

Virulentni čimbenici bakterije *Enterococcus faecalis* iz različitih izolacijskih izvora

Novosel, Željka

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:911202>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Željka Novosel

Virulentni čimbenici bakterije *Enterococcus faecalis* iz različitih izolacijskih izvora

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Mikrobiologija s parazitologijom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za mikrobiologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ivana Kosalca i neposrednim vodstvom dr. med. Diane Brlek Gorski, spec. kl. mikrobiol. parasitolog. (HZJZ) i dr. sc. Josipe Vlainić (Institut Ruđer Bošković).

U radu je korištena znanstveno-istraživačka oprema (MALDI-TOF) nabavljena u okviru projekta FarmInova (KK.01.1.1.02.0021) koji je financiran iz Europskog fonda za regionalni razvoj.

Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Ivanu Kosalcu na pruženoj pomoći, uloženom trudu i strpljenju prilikom izrade ovog diplomskog rada te neposrednim mentoricama dr. med. Diani Brlek-Gorski i dr. sc. Josipi Vlainić što su bile dio našeg malog tima i uvelike pridonijele mom znanju i diplomskom radu.

Također se zahvaljujem svojoj mentorici u javnoj ljekarni, mag. pharm. Mireli Žonji Olujić koja me kroz sate provedene u ljekarni bodrila i poticala da dajem sve od sebe, kako u ovom radu, tako i u životu.

Najveća zahvala ide mojim roditeljima Nevenki i Željku te sestri Petri koji su mi omogućili sve što je bilo potrebno da danas budem ovdje gdje jesam.

Od srca hvala svima, obitelji, prijateljima, mentorima i kolegama.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Rod <i>Enterococcus</i>	1
1.2. Virulencija enterokoka.....	6
1.3. Vrsta <i>Enterococcus faecalis</i>	8
1.4. Hidrofobnost stanične površine	10
1.5. Sposobnost stvaranja biofilma	11
1.6. Hemoliza	13
1.7. Osjetljivost na vankomicin	16
2. OBRAZLOŽENJE TEME	20
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. Uzorci.....	21
3.2. Izolacija i identifikacija.....	21
3.3. Hidrofobnost stanične površine	23
3.4. Sposobnost stvaranja biofilma	23
3.5. β -hemolitička aktivnost.....	25
3.6. Osjetljivost na antibiotike -fenotipski pristup.....	26
3.7. Statistička obrada podataka.....	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. Rezultati mjerenja hidrofobnosti stanične površine.....	28
4.2. Rezultati mjerenja sposobnosti stvaranja biofilma	31
4.3. Rezultati mjerenja β -hemolitičke aktivnosti	36
4.4. Rezultati mjerenja osjetljivosti na vankomicin.....	39
5. ZAKLJUČAK	42
6. KRATICE	43
7. LITERATURA	45
8. SAŽETAK/SUMMARY	50
8.1. SAŽETAK	50
8.2. SUMMARY	51
9. PRILOZI	52

1. UVOD

1.1. Rod *Enterococcus*

Thiercelin je prvi puta opisao termin "enterokoki" u 19. stoljeću kao saprofitske gram-pozitivne koke porijeklom iz gastrointestinalnog sustava koji su sposobni uzrokovati infekciju. (Lebreton i sur., 2014).

Definiraju se kao nesporelirajuće, oportunističke gram-pozitivne bakterije koje mogu biti pojedinačno, u parovima te u lancima (Kalenić i sur., 2013). Obično su homofermentativne, a konačni produkt fermentacije glukoze je mliječna kiselina, bez stvaranja plina (Lebreton, 2014). Na katalazu su negativne i uobičajeno prisutne u ljudskoj mikrobioti posebice u gastrointestinalnom sustavu te na koži, u usnoj šupljini i urogenitalnom sustavu kao i perianalnom području. Probavni sustav se smatra habitatom iz kojeg kreću u druge sustave uzrokujući infekcije (Said i sur., 2022). U čovjeka se mogu izolirati u koncentraciji od otprilike $10^5 - 10^7$ CFU/g fecesa (Krawczyk i sur., 2021). Osim ljudskog i životinjskog rezervoara također su sastavan dio okoliša i mogu se naći u tlu, vodi i hrani. Ranije su bili svrstani u skupinu streptokoka, a 1984. su dobili status gena istraživanjem DNA hibridizacije i sekvenciranjem 16S rRNA. Od streptokoka se razlikuju prema sposobnosti hidrolize žuč-eskulina, otporniji su prema nekim fizikalnim i kemijskim agensima te ih većina posjeduje antigen grupe „D“ definirano prema Rebeci Lancefield (Said i sur., 2022; Kalenić i sur., 2013). Enterokoki imaju sposobnost rasti na temperaturama između 10°C i 45°C i u prisutnosti 6,5% NaCl, što ih također razlikuje od streptokoka. Samo poneki izolati imaju plazmide koji kodiraju za β -laktamazu i više su rezistentni na penicilin G od streptokoka (Morse i sur., 2013).

Od preko 50 različitih vrsta roda enterokoka, dva najznačajnija predstavnika su *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* (Lebreton i sur., 2014).

Najčešće infekcije koje uzrokuju su povezane s urogenitalnim sustavom, sposobni su inficirati kožu i rane, uzrokuju enteritis te kao najopasnije bolesti endokarditis i meningitis (Kalenić i sur., 2013). Jedni su od najčešćih izoliranih bolničkih patogena (Said i sur., 2022). Svi enterokoki pokazuju smanjenu osjetljivost na peniciline i ampicilin kao i značajnu rezistenciju na većinu cefalosporina i polusintetske peniciline što se događa zbog ekspresije nisko afinitetnih penicilin vezujućih proteina (Kristich i sur., 2014).

Klinički značaj enterokoka je upravo njihova rezistencija koja se može svrstati u tri kategorije. Prvu kategoriju čini intrinzična rezistencija na antibiotike kao što je bakteriostatski linkozamid klindamicin. Primijećena je specifičnost kod analiziranja sulfametoksazol-

trimetoprima jer u *in vitro* uvjetima dolazi do odgovarajućeg učinka lijeka, međutim u životinjskim modelima lijek nema učinka jer se djelovanje bazira na folatu, kojeg je u *in vitro* uvjetima deficit, dok u životinjskim modelima enterokoki uzimaju folate iz okoliša (Kristich i sur., 2014; Zervos i sur., 1986). Drugi primjer intrinzične rezistencije je rezistencija na klinički značajne koncentracije aminoglikozida što isključuje njihovu samostalnu primjenu (Kristich i sur., 2014).

E. faecalis je prirodno rezistentan na kombinaciju kvinupristina-dalfopristina međutim ta kombinacija je vrlo značajna i uspješna za infekcije uzrokovane bakterijom *E. faecium* (Kristich i sur., 2014).

Druga kategorija rezistencije je tolerancija pod kojom se smatra da bakterija može biti inhibirana uz primjenu klinički značajnih odnosno dostupnih koncentracija, ali baktericid bi bio vidljiv samo u koncentracijama koje znatno premašuju minimalnu inhibitornu koncentraciju. Takva tolerancija se uobičajeno može savladati kombinacijom dvaju lijekova kao što su inhibitori stanične stijenke i aminoglikozidi. Točan mehanizam djelovanja nije poznat iako studije ukazuju kako primjenom inhibitora stanične stijenke dolazi do narušavanja te strukture pa aminoglikozidi lakše ulaze i efikasnije djeluju, odnosno inhibitori stanične stijenke potiču unos aminoglikozida (Kristich i sur., 2014).

Treća, ujedno i posljednja kategorija je stečena rezistencija. Osim spomenutih lijekova, enterokoki su porodica bakterija koja stekne rezistenciju na svaki lijek s kojim se pokušava liječiti. Vrlo brzo se razvila tolerancija na tetracikline, kloramfenikol, makrolide i klinički najzloglasnija rezistencija na vankomicin koja je karakterističnija za *E. faecium* iako je prisutna i u *E. faecalis*. Novi lijekovi koji se koriste upravo kod ovakvih rezistencija jesu kvinupristin-dalfopristin, linezolid, daptomicin, tigeciklin, no ni oni nisu bez rezistencija što govori o nužnosti farmaceutskih industrija za proizvodnjom novijih efikasnih lijekova u borbi protiv enterokokalnih infekcija (Kristich i sur., 2014).

Liječenje infekcija uzrokovanih enterokokima zahtijeva u nekim slučajevima provođenje antibiograma kako bi se odredio točan stupanj rezistencije. Obzirom na rezultate antibiograma, enterokoki se mogu svrstati u tri kategorije :

- a) Liječenje infekcija *E. faecalis* koji su osjetljivi na ampicilin i vankomicin i ne pokazuju visoku razinu rezistencije na aminoglikozide

Antibiotik izbora je β -laktam osim u slučaju alergije u kojem se onda koristi vankomicin. Najjače djelovanje redom imaju ampicilin, piperacilin, penicilin G te imipenem, ali ovi lijekovi djeluju samo bakteriostatski stoga se preporučuje kombinacija s aminoglikozidima, gentamicinom i streptomycinom, kako bi se dobio sinergistički baktericidni učinak.

b) Liječenje infekcija *E. faecalis* koji su osjetljivi na ampicilin i vankomicin, ali pokazuju visoku razinu rezistencije na aminoglikozide

U ovom slučaju je spriječen sinergistički učinak β -laktama s aminoglikozidima zbog rezistencije. Koriste se kombinacije cefalosporina, ceftriaksona ili cefotaksima s aminopenicilinima primjerice amoksicilinom ili ampicilinom. Spomenuta kombinacija djeluje baktericidno na *E. faecalis*.

c) Liječenje infekcija multirezistentnog *E. faecium*

Najčešće se koriste noviji lijekovi kao što su linezolid, kvinupristin-dalfopristin, daptomicin i tigeciklin.

Prilikom liječenja urinarnih infekcija najčešće se koriste nitrofurantoin te fosfomicin (Kristich i sur., 2014).

Tablica 1. Prikaz najvažnijih mehanizama rezistencija roda enterokoka (Codelia Anjum i sur., 2023)

Antibiotik	Mehanizam djelovanja	Mehanizam rezistencije
Aminoglikozidi	Vežu se na 30S podjedinicu ribosoma i inhibiraju sintezu proteina.	Postoje aminoglikozid modificirajući enzimi, jedini izuzeci su streptomycin i gentamicin. Rezistencija na streptomycin se pojavljuje na 2 načina : enzimskom inaktivacijom ili apsolutnom inhibicijom. Rezistencija na gentamicin se pojavljuje zbog enzima AAC(6')-Ie/APH(2') koji na 6' sadrži acetiltransferazu i na 2' fosfotransferazu.
β -laktami	Inhibiraju sintezu stanične stijenke inhibicijom sinteze peptidoglikana.	Dolazi do rezistencije učinka ovih antibiotika preko ekspresije pbp5 gena koji kodira za penicilin vezujući protein u kojem ampicilin i cefalosporini imaju slabi afinitet vezanja. Osim toga, na rezistenciju prema cefalosporinima utječe i dvokomponentni sustav koji se sastoji od serin/treonin kinaze i fosfataze.
Daptomicin	Inhibira funkciju stanične membrane tako što dovodi do poremećaja u potencijalu membrane.	Tri gena se povezuju s rezistencijom: LiaF koji je dio LiaFSR regulatornog sistema, gpdD i Cls od kojih su oba uključena u metabolizam fosfolipida. Mehanizam rezistencije se razlikuje kod <i>E. faecalis/faecium</i> međutim LiaFSR ima ulogu kod obje vrste.

Glikopeptidi	Vežu se za prekursore i inhibiraju sintezu i permeabilnost stanične stijenke i membrane.	Mehanizam rezistencije je ukodiran u genima koji modificiraju prekursore stanične stijenke na koje se vankomicin veže.
Oksazolidindioni	Vežu se za 23S rRNA podjedinicu i ometaju sintezu proteina.	Rezistencija se javlja zbog mutacija u genu koji kodira za 23S rRNA što sprječava antibakterijsko vezanje.
Kinoloni	Utječu na enzime koji su potrebni za transkripciju i replikaciju.	Rezistencija se obično javlja mutacijama ciljnih gena koji smanjuju afinitet vezanja.
Rifampicin	Inhibira mRNA transkripciju tako što se veže za β -podjedinicu RNA polimeraze kodiranu rpoB genom.	Dolazi do mutacije u rpoB genu.
Trimetoprim i sulfametoksazol	Inhibira enzime uključene u sintezu folata, mnoge bakterije ne mogu koristiti egzogeni folat.	Enterokoki mogu uzeti egzogeni folat.

1.2. Virulencija enterokoka

Kao što je već ranije spomenuto, rod enterokoka uzrokuje širok spektar infekcija, a što im to omogućuje prikazano je u Tablici 2.

Tablica 2. Prikaz virulentnih čimbenika enterokoka (Codelia Anjum i sur., 2023; Fiore i sur., 2019)

Virulentni čimbenici	Opis
Citolizin ^a	Hemolizin/bakteriocin, lizira širok spektar eukariotskih i gram-pozitivnih stanica tako što formira pore, kodiran preko plazmida
Želatinaza ^a	Metaloproteinaza ovisna o cinku, može razgraditi različite supstrate (proteine, kolagen), pomaže u formiranju biofilma
Serinska proteaza ^a	Serinska proteaza, služi za razgradnju proteina
Hijaluronidaza ^b	Razgrađuje hijaluronsku kiselinu kako bi se povećala propusnost vezivnog tkiva
ESP ^{a,b}	Protein usidren u staničnu stijenku, potiče stvaranje biofilma i kolonizaciju epitela mokraćnog mjehura
Agregacijska supstancija ^{a,b}	Protein usidren u staničnu stijenku, uključen u konjugaciju i adheziju za eukariotske stanice
ACE ^{a,b}	Protein usidren u staničnu stijenku, kolagen vezujući protein koji olakšava prijanjanje na izvanstanični matriks i kolagen tipa 1
EPA ^{a,b}	Enterokokalni polisaharidni antigen, anti-fagocitični polisaharid stanične stijenke
CPS ^{a,b}	Kapsularni polisaharid, anti-fagocitični polisaharid stanične stijenke
LTA ^{a,b}	Lipoteikoična kiselina, enterokokalni grupni antigen, vezna supstancija za konjugaciju
Toksični metaboliti ^{a,b}	Reaktivne kisikove vrste : ekstracelularni superoksid, vodikov peroksid
Pilin genski klasteri ^{a,b}	Kodira gene za stvaranje pili koji pomažu prilikom stvaranja biofilma i prijanjanja na stanice domaćina Kod <i>E. faecalis</i> i <i>E. faecium</i> dolazi do različite ekspresije PCG-a iako imaju zapravo istu ulogu

TcpF ^{a,b}	Sprječava Toll-like receptore od otpuštanja citokina tako što interferira sa signalnim putem
---------------------	--

^aVirulentni čimbenici identificirani u bakterije *Enterococcus faecalis*

^bVirulentni čimbenici identificirani u bakterije *Enterococcus faecium*

1.3. Vrsta *Enterococcus faecalis*

Vrsta *Enterococcus faecalis* je najzastupljenija bakterija roda enterokoka i ujedno jedna od glavnih uzročnika bolnički stečenih infekcija kao što su bakterijemija, urinarne infekcije i endokarditis (Bryan i sur., 2021).

