

# Ispitivanje interakcije različitih antibiotika na adheziju uropatogenih izolata enterokoka

---

Ribić, Marta

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:184:603431>

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](#)



uniri DIGITALNA  
KNJIŽNICA



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Marta Ribić

ISPITIVANJE INTERAKCIJE RAZLIČITIH ANTIBIOTIKA NA ADHEZIJU  
UROPATHOGENIH IZOLATA ENTEROKOKA

Završni rad

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Marta Ribić

ISPITIVANJE INTERAKCIJE RAZLIČITIH ANTIBIOTIKA NA ADHEZIJU  
UROPATHOGENIH IZOLATA ENTEROKOKA

Završni rad

Rijeka, 2022.

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

Završni rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

- 1.
- 2.
- 3.

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

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se svojoj dragoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Gobin, dipl. sanit. ing. na stručnim savjetima te strpljenu i predanoj pomoći prilikom izrade završnog rada.

Također, zahvaljujem se i svojoj obitelji, kolegama i kolegicama koji su vjerovali u mene i moj uspjeh te na pruženim savjetima, strpljenju i razumijevanju tijekom izrade završnog rada.

## SAŽETAK

Rod *Enterococcus* je izolirani patogen i često je uzročnik infekcija kod ljudi. Dio su normalne mikrobiote probavnog sustava te kod ljudi su najčešće izolirane vrste *E. faecalis* i *E. faecium*. Najčešće su uzročnici bolničkih infekcija, a osobito u jedinicama intenzivne skrbi. Uzrokuju infekcije urinarnog trakta, kirurške infekcije na mjestu zahvata te u nekim slučajevima može uzrokovati bakterijemiju i meningitis. Cilj ovog rada bio je ispitati interakciju različitih antibiotika na adheziju uropatogenih izolata enterokoka.

U svrhu ovog istraživanja koristili su se uropatogeni sojevi *E. faecalis*. Pomoću metode šahovnice ispitala se potencijalna sinergija dva antibiotika nitroksolin i gentamicin. Također, provedeno je inhibicijsko djelovanje dva antibiotika na adheziju.

Ispitivani antibiotici, nitroksolin i gentamicin u kombinaciji pokazuju sinergistički, aditivni, indiferentni učinak. Dobiveni rezultati su pokazali da je dobiven puno veći efekt kombinacijom dvaju antibiotika manjih koncentracija. Istovremeno kombinacija antibiotika pokazuje i antiadhezijski učinak u nižoj koncentraciji od pojedinačnih antibiotika. Zaključno, kombinacija nitroksolina i gentamicina pokazuje veliki potencijal za primjenu u terapiji kroz antimikrobni i antiadhezijski učinak.

Ključne riječi: *Enterococcus*, sinergija, biofilms, antibiotik

## SUMMARY

The genus *Enterococcus* is an isolated pathogen and is often the cause of human infections. They are part of the normal microbiota of the digestive system, and the most frequently isolated species in humans are *E. faecalis* and *E. faecium*. They are the most common cause of hospital infections, especially in intensive care units. They cause urinary tract infections, surgical infections at the procedure site, and in some cases can cause bacteremia and meningitis. The aim of this work was to examine the interaction of different antibiotics on the adhesion of uropathogenic isolates of enterococci.

For the purpose of this research, uropathogenic strains of *E. faecalis* were used. Using the checkerboard method, the potential synergy of the two antibiotics nitroxoline and gentamicin was tested. Also, the inhibitory action of two antibiotics on adhesion was performed.

The tested antibiotics, nitroxolin and gentamicin in combination show a synergistic, additive, indifferent effect. The obtained results showed that a much greater effect was obtained by combining two antibiotics of lower concentrations. At the same time, the combination of antibiotics also shows an anti-adhesion effect in a lower concentration than individual antibiotics. In conclusion, the combination of nitroxoline and gentamicin shows great potential for use in therapy through antimicrobial and antiadhesion effects.

Key words: *Enterococcus*, synergy, biofilms, antibiotic

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Građa i fiziologija.....	2
1.2. Patogeneza i imunost.....	2
1.3. Kliničke manifestacije.....	3
1.4. Laboratorijska dijagnostika .....	3
1.5. Osjetljivost na antimikrobne lijekove .....	4
1.5.1. Rezistencija na aminoglikozide .....	5
1.5.2. Rezistencija na vankomicin .....	6
1.5.3. Nitroksolin .....	6
1.5.4. Gentamicin.....	6
1.6. Liječenje .....	7
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	8
3. MATERIJALI I POSTUPCI.....	9
3.1. Materijali .....	9
3.1.1. Korišteni laboratorijski pribor i uređaji .....	9
3.1.2. Kemikalije i hranjive podloge .....	9
3.1.3. Bakterijski sojevi .....	10
3.2. Metode.....	11
3.2.1. Priprema bakterijske suspenzije i štok otopine.....	11
3.2.2. Metoda za ispitivanje sinergije antibiotika.....	11
3.2.3. Metoda šahovnice .....	12
4. REZULTATI.....	14
4.2. Određivanje interakcije između antibiotika nitroksolin i gentamicin metodom šahovnice.....	14
4.3. Kombinacija nitroksolin i gentamicin na inhibiciju stvaranja biofilomva.....	24
5. RASPRAVA .....	30
6. ZAKLJUČAK.....	32
7. LITERATURA .....	33
8. ŽIVOTOPIS.....	35





## 1. UVOD

Rod *Enterococcus* je čest izolat u kliničkim mikrobiološkim laboratorijima . Dio su normalne mikrobiote probavnog sustava (1). Sve do danas otkriveno je 37 vrste enterokoka (9). Također, enterokoki su izdvojeni iz skupine streptokoka jer su otporniji na vanjske uvjete i većina ih sadrži antigen D (2). Velika je zastupljenost infekcija u bolnicama, ali i u izvanbolničkoj sredini te često razvijaju rezistenciju na većinu postojećih antibiotika (9). Jedno od važnih obilježja enterokoka je njihova rezistencija na nekoliko antibiotika. Može se podijeliti na stečenu i intrinzičnu (prirodnu) rezistenciju. Stečena rezistencija kod enterokoka može se pojaviti kao posljedica mutacije .

Također, enterokoki su intrinzično (prirodno) rezistentni na brojne antibiotike (cefalosporine, monobaktame i penicilinaze). Prirodna rezistencija je tipična za sve enterokoke. Kod pojave blagih infekcija ampicilin je lijek izbora, ali u slučaju pojave težih infekcija primjenjuje se kombinirana terapija s antibioticima. Važno je ispitati nove kombinacije antibiotika. A cilj rada bio je ispitati interakciju dvaju antibiotika nitroksolin i gentamicin antimikrobno i antiadhezijski na uropatogene izolate enterokoka (1,2,9).

## 1.1. Građa i fiziologija

Enterokoki su gram pozitivni koki koji su jako slični streptokokima te se pojavljuju u vidu kratkih lanaca ili u parovima. Mikroskopski se ne razlikuju od većinu streptokoka. Optimalna temperatura za njihov rast je 35°C, ali većina sojeva enterokoka može rasti na temperaturama u rasponu od 10°C – 45°C. Enterokoki su katalaza-negativni, fakultativno anaerobni. Za njihov rast je potreban vitamin B, ugljik kao izvor energije i baze nukleinskih kiselina. Rastu u obliku sitnih bijelih kolonija koje mogu biti bez hemolize, sa alfa ili beta hemolizom. Krvni agar koji je obogaćen sa ovčjom krvlju, uvelike omogućuje rast bakterijama. Otporni su na vanjske uvjete te povećanu koncentraciju žučnih soli (2). Mogu izdržati različite nepovoljne uvjete i preživjeti nekoliko mjeseci u okolišu (4).

## 1.2. Patogeneza i imunost

Enterokoki ne proizvode toksine te imaju velik potencijal da prouzrokuju infekcije, kao što su infekcije mokraćnog sustava, infekcije na mjestu kirurškog zahvata te bakterijemiju. Također, ponekad mogu uzrokovati pneumoniju i meningitis (2,3). Najčešće se ozbiljne infekcije događaju kod hospitaliziranih bolesnika (3). Zbog preživljavanja u bolničkoj sredini imaju veliku rezistenciju na brojne antibiotike kao na primjer oksacilin, cefalosporini te rezistencija na aminoglikozide i vankomicin (VRE) (2). Gotovo sve bolničke infekcije su uzrokovane *E. faecalis* ili *E. faecium*. *E. faecalis* je najpatogenija vrsta dok *E. faecium* je često otporna na antimikrobne lijekove (4, 5). Patogeneza infekcija uzrokovana enterokokom nije upotpunosti razriješena, te stoga postoje potencijalni čimbenici virulencije. Najvažniji čimbenici virulencije su sposobnost adherencije, produkcija toksina i enzima, prisutnost kapsule, pokretnost te invazivnost. Također, one bakterije koje adheriraju na površinu pomoću sluzi dovode do stvaranja biofilma što izrazito ima ulogu u patogenezi brojnih infekcija. Bakterije moraju posjedovati različite čimbenike virulencije kako bi izazvale bolest kod imunokompetentnih bolesnika. Najčešće ljudi obolijevaju od infektivnih bolesti onda kada mikroorganizmi nadjačaju organizam te izazovu simptome poput upale i vrućice. Ponekad ljudi mogu biti inficirani, a da ne razviju nikakve simptome, pa se onda radi asimptomatskoj infekciji. Asimptomatska infekcija se može ustanoviti na temelju protutijela u serumu inficirane osobe (18).

