

# Utjecaj ameba na preživljavanje *Francisella philomiragia* u izvorskoj vodi

---

**Marohnić, Sara**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*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:184:512592>

*Rights / Prava:* [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-19**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Sara Marohnić

UTJECAJ AMEBA NA PREŽIVLJAVANJE *FRANCISELLA PHILOMIRAGIA*  
U IZVORSKOJ VODI

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

Mentor rada: prof. dr. sc. Marina Šantić, dipl. sanit. ing.

Završni rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci,

pred povjerenstvom u sastavu:

1.

2.

3.

Rad ima 40 stranica, 13 slika, 2 tablice, 82 literaturnih navoda.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Marini Šantić, dipl. sanit. ing. na temi i savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Također, zahvaljujem se osoblju Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci na pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela ovoga rada, a osobito Maši Knežević, mag. pharm. inv.

Na kraju, veliko hvala mojoj obitelji na podršci i omogućavanju pohađanja ovog studija na Medicinskom fakultetu u Rijeci.

## SAŽETAK

*Francisella philomiragia* je aerobni, gram–negativni kokobacil. Široko je rasprostranjena u prirodi; u vodi, zraku, zemlji, prašini i blatu, a detektirana je u većini krajeva svijeta. Problem mogu predstavljati onečišćene površinske, bunarske i ruralne vode jer *F. philomiragia* može rezultirati pojavom povremenih infekcija kod rizičnih skupina ljudi. Također, *F. philomiragia* može izazvati ozbiljne posljedice na ribarstvo jer uzrokuje tularemiju u pojedinim vrsta riba. U ovom istraživanju praćena je kinetiku rasta *F. philomiragia* i *A. castellanii* u izvorskoj vodi „Vela Fontana“ unutar vremenskog perioda od 40 dana. Rezultati su pokazali da *F. philomiragia* dulje preživljava u kokulturi s amebom *A. castellanii*. Nadalje, *F. philomiragia* se ne razmnožava unutar ameba, ali može opstati u okolišu koji sadrži amebe zbog mogućeg endosimbiotskog odnosa. Interakcija između *F. philomiragia* i *A. castellanii* ukazuje da su amebe važni okolišni rezervoar za bakterije iz roda *Francisella*, ali one mogu stimulirati preživljavanje i drugih ljudskih patogena. Kao takve mogu biti prijenosnici ove bakterije i drugih mikroorganizama putem izvorskih i površinskih voda. Za prevenciju *F. philomiragia* je bitno razumjeti kako preživljava, raste i razmnožava se u vodenim ekosustavima, a ova saznanja mogu pridonijeti boljem shvaćanju epidemiologije i mikrobiološke ekologije cijelog roda *Francisella*.

**Ključne riječi:** *F. philomiragia*, *A. castellanii*, tularemija, izvorska voda, endosimbiotski odnos

## SUMMARY

*Francisella philomiragia* is an aerobic, gram-negative cocobacillus. It is widespread in nature; in water, air, earth, dust, and mud and has been detected in most parts of the world. Problem can be contaminated rural waters because *F. philomiragia* can result in occasional infections in at-risk groups. In addition, *F. philomiragia* can cause serious consequences for aquaculture and fishing because it causes francisellosis in certain fish species. In this study, the growth kinetics of *F. philomiragia* and *A. castellanii* in the spring water "Vela Fontana" were monitored within a period of 40 days. The results showed that *F. philomiragia* survives longer in coculture with the amoeba *A. castellanii*. Furthermore, *F. philomiragia* does not replicate within the amoeba, but may oppose the amoeba-containing environment due to a possible endosymbiotic relationship. The interaction between *F. philomiragia* and *A. castellanii* indicates that amoebae are important environmental reservoirs for *Francisella* species, but they can also stimulate the survival of other human pathogens. As such, they can be reservoirs of tularemia and other infectious diseases through spring and surface waters. For the prevention of *F. philomiragia*, it is essential to understand how it survives, grows and replicates in aquatic ecosystems, and this knowledge can contribute to a better understanding of the epidemiology and microbiological ecology of the entire genus *Francisella*.

**Keywords:** *F. philomiragia*, *A. castellanii*, franciselloza, spring water, endosymbiotic relationship

## SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA .....	1
1.1 Rod <i>Francisella</i> .....	1
1.2. <i>Francisella novicida</i> .....	2
1.3. <i>Francisella tularensis</i> .....	2
1.3.1. Tularemija u ljudi .....	3
1.3.2. Tularemija u životinja.....	4
1.4. <i>Francisella philomiragia</i> .....	5
1.4.1. <i>F. philomiragia</i> u bolesnika s kroničnom granulomatoznom bolešću .....	6
1.4.2. Dijagnostika <i>F. philomiragia</i> .....	6
1.5. Patogeneza i virulencija <i>Francisella</i> .....	7
1.6. <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	9
1.6.1. Životni ciklus <i>A. castellanii</i> .....	9
1.6.2. <i>A. castellanii</i> kao model za proučavanje razmnožavanja bakterija .....	10
1.7. Vodozahvat „Vela Fontana“.....	12
1.8. Biokemijske i kemijske karakteristike voda ključne za preživljavanje <i>Francisella</i> .....	13
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	15
3. MATERIJALI I METODE .....	16
3.1. Kulture bakterija i ameba .....	16
3.2. Hranjive podloge .....	16
3.3. Inokulacija <i>A. castellanii</i> .....	17
3.4. Inokulacija <i>F. philomiragia</i> .....	18
3.5. Priprema uzoraka izvorske vode .....	18
3.6. Kinetika rasta <i>F. philomiragia</i> i <i>A. castellanii</i> .....	19
3.7. Statistička obrada podataka .....	20
4. REZULTATI.....	21
4.1. Kinetika rasta <i>F. philomiragia</i> pri razrjeđenju od $1 \times 10^6$ CFU/ml i <i>A. castellanii</i> .....	24
4.2. Kinetika rasta <i>F. philomiragia</i> pri razrjeđenju od $1 \times 10^7$ CFU/ml i <i>A. castellanii</i> .....	25
4.3. Kinetika rasta <i>A. castellanii</i> pri razrjeđenju od $1 \times 10^6$ CFU/ml i <i>F. philomiragia</i> .....	26
4.4. Kinetika rasta <i>A. castellanii</i> pri razrjeđenju od $1 \times 10^7$ CFU/ml i <i>F. philomiragia</i> .....	27
5. RASPRAVA.....	28
6. ZAKLJUČAK .....	31
7. LITERATURA.....	32

# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

## 1.1 Rod *Francisella*

1911. godine Charles Chapin i George McCoy su proučavanjem kuge u vjeverica detektirali bakteriju koja je izazivala bolest sličnu kugi. Nova bolest je istraživana u gradu Tulari, u Kaliforniji pa je po njemu dobila ime *Bacterium tularensense*. Dokazali su da se radi o vrlo virulentnoj, asporogenoj bakteriji koja se dugo zadržava u okolišu, a predstavlja rizik za zdravlje ljudi. Potvrđeni su slučajevi zaraze u Washingtonu i Japanu gdje je bolest nazvana zečja groznica. Edward Francis je imao znatan utjecaj na istraživanje tularemije pa je 1959. godine bakterija po njemu dobila ime [1]. Francis je dokazao da *F. tularensis* ima sposobnost ulaska u stanicu i mogućnost razmnožavanja u fagocitima.

Porodici *Franciselaceae* pripada rod *Francisella* spp. koji se, zatim, dijeli u pet vrsta: *tularensis*, *philomiragia*, *novicida*, *noatunensis* te *hispaniensis*. Potom, *F. tularensis* pripadaju tri podvrste: *tularensis*, *holarctica* i *mediasiatica*, dok u vrstu *F. noatunensis* spadaju dvije podvrste: *orientalis* i *noatunensis*. Taksonomija *Francisella* prikazana je tablicom 1. Pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR, eng. *polymerase chain reaction*) detektirana je nova vrsta *Francisella* koja je povezana s vodenim medijem. Iz morske vode su otkrivene *F. uliginis* i *F. salina*, a u rashladnim tornjevima su izolirane *F. frigiditurris* te *F. guangzhouensis* [2].

**Tablica 1: Taksonomija *Francisella***

<b>PORODICA</b>	<b>ROD</b>	<b>VRSTA</b>	<b>PODVRSTA</b>
<i>Franciselaceae</i>	<i>Francisella</i>	<i>tularensis</i>	<i>tularensis</i>
			<i>holarctica</i>
			<i>mediasiatica</i>
		<i>philomiragia</i>	
		<i>noatunensis</i>	<i>orientalis</i>
			<i>noatunensis</i>



		<i>novicida</i>	
		<i>hispaniensis</i>	

### 1.2. *Francisella novicida*

*F. novicida* raste u obliku kokobacila na CGBA agaru (engl. cysteine-glucose-blood agar) pri temperaturi od 37 °C. Za nju je karakterističan način razmnožavanja i unutarstanični rast što je ujedno i zajedničko svim vrstama roda *Francisella*. *F. novicida* nije virulentna za čovjeka i zbog toga koga se koristi u eksperimentalne svrhe. Imunokompromitirane osobe jedina su rizična skupina koja može razviti simptome bolesti *F. novicida*. Zabilježeni slučajevi bolesti uzrokovani ovom bakterijom povezani su s vodenim ekosustavima, boćatom i morskom vodom, ledom i tlom [3]. Na području Australije je geografski rasprostranjena [4].

Nisu opisani slučajevi prijenosa *F. novicida* s člankonožaca na čovjeka. S druge strane, *F. novicida* kod životinja uzrokuje bolest sličnu tularemiji i ima mogućnost infekcije humanih makrofaga.

### 1.3. *Francisella tularensis*

*F. tularensis* kultivira se na čokoladnom agaru pri temperaturi od 37 °C tijekom 2 - 4 dana, a porasle kolonije su bijele, glatke i vlažne. *F. tularensis* stvara usku zonu alfa - hemolize te raste na podlogama koje sadrže aminokiselinu cistein i animalne proteine. *F. tularensis* uključuje tri podvrste: *tularensis* (tip A), *holartica* (tip B) i *mediasiatica*.

*F. tularensis* subsp. *tularensis* je najvirulentnija od svih navedenih podvrsta, a pronađena je samo u Sjevernoj Americi. Potrebno je svega 10 bakterija za razvoj bolesti, tularemije, a često dovodi do smrtnog ishoda.

*F. tularensis* subsp. *holartica* je pronađena u sjevernoj hemisferi, a *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* u srednjoj Aziji. Kod obje podvrste zabilježeni su blaži oblici bolesti [5].

Najčešći put zaraze *F. tularensis* jest ugrizom člankonožaca, najčešće komarcima ili krpeljima, koji su ranije hranili krvlju životinje zaražene ovom bakterijom ili prilikom kontakta sa zaraženim životinjama [6]. Zabilježeni su slučajevi zaraze ingestijom hrane ili

vode koja je kontaminirana s *F. tularensis* [7]. Također, do infekcije može doći prilikom obavljanja različitih vodenih aktivnosti kao što su ribolov ili plivanje [8]. Za prijenos tularemije krpeljima najznačajnije su vrste *Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulans*, *Haemaphysalis concinna*. Tularemija se među životinjama najčešće prenosi putem krpelja *Dermacentor reticulans*. U Skandinaviji se tularemija isključivo prenosi ubodom komaraca, a najznačajnije vrste su *Culex*, *Aedes*, i *Anopheles*. U Sjevernoj Americi bolest je zabilježena kod domaćih i divljih sisavaca, osobito zečeva, te ptica. Tamo je tularemija poznata kao „zečja groznica,“ a lovcima se savjetuje izbjegavanje lova na zečeve [9].

*F. tularensis* navodi se i kao potencijalno biološko oružje. Smatra se da raspršivanjem 50 kg *F. tularensis* u neku gradsku cjelinu s 5 milijuna stanovnika može rezultirati obolijevanjem 250 000 i smrću čak 19 000 ljudi. S druge strane, *F. tularensis* subsp. *holarctica* dovodi do razvoja blažeg oblika bolesti, a karakteristična je za vodene ekosustave. Rezervoari *F. tularensis* mijenjaju se ovisno o zamljopisnoj regiji, klimatskom pojasu i zastupljenosti životinja u određenom području. Glavni domaćin *F. tularensis* tip B u Euroaziji je smeđi zec, a do zaraze najčešće dolazi preko kože životinje [10]. U Skandinaviji komarci šire zarazu, dok je u južnoj Europi voda ključni medij za prijenos bakterije na ljude [2]. U Sjevernoj Americi domaćini *F. tularensis* subsp. *holarctica* su glodavci i vodeni sisavci, npr. muskrat i američki dabar [10].

### 1.3.1. Tularemija u ljudi

Tularemija je bakterijska zarazna bolest koju uzrokuje *F. tularensis*. Najčešće je rasprostranjena u planinskim i šumskim predjelima sjeverne hemisfere [11]. Međutim, nedavna istraživanja ukazuju na preživljavanje ove bakterije u raznovrsnom vodenom okolišu, kao što su morske vode, boćate vode te prirodno izvorske vode [2, 12]. Slučajevi zaraze *F. tularensis*, povezani s onečišćenom izvorskom vodom, evidentirani su u državama južne Euroazije, uključujući Tursku, Kosovo, Makedoniju, Bugarsku, Gruziju i Italiju [2, 13].

Tularemija je prvi put zabilježena kod čovjeka 1914. godine u Sjedinjenim Američkim Državama, a bila je objavljena kao „Deer-fly.“ Nakon dvije godine, objavljeno je da se bolest prenosi ugrizom krpelja sa zeca na čovjeka.

Rezervoari tularemije jesu sisavci, primarno zečevi i glodavci, beskralježnjaci, pojedine vrste ptica i vodozemaca. Muhe i komarci su najčešći vektori ove bolesti [10].

*F. tularensis* može prodrijeti u organizam udisanjem, gutanjem, putem insekata ili putem ulceracija na koži. Zbog različitog mjesta i načina ulaska *F. tularensis* u organizam, tularemija se može podijeliti na vanjske i unutarnje oblike bolesti. U vanjske oblike bolesti ubrajaju se ulceroglandularni, glandularni, okuloglandularni i anginozni oblik, a u unutarnje plućni, abdominalni i tifoidni ili septički oblik. Inkubacija tularemije iznosi od 3 do 10 dana. Klinička slika razlikuje se ovisno o obliku bolesti. Međutim, početak bolesti je uglavnom jednak kod svakog oblika i očituje se kao groznica, povišena temperatura, glavobolja, malaksalost, mučnina i povraćanje [7, 14].