Poznato je da su vrste *E. faecalis* i *E. faecium* vrlo slične s nekim manjim razlikama koje su navedene u Tablici 3.

Tablica 3. Prikaz karakternih razlika između *E. faecalis* i *E. faecium* dobivenih istraživanjem i uspoređivanjem 131 izolata koka iz kliničkih uzoraka (Abu Lila i sur., 2023).

Test	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
Katalaza	-	-
Oksidaza	-	-
Pokretljivost	Nepokretan	Nepokretan
Rast na 6,5% NaCl	+	+
Rast na 45°C	+	+
Fermentacija laktoze	+	+
Fermentacija manoze	+	+
Rast na 0,04% teluritu	+	-
Fermentacija arabinoze	-	+

Pod pojmom bakterijemije podrazumijeva se pronalazak vijabilnih bakterija u krvotoku koja je rezultat premještanja bakterija iz gastrointestinalnog sustava (Said i sur., 2022). Smrtnost nakon enterokokne bakterijemije kreće se od 19% do 48% (Suppli i sur., 2011). Rizični čimbenici koji povećavaju smrtnost su dob bolesnika, prisutnost teške bolesti te korištenje metronidazola i treće generacije cefalosporina. Pacijenti koji su bili inficirani s hemolitičkim gentamicin-rezistentnim *E. faecalis* su imali pet puta veći rizik za smrt unutar tri tjedna za razliku od pacijenata kojima je dokazana prisutnost ne-hemolitičkih i na gentamicin osjetljivih *E. faecalis*, iako druga studija kaže da nema povezanosti između smrtnosti i rezistencija na gentamicin (Fiore i sur., 2019).

Prema istraživanju Jafari i sur. (2022) od 73 pacijenata s bakterijemijom, u 80,8% njih je kao uzročnik pronađen *E. faecalis*, u 13,7% *E. faecium* dok je ostatak nepoznat. Važni faktori smrtnosti uključuju rezistenciju na vankomicin za izolirane enterokoke, prisutnost

imunodeficijencije, dulju hospitalizaciju prije bakterijemije te neodgovarajući empirijski režim liječenja.

Urinarne infekcije su među najčešćim bolničkim infekcijama u kojima su enterokoki jedni od češćih uzročnika povezanih s primjenom katetera (Fiore i sur., 2019). Prema istraživanju provedenom od 2011. do 2014. godine, enterokoki kao uzrok uroinfekcije su bili dokazani u preko 20 000 slučajeva, a u 50% njih je uzročnik bio *E. faecalis* (Fiore i sur., 2019). Virulentni faktori koji su zaslužni za ovaj tip infekcija uključuju agregacijsku supstanciju, površinske proteine, PGC, kolagen vezujuće proteine, TcpF i želatinazu. Za primarnu adheziju su zaslužni ESP (enterokokni površinski protein) koji pomaže pri stvaranju biofilma, a najznačajniju ulogu ima u kolonizaciji. Agregacijska tvar pomaže adheziji na stanice domaćina kao i agregaciji. U vrste *E. faecalis* je primijećena veća koncentracija kolagen vezujućeg proteina (Codelia-Anjum i sur., 2023).

Tvorba biofilma za sobom vuče daljnje probleme jer dolazi do polimikrobne kolonizacije s ostalim bakterijama, ponajviše *E. coli*. *E. faecalis* tako povećava virulenciju komenzala preko imunosupresije i modulacije (Codelia-Anjum i sur., 2023).

Enterokokni endokarditis podrazumijeva stvaranje biofilma na srčanim zaliscima koji su na nekim mjestima oštećeni, koji zatim postaju integrirani u mase koje se zovu vegetacije. Od virulentnih čimbenika najznačajniji su želatinaza, proteaza Eep, agregacijska supstancija, Ebp pili te ACE (Garsin i sur., 2014).

Endoftalmitis se povezuje s gubitkom vida. Najznačajniji virulentni čimbenik u ovoj bolesti je citolizin hemolizin koji čini terapiju s deksametazonom neučinkovitom. Serinska proteaza i želatinaza koje su regulirane *quorum-sensing* sistemom, imaju ulogu u destrukciji retine. Izuzev retine, pokazalo se da proteaze imaju ulogu u endoftalmitisu afakičnog oka nakon operacije mrežnice. Proteaze mogu pomoći širenju mikroorganizama tako što penetriraju kroz stražnju kapsulu leće što je ključni faktor u pogoršanju bolesti. Agregacijska supstancija bakterije koja je još jedan bitan virulentni čimbenik, je površinski adhezin koji ima ulogu u lokalizaciji mikroorganizama (Suzuki i Gilmore, 2010).

1.4. Hidrofobnost stanične površine

Hidrofobnost stanične površine (engl. *Cell Surface Hydrophobicity*, CSH) je važan čimbenik kojim se iskazuje sposobnost bakterije da adherira na inertnu površinu, hranu ili komponente hrane. Ovisi o strukturi stanične membrane i stijenke. Nepolarne molekule kao što su teikoična, lipoteikoična kiselina, lipopolisaharidi te neki površinski proteini doprinose hidrofobnosti. Hidrofobne bakterije uzrokuju oštećenje površina stvaranjem biofilma (Salas-Tovar i sur., 2021). Hidrofobnost se može odrediti pomoću testa mikrobne (bakterijske) adhezije na ugljikovodik (MATH/BATH) koji mjeri sposobnost prianjanja mikroorganizama na površinu kapljica nepolarnog otapala odnosno ugljikovodika suspendiranih mućkanjem u kontinuiranoj vodenoj fazi koja sadrži poznatu koncentraciju bakterija. Postotak adhezije bakterija na ugljikovodik, postotak hidrofobnosti ili afinitet prema ugljikovodicima određuje se tako što se procjenjuje razlika mjerenjem koncentracije bakterija zaostalih u vodenom sloju nakon razdvajanja dviju faza (Salas-Tovar i sur., 2021).

Kod enteralnih bakterija lektin često potiče adheziju na stanice. On se nalazi na površinski lokaliziranim fimbrijama koje sadrže visok udio hidrofobnih aminokiselinskih ostataka. Fimbrije prevladavaju barijeru elektrostatskog odbijanja koje postoji između stanice i površine te tako pokazuju svoju ulogu u hidrofobnosti i vezanju za površinu. (Krasowska i Sigler, 2014).

Izuzev fimbrija, postoje razni bakterijski nepolimerni adhezini koji imaju mogućnost prepoznavanja različitih elemenata površine stanice domaćina kao što su kolagen i laminin. Vitronektin, fibronektin te fibrinogen su adhezivni glikoproteini koji se mogu lučiti ili povezati s plazma membranom, a njih mogu prepoznati mnoge vrste patogena (Krasowska i Sigler, 2014).

Gram-pozitivne bakterije koriste drugačije strategije za uspostavljanje adhezivnog kontakta s endotelom koje uključuju proteine izvanstaničnog matriksa koji djeluju kao kolonizacijski mostovi sa stanicama domaćina (Krasowska i Sigler, 2014).

Medicinski proizvodi kao što su umjetni srčani zalisci, pacemakeri i kateteri napravljeni su od hidrofobnog materijala što omogućuje hidrofobnim organizmima vrlo lako prianjanje na njih. Kako bi se riješio taj problem, moguće je korištenje anti-biofilm materijala koji mogu odgoditi ili totalno izbjeći adheziju bakterija. Kao primjer se može navesti korištenje polimernih nanovlakana na polistirenskim površinama čime dolazi do odgođenog stvaranja biofilma. Drugi primjer prevencije bakterijske kolonizacije površine je modifikacija površine metalima kao što su nanočestice srebra (Krasowska i Sigler, 2014).

1.5. Sposobnost stvaranja biofilma

Biofilm se definira kao agregat bakterijskih stanica okruženih samoproducirajućim polimernim matriksom koji im služi kao obrana. Biofilmovi se mogu, ali i ne moraju, vezati za površinu, također se nalaze u tkivima ili izlučevinama (Hall-Stoodley i sur., 2012).

Prvi koji je opisao biofilm bio je Anthonie van Leeuwenhoek 1683. godine kada je promatrao uzorke uzete s jezika i zubiju (Høiby, 2017). Sufiks "film" koji obuhvaća bakterijsku adheziju, agregaciju i razmnožavanje na površinama se prvotno koristio u području morske mikrobiologije kako bi se razlikovali slobodno plivajući organizmi od sesilnih bakterija (Høiby, 2017; Høiby, 2014).

Spomenuti polimerni matriks sastoji se od proteina, polisaharida kao i eDNA. To je jedna vrsta zaštite, a osim nje bakterije u biofilmu raspolažu još nekim metodama kojima mogu izbjeći obranu domaćina. Ostaju dormantne i skrivene od imunskog sustava i tako mogu izazvati lokalno oštećenje tkiva i kasnije akutnu infekciju. Bakterije se unutar biofilma prilagođavaju uvjetima okoliša što uključuje okolišnu anoksiju i ograničenje nutrijenata što onda dovodi do promjenjivog metabolizma, genske ekspresije i posljedično proizvodnje proteina. Posljedica ovakvog stanja može biti smanjeni metabolizam i smanjena stopa stanične diobe. Navedenim prilagodbama dolazi do veće rezistencije na antimikrobnu terapiju jer dolazi do inaktivacije ciljnih meta terapije ili se pak smanjuju zahtjevi za funkciju stanica na koje antimikrobici djeluju. (Vestby i sur., 2020).

Za ovaj tip infekcije je karakteristično da istovremeno dolazi do aktivacije i stečenog i urođenog imunološkog odgovora bolesnika, no nažalost niti jedan od njih ne može eliminirati patogen već može samo ubrzati kolateralno oštećenje tkiva. Ovakve bolesti, koje se povezuju s biofilmom su obično trajne infekcije koje se razvijaju polako, gotovo se nikad ne uspiju savladati imunološkim sustavom i u većini slučajeva različito reagiraju na antimikrobnu terapiju (Vestby i sur., 2020).

Opisana su četiri stupnja razvoja biofilma kod *E. faecalis* :

- a) Prianjanje posredovano proteazama, glikolipidima i površinskim adhezinima u koje ubrajamo agregacijsku supstanciju i ESP.
- b) Nakon sigurnog povezivanja dolazi do razmnožavanja bakterija i stvaranja matriksa biofilma što formira mikrokolonijске agregate.
- c) Zatim dolazi do sazrijevanja uz formaciju ekstracelularne DNA, polisaharida, lipoteikoične kiseline, proteaza, modificiranih lipida i glikoproteina.

- d) Kako kolonije rastu i sazrijevaju tako dolazi do gužvanja, deficita nutrijenata, hipoksije što sve zajedno stvara okolišni stres. Kao odgovor na takav stres dolazi do pomaka genske ekspresije prema disperziji što je ujedno i posljednji korak formacije biofilma koji obuhvaća prijelaz jezgre u tekuće stanje uz oštećenje stijenke zida mikrokolonija što dopušta bakterijama da izađu i tvore dalje nove kolonije (Codelia Anjum i sur., 2023).

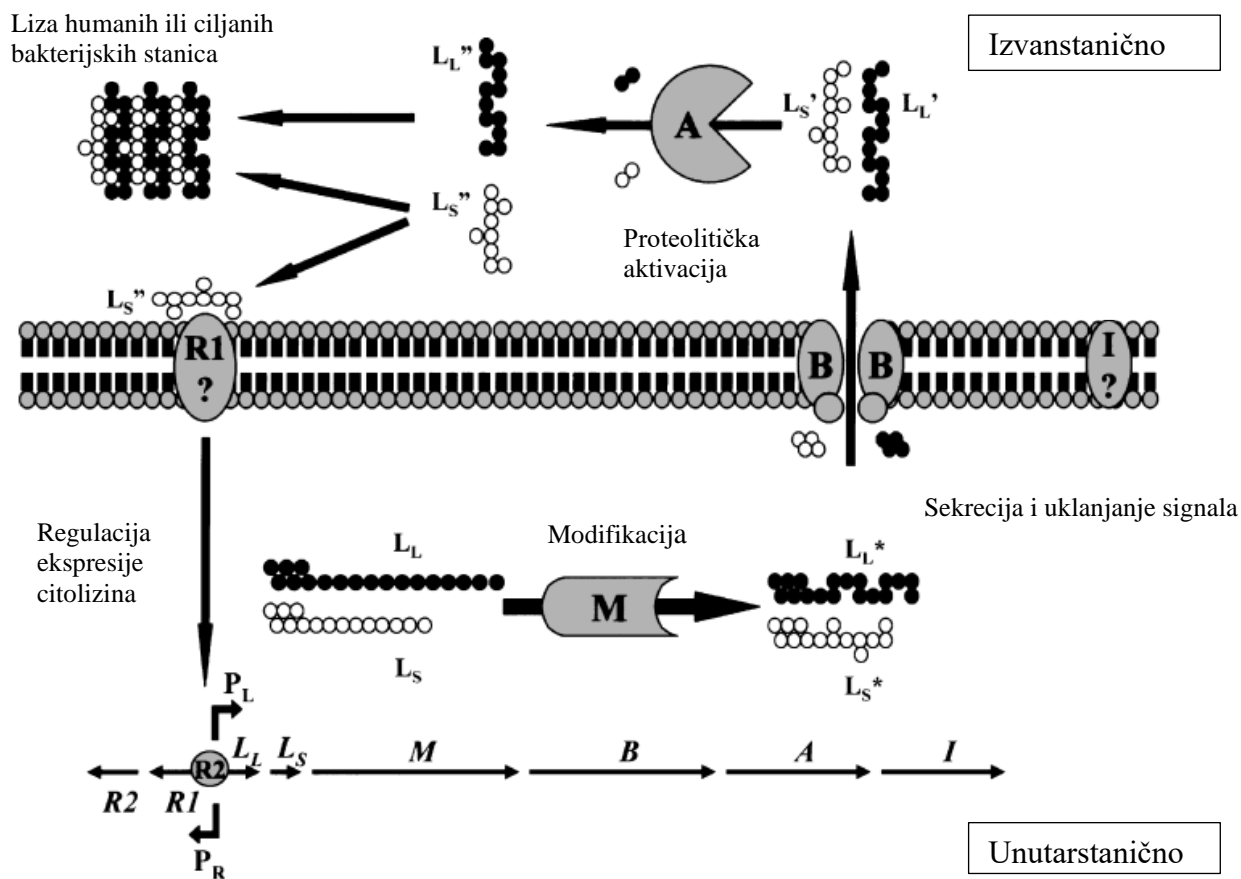
1.6. Hemoliza

Hemolizini, koji se smatraju važnim faktorom virulencije, su pora formirajući egzotoksini koje proizvode različite bakterijske vrste, a spadaju u skupinu lanbiotika (Van Tyne, 2013). Uzrokuju oštećenje stanične membrane, lizu stanica kao i uništavanje susjednih stanica i tkiva kako bi se osigurale hranjive tvari, od kojih je najbitnije željezo, za bakterije koje proizvode toksine (Mogrovejo i sur., 2020).