### 1.3. Kliničke manifestacije

Budući da enterokoki nemaju virulentne faktore, najčešće uzrokuju nozokomijalne infekcije. Uvelike uzrokuju infekcije urinarnog trakta (2), a kateterizacija je glavni čimbenik rizika za nastanak same infekcije (5). Oportunistički su patogeni i uzrokuju infekcije kod bolesnika koji se nalaze u jedinicama intenzivne njege, imunokompromitiranih i kod bolesnika s nekakvom kroničnom bolesti. Bakterije se prenose s bolesnika na bolesnika i to najviše rukama medicinskog osoblja, a ponekad se mogu prenijeti i medicinskim pomagalima (9). Veliki rizik prisutan je kod bolesnika koji su podvrgnuti abdominalnim operacijama ili kod onih koji koriste peritonejsku dijalizu. Najveći dio infekcija uzrokuju enterokoki koji su dio endogene flore. Vaskularni i peritonejski kateteri su najčešće mjesto ulaska enterokoka u organizam. Ukoliko enterokoki uđu u krvotok to može rezultirati endokarditisom. Kod bolesnika se mogu javiti respiratorne infekcije, sinusitis, otitis, infekcije središnjeg živčanog sustava itd. (1).

### 1.4. Laboratorijska dijagnostika

Bakterije iz roda *Enterococcus* rastu na neselektivnim medijima. Također, mogu rasti u prisutnosti visokih koncentracija žući i Na-klorida. Glavna karakteristika im je da hidroliziraju eskulin uz prisutnosti žučnih soli (žuč-eskulin pozitivni). Rastu na krvnom i čokoladnom agaru. Na BEA (engl. Bile Esculin Agar) hranjivoj podlozi enterokoki hidroliziraju eskulin do dekstroze i eskuletina koji regira sa solima željeza u podlozi i stvara tamnosmeđu obojenu halo zonu oko samih kolonija (6). Mikroskopski se ne mogu razlikovati od *S. pneumoniae* te se diferencijacija vrši na osnovu biokemijskih reakcija (2). Biokemijski testovi koji se provode za diferencijaciju i identifikaciju *E. faecalis* su: test katalaze, hemoliza, test pokretljivosti, eskulin i žučno-eskulinski test, test topivosti žući i test tolerancije soli (3,6). Također, se provodi PYR test kao brzi pet minutni spot test (PYR pozitivni) (3). Na krvnom agaru vidljive su glatke, sive, nehemolitički prozirne kolonije, a ponekad se može vidjeti alfa ili beta-hemoliza (3). Izrazito su otporni na niz vanjskih faktora te preživljavaju u mediju pri vrlo visokim koncentracijama soli i pH. Također, mogu preživjeti jako visoke temperature (60°C - 30 minuta) (3).



Slika 1. Porast enterokoka na Brilliance UTI Agar

### **1.5. Osjetljivost na antimikrobne lijekove**

Enterokoki, prirodno su rezistentni na peniciline i cefalosporine (3). Također, imaju vrlo niski stupanj otpornosti na neke aminoglikozide i vankomicine (4). Zbog svoje intrinzičnosti i povećane rezistencije na antibiotike, enterokoki su uglavnom odgovorni za bolničke infekcije. Rezistencija se prevladava ukoliko se koristi kombinirana terapija penicilinom i aminoglikozidom kao na primjer gentamicin jer se postiže sinergični učinak. Ukoliko se koristi sam aminoglikozid dolazi do neučinkovitog liječenja jer ne može prodrijeti staničnu stijenku. Kombinacijom penicilina ili vankomicina sa aminoglikozidom dolazi do učinka jer penicilin/vankomicin oslabljuje staničnu stijenku. Na primjer ampicilin i penicilin inhibiraju sintezu bakterijske stanične stijenke te se koriste za sve enterokokne infekcije (8).

### 1.5.1. Rezistencija na aminoglikozide

Aminoglikozidi su antibiotici koji izrazito remete samu sintezu bakterijskih proteina djelujući na bakterijske ribosome. Uspješno djelovanje postiže se prodiranjem u bakterijsku stanicu. Izrazito veliki stupanj rezistencije na gentamicin prouzroči bifunkcionalni enzim te svi sojevi koje nose gen za taj enzim rezistentni su na aminoglikozide osim streptomicina. Rezistencija na streptomicin je najčešće posljedica mutacije gena koji dovode do promjena na ciljnom mjestu vezanja aminoglikozida. Kombiniranjem antibiotika koji djeluju na staničnu stijenku same bakterije i aminoglikozida važno je primjenjivati u teškim infekcijama kao što je endokarditis. Pokazuju osjetljivost u slučaju sinergističkog učinka s beta-laktamskim antibioticima. Visoka razina rezistencije na aminoglikozidne lijekove kod enterokoka je posredovana enzimima koji modificiraju aminoglikozide te eliminiraju sinergistički učinak. Sojevi s visokom otpornošću na gentamicin i streptomicin su vrlo česti te će se broj endokarditisa povećavati. Na enterokoke je moguće isključivo djelovati sa samo dvije vrste aminoglikozida, a to su gentamicin i streptomicin. Kako bi oni mogli uspješno djelovati tj. ući u bakterijsku stanicu u onoj koncentraciji koja će djelovati baktericidno, potrebno ih je primjenjivati sa antibioticima koji ometaju sintezu stanične stijenke (beta-laktamski antibiotici) (7, 8).

### **1.5.2. Rezistencija na vankomicin**

Glikopeptidni antibiotici kao što su vankomicin i teikoplanin imaju baktericidno djelovanje na većinu gram-pozitivnih bakterija, za razliku od gram-negativnih bakterija koji posjeduju vanjsku membranu koja sprječava ulazak glikopeptida u stanicu (10). Vankomicin je prvi alternativni lijek penicilinu koji se koristi u liječenju enterokoknih infekcija (1). Također, najčešće se upotrebljavaju u liječenje bolničkih infekcija, ali zbog česte uporabe vankomicina rezultira rezistencijom kod enterokoka. Rezistencija se na vankomicin najčešće pojavljuje kod vrste *E.faecium*, ali opisano je i kod *E.faecalis* (10). Razlog rezistencija na je promjena u perkursorima peptidoglikana i zadebljanoj staničnoj stijenci (1).

Teikoplanin je također glikopeptidni antibiotik koji je vrlo sličan vankomicinu, te je dostupan bolesnicima u Europi, ali ne i SAD-u. Vankomicin rezistentni enterokoki vrlo često sadržavaju plazmide koji im omogućuju rezistenciju na ampicilin i aminoglikozide. Zato se najčešće u tom slučaju koriste antimikrobni lijekovi kao što su daptomicin, tigeciklin, linezolid i kvinupristin-dalfopristin (10).

### **1.5.3. Nitroksolin**

Nitroksolin (5-nitro-8-hidroksikimolin) je najpoznatiji i učinkoviti uroantiseptik koji ne pokazuje toksične nuspojave. Najčešće se koristi u liječenju urinarnih infekcija uzrokovanih bakterijama osjetljivim na taj lijek (11). Izrazito inhibira adheziju *E.faecalis* i također pokazuje antibiofilmsko djelovanje.

### **1.5.4. Gentamicin**

Gentamicin je antibiotik koji se nalazi u skupini aminoglikozida i djeluje na veliki broj bakterijskih infekcija, a najviše na infekcije koje su uzrokovane gram-negativnim bakterijama (2).

## 1.6. Liječenje

Liječenje enterokoknih infekcija nije jednostavno jer većina antibiotika ne djeluje baktericidno. Najčešće se primjenjuje kombinirana terapija, aminoglikozidi s antibioticima koji djeluju na staničnu stjenku kao npr. ampicilin i vankomicin. No, rezistencija na vankomicin, penicilin i ampicilin predstavlja jako veliki problem te je ta rezistencija posredovana plazmidima i može se prenijeti i na druge bakterije. Ukoliko pacijente ima enterokoknu infekciju te bez kliničkih poboljšanja na liječenje ampicilinom i vankomicinom, koriste se zato noviji antibiotici kao npr. linezolid i neki određeni kinoloni. Enterokokne infekcije je vrlo teško prevenirati, ali se rizik kolonizacije bakterijama može smanjiti tako da se izolira pacijenta i upotrebljavaju rukavice u kontaktu s pacijentom (2).



## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog rada bio je ispitati interakciju dvaju antibiotika nitroksolin i gentamicin antimikrobno i antiadhezijski na uropatogene izolate enterokoka.

