

Virulentni čimbenici bakterije *Enterococcus faecium* iz različitih izolacijskih izvora

Novak, Silvia

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:163:511151>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-14**



Repository / Repozitorij:

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



Silvia Novak

Virulentni čimbenici bakterije *Enterococcus faecium* 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 Vlanić (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.

Prvenstveno zahvaljujem svojem mentoru prof. dr. sc. Ivanu Kosalecu na pruženoj prilici rada pod njegovim stručnim vodstvom i na svim korisnim savjetima, također hvala neposrednim mentoricama dr. med. Diani Brlek Gorski i dr. sc. Josipi Vlanić na pomoći prilikom izrade ovog rada.

Hvala mojim prijateljima i dečku Borni na neizmjerne ljubavi i podršci.

Najveće zahvale idu mojim roditeljima Svjetlani i Marku te sestri Rafaeli na bezuvjetnoj podršci i strpljenju, bez kojih završetak studija i ovog rada ne bi bio moguć.

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Rod Enterococcus	1
1.2.	Na vankomicin otporni enterokoki (VRE).....	4
1.3.	Vrsta Enterococcus faecium.....	5
2.	OBRAZLOŽENJE TEME.....	6
3.	MATERIJALI I METODE.....	7
3.1.	Odabir sojeva za istraživanje.....	7
3.2.	Izolacija i identifikacija sojeva.....	7
3.3.	Testiranje osjetljivosti na antibiotike	8
3.4.	Ispitivanje sposobnosti stvaranja biofilma	8
3.5.	Ispitivanje β -hemolitičke aktivnosti.....	9
3.6.	Ispitivanje hidrofobnosti stanične površine.....	10
3.7.	Statistička obrada podataka.....	11
4.	REZULTATI I RASPRAVA	12
4.1.	Rezultati određivanja osjetljivosti na vankomicin disk-difuzijskim postupkom	12
4.2.	Rezultati ispitivanja sposobnosti tvorbe biofilma.....	14
4.3.	Rezultati ispitivanja hidrofobnosti stanične površine	16
4.4.	Rezultati ispitivanja β -hemolitičke aktivnosti	19
4.5.	Korelacija na vankomicin-otpornih sojeva (VRE) E. faecium sa indeksom hidrofobnosti stanične površine i stvaranja biofilma.....	21
5.	ZAKLJUČAK	22
6.	POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA	24
7.	LITERATURA.....	26
8.	SAŽETAK/ SUMMARY	29
8.1.	SAŽETAK	29
8.2.	SUMMARY	30

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. Rod *Enterococcus*

Bakterije roda *Enterococcus* pripadaju skupini gram-pozitivnih koka koji pokazuju negativan rezultat na test katalaze, a pojavljuju se pojedinačno ili se udružuju u parove ili kratke lance (Kalenić i sur., 2013.). Enterokoki su prvi put otkriveni 1899. godine, međutim do 1984. godine su bili klasificirani kao bakterije roda *Streptococcus* serološke grupe D zbog svojeg grupnog antigena „D“, glicerol-teihoične kiseline koja je sastavni dio bakterijske stanične stijenke i koju sadrže sve bakterije koje su tada svrstane u navedenu skupinu. Tek 1984. su enterokoki svrstani u zaseban rod imena *Enterococcus* na temelju studija koje su pokazale biokemijske i genetske različitosti od streptokoka. Studije uglavnom sadrže polifazični pristup koji kombinira molekularne tehnike, a neke od njih su DNA-DNA resocijacijski pokusi, 16S rRNA sekvencioniranje i profilna analiza proteina stanice (Zhou i sur., 2020.).

Enterokoki su fakultativno anaerobne bakterije s fermentativnim metabolizmom koji rezultira nastankom mliječne kiseline i izrazito su otporne na različite uvjete zbog čega mogu perzistirati gotovo posvuda. Mogu rasti u temperaturnom rasponu od +10°C do +45°C te u kiselim, alkalnim, hipertoničnim i hipotoničnim uvjetima i uz prisutnost visokih koncentracija žuči i natrijevog klorida. Imaju sposobnost hidrolizacije eskulina zbog čega se eskulin-žučni agar može koristiti za razlikovanje enterokoka od ostalih gram-pozitivnih koka (Murray i sur., 2002.). Enterokoki su otporni na većinu dezinficijensa i antiseptika te mogu preživjeti UV zračenje i čak 30 minuta na temperaturi pasterizacije (Čanžek Majhenič, 2006.). Zbog navedene otpornosti na fizikalne i kemijske agense izdvajaju se iz skupine streptokoka kojoj su nekoć pripadali. Izolati roda *Enterococcus* rastu dobro na uobičajnim hranjivim podlogama sa ili bez dodatka krvi, a na podlogama od krvnog agra stvaraju velike, bijele kolonije nakon 24-satne inkubacije. Pojedini sojevi mogu stvarati α -hemolizu i β -hemolizu, pa je tada prisutan tanki prsten hemolize (Murray i sur., 2002.).

Bakterije roda *Enterococcus* su komenzalni organizmi u mikrobioti probavnog sustava čovjeka, ali ih nalazimo i u okolišu, tlu, vodama, hrani, biljkama i životinjama. Smatraju se najbrojnijim gram-pozitivnim kokima koji nastanjuju crijeva čovjeka. Osim u crijevnom mikrobiomu, mogu se naći i na drugim mjestima u čovjeku kao što su genitalno-urinarni sustav, usna šupljina, koža, posebice perinealno područje. Prevalencija ovih bakterija će ovisiti o različitim čimbenicima, primjerice dob, prehrana, prethodne bolesti i upotreba antibiotika (Kalenić i sur., 2013.). Ovi koki smatraju se i oportunističkim patogenima jer mogu uzorkovati razne infekcije kao što su infekcije mokraćno-spolnog sustava, infekcije kože i rana, enteritis,

endokarditis, meningitis te bakterijemiju (Pintarić i sur., 2018.). U tom slučaju je gastrointestinalni trakt čovjeka rezervoar iz kojeg će dospjeti u druge organske sustave (Kalenić i sur., 2013.).

Trenutačno je imenovano 51 vrsta enterokoka u koje ubrajamo *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* i brojne druge (Said i sur., 2021.). U većini slučajeva za potrebe liječenja nije potrebna identifikacija enterokoka do vrste, no ukoliko se radi o meningitisu ili endokarditisu ona će ipak biti nužna zbog ozbiljnosti takvih infekcija. Identifikacija vrste je u takvim slučajevima ključna iz razloga što se razlikuje njihova osjetljivost na antibiotike zbog različitih mehanizama rezistencije koje su razvile (Pintarić i sur., 2019.). Najznačajnije i najzastupljenije vrste su *E. faecalis* i *E. faecium* te su i glavni uzročnici bolesti u ljudi. Američki Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Center for Disease Control and Prevention*, CDC) kategorizira ih kao ozbiljnu prijetnju budući da su od 1970-tih godina glavni uzročnici bolničkih infekcija. Često ih se može pronaći kolonizirane na rukama bolničkog osoblja zahvaljujući njihovoj lakoj transmisiji. Osim bolničkih infekcija, enterokoki su zaslužni za 5-20% izvanbolničkih endokarditisa (Fiore i sur., 2018.). Samo u 2017. godini u Sjedinjenim Američkim Državama zabilježeno je čak 55 000 infekcija uzrokovano bakterijama roda *Enterococcus*, od kojih je 5 400 završilo smrću (CDC, 2019.).

Enterokoki nisu visoko virulentni organizmi i ne izazivaju fulminantnu bolest. Njihovi čimbenici virulencije su površinski enterokokni protein- **Esp** (engl. *Enterococcal surface protein*), adhezini, pili, čahura, agregacijske tvari, secernirajući toksin citolizin/hemolizin, proteinska želatinaza, serinska proteaza, polisaharidi stanične stijenke te ekstracelularni superoksid (Kalenić i sur., 2013, Said i sur., 2022.). Najranije otkriven čimbenik virulencije je **Cyl**, citolizin otkriven prvi puta u vrstama *E. faecalis* i *E. faecium*. Otpuštanjem citolizina bakterija oštećuje membranu stanice domaćina i tako olakšava infekciju, dok enzimi proteinska želatinaza i serinska proteaza imaju ulogu cijepanja peptidnih veza. Proteinska želatinaza je kodirana gen **geIE** te pripada porodici enzima matriksnih metaloproteinaza koje hidroliziraju želatinu, kolagen i druge male peptide. Esp je veliki stanični protein koji je najzastupljeniji u vrsti *E. faecium* te doprinosi patogenezi uzlaznih infekcija mokraćnog sustava jer značajno povećava kolonizaciju stanica uretre (Gao i sur., 2018.). Navedeni čimbenici im omogućuju otpornost na fagocitozu, lako prijanjanje na površine i stvaranje biofilma zbog čega dolazi do njihove adhezije na umjetne medicinske materijale u organizmu kao što su kateteri, zubne proteze i dr. Adhezijom na navedene medicinske instrumente u organizmu, enterokoki mogu dovesti do infekcije okolnih tkiva koje je teško liječiti budući da je sposobnost prodiranja antibiotika na umjetne materijale nemoguća. Enterokoki, za razliku od streptokoka, ne stvaraju

bakterijske toksine, međutim njihova virulencija proizlazi iz drugih sposobnosti kao što je velika otpornost na različite uvjete, specifična struktura te rezistencija na brojne antibiotike (Said i sur., 2022.).

Rezistencija na antibiotike je glavni problem liječenja infekcija uzrokovanih enterokokima zbog čega se ovaj rod bakterija ubraja u bakterijsku skupinu ESKAPE koja je multirezistentna. Skupinu čine *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* Enterokoki su intrinzično rezistentni na cefalosporine, polusintetske peniciline, klindamicin te kombinaciju trimetoprima i sulfametoksazola, a pokazuju i smanjenu osjetljivost na penicilin, ampicilin i aminoglikozide. Intrinzična rezistencija je prirođena i kromosomom je kodirana za sve vrste enterokoka (Said i sur., 2022.). Osim intrinzične rezistencije, enterokoki su razvili stečenu rezistenciju koja je posljedica mutacija ili transfera novih genskih elemenata nošenih na plazmidu ili transpozonu. Zahvaljujući takvoj sposobnosti, često se mogu stvoriti rezistencije na tetracikline, makrolide, kinolone, glikopeptidne antibiotike te aminoglikozide (Hollenback i sur., 2012.). Ekstrinzična, odnosno stečena, rezistencija je karakteristična za svaku pojedinu vrstu bakterije roda *Enterococcus* (Kalenić i sur., 2013.).