Najčešći oblik tularemije je ulceroglandularni oblik koji se javlja prilikom kontakta, odnosno ugriza sa zaraženom životinjom. Na mjestu ugriza stvori se papula koja nekrotizira i rezultira povećanjem limfnih čvorova u području pazuha ili lakta. Okuloglandularni oblik javlja se nakon umivanja kontaminiranom vodom ili zagađenih prstiju, a bolest se manifestira kao konjunktivitis i upala limfnih čvorova. Udisanjem zraka kontaminiranog *F. tularensis* razvija se plućni oblik, odnosno atipična pneumonija s afekcijom limfnih čvorova. Može doći do komplikacija kao što su apscesi, pleuritis ili gangrene. Abdominalni oblici nastaju nakon ingestije zaraženog mesa ili zagađene vode, a očituju se kao ulceracije na tankom i debelom crijevu. Osip se može javiti kod svih oblika bolesti, a nastaje zbog prodora *F. tularensis* u krv, odnosno bakterijemije [7, 14].

Zasad ne postoji odobreno cjepivo protiv tularemije. Zbog toga se preporuča nošenje zaštitne odjeće, korištenje repelenata i zaštitnih mreža, efikasno uklanjanje krpelja te izbjegavanje kontakata sa zaraženim ili uginulim sisavcima. Također, meso je potrebo dobro termički obraditi, a potencijalno zagađenu vodu dezinficirati [15].

### 1.3.2. Tularemija u životinja

Zaraza *F. tularensis* u životinja manifestira se obično u obliku akutne febrilne bolesti. Klinička slika ovisi o mjestu ulasku u organizam, kao i o infektivnoj dozi. Tularemija je zabilježena u više od 200 vrsta divljih i domaćih životinja [16]. Detektirani su slučajevi zaraze u pasa prilikom kontakta s zaraženom životinjom, tijekom ingestije i kupanja u

kontaminiranoj vodi te tijekom hranjena divljim životinjama (npr. divlji zec) [17]. Između ostalog, tularemija je opisana kod pasa koji su bili podvrgnuti istraživanju. Nakon nekoliko dana, psi su razvili simptome limfadenopatije, groznice, imali su pustule na mjestu inokulacije te mukozne izlučevine iz oka i nosa [18].

Slučajevi zaraze *F. tularensis* opisani su kod mačaka, ali kod njih klinička manifestacija zaraze nije nužna. Ukoliko dođe do razvoja bolesti može doći do groznice, dehidracije, anoreksije, hepatomegalije, jezičnih ulceracija i splenomegalije. U slučaju teških obolijevanja može doći do teške groznice s mogućim smrtnim ishodom. Mačka iako nema simptome, može prenijeti bolest na ljude ili druge životinje [19].

Osim pasa i mačaka detektirani su slučajevi tularemije u ovaca u SAD-u (Idaho i Montana) koja je u većini slučajeva završila fatalno [20]. Simptomi tularemije u ovaca bili su febrilitet, dijareja, anoreksija te povećanje limfnih čvorova. Također, opisani su slučajevi tularemije u nekoliko divljih životinja kao što su vjeverice, majmuni, miševi i zečevi. Kod njih se bolest razvila u obliku nekroze slezene i jetre, splenomegalije i krvarenja sluznice crijeva [21].

#### 1.4. *Francisella philomiragia*

*F. philomiragia*, ranije zvana *Yersinia philomiragia* [22], je aerobni, gram - negativni kokobacil. Pokretljiva je i stvara sumporovodik zbog čega je fenotipski u skladu sa članovima roda *Francisella* spp. Također je katala i oksidaza pozitivna. O morfologiji, dijagnostici i preživljavanju *F. philomiragia* bit će više rečeno u ovom diplomskom radu.

*F. philomiragia* je široko rasprostranjena u prirodi. Pronađena je u zraku, vodi, blatu, prašini, zemlji i slami u većini krajeva svijeta; Europi, Sjevernoj Americi, Australiji, Atlantskom i Tihom oceanu te Meksičkom zaljevu. Otkriveno je da sojevi *F. philomiragia* uzrokuju francisellozu kod različitih vrsta riba, a posebno kod uzgojenih. Također, *F. philomiragia* uzrokuje povremene infekcije kod ljudi. Oboljenja *F. philomiragia* su pronađena kod bolesnika s kroničnom granulomatoznom bolešću. Granulomatozna upala nastaje jer leukociti nisu u mogućnosti stvarati aktivne spojeve kisika i zbog poremećene fagocitoze. Nadalje, infekcija *F. philomiragia* evidentirana je kod žrtava utapanja u morskoj vodi. Na Tajvanu su zabilježeni slučajevi tularemije kod uzgajane ribe tilapije, a utvrđena je i visoka stopa smrtnosti riba. Zbog toga *F. philomiragia* izravno utječe na akvakulturu. Za

njenu prevenciju važno je razumjeti kako preživljava, raste i razmnožava se u vodenim ekosustavima [23].

#### 1.4.1. *F. philomiragia* u bolesnika s kroničnom granulomatoznom bolešću

*F. philomiragia* je opisana kao oportunistički patogen sposoban za stvaranje invazivne infekcije kod pacijenata s ugroženom funkcijom neutrofila [22, 24]. U rizične skupine ubrajaju se pacijenti s kroničnom granulomatoznom bolešću, oboljeli od mijeloproliferacijskih poremećaja te osobe koje su se gotovo utopile u morskoj vodi [25]. *F. philomiragia* ima malu virulenciju za ljude. Međutim, u bolesnika s kroničnom granulomatoznom bolešću može rezultirati stvaranjem vezikularnih lezije kože, meningitisa, pneumonitisa, peritonitisa ili apscesa slezene [26].

U svih bolesnika s kroničnom granulomatoznom bolešću, žrtava utapanja ili osoba s nekim septičkim procesom nerazjašnjene etiologije treba procijeniti prisutnost *F. philomiragia*. Preporučljivo je provesti biokemijsku studiju nakon koje se sekvencira 16S ribosomske RNA.

Identificiran je cjeloviti genom *F. philomiragia* koji je sličan *F. tularensis*. Unatoč genetskim sličnostima, infekcija *F. philomiragia* epidemiološki se razlikuje od bolesti uzrokovane *F. tularensis*. Životinjski i artopodni vektori nisu prenosioci infekcije *F. philomiragia* što nije slučaj kod *F. tularensis* [27]. Također, *F. philomiragia* je oksidaza - pozitivna za razliku od *F. tularensis*.

Ponekad, ograničeno znanje o *F. philomiragia* dovodi do odgode identifikacije s posljedičnom smrću pacijenta ili čak pogrešnom identifikacijom kao *F. tularensis* što predstavlja značajan problem [26].

#### 1.4.2. Dijagnostika *F. philomiragia*

*F. philomiragia* može se dijagnosticirati na temelju pripremljenog trostrukog šećera željezo agara u kojem bakterija, zbog sposobnosti produkcije sumporovodika, stvara crno dno. Može se detektirati na temelju pozitivnog oksidaza testa te djelomične hidrolize želatine. Međutim, konačna se dijagnoza mora temeljiti na sekvencira 16S ribosomske RNA. Većinom

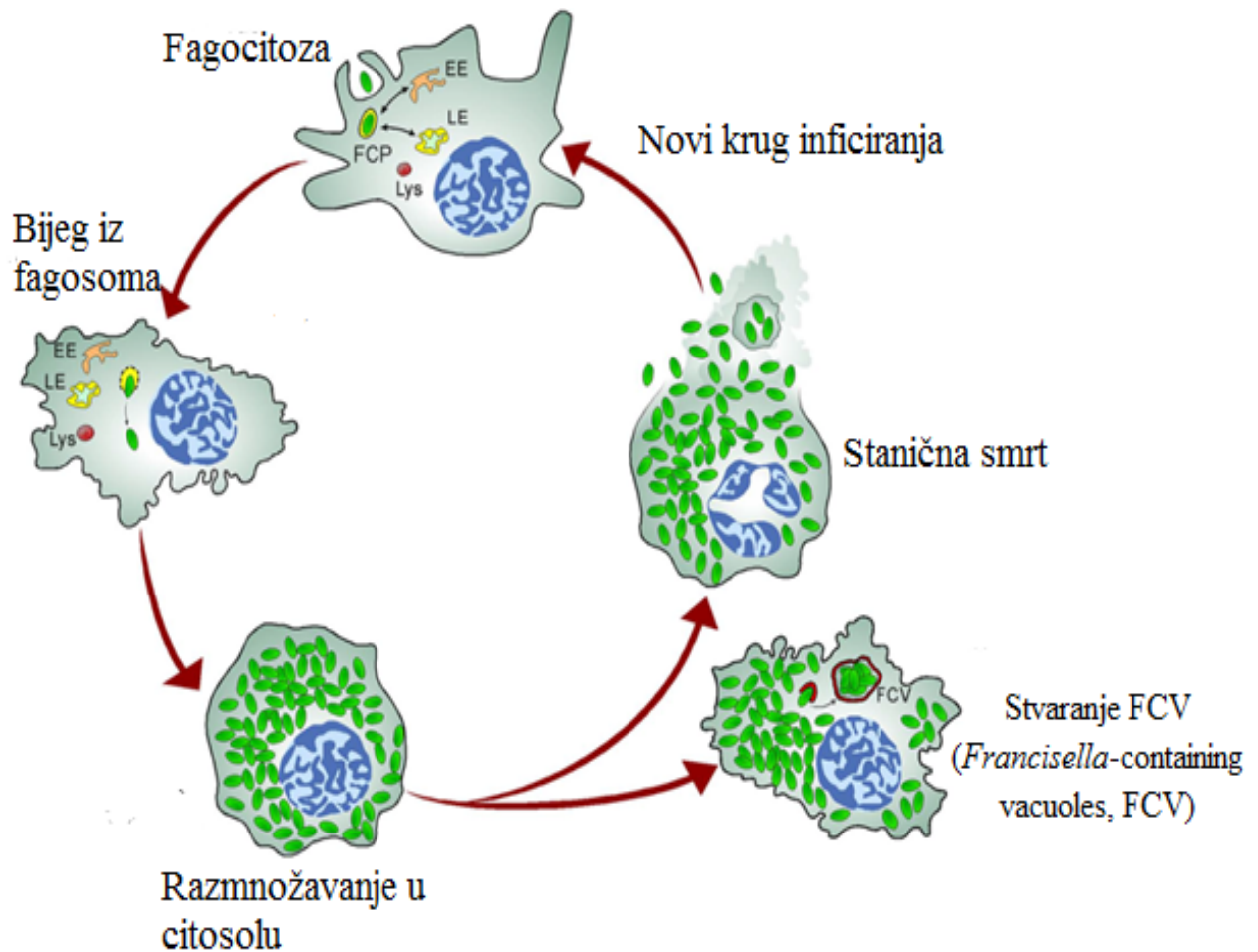
je osjetljiva na kinolone, kloramfenikol, karbapeneme, cefalosporine, aminoglikozide i tetracikline [28].

### 1.5. Patogeneza i virulencija *Francisella*

*Francisella* uzrokuje abnormalno funkcioniranje organizma zbog razmnožavanja unutar organizma domaćina. Pokreće se intenzivna upalna reakcija domaćina koja doprinosi razvoju bolesti. Neki od činitelja patogenosti *Francisella* jesu IV skupina pila, kapsula i lipopolisaharidi. Najznačajnija je IV skupina pila koje bakterija sadrži na svojoj površini, a omogućuje adherenciju bakterija na stanicu domaćina. Na površini stanica makrofaga i dendritičkih stanica nalaze se TLR skupina receptora koji pokreću imunološki odgovor na bakteriju. TLR skupina receptora djeluje na bakterijske lipoproteine što rezultira indukcijom protuupalnih citokina tijekom infekcije. Napredovanjem infekcije aktivirani makrofazi i neutrofili otpuštaju matriks metaloprotein 9 koji dovodi do nakupljanja leukocita u tkivima. Organizmi koji imaju mutaciju u sintezi ovog proteina lakše će preboljeti bolest za razliku od organizama kog kojih je protein normalno prisutan [29, 30].

Za ulazak u stanicu domaćina, *Francisella*, koristi već navedeni IV sustav pila, faktor elongacije (EF) te protein FsaP koji omogućuju adherenciju na stanice makrofaga. Važnu ulogu ima i Fc receptor koji omogućuje ulazak bakterije u stanicu domaćina ukoliko je stanica prekrivena protutijelima [31].

*Francisella* ulazi u stanicu domaćina procesom fagocitoze. Bakterija se u fagosomu zadržava 2 sata nakon čega izlazi, tzv. bijeg iz fagosoma, i replicira se u citosolu. Potom se apoptozom širi iz inficiranih na neinficirane stanice gdje dolazi do nastanka vakuola koje sadrže *Francisellu* tzv. FCV vakuola (engl. *Francisella-containing vacuoles*). Posljedično dolazi do razaranja stanica te stanične smrti. Nakon toga bakterija započinje novi krug infekcije (slika 1.) [32-37].



**Slika 1. Unutarstaničnog životnog ciklusa *Franciselle* unutar makrofaga.** *Francisella* ulazi u stanicu domaćina procesom fagocitoze. Potom izlazi iz fagosoma i replicira se u citosolu. Apoptozom se širi na druge stanice stvarajući FCV vakuole. Dolazi do razaranja stanica te stanične smrti. Nakon toga bakterija započinje novi krug infekcije. *Prilagođeno prema: Chong, A., Celli, J. The Francisella intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. Prilagođeno na hrvatski jezik.*

*Francisella* može ući i razmnožavati se unutar ameba *Acanthamoeba castellanii*, *Dictyostelium discoideum* i *Hartmannella vermiformis*. Navedene amebe imaju bitnu ulogu u prijenosu tularemije putem izvorskih i površinskih voda. Za razliku od stanica makrofaga gdje bakterije bježe iz fagosoma, kako bi se razmnožavale u citosolu, unutar ameba *A. castellanii* i *H. vermiformis* bakterije se razmnožavaju unutar vakuole [38].

## 1.6. *Acanthamoeba castellanii*

Rodu *Acanthamoeba* pripada *A. castellanii*. *Acanthamoeba* spp. su slobodno živuće amebe koje su široko rasprostranjene u okolišu. Nalaze se slatkoj i morskoj vodi, jezerima i u tlu. Pronađene su u uzorcima klorirane vode iz bazena, bazena za hidroterapiju, jacuzzijsima, vodovodnoj vodi, kanalizaciji, kontaktnim lećama te u vodama iz klima uređaja i jedinicama za grijanje [39 - 41]. Identificirane su i u kulturama stanica sisavaca, ljudskim nosnicama i grlu, animalnom i ljudskom tkivu kože, mozga i pluća te povrću. Amebe preživljavaju hraneći se bakterijama, gljivama i algama fagocitozom.