### **3. MATERIJALI I POSTUPCI**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Korišteni laboratorijski pribor i uređaji**

- Epruvete
- Plastične Petrijeve zdjelice
- Plastična šprica od 10 mL
- Plastične eze
- Plastične kivete (spektrofotometrija)
- Mikrotitarska pločica s jažicama
- MHB agar (Muller Hinton agar)
- Automatske pipete 0,5 – 10  $\mu$ L, 20 – 200  $\mu$ L, 100 – 1000  $\mu$ L
- Nastavci za automatske pipete
- Multikanalna pipeta s nastavcima
- Bunsenov plamenik
- Spektrofotometar
- Ultrazvučna kupelj
- Tresilica
- Inkubator

##### **3.1.2. Kemikalije i hranjive podloge**

- Fiziološka otopina
- Nitroksolin štok otopina 256  $\mu$ g/mL
- Gentamicin štok otopina 512  $\mu$ g/mL
- Resazurin
- Krvni agar
- Muller – Hinton agar

### **3.1.3. Bakterijski sojevi**

Tijekom istraživanja bakterijskog soja uključeno je 3 kliničkih uroizolata *Enterococcus faecalis* te su prikupljeni u Kliničkom zavodu za kliničku mikrobiologiju KBC Rijeka iz uzoraka pacijenata koji su liječeni u KBC-u Rijeka. U istraživanju je korišten i ATCC (engl./hrv. American Type Culture Collection/Američka zbirka staničnih kultura) 29212 soj *E. faecalis*. Prije samog korištenja bakterije su nasađene na krvni agar te su kultivirane na 37°C tijekom 24 sata.

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Priprema bakterijske suspenzije i štok otopine**

Bakterijska suspenzija napravljena je u MHB bujonu (Muller Hinton bujon). Broj bakterije je određen spektrofotometrijski na 600 nm, a apsorbancija određuje količinu bakterija u suspenziji. Nakon toga napravljena su desetorostruka razrijeđenja do  $10^6$  CFU/mL.

Štok otopina nitroksolin koja se primjenjivala za rad je iznosila 256  $\mu$ L, a štok otopina gentamicin je iznosila 512  $\mu$ L.

### **3.2.2. Metoda za ispitivanje sinergije antibiotika**

Jedna od najčešće korištenih metoda za ispitivanje sinergije je Checkerboard metoda ili metoda šahovnice(15). Interakcije između pojedinog antibiotika mogu se iskazati kao sinergističke, aditivne, indiferentne i antagonističke (16).

### 3.2.3. Metoda šahovnice

Metoda šahovnice je *in vitro* tehnika te se koristi u ispitivanju sinergije između pojedinih antimikrobnih tvari (15). Rezultati koji su dobiveni metodom šahovnice tumače se izračunavanjem FIC indeksa (FIC<sub>i</sub>). Prije samog izračunavanja važno je odrediti MIK pojedinačnog antibiotika. Nakon toga se izračunava pojedinačni FIC(A) i FIC(B) te suma pojedinačnog FIC(A) i FIC(B).

Izračun FIC-a:

$$\Sigma\text{FIC} = \text{FIC(A)} + \text{FIC(B)}$$

$$\text{FIC(A)} = \text{MIK(A) u kombinaciji s (B)} / \text{MIK(A)}$$

$$\text{FIC(B)} = \text{MIK(B) u kombinaciji s (A)} / \text{MIK(B)}$$

Rezultati se ukupnog FIC-a interpretiraju na način:

**SINERGIJSKOM** ako je  $\Sigma\text{FIC} \leq 0.5$ ,

**ADITIVAN** ako je  $\Sigma\text{FIC} > 0.5$  i  $< 1.0$ ,

**INDIFERENTAN** ako je  $\Sigma\text{FIC} > 1.0$  i  $< 4.0$ ,

**ANTAGONISTIČKI** ako je  $\Sigma\text{FIC} > 4.0$

## Postupak

U prvu mikrotitarsku pločicu dodali smo 50  $\mu\text{L}$  MHB bujona (Muller Hinton bujon) u sve stupce osim u 12 te smo još u red A dodali 50  $\mu\text{L}$  bujona. Zatim smo u stupac 12 (od A12 – H12) dodali 200  $\mu\text{L}$  nitroksolina (256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) i serijski razrijedili od 12 stupca do 2 stupca (višak 50  $\mu\text{L}$  izbacili). U drugu mikrotitarsku pločicu smo dodali 100  $\mu\text{L}$  Muller Hinton bujona u sve redove osim u H i A. Zatim smo u redu H (H1 - H12) dodali 200  $\mu\text{L}$  gentamicina (512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) i serijski razrijedili 100  $\mu\text{L}$  do reda B (višak 100  $\mu\text{L}$  izbacili). Nakon pripremljenih ploča, te dvije ploče su spojene na način da je 50  $\mu\text{L}$  suspenzije od reda B (B1 – B12) iz ploče 2 prebačeno na isto mjesto u ploču 1 i tako svaka jažica. Na taj način smo na mikrotitarskoj ploči 1 sa ravnim dnom dobili u svakoj pojedinoj jažici različite kombinacije koncentracija dvaju antibiotika. Na kraju je u svaku jažicu osim u A1 dodano 70  $\mu\text{L}$  bakterijske suspenzije koncentracije  $10^6$  CFU/mL i 30  $\mu\text{L}$  Resazurin u sve jažice. Resazurin je plave boje te lagano flurorscira, a ukoliko bakterije porastu, ireverzibilno mijenja boju u ružičastu. Tako spojena ploča inkubirana je na  $37^\circ\text{C}$  tijekom 24 sata. Sljedećeg dana suspenzije iz jažica nakapavane su na hranjivu podlogu (Muller – Hinton agar) po 5  $\mu\text{L}$ , te ponovno stavljene na inkubaciju na  $37^\circ\text{C}$  tijekom 24 sata. Na kraju su zabilježene jažice u kojima nije bilo porasta bakterije.

## **4. REZULTATI**

### **4.2. Određivanje interakcije između antibiotika nitroksolin i gentamicin metodom šahovnice**

Za ispitivanje interakcije između antibiotika nitroksolin i gentamicin koristili smo metodu šahovnice. Tamo gdje nije došlo do porasta bakterije smo izračunali FIC te smo pomoću njega odredili tip interakcije između koncentracija dva antibiotika. Na temelju dobivenog rezultata se određuje interakcija koja može biti sinergistička ( $\leq 0,5$ ), aditivna ( $> 0,5$  i  $< 1,0$ ), indiferentna ( $> 1,0$  i  $< 4,0$ ) i antagonistička ( $> 4,0$ ).

Tablica 1. Tablični prikaz izračunatih FIC koncentracija na temelju dobivenih rezultata i tipa interakcije između antibiotika nitroksolin i gentamicin za soj 45 .

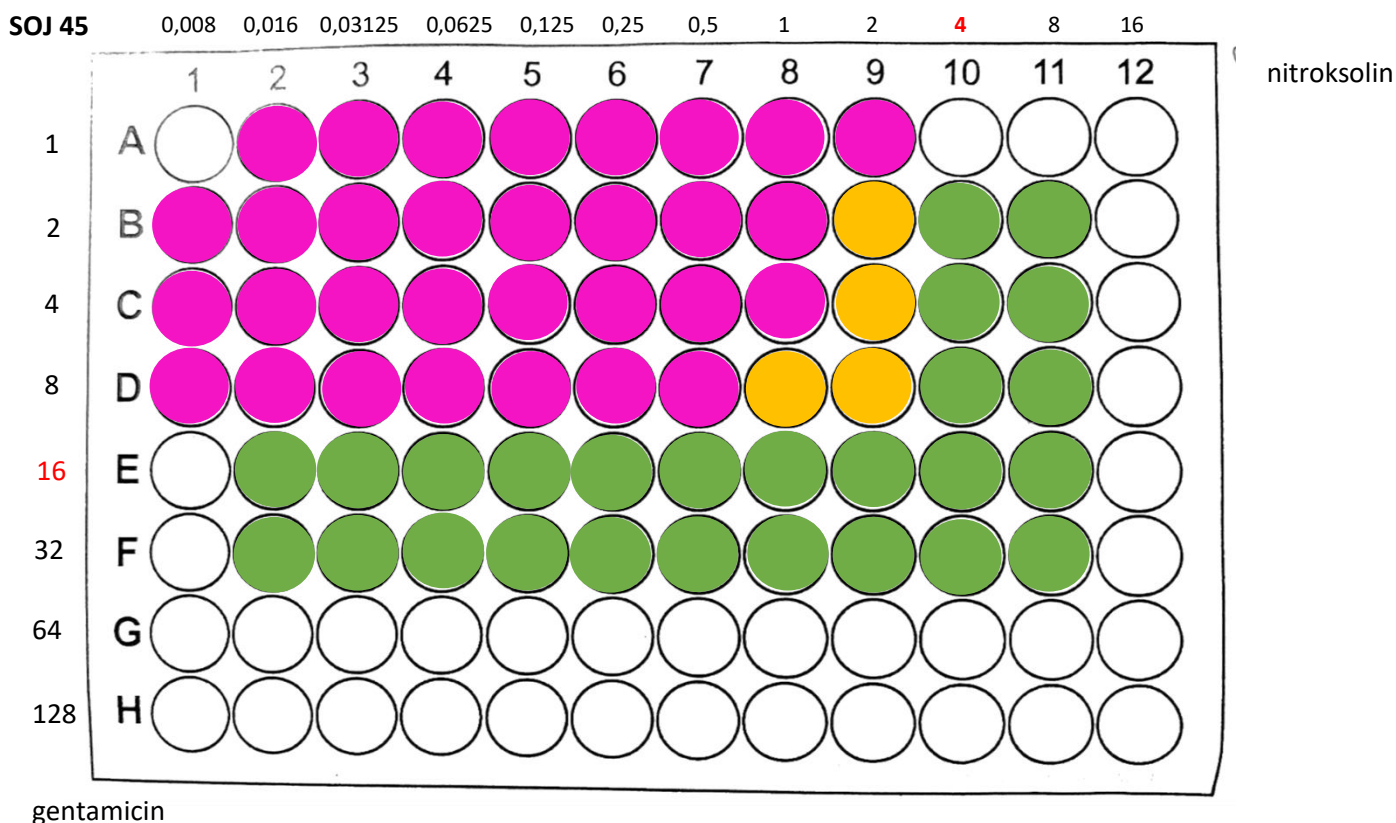
<i>E. faecalis</i> soj 45					
MIK nitroksolin $\mu\text{g/mL}$	MIK gentamicin $\mu\text{g/mL}$	FIC indeks		Interakcija između antibiotika	
4	16	FIC (A) (gentamicin)	FIC (B) (nitroksolin)	FIC = FIC(A) + FIC(B)	UČINAK
		0,125	0,5	0,625	ADITIVAN
		0,125	1	1,125	INDIFERENTAN
		0,125	2	2,125	INDIFERENTAN
		0,25	0,5	0,75	ADITIVAN
		0,25	1	1,25	INDIFERENTAN
		0,25	2	2,25	INDIFERENTAN
		0,5	0,25	0,75	ADITIVAN
		0,5	0,5	1	ADITIVAN
		0,5	1	1,5	INDIFERENTAN
		0,5	2	2,5	INDIFERENTAN
		0,004	1	1,004	INDIFERENTAN
		0,0078	1	1,0078	INDIFERENTAN
		0,02	1	1,02	INDIFERENTAN
		0,03	1	1,03	INDIFERENTAN
		0,063	1	1,063	INDIFERENTAN
		0,125	1	1,125	INDIFERENTAN
		0,25	1	1,25	INDIFERENTAN
		0,5	1	1,5	INDIFERENTAN
		1	1	2	INDIFERENTAN
		2	1	3	INDIFERENTAN
		0,004	2	2,004	INDIFERENTAN
		0,0078	2	2,0078	INDIFERENTAN
		0,02	2	2,02	INDIFERENTAN
		0,03	2	2,03	INDIFERENTAN
		0,063	2	2,06	INDIFERENTAN
		0,125	2	2,125	INDIFERENTAN
		0,25	2	2,25	INDIFERENTAN
		0,5	2	2,5	INDIFERENTAN
		1	2	3	INDIFERENTAN
		2	2	4	INDIFERENTAN