Osjetljivi sojevi enterokoka se liječe ampicilinom, a to je slučaj kod infekcija mokraćnog sustava i blažih infekcija mekih tkiva. Kod težih infekcija dolazi do spomenute intrinzične rezistencije na β -laktamske antibiotike koja se najčešće javlja kod vrste *E. faecium*. Bakterija sintetizira molekulu PBP-5 koja ima niski afinitet za β -laktame, pa izostaje baktericidni učinak ovih antibiotika na tom promijenjenom ciljnom mjestu (Gilmore i sur., 2014.). Međutim, kako i dalje postoji bakteriostatski učinak ovih lijekova, može se koristiti kombinacija β -laktamskog antibiotika (najčešće penicilin i ampicilina, a vankomicin samo ako je soj rezistentan na penicilin ili ampicilin) i aminoglikozida (gentamicin ili streptomycin) (Kalenić i sur., 2013.). Sinergija ovih lijekova funkcionira na način da penicilin ili ampicilin oslabi staničnu stijenku bakterije te aminoglikozid u većim koncentracijama može doprijeti do unutrašnjosti stanice. Također, bitno je naglasiti, aminoglikozid kao samostalan lijek nikad nije izbor liječenja enterokoknih infekcija (Gilmore i sur., 2014.). Po novijim istraživanjima, kombinacija ampicilina i ceftriaksona je jednako učinkovita kao i kombinacija ampicilina i aminoglikozida u liječenju endokarditisa uzrokovanog vrstom *E. faecalis* te joj se i daje prednost jer se izbjegava moguća toksičnost uzrokovana aminoglikozidima (Hidalgo i sur., 2013.).

1.2. Na vankomicin otporni enterokoki (VRE)

Vankomicin pripada skupini glikopeptidnih anitibotika koji djeluje baktericidno na gram-pozitivne bakterije inhibirajući sintezu njihove stanične stijenke. Veže se za D-alanin-D-alaninski kraj prekursorskih jedinica stanične stijenke te na taj način sprječava daljnje enzimske korake u sintezi peptidoglikana stijenke. Indiciran je za liječenje infekcija uzrokovanih mikroorganizmima koji nisu osjetljivi na druge antimikrobne lijekove, kao što su meticilin-rezistentni sojevi bakterije *Staphylococcus aureus* (MRSA, engl. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) te u bolesnika koji su osjetljivi na peniciline i cefalosporine (Anderson i sur., 2023.).

Stjecanje rezistencije na vankomicin bitan je događaj u evolucijskom razvoju enterokoka prema visoko rezistentnim organizmina (Zhou i sur., 2020.). Prve kolonizacije i kliničke infekcije vankomicin rezistentnim enterokokima opisane su 1980-tih godina u Europi, a nedugo nakon toga pojavljene su u SAD i od tada je broj VRE izolata stalno u porastu. Osim bolničkih, opisane su i brojne izvanbolničke infekcije vankomicin rezistentnim enterokokima što je moguće povezano s ondašnjom upotrebom glikopeptida avoparcina kao aditiva u hrani za poticanje rasta životinja. Ovu je praksu kasnije zabranila Europska Unija. Osim toga, do naglog porasta broja enterokoka rezistentnih na vankomicin dovela je i sve češća uporaba vankomicina, posebice u bolnicama krajem 20. stoljeća (Pintarić i sur., 2018., Anderson i sur., 2023.).

Velika većina VRE izolata je vrste *E. faecium* što je dokazano analizom iz baze podataka 'Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance' (SCOPE) o 24179 bolničkih infekcija koje su zabilježene u Sjedinjenim Američkim Državama od 1995. do 2002. godine u 49 različitih bolnica. Otpornost na antibiotik vankomicin je dokazana u 60% izolata bakterijske vrste *E. faecium*, u usporedbi s 2% izolata *E. faecalis* (Anderson i sur., 2023.).

Visoka razina otpornosti na vankomicin u enterokokima kodirana je genima **vanA**, **vanB**, **vanC**, **vanD**, **vanE**, **vanG**, **vanL**, **vanM** i **vanN**. Geni kodiraju za različite enzime ligaze koji su zaslužni za izmjenu aminokiselina u ciljnom mjestu bakterije za koje se veže antibiotik. Na taj način, antibiotik se veže i do tisuću puta slabije. D-Ala-D-Lac ligaza zamjenjuje jedan alanin sa laktatom u peptidu D-Ala-D-Ala, ključnom za vezanje vankomicina, dok D-Ala-D-L-Ser ligaza u spomenutom peptidu zamjenjuje jedan alanin s laktatom. Geni koji kodiraju za D-Ala-D-Lac ligaze uzrokuju rezistencije umjerenog ili visokog stupnja, dok geni koji kodiraju za D-Ala-D-Ser ligaze uzrokuju rezistencije nižeg stupnja (Miller i sur., 2014.). Dokazan je i moguć prijenos rezistencije s VRE izolata na druge bakterijske vrste, kao što je MRSA.

Izbor antibiotika za liječenje infekcija uzrokovanih VRE izolatima je ograničen, a najčešće se koriste antibiotici novijih generacija, kvinupristin/dalfopristin, linezolid, daptomicin i tigeciklin, međutim rezistencija na navedene antibiotika je također sve češća (Anderson i sur., 2023.).

1.3. Vrsta *Enterococcus faecium*

Istraživanja na području populacijske genetike i genomike su dokazala da postoje dvije različite subpopulacije bakterijske vrste *E. faecium*. Prva subpopulacija, klasa B, predstavlja komenzale probavnog sustava čovjeka i obično ne izaziva infekcije, dok je druga subpopulacija, klasa A, povezana s nozokomijalnim epidemijama i oportunističkim infekcijama hospitaliziranih pacijenata (Zhou i sur., 2020.). Različite subpopulacije su dokazane korištenjem metode polimorfizma dužine amplificiranih fragmenata (AFLP; engl. *Amplified Fragment Length Polymorphism*) koja se temelji na selektivnom PCR umnožavanju restrikcijskih fragmenata iz ukupne genomske DNA (Zhou i sur., 2020., Paun i sur., 2012.).

Izolati iz klase A sadrže brojne različitosti, u odnosu na izolate iz klase B, koje im povećavaju sposobnost preživljavanja u ekstremnim uvjetima što objašnjava njihovu postojanost u bolničkom okruženju. Klasa A je dalje podijeljena na dvije subklase; subklasa A1 i subklasa A2. Izolati subklase A1, također referirani kao CC17 (engl. *Clonal complex 17*), pokazuju otpornost na ampicilin i kinolone te veću učestalost stvaranja spontanijh mutacija u usporedbi sa subklasom A2 i klasom B. Enterokoki klase A1 također imaju sveukupno veći genom od izolata subklase A2 i klase B i veći broj mobilnih genetskih elemenata koji kodiraju za različite patogene osobine same bakterije (Gao i sur., 2017.). Takve razlike u genomu su rezultat horizontalnog transfera gena i gubitka gena što je olakšano plazmidnim prijenosom i homolognom rekombinacijom posredovanom elementima insercijske sekvence (IS). IS elementi omogućuju inserciju gena na specifična mjesta u kromosomu (Zhou., 2020.).

Ove genomske razlike upućuju na pogodan evolucijski razvoj bakterija subklase A1 koji se dogodio u posljednjih 76 godina. Vremenski okvir od 76 godina se preklapa s vremenom početka uvođenja antibiotika u kliničku medicinu (Gao i sur., 2017.).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Otpornost bakterijske vrste *Enterococcus faecium* predstavlja značajni javnozdravstveni problem jer može dovesti do nastanka infekcija koje je teško liječiti te do povećanog morbiditeta i mortaliteta. Zbog visokorezistentnih enterokoka dolazi do potrebe za razvojem ovih antibiotika koji mogu uspješno liječiti rezistentne sojeve, međutim isto tako važno je razumno koristiti postojeće antibiotike te mjerama prevencije pomoći u smanjenu širenja rezistentnih sojeva *Enterococcus* (Miller i sur., 2020.).

Razumijevanje virulentnih čimbenika bakterije *E. faecium* je važan preduvjet za razumijevanje mikrobne patogeneze te za razvoj učinkovitih strategija za prevenciju i liječenje infekcija uzrokovanih ovom bakterijom. Stoga je cilj ovog rada u uvjetima in vitro ispitati osjetljivost izolata bakterije *E. faecium* na antibiotik vankomicin te ispitati slijedeće virulentne čimbenike:

- a) sposobnost stvaranja biofilma,
- b) β -hemolitičku aktivnosti te
- c) hidrofobnosti stanične površine.

Navedena svojstva su se ispitivala na 90 nasumično izoliranih sojeva bakterije *E. faecium* prikupljena iz tri različita izvora; bolnica, hrana te otpadne vode. Iz svakog izvora prikupljeno je 30 sojeva. Nulta hipoteza je postojanje razlika u fenotipskoj osjetljivosti i virulentnim čimbenicima između nasumičnih izolata iz različitih izvora (bolnica, hrana, otpadne vode).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Odabir sojeva za istraživanje

Za istraživanje je prikupljeno 30 sojeva bakterijske vrste *Enterococcus faecium* iz kliničkih uzoraka stolice, urina, hemokultura, kožnih promjena, rektalnih i perinealnih briseva dobivenih od Kliničkog bolničkog centra Zagreb (KBC Zagreb) te iz otpadnih voda i uzoraka hrane prikupljenih u Zavodu za mikrobiologiju hrane, Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ) i Hrvatskog veterinarskog instituta (HVI). Sojevi su prikupljeni od 2012. do 2022. godine na području grada Zagreba. 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). Sojevi su tokom prikupljanja pohranjivani na -18°C u sustavu Microbank (Pro-Lab Diagnostics).

