sve je češća rezistencija na vankomicin. Poznato je da je *Enterococcus faecium* rezistentnija vrsta od *E. faecalis*. Istraživanje 2011. godine u hrvatskoj pokazalo je kako je na ampicilin rezistentno samo 2% soja *E. faecalis* dok je na isti antibiotik rezistentno 81% soja *E. faecium*. Na gentamicin postoji nešto veći postotak rezistencije *E. faecalis* (30%) i *E. faecium* (58%), dok na vankomicin su te godine pokazali slabu rezistenciju oba soja od samo 1% (7, 8).



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

### ***1.2.5. Rezistencija na vankomicin***

*Enterococcus faecium* i *E. faecalis* uzrok su velike većine svih enterokoknih infekcija. Kada su se krajem osamdesetih godina počeli izolirati sojevi koji su vankomicin rezistentni došlo je do značajne promjene kontrole infekcija enterokoka i njihovog liječenja. Prva pojava rezistentnih sojeva roda *Enterococcus* zabilježena je 1980. godine u Francuskoj i Italiji, čiji se broj vremenom uvećavao, a razlog tome je široka upotreba antibiotika. Utvrđeno je da za mehanizam stečene glikopeptidne rezistencije na vankomicin zapravo je zaslužna skupina gena koji kodiraju alternativni biosintetički put za proizvodnju prekursora stanične stijenke koji loše vežu vankomicin. Za razliku od normalnih prekursora peptidoglikana (PG), koji imaju d-alanil-d-alanin (d-Ala-d-Ala) dipeptidni kraj, kod enterokoka sa rezistencijom na vankomicin završavaju sa depsipeptidom d-alanil-d-laktatom (D-Ala-D-Lac). Ova promjena ciljanog

mjesta za glikopeptidne antibiotike postiže se s nekoliko proteina koji osjete prisutnost lijeka (ili učinak lijeka). Osim toga, vankomicin rezistentni enterokoki često posjeduju plazmide zbog kojih su stekli rezistenciju i na antibiotike aminoglikozide i ampicilin. Zato se u takvim slučajevima koriste noviji antimikrobni lijekovi (linezolid, daptomicin, tigeciklin) (9,10).

### **1.2.6 Klinička slika**

*E. faecalis* gram je pozitivna bakterija, ali za razliku od drugih gram pozitivnih bakterija (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) ne pokazuju virulenciju u takvim granicama. Istraživanja pokazuju da su oportunistički patogeni te najčešće izazivaju infekcije kao posljedicu hospitalizacije bolesnika (9).

Kao uzročnici endokarditisa poznato je da se simptomi javljaju postepeno. Dok se simptomi prepoznaju, najčešće endokarditis pređe u kronični koji nepovratno oštećuje srčane zaliske. Za razliku od endokarditisa, kada jednom dospiju u abdomen i uzrokuju infekciju simptomi nastupaju odmah i naglo te se takva infekcija lako prepoznaje i može se brzo intervenirati i liječiti (10). U organizam često ulaze kroz kirurške rane, inficirane katetere i putem drugih medicinskih uređaja. No najčešći način da dospije u organizam je putem nepravilne higijene ruku jer se mogu naći u fekalnim materijalima zbog njihovog prirodnog obitavanja u tim područjima. Stoga je prijekopotrebna visoka higijena ruku pacijenta sa kateterima i ranama, kao i medicinskog osoblja koji dolaze u konatkt s njima nebi li se takve infekcije spriječile. Kada jednom dospiju u urinarni trakt, izazivaju klasične simptome uroinfekta. Osim boli pri mokrenju, govorimo i o učestalom mokrenju te peckanju. Dijagnoza se lako postavlja na



temelju mikrobiološke pretrage mokraće, to jest urina. Podrazumijeva se provođenje urinokulture sa antibiogramom (11).

Osim u intestinalnom sustavu gdje normalno obitavaju također se u usnoj šupljini mogu naći kao dio normalne flore čovjeka. Upravo zbog toga, u 70% izoliranih slučajeva pronađeni su kao uzročnici parodontitisa usne šupljine (11, 12).

### ***1.2.7. Dijagnostika***

Nijedan medij nije potpuno selektivan i produktivan za sve sojeve enterokoka, ali neki mediji su selektivniji za neke vrste enterokoka, npr. *E. faecalis* i *E. faecium*. Enterokoki dobro rastu u prisutnosti žuči pa je jedan od testova kultivacije i selekcije Bile esculin agar (BEA) koji sadrži žuč, te agar sa dodatkom soli (6,5 % NaCl). Najčešće se kao uzorci uzimaju mokraća, obirisi rana, te krv ako se radi o sepsi (11).

- Test tolerancije *E. faecalis* na prisutnost soli

Test tolerancije na prisutnost soli izvodi se često za identifikaciju enterokoka zbog njihove tolerancije na visoke koncentracije soli. Imaju sposobnost rasta i ramnožavanja u prisutnosti čak 6.5% NaCl ukomponiranog u agar. Rezultati se očitavaju nakon 24 sata u inkubaciji od 37 °C (12).

- Test tolerancije *E. faecalis* na prisutnost žuči ili žučnih soli

Ovaj test naziva se još i Bile-eskulin testom i s njim se kao i sa prethodno navedenim testom lako identificiraju enterokoki zbog njihove sposobnosti hidrolize eskulina u prisutnosti žučnih

soli. Za ovaj test važno je napomenuti da veći broj bakterija je sposoban hidrolizirati sam eskulin, no samo nekolicina njih može to uz prisutnost žuči ili žučnih soli. Rezultati se očitavaju nakon 24-28 sati pod inkubacijom od 37 °C (13).

### **1.2.8 Ekologija**

Osim u crijevima životinja i čovjeka, mogu se naći u hrani, otpadnim vodama i na biljkama jer su ubikvitarnе prirode. Ne smijemo izostaviti da je *E. faecalis* izuzetno prilagodljiv nepovoljnim uvjetima. Nakon što se izloži subletalnim stresnim uvjetima, postaje manje osjetljiv kada dođe do normalno letalnih doza soli, topline, žuči, hiperosmolarnosti, etanola, vodikovog peroksida, kiselosti i lužnatosti (14). U slučaju kada se nađu u nepovoljnim uvjetima, održavaju svoju postojanost što je duže moguće a nakon toga, ako prežive mogu stvoriti rezistenciju na UV zračenje, toplinu, natrijev hipoklorit, vodikov peroksid i etanol. Štoviše, mogu ući u održivo stanje ali se kao takvi ne mogu razmnožavati. To je zapravo mehanizam preživaljavanja koje bakterije usvoje kada se nađu u stresnim uvjetima. Nakon čega se mogu vratiti u normalno stanje kada se okolišni uvjeti poboljšaju. Sposobnost *E. faecalis* da toleriraju i da se adaptiraju na različite okolišne uvjete daje im prednost pred svojom vrstom (15).

### 1.3. Infekcije mokraćnih puteva

Urinarne infekcije česte su infekcije koje mogu zahvatiti mokraćni mjehur ili bubrege. Bilo tko može oboliti od ove vrste infekcije. No upravo zbog anatomije ženskih mokraćnih puteva (kratke uretre) upravo su žene te koje često oboljevaju. Postoje mnogi slučajevi gdje se ove infekcije često vraćaju kod osobe pa ih nazivamo kroničnom upalom. Infekcija mokraćnih puteva zna biti bolna i izuzetno neugodna ali vrlo se lako rješava antibioticima (16).

Simptomi se razlikuju u dva različita slučaja, ako je infekcija lokalizirana na mjehuru ili uretri poznato kao donja infekcija mokraćnih puteva, ili ako je infekcija zahvatila bubrege (gornja urinarna infekcija) (17).

**Tablica 1.** Simptomi infekcije urinarnog trakta

Simptomi infekcije mjehura/ uretre	Simptomi infekcije bubrega
Učestalo mokrenje	Visoka temperatura
Bol i neugoda pri mokrenju	Bol u leđima (u predjelu bubrega)
Nagli osjećaji potrebe za mokrenjem	Tresavica
Otežano mokrenje zbog osjećaja boli	Osjećaj slabosti
Bol u donjem dijelu abdomena	Osjećaj umora
Mutni urin, neobičnog mirisa ili sadrži krv	Te svi simptomi infekcije mjehura

Infekcije donjih mokraćnih puteva češći su i bezopasniji, dok infekcija koja je zahvatila bubrege može izazvati ozbiljne probleme.

## Terapija infekcija mokraćnih puteva

Većina oboljelih od ove vrste infekcije dobiva antibiotsku terapiju. Kako je već napomenuto, dva najčešća uzročnika su *Escherichia coli* i bakterije roda *Enterococcus*. Nakon što se u urinu mikrobiološki dokaže koja je bakterija uzročnik infekcije, prema tome se radi antibiogram te tako izabire najprikladnija terapija (17).

## Prevenција

Kako bi spriječili nastanak ovakve infekcije preporuča se nošenje pamučnog donjeg rublja, dobra hidratacija, pražnjenje mjehura bez retencije, te obavezno pražnjenje mjehura nakon seksualnih odnosa. Osim toga treba izbjegavati česte higijene intimnih djelova sa agresivnim sapunima, izbjegavati kupke. Osim ovih preporuka, često se spominje konzumacija brusnica tokom cijele godine u bilo kojem obliku (sokovi, suhe brusnice, tablete). Zbog svojih svojstava, brusnica sprječava adheriranje bakterija na samu površinu mjehura. A kada do infekcije već dođe, u ranom stadiju pomaže uviš H čaj, koji zbog visokog postotka medvjette opušta mišiće mjehura te dokazano olakšava mokrenje i sprječava širenje infekcije (17, 18).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je utvrditi faktore virulencije bakterija *Enterococcus faecalis* koji su nakon *Escherichie coli* najčešći uzročnici urinarnih infekcija u većine populacije, posebno hospitaliziranih osoba.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Materijali

- Petrijeve ploče
- Inkubator (Termomedicinski aparati Bodalec i Havoic, Dugo selo – Zagreb, Hrvatska)
- Spektrofotometar (“Eppendorf Biophotometer”, Eppendorf, Njemačka)
- Tresilica (“EV-100”, Tehtnica Železniki, Slovenija)
- Automatske pipete:
- 0,5-10  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Njemačka)
- 2-20  $\mu\text{L}$ , 20-100  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$  i 100-1000  $\mu\text{L}$  “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 (“eze”)
- Plastične eze
- Centrifuga sa hlađenjem (“Jouan Centrifuge BR4i multifunction”, Thermo Electron Corporation, USA)
- Mikroeprovete (Eppendorf, Njemačka)
- Plastične kivete za spektrofotometriju

### **3.1.1. Hranjive podloge i mediji**

Za uzgoj mikroorganizama korištene su hranjive podloge i bujoni pripremljeni prema propisanim recepturama. Kemikalije su dobavljene od proizvođača: Kemika, Biolife, Oxoid i Difco.