Tablica 2. Tablični prikaz izračunatih FIC koncentracija na temelju dobivenih rezultata i tipa interakcije između antibiotika nitroksolin i gentamicin za soj 45 .

SOJ 45		Koncentracija nitroksolin $\mu\text{g/mL}$ <b>MIK 4</b>													
		<b>FIC (B)</b>													
		/	0,00 8	0,016 125	0,03 5	0,062 5	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	
Koncentracija gentamicin $\mu\text{g/mL}$ <b>MIK 16</b>	<b>FIC (A)</b>	1													
		2									0,625	1,125	2,125	4,125	
		4										0,75	1,25	2,25	4,25
		8									0,75	1	1,5	2,5	4,5
		16			1,004 78	1,00	1,02	1,03	1,0625	1,125	1,25	1,5	2	3	5
		32			2,004 78	2,00	2,02	2,03 125	2,062 5	2,125	2,25	2,5	3	4	6
		64			4,003 9	4,00 78	4,02	4,03	4,062 5	4,125	4,25	4,5	5	6	8
		128			8,0039 78	8,00	8,02	8,03 125	8,0625	8,125	8,25	8,5	9	10	12

Na slici 2. prikazana su mjesta sa tipom interakcije između antibiotika (nitroksolin/gentamicin) za soj 45



Slika 2. Prikaz mjesta sa tipom interakcije između antibiotika (nitroksolin/gentamicin) za soj 45.

●	Porast enterokoka
●	Sinergistički učinak
●	Aditivan učinak
●	Indiferentan učinak

Prema dobivenim rezultatima kod soja 45, nije došlo do porasta u 30 jažica te je od toga postignut aditivan učinak u 4 jažice, Dobivene koncentracije kod aditivnog učinka iznose: red B9 0,625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , red C9 0,75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , red D8 0,75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  i D9 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Indiferentan učinak je postignut u 26 jažica (Tablica 1).

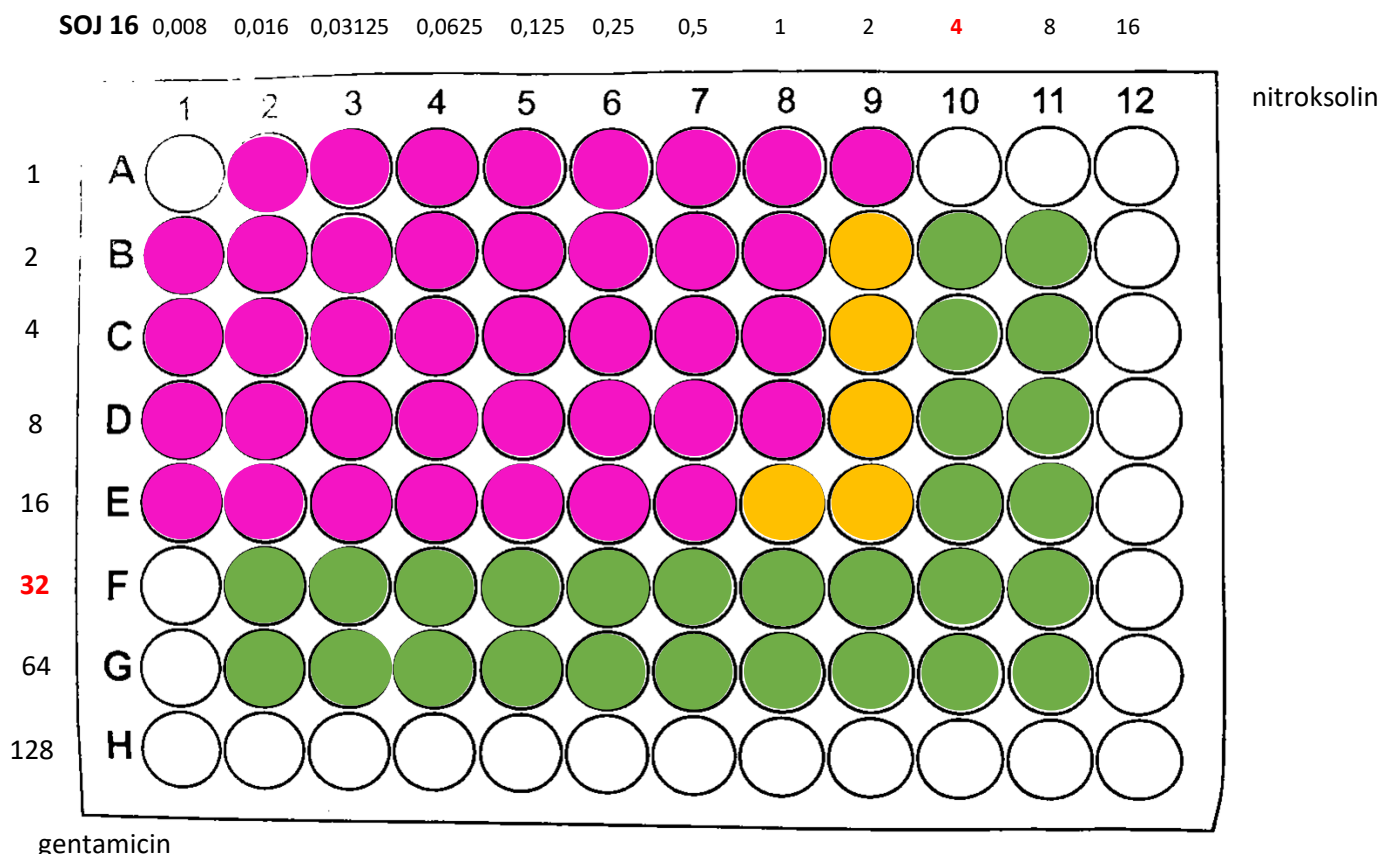
Tablica 3. Tablični prikaz izračunatih FIC koncentracija na temelju dobivenih rezultata i tipa interakcije između antibiotika nitroksolin i gentamicin za soj 16.