3.2. Izolacija i identifikacija sojeva

Sojevi su uzgajani na čvrstim podlogama kanamicin-eskulin agaru (KEA, engl. *Kanamycin Aesculin Agar*) (Liofilchem) i TSA (engl. *Trypton Soya Agar*) (Liofilchem) te inkubirani u aerobnim uvjetima na temperaturnom rasponu od 35°C do 37°C tijekom 24h do 48 sata. Rod *Enterococcus* potvrđen je temeljem morfoloških, uzgojnih i fizioloških osobina – bojenjem po Gramu, reakcijom katalaze i rastom na KEA. Bojenjem po Gramu razlikujemo gram-pozitivne enterokoke od ostalih gram-negativnih bakterija te je reakcija katalaze za enterokoke negativna, a rastom na KEA agaru nastaju okrugle bijele ili sive kolonije promjera oko 1-2 mm, okružene crnim zonama. Sljedeći korak identifikacije učinjen je sa BBL Crystal GP ID panelom (Beckton, Dickinson and company). BBL Crystal GP ID ploče sadrže 29 osušenih biokemijskih i enzimskih supstrata u koje su stavljene bakterijske suspenzije u tekućini inokuluma koje rehidriraju supstrat. Razgradnju specifičnih supstrata detektiraju razni sustavi indikatora, prati se promjena boje ili prisutnost fluorescencije u jažicama koje su rezultat metaboličke aktivnosti mikroorganizama. Dobiveni uzorak od 29 reakcija pretvara se u deseteroznamenasti broj koji se koristi kao osnova za identifikaciju (BBL crystal™ identification systems). Daljnja identifikacija je provedena pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*) sa softverom MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Njemačka). Enterokoki su nakon inkubacije u BH bujonu kultivirani na selektivnom (KAE) i neselektivnom (TSA) agaru i inkubirani na temperaturi +35°C-37°C tijekom 24h do 48 sata. Kolonije su zatim stavljene na

MALDI ciljnu ploču čačkalicom i prekrivene s 1 µL HCCA matriksne otopine (Bruker Daltonics, Bremen, Njemačka) te osušene na zraku. Ciljna ploča je stavljena u instrument, a zatim je očitana spektar te uspoređen s podacima pohranjenim u softveru instrumenta (MALDI Biotyper software). Kalibracija instrumenta je provedena sa standardom bakterije *Escherichia coli* (Bruker Daltonics), a kao pozitivna kontrola je korišten soj ATCC® 29212 *Enterococcus faecalis*. Svaki test je izveden u tri primjerka.

3.3. Testiranje osjetljivosti na antibiotike

Disk-difuzijska metoda za ispitivanje osjetljivosti izolata *Enterococcus* na antibiotike učinjena je po EUCAST (engl. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) standardima. Na Mueller-Hinton agar (Liofilchem) apliciran je inokulum napravljen od nekoliko kolonija u sterilnoj fiziološkoj otopini natrijeva klorida optičke gustoće 0,5 po McFarlandu ($1-2 \times 10^8$ CFU/mL) određene denzitometrom (Densimat, bioMerieux, Francuska) i antibiotski disk; vankomicin (5 µg) (Mast Group Ltd.) Ploče su zatim inkubirane na temperaturi od $+35 \pm 1^\circ\text{C}$. Soj se proglasio rezistentim (otpornim) (R) ili osjetljivim (S) na antibiotik prema izmjerenom promjeru zone (mm) bez bakterijskog rasta oko diska s antibiotikom te prema podacima EUCAST-a 'Clinical breakpoint tables v.12.0.' važećim od 2022-01-01. Za kontrolu kvalitete koristio se *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212.

3.4. Ispitivanje sposobnosti stvaranja biofilma

Sposobnost stvaranja biofilma jedno je od najvažnijih svojstava virulentnosti enterokoka. Biofilm je populacija stanica pričvršćenih na različite biotičke i abiotičke površine i inkapsulirana je u hidratiziranu matricu egzopolimernih tvari, proteina, polisaharida i nukleinskih kiselina. Takva struktura osigurava optimalno okruženje za rast bakterija i olakšava prijenos mobilnih genetskih elemenata između bakterija (Gajewska i sur., 2023.).

Za ispitivanje stvaranja biofilma uzeto je 20 µl uzorka svakog soja enterokoka u TSB-u (engl. *Tryptic Soy Broth*) (Liofilchem) s dodatkom 1% m/v glukoze i dodano u mikrotitarske pločice ravnog dna s 96 jažice (Biofloat) koje su napunjene s 180 µl TSB-a. Mikrotitarske ploče su zatim inkubirane na 37°C tijekom 24 h, a nakon toga medij je odbačen i ploče su isprane s otopinom puferiranog fosfata (PBS, engl. *Phosphate-buffered saline*). Za uklanjanje neadherentnih stanica postupak je ponovljen tri puta. Pločice su se nakon toga sušile na zraku preko noći, a zatim su obojene s 200 µl 1% m/V otopine kristal violeta. Nakon 15 minuta, pločice su isprane s vodom i osušene te je dodano 200 µl 96 % v/v etanola. Zatim je nakon 30

minuta izmjerena optička gustoća na valnoj duljini od 570 nm (OD_{570}). Dobivene vrijednosti optičke gustoće u pojedinoj jažici predstavljaju produkciju biofilma u toj jažici. Ove vrijednosti su dalje izražene kao njihova srednja vrijednost, to jest OD (engl. *optical density*). Također izračunata je vrijednost OD_c (engl. *optical density cut-off value*) koja predstavlja graničnu vrijednost tvorbe biofilma. OD_c vrijednost se izračunala tako da su se tri standardne devijacije negativnih kontrola dodale srednjoj vrijednosti OD-a negativnih kontrola. Dobiveni rezultati su poslužili za klasifikaciju sojeva na sljedeće kategorije: jaki produktori biofilma, umjereni produktori, slabi produktori te neproduktori. Svi testovi su izvođeni u triplicatu, a 200 µl neinokuliranog medija TSB-a s dodatkom 1% m/v glukoze je poslužilo kao negativna kontrola.

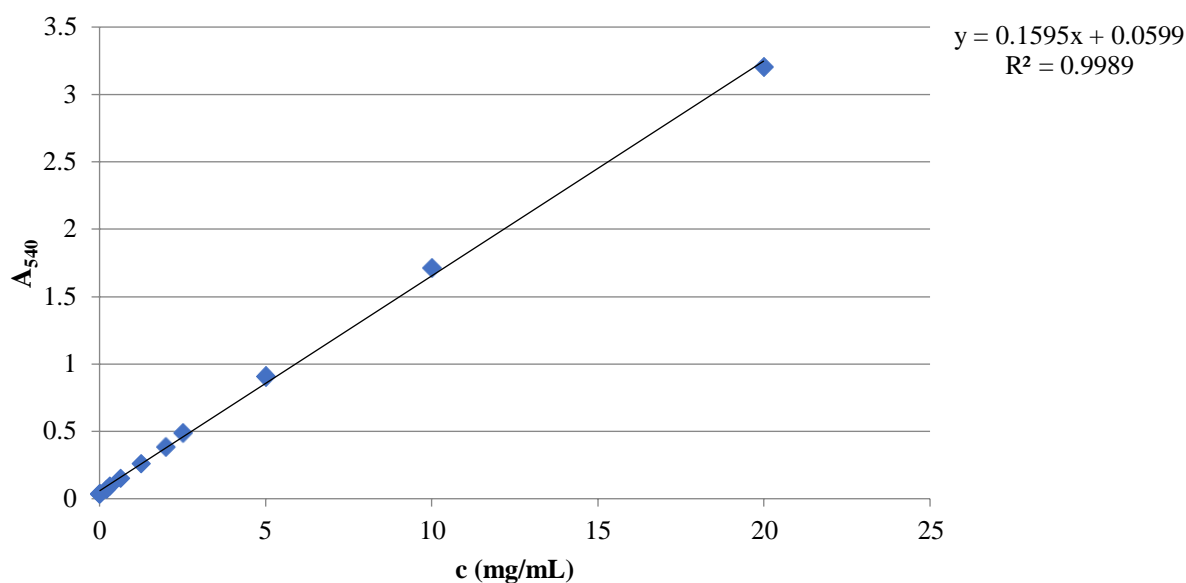
3.5. Ispitivanje β-hemolitičke aktivnosti

Hemolitička aktivnost odnosi se na sposobnost bakterije da lizira ili razgrađuje eritrocite (crvene krvne stanice). Hemolitička aktivnost može biti povezana s virulencijom ili patogenošću bakterija. Neki sojevi *Enterococcus faecium* koji posjeduju hemolitičku aktivnost mogu imati povećanu sposobnost izazivanja bolesti ili infekcije. Liza crvenih krvnih stanica može pomoći bakteriji da pristupi hranjivim tvarima i izbjegne imunološki odgovor domaćina, pridonoseći njezinom patogenom potencijalu. Prisutnost hemolitičke aktivnosti u kliničkim izolatima može ukazivati na agresivniji soj koji bi mogao biti povezan s teškim infekcijama (Jovanović i sur., 2023.).

Hemolitička aktivnost enterokoknih kultura se ispitala na krvnom agaru s 5% v/v sterilne konjske krvi (bioMerieux) koji se zatim inkubirao na +35°C do +37°C između 24 i 48 sati. Nakon inkubacije, sojeve oko kojih je nastala jasna zona β-hemolize smatramo β-hemolitički pozitivnim sojevima, a ukoliko su kolonije bile bez zone ili je nastala zelena zona oko njih kolonije su protumačene kao β-hemolitički negativni sojevi. Za pozitivnu kontrolu korišten je *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923. β-hemolitički pozitivni sojevi su nadalje korišteni za ispitivanje hemolitičkog učinka na eritrocitima iz ljudske krvi *ex situ*.