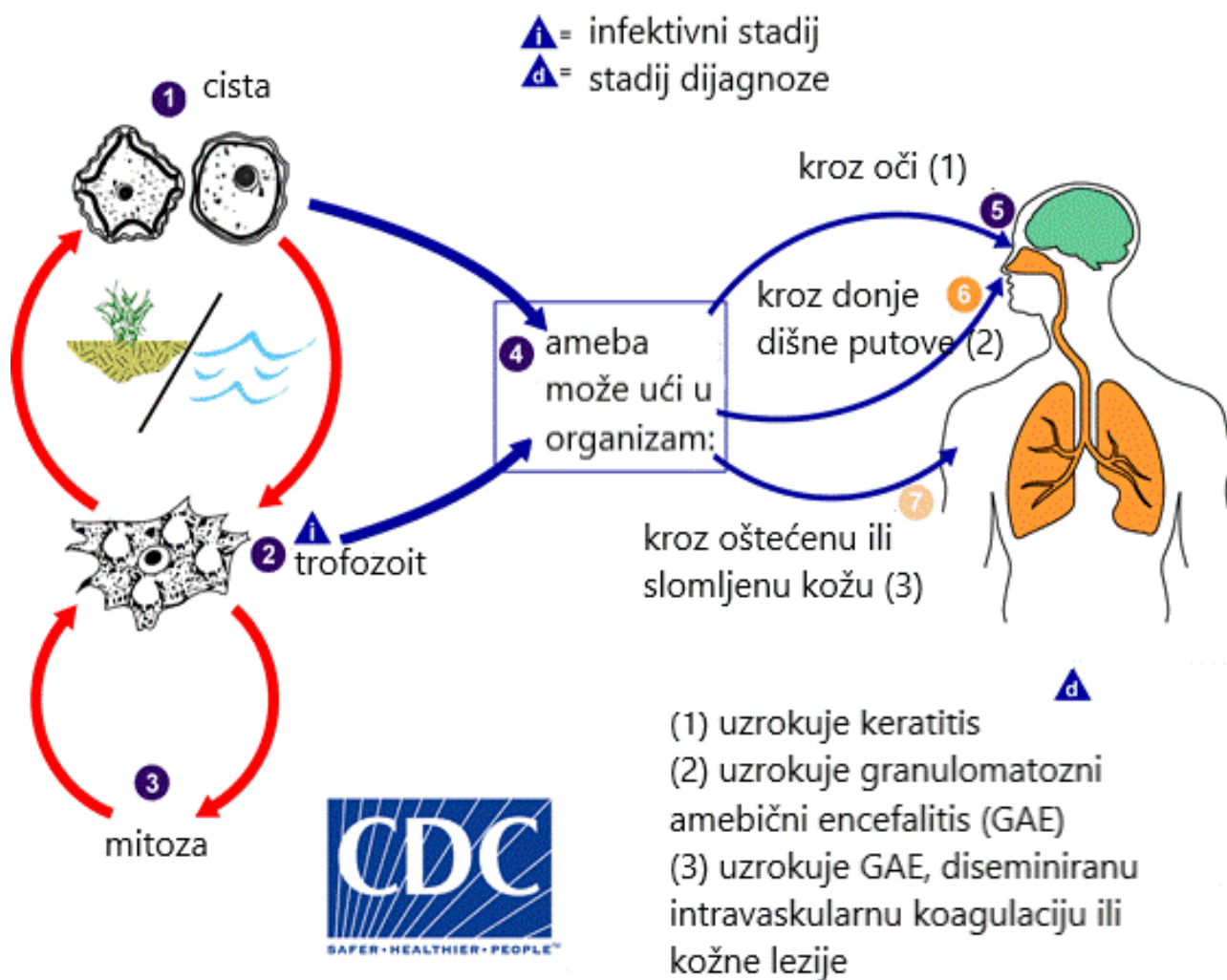
*A. castellanii* može dovesti do razvoja bolesti u ljudi. Vrste *Acanthamoeba* mogu biti okolišni domaćini značajnom broju patogena, uključujući *Francisella tularensis*, *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii*, *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia*, te mnoge *Mycobacterium* spp. Genom *A. castellanii* od 45 Mb čini ju prikladnom za širok raspon eksperimentalnih istraživanja [39, 40, 42].

### 1.6.1. Životni ciklus *A. castellanii*

Životni ciklus *Acanthamoeba* sastoji se od dva stadija, trofozoita i ciste (slika 2.). Trofozoit je infektivni vegetativni stadij, a cista predstavlja neaktivni oblik amebe. Oba stadija imaju promjer od 13 do 23  $\mu\text{m}$  [43]. Ameba se tijekom faze trofozoita udvostručuje mitozom ukoliko su ispunjeni optimalni uvjeti uzgoja; temperatura oko 30 °C, pH 7 i dovoljna količina hrane. Trofozoit se replicira u vremenskom rasponu 8 - 18 sati. Trofozoit i cista ulaze u tijelo kroz oči, donje dišne putove ili ulceracije na koži. Ulaskom u organizam trofozoit i cista migriraju u tkiva. Ukoliko uđe kroz oči, *Acanthamoeba* može izazvati ozbiljne upale rožnice naročito kod osoba koje koriste kontaktne leće. Ulaskom u donje dišne putove ili kroz ulceracije na koži može zahvatiti središnji živčani sustav i pritom uzrokovati granulomatozni amebični encefalitis, diseminiranu intravaskularnu koagulaciju ili kožne lezije kod imunokompromitiranih bolesnika [44].

*Acanthamoeba* posjeduju akantopodije, tzv. „lažne nožice“, što ih čini izuzetno pokretljivim, a imaju i sposobnost uporabe kemotaksije [45]. Kada se nalaze u životnoj opasnosti ili u nepovoljnim životnim uvjetima okoliša, amebe prelaze u stadij ciste s dvostrukim stijenkama [43].





**Slika 2. Životni ciklus *Acanthamoeba*.** Postoje dva stadija amebe: infektivni oblik je cista te trofozoit. Trofozoit se mitozom udvostručuje. Amebe mogu ući u organizam kroz oči, donje dišne puteve, slomljenu ili oštećenu kožu. *Prilagođeno prema: Acanthamoeba: Pathogen & Environmen. Centers for Disease Control and Prevation. Dostupno na: <https://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/pathogen.html>). Prilagođeno na hrvatski jezik.*

#### 1.6.2. *A. castellani* kao model za proučavanje razmnožavanja bakterija

Različite vrste ameba u okolišu, uključujući *Acanthamoeba*, mogu biti domaćini unutarstaničnih bakterija, odnosno rezervoari iz kojih se mogu razviti mnoge ljudske bolesti. Zbog toga je važno razumjeti interakciju između bakterija i ameba. Bakterije rezistentne na amebu jesu one koje se mogu obraniti od slobodno živućih ameba. To znači da im amebe pružaju zaštitu od nepovoljnih životnih uvjeta okoliša te u amebama mogu preživjeti i umnožiti se [46].

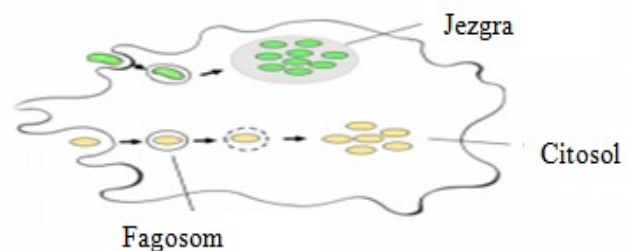
Mehanizam ingestije bakterija u amebu je poprilično jednostavan. Najčešće bakterije fagocitozom ulaze u amebu. Unutar fagosoma zbog oksidacijskog stresa, kisele sredine, raznovrsnih antimikrobnih supstanci i nedostatka hranjivih tvari unesene bakterije ugibaju. No, bakterije rezistentne na amebe razvile su metode preživljavanja unutar fagosoma i sposobne su iskoristiti resurse stanice domaćina. Bakterije najčešće migriraju u citosol amebe jer on osigurava hranjive tvari za rast bakterije te je zaštićen od imunološkog sustava domaćina. Zbog toga je citosol idealno mjesto za napredovanje bakterija nakon izlaska iz fagosoma.

Drugi način preživljavanja bakterija je zadržavanje unutar vakuole fagosoma gdje moraju poraziti njene antimikrobne mehanizme. To uključuje sprečavanje fuzije fagosoma i lizosoma, oštećenje membrana fagosoma ili promjenu pH unutar fagosoma. Takav mehanizam otimanja vakuole razvila je *L. pneumophila*, ali i druge srodne bakterije.

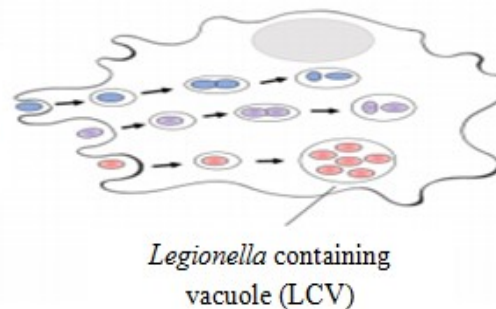
*A. castellanii* se smatra dobrim modelom za proučavanje razmnožavanja bakterija zbog njenog brzog rasta (8 sati na temperaturi od 30 °C) te encistcije za izgladnjivanje. Bakterije mogu preživjeti unutar *A. castellanii* kao endosimbionti. Također, ameba može poslužiti kao vektor za njihovo širenje [47].

### STRATEGIJE BAKTERIJA:

#### A BJEŽANJE IZ FAGOSOMA



#### B MIJENJANJE FAGOSOMSKE VAKUOLE



**Slika 3. Preživljavanje bakterija unutar ameba.** Bakterije mogu preživjeti unutar ameba na dva načina: (A) mogu pobjeći iz fagosoma ili (B) mogu promijeniti fagosomsku vakuolu. *Prilagođeno prema: J.E.Strassmann, L.Shu: Ancient bacteria- amoeba relationships and pathogenic animal bacteria. Prilagođeno na hrvatski jezik.*

### 1.7. Vodozahvat „Vela Fontana“

Za vodoopskrbu stanovništva otoka Krka koristi se izvorište Ponikve koji opskrbljuje 70 % potrebnih količina vode. Zatim, izvorišta u Bašćanskoj kotlini, izvorište Jezero, izvorište Paprata, izvorište Stara Baška te Vodovod Rijeka. Izvorišta vode na otoku Krku zadovoljavaju kvalitetom i količinom cijele godine, iako tijekom turističke sezone dolazi do šest puta veće potrošnje vode [48].

Kontinuiranim porastom broja stanovnika otoka Krka postupno je razvijen vodoopskrbni sustav Krk. Prvotno se razvilo glavno otočno izvorište Ponikve. Prednost izvorišta je akumulacija vode za sušna razdoblja. Povoljni prirodni uvjeti osigurali su da se dio vode koja padne na sliv sačuva u akumulaciji Ponikve za periode kada su potrebe za vodom veće. Ponikve su nedjeljive pa je potrebno zaštititi akumulaciju koja prihranjuje podzemlje.

Uvala Ponikve je krška dolina smještena unutar karbonatnih stijena. Mala Fontana je 1938. bila prvi kaptirani izvor u uvali Ponikve, a crpna stanica s rezervoarima i cjevovodima puštena je u pogon 1948. godine. 1961. godine su na tu crpnu stanicu priključeni bunari Vela Fontana i Škrili pomoću niskotlačnih pumpi, a 1967. galerijski zahvat Vela Fontana [48].

Glavni vodozahvat za vodoopskrbu je vodozahvat Vela Fontana. Sastoji se od dva kraka horizontalne galerije i vertikalnog okna. Iskop je napravljen u zdrobljenoj vapnenačkoj stijeni tijekom suhog ljetnog razdoblja. Tada nije bilo zaliha vode u retenciji, a akumulacija Ponikve još nije bila izgrađena. Tijekom izvedbe privremenog nasipa razina vode se podignula i danas je kaptaža trajno potopljena.

Gotovo 50 godina nakon formiranja Vele fontane nastala je akumulacija Ponikve izgradnjom brane na području nekadašnjega plitkog povremenog jezera. Oborinska voda iz slivnog područja opskrbljuje akumulaciju Ponikve.

Crpna stanica Ponikve smještena je u blizini vodozahvata Vela Fontana, a predstavlja glavnu stanicu za vodoopskrbu najvećeg dijela otoka Krka. Stanica se sastoji od strojarne,

vodospreme volumena 4.000 m<sup>3</sup>, prostorije za elektroopremu, upravljanje i daljinski nadzor te uređaja za dezinfekciju vode UV zračenjem i klor dioksidom. Uz crpnu stanicu nalazi se filtarsko postrojenje sa četiri višeslojna tlačna filtra [48].

#### 1.8. Biokemijske i kemijske karakteristike voda ključne za preživljavanje *Francisella*

Smatra se da su biokemijske značajke vode, kao i određeni okolišni čimbenici bitni za preživljavanje *Francisella* u određenim vodenim okuženjima. Također, za opstanak i razmnožavanje *Francisella* važna je njihova sposobnost adaptacije na ograničavajuću prehrambene faktore. Pa tako, obilje hranjivih tvari pridonosi preživljavanju *F. tularensis* subsp. *holartica* u jezerskim vodama [49]. Osim toga, *F. tularensis* subsp. *holartica* ulazi u tzv. VBNC stanje (engl. *viable but non-culturable state*) nakon kokulture s protozoama. VBNC stanje definirano je kao strategija preživljavanja, gdje bakterije ne mogu rasti i dijeliti se na uobičajenim kulturama, ali su žive i sposobne obnoviti metaboličku aktivnost. Međutim, pokazalo se da unatoč prisutnosti hranjivih tvari bakterija vremenom gubi svoju virulenciju [49].

*F. tularensis* rabi različite hranjive tvari od svog domaćina. Tu spadaju prijelazni metali, poput cinka, mangana i željeza, i upravo su se oni pokazali ključnim za opstanak i dijeljenje *F. tularensis*, ali i ostalih patogena. Prijelazni metali sudjeluju u strukturnoj izgradnji enzima, skladišnih proteina te čimbenika transkripcije [50, 51]. Bakterije koriste metalne ione u metaboličkim procesima te su neophodni za njihovu virulentnost. Prethodnim istraživanjima dokazano je da *F. tularensis* subsp. *tularensis* dulje preživljava u bočatoj vodi za razliku od slane vode. Porastom slanoće vode povećava se pokretljivost te ukupna koncentracija metala (kadmija, bakra i nikla) u vodi. Prisutnost visokohranjivih tvari, kao što su sumporni spojevi, te protozoa doprinosi opstanku *F. tularensis* subsp. *holartica* u jezerskim vodama [49].