<i>E. faecalis</i> soj 16					
MIK nitroksolin µg/mL	MIK gentamicin µg/mL	FIC indeks		Interakcija između antibiotika	
4	32	FIC (A) (gentamicin)	FIC (B) (nitroksolin)	FIC = FIC(A) + FIC(B)	UČINAK
Koncentracija nitroksolin 512 µg/mL Koncentracija gntamicin 512 µg/mL	0,0625	0,5	0,562	ADITIVAN	
	0,0625	1	1,0625	INDIFERENTAN	
	0,0625	2	2,0625	INDIFERENTAN	
	0,125	0,5	0,625	ADITIVAN	
	0,125	1	1,125	INDIFERENTAN	
	0,125	2	2,125	INDIFERENTAN	
	0,25	0,5	0,75	ADITIVAN	
	0,25	1	1,25	INDIFERENTAN	
	0,25	2	2,25	INDIFERENTAN	
	0,5	0,25	0,75	ADITIVAN	
	0,5	0,5	1	ADITIVAN	
	0,5	1	1,5	INDIFERENTAN	
	0,5	2	2,5	INDIFERENTAN	
	1	0,004	1,004	INDIFERENTAN	
	1	0,0078	1,0078	INDIFERENTAN	
	1	0,02	1,02	INDIFERENTAN	
	1	0,03	1,03	INDIFERENTAN	
	1	0,06	1,06	INDIFERENTAN	
	1	0,125	1,125	INDIFERENTAN	
	1	0,25	1,25	INDIFERENTAN	
	1	0,5	1,5	INDIFERENTAN	
	1	1	2	INDIFERENTAN	
	1	2	3	INDIFERENTAN	
	2	0,004	2,004	INDIFERENTAN	
	2	0,0078	2,0278	INDIFERENTAN	
	2	0,02	2,02	INDIFERENTAN	
	2	0,03	2,03	INDIFERENTAN	
	2	0,06	2,06	INDIFERENTAN	
2	0,125	2,125	INDIFERENTAN		
2	0,25	2,25	INDIFERENTAN		
2	0,5	2,5	INDIFERENTAN		
2	1	3	INDIFERENTAN		
2	2	4	INDIFERENTAN		

Tablica 4. Tablični prikaz izračunatih FIC koncentracija na temelju dobivenih rezultata i tipa interakcije između antibiotika nitroksolin i gentamicin za soj 16.

SOJ 16	Koncentracija nitroksolin $\mu\text{g/mL}$ <b>MIK 4</b>													
	<b>FIC (B)</b>													
<b>Koncentracija gentamicin <math>\mu\text{g/mL}</math> <b>MIK 32</b></b> <b>FIC (A)</b>	/	0,00 8	0,016	0,03 125	0,062 5	0,12 5	0,25	0,5	1	2	4	8	16	
	1													
	2									0,562 5	1,062 5	2,0625	4,062 5	
	4									0,625	1,125	2,125	4,125	
	8									0,75	1,25	2,25	4,25	
	16								0,75	1	1,5	2,5	4,5	
	32		1,004 78	1,00 78	1,02	1,03 125	1,062 5	1,125	1,25	1,5	2	3	5	
	64		2,003 9	2,00 78	2,02	2,03	2,062 5	2,125	2,25	2,5	3	4	6	
	128		4,0039	4,00 78	4,02	4,03 125	4,0625	4,125	4,25	4,5	5	6	8	

Na slici 3. prikazana su mjesta sa tipom interakcije između antibiotika (nitroksolin/gentamicin) za soj 16



Slika 3. Prikaz mjesta sa tipom interakcije između antibiotika (nitroksolin/gentamicin) za soj 16.

●	Porast enterokoka
●	Sinergistički učinak
●	Aditivan učinak
●	Indiferentan učinak

Prema dobivenim rezultatima kod soja 16, nije došlo do porasta u 33 jažice te je od toga postignut aditivan učinak u 5 jažica. Dobivene koncentracije kod aditivnog učinka iznose: red B9 0,563  $\mu\text{g/mL}$ , red C9 0,625  $\mu\text{g/mL}$ , red D9 0,75  $\mu\text{g/mL}$ , red E8 0,75 i E9 1  $\mu\text{g/mL}$ . Indiferentan učinak je postignut u 28 jažica (Tablica 2).

Tablica 5. Tablični prikaz izračunatih FIC koncentracija na temelju dobivenih rezultata i tipa interakcije između antibiotika nitroksolin i gentamicin za ATCC 29212.

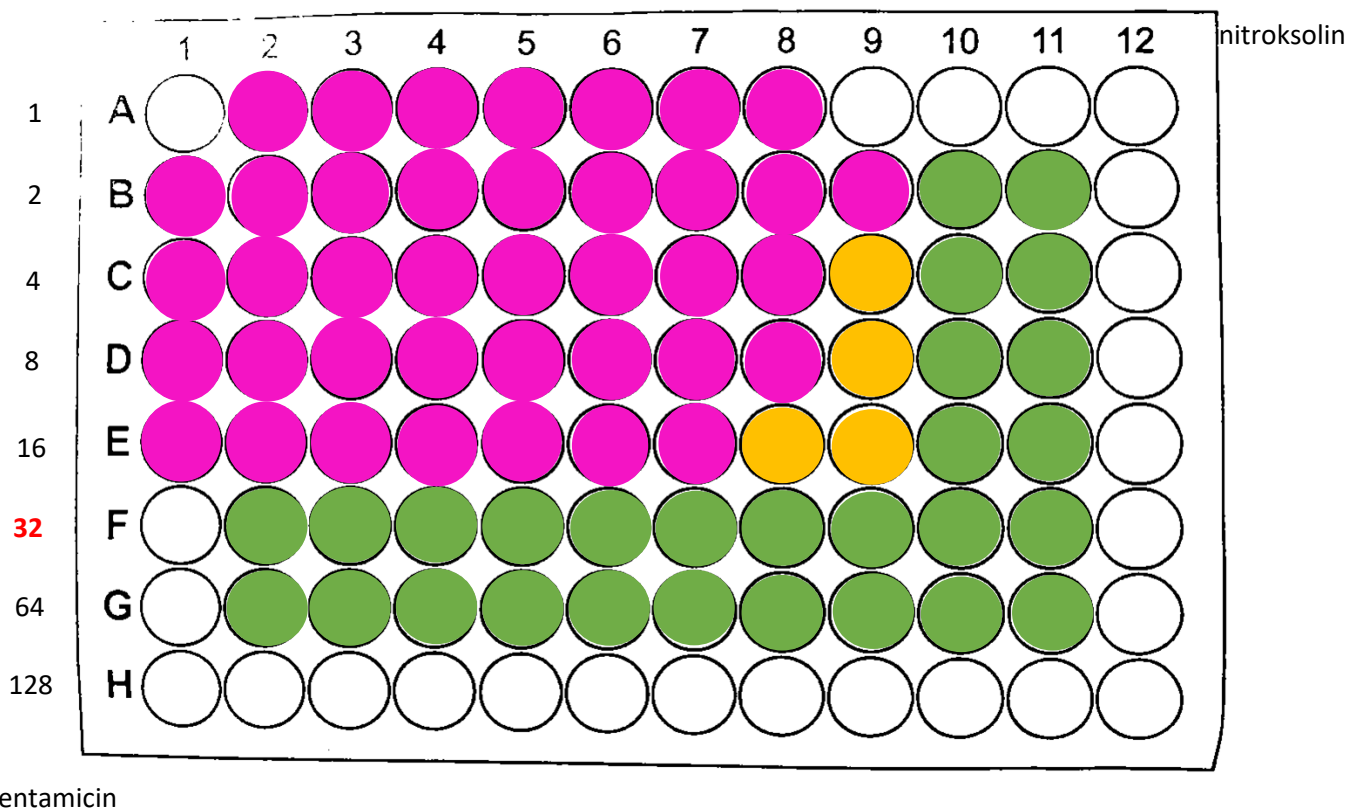
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212					
MIK nitroksolin µg/mL	MIK gentamicin µg/mL	FIC indeks		Interakcija između antibiotika	
16	32	FIC (A) (gentamicin)	FIC (B) (nitroksolin)	FIC = FIC(A) + FIC(B)	UČINAK
Koncentracija nitroksolin 256 µg/mL Koncentracija gentamicin 512 µg/mL		0,0625	1	1,065	INDIFERENTAN
		0,0625	2	2,0625	INDIFERENTAN
		0,125	0,5	0,625	ADITIVAN
		0,125	1	1,125	INDIFERENTAN
		0,125	2	2,125	INDIFERENTAN
		0,25	0,5	0,75	ADITIVAN
		0,25	1	1,25	INDIFERENTAN
		0,25	2	2,25	INDIFERENTAN
		0,5	0,25	0,75	ADITIVAN
		0,5	0,5	1	ADITIVAN
		0,5	1	1,5	INDIFERENTAN
		0,5	2	2,5	INDIFERENTAN
		1	0,004	1,004	INDIFERENTAN
		1	0,0078	1,0078	INDIFERENTAN
		1	0,016	1,016	INDIFERENTAN
		1	0,03125	1,03125	INDIFERENTAN
		1	0,0625	1,0625	INDIFERENTAN
		1	0,125	1,125	INDIFERENTAN
		1	0,25	1,25	INDIFERENTAN
		1	0,5	1,5	INDIFERENTAN
		1	1	2	INDIFERENTAN
		1	2	3	INDIFERENTAN
		2	0,004	2,004	INDIFERENTAN
		2	0,0078	2,0078	INDIFERENTAN
		2	0,016	2,016	INDIFERENTAN
		2	0,03125	2,03125	INDIFERENTAN
		2	0,0625	2,0625	INDIFERENTAN
		2	0,125	2,125	INDIFERENTAN
	2	0,25	2,25	INDIFERENTAN	
	2	0,5	2,5	INDIFERENTAN	
	2	1	3	INDIFERENTAN	
	2	2	4	INDIFERENTAN	

Tablica 6. Tablični prikaz izračunatih FIC koncentracija na temelju dobivenih rezultata i tipa interakcije između antibiotika nitroksolin i gentamicin za soj ATCC 29212.

