

Fenotipska karakterizacija i antimikrobni profil uropatogenih enterokoka

Phenotypic characterization and antimicrobial profile of uropathogenic enterococci

Davorka Repac Antić^{1*}, Ivana Gobin², Gabrijele Begić², Sanja Štifter³, Maja Abram¹

¹Klinički zavod za kliničku mikrobiologiju, Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka

²Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

³Zavod za patologiju i patološku anatomiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

Sažetak. Cilj: Istražiti odabrane čimbenike virulencije te antimikrobnu osjetljivost/rezistenciju uropatogenih bakterija *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*. **Materijali i metode:** Ukupno 96 urinarnih izolata enterokoka identificirano je standardnim i automatiziranim biokemijskim postupcima. Fenotipskim metodama dokazana je prisutnost kazeinaze i želatinaze te lipaze. Metodom agar dilucije određena je rezistencija prema lizozimu. Disk-difuzijskom i mikrodilucijskom metodom ispitana je osjetljivost/rezistencija izolata prema odabranim antibioticima. **Rezultati:** Od ukupnog broja uropatogenih enterokoka *E. faecalis* identificiran je u 79,2 %, a *E. faecium* u 20,8 % slučajeva. Većina sojeva uropatogenih enterokoka pokazivala je lipolitičku aktivnost, dok je produkcija želatinaze i kazeinaze dominantna karakteristika *E. faecalis*, a izostaje u *E. faecium*. Rezistencija prema nižim koncentracijama lizozima uočena je u 97 % od ukupnog broja testiranih uropatogenih enterokoka. Visok stupanj rezistencije na lizozim zabilježen je u 72 % svih ispitanih sojeva. Svi izolati *E. faecalis* bili su osjetljivi prema glikopeptidima i imipenemu. Vankomicin (VanA fenotip) rezistentni enterokoki (VRE) prisutni su isključivo među sojevima *E. faecium*. Isti sojevi rezistentni su prema imipenemu, ampicilinu i gentamicinu. **Zaključak:** S obzirom na rastuću važnost vrsta iz roda *Enterococcus* kao uzročnika hospitalnih i izvanbolničkih infekcija te sve veću učestalost glikopeptidne rezistencije, utvrđivanje čimbenika virulencije i njihove uloge u patogenezi infekcija mokraćnog sustava od posebnog je značenja.

Cljučne riječi: antimikrobna rezistencija; čimbenici virulencije; *Enterococcus*; infekcije mokraćnog sustava; uropatogeni

Abstract. Aim: To investigate the selected virulence factors and the antimicrobial resistance profile of uropathogenic bacteria *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **Materials and methods:** A total of 96 urinary isolates of enterococci were identified by standard and automated biochemical procedures. Using phenotypic methods the presence of caseinase and gelatinase, as well as lipase were detected. Resistance to lysozyme was determined by the agar dilution method. Disk diffusion and microdilution methods were used to test the sensitivity/resistance of isolates to selected antibiotics. **Results:** Of the total number of uropathogenic enterococci, *E. faecalis* was identified in 79.2 % and *E. faecium* in 20.8 % of cases. The majority of uropathogenic enterococci strains exhibited lipolytic activity while gelatinase and caseinase production dominated in *E. faecalis*, and was absent in *E. faecium*. Resistance to lower concentrations of lysozyme was observed in 97 % of the total number of uropathogenic enterococci. High levels of resistance to lysozyme were observed in 72 % of all strains tested. All *E. faecalis* isolates were susceptible to glycopeptides and imipenem. Vankomycin (VanA phenotype) resistant enterococci (VRE) were present exclusively among *E. faecium* strains. The same strains were resistant to imipenem, ampicillin and gentamicin. **Conclusion:** Given the growing importance of *Enterococcus* species as a cause of hospital and infections in general population, as well as an increasing frequency of glycopeptide resistance, determining virulence factors and their role in pathogenesis of urinary tract infections is of particular significance.