#### **Krvni agar**

Sastav podloge (g/L): goveđi ekstrakt 10,0 g/L; triptoza 10,0 g/L; natrijev klorid 5,0 g/L; agar 15,0 g/L; destilirana voda. Sterilizacija hranilišta se provodi na 121°C tijekom 15 minuta. Kada se hranilište ohladi na približno 50°C, aseptički se dodaje 5% sterilna defibrinirana ovčija krv. pH vrijednost hranilišta iznosi  $7,4 \pm 0,2$ .

#### **Mueller Hinton agar**

Sastav podloge (g/L): goveđi ekstrakt 0,2 g/L; kazein hidrozilat 17,5 g/L; škrob 1,5 g/L; agar 17,0 g/L; destilirana voda 1 L. Sterilizacija hranilišta provodi se na 121°C tijekom 15 minuta. pH vrijednost hranilišta iznosi  $7,4 \pm 0,2$ .

#### **Mueller Hinton bujon**

Sastav podloge (g/L): goveđi ekstrakt 0,2 g/L; kazein hidrozilat 17,5 g/L; škrob 1,5 g/L; destilirana voda 1 L. Sterilizacija hranilišta provodi se na 121°C tijekom 15 minuta. pH vrijednost hranilišta iznosi  $7,4 \pm 0,2$ .

#### **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

### **Želatina**

200g želatine ugrijana do 50°C u 100 mL destilirane vode. Na 100 mL otopljene želatine dodano je 5,0 g životinjskog uglja (CARBO ANIMALIS) u prahu i dobro je promješano. Smjesa se izlila u Petrijeve zdjelice približno 3 mm debljine tek kada se mješanjem smjesa ohladila. Dno zdjelice premazno je vazelinom. Nakon skrućivanja izvadi se cijeli sloj i stavi u 10% formalin kroz 24 sata. Izreže se u kockic, uvije u gaze i ispiru u vodi 24 sata. Gotovu želatinu stavlja se u bocu širokog grla prelijeva destiliranom vodom do vrha i sterilizira u roku sat vremena.

### **• PBS (eng. phosphate buffered saline)**

Sastav: NaCl 8 g, Kcl 0.2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g

•**Lizozim** (L3790-1 ML, Lysozyme from chicken egg white, Molecular Biology Tested; Sigma)



### 3.1.2. Bakterijski sojevi

U istraživanju bakterijskog soja uključeno je 77 kliničkih izolata *Enterococcus faecalis* (Tablica 2.) koji su prikupljeni u Kliničkom zavodu za kliničku mikrobiologiju iz uzoraka urina pacijenata liječenih u KBC-u u Rijeci. Uzorak urina nasađivao se na kromogenu podlogu HiCrome UTI (HIMEDIA, India). Nakon inkubacije od 24 sata porast malih plavozelenih do plavih kolonija upućivao je porast enterokoka. Nakon preliminarne diferencijacije radila su se dodatna potvrдна ispitivanja, fermentacija arabinoze i eskulina. Krajnja potvrda u identifikaciji određivala se pomoću kartica VITEK 2 GP za uređaj VITEK 2-compact 15 System proizvođača Biomerieux.

Bakterije su čuvane u zamrzivaču na  $-80^{\circ}\text{C}$  te su nasađivane na krvne agare i Mueller Hinton agar.

Inkubirane 24 sata/ $37^{\circ}\text{C}$ .

**Tablica 2.** Uroizolati *Enterococcus faecalis*

<b>R.br.</b>	<b>IZOLAT</b>	<b>Br. izolata</b>	<b>KL. Uzorak</b>
1.	<i>E. faecalis</i>	52491	urin
2.	<i>E. faecalis</i>	52056	urin
3.	<i>E. faecalis</i>	52014	urin
4.	<i>E. faecalis</i>	52836	urin
5.	<i>E. faecalis</i>	52567	urin
6.	<i>E. faecalis</i>	52748	urin
7.	<i>E. faecalis</i>	52203	urin
8.	<i>E. faecalis</i>	52096	urin
9.	<i>E. faecalis</i>	51462	urin
10.	<i>E. faecalis</i>	53012	urin
11.	<i>E. faecalis</i>	53236	urin
12.	<i>E. faecalis</i>	53108	urin
13.	<i>E. faecalis</i>	53292	urin
14.	<i>E. faecalis</i>	53041	urin/ejakulat
15.	<i>E. faecalis</i>	53373	urin
16.	<i>E. faecalis</i>	53379	urin
17.	<i>E. faecalis</i>	53463	urin
18.	<i>E. faecalis</i>	53491	urin
19.	<i>E. faecalis</i>	53484	urin
20.	<i>E. faecalis</i>	39997	urin
21.	<i>E. faecalis</i>	40080	urin
22.	<i>E. faecalis</i>	54674	urin

23.	<i>E. faecalis</i>	54604	urin
24.	<i>E. faecalis</i>	54540	urin
25.	<i>E. faecalis</i>	54537	urin
26.	<i>E. faecalis</i>	54685	urin
27.	<i>E. faecalis</i>	54672	urin
28.	<i>E. faecalis</i>	54631	urin
29.	<i>E. faecalis</i>	54998	urin
30.	<i>E. faecalis</i>	55009	urin
31.	<i>E. faecalis</i>	54946	urin
32.	<i>E. faecalis</i>	54985	urin
33.	<i>E. faecalis</i>	54510	urin
34.	<i>E. faecalis</i>	56115	urin
35.	<i>E. faecalis</i>	55947	urin
36.	<i>E. faecalis</i>	55933	urin
37.	<i>E. faecalis</i>	56711	urin
38.	<i>E. faecalis</i>	56707	urin
39.	<i>E. faecalis</i>	56411	urin
40.	<i>E. faecalis</i>	56818	urin
41.	<i>E. faecalis</i>	56590	urin
42.	<i>E. faecalis</i>	56813	urin
43.	<i>E. faecalis</i>	56803	urin
44.	<i>E. faecalis</i>	56540	urin
45.	<i>E. faecalis</i>	56306	urin
46.	<i>E. faecalis</i>	57439	urin

47.	<i>E. faecalis</i>	57427	urin
48.	<i>E. faecalis</i>	57433	urin
49.	<i>E. faecalis</i>	57470	urin
50.	<i>E. faecalis</i>	55917	urin
51.	<i>E. faecalis</i>	57670	urin
52.	<i>E. faecalis</i>	57513	urin
53.	<i>E. faecalis</i>	58016	urin
54.	<i>E. faecalis</i>	57758	urin
55.	<i>E. faecalis</i>	57913	urin
56.	<i>E. faecalis</i>	58319	urin
57.	<i>E. faecalis</i>	58570	urin
58.	<i>E. faecalis</i>	58151	urin
59.	<i>E. faecalis</i>	58497	urin
60.	<i>E. faecalis</i>	58705	urin
61.	<i>E. faecalis</i>	58268	urin
62.	<i>E. faecalis</i>	58214	urin
63.	<i>E. faecalis</i>	58848	urin
64.	<i>E. faecalis</i>	58022	urin
65.	<i>E. faecalis</i>	58326	urin
66.	<i>E. faecalis</i>	59764	urin
67.	<i>E. faecalis</i>	59801	urin
68.	<i>E. faecalis</i>	59739	urin
69.	<i>E. faecalis</i>	59144	urin
70.	<i>E. faecalis</i>	59271	urin

71.	<i>E. faecalis</i>	59530	urin
72.	<i>E. faecalis</i>	59170	urin
73.	<i>E. faecalis</i>	60306	urin
74.	<i>E. faecalis</i>	60637	urin
75.	<i>E. faecalis</i>	61036	urin
76.	<i>E. faecalis</i>	62269	urin
77.	<i>E. faecalis</i>	64562	urin

### **3.2. Metode ispitivanja**

U ovom istraživanju korišteno je više metoda u svrhu dokazivanja različitih čimbenika virulencije.

Ispitivala se produkcije odabranih enzima:

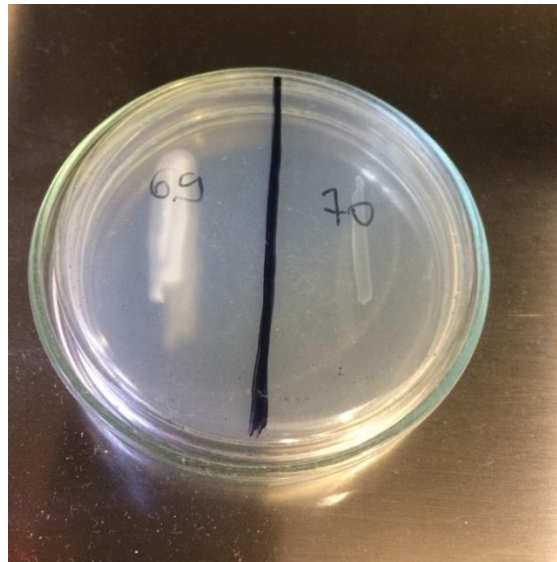
- Proteaze
- Lipaze
- Želatinaze
- Katalaze
- Hemolizina

Ispitivala su se i još neka funkcionalna svojstva enterokoka koja pridonose njihovoj virulenciji:

- Dokaza produkcije izvanstanične sluzi
- Rezistencija na lizozim
- Ispitivanje pokretljivosti
- Hidrolize eskulina
- Sposobnost agregacije
- Osjetljivosti na antibiotike

#### **3.2.1. Određivanje proteaze**

Proteaza (peptidaza ili proteinaza) enzim je koji vrši proteolizu, tj. katabolizam proteina hidrolizom peptidnih veza. Proteaze su pronađene kod ljudi, životinja, gljiva, biljki, bakterija i virusa. Njihova uloga je probavljanje dugih proteina na manje djelove (aminokiseline). Kada govorimo o bakterijskoj proteazi smatramo je endotoksinom koji razara proteine domaćina (2, 19). Posjeduju li bakterijski sojevi enzim proteazu koji je zaslužan za razgradnju različitih proteina ispitali smo na sljedeći način: na Silk milk agru bakterijski soj smo nasadili tankim potezom eze. U slučaju da bakterijski soj posjeduje enzim proteazu, oko poteza ezom nakon inkubacije od 24/48 sati na 37 °C vidljivo bi bakterije porasle što bi značilo da su razgradile proteine enzimom. Ako bakterije ne posjeduju spomenuti enzim bakterije ne bi porasle, rezultat bi bio negativan.