Prve poznate studije o citolizinu bile su provedene 1934. godine kada su se sojevi *Enterococcus faecalis* koji su pokazivali hemolizu na krvnom agaru uzgajali na standardnom laboratorijskom tekućem mediju i nije bila detektirana hemolitička aktivnost. Ovakav rezultat pokusa bi upućivao na to da se radi o pseudohemolizinu. Međutim kako se tijekom godina saznalo mnogo više o citolizinu i njegovim molekularnim svojstvima, može se reći da je fenomen pseudohemolizina vjerojatno rezultat formiranja visoko netopljivih kompleksa podjedinica citolizina u tekućoj kulturi. Zatim je kreiran medij koji podržava hemolitičku aktivnost te je na njemu bilo vidljivo da su neki eritrociti osjetljivi na hemolizu posredovanu citolizinom, dok neki drugi nisu. Osjetljivi su posebice ljudski, konjski, kravljji i zečji dok ovčji i kozji nisu. Veća osjetljivost navedenih vrsta se objašnjava time što je prisutna viša razina fosfatidilkolina u vanjskom sloju membrana eritrocita što sugerira da fosfatidilkolin može poslužiti kao preferirana meta na površini eritrocita (Coburn i Gilmore, 2003).

Neki sojevi *E. faecalis* sadrže citolizin operon koji se nalazi na feromon-odgovarajućem plazmidu i na otocima patogenosti na kromosomu. Osim citolizina, virulentni čimbenici koji su također ukodirani unutar otoka patogenosti su površinski adhezin, površinski protein, agregacijska supstancija i ESP koji se pokazao bitnim u kolonizaciji mokraćne cijevi. Raznim metodama je otkriveno i karakterizirano 8 gena operona citolizina i oni su definirani kao *cylR1*, *cylR2*, *cylL_L*, *cylL_S*, *cylM*, *cylB*, *cylA* i *cylI* (Coburn i Gilmore, 2003).

Geni *cylL_L* i *cylL_S* kodiraju za veliki i mali peptid što zajedno čini litičku komponentu, a *cylA* kodira aktivatorsku komponentu (Coburn i Gilmore, 2003).



Slika 1. Prikaz modela za ekspresiju citolizina *E. faecalis*. *cylL_L* je sintetiziran kao prekursor od 68 aminokiselina i *cylL_S* kao prekursor od 63 aminokiseline. Zatim slijedi post-translacijska modifikacija preko produkta *cylM* gena pri čemu se dobije *cylL_L** i *cylL_S**. Nakon modifikacije, obje podjedinice se sekreniraju i procesuiraju preko *cylB*. Rezultati su *cylL_L'* i *cylL_S'*. Nakon što obje podjedinice izađu izvan stanice, identičan slijed od 6 aminokiselina se uklanja s N-kraja svake podjedinice, a to provodi *cylA* i nastaju aktivne toksične podjedinice *cylL_L''* i *cylL_S''*. Gen *cylI* pruža zaštitu. Regulacija ekspresije citolizina je ovisna o produktima *cylR1* i *cylR2*. Gen *cylL_S''* je pokazao da ima signalnu moć koja rezultira autoindukcijom citolizin operona preko novih *quorum-sensing* mehanizama (preuzeto i prevedeno prema Coburn i Gilmore, 2003 uz dobivenu licencu).

Tablica 4. Doprinos hemolizina *E. faecalis* virulenciji (Van Tyne i sur., 2013)

Vrsta infekcije	Učinak citolizina
Bakterijemija u čovjeka	Citolizin čini infekciju pet puta akutno smrtonosnijom
Zečji endoftalmitis	Citolizin čini infekciju akutno uništavajućom za retinu i ostale očne strukture te otpornom na terapiju antibiotikom
Mišja intraperitonealna infekcija	Citolizin čini infekciju sto puta akutno smrtonosnijom
Zečji endokarditis	Citolizin čini infekciju akutno smrtonosnom u sinergiji sa supstancijom zgrušavanja
<i>C. elegans</i> ingestacija	Citolizin čini infekciju akutno smrtonosnom nakon ingestije

1.7. Osjetljivost na vankomicin

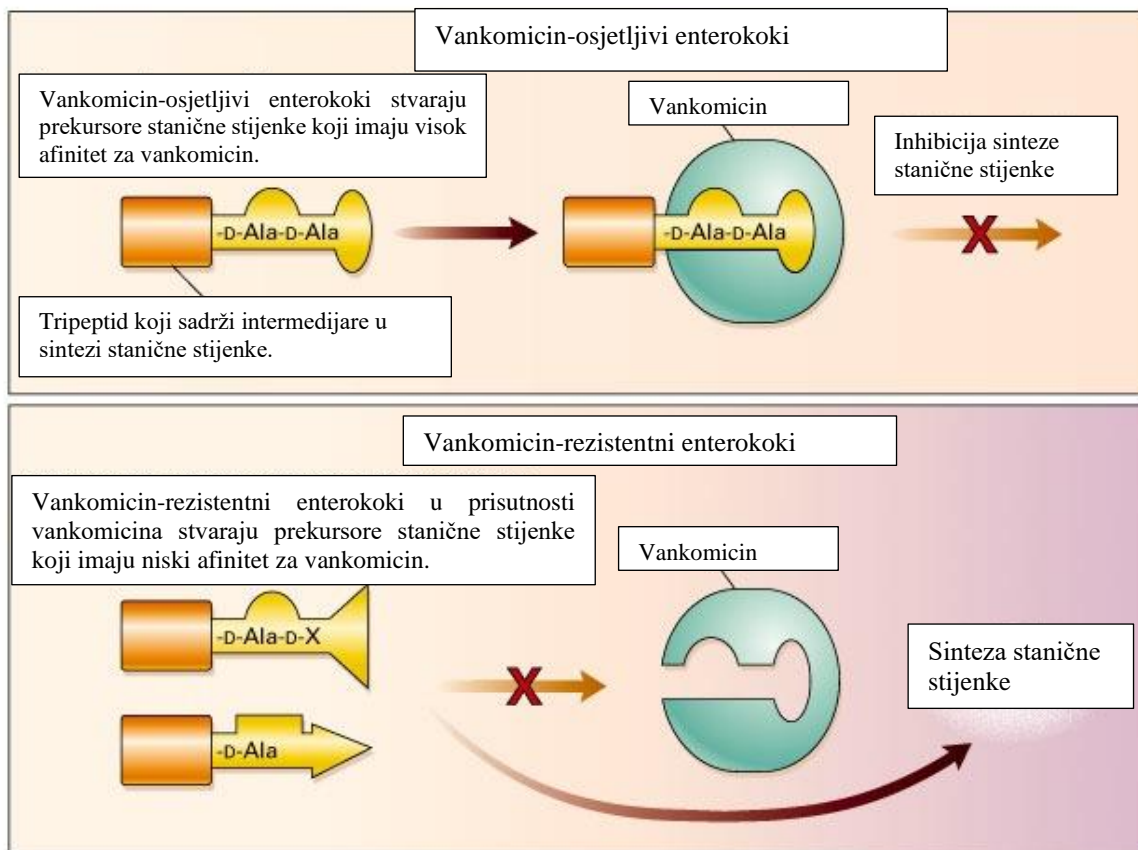
Od svih spomenutih rezistencija, najvažnija je rezistencija na vankomicin (VRE). Prvi puta je definirana 1933. godine u životinja koje su uzimale avoparcin (Said i sur., 2022).

Do rezistencije na vankomicin može doći zbog prethodne ekspozicije terapiji antibioticima kada je narušena crijevna mikrobiota posebice ako su korišteni cefalosporini ili upravo vankomicin. Rezistencija se također može steći njihovom sposobnošću stjecanja i prijenosa mobilnih genetskih elemenata koji su povezani s rezistencijom, a uključuje različite mehanizme kao što su plazmidi, transpozoni i konjugacije (Said i sur., 2022).

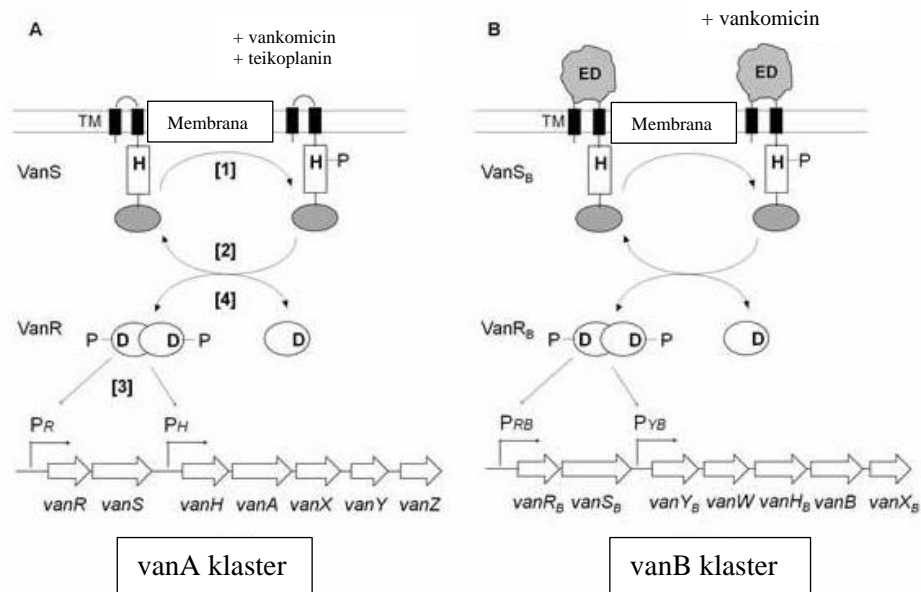
Pacijenti koji se nalaze u intenzivnim jedinicama, koji su na hemodijalizi, imaju dijabetes, tumor ili neku drugu bolest zbog koje spadaju u skupinu imunokompromitiranih osoba, imaju veće predispozicije za dobiti infekciju vankomicin-rezistentnim enterokokom (Said i sur., 2022).

Vankomicin-rezistentni enterokoki stvaraju modificirane prekursore peptidoglikana u kojem D-Ala-D-Ala terminalni dio biva promijenjen tako da umjesto posljednjeg alanina dođe laktat ili serin. Takva zamjena dovodi do smanjenja afiniteta vezanja antibiotika za prekursore peptidoglikana. Novostvoreni modificirani prekursori mogu i dalje poslužiti kao supstrati za sintezu stanične stijenke kako bi došlo do izgradnje nefunkcionalnog peptidoglikana umjesto normalnog funkcionalnog. Kapacitet enterokoka da proizvedu glikopeptid-rezistentne peptidoglikan prekursore je ukodiran preko operona za rezistenciju koji se nalaze na mobilnim genetičkim elementima čime se onda omogućuje prijenos na inače vankomicin-osjetljive bakterije. Postoje neki specifični tipovi rezistencije koji su ukodirani u kromosomima kao dio genoma nekih određenih enterokoka (Kristich i sur., 2014).

Ukupno je opisano 9 genskih klastera u rezistenciji na glikopeptide kod enterokoka koji se razlikuju i genetski i fenotipski, kao i po mjestu gdje se nalaze. Vankomicin genski klasteri kodiraju za više funkcija. Prva od njih je regulacija, dvokomponentni signalni transdukcijski sistem koji osjeća prisutnost glikopeptida i aktivira ekspresiju gena za rezistenciju u inducibilnim vankomicin tipovima. Iduća uloga je kodiranje za enzime koji stvaraju modificirane prekursore peptidoglikana uključujući i one koji služe za zamjenu alanina s laktatom ili serinom, kao i one ligaze koje povezuju alanin s laktatom ili serinom. Još jedna poznata uloga je kodiranje D,D-karboksipeptidaze koja eliminira nemodificirani prekursor peptidoglikana. Vankomicin klasteri su dobili imena prema ligazama za koje kodiraju : VanA, VanB, VanC i tako dalje. Najčešći među kliničkim izolatima su VanA i VanB (Kristich i sur., 2014).



Slika 2. Prikaz mehanizma kojim se odvija djelovanje vankomicina u osjetljivih vrsta enterokoka kao i rezistentnih (preuzeto i prevedeno prema Murray, 2000, autorska prava Massachusetts Medicinskog Društva).



Slika 3. Prikaz regulacije rezistencije na vankomicin. Preko 2 transmembranska segmenta su Van S/S_b senzorne kinaze usidrene u citoplazmatskoj membrani. VanS može primati aktivatorske signale u ili neposredno pored membrane, sadrži kratku izvanstaničnu petlju. VanS_b sadrži veliku izvanstaničnu domenu koja služi za prepoznavanje liganda. U prisutnosti glikopeptida vankomicina dolazi do aktivacije kinaze i ATP-ovisne autofosforilacije na histidinskom kraju [1]. Takva fosforilirana grupa se prenosi na VanR/VanR_b [2] čemu slijedi dimerizacija i vezanje za DNA te aktivacija transkripcije preko 2 promotora [3]. Ako u nekom slučaju nema stimulirajućeg antibiotika, tada VanS/VanS_b služi kao obična fosfataza koja osigurava da VanR/VanR_b ostane u inaktivnom stanju [4].
(preuzeto i prevedeno prema Kristich i sur., 2014 uz licencu Creative Commons)

VanA pruža visoku stopu rezistencije na vankomicin i teikoplanin i ukodiran je na transpozonomima te uključuje 7 okvira za čitanje koji su transkribirani iz 2 različita promotora. Preko VanR koji je regulator odgovora te VanS koji je senzorna kinaza, ukodiran je regulatorni aparat te su oba transkribirana od strane zajedničkog promotora. Ostali geni su transkribirani od strane drugog promotora. Genski produkti odgovorni za produkciju ili modifikaciju peptidoglikan prekursora uključuju VanA koji ima ulogu ligaze formirajući D-Ala-D-Lac dipeptid te VanH dehidrogenazu koja služi za pretvorbu piruvata u laktat. Za eliminaciju pravilno stvorenih prekursora služi VanX koji "cijepa" D-Ala-D-Ala i VanY (D,D-karboksipeptidaza). Također je prisutan VanZ međutim njegova uloga nije u potpunosti razjašnjena (Kristich i sur., 2014).