Poznato je da se u Skandinavskim zemljama tularemija pretežno prenosi ubodom komaraca, dok su u Turskoj, Bugarskoj, Kosovu i Makedoniji slučajevi zaraze povezani s kontaminiranom pitkom vodom. Zbog toga je bitno razumjeti mehanizme dugotrajnog opstanka *Francisella* u njihovom prirodnom okruženju. Slučajevi obolijevanja u ljudskoj populaciji povezani su s životom blizu obale, obuhvaćajući prirodne izvorske vode, bočate i morske vode. Unatoč potvrđenim slučajevima zaraze ovom bakterijom nisu utvrđeni točni

mehanizmi njenog dugotrajnog preživljavanja uglavnom zbog ograničenog znanja o preživljavanju *Francisella* u njihovom prirodnom okruženju.

Na preživljavanje *Francisella* utječe temperatura vode, iako prijelazni metali imaju ključnu ulogu u bakterijskoj patogenezi [52]. Prijelazni metali sudjeluju u širokom rasponu neophodnih bioloških procesa. Ukoliko bakterija posjeduje određene defekte u sposobnosti iskorištavanja metalnih iona u svom metabolizmu može doći do slabljena virulentnosti [53]. S druge strane, prevelika koncentracija metalnih iona može djelovati toksično na bakterije. Zbog toga je nužno da unos i raspoloživost metalnih iona bude u ravnoteži s fiziološkim potrebama patogena [54]. Pojedine bakterije razvile su specifične mehanizme za preživljavanje suviška metalnih iona u okolišu i unutar fagocitnih stanica [54]. Naime, neki patogeni imaju nekoliko reguliranih prijenosnika metala za npr. cink, željezo, bakar i mangan. To im omogućuje prilagodbu na varijabilne uvjete okoline [55 -57, 83].

Istraživanja su pokazala da su mangan i cink neophodni za preživljavanje i razmnožavanje *Francisella* u vodenom okruženju. Povišena količina cinka djeluju toksično na *Francisella*, a visoke razine mangana nemaju negativan utjecaj na preživljavanje ove bakterije. Može se zaključiti da je za obavljanje fizioloških procesa *Francisella* potrebna odgovarajuća razina cinkovih iona, dok ona tolerira oscilacije u razini manganovih iona. Također, na opstanak *Francisella* u okolišu doprinosi prisutnost ameba, kao što je *A. castellanii*.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Primarni cilj ovog istraživanja bio je istražiti kinetiku rasta *F. philomiragia* i *A. castellanii* u izvorskoj vodi „Vela Fontana“ unutar vremenskog perioda od 40 dana. Praćeno je preživljavanje *F. philomiragia* pri različitim razrjeđenjima,  $1 \times 10^6$  CFU/ml te  $1 \times 10^7$  CFU/ml, kada je sama u izvorskoj vodi i kada se nalazi u kokulturi s *A. castellanii*. Također, praćen je rast *A. castellanii* kada je sama u izvorskoj vodi i u kokulturi s bakterijom.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Kulture bakterija i ameba

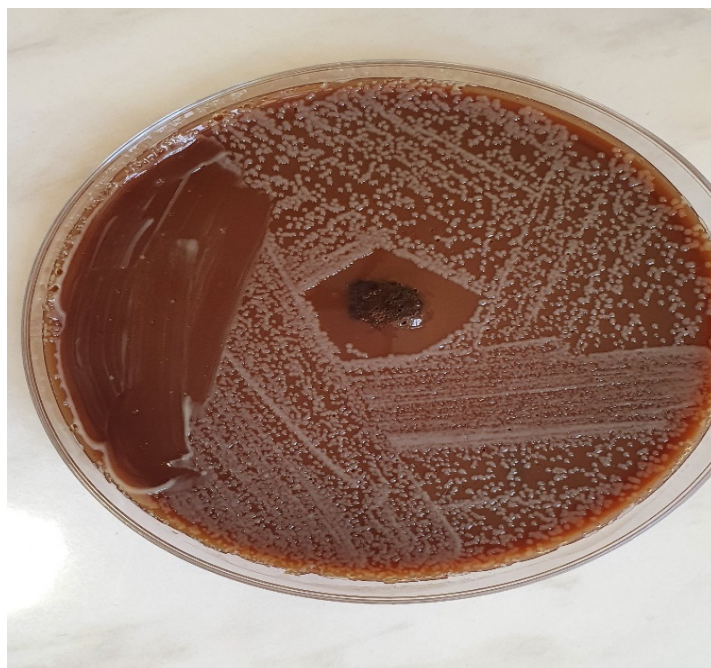
Za potrebe ovog istraživanja korišten je bakterijski soj *F. philomiragia* ATCC25015 te ameba *A. castellanii* ATC30234. *F. philomiragia* pribavljena je od prof. H. C. Winther-Larsen sa Sveučilišta Oslo u Norveškoj.

#### 3.2. Hranjive podloge

*F. philomiragia* je uzgojena na čokoladnom agaru obogaćenom IsoVitaleX-om (BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment) na 37 °C uz prisustvo 5% CO<sub>2</sub> tijekom 24 sata.

Čokoladni agar je obogaćena, neselektivna podloga u kojoj crvene krvne stanice liziraju. Kao rezultat toga, medij poprima čokoladno - smeđu boju po čemu je agar i dobio ime. Lizom crvenih krvnih stanica dolazi do ispuštanja unutarstaničnih hranjivih tvari kao što su hemin (faktor X), hemoglobin te koenzim (NAD ili faktor V), a njih koriste bakterije [58 - 60].

Pripremljene su dvije otopine. U prvoj se koriste GC agar (Difco™ GC Medium Base) i destilirana voda, a za drugu otopinu sušeni goveđi hemoglobin (BBL™ goveđi hemoglobin). Dobivene otopine odvojeno su autoklavirane na 121 °C tijekom 15 minuta, a potom su ohlađene na 50 °C. Druga otopina je aseptično dodana u prvu te je sve skupa promiješano s IsoVitaleX-om. Dobivena otopina je ravnomjerno inokulirana na ploče. Goveđi ekstrakt služi kao izvor hranjivih tvari, IsoVitaleX opskrbljuje faktorima rasta (faktor V) te vitaminima, a hemoglobin daje faktor X.



**Slika 4. Kolonije *F. philomiragia* na čokoladnom agaru. Izvor: Sara Marohnić**

Ameba *A. castellanii* je kultivirana u mediju od ekstrakta peptona, kvasca te glukoze (PYG = ATCC medij) u flasku za stanične kulture od 75 cm<sup>2</sup> (Falcon, Corning Life Sciences, Durham, Sjedinjene Američke Države). Ekstarkt peptona, kvasca i glukoze je pripremljen miješanjem 0,1% ekstrakta kvasca, 2 % proteaze peptona, 2 M glukoze, 0,05 M kalcijevog klorida, 0,44 M magnezijevog sulfata heptahidrata (MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O), 0,25 M natrijevog hidrofosfata heptahidrata (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O), 0,25 M monokalijevog fosfata (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) te 0,005 M Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O. ATCC 30234 medij s dodanom glukozom se koristi za uzgoj ameba, dok se medij bez glukoze koristi za eksperimentalna istraživanja.

### 3.3. Inokulacija *A. castellanii*

*A. castellanii* je uzgajana u bočicama za stanične kulture od 75 cm<sup>2</sup>, u ATCC mediju 30234 s dodanom glukozom na 27 °C. Nakon uzgoja je uklonjen medij iz bočicama za stanične kulture te je dodan ATCC 30234 medij bez glukoze. Zatim su adherirane amebe s bočicama za staničnu kulturu sastrugane u suspenziju. Amebe u suspenziji premještene su u epruvetu od 50 ml, promiješane te prebrojane pomoću Neubauerove komore pod invertnim mikroskopom. Potom su amebe centrifugirane 10 min na 1000 rpm (engl. *revolutions per*



*minute* ili  $\text{sec}^{-1}$ ), a supernatant je izliven. Amebe u talogu su resuspendirane u 3,27 ml sterilne vode kako bi se postigao željeni broj od  $1 \times 10^7$  ameba u 1 ml.

### 3.4. Inokulacija *F. philomiragia*

Za pripremu bakterijske suspenzije željene koncentracije potrebno je odrediti turbiditet, odnosno optičku gustoću (OD). Prema iskustvu višegodišnje laboratorijske prakse utvrđeno je da optička gustoća 1 označava koncentraciju bakterija od  $1 \times 10^9$  CFU/ml. Bakterije su izdvojene iz čokoladnog agara pomoću sterilne eze. Zatim je pripremljena suspenzija u fiziološkoj otopini koja je homogenizirana mješalicom. Optička gustoća (OD) uzoraka izmjerena je spektrofotometrom pri valnoj duljini 580 nm. Sterilna destilirana voda je korištena kao kontrola, odnosno kao slijepa proba. Očitane su apsorbancije slijepe probe i pripremljene otopine. Računski je određena željena koncentracija bakterijske suspenzije,  $1 \times 10^6$  CFU/ml i  $1 \times 10^7$  CFU/ml, koju je bilo potrebno pripremiti.

### 3.5. Priprema uzoraka izvorske vode

Iz vodozahvata Vela Fontana na Krku prikupljena je izvorska voda (pH 7,5) koje je autoklavirana na  $121\text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 15 minuta. U 1 l izvorske vode u šest staklenih boca kultivirane su *F. philomiragia* te *A. castellanii* na sobnoj temperaturi uz nepotpuno zatvoren poklopac. U uzorke izvorske vode dodane su koncentracije suspenzija redom:  $1 \times 10^6$  CFU/ml *A. castellanii*,  $1 \times 10^7$  CFU/ml *A. castellanii*,  $1 \times 10^6$  CFU/ml *F. philomiragia*,  $1 \times 10^7$  CFU/ml *F. philomiragia*,  $1 \times 10^6$  CFU/ml *F. philomiragia* u kokulturi s  $1 \times 10^7$  CFU/ml *A. castellanii*,  $1 \times 10^7$  CFU/ml *F. philomiragia* u kokulturi s  $1 \times 10^6$  CFU/ml *A. castellanii*.

**Tablica 2. Prikaz dodanih koncentracija suspenzija u uzorke izvorske vode „Vela Fontana.“**

<i>A. castellanii</i> $10^6$ CFU/ml	<i>A. castellanii</i> $10^7$ CFU/ml	<i>F.</i> <i>philomiragia</i> $10^6$ CFU/ml	<i>F.</i> <i>philomiragia</i> $10^7$ CFU/ml	<i>A. castellanii</i> $10^6$ CFU/ml + <i>F. philomiragia</i> $10^7$ CFU/ml	<i>A. castellanii</i> $10^7$ CFU/ml + <i>F.</i> <i>philomiragia</i> $10^6$ CFU/ml
--	--	---	---	--	---

### 3.6. Kinetika rasta *F. philomiragia* i *A. castellanii*

Kinetika rasta *F. philomiragia* i *A. castellanii* praćena je svakih pet dana tijekom 40 dana. Prije svakog uzorkovanja, otopine su homogenizirane jer je većina ameba bila adherirana za stjenke boce. Potom je 1 ml uzorka vode premješteno na ploću s 24 jažice te inkubirano na 27 °C tijekom 24 sata. Zatim je broj ameba određen korištenjem svjetlosnog mikroskopa.

Broj bakterija utvrđen je nasađivanjem deseterostrukih razrjeđenja na ćokoladni agar. Za pripremu deseterostrukih razrjeđenja 200 µl svakog uzorka preneseno je u prvi red jažica mikrotitarske ploćice koja se sastoji od ukupno 96 jažica. Ostale jažice nadopunile su se s 180 µL sterilne destilirane vode. Potom je prenijeto 20 µl suspenzije uzoraka krenuvši od prve jažice. Dobivena deseterostruka razrjeđenja nasađena su na ćokoladni agar i inkubirana na 37 °C tijekom 24 sata. Sljedeći dan izbrojane su narasle kolonije *F. philomiragia*. Analizirana je morfologija *F. philomiragia*, ukljućujući njen oblik, boju, velićinu i gustoću.



**Slika 5. Porasle kolonije *F. philomiragia* nakon pripreme deseterostrukih razrjeđenja i inkubacije na 37 °C tijekom 24 sata. Izvor: Sara Marohnić**

### 3.7. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao logaritamske vrijednosti s bazom 10 ( $\log_{10}$  CFU/ml), a dobiveni su u programu Microsoft® Office Excel. Izračunate su aritmetičke sredine i standardna devijacija. Dobivene vrijednosti opisane su grafički. Pomoću programa GraphPad Prism, 5.0 software provedena je statistička obrada podataka koristeći parametrijski Studentov t - test. To je test koji omogućuje računanje statističke značajnosti između dvije srednje vrijednosti.