Key words: drug resistance; *Enterococcus* spp; urinary tract infection; uropathogens; virulence factors

***Dopisni autor:**

Davorka Repac Antić, dr. med.
Klinički zavod za kliničku mikrobiologiju,
KBC Rijeka
Krešimirova 42, 51 000 Rijeka
e-mail: davorka.repac.antic@gmail.com

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

UVOD

Rod *Enterococcus* velika su grupa gram-pozitivnih kuglastih bakterija. Za čovjeka su najznačajnije dvije vrste, *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* koji čine dio fiziološke mikrobiote crijeva, usne šupljine i ženskog spolovila. Prepoznati su kao oportunistički patogeni, mogući uzročnici endokarditisa, septikemije, infekcija povezanih s intravaskularnim kateterima, abdominalnih infekcija te kompliciranih infekcija mokraćnog sustava. Infekcije mokraćnog sustava (IMS) predstavljaju najčešće bakterijske infekcije u izvanbolničkoj populaciji te najčešće infekcije povezane sa zdravstvenom skrbi. *Escherichia coli* i *Staphylococcus saprophyticus* su primarni uropatogeni koji uzrokuju > 80 % nekompliciranih IMS-a u osoba s normalnim mokraćnim sustavom. Primarni patogeni oboružani su čimbenicima virulencije dovoljno jakim da infekciju mokraćnog sustava mogu uzrokovati i kod anatomske i funkcionalno normalnog urotrakta. Sekundarni patogeni mogu uzrokovati infekciju kad u domaćina postoji još i neki od predisponirajućih čimbenika za razvoj IMS-a te rijetko izazivaju infekcije u osoba bez anatomske ili fiziološke anomalije urotrakta. U sekundarne uropatogene ubrajaju se druge enterobakterije osim *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* te enterokoki. *Enterococcus faecalis* i *E. faecium* smatraju se sekundarnim uropatogenima koji rijetko uzrokuju nekomplicirane, ali su čest uzrok kompliciranih i IMS-a stečenih za vrijeme zdravstvene skrbi. Čimbenici rizika za razvoj urinarnih infekcija su spol, dob, trudnoća, vezikoureteralni refluks i druge funkcionalne i anatomske abnormalnosti mokraćnog sustava, dijabetes i transplantacija bubrega. Ostali čimbenici rizika, poput urinarnih katetera, starije životne dobi i muškog spola (vjerojatno radi učestalije uporabe trajnih urinarnih katetera) opisani su kao dodatni rizični čimbenici za nastanak kolonizacije, a potom i infekcije enterokokima. Osobine uzročnika, vrsta, broj te posjedovanje različitih čimbenika virulencije, od izuzetnog su značenja za patogenezu urinarne infekcije. Enterokoki se ne smatraju izrazito virulentnim bakterijama. Poznato je, međutim, da su otporni na niz faktora iz okoline. Preživljavaju u mediju s visokom koncentracijom soli i pH, otporni su na žučne soli, detergente, etanol i teške metale.

Termorezistentni su, preživljavaju temperature od 60 °C čak 30 minuta, a rastu u temperaturnom rasponu od 10 do 45 °C. Navedene činjenice, uz nekoliko značajnih enzima i polisaharidnu kapsulu, omogućavaju enterokokima preživljavanje u nepovoljnom okolišu, izvan organizma domaćina, kao i u njemu, te pridonose otpornosti prema imunološkom odgovoru^{1,2}.