Načinjena je 4% v/v otopina humanih eritrocita iz svježe do 18h stare površinske heparizirane krvi dobrovoljca u PBS-u, pH=7. Zatim je uzeto 1 ml navedene otopine i pomiješano s 1 ml razrijeđenog inokuluma enterokoka s fiziološkom otopinom u omjeru 1:1(v:v) te stavljeno na inkubaciju 1h na +37°C. Nakon toga otopina je stavljena u laboratorijsku centrifugu (Tehtnica) na 1500 okretaja i 3 minute. Centrifugiranjem su nastala dva sloja otopine budući da su se humani eritrociti sedimentirali. 100 µl supernatanta uneseno je u mikrotitracijske pločice ravnog dna te je izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 540

nm. Od svake dobivene apsorbancije oduzeta je vrijednost apsorbancije prazne jažice. Postupak je ponovljen tri puta te su izračunate srednje vrijednosti dobivenih apsorbancija. Množenjem takve srednje vrijednosti apsorbancije sa 100 dobije se hemolitički indeks (HemI%). Kao pozitivna kontrola korištena je 1% v/v otopina Triton[®]X100 sa 4% v/v humanih eritrocita. Dobiveni rezultati su izraženi kao ekvivalenti goveđeg hemoglobina (GHE) izračunati prema kalibracijskoj krivulji goveđeg hemoglobina (Slika 1.) Kalibracijska krivulja je dobivena stavljanjem u odnos apsorbancije goveđeg hemoglobina, izmjerene na valnoj duljini od 540 nm, i njegove odgovarajuće koncentracije.



Slika 1. Kalibracijska krivulja goveđeg hemoglobina sa pripadajućom jednadžbom i nagibom pravca

Legenda: A_{540} = izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 540 nm (srednja vrijednost n=3 mjerenja)

3.6. Ispitivanje hidrofobnosti stanične površine

Hidrofobnost stanične površine (CSH, engl. *Cell surface hydrophobicity*) je biofizičko mjerenje afiniteta stanice za hidrofobnu okolinu, naspram hidrofilne. Stanice s višim CSH preferiraju hidrofobno okruženje, dok će one s nižim CSH-om preferirano ostati u vodenom okruženju (Krasowska i Singler, 2014.).

Hidrofobnost površina stanica kod bakterija utječe na njihovu sposobnost prijanjanja na površine, stvaranje biofilma, otpornosti na antibiotike i interakcije s okolišem. Razumijevanje i moduliranje hidrofobnim svojstvima bakterijskih stanica može imati implikacije u raznim

područjima, uključujući medicinu, industriju i znanosti o okolišu (Krasowska i Singler, 2014., Joyanes i sur. 1999.).

Mjerena je optička gustoća bakterijske suspenzije prije i nakon dodatka otapala ksilena te je izračunat postotak adherencije koji se naziva indeks hidrofobnosti (HFI %, engl. *Hydrophobicity index*) stanične površine što je u ovom slučaju mjera za afinitet bakterije prema ksilenu. Enterokokne kulture su nakon 24-satne inkubacije suspendirane u 0,9 %-tnoj otopini NaCl-a te je izmjerena optička gustoća koja je označena kao A_0 . Nakon toga je dodano 1,7 ml ksilena (Sigma-Aldrich, Njemačka) u bakterijsku suspenziju te je otopina stavljena na mješalicu (Vortex) točno 2 minute. Nakon odvajanja dviju faza izmjerena je optička gustoća vodene faze koja je označena kao A . Indeks hidrofobnosti se zatim računa pomoću vrijednosti A i A_0 prema formuli:

$$\text{HFI (\%)} = [(A_0 - A) \div A_0] \times 100 \text{ (Stepień-Pyśniak i sur., 2019.)}$$

Prema Stepień-Pysniak i suradnicima hidrofobno svojstvo imaju sojevi s $\text{HFI} \geq 50\%$ (Stepień-Pysniak i sur., 2019.), dok su Tahmourespur i suradnici (2008.) podijelili hidrofobnu skupinu na visoko hidrofobnu ($\text{HFI} > 70\%$), umjereno hidrofobnu ($\text{HFI} 50 - 70\%$) i nisko hidrofobnu ($\text{HFI} < 50\%$).

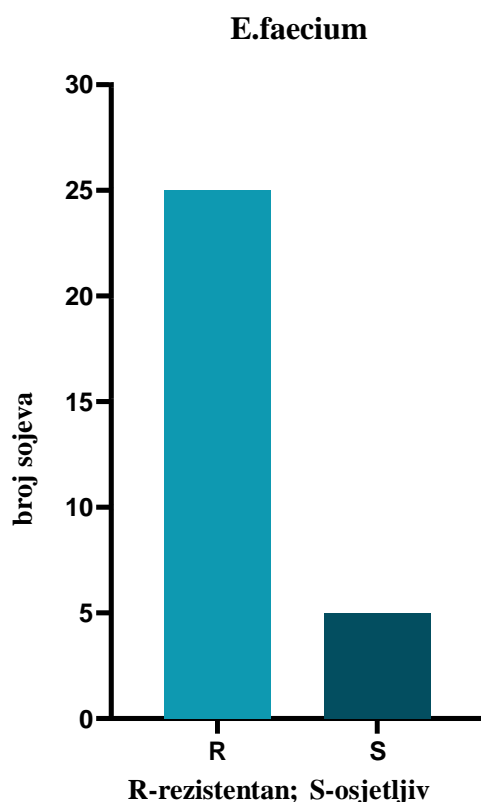
3.7. Statistička obrada podataka

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija n nezavisnih mjerenja, a za statističku obradu podataka korišten je programski paket Prism GraphPad (GraphPad Software, Inc., San Diego, SAD; www.graphpad.com). Podaci su obrađeni primjenom testa analize varijance (ANOVA) uz razinu statističke značajnosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

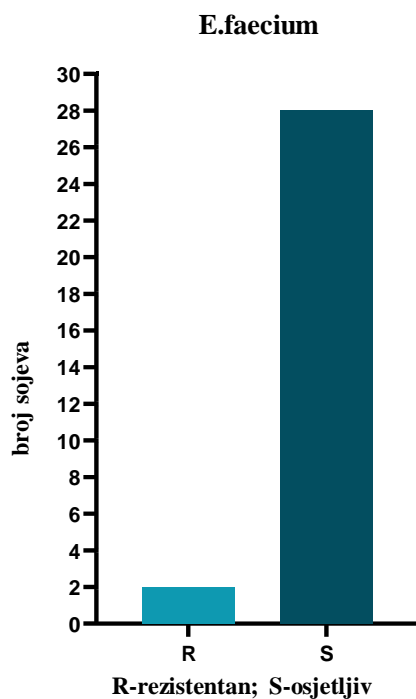
4.1. Rezultati određivanja osjetljivosti na vankomicin disk-difuzijskim postupkom

Disk-difuzijskom metodom je ispitana osjetljivost bakterije *E. faecium* na antimikrobni lijek vankomicin. Ispitano je 30 nasumičnih izolata iz svakog izvora; iz kliničkih uzoraka iz bolnice, iz hrane te iz otpadnih voda. Na Slici 2., Slici 3. i Slici 4. prikazani su rezultati ispitivanja.



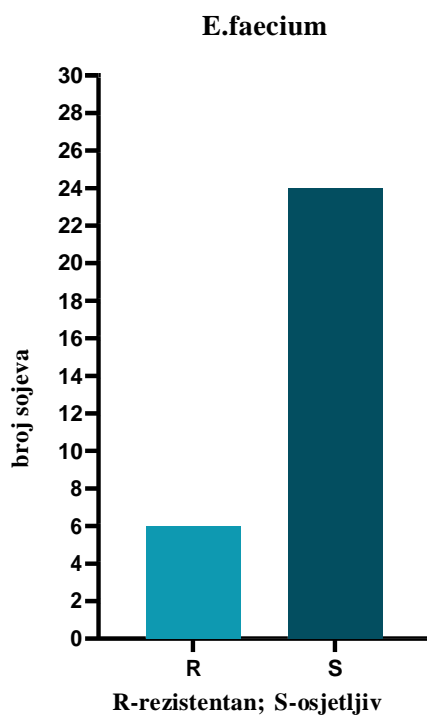
Slika 2. Prikazani rezultati osjetljivosti na vankomicin izolata *E. faecium* izdvojenih iz kliničkih uzoraka stolice, urina, hemokultura, kožnih promjena, rektalnih i perinealnih briseva.

Ispitivanje je pokazalo da je 25 sojeva *E. faecium* iz bolničke sredine rezistentno na antibiotik vankomicin, dok je samo 5 sojeva osjetljivo na navedeno antibiotik.



Slika 3. Prikazani rezultati osjetljivosti na vankomicin izolata *E. faecium* izdvojenih iz hrane.

Iz priloženog se vidi da je 28 od 30 sojeva iz hrane osjetljivo na vankomicin, a 2 soja su rezistentna.



Slika 4. Prikazani rezultati osjetljivosti na vankomicin izolata *E. faecium* izdvojenih iz otpadnih voda.

Iz Slike 4. se vidi da je 24 soja, izoliranih iz otpadnih voda, osjetljivo na vankomicin, a 6 sojeva je rezistentno.

Uzimajući u obzir podatke iz svih triju slika, može se uočiti značajna razlika u rezultatima kod sojeva iz bolničke okoline u odnosu na rezultate ispitivanja nad sojevima iz hrane i otpadne vode. Dok je broj rezistentnih sojeva na vankomicin u hrani i otpadnoj vodi približno isti, broj rezistentnih izolata iz bolnice je drastično veći. U bolničkom je okruženju čak 83,33% ispitanih izolata rezistentno na vankomicin, dok je u hrani 6,67%, a u vodi 20%. Dovodi se u pitanje je li razlog velikog broja rezistentnih enterokoka u bolnici činjenica da su bolnički sojevi češće izloženi antibioticima, pa tako i vankomicinu.

Istraživanje prema Goudarzi i sur. (2018.) je također pokazalo veću učestalost rezistencije na antibiotik vankomicin kod izolata bakterije *E. faecium* izoliranih iz bolnice, nego kod izolata iz okoliša. 45% kliničkih izolata ispitivane bakterije *E. faecium* bilo otporno na vankomicin, dok je samo 6% izolata iz okoliša pokazalo to svojstvo.