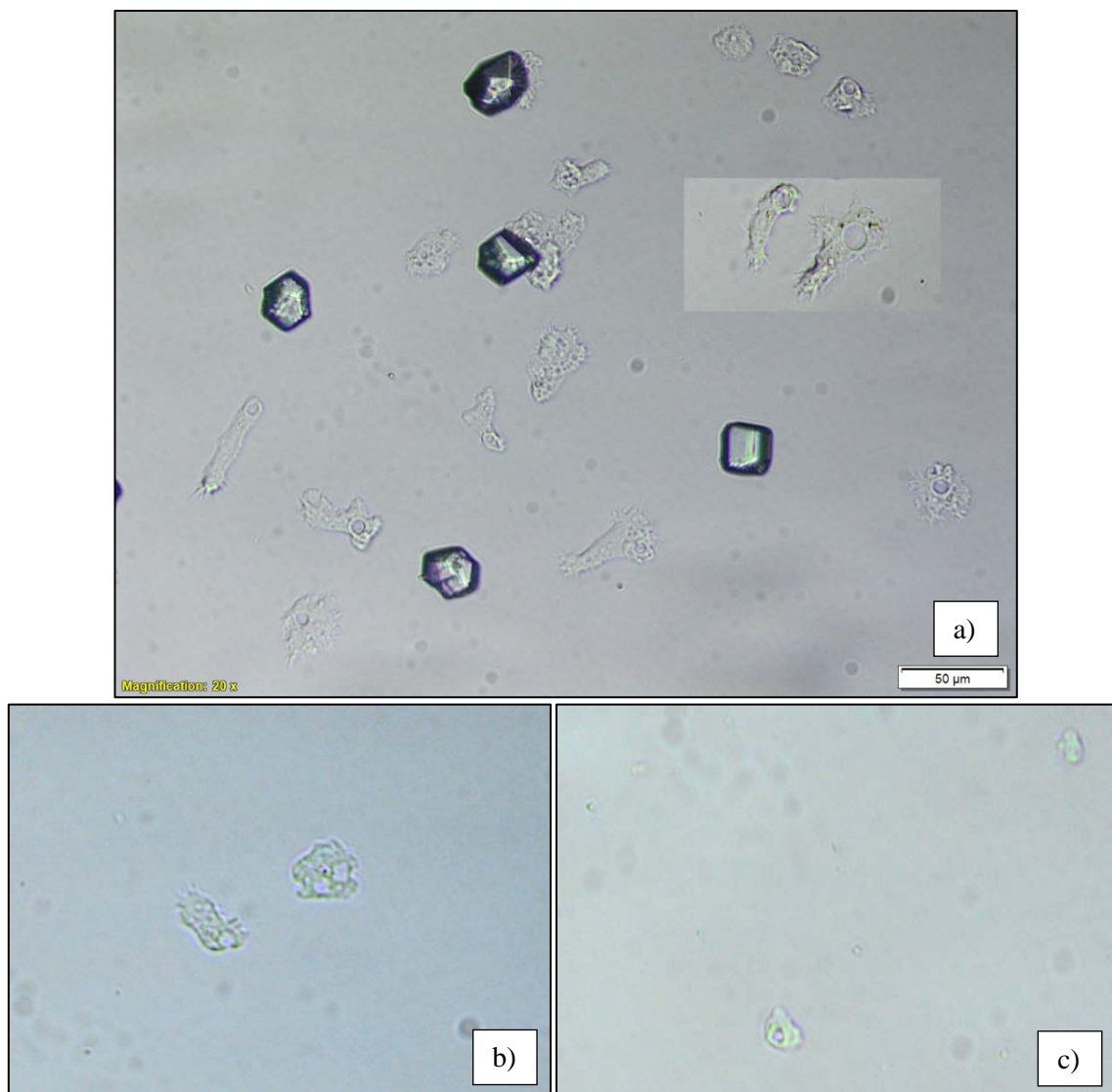
#### 4. REZULTATI

U razdoblju od 40. dana praćena je kinetika rasta *F. philomiragia* i *A. castellanii* u 1 l izvorske vode „Vela Fontana“ pri sobnoj temperaturi i slabom dotoku zraka. U 1 l izvorske vode, bakterija i ameba su kultivirane u koncentracijama  $1 \times 10^6$  CFU/ml te  $1 \times 10^7$  CFU/ml. Analizirano je koliko dugo *F. philomiragia* preživljava sama, a koliko dugo uz prisustvo amebe. Također je ispitivan rast *A. castellanii* u izvorskoj vodi te kako se ona ponaša u kokulturi s *F. philomiragia*. Nakon nasađivanja na hranjivu podlogu i inkubacije, izbrojan je broj poraslih kolonija *F. philomiragia*. Narasle kolonije jesu sjajno sive boje, pravilnog oblika. Broj ameba izbrojan je pomoću svjetlosnog mikroskopa. U prvih 20. dana ameba živi u obliku trofozoita, odnosno aktivnog parazita, dok su nakon 20. dana nađene samo ciste, neaktivni oblici amebe.

Na početku pokusa, odnosno 0. dan broj *F. philomiragia* bila je  $2,75 \times 10^6$  CFU/ml, 5. dan se već dvostruko smanjila na  $1,3 \times 10^6$  CFU/ml. Dvadesetpetog dana broj bakterije iznosio je  $4 \times 10^5$  CFU/ml te je to ujedno i zadnji dan rasta *F. philomiragia*, dodane u razrjeđenju od  $1 \times 10^6$  CFU/ml, u izvorsku vodu „Vela Fontana.“ Nasuprot tome, količina bakterija dodana u istom broju u kokulturi s amebom, nultog dana iznosila je  $5,8 \times 10^6$  CFU/ml, 5. i 10. dana  $2 \times 10^6$  CFU/ml, a 20. dana  $1 \times 10^6$  CFU/ml, nakon čega više nije zabilježen rast *F. philomiragia* na čokoladnom agaru.

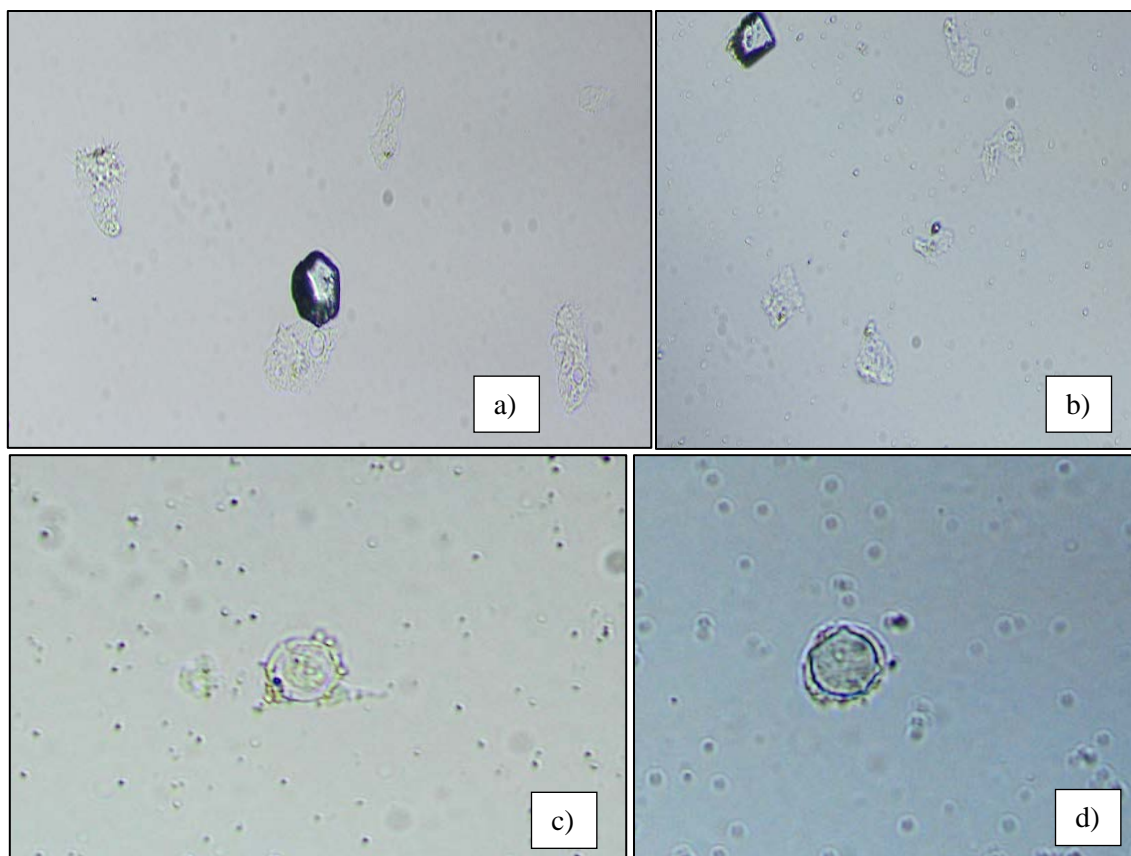
Broj *F. philomiragia* u izvorskoj vodi, u drugoj boci, na početku pokusa iznosio je  $2 \times 10^7$  CFU/ml, a 5. dana  $1,3 \times 10^7$  CFU/ml. Desetog dana nije uočen rast *F. philomiragia*. Primijećeno je da bakterija dulje preživljava u vodi kada se nalazi u kokulturi s amebom. U tom slučaju preživljava 15. dana i tada je izbrojan količina od  $1 \times 10^5$  CFU/ml.

Ameba ( $1 \times 10^6$  CFU/ml) sama i u kokulturi s bakterijom u izvorskoj vodi „Vela Fontana“ jednako dugo preživljava, točnije, 20. dana. Nultog dana, izbrojano je  $5,6 \times 10^5$  CFU/ml amebe *A. castellanii* u obliku trofozoita, 5. dan količina je dvostruko opala, a 15. dan je iznosila  $1,2 \times 10^5$  CFU/ml. 20. dan uočeno je  $8,8 \times 10^4$  CFU/ml ameba u cističnom obliku. U drugom slučaju, amebe i bakterije zajedno, zabilježeno je  $6,72 \times 10^5$  CFU/ml trofozoita nultog dana, 5. je dan količina ostala nepromijenjena, dok je 15. dana iznosila  $6 \times 10^4$  CFU/ml. 20. dan primijećeno je  $1,6 \times 10^4$  CFU/ml cističnih oblika.



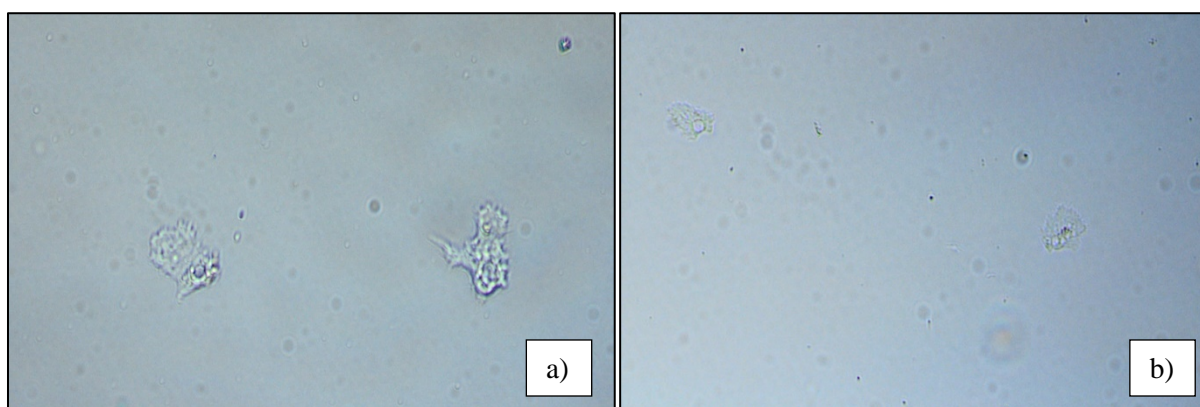
**Slika 6. Mikroskopski prikaz *A. castellanii* pri razrjeđenju  $1 \times 10^6$  CFU/ml u izvorskoj vodi „Vela Fontana“ nakon 0. dana (a), 5. dana (b) i 20. dana (c) pokusa. Izvor: Sara Marohnić**

*A. castellanii* dodana u broju  $1 \times 10^7$  CFU/ml u izvorsku vodu preživljava cjelokupno vrijeme trajanja pokusa, odnosno 40 dana. Nulti dan evidentiran je broj od  $5,52 \times 10^6$  CFU/ml trofozoita, 5. dan se vrijednost povećala na  $6,4 \times 10^6$  CFU/ml, a 20. dan se broj smanjio na  $2 \times 10^6$  CFU/ml ameba u cističnom obliku. Zadnjeg dana odvijanja pokusa, primijećeno je  $2,4 \times 10^4$  CFU/ml cista. *A. castellanii*, također, egzistira zajedno s *F. philomiragia* 40. dana i tada je zabilježen veći broj cista nego kada je ameba sama,  $5,6 \times 10^4$  CFU/ml. Nultog dana zabilježeno je  $4,68 \times 10^6$  CFU/ml trofozoita, 5. dana  $5,87 \times 10^6$  CFU/ml, dok je 20. dana uočeno  $1,28 \times 10^6$  CFU/ml cista.



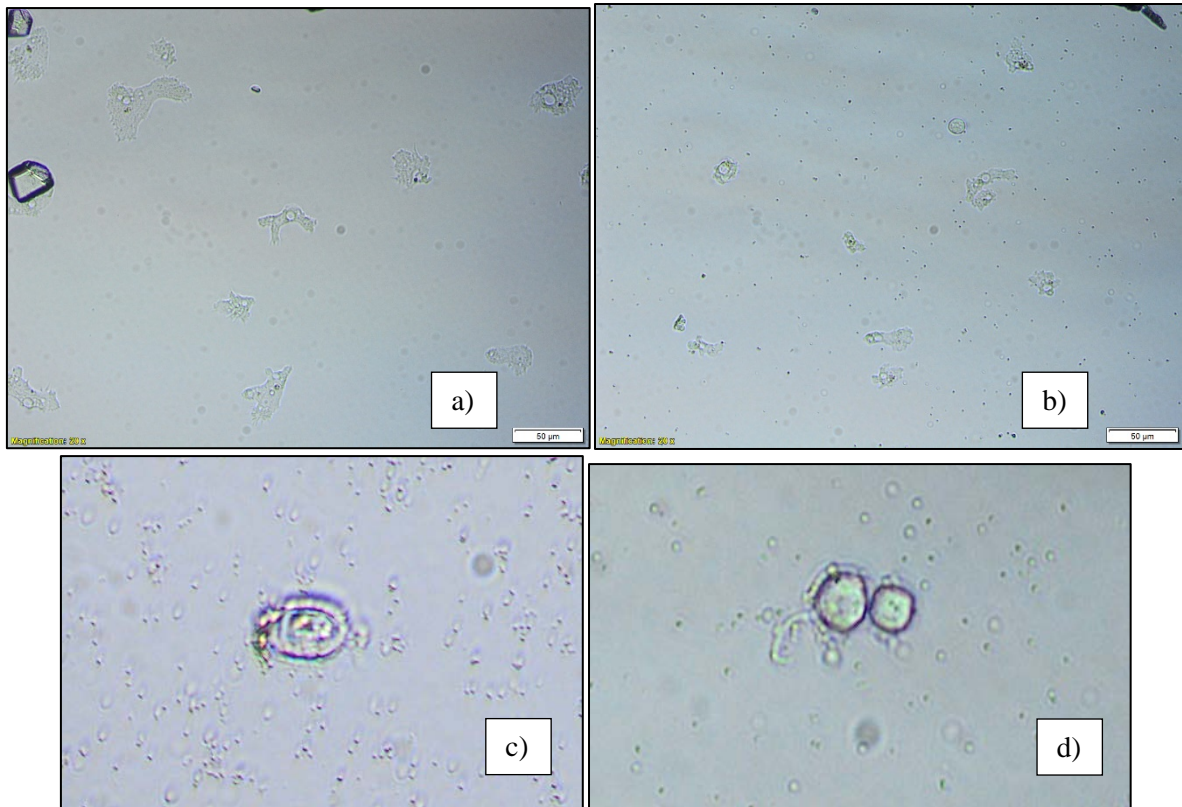
**Slika 7. Mikroskopski prikaz *A. castellanii* pri razrjedenju  $1 \times 10^7$  CFU/ml u izvorskoj vodi „Vela Fontana“ nakon 0. dana (a), 5. dana (b), 20. dana (c) i 40. dana (d) pokusa.**