**Slika 6.** Prikaz pozitivne proteaze (lijevo) i negativne (desno)

### 3.2.2. Određivanje lipaze

Lipaza su enzimi koji kataliziraju razgradnju masti, tj. lipida. U čovjeka su izuzetno važni u probavi, dok kod bakterija to čini svojstvo virulencije (20). Kod ispitivanja posjedovanja enzima lipaze postupak je bio sličan kao ispitivanja posjedovanja enzima proteaze. Na Tween 80 agru nasadili smo tankim potezom eze bakterijske sojeve i stavili na inkubaciju. Nakon 24/48 sati inkubacije na 37°C, jasno vidljiva halo zona oko nasađenih bakterija bio je pozitivan znak, to jest, ukazivalo je da bakterijski soj posjeduje enzim lipazu i koristi lipide za svoj rast i razvoj.



**Slika 7.** Prikaz pozitivne lipaze (89) i negativne (86, 87, 88)

### 3.2.3. Određivanje želatinaze



Enzim želatinaza je proteaza koja je zaslužna za razgradnju kolagena, kazeina, hemoglobina, želatina i drugih peptida u organizmu. U životinjskom modelu bakterije koje posjeduju ovaj enzim uzrokuju endokarditis (21). Kako bi provjerili da li bakterijski sojevi posjeduju ovaj enzim, koristili smo metodu u kojoj smo u bakterijski inokulum umješali u jednom mililitru fiziološke otopine u epruveti i ubacili želatinu veličine oko 5x5 milimetra. Rezultate smo očitali nakon prve inkubacije od 48 sati na 37°C i nakon druge inkubacije od dva tjedna koliko je potrebno da ga bakterije razgrade. U slučaju pozitivne želatinaze, dolazi do razgradnje želatina, otopina se boji u crno. Kod negativnog rezultata komadić želatine ostaje vidljiv u epruveti.



**Slika 8.** Epruveta 1- Pozitivna želatinaza; epruveta 2- Negativna želatinaza

#### **3.2.4. Određivanje katalaze**

Katalaza je enzim čiji je zadatak razgradnja vodikovog peroksida na kisik i vodu. Iz tog razloga važan je u antioksidacijskoj zaštiti organizma. Prisutna je u većini organizama. Ako bakterija posjeduje ovaj enzim, to joj omogućuje zaštitu od obrambenog mehanizma (imuniteta) domaćina (21). Katalaza test se vrlo jednostavno ispituje. Na predmetnom stakalcu kap vodikovog peroksida se kapne te uz pomoć eze se umuti bakterijski soj. U slučaju pozitivne reakcije nastat će mjehurići kao znak raspada vodikovog peroksida na vodu i kisik. U slučaju odsustva ovog enzima kod bakterije, nakon umućenja soja u kapljici vodikovog peroksida, kapljica ostaje mliječno zamućena i test se očitava negativnim.



**Slika 9.** Negativni test katalaze (lijevo) i pozitivni (desno)

### 3.2.5 Određivanje hemolize

Hemoliza se u mikrobiologiji koristi kako bi se utvrdilo da li mikroorganizmi, u našem slučaju bakterije, razgrađuju eritrocite. To je moguće ako posjeduju enzim hemolizin. Prema sposobnosti razgradnje eritrocita i hemoglobina na krvnom agaru možemo ralikovati: alfa, beta i gama hemoliza. Alfa hemoliza označava da dolazi do oksidacije hemoglobina i pritom se oko kolonije stvara uska tamnozeleno-zelena zona, još se naziva nepotpunom ili djelomičnom hemolizom. Beta hemoliza ili potpuna hemoliza ukazuje na potpuni raspad krvnih stanica a na krvnom agaru su jasno vidljive prozirne halo zone oko kolonije. Dok gama hemoliza označava izostanak hemolize, tj. nesposobnost razgradnje eritrocita i hemoglobina (4, 22). Ovo svojstvo se vrlo jednostavno provjerava nasađivanjem bakterijskog soja na krvni agar (ovčja ili konjska krv. Ploče se očitavaju nakon 24 ili 48 sati na 37°C .



**Slika 10.** Hemoliza *E. faecalis*

### **3.2.6. Dokazivanje produkcije izvanstanične sluzi**

Stvaranje biofilma izuzetno je važno svojstvo virulencije. Biofilm je zapravo skupina mikroorganizama koja se međusobno povezala i adherirala na neku površinu te tako komuniciraju, rastu i razmnožavaju se te lakše preživljavaju različite okolišne uvjete (22). Da li i kakav biofilm stvaraju saznali smo nasađivanjem bakterija na Congo red agar i inkubacijom od 24 sata na 37°C. Produkcija izvanstanične sluzi i posljedično stvaranje biofilma gdje bakterije adheriraju i međusobno se povezuju očitava se stvaranjem crne halo zone i tamnjenjem kolonija u tamnosmeđu do crnu boju.

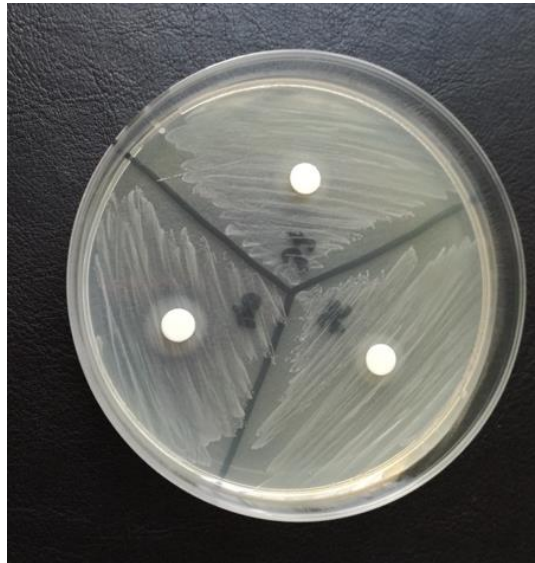


**Slika 11.** Prikaz stvorene izvanstanične sluzi

### **3.2.7. Rezistencija na lizozim**

Lizozim je enzim pomoću kojeg se organizmi brane od patogenih mikroorganizama. Poznat je pod nazivom „antibiotik tijela“ (23). Rezistenciju bakterija na lizozim ispitivali smo na dva načina.

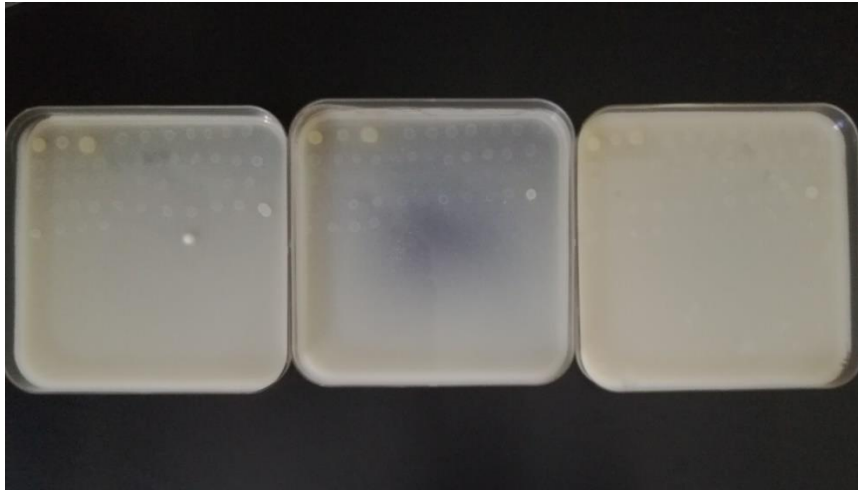
Prvi način disk-difuzijske metode uključivao je Mueller Hintonov agar na kojem smo nasadili bakterije na gusto sa brisnim štapićem nakon čega smo celulozne diskove promjera 5 milimetra stavili na sredinu nasadenih bakterija, i natopili sa 5 mikrolitara lizozima. Ploče su išle na inkubaciju 24 sata na 37°C. Pozitivan rezultat pokazao bi porast bakterija sve do diska neometano, što znači da su bakterije rezistente na lizozim. U slučaju kad bakterije ne bi porasle oko diska značilo bi da su osjetljive na lizozim te im to nije faktor virulencije.



**Slika 12.** Disk- difuzijska metoda (negativni rezultati)

U drugoj metodi, metodi agar dilucije koristili smo lizozimske ploče koncentracije od 20, 40 i 60 mg/mL lizozima. Bakterije smo nasadili iz prethodno pripremljenog bakterijskog inokuluma

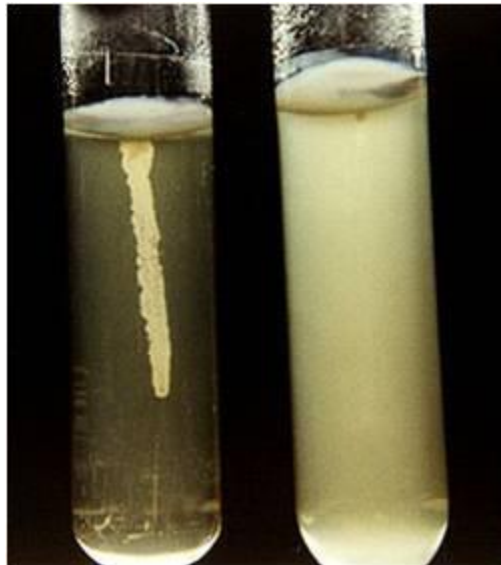
koncentracije bakterija  $1 \times 10^9$  cfu/mL koje smo računski namjestili pomoću spektrofotometra i apsorbancije. Nanošenje lizozima smo izvršili nakapavanjem kapi od 5 mikrolitara sa automatskim pipetama. Inkubirali smo ploče 24 sata na  $37^\circ\text{C}$ . Rezultati su lako vidljivi nakon inkubacije. U slučaju da je bakterijski soj porastao, rezultat je pozitivan, soj je rezistentan na lizozim. Ako je porast izostao, soj nije rezistentan, rezultat je negativan.