Dodatno, poznata je intrinzična rezistencija ovih bakterija prema cefalosporinima, klindamicinu i kloksacilinu te umjerena osjetljivost prema ami-

Enterococcus faecalis i *E. faecium* smatraju se sekundarnim uropatogenima koji rijetko uzrokuju nekomplicirane, ali često komplicirane urinarne infekcije. Otporni su prema nizu faktora iz okoline, dok im nekoliko značajnih enzima i polisaharidna kapsula omogućavaju preživljavanje u nepovoljnom okolišu u organizmu domaćina, kao i izvan njega, te pridonose otpornosti prema imunološkom odgovoru.

noglikozidima³. Brine pojava sojeva rezistentnih prema jednom ili oba glikopeptidna antibiotika, posebno u *E. faecium*, čime je znatno otežana terapija enterokoknih infekcija zbog ograničenog broja djelotvornih antibiotika. Stoga je cilj rada bio istražiti prevalenciju, antimikrobni profil i odabrane čimbenike virulencije među uropatogenim enterokokima.

MATERIJALI I METODE

Bakterijski izolati

U Kliničkom zavodu za kliničku mikrobiologiju KBC-a Rijeka, u okviru rutinske, klinički indicirane bakteriološke analize urina, u periodu od 1. rujna do 30. studenog 2016. godine prikupljeno je 96 urinarnih izolata iz roda *Enterococcus*. Svi urinarni izolati bili su povezani sa značajnom bakteriurijom $\geq 10^5$ cfu/ml (colony forming units/ml). Bakterije su pohranjene u 20 %-tnom glicerol bujonu i čuvane u zamrzivaču na -80 °C, nakon čega su supkultivirane na krvnom agaru (KA) i Mueller Hinton agaru – MHA (Oxoid, Engleska). Korištenje uropatogenih izolata u znanstveno-istraživačke svrhe odobrilo je Povjerenstvo za etička pitanja Kliničkog bolničkog centra Rijeka (Klasa 003-05/17-1/99).

Identifikacija izolata

Uzorak urina naciepljen je na kromogeno urinsko hranilište (HiCrome UTI, Himedia, Indija). Nakon 24-satne inkubacije na 35 °C iz suspektnih kolonija učinjen je mikroskopski preparat i obojen po Gramu te je provedena identifikacija temeljem hidrolize eskulina i rasta u prisutnosti 40 % žuči (Bile Eskulin agar, Himedia, Indija), fermentacije arabinoze (Merck, Germany) i određivanja pokretljivosti (SIM agar – sumporovodik, indol, pokretljivost- Liofilchem, Italija). Identifikacija je potvrđena na automatiziranom sustavu VITEK 2 (bioMerieux, Francuska) pomoću kartica za identifikaciju gram-pozitivnih bakterija (VITEK 2 GP, bioMerieux, Francuska).

Priprema preparata za transmisijsku elektronsku mikroskopiju (TEM)

E. faecalis uzgojen je na MHA tijekom 24 sata na 35 ± 2 °C. Pripremljena je bakterijska suspenzija (1 × 10⁸ cfu/ml) iz koje je 10 µL postavljeno na ugljikom obložene mrežice za elektronsku mikroskopiju (SPI Supplies, SAD). Nakon dvije minute višak tekućine uklonjen je filtarskim papirom. Bakterije na mrežicama bojene su 1 %-tnim uranil acetatom (UA, Sigma-Aldrich, SAD) kroz jednu minutu, nakon čega je suvišak UA-a pažljivo uklonjen filtarskim papirom, a mrežice osušene na zraku. Bakterije su vizualizirane na transmisijskom elektronskom mikroskopu (JEM-2100F, Jeol, Japan) pri povećanju od 14 000x.

Fenotipska detekcija čimbenika virulencije

Za dokaz solubilnih čimbenika virulencije izolati su kultivirani na hranilištima koja sadržavaju specifične supstrate. Produkcija kazeinaze detektirana je u agaru s dodatkom obranog mlijeka kao supstratom (Dukat, Zagreb, Hrvatska). Bakterijska kultura naciepljena je mikrobiološkom ušicom u vidu crte na površinu agara, koji je zatim inkubiran na 37 °C, tijekom 48 sati. Prisutnost bistre zone oko bakterijskih kolonija dokazuje prisutnost i aktivnost kazeinaze.