*Izvor: Sara Marohnić*



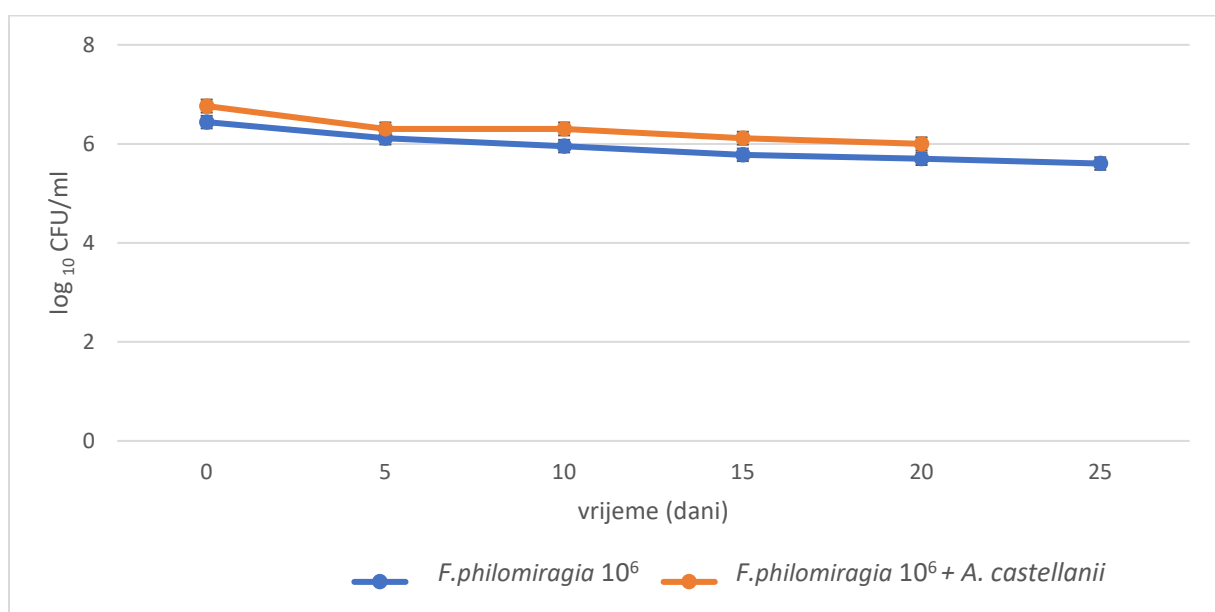
**Slika 8. Mikroskopski prikaz *A. castellanii* pri razrjedenju od  $1 \times 10^6$  CFU/ml u kokulturi s *F. philomiragia* u izvorskoj vodi „Vela Fontana“ nakon 0. dana (a) te 5. dana (b) pokusa. *Izvor: Sara Marohnić***





**Slika 9. Mikroskopski prikaz *A. castellanii* pri razrjeđenju od  $1 \times 10^7$  CFU/ml u kokulturi s *F. philomiragia* u izvorskoj vodi „Vela Fontana“ nakon 0. dana (a), 5. dana (b), 20. dana (c) i 40. dana (d) pokusa. Izvor: Sara Marohnić**

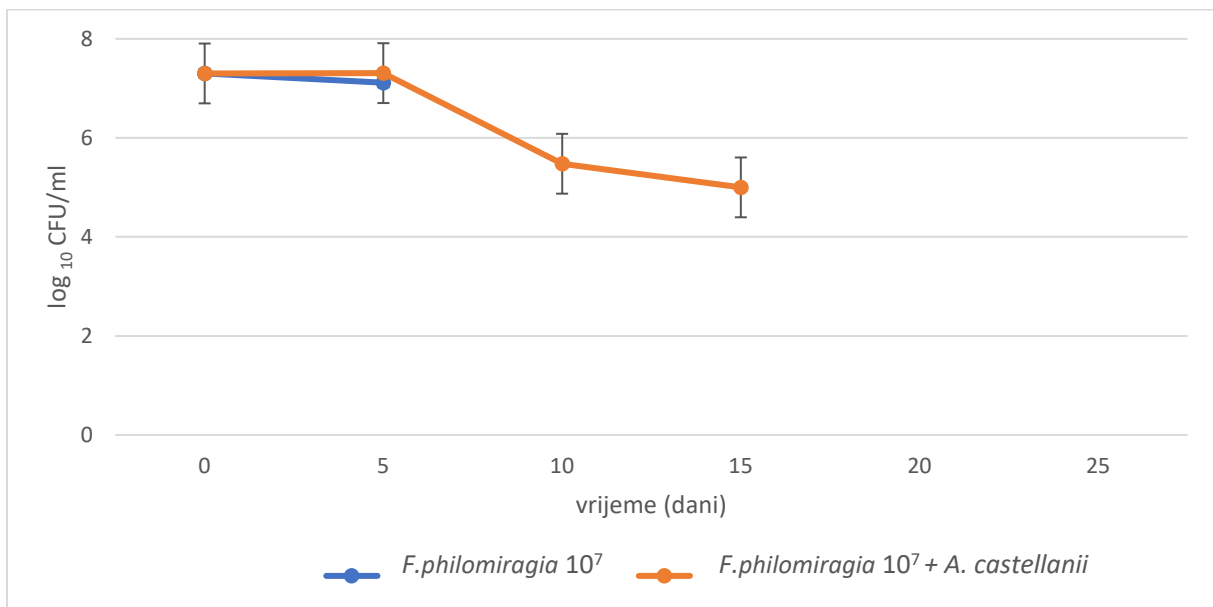
#### 4.1. Kinetika rasta *F. philomiragia* pri razrjeđenju od $1 \times 10^6$ CFU/ml i *A. castellanii*



**Slika 10. Kinetika rasta *F. philomiragia* pri razrjeđenju od  $1 \times 10^6$  CFU/ml i *A. castellanii* u izvorskoj vodi "Vela fontana" tijekom 40 dana.** Bakterija je nasadena na čokoladni agar i inkubirana na 37 °C, dok se preživljavanje amebe pratilo uz pomoć svjetlosnog mikroskopa. Pokus je ponovljen u triplicatu tri puta te je određena standardna devijacija.

Iz slike 10. je vidljivo da *F. philomiragia* pri razrjeđenju od  $1 \times 10^6$  CFU/ml bolje raste sama nego u kokulturi s *A. castellanii* u izvorskoj vodi "Vela Fontana." Veći broj bakterija zabilježen je kada one rastu u kokulturi s amebom jer koriste iz nje hranjive tvari. Također, uočeno je da se broj bakterije same i bakterije u kokulturi s amebom smanjio 25. dan u usporedbi s 0. danom. Rezultati se u ovom periodu statistički značajno razlikuju s obzirom na početni dan ( $p < 0,0001$ ). Nakon 20. dana *F. philomiragia* u kokulturi s amebom ne preživljava u vodi, dok nakon 25. dana nije zabilježen rast *F. philomiragia* pri razrjeđenju od  $1 \times 10^6$  CFU/ml.

#### 4.2. Kinetika rasta *F. philomiragia* pri razrjeđenju od $1 \times 10^7$ CFU/ml i *A. castellanii*



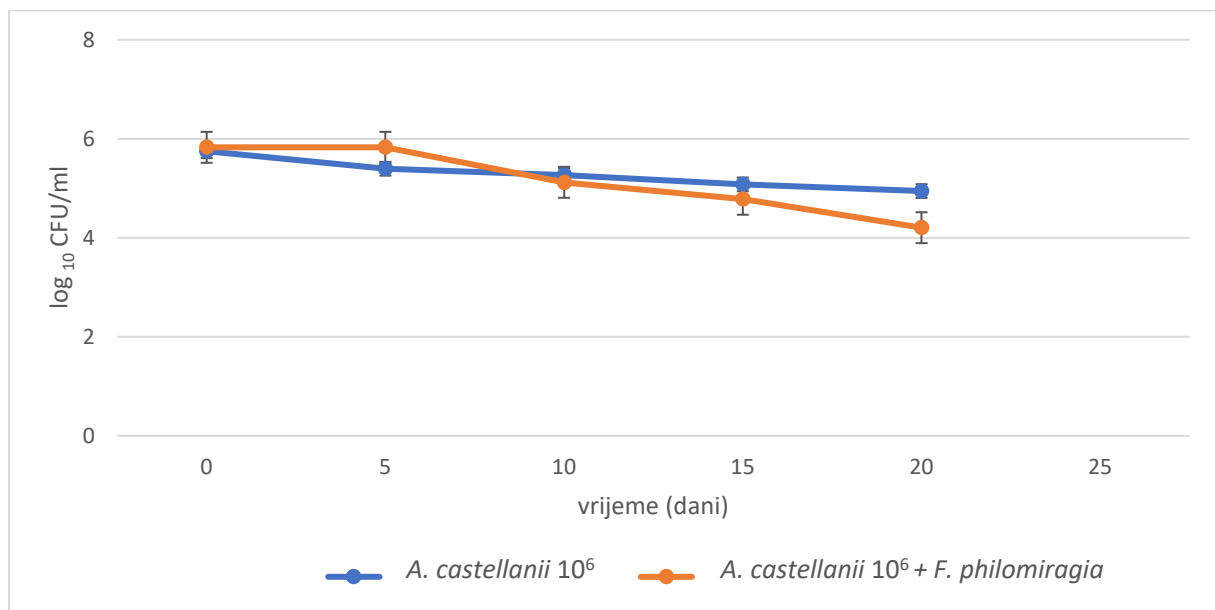
**Slika 11. Kinetika rasta *F. philomiragia* pri razrjeđenju od  $1 \times 10^7$  CFU/ml i *A. castellanii* u izvorskoj vodi "Vela fontana" tijekom 40 dana.** Bakterija je nasadena na čokoladni agar i inkubirana na 37 °C, dok se preživljavanje amebe pratilo uz pomoć



svjetlosnog mikroskopa. Pokus je ponovljen u triplicatu tri puta te je određena standardna devijacija.

*F. philomiragia* pri razrjeđenju od  $1 \times 10^7$  CFU/ml u izvorskoj vodi (1 l) "Vela Fontana" preživljava samo pet dana, dok u kokulturi s amebom preživljava i do čak 15 dana (slika 11.). Broj *F. philomiragia* same je prosječno jednak na početku inokulacije i 5. dana te njezina vrijednost iznosi  $6,71 \times 10^7$  CFU/ml. Iz slike je vidljiv značajan pad broja bakterije kada ona raste u kokulturi s amebom 0. dana u odnosu na 15. dan. Rezultati se statistički značajno razlikuju 10. i 15. dan u odnosu na nulti dan ( $p < 0,0001$ ).

#### 4.3. Kinetika rasta *A. castellanii* pri razrjeđenju od $1 \times 10^6$ CFU/ml i *F. philomiragia*

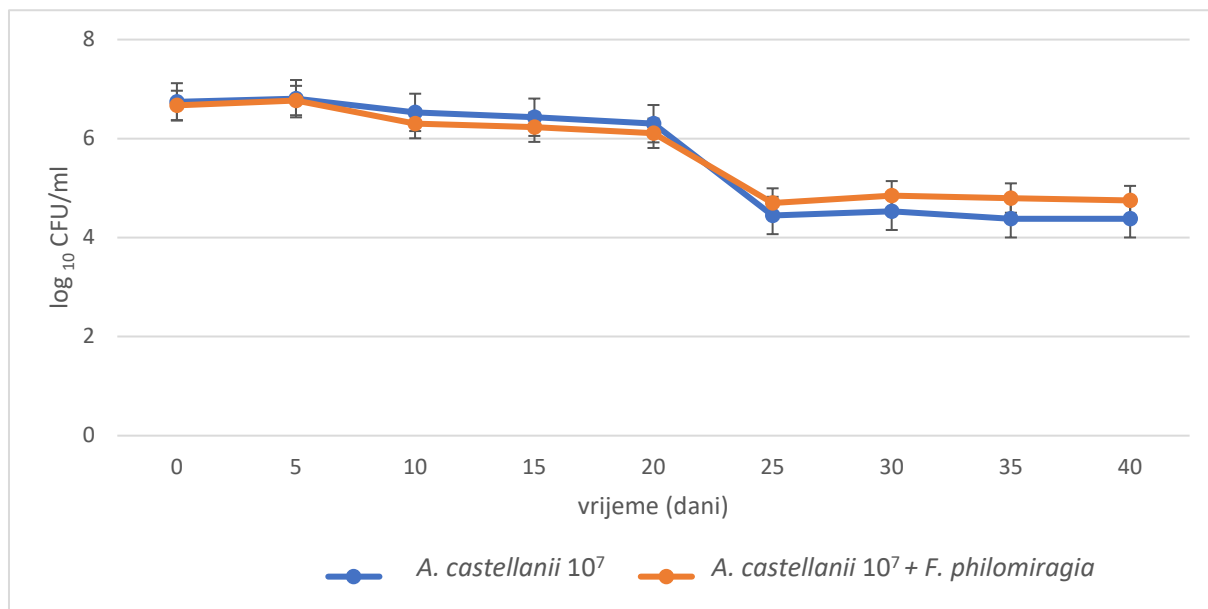


**Slika 12. Kinetika rasta *A. castellanii* pri razrjeđenju od  $1 \times 10^6$  CFU/ml i *F. philomiragia* u izvorskoj vodi "Vela fontana" tijekom 40 dana.** Bakterija je nasađena na čokoladni agar i inkubirana na  $37^\circ\text{C}$ , dok se preživljavanje amebe pratilo uz pomoć svjetlosnog mikroskopa. Pokus je ponovljen u triplicatu tri puta te je određena standardna devijacija.

Iz slika 12. i 13. može se uočiti da *A. castellanii* jednako dobro preživljava i sama i u kokulturi s *F. philomiragia* u izvorskoj vodi "Vela Fontana." Slika 3. prikazuje da ameba sama i u kokulturi s bakterijom preživljava do 20 dana. Početnog i petog dana inokulacije broj

amebe u kokulturi s bakterijom je približno jednak i prosječno iznosi  $5,61 \times 10^6$  CFU/ml, a potom značajno opada. Broj amebe same se s vremenom smanjuje.