4.2. Rezultati ispitivanja sposobnosti tvorbe biofilma

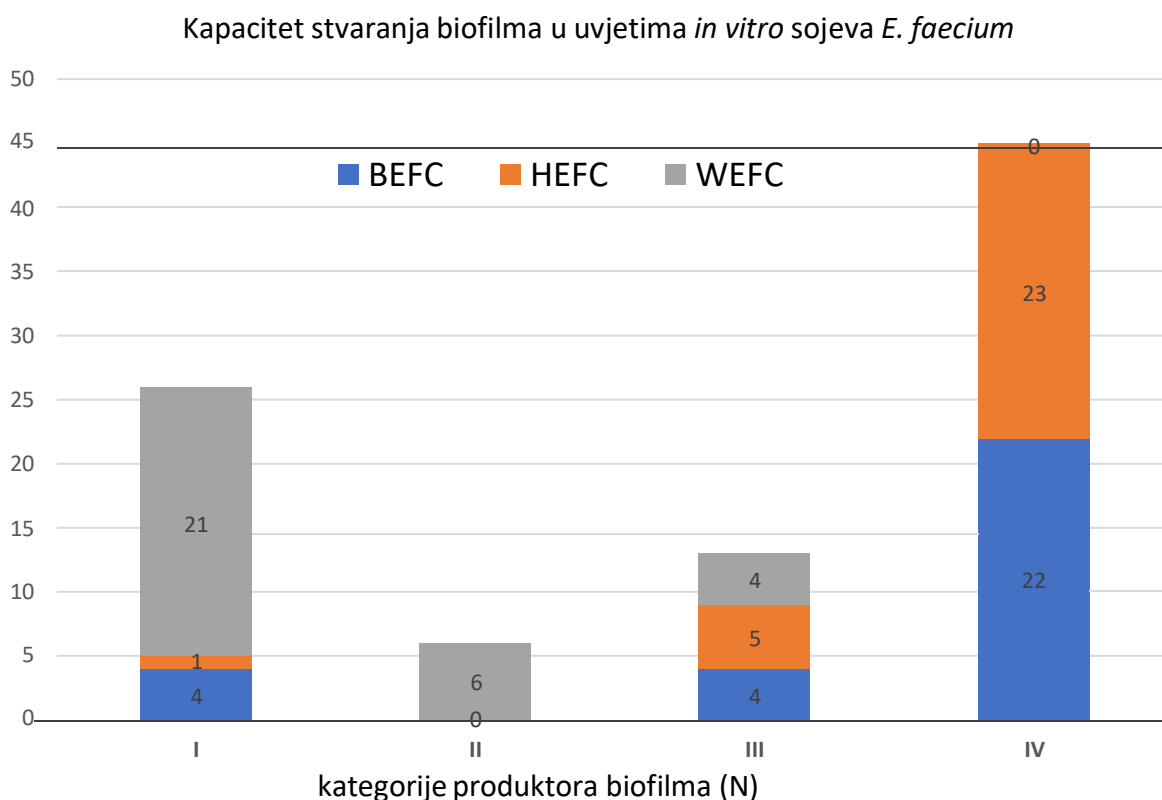
Ispitala se sposobnost tvorbe biofilma bakterije *Enterococcus faecium* iz tri različita izvora; bolnička sredina, otpadna voda te hrana. Uzeto je 30 sojeva iz svakog izvora koji su nakon istraživanja prema Stępień-Pyśniak i sur. (2019) klasificirani u jednu od četiri moguće kategorije s obzirom na tvorbu biofilma: jaki produktori biofilma (kategorija IV), umjereni produktori biofilma (kategorija III), slabi produktori biofilma (II) te neproduktori biofilma (kategorija I). Način klasifikacije sojeva prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Prikaz kriterija za klasifikaciju sojeva po produkciji biofilma prema Stępień-Pyśniak (2019)

Kategorija I (neproduktori biofilma)	$OD < ODc$
Kategorija II (slabi produktori biofilma)	$ODc < OD < 2 \times ODc$
Kategorija III (umjereni produktori biofilma)	$2 \times ODc < OD < 4 \times ODc$
Kategorija IV (jaki produktori biofilma)	$OD > 4 \times ODc$

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

Na Slici 5. su kategorijalno prikazani rezultati istraživanja.



Slika 5. Klasificirani sojevi po kategorijama s obzirom na stvaranje biofilma
Legenda: BEFC=sojevi bakterije *E. faecium* izolirani iz kliničkih uzoraka iz bolnice; HEFC=sojevi bakterije *E. faecium* izolirani iz hrane; WEFC=sojevi bakterije *E. faecium* izolirani iz otpadne vode; N=broj sojeva

Istraživanje je pokazalo da je 21 sojeva iz otpadne vode neproduktor biofilma, 6 sojeva je slabi produktor biofilma te je 4 soja umjereni produktor biofilma. Nijedan soj iz otpadnih voda nije bio jaki produktor biofilma. Također iz priloženog se vidi da je 1 soj iz hrane neproduktor biofilma, 5 soja umjereni produktor i 23 soja su bili jaki produktori biofilma. Dok je u bolničkoj sredini 4 soja bilo neproduktor biofilma, 4 soja umjereni produktor i 22 soja jaki produktori biofilma.

Rezultati pokazuju da ispitivani izolati iz bolnice i hrane imaju puno veći afinitet prema stvaranju biofilma od izolata iz otpadnih voda. 86,67% kliničkih sojeva; 96,55% sojeva iz hrane te svega 32,26% sojeva iz otpadnih voda je bilo sposobno stvarati biofilm.

Kvantitativna procjena stvaranja biofilma iz studije prema Goudarzi i sur. (2018.) utvrđeno je da 49% bolničkih izolata otpornih na vankomicin i 33% izolata osjetljivih na vankomicin može proizvesti biofilm. Ovaj je nalaz bio čak niži od izvješća drugih istraživača. U Japanu je prema istraživanju Seno i sur. (2005.) 63% kliničkih izolata *E. faecium* bilo sposobno stvarati biofilm, a u Španjolskoj prema istraživanju Tendolkar i sur. (2004.) 62% te u SAD-u prema istraživanju Toledo-Arana i sur. (2001.) 79%. Rezultat našeg istraživanja se pokazao sličnim jer je 86,67% ispitivanih bolničkih sojeva bakterije *E. faecium* bilo sposobno stvarati biofilm.

Zanimljivo je da su podaci iz studije prema Goudarzi i sur. (2018.) pokazali da su sojevi *E. faecium* koji proizvode biofilm bili otporniji na antibiotike od sojeva koji ne proizvode biofilm te da su karakterizirani s više gena virulentnosti i otpornosti. Slično zapaženje je zamijećeno i u našem istraživanju budući da su ispitivani bolnički izolati *E. faecium* pokazali najveću rezistentnost na vankomicin jer je čak 83,33% izolata pokazalo rezistenciju, ali i veliku sposobnost stvaranja biofilma. 86,67% bolničkih izolata je bilo sposobno stvarati biofilm. Isto tako, mali broj ispitivani izolati iz otpadnih voda je bilo rezistentno na vankomicin (20%) i sposobno stvarati biofilm (32,26%). Ova teza međutim se nije pokazala primjenjiva kod ispitivanih izolata iz hrane jer je samo 6,67% izolata bilo rezistentno na vankomicin, ali čak 95,55% je bilo u mogućnosti stvarati biofilm.

Slično našim rezultatima, istraživanje Marinho i sur. (2013.) također pokazuje da je veliki broj sojeva *E. faecium* izoliranih iz hrane bilo sposobno stvarati biofilm. Pri 37°C su svi ispitivani izolati stvorili biofilm, a 57,1% sojeva je pripadalo kategoriji jakih produkatora. U istraživanju Marinho i sur. (2013.) se koristila ista metoda bojanjem otopinom kristal violet, a sojevi su također ispitivani u otapalu TSB s dodatkom glukoze kao i u našem istraživanju.

4.3. Rezultati ispitivanja hidrofobnosti stanične površine

Na ukupno 90 prikupljenih sojeva iz tri već navedena izvora utvrđena je hidrofobnost stanične površine (CSH) u uvjetima in vitro. Svaki soj je svrstan u jednu od slijedećih kategorija s obzirom na izračunati indeks hidrofobnosti (HFI%): visoko hidrofobna skupina, umjereno hidrofobna skupina i nisko hidrofobna skupina. Visoko hidrofobna skupina čini sojeve koji imaju $HFI > 70\%$, umjereno hidrofobna skupina su sojevi s HFI između 50 i 70%, a nisko hidrofobna skupina su sojevi s $HFI < 50\%$ (Tahmourespur, 2008.) Dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 2.

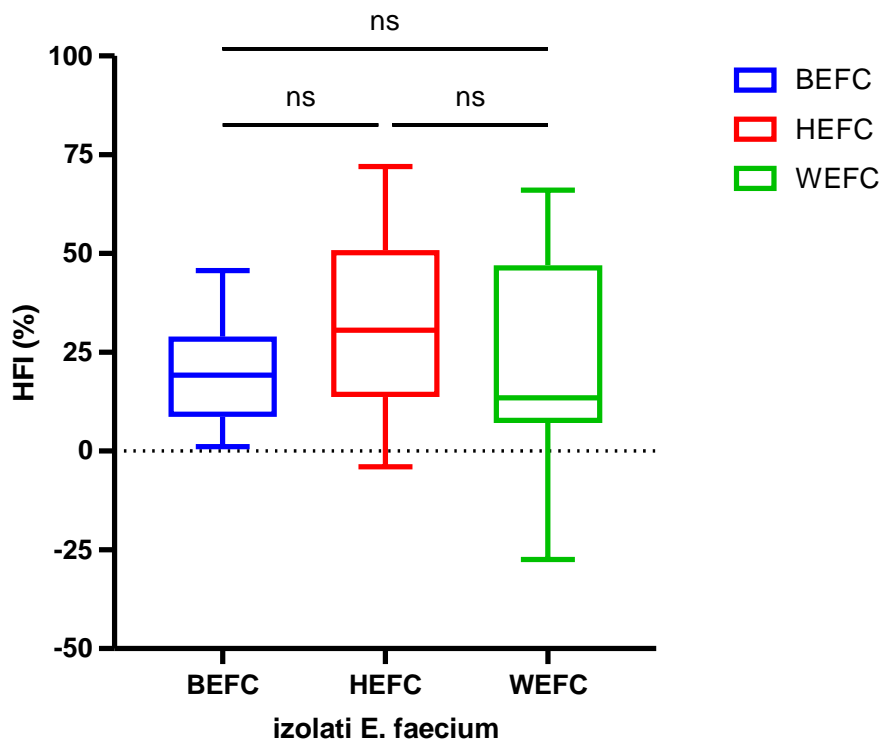
Tablica 2. Kategorijalni prikaz hidrofobnosti stanične površine sojeva *E. faecium* (prema Tahmourespur i sur., 2008.)