VanB pruža umjerenu do visoku rezistenciju na vankomicin, bez utjecaja na teikoplanin. Stečena je u kromosomu domaćina ili na transpozonima koji se pojavljuju na plazmidima. Kao i VanA, genska organizacija im je slična tako što sadrži dva promotora koja transkribiraju 7 okvira čitanja. VanB kodira dvokomponentni sistem VanR_b i VanS_b i takav signalni sistem je drugačiji od onog prikazanog u VanA. VanB kodira homologe VanH i D-Ala-D-Ala ligaze, kao i peptidaze VanX i VanY. Kako u VanA postoji VanZ kojem uloga nije razjašnjena, tako i u VanB umjesto VanZ postoji VanW čija uloga u rezistenciji također nije potpuno poznata (Kristich i sur., 2014).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Rod enterokoka sve je značajniji u vidu infekcija jer vrlo brzo nakon primjene novog antibiotika dolazi do nastanka rezistencije. Nulta hipoteza je da nakon statističke obrade podataka postoje fenotipske razlike između sojeva bakterija vrste *Enterococcus faecalis* izoliranih iz različitih okruženja. Bitno je steći uvid u trenutno stanje što se tiče karakterizacije virulentnih čimbenika kako bi se adekvatno prilagodila terapija koja mora biti učinkovita.

Istraživanja su se provodila u *in vitro* uvjetima iz 3 izvora i s nasumično odabranih 30 sojeva iz svakog izvora (ukupno N=90) :

- a) *E. faecalis* iz bolničkog izvora,
- b) *E. faecalis* iz uzorka hrane,
- c) *E. faecalis* iz uzorka otpadnih voda.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

Uzorci su sakupljeni u periodu od deset godina, od 2012. do 2022. godine. Radi se o kliničkim uzorcima iz krvi, stolice, urina, rektalnih i perianalnih briseva, kao i briseva promjena na koži prikupljenih iz Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Uzorci iz hrane i otpadnih voda su dobiveni iz okolišnih briseva i voda iz Zavoda za mikrobiologiju, Hrvatskog Zavoda za javno zdravstvo te Hrvatskog veterinarskog instituta.

Etičko odobrenje je dobiveno od Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Hrvatskog Zavoda za javno zdravstvo i Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (643-02/22-03/01, 251-62-03-22-38).

Tijekom sakupljanja bakterijske kulture su bile čuvane u sustavu Microbank (Pro-Lab Diagnostics) na -18°C.

3.2. Izolacija i identifikacija

Izolati iz mikrobanke su uzgajani na čvrstom mediju Kanamicin Eskulin Azid Agar (KEA), (Liofilchem) i Triptikaza Soja Agar (TSA), (Liofilchem). Inkubacija se provodila u aerobnim uvjetima na temperaturi od 35-37°C/24-48h.

Identifikacija se provodila :

- a) morfološkim proučavanjem (rast na žućnom eskulin agaru – okrugle, bijele ili sive kolonije 1-2 mm u promjeru, okružene crnim zonama)
- b) aktivnošću katalaze (negativna)
- c) bojanje po Gramu (gram-pozitivni koki, u parovima ili kratkim lancima)
- d) BBL Crystal GP ID panel (Becton, Dickinson and Company) (GRAM-POSITIVE ID KIT, Rev. 7/02 (PI 5/99))

Test inokulum je pripremljen iz fluida inokoluma i bunari mikrotitarske pločice su napunjeni. Nakon inkubacije provedeno je ispitivanje promjene boje ili prisutnosti fluorescencije kao rezultat metaboličke aktivnosti mikroorganizama. Rezultati 29 reakcija su pretvoreni u deseteroznamenasti profilni broj koji je korišten za identifikaciju.

Identifikacija na temelju soja je provedena s Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) s MALDI Biotyper 3.0 softverom (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Korištena je metoda direktne kolonije. Nakon noćne inkubacije u BHIB (engl. *Brain Heart Infusion Broth*), enterokoki su kultivirani na selektivnom (KEA) i neselektivnom (TSA) agaru, inkubirani na temperaturi od 35-37°C/24-48h.

Kolonije bakterijskog izolata s mikrotitarskih pločica su nanese na MALDI pločicu i prekrivene s 1 µL HCCA otopinom (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) te osušene na zraku. Pločice su zatim stavljene u instrument, očitani su spektri i uspoređeni s bazom podataka (MALDI Biotyper software). Identifikacijom je dobiven brojčani raspon povezan s kategorijom dosljednosti (A-C). Raspon od 2,00-3,00 predstavlja visoku dosljednost, 1,70-1,99 nisku dosljednost te u 0,00-1,69 nije moguće identificirati mikroorganizme.

Kalibracija je napravljena sa standardom *Escherichia coli* (Bruker Daltonics). Pouzdanost identifikacije MALDI Biotyper sustava je predstavljena preko bodova. Vrijednost logaritma rezultata $\geq 2,00$ ukazuje na identifikaciju na temelju soja, dok vrijednost između 1,70 i 2,00 ukazuje na identifikaciju na temelju gena (Stępień-Pyśniak i sur. 2017). Rezultati analize su pokazali vrijednosti logaritma rezultata $\geq 2,00$, također u intervalima od 1,70 do 1,99, ali za neke su rezultati i manji od 1,70. ATCC 29212 *Enterococcus faecalis* je korišten kao pozitivna kontrola. Svako ispitivanje je provedeno u triplikatu (Wu X i sur., 2021; Fang i sur., 2012).

3.3. Hidrofobnost stanične površine

Mjerila se optička gustoća bakterijske suspenzije prije i nakon miješanja sa ksilenom i računao postotak adherencije što se naziva indeks hidrofobnosti (%HFI – mjera afiniteta bakterija za ksilen). Nakon dvadesetčetverosatne inkubacije enterokokne kulture su suspendirane u 0,9% natrijevom kloridu i mjerila se optička gustoća (A_0). Zatim se dodao ksilen (1,7 mL) u suspenziju, vorteksiralo se točno dvije minute i nakon separacije na sobnoj temperaturi se mjerila optička gustoća vodene faze (A). Izračunao se indeks hidrofobnosti (HFI%) koristeći vrijednosti A_0 i A prema formuli :

$$HFI (\%) = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \times 100 \quad (\text{Dec i sur., 2016})$$

Prema Stępień-Pyśniak i suradnicima iz 2019. godine, hidrofobno bi bilo ako je $HFI \geq 50\%$.

Tahmourespur i suradnici su 2008. podijelili hidrofobne grupe na :

- a) Visoko hidrofobne ($HFI > 70\%$)
- b) Umjereno hidrofobne ($HFI 50-70\%$)
- c) Nisko hidrofobne ($HFI < 50\%$)

3.4. Sposobnost stvaranja biofilma

Metoda određivanja biofilma se provodila kako bi se dobila sposobnost stvaranja biofilma. 20 μL prekonoćne kulture svakog soja enterokoka u TSB (engl. *Tryptic Soy Broth*) (Liofilchem) suplementiranog s 1% glukozom (0,5 McFarland, 10^8 CFU/mL) se nanosilo na mikrotitarske pločice (engl. *Sterile flat-bottomed 96-well poly styrene microtitre plates*) čije su jažice napunjene sa 180 μL TSB. Mikrotitarske pločice su inkubirane na 37°C 24 sata. Nakon inkubacije medij je odbačen i pločice su ispirane s PBS-om (engl. *Phosphate-buffered saline*). Kako bi se uklonile neadherentne stanice ovaj se postupak ponovio tri puta. Nakon prekonoćnog sušenja, pločice su se bojale s 200 μL 1% kristal-violet otopinom. Nakon 15 minuta pločice su isprane vodovodnom vodom i osušene. 200 μL 96% etanola je dodano i nakon 30 minuta je mjerena optička gustoća (OD_{570}). Te vrijednosti predstavljaju produkciju biofilma u svakoj pojedinoj jažici. Dobivene vrijednosti su dalje izražene kao OD (engl. *Optical density*) odnosno kao njihova srednja vrijednost što je napravljeno i za negativnu kontrolu koja je bitna kasnije u postupku. Računala se granična vrijednost produkcije biofilma ODC (engl. *Optical density cut-*

off value) tako što su se tri standardne devijacije negativnih kontrola dodale srednjoj vrijednosti (OD) negativnih kontrola. Kako bi se odredila pojedina kategorija uspoređivani su OD sojeva i ODc negativnih kontrola. Prema rezultatima sojevi su se podijelili na jake produktore biofilma, umjerene produktore, slabe produktore i neproduktore. Optička gustoća je mjerena na valnoj duljini od 570 nm. Sva ispitivanja su provedena u triplicatu, a negativna kontrola je 200 μ L neinokuliranog TSB medija. Za svaki soj je oduzeta optička gustoća prazne jažice od izmjerene vrijednosti (Stepanović i sur., 2007).

Tablica 5. Kategorijalni prikaz produktora biofilma prema Stępień-Pyśniak (2019)

KAT I (ne produciraju biofilm)	$OD < ODc$
KAT II (slabi produktori biofilma)	$ODc < OD < 2ODc$
KAT III (umjereni produktori biofilma)	$2ODc < OD < 4ODc$
KAT IV (jaki produktori biofilma)	$OD > 4ODc$

Legenda : OD = srednja vrijednost produkcije biofilma u jažici; ODc = granična vrijednost produkcije biofilma.

Tablica 6. Kategorijalni prikaz produktora biofilma prema Andersonu (2016)

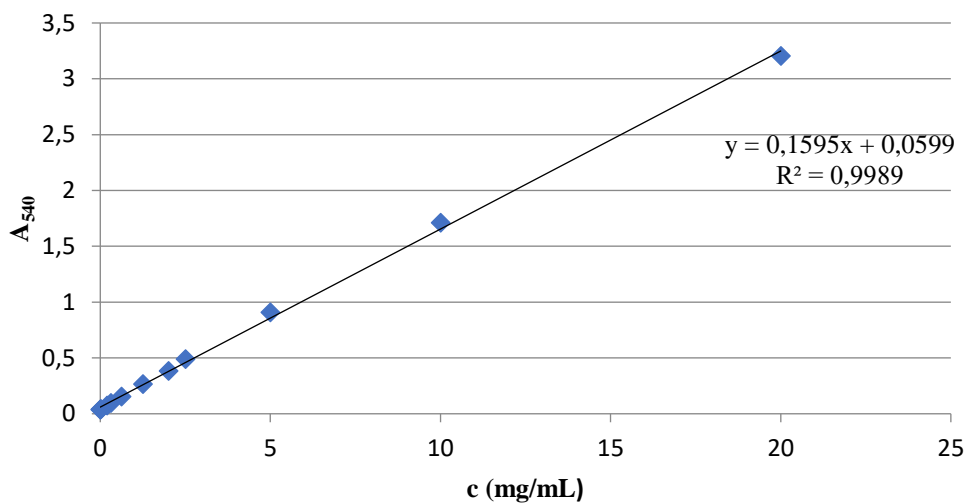
C1 (ne produciraju biofilm)	$OD < ODc$
C2 (umjereni produktori biofilma)	$ODc < OD < 3ODc$
C3 (jaki produktori biofilma)	$OD > 3ODc$

Legenda : OD = srednja vrijednost produkcije biofilma u jažici; ODc = granična vrijednost produkcije biofilma

3.5. β -hemolitička aktivnost

Hemolitička aktivnost se određivala nanošenjem enterokoknih kultura na krvni agar s 5% v/v sterilnom konjskom krvlju (bioMerieux, Francuska) nakon čega su ploče inkubirane na 35-37°C/24-48 h u aerobnim uvjetima. Nakon inkubacije u obzir su se uzele kolonije koje su oko sebe imale bistru zonu što se definiralo kao β -hemolitički pozitivni soj, a one koje su imale zelenkastu zonu (α -hemoliza) ili nisu imale zonu (γ -hemoliza) su definirane kao β -hemolitički negativne. Vrsta *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se koristila kao pozitivna kontrola. Sve β -hemolitičke enterokokne kulture su uzete u daljnja istraživanja ispitivanja hemolitičkog učinka na eritrocitima *ex situ* (hErc), izolirane iz svježe humane krvi 50-godišnjeg dobrovoljca. Izrađena je svježa 4% v/v otopina humanih eritrocita iz površinske heparizirane krvi u PBS-u, pH 7. Uzeto je 1 mL te otopine i pomiješano s 1 mL razrijeđenog inokuluma enterokoka s fiziološkom otopinom i stavljeno na inkubaciju 60 min na 37°C. Zatim je otopina stavljena u centrifugu (Tehtnica) na 1500 okretaja tijekom 3 minute. Nakon centrifugiranja bila su vidljiva 2 sloja pri čemu je donji sloj činio sediment humanih eritrocita. Uzeto je 100 μ L supernatanta i unijeto u mikrotitarske pločice ravnog dna i mjerena je apsorbancija na valnoj duljini od 540 nm. Za pozitivnu kontrolu je uzeta 1% v/v otopina Triton X-100 (Merck) sa 4% v/v humanih eritrocita slijedeći isti postupak kao i sa enterokokima. Apsorbancija je mjerena u triplikatu te je izračunata srednja vrijednost od koje je oduzeta apsorbancija prazne jažice. Dobivena srednja vrijednost je pomnožena sa 100 i dobiven je hemolitički indeks izražen u postotku (HemI%). Rezultati su izraženi također kao ekvivalenti goveđeg hemoglobina (GHE) gdje se uzimala različita koncentracija goveđeg hemoglobina i mjerila apsorbancija. Na temelju toga je izrađena kalibracijska krivulja (Slika 4.) i dobivena je jednadžba pravca. Kako bi se dobio ekvivalent goveđeg hemoglobina, u tu jednadžbu je uvrštena srednja vrijednost apsorbancije svakog soja i izračunom jednadžbe s jednom nepoznicom dobila se ekvivalentna koncentracija goveđeg hemoglobina. Mjerenja su izvedena na 540 nm (Ljoljić Bilić i sur., 2022; Semedo i sur., 2003). Hemolitički učinak izražen je kao HemI%.

Hemoglobin (goveđi)



Slika 4. Kalibracijska krivulja korištena za iskazivanje hemolitičke aktivnosti *E. faecalis* na osnovi goveđeg hemoglobina.

3.6. Osjetljivost na antibiotike -fenotipski pristup

Koristila se disk-difuzijska metoda prema EUCAST standardnom testiranju na Mueller-Hinton agaru (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Clinical breakpoint Tables v.12.0). Inokulum gustoće 0,5 McFarland nanešen je na površinu MH agara na koju su također stavljeni diskovi s antibiotikom, nakon bakterija. Od antibiotika su stavljeni ampicilin (2 µg), gentamicin HLAR (30 µg), ciprofloksacin (5 µg) i vankomicin (5 µg) (Mast Group Ltd., UK). Petrijeve zdjelice su inkubirane na 35±1°C. Prema izmjerenim dijametrima zone inhibicije i prema EUCAST Clinical breakpoint Tables v. 12.0, koje vrijede od 2022-01-01(*), utvrdilo se je li soj osjetljiv (S) ili rezistentan (R) na ispitivane antibiotike.