Produkcija želatinaze dokazana je inokulacijom bakterijske kulture u epruvetu s 1 ml sterilne fiziološke otopine u kojoj se nalazi kockica želatine veličine 10 mm × 5 – 8 mm. Suspenzija je inkubirana kroz 48 sati na 37 °C. Razgradnja želatine,

zbog čega se medij obojio u crno, znak je aktivnosti želatinaze.

Ekspresija lipaze dokazana je u hranilištu s dodatkom maslinovog ulja i Tween 80 (Biolife, Italija) kao supstratima, zbog čega je hranilište neprozirno. Bakterijski soj nasađen je na površinu agara te inkubiran tijekom 48 sati na 37 °C. Vidljivo bistrenje uz rub bakterijskih kolonija ukazuje na razgradnju lipida, odnosno prisutnost lipaze. Produkcija kazeinaze i želatinaze te lipaze procjenjivana je kvalitativno kao pozitivna ili negativna reakcija bez pokušaja kvantifikacije.

Određivanje antimikrobne osjetljivosti

Rezistencija prema lizozimu

Rezistencija prema lizozimu određivana je metodom agar dilucije koristeći MHA s dodatkom lizozima (Serva Electrophoresis GmbH, Germany) u koncentraciji od 20, 40 i 60 mg/ml. Bakterijska suspenzija u koncentraciji 1 × 10⁹ cfu/ml, naciepljena je na pripremljeni agar te inkubirana 24 sata na 37 °C. Rezistencija prema lizozimu utvrđena je porastom bakterija na površini hranilišta.

Disk-difuzijska metoda

Antimikrobna osjetljivost kliničkih izolata *E. faecalis* i *E. faecium* te kontrolnog soja (*E. faecalis* ATCC 29212) ispitana je disk-difuzijskom metodom prema Kirby-Baueru. Suspenzija ispitivanog soja bakterija nanosena je na MHA te su na površinu agara postavljeni diskovi promjera 6 mm, natopljeni standardiziranom količinom antibiotika: gentamicin (30 µg), ampicilin (2 µg), norfloksacin (5 µg), vankomicin (5 µg), teikoplanin (30 µg) i imipenem (10 µg) (Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Njemačka). Rezultati su interpretirani prema važećem EUCAST-u (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) standardu koji ažurira i izdaje Europski odbor za testiranje antimikrobne osjetljivosti⁴.

Metoda mikrodilucije

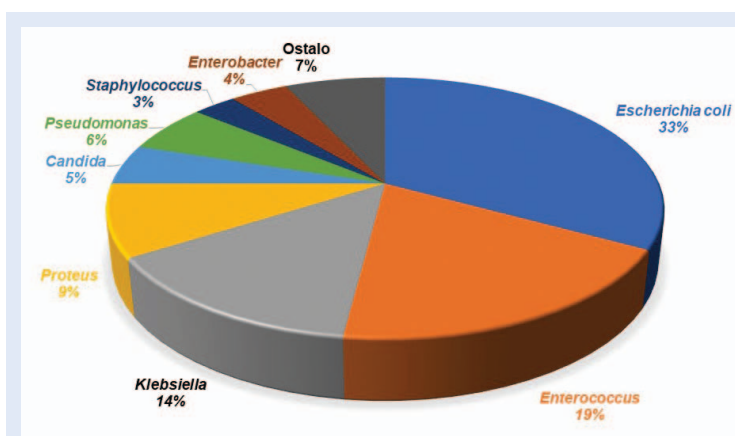
Metodom mikrodilucije određena je minimalna inhibicijska koncentracija (MIK) za vankomicin, ciprofloksacin i norfloksacin (Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen, Germany). Svaki antibiotik, prvotno u obliku praška, pripremljen je kao izvorna otopina (engl. *stock solution*) u koncentraciji od 5120 µg/ml, sukladno njegovoj potenciji te rastočen u

epruvete po 1 ml. Tako pripravljene otopine čuvane su na temperaturi od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kroz maksimalno dva tjedna, nakon čega se postupak ponavlja. U MH bujonu (Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen, Germany) pripremljen je bakterijski inokulum od 5×10^6 cfu/ml te su učinjena dvostruka razrjeđenja antibiotika u rasponu koncentracija od 0,25 do 256 $\mu\text{g/ml}$. Minimalna inhibicijska koncentracija (MIK) najniža je koncentracija antibiotika kod koje nema vidljivog porasta mikroorganizama nakon prekonoćne inkubacije⁴.