#### 4.4. Kinetika rasta *A. castellanii* pri razrjeđenju od $1 \times 10^7$ CFU/ml i *F. philomiragia*



**Slika 13. Kinetika rasta *A. castellanii* pri razrjeđenju od  $1 \times 10^7$  CFU/ml i *F. philomiragia* u izvorskoj vodi "Vela fontana" tijekom 40 dana.** Bakterija je nasadena na čokoladni agar i inkubirana na  $37^\circ\text{C}$ , dok se preživljavanje amebe pratilo uz pomoć svjetlosnog mikroskopa. Pokus je ponovljen u triplikatu tri puta te je određena standardna devijacija.

Slika 13. označava da ameba sama i u kokulturi s bakterijom preživljava 40. dana u izvorskoj vodi „Vela Fontana,“ a njihov broj se periodično smanjuje. 30. i 35. dana se broj bakterija statistički značajno razlikuje s obzirom na početni ( $p < 0,0001$ ).

## 5. RASPRAVA

Rezultati provedenog istraživanja pokazuju da *F. philomiragia* dulje preživljava u kokulturi s amebom *A. castellanii* u izvorskoj vodi „Vela Fontana.“ *F. philomiragia* dodana pri razrjeđenju od  $10^7$  CFU/ml u kokulturi s amebom opstaje 10 dana dulje nego kada je sama u izvorskoj vodi. Broj bakterija periodično se smanjuje s vremenom što znači da se one nisu umnožavale. Može se zaključiti da amebe podupiru preživljavanje bakterija. Moguća su dva mehanizma koja objašnjavaju preživljavanje bakterija u kokulturi s amebama. Prvi je izravna interakcija između *F. philomiragia* i *A. castellanii*. Drugi pristup opisuje da ameba proizvodi hranjive tvari koje bakterija koristi za njen opstanak. Nakon što bakterije procesom fagocitoze uđu u amebu, migriraju u citosol koji osigurava hranjive tvari za napredovanje bakterija i zaštićen je od imunološkog sustava domaćina. Također, moguće je da bakterije razgrađuju toksične supstance koje izlučuje ameba i na taj način preživljavaju [61].

Zabilježeno je da *A. castellanii* jednako dugo preživljava kada je sama te kada se nalazi u kokulturi s *F. philomiragia* u izvorskoj vodi „Vela Fontana.“ Odnosno, uočeno je da amebe preživljavaju cjelokupno vrijeme trajanja eksperimenta. Veći broj cističnih oblika *A. castellanii* primijećen je kada se amebe nalaze same u izvorskoj vodi, tj. bez prisutnosti *F. philomiragia*. Amebe prelaze u stadij ciste s dvostrukim stjenkama kada se nalaze u životnoj opasnosti ili u nepovoljnim životnim uvjetima. Također, zbog njihovog brzog rasta i encisticije za izglednivanje amebe su dobri domaćini za preživljavanje bakterija [43].

Postoje više hipoteza o interakcijama između *Francisella* spp. i ameba. U nekim istraživanjima *F. philomiragia*, *F. noatunensis*, *F. novicida* i *F. tularensis* subsp. *tularensis* multipliciraju se unutar ili zajedno s amebama, kao što su *A. castellanii*, *D. discoideum* i *V. vermiformis*. Kontradiktorno tome, druge studije nisu opazile razmnožavanje kliničkih sojeva *F. tularensis* subsp. *tularensis* i *F. novicida* u kokulturi s amebama [62 - 67]. Drugačiji rezultati u pojedinim istraživanjima moguća su posljedica korištenja različitih eksperimentalnih protokola, osobito u pogledu medija za kulturu ameba. Istraživanja u kojim je korišten hranjivi medij (npr. PYG medij) zabilježeno je umnožavanje sojeva *Francisella* spp. u kokulturi s amebama tijekom 12 ili 20 dana. U tim slučajevima može biti teško identificirati bakterijski rast unutar ili u prisutnosti ameba, a porast naraslih kolonija potrebno je pažljivo proučiti [64, 65].

U provedenom istraživanju dokazano je da se *F. philomiragia* ne razmnožava unutar ameba, ali može opstati u okolišu koji sadrži amebe. To se može objasniti endosimbiotskim odnosom između *F. philomiragia* i *A. castellanii*, a takav odnos se javlja u vodenom okružju u kojem su amebe rasprostranjene [68]. Pretpostavlja se da *F. philomiragia* i *F. novicida* imaju primarni vodeni rezervoar te posljedično izazivaju pojedinačne infekcije u ljudi i životinja. Iako različiti sojevi *Francisella* spp. mogu opstati i razmnožavati se u zajedničkom okolišu s amebama, ne treba isključiti mogućnost i drugih potencijalnih mehanizama preživljavanja ovih bakterija, kao što su biofilmovi i ličinke komaraca [69].

Verhoeven i suradnici dokazali su da *F. philomiragia* *in vitro* stvara biofilme pri temperaturi od 25 do 37 °C. *F. philomiragia* je sposobna preživjeti, rasti i stvarati mješoviti biofilm u kokulturi s amebom *A. castellanii*. U mješovitom biofilmu *A. castellanii* se nalazi na njegovoj periferiji. U istraživanju je *F. philomiragia* ATCC 25015 inokulirana u PYG medij koji je uvjetovan *A. castellanii*, odnosno u supernatantu *A. castellanii* iz kojeg su uklonjene amebe. Pokazalo se da je stvaranje biofilma *F. philomiragia* značajno inhibirano u prisutnosti supernatanta *A. castellanii*, iako je rast bakterija snažno pospješen. Razlog ove inhibicije je nepoznat. Rezultati su pokazali da *F. philomiragia* može zaraziti *A. castellanii* nakon samo 5 dana koinkubacije i da brže zarazi *A. castellanii* od srodne vrste *F. novicida* [23].

S obzirom da je *F. philomiragia* široko rasprostranjena u okolišu, osobito u vodenom okruženju, kontaminacija vode ovim mikroorganizmom povezana je s naknadnim infekcijama kod ljudi. Ozbiljan problem mogu predstavljati onečišćene ruralne, bunarske, površinske vode te neadekvatni postupci kloriranja i dezinfekcije u vodoopskrbnim sustavima. Slučajevi zaraze *F. philomiragia* zabilježeni su kod pacijenata s kroničnom granulomatoznom bolešću i s mijeloproliferacijskim poremećajem. *F. philomiragia* izolirana je i kod žrtava utapanja u morskoj vodi [14]. U popravnom domu zbog upotrebe kontaminiranog leda utvrđeno je nekoliko slučajeva bakterijemije. Zbog toga je potrebno pravovremeno identificirati *Francisella* spp. kako bi se izbjegla pogrešna identifikacija i smrt pacijenata [70 - 72].

Različite studije su pokazale da *F. philomiragia* uzrokuje tularemiju pojedinih vrsta riba, uključujući atlantski i norveški bakalar, atlantski losos, prugasti bas (lat. *Morone saxatilis*) i tilapiju (lat. *Oreochromis* spp.) [73, 74]. U oba područja zabilježen je značajan utjecaj na uzgoj ribe i ribarstvo. Tilapija je bila prva zaražena riba. Na Tajvanu su utvrđeni slučajevi tularemije prilikom uzgoja tilapije koji su rezultirali pomorom velikog broja riba. Bakterije koje su izolirane iz granuloma posjeduju 16s rRNA gene koji su srodni s *F.*

*tularensis* subsp. *philomiragia*, *F. tularensis* subsp. *tularensis* te *F. tularensis* subsp. *novicida* [10, 75, 76]. U Japanu 2005. godine je riba *Paraprisipoma trilineatum* zaražena *F. tularensis*, a otkrilo se da uzrokuje granulom kod prethodno zdravih riba. Također je dokazano da ptice zaražene *F. tularensis* mogu lako širiti bolest iz jednog područja u drugo [23].

Iz vodenog okruženja izolirane su i slobodno živeće amebe, kao što je *Acanthamoeba* spp. One su prisutne u morskim i slatkim vodama, uzorcima klorirane vode iz bazena, vodovodnoj vodi, kanalizaciji, bazenima, unutar uređaja za pročišćavanje vode i čak u antarktičkim vodama [77 - 79]. Neke publikacije navode da prisutnost ličinki komaraca ima značajan utjecaj na populacije praživotinja (amebe, trepetljikaši, kolnjaci). S obzirom da ličinke komaraca i amebe preživljavaju i nastanjuju vodeni okoliš moguće su interakcije između ameba i *Francisella* spp. posredovane komarcima u tim ekološkim nišama [80, 81]. Interakcija između *Francisella* spp. i *Acanthamoeba* spp. ukazuje da su amebe važni okolišni rezervoar za vrstu *Francisella*, ali one također potiču rast i preživljavanje drugih ljudskih patogena na bazi vode, poput *Mycobacterium* spp. i *Legionella pneumophila* [77, 82].

S obzirom da *F. philomiragia* ostavlja ozbiljne ekonomske posljedice na ribarstvo taksonomija sojeva *F. philomiragia* koji zarazuju ribe se kontinuirano proučava. Zbog toga je za prevenciju ovog patogena bitno razumjeti na koji način ova bakterija preživljava u vodenim sustavima, kakva je interakcija sa slobodno živećom amebom *Acanthamoeba* i kako formira biofilmove. Također, ova saznanja mogu pridonijeti boljem shvaćanju epidemiologije i mikrobiološke ekologije cijelog roda *Francisella*.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja o utjecaju ameba na preživljavanje bakterije *F. philomiragia* mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- *F. philomiragia* dulje preživljava u kokulturi s amebom *A. castellanii* u izvorskoj vodi „Vela Fontana.“
- Interakcija između *F. philomiragia* i *A. castellanii* ukazuju da su amebe važni okolišni rezervoar za preživljavanje bakterija, ali one mogu biti prenositelji tularemije i drugih infektivnih bolesti putem izvorskih i površinskih voda.
- *A. castellanii* se smatra dobrim modelom za proučavanje razmnožavanja bakterija zbog njenog brzog rasta (8 sati na temperaturi od 30 °C).
- *F. philomiragia* se ne razmnožava unutar ameba, ali može opstati u okolišu koji sadrži amebe zbog mogućeg endosimbiotskog odnosa.
- *F. philomiragia* ima malu virulenciju za ljude, ali može izazvati povremene infekcije kod pacijenata s ugroženom funkcijom neutrofila.
- Zaraza riba *F. philomiragia* može ostaviti ozbiljne ekonomske posljedice na ribarstvo.
- Za njenu prevenciju je bitno razumjeti kako preživljava, raste i razmnožava se u vodenim ekosustavima, a ova saznanja mogu pridonijeti boljem shvaćanju epidemiologije i mikrobiološke ekologije cijelog roda *Francisella*.

## 7. LITERATURA

1. Mannikkö N.: Etymologia: *Francisella tularensis*., Emerg Infect Dis. 2011, 17 (5), str. 799.
2. Hennebique A., Boisset S., Maurin M.: Tularemia as a waterborne disease: a review. Emerging Microbes & Infections 2019, 8 (1), str. 1027. –1042.
3. Larson CL, Wicht W, Jellison WL.: Public Health Rep 1955., 70 (3), str. 253.- 8.
4. Whipp, M. J., Davis, J.M. i suradnici: Characterization of a novicida like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. J of Med Microbiol 2003, 52, str. 839. -842.
5. Sjödin A.: Genome characterisation of the genus *Francisella* reveals insight into similar evolutionary paths in pathogens of mammals and fish. BMC Genomics 2012, 3 (1).
6. Sjostedt A.: Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. Ann N Y Acad Sci 2007, 1105, str. 1. - 29.
7. Feldman K.A.: Tularemia on Martha's Vineyard: seroprevalence and occupational risk. Emerg Infect Dis 2003, 9(3), str. 350. - 4.
8. Janse I., R. Q. J. van der Plaats, A. M. de Roda Husman, M. W. J. van Passel: Environmental surveillance of zoonotic *Francisella tularensis* in the Netherlands. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 2018, 8, str. 140.
9. Hubalek Z.: Frequent isolation of *Francisella tularensis* from *Dermacentor reticulatus* ticks in an enzootic focus of tularaemia. Med Vet Entomol 1996. 10(3), str. 241. - 6.
10. Semić, Brezovec M. i suradnici: Ekologija, domaćini i vektori bakterije *Francisella tularensis*. Medicina 2009, 45 (2), str.154. - 159.
11. Luque-Larena J. J., Mougeot F., Arroyo B.: Irruptive mammal host populations shape tularemia epidemiology. PLoS Pathogens 2017, 13 (11), article e1006622.
12. Berrada Z. L., Telford S. R.: Survival of *Francisella tularensis* type A in brackish-water. Archives of Microbiology 2011, 193 (3), str.. 223. –226.
13. Telford S. R., Goethert H. K.: Ecology of *Francisella tularensis*. Annual Review of Entomology 2020, 65 (1), str. 351. – 372.

14. Ellis, J. i suradnici: Tularemia. Clin Microbiol Rev 2002. 15(4), str. 631. - 46.
15. Burke D.S.: Immunization against tularemia: analysis of the effectiveness of live *Francisella tularensis* vaccine in prevention of laboratory-acquired tularemia. J Infect Dis 1977, 135(1), str. 55. -60.
16. Behr M. Laboratory-acquired lymphadenopathy in a veterinary pathologist. Lab Anim (NY) 2000, 29, str. 23. –25.
17. Teutsch S. M., Martone W. J., Brink E. W. i suradnici: Pneumonic tularemia on Martha's Vineyard. N Engl J Med 1979, 301, str. 826. –828.
18. Johnson H. N.: Natural occurrence of tularemia in dogs used as a source of canine distemper virus. J Lab Clin Med 1944, 29 str. 906. –915.
19. Woods J. P. , Panciera R. J. , Morton R. J. I suradnici: Feline tularemia. Compend Contin Educ Pract Vet, 1998, 20, str. 442. –457.
20. Waggle K, Day-Lollini P, Murphy-Hackley Pi suradnici: Diagnostic exercise: illness, cutaneous hemorrhage, and death in two squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). Lab Anim Sci 1997, 47, str. 647. –649.
21. Johansson, A., Berglund, L., Sjostedt, A. & Tarnvik, A.: Ciprofloxacin for treatment of tularemia. Clin Infect Dis 2001, 33, str. 267. –268.
22. Hollis DG, Steigerwalt AG, Wenger JD, Moss CW, Brenner DJ.: *Francisella philomiragia* comb. Nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup novicida (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. J Clin Microbiol 1989, 27, str. 1601–8.
23. Verhoeven B. A., Durham-Colleran M. W. i suradnici: *Francisella philomiragia* Biofilm Formation and Interaction With the Aquatic Protist *Acanthamoeba castellanii*. Biol. Bull 2010, 219, str. 178. –188.
24. Wenger JD, Hollis DG, Weaver RE i suradnici: Infection caused by *Francisella philomiragia* (formerly *Yersinia philomiragia*). A newly recognized human pathogen. Ann Intern Med 1989, 110, str. 888. – 92.