ATCC 29212	Koncentracija nitroksolin $\mu\text{g/mL}$ <b>MIK 16</b>												
	<b>FIC (B)</b>												
	/	0,06 25	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
<b>Koncentracija gentamicin <math>\mu\text{g/mL}</math> <b>MIK 32</b></b> <b>FIC (A)</b>	1												
	2										1,062 5	2,0625	4,062 5
	4									0,625	1,125	2,125	4,125
	8									0,75	1,25	2,25	4,25
	16								0,75	1	1,5	2,5	4,5
	32		1,003 9	1,00 78	1,016	1,03 125	1,062 5	1,125	1,25	1,5	2	3	5
	64		2,003 9	2,00 78	2,016	2,03 125	2,062 5	2,125	2,25	2,5	3	4	6
	128		4,0039	4,00 78	4,016	4,03 125	4,0625	4,125	4,25	4,5	5	6	8

Na slici 4. prikazana su mjesta sa tipom interakcije između antibiotika (nitroksolin/gentamicin) za ATCC 29212

ATCC 29212 0,0625 0,125 0,25 0,5 1 2 4 8 16 32 64 128



Slika 4. Prikaz mjesta sa tipom interakcije između antibiotika (nitroksolin/gentamicin) za ATCC 29212.

●	Porast enterokoka
●	Sinergistički učinak
●	Aditivan učinak
●	Indiferentan učinak

Prema dobivenim rezultatima kod ATCC 29212, nije došlo do porasta u 32 jažice te je od toga postignut aditivan učinak u 4 jažice, Dobivene koncentracije kod aditivnog učinka iznose: red C9 0,625 µg/mL, red D9 0,75 µg/mL, red E8 0,75 µg/mL i E9 1 µg/mL. Indiferentan učinak je postignut u 28 jažica (Tablica 3).

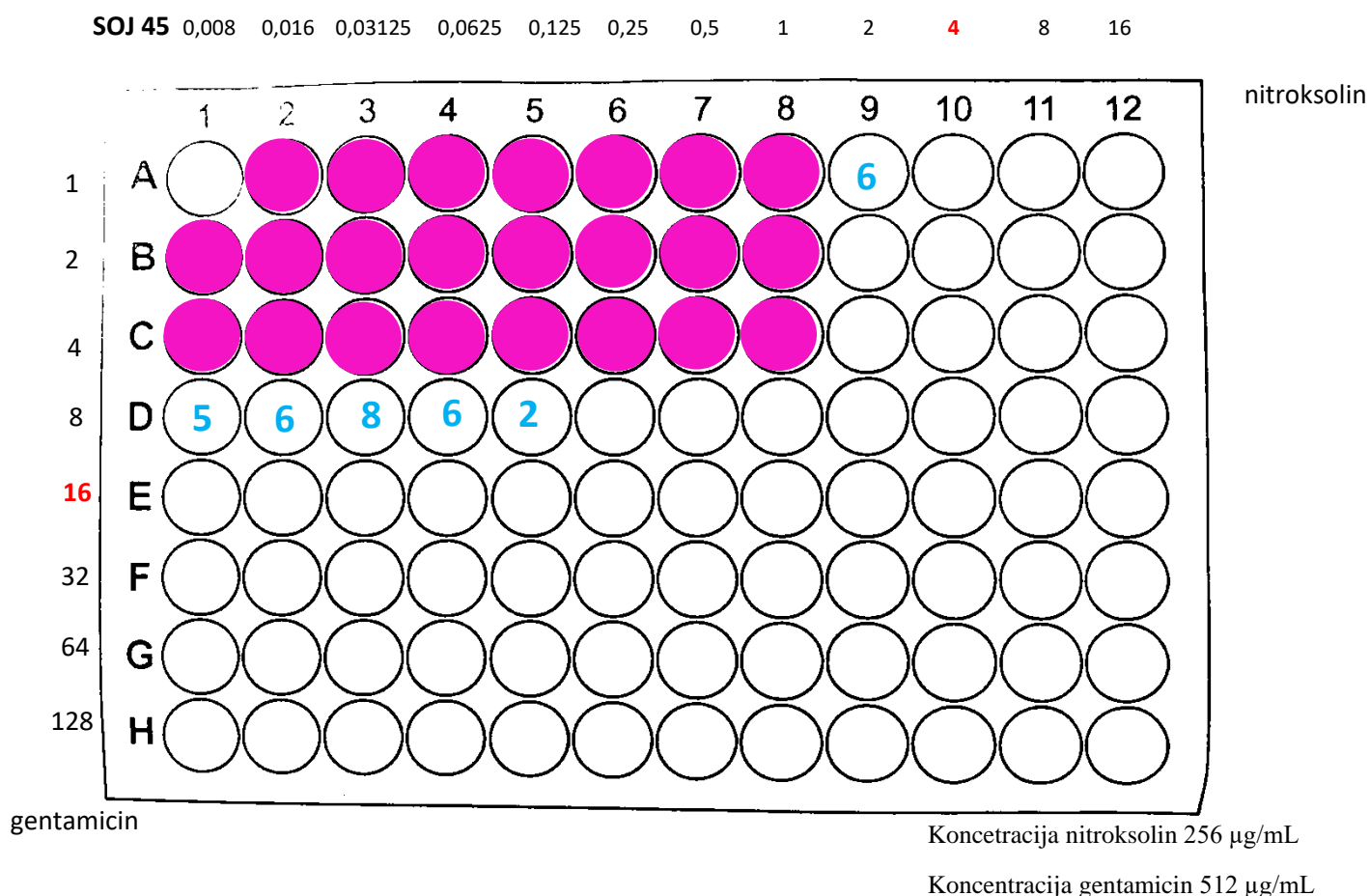


Možemo uočiti da je dobiven puno veći efekt kombinacijom dvaju antibiotika manjih koncentracija. To nam ukazuje da kombinacijom antibiotika nitroksolin postignuta interakcija sa antibiotikom gentamicin te djeluje aditivan učinak.

### 4.3. Kombinacija nitroksolin i gentamicin na inhibiciju stvaranja biofilmova

Nakon provedenog ispiranja, mikrotitarska ploča je tretirana na ultrazvučnoj kupelji te je presađena na hranjivu podlogu. Taj postupak je proveden iz razloga kako bi odvojili adherirane bakterije od podloge tj. ukoliko je došlo do nastajanja biofilma da se on odvojio od same podloge. Dobiveni rezultat nam je ukazao kao kombinacija dvaju antibiotika nitroksolin i gentamicin djeluju inhibiciju stvaranja biofilmova.

Na slici 5. prikazani su rezultati dvaju antibiotika na razaranje biofilma za soj 45



Slika 5. Dobiveni rezultati dvaju antibiotika na razaranje biofilma za soj 45.

● - Porast bakterije (nema djelovanja)

## BROJ kolonija - Inhibicija adhezije

○ - Nema porasta bakterija – antiadhezijsko djelovanje

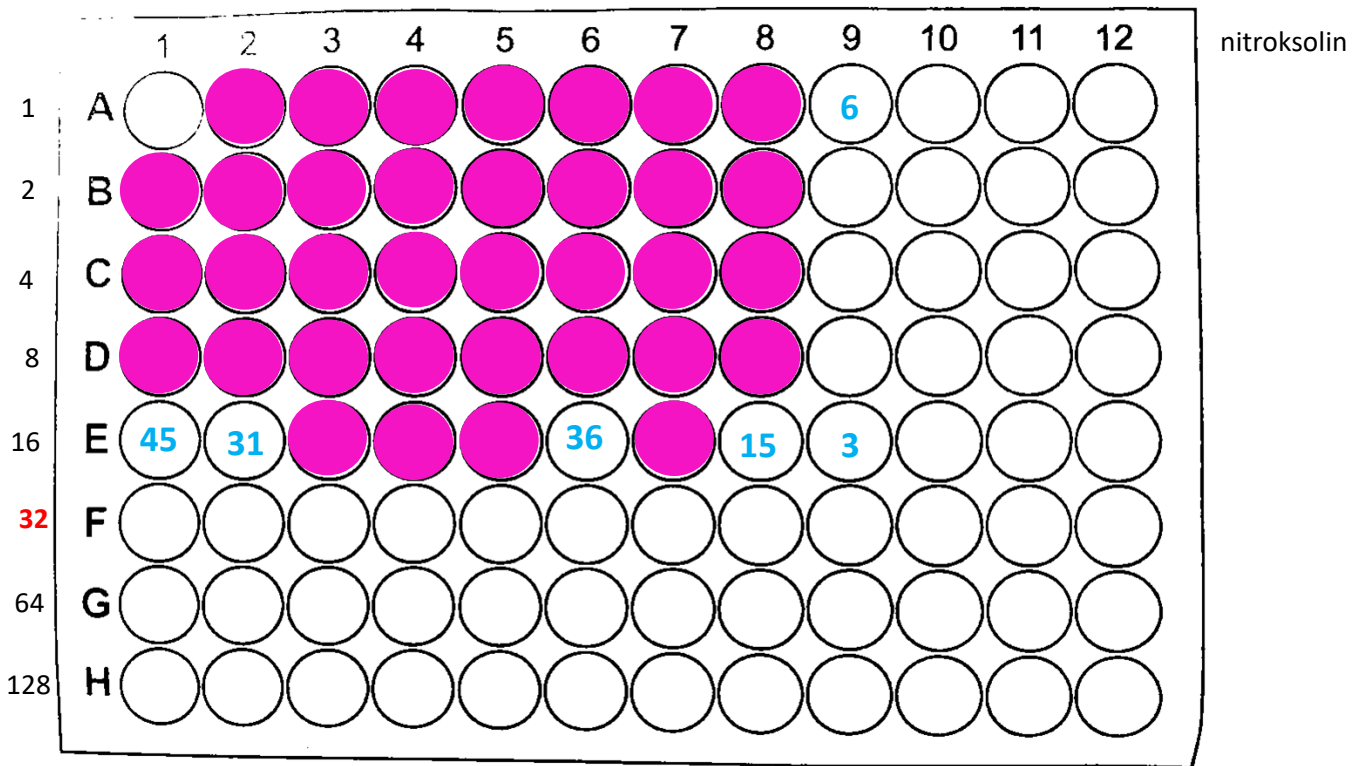
Tablica 4. Prikaz rezultata djelovanjem nitroksolin i gentamicin na razaranje biofilma za soj 45.