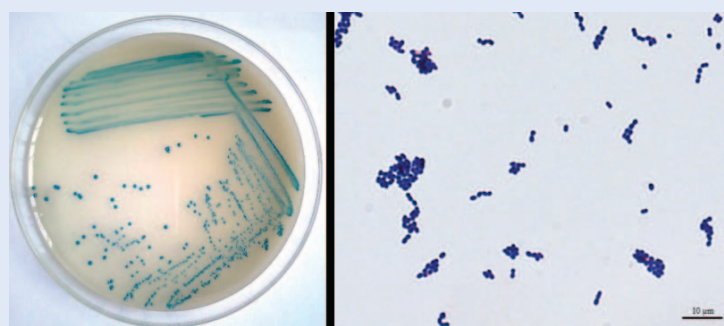
REZULTATI

Unutar tromjesečnog razdoblja tijekom kojeg su prikupljani uropatogeni enterokoki, od početka rujna do kraja studenog 2016., primijećeno je kako se od ukupnog broja urinarnih izolata, iza najčešćeg uzročnika cistitisa bakterije *Escherichia coli*, na drugom mjestu nalazi *Enterococcus* spp. s učestalošću od 22 %. Rezultati se podudaraju i s godišnjom prevalencijom različitih uzročnika infekcija mokraćnog sustava u KBC-u Rijeka (slika 1). Više od jedne trećine (33 %) IMS-a izazvano je *E. coli*. Sljedeći po učestalosti su enterokoki u 19 % slučajeva, zatim bakterije iz roda *Klebsiella* (14 %) i roda *Proteus* (9 %), dok su ostali uzročnici nađeni u manjem broju. Među 96 sojeva enterokoka izoliranih iz urina, korištenjem standardnih i automatiziranih identifikacijskih postupaka dokazane su dvije vrste, od kojih dominira *E. faecalis* (79,2 %), dok je znatno rjeđe prisutan *E. faecium* (20,8 %).

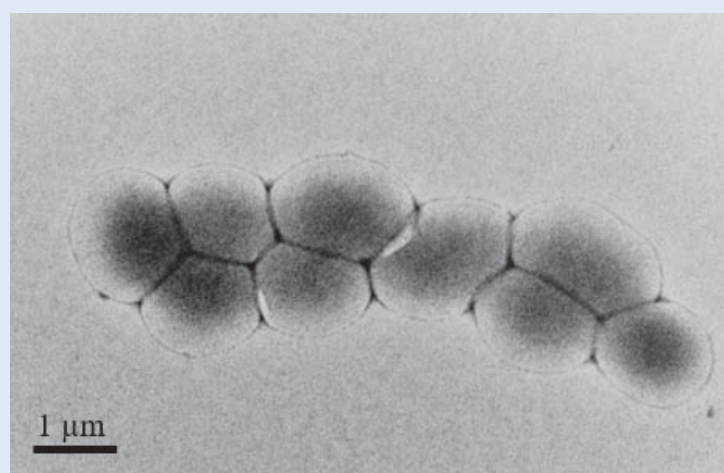
Uzorci urina rutinski su kultivirani na kromogenom urinskom agaru koji omogućava brzu preliminarnu identifikaciju uropatogenih bakterija. Jedan od kromogenih supstrata ugrađen u ovo hranilište razgrađuje se posredstvom enterokoke β -glukozidaze rezultirajući porastom sitnih, tirkizno plavih kolonija. Svjetlosnom mikroskopijom u preparatu iz kulture utvrđene su morfološke karakteristike enterokoka. Bakterije iz roda *Enterococcus* prikazuju se kao karakteristični gram-pozitivni koki, poredani u kraće lance (slika 2). Transmisijskom elektronskom mikroskopijom vide se proliferirajuće stanice, uniformno oblikovane, s unutarstaničnom DNK regijom koja pokazuje relativno homogenu elektronsku gustoću te intaktnom i jasno definiranom staničnom stijen-