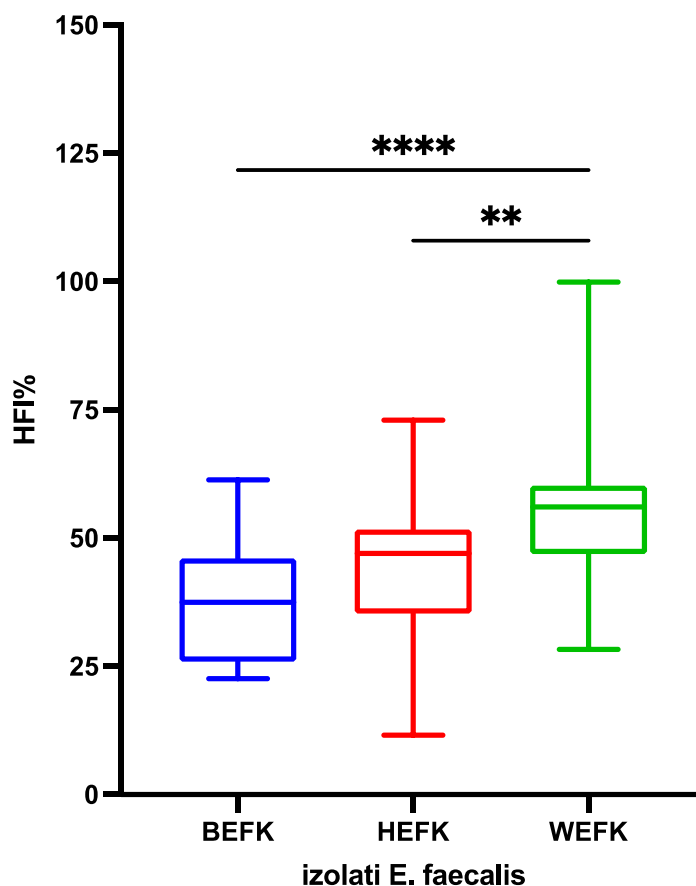
3.7. Statistička obrada podataka

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija n nezavisnih mjerenja. Za usporedbu rezultata između mjesta izolacije je korišten ANOVA test u sklopu programa za statističku obradu podataka Prism GraphPad (GraphPad Software, Inc., San Diego, SAD; www.graphpad.com).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati mjerenja hidrofobnosti stanične površine

Indeks hidrofobnosti kao rezultat istraživanja izražen kao postotak (%) prema mjestu izolacije sojeva *Enterococcus faecalis* prikazan je preko dvije metode vidljive na Slici 5. te Tablici 7.



Slika 5. Prikaz rezultata mjerenja hidrofobnosti stanične površine (izražene kao indeks hidrofobnosti) prema mjestu izolacije vrste *E. faecalis*

Legenda : BEFK = sojevi *E. faecalis* iz bolničkog izvora, HEFK = sojevi *E. faecalis* iz hrane, WEFK = sojevi *E. faecalis* iz otpadnih voda, HFI% = indeks hidrofobnosti: **= $p < 0,0044$; ****= $p < 0,0001$

Na slici 5. su prikazani na osi apscisa izvori bakterije *E. faecalis* dok ordinata predstavlja indeks hidrofobnosti (HFI%). Dobiveni rezultati prema mjestu izolacije su :

- a) **BEFK** – ukupno je mjerena hidrofobnost 25 sojeva bolničkog izvora, najmanji postotak hidrofobnosti iznosi 22,60%, a najveći 61,40%. Polovica rezultata se nalazi između 25,90% i 46,05%. Medijan iznosi 37,50%. Ova skupina ima najveću varijabilnost podataka.
- b) **HEFK** – mjerena je hidrofobnost 29 sojeva te je iz Slike 5. vidljivo da ima značajnije veći raspon rezultata od bolničkih izolata pri čemu minimum iznosi 11,60%, a maksimum 73,00%. Polovica rezultata se nalazi između 35,30% i 51,70%. Medijan iznosi 47,00%.
- c) **WEFK** – mjerena je hidrofobnost 29 sojeva i prema Slici 5. ova skupina ima najizraženija svojstva hidrofobnosti s maksimumom od 99,90% i minimumom od 28,30%. Polovica rezultata se nalazi između 46,90% i 60,25%. Medijan iznosi 56,10%. Ova skupina ima najmanju varijabilnost podataka.
- d) **BEFK i HEFK** – srednja vrijednost BEFK iznosi 37,75%, a HEFK 42,40%. Pošto je $p = 0,6442$ i veći od α koji iznosi 0,05, rezultati nisu statistički značajni i nema dokaza da postoji razlika između sojeva uspoređivanih iz različitih izolacijskih mjesta.

Tablica 7. Prikaz podjele hidrofobnosti sojeva prema Tahmourespur i suradnicima iz 2008. godine.

MJESTO IZOLACIJE	NISKA HIDROFOBNOST (HFI < 50%)	UMJERENA HIDROFOBNOST (HFI 50-70%)	VISOKA HIDROFOBNOST (HFI > 70%)
BEFK (N=29)	24 (82,76%)	5 (17,24%)	0 (0,00%)
HEFK (N=30)	19 (63,33%)	10 (33,33%)	1 (3,33%)
WEFK (N=30)	10 (33,33%)	19 (63,33%)	1 (3,33%)

Legenda : BEFK = bolnički izolirani *E. faecalis* sojevi; HEFK = sojevi *E. faecalis* izolirani iz hrane; WEFK = sojevi *E. faecalis* izolirani iz otpadnih voda; HFI = indeks hidrofobnosti (%)

Iz tablice 7. se može uočiti kako u skupini bolničkih izolata prevladavaju sojevi niske hidrofobnosti s udjelom od 82,76%, dok je umjereno hidrofobnih samo 17,24%. U ovoj kategoriji nema visoko hidrofobnih sojeva. U skupini izolata iz hrane se vidi da je 63,33% sojeva niske hidrofobnosti koji su također u prednosti, 33,33% su umjereno hidrofobni, a svega 3,33% pokazuju visoku hidrofobnost. Posljednja skupina izolata iz otpadnih voda pokazuje

najbolje rezultate s 33,33% sojeva niske hidrofobnosti, čak 63,33% sojeva umjerene hidrofobnosti i tek 3,33% sojeva visoke hidrofobnosti. Može se zaključiti da je skupina sojeva izoliranih iz otpadnih voda na prvom mjestu što se tiče hidrofobnosti stanične površine, dok skupine BEFK i HEFK pokazuju slabiju hidrofobnost i među njima nema značajne razlike što je opisano na stranici prije.

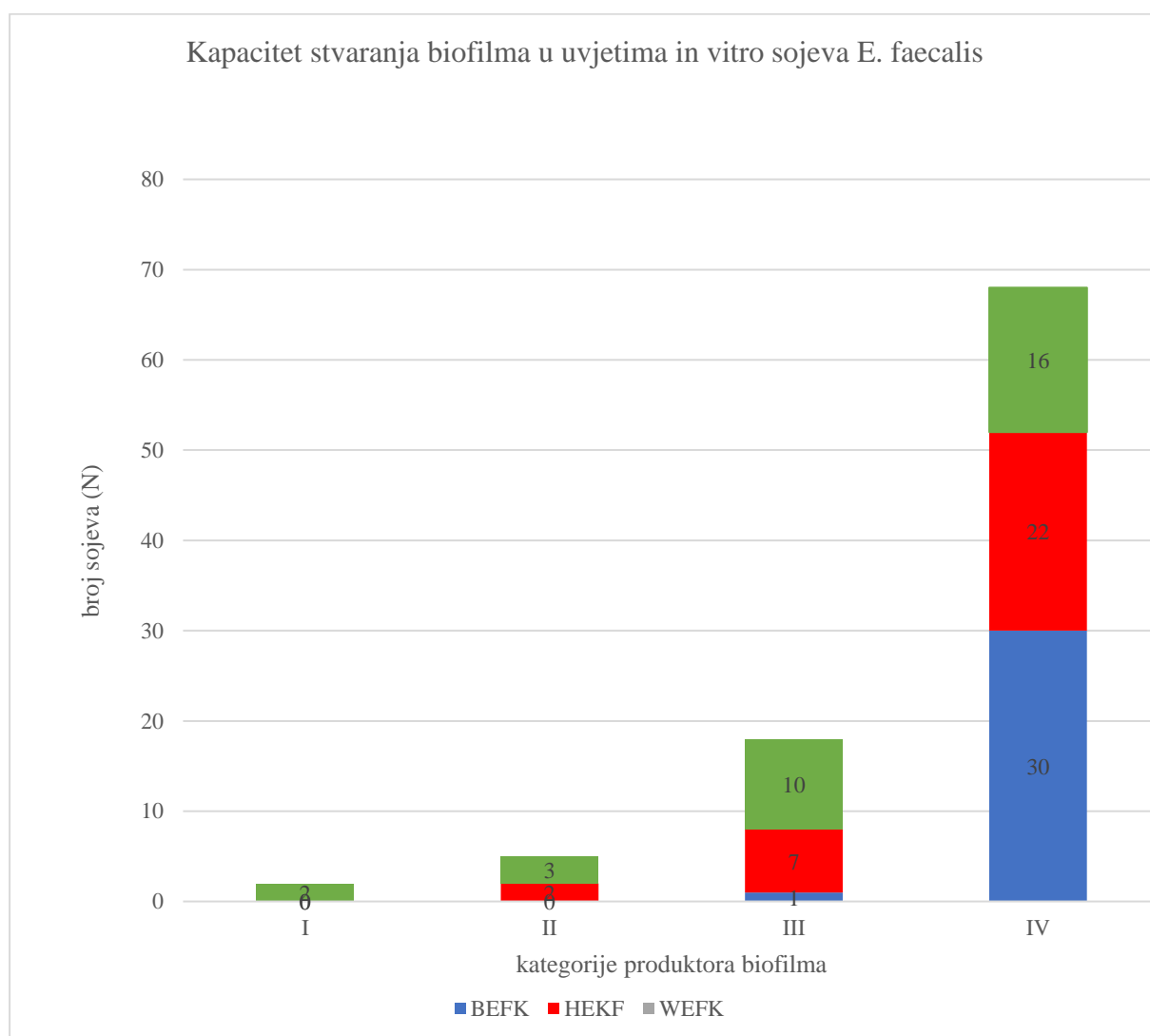
Prema Stępień-Pyśniak i sur. (2019), hidrofobno bi bilo ako je HFI $\geq 50\%$. U grupi sojeva izoliranih iz bolničkog okruženja nalazi se 24% hidrofobnih sojeva. Među izolatima iz hrane našlo se 37,93% hidrofobnih sojeva te 68,97% iz otpadnih voda.

Joyanes i sur. su 1999. proveli istraživanje o virulentnim čimbenicima *E. faecalis* iz bolničkog izvora gdje su mjerili hidrofobnost stanične površine prema metodi Rosenberga i sur. (1980). Tri mililitra PBS (engl. *Phosphate-buffered saline*, pH 7,2-7,4) koji sadrži 10^9 CFU/mL (mjereno spektrofotometrijski, početna optička gustoća OD_I) se vorteksiralo jednu minutu s 0,25 mL *p*-ksilena zatim se ostavilo 30 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se faze razdvojile, nakon čega se mjerila optička gustoća vodene faze (konačna optička gustoća OD_F). Hidrofobnost površine se iskazala kao postotak prema formuli $SH=[1-(OD_F/OD_I)]\times 100$. U ispitivanje se uzelo 9 sojeva *E. faecalis* i 8 sojeva je pokazalo hidrofobnost površine manju od 29% osim jednog soja koji je pokazao 67%. Naši rezultati ispitivanja hidrofobnosti bolničkih izolata ukazuju na to da 8 od 25 sojeva (32%) imaju hidrofobnost nižu od 29%, a najviše rezultata se nalazi između 25,90% i 46,05%.

4.2. Rezultati mjerenja sposobnosti stvaranja biofilma

Ispitivanje sposobnosti stvaranja biofilma se provodilo prema postupku opisanom u Materijalima i metodama, a rezultati su prezentirani na tri načina prikazana u Tablici 8. i 9. te na Slici 6.

Tablica 8. Prikaz podjele kategorija prema sposobnosti stvaranja biofilma (Stępień-Pyśniak, 2019).

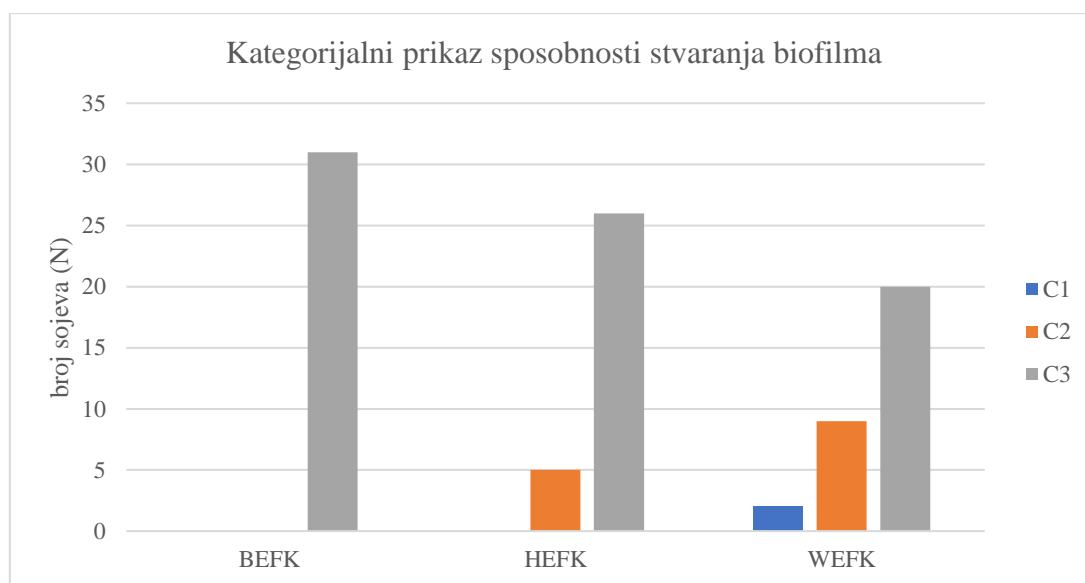


Prema provedenom mjerenju, od ukupno 31 soja iz svakog izvora vidljivo je da se u skupini bolnički izoliranih sojeva nalazi 1 soj koji spada u umjerene produktore biofilma te 30 jakih produktora od koji je jedan soj ATCC. U skupini sojeva izoliranih iz hrane nalaze se 2 slaba

produktora biofilma, 7 umjerenih od kojih je jedan ATCC, i 22 jaka produktora. U posljednjoj skupini koja je izolirana iz otpadnih voda se nalaze 2 soja koja ne produciraju biofilm, potom 3 koja su slabi produktori među koje spada i ATCC, zatim 10 koji spadaju u skupinu umjerenih produktora i konačno 16 sojeva koji su jaki produktori biofilma.