**Slika 13.** Metoda agar dilucije (20, 40, 60 mg/mL lizozima u agaru)

### 3.2.8. Određivanje pokretljivosti

Pokretljivost bakterija daje nam uvid kreću li se bakterije više ili manje u organizmu domaćina. Veća pokretljivost svakako označava važno svojstvo virulencije jer tako bakterija može doprijeti s jednog mjesta na drugo u kratkom vremenskom roku, uzrokovati simptome brže i lakše širiti infekciju (24). Pokretljivost smo ispitali nasađivanjem bakterijskog soja tankim ubodom u sredinu u epruvetu u kojoj se nalazilo 2 mililitra Mueller Hintonovog bujona u čvrstom agregatnom stanju. Rezultati su se očitavali nakon 24 i 48 sati na 37 °C. Pozitivni rezultati ukazivali bi na tanke bijele crte koje su se proširile sve do ruba epruvete ili bijeli takozvani mutni oblaci koji su se proširili od ruba uboda bakterijskog soja. Negativni rezultat zapravo je samo porast bakterija oko mjesta uboda.



**Slika 14.** Test pokretljivosti u epruveti (lijevo negativno) (desno pozitivno)

### 3.2.9. Hidroliza eskulina

Eskulin je glukozid kojeg prirodno nalazimo u kestenu. U mikrorbiologiji se koristi kao dodatak agarima kako bi se potvrdila identifikacija nekih bakterija koje imaju sposobnost razgradnje tog glukozida svojim enzimima. *Enterococci spp.* i *Listeria monocytogenes* uglavnom posjeduju ovaj enzim (25). Određivanje se vrši nasađivanjem bakterijske suspenzije na Agar sa žučnim solima i eskulinu (engl. Bile Esculin agar (BEA)) te pušta na inkubaciji 24 sata na 37. Pozitivan rezultat bila bi pojava crnih kolonija na podlozi, što znači da su bakterije hidrolizirale eskulin.



**Slika 15.** Porast *E. faecalis* na BAE agaru

### 3.2.10. Određivanje agregacije bakterija (autoagregacija)



Agregacija je svojstvo koje kod bakterija podrazumijeva njihovo nakupljanje na jednom mjestu te si tako omogućuju lakši rast i razmnožavanje. Feromonski inducibilni površinski protein zapravo potiče stvaranje nakupljanja agregata tijekom bakterijske konjugacije. U organizmu, agregacija može pridonijeti patogenezu enterokokne infekcije kroz niz mehanizama. Osim poticanja kontakta između stanice domaćina i bakterija, agregacija im omogućuje adheziju na stanice te time povećavaju hidrofobnost stanične površine (26).

Ispitivanje smo proveli zamućivanjem svakog pojedinog bakterijskog soja u epruveti sa 3 mL fiziološke otopine. Cilj nam je bio dobiti otprilike  $1 \times 10^9$  cfu/mL bakterija. Sljedeći korak bio je ostaviti epruvete sa bakterijskim suspenzijama 24 sata da miruju. Nakon što to vrijeme prođe očekivano je da bakterije agregiraju na dnu epruvete što je golim okom vidljivo. Manje ili više, u gornjem dijelu epruvete ostaje bezbojna prozirna fiziološka, dok se na dnu jasno vidi zamućenje zbog velike koncentracije agregiranih bakterija. Korak koji slijed zahtjeva lagano pipetiranje gornjeg dijela fiziološke otopine u kivete za određivanje apsorbancije na spektrofotometru. Ponovno mjerenje apsorbancije potrebno je kako bi računski dobili postotak agregiranih bakterija. Agregaciju smo izračunali po formuli

$$\text{Agregacija} = 1 - (A_t/A_0) \times 100.$$

$A_t$  predstavlja apsorbanciju izmjerenu u određeno vrijeme (nakon 24 sata) a  $A_0$  predstavlja početnu apsorbanciju.

### **3.2.11. Osjetljivost na antibiotike**

Testiranje antimikrobne osjetljivosti provodi se disk difuzijskom metodom pomoću antibiotskih diskova u sljedećim koncentracijama: 2,0 µg ampicilin, 30,0 µg gentamicin, 30,0 µg norfloksacin, 10,0 µg imipenem, 5,0 µg vankomicin, 30,0 µg teikoplanin (Bio-Rad, Francuska). 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

#### **4. REZULTATI**

Nakon ispitivanja odabranih čimbenika virulencije rezultati ukazuju da svaki soj ima posebnosti u svojoj virulenciji, te iako svi sojevi pripadaju vrsti bakterija *Enterococcus faecalis* ne možemo zanemariti činjenicu da se svaki soj razlikuje. Svako svojstvo virulencije važno je samo po sebi, a koji od faktora posjeduje bakterija to ju čini više ili manje patogenom.

#### 4. 1. Rezultati određivanja enzima

Od ukupno 77 ispitanih bakterija, proteaza pozitivne pokazale su se 31 bakterija (40,2 % bakterija), što znači da je većina negativna. Lipaza pozitivne su 73 bakterije, tj. više od 95% ispitanih bakterija. Enzim želatinazu posjeduje 30 ispitanih bakterija (38,9 % bakterija), što je manje od polovice ispitanih. Kod izvođenja testa katalaze uočena je blaga reakcija u 60 izolata, koja se u usporedbi s kontrolom (*Staphylococcus aureus*) pokazala negativnom.

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

Red.br.	Izolat	Oznaka izol.	Proteaza	Lipaza	Želatinaza	Katalaza
1.	<i>E. faecalis</i>	52491	+	+	++	-
2.	<i>E. faecalis</i>	52056	-	+	-	-
3.	<i>E. faecalis</i>	52014	-	+	-	-
4.	<i>E. faecalis</i>	52836	+	+	++	-
5.	<i>E. faecalis</i>	52567	-	+	-	-
6.	<i>E. faecalis</i>	52748	-	+	-	-
7.	<i>E. faecalis</i>	52203	+	+	++	-
8.	<i>E. faecalis</i>	52096	-	+	-	-
9.	<i>E. faecalis</i>	51462	-	+	-	-
10.	<i>E. faecalis</i>	53012	+	+	++	-
11.	<i>E. faecalis</i>	53236	+	+	++	-
12.	<i>E. faecalis</i>	53108	+	+	-	-
13.	<i>E. faecalis</i>	53292	-	+	-	-
14.	<i>E. faecalis</i>	53041	+	+	++	-

15.	<i>E. faecalis</i>	53373	-	+	-	-
16.	<i>E. faecalis</i>	53379	+	+	++	-
17.	<i>E. faecalis</i>	53463	-	+	-	-
18.	<i>E. faecalis</i>	53491	-	+	-	-
19.	<i>E. faecalis</i>	53484	-	+	-	-
20.	<i>E. faecalis</i>	39997	-	+		-
21.	<i>E. faecalis</i>	40080	+	+	++	-
22.	<i>E. faecalis</i>	54674	+	+	++	-
23.	<i>E. faecalis</i>	54604	+	+	++	-
24.	<i>E. faecalis</i>	54540	-	+	-	-
25.	<i>E. faecalis</i>	54537	+	+	++	-
26.	<i>E. faecalis</i>	54685	-	+	-	-
27.	<i>E. faecalis</i>	54672	-	+	-	-
28.	<i>E. faecalis</i>	54631	-	+	-	-
29.	<i>E. faecalis</i>	54998	-	+	-	-
30.	<i>E. faecalis</i>	55009	+	+	++	-
31.	<i>E. faecalis</i>	54946	+	+	++	-
32.	<i>E. faecalis</i>	54985	-	+	-	-
33.	<i>E. faecalis</i>	54510	+	+	++	-
34.	<i>E. faecalis</i>	56115	-	+	-	-
35.	<i>E. faecalis</i>	55947	-	+	-	-
36.	<i>E. faecalis</i>	55933	-	+	-	-
37.	<i>E. faecalis</i>	56711	+	+	++	-
38.	<i>E. faecalis</i>	56707	-	+	-	-

39.	<i>E. faecalis</i>	56411	+	+	++	-
40.	<i>E. faecalis</i>	56818	-	-	-	-
41.	<i>E. faecalis</i>	56590	-	+	-	-
42.	<i>E. faecalis</i>	56813	-	+	-	-
43.	<i>E. faecalis</i>	56803	-	+	-	-
44.	<i>E. faecalis</i>	56540	+	+	++	-
45.	<i>E. faecalis</i>	56306	-	+	-	-
46.	<i>E. faecalis</i>	57439	+	+	++	-
47.	<i>E. faecalis</i>	57427	-	+	-	-
48.	<i>E. faecalis</i>	57433	-	+	-	-
49.	<i>E. faecalis</i>	57470	+	+	++	-
50.	<i>E. faecalis</i>	55917	-	+	-	-
51.	<i>E. faecalis</i>	57670	+	+	-	-
52.	<i>E. faecalis</i>	57513	-	-	-	-
53.	<i>E. faecalis</i>	58016	-	+	-	-
54.	<i>E. faecalis</i>	57758	-	+	++	-
55.	<i>E. faecalis</i>	57913	-	+	++	-
56.	<i>E. faecalis</i>	58319	+	+	++	-
57.	<i>E. faecalis</i>	58570	-	+	++	-
58.	<i>E. faecalis</i>	58151	+	+	-	-
59.	<i>E. faecalis</i>	58497	-	+	-	-
60.	<i>E. faecalis</i>	58705	-	+	++	-
61.	<i>E. faecalis</i>	58268	+	+	-	-
62.	<i>E. faecalis</i>	58214	-	+	++	-

63.	<i>E. faecalis</i>	58848	-	+	-	-
64.	<i>E. faecalis</i>	58022	-	+	-	-
65.	<i>E. faecalis</i>	58326	-	+	++	-
66.	<i>E. faecalis</i>	59764	+	+	-	-
67.	<i>E. faecalis</i>	59801	+	+	-	-
68.	<i>E. faecalis</i>	59739	+	-	-	-
69.	<i>E. faecalis</i>	59144	+	+	-	-
70.	<i>E. faecalis</i>	59271	-	+	++	-
71.	<i>E. faecalis</i>	59530	-	+	-	-
72.	<i>E. faecalis</i>	59170	+	+	-	-
73.	<i>E. faecalis</i>	60306	-	-	++	-
74.	<i>E. faecalis</i>	60637	+	+	-	-
75.	<i>E. faecalis</i>	61036	-	+	-	-
76.	<i>E. faecalis</i>	62269	-	+	++	-
77.	<i>E. faecalis</i>	64562	+	+	++	-

#### 4. 2. Određivanje hemolize

*Enterococcus faecalis* poznati su kao gama hemoliza ( $\gamma$ -hemoliza) bakterije. U ovom je istraživanju ipak se pokazalo da postoje mala odstupanja. Da su gama hemolitičke bakterije pokazalo se njih 64 od ispitanih 77 bakterija, od preostalih 13, 9 bakterija je pokazalo alfa hemolize, te njih 4 beta hemolize.