Broj bakterija CFU/mL		Koncentracija gentamicin $\mu\text{g/mL}$													
		/	0,008	0,016	0,03	0,062 5	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	
Koncentracija nitroksolin $\mu\text{g/mL}$	/	/													
	1	Kontrola /	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$6 \times 10^3$	0	0	0
	2	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	0	0	0	0
	4	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	0	0	0	0
	8	$5 \times 10^3$	$6 \times 10^3$	$8 \times 10^3$	$6 \times 10^3$	$2 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Prema dobivenim rezultatima gentamicin inhibira stvaranje biofilma u koncentraciji od 16  $\mu\text{g/mL}$ , a nitroksolin u koncentraciji od 4  $\mu\text{g/mL}$ . Kombinacije koncentracija 0,531  $\mu\text{g/mL}$ , 0,563  $\mu\text{g/mL}$ , 0,625  $\mu\text{g/mL}$ , 0,75  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\mu\text{g/mL}$ , su imale aditivni antiadhezijski učinak (Tablica 4.).

Na slici 6. prikazani su rezultati dvaju antibiotika na razaranje biofilma za soj 16

**SOJ 16** 0,008 0,016 0,03125 0,0625 0,125 0,25 0,5 1 2 **4** 8 16



gentamicin

Koncentracija nitroksolin 256 µg/mL

Koncentracija gentamicin 512 µg/mL

Slika 6. Dobiveni rezultati dvaju antibiotika na razaranje biofilma za soj 16.

● - Porast bakterije (nema djelovanja)

**BROJ kolonija** - Inhibicija adhezije

○ - Nema porasta bakterija – antiadhezijsko djelovanje

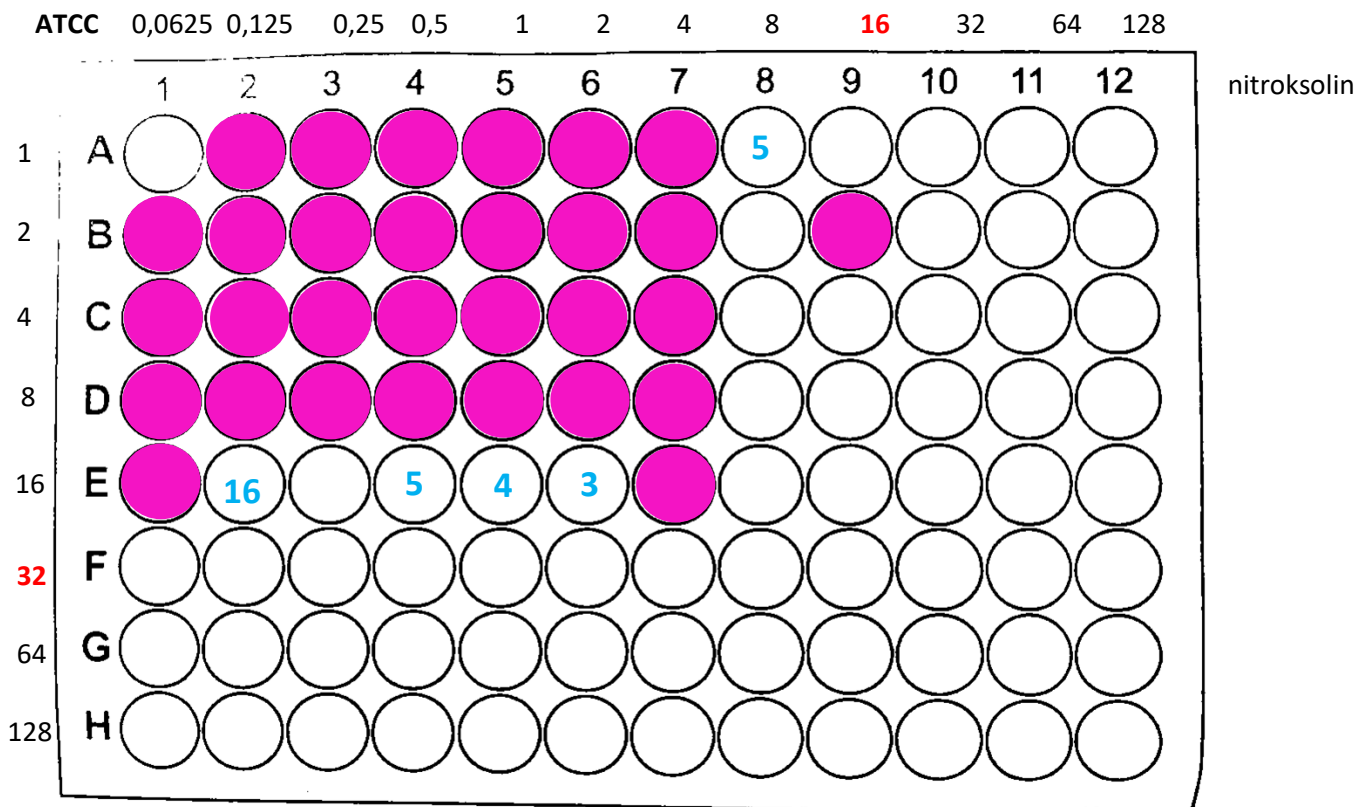
Tablica 5. Prikaz rezultata djelovanjem nitroksolin i gentamicin na razaranje biofilma za soj

16.

Broj bakterija CFU/mL		Koncentracija gentamicin mg/mL												
/		/	0,008	0,016	0,03	0,062 5	0,12 5	0,25	0,5	1	2	4	8	16
Koncentracija nitroksolin mg/mL	1	Kontola /	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>	0	0	0
	2	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0	0	0	0
	4	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0	0	0	0
	8	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0	0	0	0
	16	4,5x10 <sup>4</sup>	3,1x10 <sup>4</sup>	0	0	0	0	3,6x10 <sup>4</sup>	0	1,5x 10 <sup>4</sup>	3x10 <sup>3</sup>	0	0	0
	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Prema dobivenim rezultatima gentamicin inhibira stvaranje biofilma u koncentraciji od 32 µg/mL, a nitroksolin u koncentraciji od 4 µg/mL. Kombinacije koncentracija 0,563 µg/mL, 0,625 µg/mL i 0,75 µg/mL su imale aditivni antiadhezijski učinak (Tablica 5.).

Na slici 7. prikazani su rezultati dvaju antibiotika na razaranje biofilma za soj ATCC 29212



gentamicin

Koncentracija nitroksolin 256 µg/mL

Koncentracija gentamicin 512 µg/mL

Slika 7. Dobiveni rezultati dvaju antibiotika na razaranje biofilma za ATCC 29212.

● - Porast bakterije (nema djelovanja)

**BROJ kolonija** - Inhibicija adhezije

○ - Nema porasta bakterija – antiadhezijsko djelovanje

Tablica 6. Prikaz rezultata djelovanjem nitroksolin i gentamicin na razaranje biofilma za soj ATCC 29212.

Broj bakterija CFU/mL		Koncentracija gentamicin mg/mL												
		/	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Koncentracija nitroksolin mg/mL	/	/	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$5 \times 10^3$	0	0	0	0
	1	Kontola /	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	0	0	0	0
	2	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	0	0	0	0	0
	4	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	0	0	0	0	0
	8	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	$10^6$	0	0	0	0	0
	16	$10^6$	$1,6 \times 10^4$	0	$5 \times 10^3$	$4 \times 10^3$	0	$3 \times 10^3$	$10^6$	0	0	0	0	0
	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Prema dobivenim rezultatima gentamicin inhibira stvaranje biofilma u koncentraciji od 32  $\mu\text{g/mL}$ , a nitroksolin u koncentraciji od 16  $\mu\text{g/mL}$ . Kombinacije koncentracija 0,563  $\mu\text{g/mL}$ , 0,625  $\mu\text{g/mL}$  i 0,75  $\mu\text{g/mL}$  su imale aditivni antiadhezijski učinak (Tablica 6).

## 5. RASPRAVA

*Enterococcus* je izolirani patogen i vrlo često je uzročnik infekcija kod ljudi. Dio su normalne flore probavnog sustava te kod ljudi je najčešće izoliran *E. faecalis* i *E. faecium*. Gram pozitivni su koki koji su vrlo slični streptokokima i pojavljuju se u kratkim lancima ili u parovima. Jako je velika zastupljenost infekcija u bolnicama i izvanbolničkoj sredini te povećavaju rezistenciju na većinu postojećih antibiotika. Također, smatraju se oportunističkim patogenima, a probavni sustav je glavni rezervoar te iz njega dospijevaju u različite organske sustave.