25. Sicherer SH, Asturias EJ, Winkelstein JA, Dick JD, Willoughby RE: *Francisella philomiragia* sepsis in chronic granulomatous disease. *Pediatr Infect Dis J* 1997, 16, str. 420.-2.
26. Mailman TL, Schmidt MH.: *Francisella philomiragia* adenitis and pulmonary nodules in a child with chronic granulomatous disease. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2005, 16, str. 245. –8.
27. Mikalsen J, Olsen AB, Tengs T, Colquhoun DJ.: *Francisella philomiragia* subsp. *Noatunensis* subsp. nov., isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Int J Syst Evol Microbiol* 2007, 57, str. 1960–5
28. Robles-Marhuenda A., Vaca M i suradnici: *Francisella philomiragia*: Think of Chronic Granulomatous Disease. *Journal of Clinical Immunology*, 2018.
29. Thakran, S., Li, H., Lavine, C. L., Miller, M. A., Bina, J. E., Bina, X. R. & Re, F.: Identification of *Francisella tularensis* lipoproteins that stimulate the Toll-like receptor (TLR) 2/TLR1 heterodimer. *J Biol Chem* 2007, 283, str. 3751. –3760.
30. Barel M, Hovanessian AG, Meibom K, Briand JP, Dupuis M, Charbit A.: A novel receptor - ligand pathway for entry of *Francisella tularensis* in monocyte-like THP-1 cells: interaction between surface nucleolin and bacterial elongation factor Tu. *BMC microbiology* 2008, 8, str. 145.
31. Tamilselvam B, Daefler S.: *Francisella* targets cholesterol-rich host cell membrane domains for entry into macrophages. *J Immunol* 2008, 180 (12), str. 8262-71.
32. Chong, A., Celli, J.: The *Francisella* intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. *Frontiers in Microbiol* 2010, 1, str. 138.
33. Šantić, M., Molmeret, M., Abu Kwaik, J.: Modulation of biogenesis of the *Francisella tularensis* subsp. *novicida*-containing phagosome in quiescent human macrophages and its maturation into a phagolysosome upon activation by IFN-gamma. *Cell Microbiol* 2005, 7 (7), str. 957 -967.
34. Baron, G. S., Francis, E. N.: MglA and MglB are required for the intramacrophage growth of *Francisella novicida*. *Mol Microbiol* 1998, 29(1), str. 247. -259.

35. Lauriano, C. M., Barker, J. R., Francis, E. N., Arulanandam, B. P., Hassett, D. J., Klose, K. E.: MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. PNAS 2004, 111 (12), str. 4246. -4249.
36. Ojeda, S. S., Mares, C. A., Alvarez, J. I., Qun Li, Orihuela, C. J., Teale, J. M.: Virulence factors involved in passage of *Francisella tularensis* subsp. *novicida* through an air blood barrier model. Bioterr Biodef 2011, S3.
37. Maggio, S., Takeda, K., Stark, F., Meierovics, A. I., Yabe, I., Cowley, S. C.: Control of *Francisella tularensis* intracellular growth by pulmonary epithelial cells. PLOS ONE 2015.
38. Cooper G.M, Hausman R.E.: Stanica, molekularni pristup, 5. izdanje
39. Ožanić M., Marečić V., Gobin I., Šantić M.: Intracellular life of *Francisella* and *Legionella* within amoebae cells. Med. Flum. 2016, 52 (1), str.. 49. –54.
40. Lloyd D.: Encystment in *Acanthamoeba castellanii*. Exp. Parasitol. 2014, 145 (S), str. S20–S27.
41. Saphiro L.: *Acanthamoeba castellanii*. Encyclopedia of Life. Dostupno na: <http://eol.org/pages/491172/overview> (zadnji put pristupljeno: 10.05.2021.)
42. Abd H., Johansson T., Golovliov I., Sandstro G.: Survival and Growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. Society 2003, 69 (1), str. 600. –606.
43. Siddiqui R., Khan N. A.: Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. Parasites and Vectors 2012, 5 (1), str. 6.
44. Acanthamoeba: Pathogen & Environmen. Centers for Disease Control and Prevation. Dostupno na: <https://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/pathogen.html> (zadnje pristupljeno: 01.04.2021.)
45. Swart A. L., Harrison C. F., Eichinger L., Steinert M., Hilbi H.: *Acanthamoeba* and *Dictyostelium* as Cellular Models for Legionella Infection. Front. Cell. Infect. Microbiol 2018, 8, str. 1. –17.
46. Strassmann, J.E., Shu L.: Ancient bacteria-amoeba relationships and pathogenic animal bacteria. PLoS Biol 2017, 15(5): p. e2002460.
47. Levine B., Mizushima N., Virgin H. W.: Autophagy in immunity and inflammation. Nature, 2011, 469(7330), str. 323. -35.

48. Postojeće stanje vodoopskrbnog sustava. Dostupno na: <http://www.ponikve.hr/postojece-stanje-vodoopskrbnog-sustava> (zadnje pristupljeno: 05.04.2021.)
49. Thelaus J., Andersson A., Mathisen P., Forslund A. L., Noppa L., Forsman M.: Influence of nutrient status and grazing pressure on the fate of *Francisella tularensis* in lake water. FEMS Microbiology Ecology 2009, 67 (1), str. 69. –80.
50. Barisch C., Kalinina V., Lefrancois L. H., Appiah J., Lopez-Jimenez A. T., Soldati T.: Localization of all four ZnT zinc transporters in Dictyostelium and impact of ZntA and ZntB knockout on bacteria killing. Journal of Cell Science 2018, 131 (23), str. 222000.
51. Lopez C. A., Skaar E. P.: The impact of dietary transition metals on host-bacterial interactions. Cell Host & Microbe, 23 (6), str. 737. –748.
52. Moreau G. B., Qin A., Mann B. J.: Zinc Acquisition mechanisms differ between environmental and virulent *Francisella* species. Journal of Bacteriology 2018, 200 (4).
53. Weiss G., Carver P. L.: Role of divalent metals in infectious disease susceptibility and outcome. Clinical Microbiology and Infection 2018, 24 (1), str. 16. –23.
54. Gonzalez M. R., Ducret V., Leoni S., Perron K.: *Pseudomonas aeruginosa* zinc homeostasis: key issues for an opportunistic pathogen. BBA Gene Regulatory Mechanisms 2019, 1862 (7), str. 722. –733.
55. Andrews S. C., Robinson A. K., Rodriguez-Quinones F.: Bacterial iron homeostasis. FEMS Microbiology Reviews 2003, 27 (2-3), str. 215. –237.
56. Kolaj-Robin O., Russell D., Hayes K. A., Pembroke J. T., Soulimane T.: Cation diffusion facilitator family: structure and function. FEBS Letters 2015, 589 (12), str. 1283. –1295.
57. Ratledge C., Dover L. G.: Iron metabolism in pathogenic bacteria. Annual Review of Microbiology 2000, 54 (1), str. 881. –941.
58. Aryal S: Chocolate Agar. Microbenotes. Dostupno na: <https://microbenotes.com/chocolate-agar/> (zadnje pristupljeno: 05.04.2021.)
59. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Approved Standard M31-A2. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 2nd ed. NCCLS, Wayne, PA.

60. Mueller J.H., Hinton J.: A protein-free medium for primary isolation of the gonococcus and meningococcus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 1941, 48, str. 330.-333.
61. Knežević M., Marečić V., Ožanić M., Špoljarić N., Kelava I., Curlin M., Kwaik Y. A., Mihelčić M., Šantić M.: Increased Sensitivity of Amoeba-Grown *Francisella* Species to Disinfectants. *Microorganisms* 2020, 8, 1260.
62. Lineback, C.B., Nkemngong, C.A., Wu, S.T., Li, X., Teska, P.J., Oliver, H.F.: Hydrogen peroxide and sodium hypochlorite disinfectants are more effective against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms than quaternary ammonium compounds. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 2018, 7, str. 154.
63. Sandström, G., Saeed, A., Abd, H. Acanthamoeba-Bacteria: A model to study host interaction with human pathogens. *Curr. Drug Targets* 2011, 12, str. 936. –941.
64. Yousuf, F.A., Siddiqui, R., Khan, N.A.: *Acanthamoeba castellanii* of the T4 genotype is a potential environmental host for *Enterobacter aerogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Parasites Vectors* 2013, 6, str. 169.
65. Thomas, V., Loret, J.F., Jousset, M., Greub, G.: Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ. Microbiol* 2008, 10, str. 2728. –2745.
66. Maisonneuve, E., Cateau, E., Delouche, M., Quellard, N., Rodier, M.H.: An observational study of phagocytes and *Klebsiella pneumoniae* relationships: Different behaviors. *Microbes Infect.* 2017, 19, str. 259. –266.
67. Cirillo, J.D., Cirillo, S.L., Yan, L.; Bermudez, L.E., Falkow, S., Tompkins, L.S.: Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 1999, 67, str. 4427. –4434.
68. Durham-Colleran, M.W., Verhoeven, A.B., van Hoek, M.L.: *Francisella novicida* forms in vitro biofilms mediated by an orphan response regulator. *Microb. Ecol.* 2010, 59, str. 457. –465.
69. Mares, C.A., Ojeda, S.S., Morris, E.G., Li, Q., Teale, J.M.: Initial delay in the immune response to *Francisella tularensis* is followed by hypercytokinemia characteristic of severe sepsis and correlating with upregulation and release of damage-associated molecular patterns. *Infect. Immun.* 2008, 76, str. 3001. –3010.

70. Brett, M., Doppalapudi, A., Respicio-Kingry, L. B., Myers, D., Husband, B., Pollard, K., Mead, P., Petersen, J. M., Whitener, C. J.: *Francisella novicida* bacteremia after a neardrowning accident. J Clin Microbiol 2012, 50, str. 2826. –2829.
71. Brett, M. E., Respicio-Kingry, L. B., Yendell, S., Ratard, R., Hand, J., Balsamo, G., Scott-Waldron, C., O’Neal, C., Kidwell, D., Yockey, B., Singh, P., Carpenter, J., Hill, V., Petersen, J. M., Mead, P.: Outbreak of *Francisella novicida* bacteremia among inmates at a Louisiana correctional facility. Clin Infect Dis 2014, 59, str. 826. –833.
72. Ughetto, E., Héry-Arnaud, G., Cariou, M. E., Pelloux, I., Maurin, M., Caillon, J., Moreau, P., Ygout, J. F., Corvec, S.: An original case of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* bacteremia after a near-drowning accident. Infect Dis (Lond) 2015, 47, str. 588. –590.
73. Nylund A., Ottem K. F., Watanabe K., Karlsbakk E., Krossoy B.: *Francisella* sp. (Family Francisellaceae) causing mortality in Norwegian cod (*Gadus morhua*) farming. Arch. Microbiol 2006, 185, str. 383. – 392.
74. Olsen A. B., Mikalsen J., Rode M., Alfjorden A., Hoel E., Straum-Lie K., Haldorsen R., Colquhoun D. J.: A novel systemic granulomatous inflammatory disease in farmed Atlantic cod, *Gadus morhua* L., associated with a bacterium belonging to the genus *Francisella*. J. Fish. Dis 2006, 29, str. 307. –311.
75. Zhang F, Liu W, Chu MC, He J, Duan Q, Wu XM i suradnici: *Francisella tularensis* in Rodents. Emerg Infect Dis 2005, 12, 994-6.
76. Ringertz O, Dahlstrand S.: Culture of *F. tularensis* in the 1966-67 outbreaks of tularemia in Sweden, laboratory methods and precautions against laboratory infections. Acta Pathol Microbiol Scand 1968, 72, str. 464.
77. Declerck, P., Behets, J., van Hoef, V., Ollevier, F.: Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. Water Res 2007, 41, str. 3159. –3167.
78. Hsu, B. M., Lin, C. L., Shih, F. C.: Survey of pathogenic free-living amoebae and *Legionella* spp. in mud spring recreation area. Water Res 2009, 43, str. 2817. –2828.
79. Kuiper, M. W., Valster, R. M., Wullings, B. A., Boonstra, H., Smidt, H., van der Kooij, D.: Quantitative detection of the free-living amoeba *Hartmannella vermiformis* in surface water by using real-time PCR. Appl Environ Microbiol 2006, 72, str. 5750. –5756.

80. Östman, Ö., Lundström, J., Persson Vinnersten, T.: Effects of mosquito larvae removal with *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) on natural protozoan communities. *Hydrobiologia* 2008, 607, str. 231. –235.
81. Addicott, J. F.: Predation and prey community structure: An experimental study of the effect of mosquito larvae on the protozoan communities of pitcher plants. *Ecology* 1974, 55, str. 475. –492.
82. Delafont, V., Mougari, F., Cambau, E., Joyeux, M., Bouchon, D., Héchard, Y., Moulin, L.: First evidence of amoebae-mycobacteria association in drinking water network. *Environ Sci Technol* 2014, 48, str. 11872. –11882.
83. Ožanić M., Marečić V., Knežević M. i suradnici: The important role of metal ions for survival of *Francisella* in water within amoeba environment. *BioMed Research International* 2021.

## ŽIVOTOPIŠ

Zovem se Sara Marohnić. Rođena sam 14. svibnja 1997. godine u Rijeci, a živim u mjestu Hreljin. Pohađala sam „Osnovnu školu Hreljin“, od 2004. do 2012. godine. Nakon završene osnovne škole, upisala sam prirodoslovno matematičku gimnaziju Andrije Mohorovičića u Rijeci. Maturirala sam 2016. godine te time dobila pravo upisa na Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu u Rijeci. Završni rad, „Utjecaj fizikalno-kemijskih karakteristika tla na sorpcijsko ponašanje dimetoata“ obranila sam 2019. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci pod vodstvom mentora izv.prof.dr.sc. Dalibora Broznića. Time sam stekla akademski naziv Sveučilišna prvostupnica sanitarnog inženjerstva. Iste godine upisala sam Diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu u Rijeci.