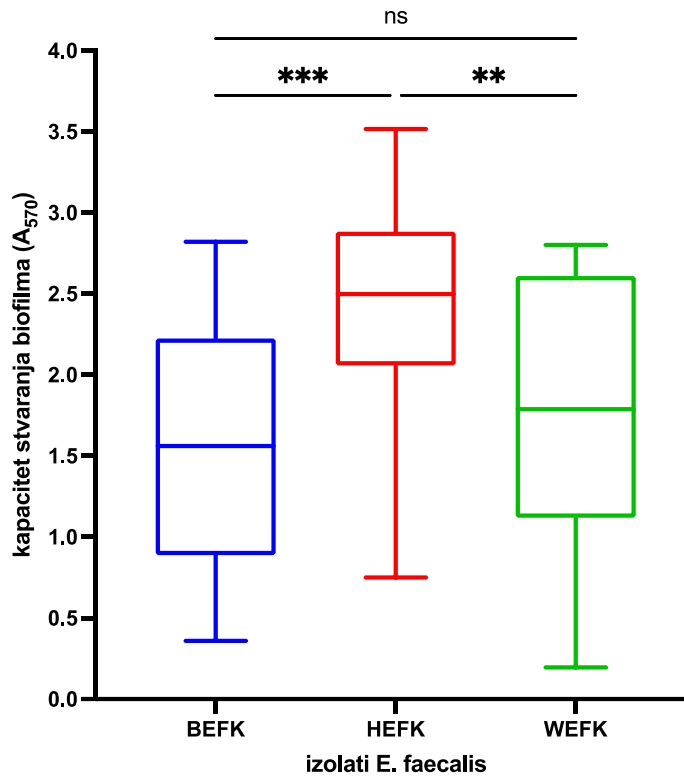
Iz dobivenih rezultata se zaključuje da su sojevi izolirani iz bolničkog izvora najjači produktori biofilma čemu slijede sojevi iz hrane, a posljednji i najslabiji produktori su sojevi izolirani iz otpadnih voda.

Tablica 9. Prikaz sposobnosti stvaranja biofilma prema Andersonu (2016)



Legenda : BEFK = *E. faecalis* sojevi izolirani iz bolničkog izvora; HEFK = sojevi *E. faecalis* izolirani iz hrane; WEFK = sojevi *E. faecalis* izolirani iz otpadnih voda; C1 = ne produciraju biofilm; C2 = umjereni produktori biofilma; C3 = jaki produktori biofilma

Prema dobivenim rezultatima istraživanja iz Tablice 9. vidljivo je da su svi sojevi izolirani iz bolničkih izvora jaki produktori biofilma (100%) uključujući i ATCC. U izolatima iz hrane također prevladavaju jaki produktori (83,87%) zajedno s ATCC, a uz njih se nalazi i umjereni (16,13%). Izolati iz otpadnih voda sadrže 64,52% jakih produktora, 29,03% umjerenih među kojima je i ATCC te 6,45% slabih produktora, a prema metodologiji Andersona (2016).



Slika 6. Rezultati ispitivanja kapaciteta stvaranja biofilma sojeva vrste *E. faecalis* iz različitih izvora.

Legenda : BEFK = sojevi *E. faecalis* iz bolničkog izvora, HEFK = sojevi *E. faecalis* iz hrane, WEFK = sojevi *E. faecalis* iz otpadnih voda, **= $p = 0.0059$; ***= $p = 0.0003$, ns = nije statistički značajno

Na osi apscisa su prikazani izolati *E. faecalis*, a na osi ordinata kapacitet stvaranja biofilma. Uzeto je 30 sojeva *E. faecalis* iz svakog izvora. Prema mjestu izolacije, dobiveni rezultati su :

- a) **BEFK** – vrijednosti se kreću od 0,359 do 2,821. Polovica rezultata se nalazi između 0,888 i 2,225. Medijan iznosi 1,562.
- b) **HEFK** – vrijednosti se kreću od 0,750 do 3,516. Polovica rezultata se nalazi između 2,059 i 2,884. Medijan iznosi 2,499. Ima najmanju varijabilnost podataka.
- c) **WEFK** – vrijednosti se kreću od 0,194 do 2,801. Polovica rezultata se nalazi između 1,118 i 2,608. Medijan iznosi 1,787. Ova skupina ima najveću varijabilnost podataka.
- d) **BEFK i WEFK** – srednja vrijednost BEFK iznosi 1,586, a WEFK 1,760. Pošto je α 0,05, a p vrijednost iznosi 0,6543, nema dokaza da postoje značajne razlike između bolničkih izolata i izolata iz otpadnih voda.

Prema rezultatima Slike 7. vidljivo je da su sojevi *E. faecalis* iz hrane najbolji produktori biofilma, dok sojevi iz bolničkog izvora i otpadnih voda nakon statističke obrade rezultata ne pokazuju značajne razlike.

Hashem Ya i sur. (2021) su proveli istraživanje o virulentnim čimbenicima bakterije *E. faecalis* među kojima je bila i sposobnost stvaranja biofilma. Koristili su 60 sojeva izoliranih iz kliničkog laboratorija koji potječu od pacijenata s urinarnim infekcijama. Sojevi su prekončno inokulirani na TSB (engl. *Trypticase Soy Broth*) koji sadrži 0,5% ili 1% glukoze i gustoća je namještena na 0,5 McFarlanda. Kulture s namještenom koncentracijom su ponovno razrijeđene s TSB-om. Mikrotitarske pločice su inokulirane s 200 μ L razrijeđenih kultura i svaki soj je nanesen u triplicatu. Negativna kontrola je TSB s 5% glukozom. Sadržaj pločica je odbačen nakon prekončne inkubacije i bunarčići su isprani fiziološkom otopinom tri puta te pušteni da se osuše. Za fiksaciju se koristio metanol. Fiksirane stanice su bojane s 1% w/v kristal-violet na 15 minuta prema metodi Christensen i sur. (1985) uz nekoliko modifikacija opisanih u radu Hashem i sur. (2021). Višak boje se uklonio ispiranjem te su se pločice ostavile da se osuše, čemu slijedi otapanje u ledenoj octenoj kiselini. Optička gustoća (OD) je mjerena na 545 nm.

Svi izolati su formirali biofilm. 37 izolata (62%) spada u jake produktore, 15 izolata (25%) u umjerene produktore i 8 izolata (13%) se klasificiraju kao slabi produktori. Jedan izolat je isključen jer je imao preširok raspon rezultata varirajući između umjerenog i jakog produktora.

Ova metoda je vrlo slična onoj koja je provedena u ovom radu stoga je moguće usporediti rezultate. Uzimamo u obzir rezultate dobivene podjelom sposobnosti stvaranja biofilma prema Stępień-Pyśniak (2019). 29 od 30 ispitivanih sojeva (96,67%) (isključujući ATCC) je pokazalo svojstva jakih produktora, a samo jedan soj je bio svrstan u umjerene produktore biofilma. Također, uzimajući u obzir da je uspoređivani rad koristio 60 sojeva, a naš samo 30, zaključujemo da su općenito bolnički izolati dosta dobri produktori biofilma s ponekim sojem bez produkcije.

Anderson i sur. (2016) su mjerili sposobnost stvaranja biofilma primjenjujući metodu Al-Ahmad i sur. (2014). Izolati su kultivirani u 5 mL TSB na 37°C preko noći. Nakon toga je namještena gustoća na otprilike 10^8 CFU/mL. Bunarčići mikrotitarske pločice su napunjeni sa 180 μ L svježeg TSB-a i 20 μ L kulture. Nakon inkubacije od 48 sati na 37°C, medij se odbacio i pločice su ispirane tri puta sa po 300 μ L PBS kako bi se uklonile bakterije koje se nisu adherirale. Pločice su zatim sušene na zraku i bojane s 0,1% kristal-violet na 10 minuta. Kako

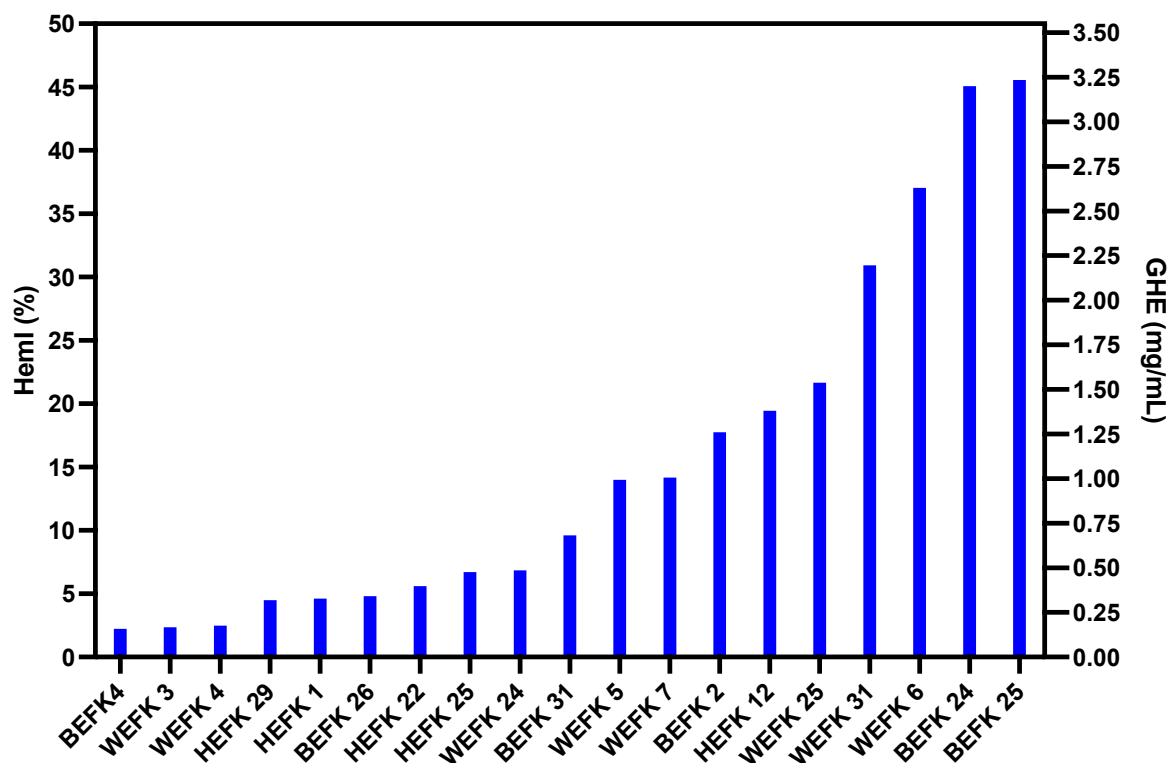
bi se uklonio višak boje, pločice su ispirane tri puta s 200 μ L destilirane vode. Nakon sušenja pločica na 60°C 10 minuta, 50 μ L etanola (99,9%) je dodano kako se bi se otopila boja. Mjerila se optička gustoća na 595 nm i sva mjerenja su provedena u kvadriplikatu. Definirane su tri kategorije sposobnosti stvaranja biofilma prema dvjema različitim ODc vrijednostima. Kategorije su : ne-produktor biofilma, umjereni produktor biofilma i jaki produktor biofilma (C1;C2;C3). Niska ODc vrijednost se odredila tako da su se tri standardne devijacije negativne kontrole dodale negativnoj kontroli, a visoka ODc se definirala kao 3 puta niska ODc.

Izolati iz hrane su pokazali najniži kapacitet za stvaranje biofilma sa 60,0% sojeva ne-produktora. 73,7% endodontskih izolata (od ukupno 30) su pokazali sposobnost stvaranja biofilma od kojih je 57,9% u skupini C2 i 15,8% u skupini C3. Većina kliničkih izolata su imali ili umjereni ili jaki kapacitet (73,3%) te su prikazali najveći postotak jakih produktora (20,0%) od ukupno njih 15. Također većina sojeva iz plaka i sline (od njih 37) su producirali biofilm, 64,9% su C2, a 5,4% su C3. Sveukupno 54,7% sojeva je pokazalo umjerenu sposobnost stvaranja biofilma dok 33,7% nije uopće produciralo biofilm.

Mogu se uspoređivati i bolnički izolati kao i oni iz hrane prema podjeli autora uspoređivanog rada. Svi naši sojevi izolirani iz bolničkog izvora spadaju u C3 kategoriju što se slaže s navedenim radom koji kaže da su upravo klinički izolati prikazali najveći postotak jakih produktora. U našim izolatima iz hrane također prevladavaju jaki produktori, čak 83,87%, dok u Andersonovu radu (2016) izolati iz hrane imaju 60,00% sojeva neproduktora.

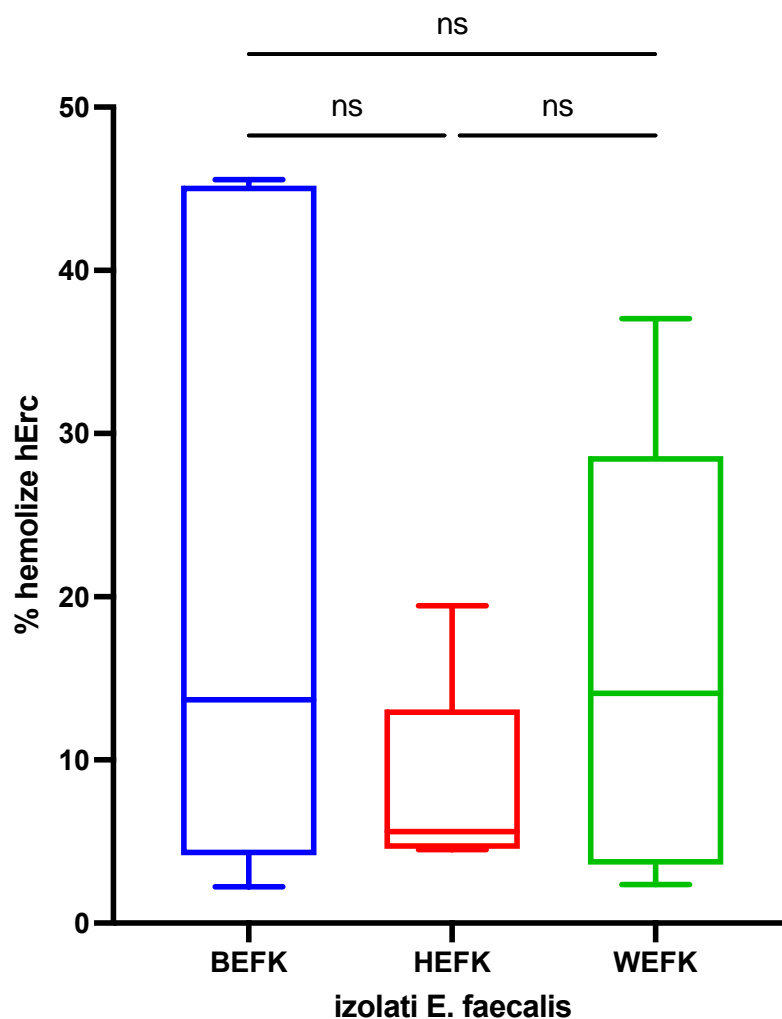
4.3. Rezultati mjerenja β -hemolitičke aktivnosti

β -hemolitička aktivnost bakterije *E. faecalis* iskazana kao ekvivalent goveđeg hemoglobina u rastućem smjeru prikazana je na Slici 7. dok je usporedba hemolitičke aktivnosti prema mjestu izolacije sojeva bakterije prikazana na Slici 8.