Slika 1. Raspodjela urinarnih izolata u 2016. godini



Slika 2. Kultura *E. faecalis* na kromogenom urinskom agaru te specifična morfologija u mikroskopskom preparatu bojenom po Gramu (svjetlosni mikroskop, povećanje 1000 \times)



Slika 3. Mikrostruktura bakterijskih stanica *E. faecalis* snimljenih pomoću transmisijskog elektronskog mikroskopa (povećanje 14 000 \times).

kom. U stanicama uhvaćenim u procesu razmnožavanja vide se poprečni zidovi koji potpuno razdvajaju novostvorene stanice kćeri (slika 3). Od ukupnog broja (96) ispitanih urinarnih izolata enterokoka, njih 32 (33,3 %) pokazuje aktivnost

kazeinaze koja je potvrđena u agaru s obranim mlijekom na temelju prisutnosti prozirne zone oko poraslih kolonije. Produkcija kazeinaze utvrđena je u 31 od 76 izolata *E. faecalis* (41 %) i svega jednom od 20 izolata *E. faecium* (5 %). Razvoj crnog obojenja bujona zbog razgradnje želatine, odnosno zbog aktivnosti enzima želatinaze zabilježena je u 62 % izolata *E. faecalis*, dok niti jedan izolat *E. faecium* nije pokazao ovu sposobnost. Svojstvo produkcije lipaze uočeno je u 91 % od ukupnog broja izolata, od čega među većinom (72 od 76 ili 95 % sojeva) *E. faecalis* i u dvije trećine (15 od 20 ili 75 % sojeva) *E. faecium* (tablica 1).

Zabrinjavajuća je pojava sojeva enterokoka, posebno *E. faecium*, rezistentnih prema jednom ili oba glikopeptidna antibiotika, čime je znatno otežana terapija enterokoknih infekcija zbog ograničenog broja djelotvornih antibiotika.

Rezistencija prema 20, odnosno 40 mg/ml lizozima uočena je u 97 % od ukupnog broja testiranih uropatogenih enterokoka, dok je rezistencija na koncentraciju od 60 mg/ml lizozima zabilježena u 72 % svih ispitanih sojeva. Svi izolati vrste *E. faecalis* bili su rezistentni na lizozim pri nižim koncentracijama od 20 i 40 mg/ml, dok je rezistenciju na koncentraciju od 60 mg/ml lizozima pokazalo 52 od 76 ili 68 % izolata. Među sojevima *E. faecium*, rezistencija prema najvišoj ispitanoj koncentraciji lizozima detektirana je u 17 od 20 (85 %) testiranih izolata (tablica 2).

Svi izolati *E. faecalis* bili su osjetljivi prema vankomicinu, teikoplaninu i imipenemu. Jedan izolat (1,3 %) bio je rezistentan na ampicilin, dok je visoki stupanj rezistencije prema aminoglikozidima (HLAR, engl. *High level aminoglycoside resistance*) detektiran pomoću diska gentamicina od 30 µg, uočen u 23,7 % slučajeva. Od 20 uključenih sojeva *E. faecium*, njih 12 (60 %) pripada skupini enterokoka rezistentnih prema glikopeptidima i

Tablica 1. Prisutnost odabranih faktora virulencije u testiranih uropatogenih enterokoka

Faktori virulencije	Kazeinaza	Lipaza	Želatinaza
	Broj pozitivnih izolata (%)		
<i>E. faecalis</i> (N = 76)	31 (41)	72 (95)	47 (62)
<i>E. faecium</i> (N = 20)	1 (5)	15 (75)	0 (0)
Ukupno (N = 96)	32 (33,3)	87 (91)	47 (49)