Mjesto izolacije sojeva <i>E. faecium</i>	Visoko hidrofobna skupina	Umjereno hidrofobna skupina	Nisko hidrofobna skupina
	N (%)		
BEFC (N=30)	0	0	30 (100)
HEFC (N=30)	1 (3,3)	6 (20)	23 (76,7)
WEFC (N=30)	0	5 (16,7)	25 (83,3)

Legenda: BEFC=sojevi bakterije *E. faecium* izolirani iz kliničkih uzoraka iz bolnice; HEFC=sojevi bakterije *E. faecium* izolirani iz hrane; WEFC=sojevi bakterije *E. faecium* izolirani iz otpadne vode; N=broj sojeva

Pregledom Tablice 2. može se uočiti da je svih 30 sojeva *E. faecium* izoliranih iz kliničkih uzoraka iz bolnice svrstano u nisko hidrofobnu skupinu što znači da je indeks hidrofobnosti tih sojeva bio manji od 50%. Rezultati ispitivanja za sojeve *E. faecium* izolirane iz hrane i sojeve izolirane iz otpadne vode su slični. 3,3% sojeva izoliranih iz hrane pripadaju visoko hidrofobnoj skupini, 20% umjereno hidrofobnoj, a 76,7% nisko hidrofobnoj skupini. Nijedan soj izoliran iz otpadnih voda ne pripada visoko hidrofobnoj skupini, a 16,7% sojeva je u umjereno hidrofobnoj skupini i 83,3% u nisko hidrofobnoj skupini. Dakle, ispitani sojevi iz hrane i otpadnih voda imaju sličnu hidrofobnost stanične površine što se povezuje sa sličnom tendencijom stvaranja biofilma i rezistencije na antibiotike, a u korist sličnosti osjetljivosti na antibiotike govore i rezultati ispitivanja prikazani na Slikama 3. i 4. Međutim sposobnost stvaranja biofilma ispitanih sojeva iz hrane i otpadnih voda se nije pokazala slična u ovom istraživanju.

Rezultati ispitivanja stanične hidrofobnosti su također prikazani i kutijastim dijagramom na Slici 6. Kutijasti dijagram prikazuje odnos minimuma, maksimuma, donjeg i gornjeg kvartila te medijana podataka. Na y-osi su prikazane vrijednosti indeksa hidrofobnosti, HFI (%).



Slika 6. Kutijasti dijagram hidrofobnosti stanične površine sojeva bakterije *E. faecium* (N=90)
Legenda: BEFC=sojevi bakterije *E. faecium* izolirani iz kliničkih uzoraka iz bolnice; HEFC=sojevi bakterije *E. faecium* izolirani iz hrane; WEFC=sojevi bakterije *E. faecium* izolirani iz otpadne vode; ns=nije statistički značajno; HFI= indeks hidrofobnosti stanične površine ($p>0.05$, ANOVA, Turkeyev *post hoc* test)

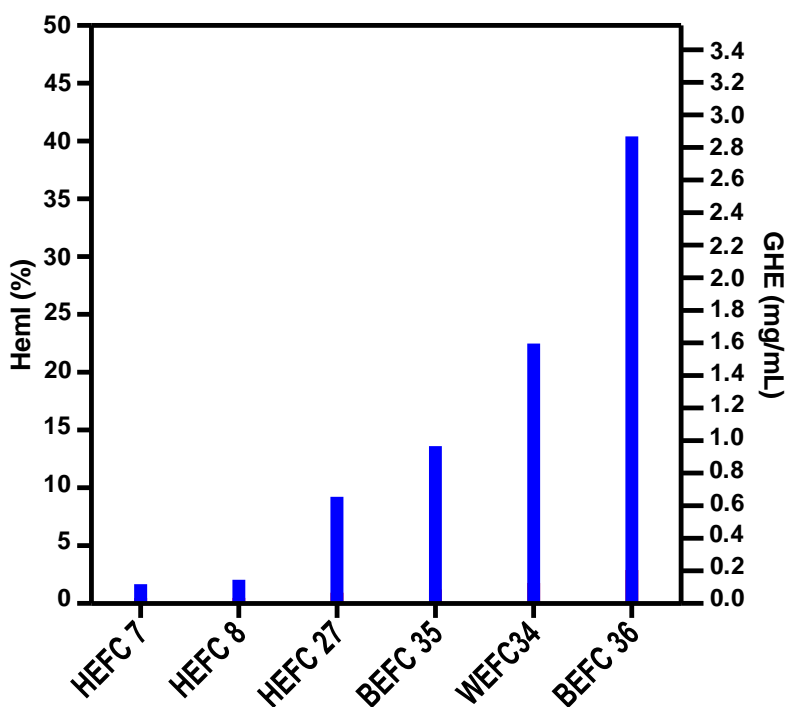
Prema prikazanom dijagramu može se vidjeti da su sojevi izolirani iz hrane imali najveću hidrofobnost stanične površine jer imaju najveće vrijednosti u sva tri parametra; prosječni HFI, maksimalni HFI i minimalni HFI. Najmanje vrijednosti prosječne i maksimalne HFI zabilježene su kod sojeva izoliranih iz bolničke sredine. Kod sojeva iz otpadne vode se primjećuje najveća oscilaciju između rezultata jer je kod tih sojeva najveća razlika između minimalne i maksimalne vrijednosti HFI.

Kao što je već rečeno, hidrofobnost stanične površine kod bakterija ima ključnu ulogu u proizvodnji biofilma jer potiče početnu adheziju stanica na površinu i stabilnost biofilma. Međutim, u ovom istraživanju se nije pokazala korelacija između hidrofobnosti stanične površine pojedinih izolata sa njihovom tvorbom biofilma. Dok su izolati iz kliničkih uzoraka i hrane pokazali značajni afinitet prema stvaranju biofilma, većina njih, odnosno 76,7% izolata iz hrane te 100% izolata iz bolnice, je pripadala skupini nisko hidrofobne stanične površine.

Ovakav zaključak se također može pronaći u studiji Cho i sur. (2022.) u kojoj dobivene hidrofobnosti stanične površine ispitivanih sojeva nisu bile u korelaciji s ukupnom sposobnošću stvaranja biofilma mikroorganizama. Takvi rezultati su pokazali da hidrofobnost stanične površine nije primarna determinanta sposobnosti stvaranja biofilma kod testiranih patogena.

4.4. Rezultati ispitivanja β -hemolitičke aktivnosti

Ispitivanje β -hemolitičke aktivnosti na konjskom krvnom agaru se izvodilo na 90 sojeva bakterije vrste *E. faecium*. Uzeto je 30 sojeva iz svakog izvora; iz kliničkih uzoraka stolice, urina, hemokultura, kožnih promjena, rektalnih i perinealnih briseva te iz hrane i iz otpadnih voda. β -hemolitičku aktivnost je pokazalo svega 6 soja od ispitanih 90. Sojevi koji su pokazali hemolitičku aktivnost na konjskom krvnom agru su nadalje ispitivani sa eritrocitima iz ljudske krvi. Količina oslobođen ljudskog hemoglobina kod svakog soja izražena je kao ekvivalent goveđeg hemoglobina (GHE) izračunatog pomoću kalibracijske krivulje prikazane na Slici 1.



Slika 7. Graf s prikazanom raspodjelom hemolitičkog učinka prema rastućim vrijednostima pojedinih hemolitički aktivnih sojeva u odnosu na goveđi hemoglobin

Legenda: BEFC=sojevi bakterije *E. faecium* izolirani iz kliničkih uzoraka iz bolnice; HEFC=sojevi bakterije *E. faecium* izolirani iz hrane; WEFC=sojevi bakterije *E. faecium* izolirani iz otpadne vode; HemI (%)=hemolitički učinak (%); GHE=ekvivalent goveđeg

hemoglobina (mg/ml) izračunat prema kalibracijskoj krivulji dobivenoj stavljanjem u odnos apsorbancije goveđeg hemoglobina, izmjerene na valnoj duljini od 540 nm, i njegove odgovarajuće koncentracije

Iz Slike 7. je vidljivo da su, od 90 ispitivanih sojeva, svega tri soja izolirana iz hrane, dva soja iz bolničke sredine te jedan iz otpadnih voda β -hemolitički aktivno. U Tablici 3. prikazane su izračunate vrijednosti hemolitičkih indeksa (HemI) i ekvivalenta goveđeg hemoglobina (GHE) za svaki od β -hemolitički aktivnih (pozitivnih) ispitivanih sojeva.

Tablica 3. Kategorijalni prikaz β -hemolitički aktivnih sojeva *E. faecium*

Mjesto izolacije sojeva <i>E. faecium</i>		HemI (%)	GHE (mg/ml)
Sojevi izolirani iz hrane (N=3; 3,33%)	HEFC 7	1,698	0,482
	HEFC 8	2,056	0,504
	HEFC 27	9,238	0,955
Sojevi izolirani iz bolničke sredine (N=2; 2,22%)	BEFC 35	13,618	1,229
	BEFC 36	40,414	2,909
Soj izoliran iz otpadnih voda (N=1; 1,11%)	WEFC 34	22,502	1,786

Legenda: BEFC=sojevi bakterije *E. faecium* izolirani iz kliničkih uzoraka iz bolnice; HEFC=sojevi bakterije *E. faecium* izolirani iz hrane; WEFC=sojevi bakterije *E. faecium* izolirani iz otpadne vode; HemI=hemolitički indeks (%); GHE=ekvivalent goveđeg hemoglobina izračunat prema kalibracijskoj krivulji dobivenoj stavljanjem u odnos apsorbancije goveđeg hemoglobina, izmjerene na valnoj duljini od 540 nm, i njegove odgovarajuće koncentracije

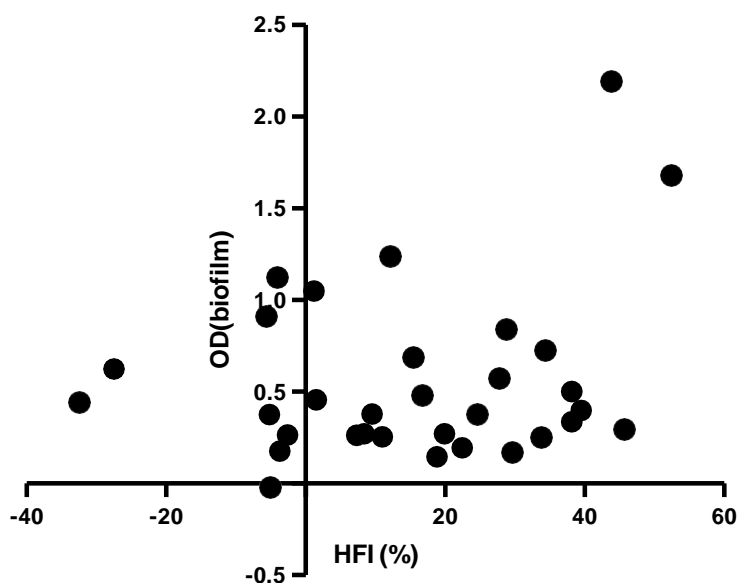
Rezultati pokazuju kako je vrlo mali postotak ispitivanih sojeva β -hemolitički aktivan te da hemoliza nije česti virulentni čimbenik kod sojeva *E. faecium*. Isti zaključak se može izvući iz studije Elsner i sur. (2000.) u kojoj je ispitivano 89 sojeva bakterije *E. faecalis* i 24

sojeva *E. faecium* te se pokazalo da je 16% ispitivanih *E. faecalis* i 0% ispitivanih *E. faecium* sojeva proizvelo hemolizin koji je potreban za njihovu hemolitičku aktivnost.