Liječenje enterokoknih infekcija nije jednostavno iz razloga što većina antibiotika ne djeluje baktericidno. Najčešće se primjenjuje kombinirana terapija, aminoglikozidi s antibioticima koji djeluju na staničnu stjenku kao npr. ampicilin i vankomicin.

Cilj ovog rada bio je ispitati interakciju dvaju antibiotika nitroksolin i gentamicin na adheziju uropatogenih izolata enterokoka.

Provedeno je istraživanje u svrhu kako bi se spriječilo stvaranje biofilma tj. je li bakterije adheriraju na stijenku urinarnog katetera. Primjena dva antibiotika nitroksolin i gentamicin u kombinaciji mogu davati različiti efekte. Može biti sinergistička, aditivna, indiferentna i antagonistička interakcija. Sinergistički efekt je kada pri istodobnoj primjeni dviju tvari imaju istu vrstu učinka, ali intenzitet njihovog zajedničkog učinka može dati puno veći efekt od zbroja pojedinačnih učinaka. Aditivna interakcija je kada pri istodobnoj primjeni dviju tvari koje imaju istu vrstu učinka, intenziteti njihovih učinaka se zbrajaju. Također, antagonistički efekt je interakcija nekog učinka koja vodi ka smanjenju ili nestajanju tog navedenog učinka. Efekti se mogu odrediti pomoću FIC (fractional inhibitory concentration) metode. Prije samog izračuna važno je odrediti MIK nitroksolin i gentamicin pojedinačno. Nakon što se odrediti MIK svakog antibiotika važno je izračunati pojedinačni FIC (FIC(A) i FIC(B)) te zbroj pojedinačnog FIC-a i na temelju rezultata odrediti koja je interakcija (16,17).

Provedena su ispitivanja na sojevima 45, 16 i ATCC 29212. Prema dobivenim rezultatima kod soja 45, nije došlo do porasta u 30 jažica te je od toga postignut aditivan učinak u 4 jažice. Kod soja 16, nije došlo do porasta u 33 jažice i postignut aditivan učinak u 5 jažica. Također, kod ATCC 29212, nije došlo do porasta u 32 jažice te je od toga postignut aditivan učinak u 4 jažice.

Možemo uočiti da je dobiven puno veći efekt kombinacijom dvaju antibiotika manjih koncentracija. To nam ukazuje da kombinacijom antibiotika nitroksolin postignuta interakcija sa antibiotikom gentamicin te djeluje aditivan učinak.

Također, provedeno je ispitivanje dva antibiotika nitroksolin i gentamicin u kombinaciji na inhibiciju stvaranja biofilma. Ispitivanje se provelo na način da se mikrotitarska pločica nakon ispiranja podvrgnula ultrazvučnoj kupelji te nakon toga je presađena na hranjivu podlogu. Postupak je proveden kako bi odvojile adherirane bakterije od podloge tj. ukoliko je došlo do nastajanja biofilma da se on odvojio od same podloge. Porasle bakterije smo očitali brojanjem. Rezultati su pokazali da je došlo do porasta bakterije tamo gdje su i prije narasle što znači da je došlo do odvajanja bakterija od biofilma te je postignut aditivni antiadhezijski učinak.

Enterokoki uzrokuju infekcije urinarnog trakta (2), a kateterizacija je glavni čimbenik rizika za nastanak same infekcije (5). Također, oportunistički su patogeni i uzrokuju infekcije kod bolesnika koji se nalaze u jedinicama intenzivne njege, imunokompromitiranih i kod bolesnika s nekakvom podležećom bolesti. Pacijenti se u bolnicama uglavnom liječe antibioticima širokog spektra (4). Najčešće se bakterije prenose s bolesnika na bolesnika i to ponajprije rukama medicinskog osoblja, a ponekad se mogu prenijeti i medicinskim pomagalima (9).



## 6. ZAKLJUČAK

Dobiveni rezultati koje se odnose na sojeve 45, 16 i ATCC 29212 ukazuju na to da je postignut puno veći efekt u kombinaciji dvaju antibiotika Nitroksolin i Gentamicin manjih koncentracija. Također, dva ispitivana antibiotika Nitroksolin i Gentamicin u nižoj koncentraciji inhibiraju adheziju enterokoka na polistiren, u odnosu na njihovu pojedinačnu primjenu u istim koncentracijama.

Sposobnost samog preživljavanja enterobakterija u bolničkom okruženju treba uzeti u obzir iz razloga što imaju visok potencijal za stvaranje biofilmova, a naročito kad se radi o medicinskim pomagalima.

## 7. LITERATURA

1. Kalenić, S. i sur. (2013). Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada.
2. Kamberović – & Uzunović, S. (ur.) (2008) Medicinska mikrobiologija. Zenica. Štamparija Fojnica.
3. Rijal, N. Enterococcus faecalis: Properties, Pathogenesis, Lab Diagnosis. (2022) Dostupno na: <https://microbeonline.com/enterococcus-faecalis-pathogenesis-diagnosis/>
4. Ramos S, Silva V, Dapkevicius MdLE, Igrejas G, Poeta P. Enterococci, from Harmless Bacteria to a Pathogen. Microorganisms. 2020; 8(8):1118. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081118>
5. Aasish, K., Ratna B., Basudha K. (2019) Characterization of Clinical Isolates of Enterococci with Special Reference to Glycopeptide Susceptibility at a Tertiary Care Center of Eastern Nepal. International Journal of Microbiology, vol. 2019, Article ID 7936156 Dostupno na: <https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2019/7936156/>
6. Šantić, M., Gobin I., Ožanić M., Marečić V. Priručnik za vježbe iz Mikrobiologije hrane i Mikrobiologije vode. (2014) Rijeka: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci.
7. Watson, S. Enterococcus Faecalis. (2019) Dostupno na: <https://www.healthline.com/health/enterococcus-faecalis>
8. Joseph W. C. Aminoglycoside Resistance in Enterococci. (2000) Clinical Infectious Diseases, Volume 31, Issue 2. Pages 586–589, <https://doi.org/10.1086/313949>
9. Jawetz, Melnick, Adelberg (2005). Medicinska mikrobiologija, 26. izdanje (1. izdanje), Placebo d.o.o., Split, 222-224.
10. Lyndy J., McGaw Esameldin E. E., Jacobus N. E. Cytotoxicity of African Medicinal Plants Against Normal Animal and Human Cells. (2014) Toxicological Survey of African Medicinal Plants.
11. Ibáñez de Garayo, M., Liu, W., Rondeau, N.C. et al. Rationally repurposed nitroxoline inhibits preclinical models of Epstein–Barr virus-associated lymphoproliferation. J Antibiot 74, 763–766 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41429-021-00433-2>
12. Giorgio, G. Enterococci from foods. Microbiology Reviews (2002). Volume 26, Issue 2. Pages 163–171, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00608.x>
13. Franz CM, Stiles ME, Schleifer KH, Holzappel WH. Enterococci in foods a conundrum for food safety. Int J Food Microbiol. 2003 Dec 1;88(2-3):105-22. doi: 10.1016/s0168-1605(03)00174-0. PMID: 14596984.

14. Nami Y., Vaseghi Bakhshayesh R., Mohammadzadeh Jalaly H., Lotfi H., Eslami S., Hejazi M. A. Probiotic Properties of Enterococcus Isolated From Artisanal Dairy Products.  
Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00300/full>
15. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;1914–18.
16. Bhat AS, Ahangar AA. Methods for detecting chemical-chemical interaction in toxicology. *Toxicol Mech Meth.* 2007;441–50.
17. Meletiadis J, Pournaras S, Roilides E, Walsh TJ. Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, Monte Carlo simulation analysis, and in vitro-in vivo correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(2):602-609. doi:10.1128/AAC.00999-09
18. <file:///C:/Users/sarar/Downloads/Vrane.Patogeneza-KNJIGApdf.pdf> (Pristupljeno: kolovoz 2022.)

## 8. ŽIVOTOPIS

Marta Ribić rođena 20. 2. 1999. godine u Zadru. Dolazi s otoka Pašmana iz mjesta Neviđane gdje je 2013. završila Osnovnu školu „Vladimir Nazor“, a potom i srednju Medicinsku Ante Kuzmanića u Zadru 2018. godine, smjer medicinska sestra. Tijekom školovanja odradila je praksu na svim odjelima u Općoj bolnici Zadar, Domu za starije i nemoćne, Psihijatrijskoj bolnici Ugljan-odjel palijative, ambulanti i dječjem vrtiću. Dodijeljena joj je kvalifikacija medicinska sestra opće njege/medicinski tehničar opće njege i odobrenje za samostalan rad. Nakon položene državne mature 2018./2019. godine, zapošljava se u Općoj bolnici Zadar na Odjelu za vaskularnu kirurgiju kao medicinska sestra. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, preddiplomski studij Sanitarnog inženjerstva je upisala u akademskoj godini 2019./2020. Od 2017. do 2022. god. obnaša dužnost tajnice Udruge za održivi razvoj „Bumbak“ te nastavlja svoje aktivno sudjelovanje u udruzi i organizaciji manifestacija. Također, aktivno sudjeluje i pleše u Kulturnom umjetničkom društvu „Nevijana“ Neviđane. Vrlo je komunikativna i vedra osoba, odgovorno izvršava radne zadatke te je sposobna za individualni, kao i timski rad.