### 4. 3. Produkcija biofilma i izvanstanične sluzi

Bakterije su izuzetno raznoliko porasle na Congo red agaru, ali produkcija biofilma označvala bi samo one sojeve koje su producirale smeđe i crne kolonije sa izvanstaničnom sluzi. Karakteristično smeđe kolonije sa halo zonom imaju 58 od 77 bakterija (75,3 % bakterija). Dok su izrazito crne kolonije samo 6 soja producirala. Ostatak (13 sojeva) koji je porastao bez izvanstanične sluzi i sivih kolonija interpretiramo kao da ne produciraju izvanstaničnu sluz i stoga nemaju sposobnost stvaranja biofilma (16,8 % bakterija)

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

Red.br.	Izolat	Oznaka izolata	Izgled kolonija
1.	<i>E. faecalis</i>	52491	Smeđe s halo zonom
2.	<i>E. faecalis</i>	52056	Smeđe s halo zonom
3.	<i>E. faecalis</i>	52014	Sive
4.	<i>E. faecalis</i>	52836	Smeđe s halo zonom
5.	<i>E. faecalis</i>	52567	Sive
6.	<i>E. faecalis</i>	52748	Smeđe s halo zonom
7.	<i>E. faecalis</i>	52203	Sive
8.	<i>E. faecalis</i>	52096	Sive
9.	<i>E. faecalis</i>	51462	Sive
10.	<i>E. faecalis</i>	53012	Sive
11.	<i>E. faecalis</i>	53236	Sive
12.	<i>E. faecalis</i>	53108	Sive
13.	<i>E. faecalis</i>	53292	Crne



14.	<i>E. faecalis</i>	53041	Crne
15.	<i>E. faecalis</i>	53373	Crne
16.	<i>E. faecalis</i>	53379	Crne
17.	<i>E. faecalis</i>	53463	Sive
18.	<i>E. faecalis</i>	53491	Smeđe s halo zonom
19.	<i>E. faecalis</i>	53484	Sive
20.	<i>E. faecalis</i>	39997	Smeđe s halo zonom
21.	<i>E. faecalis</i>	40080	Smeđe s halo zonom
22.	<i>E. faecalis</i>	54674	Sive
23.	<i>E. faecalis</i>	54604	Smeđe s halo zonom
24.	<i>E. faecalis</i>	54540	Smeđe s halo zonom
25.	<i>E. faecalis</i>	54537	Smeđe s halo zonom
26.	<i>E. faecalis</i>	54685	Sive
27.	<i>E. faecalis</i>	54672	Smeđe s halo zonom
28.	<i>E. faecalis</i>	54631	Sive
29.	<i>E. faecalis</i>	54998	Smeđe s halo zonom
30.	<i>E. faecalis</i>	55009	Smeđe s halo zonom
31.	<i>E. faecalis</i>	54946	Smeđe s halo zonom
32.	<i>E. faecalis</i>	54985	Smeđe s halo zonom
33.	<i>E. faecalis</i>	54510	Smeđe s halo zonom
34.	<i>E. faecalis</i>	56115	Smeđe s halo zonom
35.	<i>E. faecalis</i>	55947	Smeđe s halo zonom
36.	<i>E. faecalis</i>	55933	Smeđe s halo zonom
37.	<i>E. faecalis</i>	56711	Smeđe s halo zonom
38.	<i>E. faecalis</i>	56707	Smeđe s halo zonom

39.	<i>E. faecalis</i>	56411	Smeđe s halo zonom
40.	<i>E. faecalis</i>	56818	Smeđe s halo zonom
41.	<i>E. faecalis</i>	56590	Smeđe s halo zonom
42.	<i>E. faecalis</i>	56813	Smeđe s halo zonom
43.	<i>E. faecalis</i>	56803	Smeđe s halo zonom
44.	<i>E. faecalis</i>	56540	Smeđe s halo zonom
45.	<i>E. faecalis</i>	56306	Smeđe s halo zonom
46.	<i>E. faecalis</i>	57439	Smeđe s halo zonom
47.	<i>E. faecalis</i>	57427	Smeđe s halo zonom
48.	<i>E. faecalis</i>	57433	Smeđe s halo zonom
49.	<i>E. faecalis</i>	57470	Smeđe s halo zonom
50.	<i>E. faecalis</i>	55917	Smeđe s halo zonom
51.	<i>E. faecalis</i>	57670	Smeđe s halo zonom
52.	<i>E. faecalis</i>	57513	Smeđe s halo zonom
53.	<i>E. faecalis</i>	58016	Smeđe s halo zonom
54.	<i>E. faecalis</i>	57758	Smeđe s halo zonom
55.	<i>E. faecalis</i>	57913	Smeđe s halo zonom
56.	<i>E. faecalis</i>	58319	Crne
57.	<i>E. faecalis</i>	58570	Smeđe s halo zonom
58.	<i>E. faecalis</i>	58151	Smeđe s halo zonom
59.	<i>E. faecalis</i>	58497	Smeđe s halo zonom
60.	<i>E. faecalis</i>	58705	Smeđe s halo zonom
61.	<i>E. faecalis</i>	58268	Smeđe s halo zonom
62.	<i>E. faecalis</i>	58214	Smeđe s halo zonom
63.	<i>E. faecalis</i>	58848	Smeđe s halo zonom

64.	<i>E. faecalis</i>	58022	Smeđe s halo zonom
65.	<i>E. faecalis</i>	58326	Smeđe s halo zonom
66.	<i>E. faecalis</i>	59764	Smeđe s halo zonom
67.	<i>E. faecalis</i>	59801	Smeđe s halo zonom
68.	<i>E. faecalis</i>	59739	Smeđe s halo zonom
69.	<i>E. faecalis</i>	59144	Smeđe s halo zonom
70.	<i>E. faecalis</i>	59271	Smeđe s halo zonom
71.	<i>E. faecalis</i>	59530	Smeđe s halo zonom
72.	<i>E. faecalis</i>	59170	Smeđe s halo zonom
73.	<i>E. faecalis</i>	60306	Smeđe s halo zonom
74.	<i>E. faecalis</i>	60637	Smeđe s halo zonom
75.	<i>E. faecalis</i>	61036	Smeđe s halo zonom
76.	<i>E. faecalis</i>	62269	Smeđe s halo zonom
77.	<i>E. faecalis</i>	64562	Crne

#### 4. 4. Rezistencija na lizozim

Bakterijsku rezistenciju na lizozim ispitivali smo pomoću dvije metode. Prva metoda (disk-difuzijska) pokazala je sve jednake pozitivne rezultate, stoga smo u sumnji provjerili rezultat još jednom metodom kako bi to mogli utvrditi sa sigurnošću (metoda agar dilucije). Ispostavilo se da je metoda agar dilucije bila preciznija i bolja, stoga smo prvu metodu sa diskovima smatrali neuspješnom i nevažecom. Druga metoda uključivala je tri Mueller Hinton ploče sa tri različite koncentracije lizozima (20, 40, 60 mg/mL lizozima). U tablici 5. su navedeni rezultati.

**Tablica 5.** Rezistencija *E. faecalis* na lizozim

Red.br.	Izolat	Oznaka izolata	Ly 20 mg/mL	Ly 40 mg/mL	Ly 60 mg/mL
1.	<i>E. faecalis</i>	52491	+	+	+
2.	<i>E. faecalis</i>	52056	+	+	+
3.	<i>E. faecalis</i>	52014	+	+	+
4.	<i>E. faecalis</i>	52836	+	+	+
5.	<i>E. faecalis</i>	52567	+	+	+
6.	<i>E. faecalis</i>	52748	+	+	+
7.	<i>E. faecalis</i>	52203	+	+	+
8.	<i>E. faecalis</i>	52096	+	+	+
9.	<i>E. faecalis</i>	51462	+	+	+
10.	<i>E. faecalis</i>	53012	+	+	+
11.	<i>E. faecalis</i>	53236	+	+	+
12.	<i>E. faecalis</i>	53108	+	+	+
13.	<i>E. faecalis</i>	53292	+	+	+
14.	<i>E. faecalis</i>	53041	+	+	-
15.	<i>E. faecalis</i>	53373	+	+	-
16.	<i>E. faecalis</i>	53379	+	+	-
17.	<i>E. faecalis</i>	53463	+	+	-
18.	<i>E. faecalis</i>	53491	+	+	-
19.	<i>E. faecalis</i>	53484	+	+	-
20.	<i>E. faecalis</i>	39997	+	+	+
21.	<i>E. faecalis</i>	40080	+	+	-
22.	<i>E. faecalis</i>	54674	+	+	+
23.	<i>E. faecalis</i>	54604	+	+	-
24.	<i>E. faecalis</i>	54540	+	+	+
25.	<i>E. faecalis</i>	54537	+	+	+
26.	<i>E. faecalis</i>	54685	+	+	+
27.	<i>E. faecalis</i>	54672	+	+	+
28.	<i>E. faecalis</i>	54631	+	+	-
29.	<i>E. faecalis</i>	54998	+	+	+
30.	<i>E. faecalis</i>	55009	+	+	+
31.	<i>E. faecalis</i>	54946	+	+	+
32.	<i>E. faecalis</i>	54985	+	+	+
33.	<i>E. faecalis</i>	54510	+	+	+
34.	<i>E. faecalis</i>	56115	+	+	-
35.	<i>E. faecalis</i>	55947	+	+	-