Također, studija prema Semedo i sur. (2003.) koja je uključivala 164 enterokoka, od kojih je 21 sojeva bilo vrste *E. faecium*, pokazala je da su 3 klinički izolirana soja *E. faecium* od ispitivanih 7 pokazala β -hemolitičku aktivnost, dok nijedan soj iz hrane od izoliranih 14 nije bio β -hemolitički aktivan. Dakle 42,86% sojeva iz bolnice te 0% sojeva iz hrane se pokazalo β -hemolitički aktivnima u aerobnim i anaerobnim uvjetima.

4.5. Korelacija na vankomicin-otpornih sojeva (VRE) *E. faecium* sa indeksom hidrofobnosti stanične površine i stvaranja biofilma

Na Slici 8. prikazani su međudnosi indeksa hidrofobnosti stanične stijenke (HFI%) i sposobnosti stvaranja biofilma (OD_{biofilm}) u uvjetima in vitro za populaciju izolata na vankomicin otpornih ispitivanih sojeva (VRE) vrste *E. faecium*. Provjerom korelacijskog odnosa HFI% i stvaranja biofilma (OD) utvrđen je niski stupanj povezanosti sojeva VRE sojeva sa Pearsonovim koeficijentom 0,2323; $R^2=0,05395$, dok je $p=0,2008$ na $N=32$ uzorka sojeva. Na osnovu statsitičke obrade može se zaključiti da HFI ne korelira sa sposobnošću stvaranja biofilma u VRE ispitivanih sojeva u ovom radu.



Slika 8. Usporedba indeksa hidrofobnosti stanične stijenke sa stvaranjem biofilma na 32 soja na vankomicin rezistentnih *E. faecium* (VRE)

Legenda: OD=srednja vrijednost produkcije biofilma u jažici; HFI%=indeks hidrofobnosti stanične površine

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih istraživanja u uvjetima *in vitro*, statističke obrade podatka te rasprave može se zaključiti sljedeće:

- Daleko veći broj ispitivanih *E. faecium* sojeva izoliranih iz bolničke sredine ima rezistenciju na antimikrobni lijek vankomicin u odnosu na ispitivane sojeve izolirane iz hrane te iz otpadnih voda; 83,33% ispitanih bolničkih sojeva te 6,67% sojeva iz hrane i 20% sojeva iz otpadnih voda rezistentno je na vankomicin, utvrđeno fenotipski.
- Ispitivani sojevi izolirani iz hrane i bolničke sredine imaju značajno veći afinitet prema stvaranju biofilma u odnosu na sojeve izolirane iz hrane te iz otpadnih voda; 22 soja iz bolnice i 23 soja iz hrane su svrstani u jake produktore biofilma, a nijedan iz otpadnih voda.
- Najveća hidrofobnost stanične površine se pokazala kod sojeva izoliranih iz hrane; 3,3% sojeva iz hrane pripada visoko hidrofobnoj skupini, 20% umjereno hidrofobnoj te 76% nisko hidrofobnoj. Svi sojevi iz bolničke sredine pripadaju skupini niske hidrofobnosti, dok je 16,7% sojeva iz otpadnih voda u skupini umjerene hidrofobnosti i 83,3% u skupini niske hidrofobnosti.
- β -hemolitička aktivnost je dokazana kod svega šest (6,67%) sojeva, od ispitivanih 90, od kojih su tri (3,33%) hemolitička aktivna soja izolirana iz hrane, dva (2,22%) iz kliničkih uzoraka te jedan (1,11%) iz otpadnih voda. Izračunati hemolitički indeks i GHE za sojeve su imali najveće vrijednosti kod sojeva iz otpadne vode i hrane, dok su kod bolničkih izolata bile značajno manje.
- Sojevi izolirani iz kliničkih uzoraka i hrane su pokazali značajniju virulenciju od izolata iz otpadnih voda što se tiče virulentnih čimbenika rezistencije na vankomicin, tvorbu biofilma i hemolitičku aktivnost, dok su sojevi iz otpadnih voda pokazali značajnije vrijednosti stanične hidrofobnosti.
- Izolati iz hrane su dominantni u tri od četiri ispitanih virulentnih čimbenika, dakle najveći broj sojeva koji su stvorili biofilm, pokazali hemolitičku aktivnost i najveće vrijednosti hidrofobnosti stanične površine su izolirani iz hrane.
- Bolnički izolati su pokazali veliku virulenciju što se tiče rezistencije na vankomicin i tvorbe biofilma, 83,33% izolata je bilo rezistentno na vankomicin te je 73,33% istih izolata bilo svrstano u kategoriju jakih produktora biofilma.
- U ispitivanih sojeva rezistentnih na vankomicin (VRE) nije uočena korelacija virulentnih čimbenika hidrofobnosti stanične površine (HFI) i stvaranja biofilma u uvjetima *in*

vitro. No isptivanje je provedeno na malom uzorku sojeva VRE te se ne može izvući opći zaključak moguće korelacije.

Rezultatima ovog istraživanja pokazana je razlika u osjetljivosti na antibiotik vankomicin te razlika u virulentnim čimbenicima između izolata izoliranih iz tri različita izvora. S obzirom na relativno mali broj sojeva s tri različita izolacijska mjesta, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se shvatili mehanizmi nastanka različitih virulentnih čimbenika i moguća povezanost sa rezistencijom na pojedine antibiotike.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

16S rRNA = 16S ribosomska ribonukleinska kiselina (engl. *16S ribosomal ribonucleic acid*)

A = apsorbancija

A₀ = početna apsorbancija

AFLP = polimorfizam dužine amplificiranih fragmenata (engl. *amplified fragment length polymorphism*)

Ala = alanin

ATCC = Američka zbirka tipskih kultura (engl. *American Type Culture Collection*)

BEFC = bolnički sojevi *E. faecium*

CC17 = klonalni kompleks 17 (engl. *clonal complex 17*)

CDC = Centar za kontrolu i prevenciju bolesti SAD-a (engl. *Centers for disease and control and prevention*)

CSH = hidrofobnost stanične površine (engl. *cell surface hydrophobicity*)

Cyl = citolizin (engl. *cytolysin*)

DNA = deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

ESKAPE = akronim za vrste: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp.

Esp = enterokokni površinski protein (engl. *enterococcal surface protein*)

EUCAST = Europski odbor za testiranje antimikrobne osjetljivosti (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

GHE = ekvivalent goveđeg hemoglobina

HEFC = iz hrane izolirani sojevi *E. faecium*

HFI (%) = indeks hidrofobnosti

HemI = hemolitički indeks

HVI = Hrvatski veterinarski institut

HZJZ = Hrvatski zavod za javno zdravstvo

IS = insercijska sekvenca

KAE = kanamicin-eskulinski agar (engl. *Kanamycin Aesculin Agar*)

Lac = laktat (engl. *lactate*)

MALDI-TOF = matriksom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (engl. *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*)

MRSA = na meticilin otporni (rezistentni) sojevi vrste *Staphylococcus aureus* (engl. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)

OD = optička gustoća (engl. *optical density*)

ODc = granična optička gustoća (engl. *optical density cut-off value*)

PBP-5 = penicilin vežući protein 5 (engl. *penicillin binding protein 5*)

KBC = Klinički bolnički centar

PBS = fosfatno puferiranu fiziološku otopinu (engl. *phosphate-buffered saline*)

PCR = lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

SAD = Sjedinjene Američke Države

TSA = tripton soj agar (engl. *trypticase soy agar*)

TSB = triptični soj bujon (engl. *tryptic soy broth*)

UV = ultraljubičasto zračenje (engl. *ultra-violet radiation*)

VRE = na vankomicin otporni (rezistentni) enterokoki (engl. *Vancomycin Resistant Enterococci*)

WEFC = iz otpadnih voda izolirani sojevi *E. faecium*

7. LITERATURA

Cho JA, Roh, YJ, Son HR. Assessment of the biofilm-forming ability on solid surfaces of periprosthetic infection-associated pathogens. *Sci Rep*, 2022, 12, 18669.

Elsner HA, Sobottka I, Mack D, Claussen M, Laufs R, Wirth R. Virulence Factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Blood Culture Isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2000, 19, 39–42.

Fernández-Hidalgo N, Almirante B, Gavaldà J. Ampicillin plus ceftriaxone is as effective as ampicillin plus gentamicin for treating *Enterococcus faecalis* infective endocarditis. *Clin Infect Dis*, 2013, 56,1261.

Fiore E, Van Tyne D, Gilmore MS. Pathogenicity of *Enterococci*. *Microbiol Spectr*, 2019, 7(4):10.1128.

Gajewska J, Chajęcka-Wierzchowska W, Byczkowska-Rostkowska Z, Saki M. Biofilm Formation Capacity and Presence of Virulence Determinants among *Enterococcus* Species from Milk and Raw Milk Cheeses. *Life (Basel)*, 2023, 10, 13(2), 495.

Gao W, Howden, BP, Stinear TP. Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 41, 76–82.

Gilmore, M. S., D. B. Clewell, Y. Ike and N. Shankar: *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014, str. 123-185.