Slika 7. Raspodjela hemolitičkog učinka (HemI%) prema rastućim vrijednostima pojedinih sojeva u odnosu na GHE (mg/mL)

Smatra se da je hemoliza klinički značajna kada je koncentracija slobodnog hemoglobina $\geq 0,5$ g/L (Larrán i sur., 2022). Sojevima *E. faecalis* koji su pokazali hemolizu se GHE pruža od 0,515 mg/mL pa sve do 3,232 mg/mL.



Slika 8. Prikaz sposobnosti hemolize sojeva vrste *E. faecalis* iz različitih izvora izraženo u postotku

Legenda : BEFK = sojevi *E. faecalis* iz bolničkog izvora, HEFK = sojevi *E. faecalis* iz hrane, WEFK = sojevi *E. faecalis* iz otpadnih voda; hErc = humani eritrociti; ns = nije statistički značajno.

Na osi apscisa se nalaze izolati vrste *E. faecalis*, a na osi ordinata postotak hemolize humanih eritrocita. Na hemolitičku aktivnost je testirano ukupno 30 sojeva iz svakog izvora. Prema Slici 8., vidljivo je :

- a) **BEFK** – U ispitivanje je uzeto 6 hemolitički aktivnih sojeva iz bolničkog izvora. Najmanja vrijednost iznosi 2,23%, a najveća 45,56%. Polovica rezultata se nalazi između 4,16% i 45,20%. Medijan iznosi 13,69%. Ova skupina pokazuje najveću varijabilnost podataka.

- b) **HEFK** – U ispitivanje je uzeto 5 hemolitički aktivnih sojeva izoliranih iz hrane. Najmanja vrijednost iznosi 4,49%, a najveća 19,45%. Polovica rezultata se nalazi između 4,56% i 13,09%. Medijan iznosi 5,60%. Ova skupina pokazuje najmanju varijabilnost podataka.
- c) **WEFK** – U ispitivanje je uzeto 8 hemolitički aktivnih sojeva iz otpadnih voda. Najmanja vrijednost iznosi 2,36%, a najveća 37,05%. Polovica rezultata se nalazi između 3,58% i 28,62%. Medijan iznosi 14,09%.

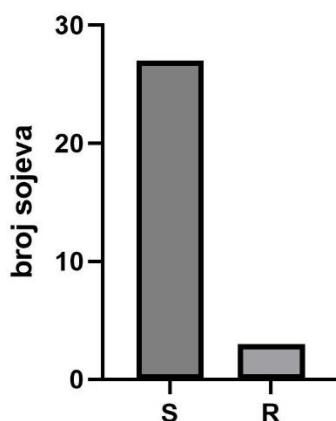
Hashem i suradnici su 2021. godine proveli istraživanje o virulentnim čimbenicima bakterije *E. faecalis* među kojima je bila i sposobnost hemolize. Uzeli su 60 sojeva iz kliničkih laboratorija koji su nađeni kod pacijenata s urinarnom infekcijom. Hemolitička aktivnost se procjenjivala kultivacijom izolata na krvnom agaru (Oxoid, UK) koji je suplementiran s 5% defibrinirane krvi. Nakon 24-satne inkubacije na 37°C promatrala se zona oko kolonija koja je ukazivala na hemolitičku aktivnost. Hemolitičku aktivnost (β -hemoliza) je pokazalo 20 sojeva od ukupno 60 (33%). U našem slučaju je od 30 sojeva uzetih iz bolničkog izvora 6 pokazalo hemolizu (20%), dakle manji postotak nego Hashemov.

Joyanes i suradnici su 1999. također proveli istraživanje o virulentnim čimbenicima među kojima su određivali koliko sojeva producira hemolizin. Od 9 ispitivanih sojeva iz bolničkih izvora, 4 ih je pokazalo ekspresiju hemolizina (44,44%), ali nisu išli u daljnje istraživanje što se tiče hemolitičkog indeksa. U odnosu na 20% hemolitičkih sojeva našeg istraživanja možemo zaključiti da je sposobnost hemolize dosta varijabilna, naš rezultat je najmanji u odnosu na 2 uspoređivana rada.

4.4. Rezultati mjerenja osjetljivosti na vankomicin

a) Osjetljivost sojeva *Enterococcus faecalis* iz bolničkog izvora na vankomicin

Prema rezultatima analize, vidljivo je na Slici 9. da su 3 soja rezistentna, a 27 osjetljiva što predstavlja 10,00% rezistentnih sojeva.

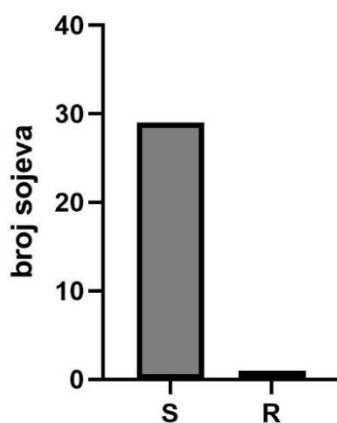


Slika 9. Osjetljivost bolničkih izolata enterokoka na vankomicin

Kafil i Asgharzadeh su 2014. godine testirali 106 kliničkih izolata iz raznih edukacijskih bolnica. Od ukupnog broja, 15 izolata je imalo vanB i 4 vanA što bi ukupno dalo 19 VRE (17,92%). Naš rezultat iznosi 10,00% što je relativno blizu uspoređivanom istraživanju iako je gotovo nemoguće očekivati slične rezultate obzirom na raznolikost uvjeta i života u pojedinim dijelovima svijeta.

b) Osjetljivost sojeva *Enterococcus faecalis* iz hrane na vankomicin

Prema provedenoj analizi vidljivo je na Slici 10. da je 1 soj rezistentan na vankomicin dok 29 njih nisu što predstavlja 3,33% rezistentnih sojeva.

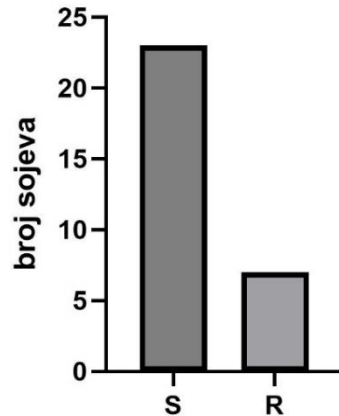


Slika 10. Osjetljivost izolata iz hrane na vankomicin

Výrostková i suradnici su 2021. godine radili istraživanje na kozjem siru i uzeli su 15 izolata *E. faecalis*. Od njih je bilo 12 rezistentnih, a samo 3 osjetljiva. To bi se moglo protumačiti činjenicom da je u koza dolazilo do infekcija, a pošto su to koze iz uzgoja tretirane raznim tvarima, vrlo lako je moglo doći do rezistencije i širenja iste.

c) Osjetljivost sojeva *Enterococcus faecalis* iz otpadnih voda na vankomicin

Prema rezultatima analize vidljivo je da je 6 sojeva rezistentno, a 24 sojeva osjetljivo na vankomicin što čini 20,00% rezistentnih sojeva.



Slika 11. Osjetljivost izolata iz otpadnih voda na vankomicin

Uzevši u obzir rezultate istraživanja osjetljivosti na vankomicin primjećuje se da postoje razlike u rezistenciji između izvora sojeva u analizi. Od ukupno 30 sojeva u svakoj kategoriji, 10,00% sojeva iz bolničkog izvora je rezistentno na vankomicin, 3,33% sojeva iz hrane pokazuje rezistenciju te 20,00% sojeva uzetih iz otpadnih voda. Očekivanja bi možda bila na strani bolničkih izolata međutim otpadne vode kao izvor fecesa opravdavaju svoj postotak.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih istraživanja i prikupljenih rezultata, zaključci su sljedeći :

- 1) Ispitivanjem hidrofobnosti stanične površine zaključuje se da sojevi izolirani iz otpadnih voda imaju najmanju varijabilnost podataka i najveću hidrofobnost. Najmanju hidrofobnost su pokazali sojevi izolirani iz bolničkog izvora, no nakon statističke obrade podataka pokazalo se da između bolničkih izolata i onih iz hrane ne postoji značajna razlika.
- 2) Prema metodi iz rada Stępień-Pyśniak (2019) sposobnost stvaranja biofilma se dijeli na četiri kategorije u ovisnosti o optičkoj gustoći sojeva i graničnoj produkciji biofilma. Prema rezultatima mjerenja, bolnički izolati su najjači produktori biofilma s 96,67% jakih produktora i 3,33% umjereno jakih od ukupno 30 sojeva. S ovom tvrdnjom se također slaže i metoda prema Andersonu (2016) gdje je 100% bolničkih izolata u kategoriji jakih produktora. Najslabiji su produktori izolati iz otpadnih voda. Ako se pak gleda isključivo optička gustoća, najveći kapacitet stvaranja biofilma imaju izolati iz hrane dok između bolničkih i izolata iz otpadnih voda nisu nađene značajne razlike.
- 3) β -hemolitičku aktivnost je pokazalo 20,00% izolata iz bolnice zatim 16,67% izolata iz hrane te 26,67% izolata iz otpadnih voda. Od ukupno 90 sojeva, 63,33% pokazuje hemolitičku aktivnost. Kod prikaza hemolize preko ekvivalenta goveđeg hemoglobina, najmanju vrijednost pokazuje bolnički izoliran soj (0,515 mg/mL), a također soj iz istog izvora i najveću vrijednost (3,232 mg/mL).
- 4) Sojevi *Enterococcus faecalis* izolirani iz otpadnih voda pokazuju najveću rezistenciju na vankomicin (20,00% ispitivanih sojeva), dok izolati iz hrane pokazuju najmanju rezistenciju (3,33%). Bolnički izolirani sojevi su u sredini s 10,00% rezistentnih sojeva.
- 5) Sojevi izolirani iz bolničkog izvora pokazuju najmanju hidrofobnost, najjači su produktori biofilma prema metodi Stępień-Pyśniak (2019) i Anderson (2016), najmanje sojeva pokazuje β -hemolizu i u sredini su što se tiče rezistencije na vankomicin.
- 6) Sojevi izolirani iz hrane su između BEFK i HEFK gledajući hidrofobnost, najjači su produktori biofilma ako se gleda samo optička gustoća, također su u sredini što se tiče β -hemolitičke aktivnosti i pokazuju najmanju rezistenciju na vankomicin.
- 7) Sojevi izolirani iz hrane pokazuju najveću hidrofobnost, najslabiji su produktori biofilma po metodi Stępień-Pyśniak (2019) i Anderson (2016), najviše sojeva pokazuje β -hemolizu i rezistenciju na vankomicin.

6. KRATICE

ANOVA – Analiza varijance (engl. *Analysis of variance*)

ATCC – Zbirka američkih tipskih kultura (engl. *American Type Culture Collection*)

ATP – Adenozin trifosfat (engl. *Adenosine triphosphate*)

BEFK – Bolnički izolirani *E. faecalis*

BHIB – Infuzija srca i mozga (engl. *Brain heart infusion broth*)

CFU – Jedinice koje formiraju kolonije (engl. *Colony forming units*)

CPS – Kapsularni polisaharid (engl. *Capsular polysaccharide*)

CSH – Hidrofobnost stanične površine (engl. *Cell surface hydrophobicity*)

eDNA – Okolišna deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Environmental deoxyribonucleic acid*)

Ebp – pili povezani s biofilmom i endokarditisom (engl. *Endocarditis and biofilm associated pilus*)

EPA – Eikozapentaenoična kiselina (engl. *Eicosapentaenoic Acid*)

ESP – Enterokokni površinski protein (engl. *Enterococcal surface protein*)

EUCAST – Europski odbor za testiranje mikrobne osjetljivosti (engl. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

GHE/BHE – Goveđi hemoglobin ekvivalent (engl. *Bovine hemoglobine equivalent*)

HCCA – Udruga za pridržavanje zdravstvenih propisa (engl. *Health Care Compliance Association*)

HEFK – *E. faecalis* izoliran iz hrane

hErc – Humani eritrociti

HFI – Indeks hidrofobnosti (%)

HemI – Hemolitički indeks (%)

HLAR – Visoka razina otpornosti (rezistencije) na aminoglikozide (engl. *High level aminoglycoside resistance*)

LTA – Lipoteikoična kiselina (engl. *Lipoteichoic acid*)

MALDI-TOF MS – Matriksom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom-analizator vremena leta-masena spektrometrija (engl. *Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*)

MATH/BATH – Mikrobna/bakterijska adhezija na ugljikovodike (engl. *Microbial/Bacterial adhesion to hydrocarbons*)

MHA – Mueller-Hinton agar

OD – Optička gustoća (engl. *Optical density*)

ODc – Granična vrijednost optičke gustoće (engl. *Cutoff optical density*)

Pbp – Penicilin vezujući protein (engl. *Peniciline binding protein*)

PBS – Fiziološka otopina s fosfatnim puferom (engl. *Phosphate-Buffered Saline*)

PCG – Pilin genski klasteri (engl. *Piline cluster genes*)

rRNA – Ribosomska ribonukleinska kiselina (engl. *Ribosomal ribonucleic acid*)

TSA – Triptikaza soja agar (engl. *Trypticase soy agar*)

TSB – Triptikaza soja bujon (engl. *Trypticase soy broth*)

VRE – Na vankomicin otporni (rezistentni) enterokoki (engl. *Vancomycin resistant enterococci*)

WEFK – *E. faecalis* izorani iz otpadnih voda

7. LITERATURA

Anderson AC, Jonas D, Huber I, Karygianni L, Wölber J, Hellwig E, Aeweiler N, Vach K, Wittmer A, Al-Ahmad A. *Enterococcus faecalis* from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation. *Fron. Microbiol*, 2016, 6, 1534.

Abu Lila AS, Alharby TN, Alanazi J, Alanazi M, Abdallah MH, Rizvi SMD, Moin A, Khafagy ES, Tabrez S, Al Balushi AA, Hegazy WAH. Clinical Resistant Strains of *Enterococci* and Their Correlation to Reduced Susceptibility to Biocides: Phenotypic and Genotypic Analysis of Macrolides, Lincosamides, and Streptogramins. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 2023, 12(3), 461.

Bryan NC, Lebreton F, Gilmore M, Ruvkun G, Zuber MT, Carr CE. Genomic and Functional Characterization of *Enterococcus faecalis* Isolates Recovered From the International Space Station and Their Potential for Pathogenicity. *Front Microbiol*, 2021, 11, 515319.

Coburn PS, Gilmore MS. The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cellular Microbiology*, 2003, 5, 661-669.

Codelia-Anjum A, Lerner LB, Elterman D, Zorn KC, Bhojani N, Chughtai B. Enterococcal Urinary Tract Infections: A Review of the Pathogenicity, Epidemiology, and Treatment. *Antibiotics*, 2023, 12(4), 778.