36.	<i>E. faecalis</i>	55933	+	+	+
37.	<i>E. faecalis</i>	56711	+	+	+
38.	<i>E. faecalis</i>	56707	+	+	+
39.	<i>E. faecalis</i>	56411	+	+	+
40.	<i>E. faecalis</i>	56818	+	+	-
41.	<i>E. faecalis</i>	56590	+	+	-
42.	<i>E. faecalis</i>	56813	+	+	-
43.	<i>E. faecalis</i>	56803	+	+	-
44.	<i>E. faecalis</i>	56540	+	+	+
45.	<i>E. faecalis</i>	56306	+	+	+
46.	<i>E. faecalis</i>	57439	+	+	+
47.	<i>E. faecalis</i>	57427	+	+	+
48.	<i>E. faecalis</i>	57433	+	+	+
49.	<i>E. faecalis</i>	57470	+	+	+
50.	<i>E. faecalis</i>	55917	+	+	+
51.	<i>E. faecalis</i>	57670	+	+	+
52.	<i>E. faecalis</i>	57513	+	+	+
53.	<i>E. faecalis</i>	58016	+	+	+
54.	<i>E. faecalis</i>	57758	+	+	+
55.	<i>E. faecalis</i>	57913	+	+	+
56.	<i>E. faecalis</i>	58319	+	+	-
57.	<i>E. faecalis</i>	58570	+	+	-
58.	<i>E. faecalis</i>	58151	+	+	-
59.	<i>E. faecalis</i>	58497	+	+	+
60.	<i>E. faecalis</i>	58705	+	+	-
61.	<i>E. faecalis</i>	58268	+	+	+
62.	<i>E. faecalis</i>	58214	+	+	+
63.	<i>E. faecalis</i>	58848	+	+	+
64.	<i>E. faecalis</i>	58022	+	+	+
65.	<i>E. faecalis</i>	58326	+	+	-
66.	<i>E. faecalis</i>	59764	+	+	-
67.	<i>E. faecalis</i>	59801	+	+	-
68.	<i>E. faecalis</i>	59739	+	+	+
69.	<i>E. faecalis</i>	59144	+	+	+
70.	<i>E. faecalis</i>	59271	+	+	+
71.	<i>E. faecalis</i>	59530	+	+	+
72.	<i>E. faecalis</i>	59170	+	+	-
73.	<i>E. faecalis</i>	60306	+	+	+
74.	<i>E. faecalis</i>	60637	+	+	+

75.	<i>E. faecalis</i>	61036	+	+	-
76.	<i>E. faecalis</i>	62269	+	+	+
77.	<i>E. faecalis</i>	64562	+	+	+

„+“ oznaka- označava porast bakterija, tj. rezistenciju na lizozim

U koncentracijama lizozima 20 i 40 mg/mL lizozima svi sojevi pokazuju rezistenciju na lizozim. Tek na koncentraciji od 60 mg/mL 24 bakterije pokazuju osjetljivost, tj. nije bilo porasta bakterija. Stoga možemo zaključiti da na koncentraciju 20 i 40 mg/mL lizozima su svi izolati (100%) rezistentni, tj. pokazali su porast na pločama. Tek na koncentraciji 60 mg/mL lizozima postotak rezistentnih bakterija pada na 65% (24 bakterije pokazuju osjetljivost na lizozim).

#### 4.5. Pokretljivost

Pokretne su samo dvije od navedenih 77 bakterija, što je uspoređujući sa drugim istraživanjima zapravo ispravno jer *E. faecalis* spadaju u principu u nepokretne bakterije.

#### 4.6. Određivanje hidrolize eskulina

Svi sojevi *E. faecalis* pokazuju pozitivan rezultat hidrolize eskulina nakon 24 sata na 37°C, što potvrđuje da su eskulin pozitivni.

#### 4.7. Određivanje agregacije

Od 77 ispitanih bakterija, ovim testom pokazalo se da sve agregiraju, ali ne u jednakom postotku. Iz tablice je vidljivo da većina bakterija (96,2 %) agregira u postotku većem od 70%. Dok 31% ukupno ispitanih bakterija agregira u postotku većem od 90%. U kojem postotku koja bakterija agregira možemo vidjeti u sljedećoj tablici.

**Tablica 6.** Prikaz agregiranih bakterija u postotcima (%)

Red.br.	Izolat	Oznaka izolata	Nulta A	A nakon 24 sata	Agregacija u %
1.	<i>E. faecalis</i>	52491	0.722	0.024	<b>96.67</b>
2.	<i>E. faecalis</i>	52056	0.786	0.156	<b>80.15</b>
3.	<i>E. faecalis</i>	52014	0.283	0.610	<b>73.11</b>
4.	<i>E. faecalis</i>	52836	0.984	0.145	<b>85.26</b>
5.	<i>E. faecalis</i>	52567	0.656	0.077	<b>83.26</b>
6.	<i>E. faecalis</i>	52748	0.744	0.104	<b>86.02</b>
7.	<i>E. faecalis</i>	52203	0.691	0.085	<b>87.69</b>
8.	<i>E. faecalis</i>	52096	0.721	0.126	<b>82.52</b>
9.	<i>E. faecalis</i>	51462	0.627	0.129	<b>79.43</b>
10.	<i>E. faecalis</i>	53012	0.457	0.057	<b>87.52</b>
11.	<i>E. faecalis</i>	53236	0.724	0.063	<b>91.29</b>
12.	<i>E. faecalis</i>	53108	0.675	0.205	<b>79.63</b>
13.	<i>E. faecalis</i>	53292	0.612	0.078	<b>87.25</b>
14.	<i>E. faecalis</i>	53041	0.616	0.116	<b>81.17</b>
15.	<i>E. faecalis</i>	53373	0.697	0.120	<b>82.78</b>
16.	<i>E. faecalis</i>	53379	0.873	0.168	<b>80.75</b>
17.	<i>E. faecalis</i>	53463	0.595	0.085	<b>85.71</b>
18.	<i>E. faecalis</i>	53491	0.805	0.029	<b>96.39</b>
19.	<i>E. faecalis</i>	53484	0.732	0.175	<b>76.09</b>
20.	<i>E. faecalis</i>	39997	0.994	0.132	<b>78.12</b>
21.	<i>E. faecalis</i>	40080	0.917	0.256	<b>72.08</b>
22.	<i>E. faecalis</i>	54674	0.772	0.118	<b>84.71</b>
23.	<i>E. faecalis</i>	54604	0.896	0.098	<b>89.06</b>
24.	<i>E. faecalis</i>	54540	0.813	0.090	<b>88.92</b>
25.	<i>E. faecalis</i>	54537	0.734	0.161	<b>78.06</b>
26.	<i>E. faecalis</i>	54685	0.248	0.085	<b>65.72</b>
27.	<i>E. faecalis</i>	54672	1.093	0.036	<b>61.29</b>
28.	<i>E. faecalis</i>	54631	0.939	0.275	<b>70.71</b>
29.	<i>E. faecalis</i>	54998	0.666	0.088	<b>87.23</b>
30.	<i>E. faecalis</i>	55009	0.879	0.212	<b>75.88</b>
31.	<i>E. faecalis</i>	54946	0.988	0.041	<b>95.85</b>
32.	<i>E. faecalis</i>	54985	0.789	0.129	<b>83.65</b>
33.	<i>E. faecalis</i>	54510	0.746	0.061	<b>91.82</b>
34.	<i>E. faecalis</i>	56115	0.575	0.489	<b>61.96</b>
35.	<i>E. faecalis</i>	55947	0.835	0.202	<b>75.80</b>
36.	<i>E. faecalis</i>	55933	0.803	0.150	<b>81.32</b>
37.	<i>E. faecalis</i>	56711	0.878	0.277	<b>65.45</b>
38.	<i>E. faecalis</i>	56707	0.881	0.171	<b>80.59</b>

39.	<i>E. faecalis</i>	56411	0.896	0.299	<b>66.63</b>
40.	<i>E. faecalis</i>	56818	0.760	0.134	<b>82.37</b>
41.	<i>E. faecalis</i>	56590	0.610	0.052	<b>91.48</b>
42.	<i>E. faecalis</i>	56813	0.929	0.058	<b>93.76</b>
43.	<i>E. faecalis</i>	56803	0.625	0.099	<b>84.16</b>
44.	<i>E. faecalis</i>	56540	0.857	0.052	<b>93.93</b>
45.	<i>E. faecalis</i>	56306	0.782	0.018	<b>97.69</b>
46.	<i>E. faecalis</i>	57439	0.774	0.122	<b>84.23</b>
47.	<i>E. faecalis</i>	57427	0.853	0.022	<b>97.42</b>
48.	<i>E. faecalis</i>	57433	0.730	0.068	<b>90.68</b>
49.	<i>E. faecalis</i>	57470	0.531	0.043	<b>91.90</b>
50.	<i>E. faecalis</i>	55917	0.725	0.074	<b>89.79</b>
51.	<i>E. faecalis</i>	57670	0.866	0.009	<b>96.61</b>
52.	<i>E. faecalis</i>	57513	0.795	0.097	<b>87.79</b>
53.	<i>E. faecalis</i>	58016	0.736	0.075	<b>89.80</b>
54.	<i>E. faecalis</i>	57758	0.626	0.033	<b>89.93</b>
55.	<i>E. faecalis</i>	57913	0.471	0.018	<b>96.18</b>
56.	<i>E. faecalis</i>	58319	0.791	0.121	<b>84.70</b>
57.	<i>E. faecalis</i>	58570	0.648	0.238	<b>63.27</b>
58.	<i>E. faecalis</i>	58151	0.852	0.031	<b>96.36</b>
59.	<i>E. faecalis</i>	58497	0.640	0.048	<b>78.62</b>
60.	<i>E. faecalis</i>	58705	0.767	0.031	<b>95.95</b>
61.	<i>E. faecalis</i>	58268	0.794	0.095	<b>88.04</b>
62.	<i>E. faecalis</i>	58214	0.225	0.065	<b>71.11</b>
63.	<i>E. faecalis</i>	58848	0.789	0.183	<b>76.80</b>
64.	<i>E. faecalis</i>	58022	0.931	0.180	<b>80.67</b>
65.	<i>E. faecalis</i>	58326	0.958	0.153	<b>84.03</b>
66.	<i>E. faecalis</i>	59764	0.917	0.084	<b>90.84</b>
67.	<i>E. faecalis</i>	59801	0.697	0.116	<b>83.36</b>
68.	<i>E. faecalis</i>	59739	0.915	0.201	<b>78.03</b>
69.	<i>E. faecalis</i>	59144	0.772	0.206	<b>73.32</b>
70.	<i>E. faecalis</i>	59271	0.933	0.176	<b>81.14</b>
71.	<i>E. faecalis</i>	59530	1.016	0.063	<b>93.80</b>
72.	<i>E. faecalis</i>	59170	0.812	0.064	<b>92.12</b>
73.	<i>E. faecalis</i>	60306	0.663	0.069	<b>89.60</b>
74.	<i>E. faecalis</i>	60637	0.865	0.156	<b>81.97</b>
75.	<i>E. faecalis</i>	61036	0.832	0.121	<b>78.81</b>
76.	<i>E. faecalis</i>	62269	0.748	0.098	<b>81.40</b>
77.	<i>E. faecalis</i>	64562	0.768	0.122	<b>95.20</b>