Goudarzi M, Mobarez AM, Najar-Peerayeh S, Mirzaee M. Prevalence of biofilm formation and vancomycin-resistant genes among *Enterococcus faecium* isolated from clinical and environmental specimens in Lorestan hospitals. *Iran J Microbiol*, 2018, 10(2), 74-81.

Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus, *Virulence*, 2012, 3, 5, 421-569.

Jovanović M, Velebit B, Tošić T. Comparative study of virulence factor genes, β -hemolysis and biofilm production in invasive and colonizing enterococci. *European Journal of Inflammation*, 2023, 21.

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

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, 2014.00112 (112), 112.

Marinho AR, Martins PD, Ditmer EM, d'Azevedo PA, Frazzon J, Sand STVD. Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food. *Braz J Microbiol*, 2013, 44(2), 423-6.

Miller WR, Murray BE, Rice LB, Arias CA. Resistance in Vancomycin-Resistant enterococci. *Infect Dis Clin North Am*, 2020, 34(4), 751-771.

Miller, W. R., J. M. Munita, C. A. Arias. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert. Rev. Anti-Infe*, 2014, 12, 1221-1236.

Murray PR PhD, Kobayashi GS PhD, Rosenthal KS PhD, Pfaller MA MD. Medical Microbiology. Mosby, 1998, str. 125.

Paun O, Schönswetter P. Amplified fragment length polymorphism: an invaluable fingerprinting technique for genomic, transcriptomic, and epigenetic studies. *Methods Mol Biol*, 2012, 862, 75-87.

Pintarić S, Šeol Martinec B. Rezistencija enterokoka na antibiotike i preporuke za liječenje. *Veterinarska stanica*, 2018, 49 (2), 105-116.

Semedo T, Almeida Santos M, Martins P, Silva Lopes MF, Figueiredo Marques JJ, Tenreiro R, Barreto Crespo MT. 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), 2569-76.

Seno Y, Kariyama R, Mitsuhashi R, Monden K, Kumon H. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta Med Okayama*, 2005, 59, 79–87.

Stępień-Pyśniak D, Hauschild T, Kosikowska U, Dec M, Urban-Chmiel R. Biofilm formation capacity and presence of virulence factors among commensal *Enterococcus spp.* from wild birds. *Sci Rep*, 2019, 9(1), 11204.

Tahmourespour A, Kasra Kermanshahi R, 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.

Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*, 2004, 72, 6032–6039.

Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67, 4538–4545.

Zhou X, Willems RJL, Friedrich AW. *Enterococcus faecium*: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2020, 9, 130.

8. SAŽETAK/ SUMMARY

8.1. SAŽETAK

Bakterija *Enterococcus faecium* je komenzalni organizmi u mikrobioti probavnog sustava čovjeka, ali ih nalazimo i u okolišu, tlu, vodama, hrani, biljkama i životinjama. Ovi koki smatraju se i oportunističkim patogenima jer mogu uzorkovati razne infekcije u čovjeka. Cilj ovog rada je ispitati osjetljivost prikupljenih bakterijskih sojeva *E. faecium* na antimikrobni lijek vankomicin te ispitati slijedeće virulentne čimbenike; stvaranje biofilma, β -hemolitičku aktivnost te hidrofobnost stanične površine. Prikupljeno je 90 sojeva bakterije *Enterococcus faecium* iz tri različita izvora; klinički uzorci iz bolničke sredine, hrana te otpadne vode. Iz svakog izvora uzeto je 30 sojeva. Ispitivanjem osjetljivosti sojeva na antibiotik vankomicin utvrđeno je da je najveći broj rezistentnih sojeva prikupljeno iz bolničke sredine, a ispitivanjem sposobnosti stvaranja biofilma pokazalo se da su sojevi izolirani iz bolnice i hrane značajno bolji produktori biofilma od sojeva izoliranih iz otpadnih voda. Također, utvrđeno je da izolati iz hrane imaju najveću hidrofobnost stanične površine, a ispitivanjem β -hemolitičke aktivnosti 90 sojeva utvrđeno je da su svega šest soja β -hemolitički aktivna; tri izolata iz hrane, dva iz bolnice te jedan iz otpadnih voda. U ispitivanih sojeva rezistentnih na vankomicin (VRE) nije uočena korelacija virulentnih čimbenika hidrofobnosti stanične površine i stvaranja biofilma u uvjetima in vitro. Međutim, ispitivanje je provedeno na malom uzorku sojeva VRE te se ne može izvući opći zaključak moguće korelacije. Iz dobivenih se podataka može zaključiti da postoji razlika u virulentnim čimbenicima između izoliranih sojeva bakterije *E. faecium*, stoga se početna hipoteza pokazala točnom.

8.2. SUMMARY

The bacterium *Enterococcus faecium* is a commensal organism in the microbiota of the human digestive system, but we also find it in the environment, soil, water, food, plants and animals. These cocci are also considered opportunistic pathogens because they can sample various infections in humans. The aim of this study is to test the sensitivity of the collected bacterial strains of *E. faecium* to the antimicrobial drug vancomycin and to test the following virulence factors; biofilm formation, β -hemolytic activity and hydrophobicity of the cell surface. 90 strains of *Enterococcus faecium* bacteria were collected from three different sources; clinical samples from the hospital environment, food and waste water. 30 strains were taken from each source. Testing the sensitivity of the strains to the antibiotic vancomycin showed that the largest number of resistant strains were collected from the hospital environment and testing the ability to form biofilms showed that strains isolated from hospitals and food are significantly better biofilm producers than strains isolated from wastewater. Also, it was determined that isolates from food have the highest hydrophobicity of the cell surface and testing the β -hemolytic activity of 90 strains revealed that only six strains are β -hemolytically active; three isolates from food, two from the hospital and one from waste water. From the examined vancomycin-resistant (VRE) strains, no correlation was observed between the virulence factors of cell surface hydrophobicity and biofilm formation under in vitro conditions. However, the test was conducted on a small sample of VRE strains and a general conclusion of a possible correlation cannot be drawn. From the obtained data, it can be concluded that there is a difference in virulence factors between the isolated strains of *E. faecium* bacteria, therefore the initial hypothesis proved to be correct.

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 FAECIUM IZ RAZLIČITIH IZOLACIJSKIH IZVORA

Silvia Novak

SAŽETAK

Bakterija *Enterococcus faecium* je komenzalni organizmi u mikrobioti probavnog sustava čovjeka, ali ih nalazimo i u okolišu, tlu, vodama, hrani, biljkama i životinjama. Ovi koki smatraju se i oportunističkim patogenima jer mogu uzorkovati razne infekcije u čovjeka. Cilj ovog rada je ispitati osjetljivost prikupljenih bakterijskih sojeva *E. faecium* na antimikrobni lijek vankomicin te ispitati slijedeće virulentne čimbenike; stvaranje biofilma, β -hemolitičku aktivnost te hidrofobnost stanične površine. Prikupljeno je 90 sojeva bakterije *Enterococcus faecium* iz tri različita izvora; klinički uzorci iz bolničke sredine, hrana te otpadne vode. Iz svakog izvora uzeto je 30 sojeva. Ispitivanjem osjetljivosti sojeva na antibiotik vankomicin utvrđeno je da je najveći broj rezistentnih sojeva prikupljeno iz bolničke sredine, a ispitivanjem sposobnosti stvaranja biofilma pokazalo se da su sojevi izolirani iz bolnice i hrane značajno bolji produktori biofilma od sojeva izoliranih iz otpadnih voda. Također, utvrđeno je da izolati iz hrane imaju najveću hidrofobnost stanične površine, a ispitivanjem β -hemolitičke aktivnosti 90 sojeva utvrđeno je da su svega šest soja β -hemolitički aktivna; tri izolata iz hrane, dva iz bolnice te jedan iz otpadnih voda. U ispitivanih sojeva rezistentnih na vankomicin (VRE) nije uočena korelacija virulentnih čimbenika hidrofobnosti stanične površine i stvaranja biofilma u uvjetima in vitro. Međutim, ispitivanje je provedeno na malom uzorku sojeva VRE te se ne može izvući opći zaključak moguće korelacije. Iz dobivenih se podataka može zaključiti da postoji razlika u virulentnim čimbenicima između izoliranih sojeva bakterije *E. faecium*, stoga se početna hipoteza pokazala točnom.

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

Rad sadrži: 30 stranica, 8 grafičkih prikaza, 3 tablice i 26 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *E. faecium*, virulencija, hemoliza, hidrofobnost stanične površine, biofilm.

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

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 BACTERIA ENTEROCOCCUS FAECIUM FROM DIFFERENT ISOLATION SOURCES

Silvia Novak

SUMMARY

The bacterium *Enterococcus faecium* is a commensal organism in the microbiota of the human digestive system, but we also find it in the environment, soil, water, food, plants and animals. These cocci are also considered opportunistic pathogens because they can sample various infections in humans. The aim of this study is to test the sensitivity of the collected bacterial strains of *E. faecium* to the antimicrobial drug vancomycin and to test the following virulence factors; biofilm formation, β -hemolytic activity and hydrophobicity of the cell surface. 90 strains of *Enterococcus faecium* bacteria were collected from three different sources; clinical samples from the hospital environment, food and waste water. 30 strains were taken from each source. Testing the sensitivity of the strains to the antibiotic vancomycin showed that the largest number of resistant strains were collected from the hospital environment and testing the ability to form biofilms showed that strains isolated from hospitals and food are significantly better biofilm producers than strains isolated from wastewater. Also, it was determined that isolates from food have the highest hydrophobicity of the cell surface and testing the β -hemolytic activity of 90 strains revealed that only six strains are β -hemolytically active; three isolates from food, two from the hospital and one from waste water. From the examined vancomycin-resistant (VRE) strains, no correlation was observed between the virulence factors of cell surface hydrophobicity and biofilm formation under in vitro conditions. However, the test was conducted on a small sample of VRE strains and a general conclusion of a possible correlation cannot be drawn. From the obtained data, it can be concluded that there is a difference in virulence factors between the isolated strains of *E. faecium* bacteria, therefore the initial hypothesis proved to be correct.

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

Thesis includes: 30 pages, 8 figures, 3 tables and 26 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *E. faecium*, virulence, hemolysis, cell-surface hydrophobicity, biofilm.

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

The thesis was accepted: July, 2023.