Dec M, Puchalski A, Nowaczek A, Wernicki A. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* strains of chicken origin against bacterial pathogens. *Int Microbiol*, 2016, 19(1), 57-67.

EUCAST, The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Clinical breakpoint Tables v.12.0, 2022., www.eucast.org, pristupljeno listopad, studeni 2022.

Fang H, Ohlsson AK, Ullberg M i sur. Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and the VITEK 2 system for the identification of clinical *Enterococcus* isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012, 31(11), 3073–3077.

Fiore E, Van Tyne D, Gilmore MS. Pathogenicity of *Enterococci*. *Microbiol Spectr*, 2019, 7,4.

Garsin DA, Frank KL, Silanpää J, Ausubel FM, Hartke A, Shankar N, Murray BE. Pathogenesis and Models of Enterococcal Infection. U: *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, urednici, Boston, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, i sur. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2012, 65(2), 127-145.

Hashem YA, Abdelrahman KA, Aziz RK. Phenotype–Genotype Correlations and Distribution of Key Virulence Factors in *Enterococcus faecalis* Isolated from Patients with Urinary Tract Infections. *Infect Drug Resist*, 2021, 14, 1713-1723.

Høiby N. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. *Pathog Dis*, 2014, 70(3), 205-211.

Høiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm Infections. *APMIS*, 2017, 125, 272-275.

Jafari S, Abdollahi A, Sabahi M i sur. An Update to Enterococcal Bacteremia: Epidemiology, Resistance, and Outcome. *Infect Disord Drug Targets*, 2022.

Joyanes P, Pascual A, Martínez-Martínez L, Hevia A, Perea EJ. In vitro adherence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* to plastic biomaterials. *Clin Microbiol Infect*, 1999, 5(6), 382-386.

Kafil HS, Asgharzadeh M. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from education hospital of Iran. *Maedica (Bucur)*, 2014, 9(4), 323-327.

Kalenić S i sur. Medicinska mikrobiologija 14. izd. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 140-143.

Krasowska A, Sigler K. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs?. *Front Cell Infect Microbiol*, 2014, 4, 112.

Krawczyk B, Wityk P, Gałęcka M, Michalik M. The Many Faces of *Enterococcus spp.*- Commensal, Probiotic and Opportunistic Pathogen. *Microorganisms*, 2021, 9(9), 1900.

Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal Infection : Treatment and Antibiotic Resistance. U: *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, urednici, Boston, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

Larrán B, López-Alonso M, Miranda M i sur. Measuring haemolysis in cattle serum by direct UV–VIS and RGB digital image-based methods. *Sci Rep* 12, 2022, 13523.

Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. U: *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, urednici, Boston, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

Ljoljić Bilić V, Gašić UM, Milojković-Opsenica D, Rimac H, Vuković Rodriguez J, Vlainić J, Brlek-Gorski D, Kosalec I. Antibacterial Fractions from *Erodium cicutarium* Exposed— Clinical Strains of *Staphylococcus aureus* in Focus. *Antibiotics*, 2022, 11(4), 492.

Mogrovejo DC, Perini L, Gostinčar C, i sur. Prevalence of Antimicrobial Resistance and Hemolytic Phenotypes in Culturable Arctic Bacteria. *Front Microbiol*, 2020, 11, 570.

Morse SA, Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Mietzner TA. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology, 26. izdanje, The McGraw-Hill Companies, 2013, 222-225 str.

Murray, BE. Vancomycin-Resistant Enterococcal Infections. *New England Journal of Medicine*, 2000, 342(10), 710-721.

Said MS, Tirthani E, Lesho E. *Enterococcus* Infections. *StatPearls*, 2022.

Salas-Tovar JA, Escobedo-García S, Olivas GI, Acosta-Muñiz CH, Harte F, Sepulveda DR. Method-induced variation in the bacterial cell surface hydrophobicity MATH test. *J Microbiol Methods*, 2021, 185, 106234.

Semedo T, Almeida Santos M, Martins P, i sur. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(6), 2569-2576.

Stepanović S, Vuković D, Hola V i sur. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 2007, 115(8), 891-899.

Stępień-Pyśniak D, Hauschild T, Kosikowska U i sur. Biofilm formation capacity and presence of virulence factors among commensal *Enterococcus spp.* from wild birds. *Sci Rep* 9, 2019, 11204.

Stępień-Pyśniak D, Hauschild T, Różański P, Marek A. MALDI-TOF Mass Spectrometry as a Useful Tool for Identification of *Enterococcus spp.* from Wild Birds and Differentiation of Closely Related Species. *J. Microbiol. Biotechnol*, 2017, 27, 1128-1137.

Suppli M, Aabenhus R, Harboe ZB, Andersen LP, Tvede M, Jensen JU. Mortality in enterococcal bloodstream infections increases with inappropriate antimicrobial therapy. *Clin Microbiol Infect.*, 2011, 17(7), 1078-83.

Suzuki T, Gilmore MS. Pathogenesis and Immunology of Bacterial Endophthalmitis. U: Encyclopedia of the Eye, Darlene A. Dartt, urednici, Academic Press Elsevier, 2010, 261-267.

Tahmourespour A, Kermanshahi RK, Salehi R, Nabinejad A. The Relationship between Cell Surface Hydrophobicity and Antibiotic Resistance of Streptococcal Strains Isolated from Dental Plaque and Caries. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2008, 10(4), 251-255.

Van Tyne D, Martin MJ, Gilmore MS. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins (Basel)*, 2013, 5(5), 895-911.

Vestby LK, Grønseth T, Simm R, Nesse LL. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics*, 2020, 9(2)59.

Výrostková J, Regecová I, Dudriková E, Marcinčák S, Vargová M, Kováčová M, Maľová J. Antimicrobial Resistance of *Enterococcus sp.* Isolated from Sheep and Goat Cheeses. *Foods*, 2021, 10(8), 1844.

Wu X, Wu B, Li Y, Jin X, Wang X. Identification and safety assessment of *Enterococcus thailandicus* TC1 isolated from healthy pigs. *PLoS ONE*, 2021, 16(7), e0254081.

Zervos MJ, Mikesell TS, Schaberg DR. Heterogeneity of plasmids determining high-level resistance to gentamicin in clinical isolates of *Streptococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1986, 30(1), 78-81.

8. SAŽETAK/SUMMARY

8.1. SAŽETAK

Bakterija *Enterococcus faecalis* je oportunistički patogen, poznata po komenzalističkom životu kao dio mikrobiote različitih organskih sustava, a nalazi se i u okolišu. Uzrokuje infekcije urinarnog sustava, inficira kože i rane, a također je specifična kao uzročnik endokarditisa. Sadrži mnoge virulentne čimbenike, a u ovom radu su detaljnije obrađeni hidrofobnost stanične površine, sposobnost stvaranja biofilma, β -hemolitička aktivnost te osjetljivost na vankomicin. Cilj diplomskog rada je bio utvrditi postoje li značajne razlike u uvjetima *in vitro* u virulenciji sojeva *E. faecalis* izoliranih iz bolnice, hrane i otpadnih voda nakon statističke obrade rezultata. Istraživanjem hidrofobnosti stanične površine zaključuje se da sojevi izolirani iz hrane imaju najveću hidrofobnost, dok između bolničkih izolata i onih iz otpadnih voda nije bilo značajne razlike. Prema metodi iz rada Stępień-Pyśniak (2019), sposobnost stvaranja biofilma je podijeljena u četiri kategorije te su sojevi iz bolničkog izvora najjači produktori biofilma, zatim sojevi iz hrane i sojevi iz otpadnih voda kao najslabiji produktori biofilma. Ako se gleda sposobnost stvaranja biofilma samo prema izmjerenoj optičkoj gustoći sojeva, najjači produktori biofilma su sojevi iz hrane potom iz otpadnih voda i konačno bolnički izolati. Hemoliza je utvrđena u 20,00% sojeva iz bolničkog izvora, 16,67% iz hrane te 26,67% iz otpadnih voda pri čemu Bonfferonijev test ukazuje da razlike između rezultata različitih sojeva nisu statistički značajne. Od ukupno 30 sojeva iz svakog izvora, rezistenciju na vankomicin iz bolničkog izvora je pokazalo 10,00%, iz hrane 3,33% i iz otpadnih voda 20,00%. Može se zaključiti da se nakon provedenih ispitivanja nulta hipoteza pokazala točnom kod svih virulentnih čimbenika osim hemolize.

8.2. SUMMARY

The bacterium *Enterococcus faecalis* is an opportunistic pathogen known for its commensal life as part of the microbiota of various organic systems and it can also be found in the environment. It causes infections of the urinary system, infects skin and wounds, and is also a specific cause of endocarditis. It holds many virulent factors, of which the hydrophobicity of the cell surface, the ability to form biofilm, β -hemolytic activity and susceptibility to vancomycin are discussed in more detail in this paper. The aim of the thesis was to determine whether there are significant differences in *in vitro* conditions in the virulence of *E. faecalis* strains isolated from the hospital, food and wastewater after statistical data processing. By investigating the hydrophobicity of the cell surface, it was concluded that the strains isolated from food have the highest hydrophobicity, while there was no significant difference between hospital isolates and those from wastewater. According to the method from the work of Stępień-Pyśniak (2019), the ability to form biofilm is divided into four categories and those isolated from a hospital source are the strongest biofilm producers followed by strains from food and strains from wastewater as the weakest biofilm producers. If the ability to form a biofilm is viewed only according to the measured optical density of the strains, the strongest biofilm producers are strains isolated from food, followed by isolates from wastewater and finally hospital isolates. Hemolysis was shown by 20,00% of strains from a hospital source, 16,67% from food and 26,67% from wastewater, while the Bonfferoni test indicates that the differences between the results of different strains are not statistically significant. Out of a total of thirty strains from each source, 10,00% showed resistance to vancomycin from a hospital source, 3,33% from food and 20,00% from wastewater. It can be concluded that after the conducted tests, the null hypothesis proved to be correct for all virulence factors except hemolytic activity.

9. PRILOZI

Licenca za korištenje Slike 1. :

<https://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=e1b151d8-ac82-4cec-8668-0c4297b78871>

Licenca za korištenje Slike 2. :

<https://www.nejm.org/about-nejm/permissions>

Licenca za korištenje Slike 3. :

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za mikrobiologiju
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Virulentni čimbenici bakterije *Enterococcus faecalis* iz različitih izolacijskih izvora

Željka Novosel

SAŽETAK

Bakterija *Enterococcus faecalis* je oportunistički patogen, poznata po komenzalističkom životu kao dio mikrobiote različitih organskih sustava, a nalazi se i u okolišu. Uzrokuje infekcije urinarnog sustava, inficira kože i rane, a također je specifična kao uzročnik endokarditisa. Sadrži mnoge virulentne čimbenike, a u ovom radu su detaljnije obrađeni hidrofobnost stanične površine, sposobnost stvaranja biofilma, β -hemolitička aktivnost te osjetljivost na vankomicin. Cilj diplomskog rada je bio utvrditi postoje li značajne razlike u uvjetima *in vitro* u virulenciji sojeva *E. faecalis* izoliranih iz bolnice, hrane i otpadnih voda nakon statističke obrade rezultata. Istraživanjem hidrofobnosti stanične površine zaključuje se da sojevi izolirani iz hrane imaju najveću hidrofobnost, dok između bolničkih izolata i onih iz otpadnih voda nije bilo značajne razlike. Prema metodi iz rada Stepień-Pyśniak (2019), sposobnost stvaranja biofilma je podijeljena u četiri kategorije te su sojevi iz bolničkog izvora najjači produktori biofilma, zatim sojevi iz hrane i sojevi iz otpadnih voda kao najslabiji produktori biofilma. Ako se gleda sposobnost stvaranja biofilma samo prema izmjerenoj optičkoj gustoći sojeva, najjači produktori biofilma su sojevi iz hrane potom iz otpadnih voda i konačno bolnički izolati. Hemoliza je utvrđena u 20,00% sojeva iz bolničkog izvora, 16,67% iz hrane te 26,67% iz otpadnih voda pri čemu Bonfferonijev test ukazuje da razlike između rezultata različitih sojeva nisu statistički značajne. Od ukupno 30 sojeva iz svakog izvora, rezistenciju na vankomicin iz bolničkog izvora je pokazalo 10,00%, iz hrane 3,33% i iz otpadnih voda 20,00%. Može se zaključiti da se nakon provedenih ispitivanja nulta hipoteza pokazala točnom kod svih virulentnih čimbenika osim hemolize.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 52 stranice, 11 grafičkih prikaza, 9 tablica i 41 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Enterococcus faecalis*; Hidrofobnost stanične površine; Biofilm; Hemoliza; Rezistencija na Vankomicin

Mentor: **Dr. sc. Ivan Kosalec**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivan Kosalec**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Petra Turčić, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Josipa Vlanić, viša zn. suradnica, Institut Ruđer Bošković

Rad prihvaćen: srpanj 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Microbiology
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Virulence factors of the bacterium *Enterococcus faecalis* from different isolation sources

Željka Novosel

SUMMARY

The bacterium *Enterococcus faecalis* is an opportunistic pathogen known for its commensal life as part of the microbiota of various organic systems and it can also be found in the environment. It causes infections of the urinary system, infects skin and wounds, and is also a specific cause of endocarditis. It holds many virulent factors, of which the hydrophobicity of the cell surface, the ability to form biofilm, β -hemolytic activity and susceptibility to vancomycin are discussed in more detail in this paper. The aim of the thesis was to determine whether there are significant differences in *in vitro* conditions the virulence of *E. faecalis* strains isolated from the hospital, food and wastewater after statistical data processing. By investigating the hydrophobicity of the cell surface, it was concluded that the strains isolated from food have the highest hydrophobicity, while there was no significant difference between hospital isolates and those from wastewater. According to the method from the work of Stępień-Pyśniak (2019), the ability to form biofilm is divided into four categories and those isolated from a hospital source are the strongest biofilm producers followed by strains from food and strains from wastewater as the weakest biofilm producers. If the ability to form a biofilm is viewed only according to the measured optical density of the strains, the strongest biofilm producers are strains isolated from food, followed by isolates from wastewater and finally hospital isolates. Hemolysis was shown by 20,00% of strains from a hospital source, 16,67% from food and 26,67% from wastewater, while the Bonfferoni test indicates that the differences between the results of different strains are not statistically significant. Out of a total of thirty strains from each source, 10,00% showed resistance to vancomycin from a hospital source, 3,33% from food and 20,00% from wastewater. It can be concluded that after the conducted tests, the null hypothesis proved to be correct for all virulence factors except hemolytic activity.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 52 pages, 11 figures, 9 tables and 41 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Enterococcus faecalis*; Cell Surface Hydrophobicity; Biofilm; Hemolysis; Resistance to Vancomycin

Mentor: **Ivan Kosalec, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ivan Kosalec, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Petra Turčić, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Josipa Vlainić, Ph.D. research associate, Ruđer Bošković Institute

The thesis was accepted: July 2023.