#### 4.8. Rezultati osjetljivosti na antibiotike

U sljedećoj tablici navedeni su rezultati osjetljivosti kliničkih izolata *E. faecalis* na sljedeće antibiotike: ampicilin, gentamicin, norfloksacin, imipenem, vankomicin, teikoplanin.

Interpretacija je rađena prema EUCAST vrijednostima te se raspon zona inhibicije očitava

prema 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 7.** Antimikrobna osjetljivost *E. faecalis* na antibiotike

R.br.	IZOLAT	Br.protokola	AM	GE	NOR	IMI	VA	TEC
1.	<i>E. faecalis</i>	52491	S	R	R	S	S	S
2.	<i>E. faecalis</i>	52056	S	S	S	S	S	S
3.	<i>E. faecalis</i>	52014	S	S	S	S	S	S
4.	<i>E. faecalis</i>	52836	S	S	S	S	S	S
5.	<i>E. faecalis</i>	52567	S	S	S	S	S	S
6.	<i>E. faecalis</i>	52748	S	R	S	S	S	S
7.	<i>E. faecalis</i>	52203	S	R	R	S	S	S

8.	<i>E. faecalis</i>	52096	S	S	S	S	S	S
9.	<i>E. faecalis</i>	51462	S	S	S	S	S	S
10.	<i>E. faecalis</i>	53012	S	R	R	S	S	S
11.	<i>E. faecalis</i>	53236	S	R	R	S	S	S
12.	<i>E. faecalis</i>	53108	S	S	S	S	S	S
13.	<i>E. faecalis</i>	53292	S	S	S	S	S	S
14.	<i>E. faecalis</i>	53041	S	S	S	S	S	S
15.	<i>E. faecalis</i>	53373	S	S	S	S	S	S
16.	<i>E. faecalis</i>	53379	S	S	S	S	S	S
17.	<i>E. faecalis</i>	53463	S	S	S	S	S	S
18.	<i>E. faecalis</i>	53491	S	S	S	S	S	S
19.	<i>E. faecalis</i>	53484	S	S	S	S	S	S
20.	<i>E. faecalis</i>	39997	S	S	S	S	S	S
21.	<i>E. faecalis</i>	40080	S	S	S	S	S	S
22.	<i>E. faecalis</i>	54674	S	S	S	S	S	S
23.	<i>E. faecalis</i>	54604	S	S	S	S	S	S
24.	<i>E. faecalis</i>	54540	S	S	S	S	S	S
25.	<i>E. faecalis</i>	54537	S	R	R	S	S	S
26.	<i>E. faecalis</i>	54685	S	S	S	S	S	S
27.	<i>E. faecalis</i>	54672	S	S	S	S	S	S
28.	<i>E. faecalis</i>	54631	S	S	S	S	S	S
29.	<i>E. faecalis</i>	54998	S	S	S	S	S	S
30.	<i>E. faecalis</i>	55009	S	S	S	S	S	S
31.	<i>E. faecalis</i>	54946	S	S	S	S	S	S

32.	<i>E. faecalis</i>	54985	S	S	S	S	S	S
33.	<i>E. faecalis</i>	54510	S	S	S	S	S	S
34.	<i>E. faecalis</i>	56115	S	S	R	S	S	S
35.	<i>E. faecalis</i>	55947	S	S	S	S	S	S
36.	<i>E. faecalis</i>	55933	S	S	S	S	S	S
37.	<i>E. faecalis</i>	56711	S	S	S	S	S	S
38.	<i>E. faecalis</i>	56707	S	S	S	S	S	S
39.	<i>E. faecalis</i>	56411	S	S	S	S	S	S
40.	<i>E. faecalis</i>	56818	S	R	R	S	S	S
41.	<i>E. faecalis</i>	56590	S	S	S	S	S	S
42.	<i>E. faecalis</i>	56813	S	S	S	S	S	S
43.	<i>E. faecalis</i>	56803	S	S	R	S	S	S
44.	<i>E. faecalis</i>	56540	S	S	S	S	S	S
45.	<i>E. faecalis</i>	56306	S	R	S	S	S	S
46.	<i>E. faecalis</i>	57439	S	R	R	S	S	S
47.	<i>E. faecalis</i>	57427	S	S	S	S	S	S
48.	<i>E. faecalis</i>	57433	S	S	S	S	S	S
49.	<i>E. faecalis</i>	57470	S	S	S	S	S	S
50.	<i>E. faecalis</i>	55917	S	S	S	S	S	S
51.	<i>E. faecalis</i>	57670	S	S	S	S	S	S
52.	<i>E. faecalis</i>	57513	S	S	S	S	S	S
53.	<i>E. faecalis</i>	58016	S	S	S	S	S	S
54.	<i>E. faecalis</i>	57758	S	R	R	S	S	S
55.	<i>E. faecalis</i>	57913	S	S	S	S	S	S

56.	<i>E. faecalis</i>	58319	S	R	R	S	S	S
57.	<i>E. faecalis</i>	58570	S	R	R	S	S	S
58.	<i>E. faecalis</i>	58151	S	S	S	S	S	S
59.	<i>E. faecalis</i>	58497	S	S	S	S	S	S
60.	<i>E. faecalis</i>	58705	S	R	R	S	S	S
61.	<i>E. faecalis</i>	58268	S	S	S	S	S	S
62.	<i>E. faecalis</i>	58214	S	S	S	S	S	S
63.	<i>E. faecalis</i>	58848	S	S	S	S	S	S
64.	<i>E. faecalis</i>	58022	S	S	S	S	S	S
65.	<i>E. faecalis</i>	58326	S	S	S	S	S	S
66.	<i>E. faecalis</i>	59764	S	S	S	S	S	S
67.	<i>E. faecalis</i>	59801	S	S	S	S	S	S
68.	<i>E. faecalis</i>	59739	S	S	S	S	S	S
69.	<i>E. faecalis</i>	59144	S	S	S	S	S	S
70.	<i>E. faecalis</i>	59271	S	R	R	S	S	S
71.	<i>E. faecalis</i>	59530	S	R	S	S	S	S
72.	<i>E. faecalis</i>	59170	S	S	S	S	S	S
73.	<i>E. faecalis</i>	60306	S	S	S	S	S	S
74.	<i>E. faecalis</i>	60637	S	S	S	S	S	S
75.	<i>E. faecalis</i>	61036	S	R	S	S	S	S
76.	<i>E. faecalis</i>	62269	S	R	R	S	S	S
77.	<i>E. faecalis</i>	64562	R	R	R	S	S	S

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

R=rezistentan, S=osjetljiv

Na antibiotik ampicilin, svi pokazauju osjetljivost osim jednog soja *E. faecalis* 64562 koji pokazuje rezistenciju. Na gentamicin rezistentnost pokazuje 18 bakterija (23,3 % bakterija), dok je većina još uvijek osjetljiva. Na norfloksacin je rezistentno 16 bakterija (20,7 % bakterija). Na antibiotik imipenem sve bakterije pokazuju osjetljivost kao i na vankomicin i teikoplanin. Vidljivo je da soj *E. faecalis* 64562 pokazuje jedini rezistenciju na tri antibiotika (ampicilin, gentamicin, norfloksacin).

## 5. RASPRAVA

*Enterococcus faecalis* koji se smatra dio normalne flore ljudskih crijeva postaje patogeni uzročnik koji uzrokuje ozbiljne infekcije sa sve češćim hospitalnim podrijetlom. Razlog tome su faktori virulencije i visoka rezistencija na antibiotike (5). Činjenice koje su se u ovom istraživanju dokazale ukazuju nam kako bi *E. faecalis* u budućnosti mogla sve više dominirati na listi uzročnika infekcija. Nekolicina radova je objavljena na teme bliske ovoj, te uspoređujući ih s ovim, jasno je da se i drugdje prepoznala problematika visokog stupnja patogenosti ove bakterije. Iako postoje slični radovi, ovaj rad je specifičan zbog velikog broja ispitanih bakterija i velikog broja ispitanih metoda, stoga se rezultati drugih radova ne mogu precizno usporediti.

Posjeduju li enzim proteazu ispitivanje također se ispitivalo i u drugim radovima. Te zapravo ne možemo reći uglavnom su proteaza negativne ili pozitivne jer su skoro jednako podjeljeni u te grupe. Možemo reći da se sojevi razlikuju u sposobnosti lučenja proteaze (46 negativnih i 31 proteaza pozitivne) što je u skladu sa literaturom (4).

Da su lipaza pozitivni, tj. da imaju sposobnost razgradnje lipida te da za svoj rast i razmnožavanje koriste lipide možemo reći jer više od 95% ispitanih bakterija u ovom istraživanju su potvrdile ovaj podatak. Uspoređujući ovaj podatak sa istraživanjem kojeg su proveli Petar A. i Mathew J. koji su testirali 140 sojeva ove bakterije gdje njihovi rezultati pokazuju 70 lipaza pozitivnih bakterija tj. samo 50% ispitanih, vidimo da postoji odstupanje. (4).

Enzim želatinazu možemo reći da u principu veći dio bakterija posjeduje jer se radi o 47 pozitivnih od 77 ispitanih, odnosno 70%. U radu Petera i Methewa ovo svojstvo opisano je kao vrlo važno svojstvo virulencije ne samo kod *E. faecalis* nego i kod drugih mikroorganizama. U njihovom radu želatinaza pozitivne su 50% ispitanih bakterija, točnije 70 od ispitanih 140. Jasno se vidi da je

znatno važno o kojem se soju radi jer postoji veći dio ispitanih bakterija koje ne pokazuju posjed ovog enzima (4).

Ispitivanje posjeda enzima katalaze rijetko se ispizuje u istraživanjima jer je potvrđeno više puta kako su enterokoki katalaza negativne bakterije (8). Tako je ovo istraživanje samo još jednom to utvrdilo. Svi ispitani sojevi su katalaza negativni.

Hemolizu smo također ispitali standardnim postupkom i utvrdili da više od 80% ispitanih bakterija spada u gama hemolitčke mikroorganizme, tj ne posjeduju enzim hemolizin. No preostalih 20% ispitanih bakterija, točnije 9 su pokazale alfa hemolizu te 6 beta hemolizu. Jednako tako u istraživanju na Gandhi sveučilištu, 100 od ispitanih 140 (70%) pokazuje alfa hemolizu dok ostatak je podjeljen na alfa i betu hemolizu (4).

Biofilm se često ispituje i u drugim istraživanjima jer se vodi kao važno svojstvo virulencije. Tendenciju stvaranja biofilma povezujemo zapravo sa bojom poraslih kolonija na Congo red agru i sposobnošću stvaranja izvanstanične sluzi. Kako porast smeđih i crnih kolonija sa izvanstaničnom sluzi označaju potencijalno stvaranje biofilma, u ovom radu su tu tendenciju pokazale 64 bakterije (73%). U istraživanju Gandhi sveučilišta govorimo o vrlo sličnom postotku od 71% (4).

Rezistenciju na lizozim ispitivano je u jednom znanstvenom radu, gdje uspoređujući sa njihovim rezultatima, iako imamo različit broj ispitanih bakterija, možemo zaključiti da smo dobili poprilično slične ili jednake rezultate. Na pločama koncentracije lizozima 20 40 i 60 mg/ mL rezistentnost opada tek na najvećoj koncentraciji lizozima. U slučaju istraživanja Petar A. i Mathewa J. i ovog na ploči koncentracije 20 mg/ml sve bakterije pokazuju rezistenciju (100%). Na ploči koncentracije lizozima 40 mg/ml ovo istraživanje pokazuje porast bakterija od 100% dok

u istraživanju 99%. Na ploči gdje je najveća koncentracija lizozima broj rezistentnih bakterija opada u ovome istraživanju na 65% rezistentnih bakterija a u njihovom istraživanju na 75%. Možemo zaključiti da su rezultati istraživanja vrlo slična (4).

Enterokoki spadaju u nepokretne bakterije. Samo dvije od ispitanih 77 bakterija pokazuju sposobnost kretanja. Istraživanje Elsnera i suradnika također je potvrdilo ovaj podatak (8) kao i istraživanje Comerlata i Cosla (20).

Da enterokoki hidroliziraju eskulin potvrdili smo ovim istraživanjem gdje su svi izolati bili eskulin pozitivni (100%).

U istraživanju se vidi da postotak agregacije varira u dosta velikom rasponu od 60% do 97%. Samo 4% ispitanih bakterija agregira u postotku manjem od 70%, dok 31% bakterija agregira u postotku većem od 90%. Možemo zaključiti da 96% bakterija agregira u postotku većem od 70%.

Rezistenciju na antibiotike više se spominje kod izolata *E. faecium*. No spomenut ćemo da na ampicilin, vankomicin i imipenem su osjetljivi svi ispitani sojevi. Izolati pokazuju rezistenciju na gentamicin u 23% ispitane bakterije i na norfloksacin 20% bakterija. Izdvojit ćemo jedan soj *E. faecalis* 64562 koji je pokazao rezistenciju na tri antibiotika (ampicilin, gentamicin, norfloksacin).

Zaključno, *Enterococcus faecalis* kao sve značajniji uzročnik hospitalnih infekcija predstavlja problem u bolničkim sredinama te bi poznavanje čimbenika virulencije i praćenje mehanizama rezistencije doprinijelo smanjenju rizika oboljevanja.

## 6. ZAKLJUČAK



Nakon provedenog istraživanja, je vidljivo da svaki od 77 ispitanih izolata ima jedno ili više pozitivnih čimbenika virulencije. Svi sojevi su katalaza negativni, za razliku od toga svi imaju sposobnost hidrolize eskulina. U više od 80% izolata nije dokazana hemoliza na krvnom agaru te su gama-hemolitički. Od ostalih enzima 59% izolata producira proteaza, 95% izolata lipazu i 70% želatinazu. Tendenciju stvaranja biofilma i izvanstanične sluzi posjeduje 73% bakterija. Svi izolati su rezistentni na niže koncentracije lizozima (20, 40 mg/ml lizozima), a na koncentraciju od 60 mg/ml lizozima postaju osjetljive 35% bakterija. Za agregaciju možemo reći da 31% bakterija agregira u postotku većem od 90%. Od antibiotika važno je izdvojiti gentamicin za kojeg postoji rezistencija kod 23% izolata te na norfloksacin 20% izolata.

Zaključno, *Enterococcus faecalis* se sve češće javlja kao uzročnik hospitalnih infekcija i važno je poznavanje čimbenika virulencije i praćenje mehanizama rezistencije radi smanjenja rizika oboljevanja.

## 7. LITERATURA

1. Kalenić, S., i suradnici. (2013). Medicinska mikrobiologija. Medicinska naklada, Zagreb, 140–143
2. Mollering RC Jr. Emergence of Enterococcus as significant pathogen. Clin Infect Dis 1992;14:1173-8
3. [https://en.wikipedia.org/wiki/Enterococcus\\_faecalis](https://en.wikipedia.org/wiki/Enterococcus_faecalis) (Pristupljeno: Rujan, 2017)
4. 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)
5. Tendulkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic Enterococci: New developments in the 21<sup>st</sup> Century. Cell Mole Life Sci 2003;60:2622-36
6. <http://emedicine.medscape.com/article/216993-overview> (Pristupljeno: Rujan, 2017)
7. Consterton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 284: 1318-1322
8. 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): 36-39
9. Moellering RC Jr, Krogstad DJ. Antibiotic resistance in enterococci. In: Schlessinger D, ed. Microbiology. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1979:293–8
10. Dahlén G, Blomqvist S, Almstahl A, Carlén A. Virulence factors and antibiotic susceptibility in enterococci isolated from oral mucosal and deep infections. J Oral Microbiol. 2012;4:10855–10855.
9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190429/> (Pristupljeno: Rujan, 2017)
10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190429/> (Pristupljeno: Rujan, 2017)

11. Sharifi Y, Hasani A, Ghotaslou R, Varshochi M, Hasani A, Aghazadeh M, Milani M. Survey of virulence determinants among vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from clinical specimens of hospitalized patients of northwest of Iran. *Open Microbiol J.* 2012;6:34–39.
12. <http://medind.nic.in/eaat/t09/i2/eaat09i2p46.pdf> (Pristupljeno: Rujan, 2017)
13. Fisher, K., Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology.* 155 (6): 1749-1757
14. <http://emedicine.medscape.com/article/216993-overview> (Pristupljeno: Rujan, 2017)
15. <https://microbeonline.com/salt-tolerance-test-enterococcus-species-principle-procedure-results/> (Pristupljeno: Rujan, 2017)
16. <http://microbeonline.com/bile-esculin-test-enterococcus-species-principle-procedure-results/> (Pristupljeno: Rujan, 2017)
17. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of *Enterococci*. *Clin Microbial Rev* 1994;7:462-78.
18. <http://www.webmd.com/women/guide/your-guide-urinary-tract-infections#2> (Pristupljeno: Kolovoz, 2017)
19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5026837/> (Pristupljeno: Rujan, 2017)
20. 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*
21. <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/154411130401500506> (Pristupljeno: Rujan, 2017)
22. <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.47331-0#tab2> (Pristupljeno: Kolovoz, 2017)
23. Jawetz, Melnick, Adelberg (2005). *Medicinska mikrobiologija*, 26. izdanje (1. hrvatsko izdanje), Placebo d.o.o., Split, 222-22
24. Drees M., Snyderman D. R., Schmid C. H., Barefoot L., Hansjosten K., Vue P. M., et al. Prior environmental contamination increases the risk of acquisition of vancomycin-resistant enterococci. *Clinical Infectious Diseases.* 2008;46(5):678–685

25. Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahn DF, Courvalin P. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2161–4.

26. Bourgeau, G., McBride, B. C. (1976). Dextran-Mediated Interbacterial Aggregation between and *Actinomyces Viscosus*. *Infection and Immunity*, 13: 1228-1234

27. Slika 1.

<http://www.bacteriainphotos.com/Enterococcus%20faecalis%20light%20microscopy.html>

(Pristupljeno: Rujan, 2017)

28. Slika 2.

<http://www.bacteriainphotos.com/Enterococcus%20faecalis%20light%20microscopy.html>

(Pristupljeno: Rujan, 2017)

29. Slika 3.

<http://www.bacteriainphotos.com/Enterococcus%20faecalis%20light%20microscopy.html>

(Pristupljeno: Rujan, 2017)

30. Slika 14. <https://www.proprofs.com/flashcards/upload/q6118896.jpg> (Pristupljeno: Rujan, 2017)

## 8. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODACI

Ime i prezime	<b>Ivana Stojčević</b>
Adresa	Rizzijeva 6, 52100 Pula
Elektronička pošta, Web adresa	<a href="mailto:stojcevicivana@hotmail.com">stojcevicivana@hotmail.com</a>
Datum i mjesto rođenja	09.01.1993., Pula
Državljanstvo	Hrvatsko

### ŠKOLOVANJE

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

### DODATNI PODACI

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

- Peta nacionalna konferencija o sigurnosti i kakvoći pčelinjih proizvoda – Regionalna suradnja, Opatija, 11. 04. 2015.

#### **Rad na fakultetu:**

- Demnstratorica na kolegiju Mikorbiologija s parasitologijom