Tablica 2. Rezistencija uropatogenih enterokoka prema lizozimu

Koncentracija lizozima	20 mg/ml	40 mg/ml	60 mg/ml
	Broj (%) rezistentnih sojeva		
<i>E. faecalis</i> (N = 76)	76 (100)	76 (100)	52 (68)
<i>E. faecium</i> (N = 20)	17 (85)	17 (85)	17 (85)
Ukupno (N = 96)	93 (97)	93 (97)	69 (72)

Tablica 3. Antimikrobna osjetljivosti uropatogenih enterokoka testiranih metodom disk-difuzije

	AMPICILIN 2 µg		GENTAMICIN 30 µg		NORFLOKSACIN 10 µg		IMIPENEM 10 µg		VANKOMICIN 5 µg		TEIKOPLANIN 30 µg	
	S*	R**	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
<i>Enterococcus faecalis</i> (N = 76)	75 (98,6 %)	1 (1,3 %)	58 (76,3 %)	18 (23,7 %)	60 (78,9 %)	16 (20,7 %)	76 (100 %)	0	76 (100 %)	0	76 (100 %)	0
<i>Enterococcus faecium</i> (N = 20)	0	20 (100 %)	10 (50 %)	10 (50 %)	0	20 (100 %)	2 (10 %)	18 (90 %)	8 (40 %)	12 (60 %)	8 (40 %)	12 (60 %)

*S = osjetljivi sojevi (engl. *Susceptible*); **R = rezistentni sojevi (engl. *Resistant*)

to VanA fenotipa, s obzirom na to da su pokazali istovremenu rezistenciju prema vankomicinu i teikoplaninu. Ovi sojevi karakteristično izražavaju višestruku rezistenciju, jer su otporni i prema drugim klasama antibiotika, ampicilinu, imipenemu, kinolonima i gentamicinu (tablica 3).

Rezultati disk-difuzijskog antibiograma potvrđeni su metodom mikrodilucije. Dvanaest izolata *E. faecium* bilo je visoko rezistentno na vankomicin (MIK \geq 250 $\mu\text{g/ml}$). Za ostale pripadnike iste vrste, MIK vrijednosti kretale su se u rasponu od 0,25 do 2 $\mu\text{g/ml}$. Za izolate *E. faecalis*, MIK vrijednosti za vankomicin kretale su se u rasponu od 0,25 do 4 $\mu\text{g/ml}$, a MIK_{90} iznosio je 1 $\mu\text{g/ml}$.

RASPRAVA

Enterokoki su gram-pozitivne bakterije, široko rasprostranjene u prirodi na biljkama, u tlu te probavnom sustavu čovjeka, drugih sisavaca, ptica, reptila i insekata. Povijesno su smatrani nepatogenim, komezalnim bakterijama, no u posljednjih 30-ak godina postaju globalno značajni uzročnici nozokomijalnih infekcija⁵. Rod *Enterococcus* obuhvaća više od 50 vrsta, od kojih dvije, *Enterococcus faecalis* i *E. faecium*, uzrokuju najveći broj svih humanih infekcija, posebno infekcija mokraćnog sustava (IMS) koje spadaju u najčešće bakterijske infekcije u općoj populaciji, kao i najčešće infekcije povezane sa zdravstvenom skrbi. Tromjesečno razdoblje tijekom kojeg je prikupljeno 96 izolata uključenih u ovu studiju, kao i godišnja prevalencija, pokazuju da su u Kliničkom bolničkom centru Rijeka enterokoki drugi najčešći uzročnici IMS-a te da su dominantno *E. faecalis*, a rjeđe *E. faecium* dvije vrste koje se uobičajeno identificiraju. S obzirom na to da se enterokoki ne smatraju posebno virulentim u odnosu na druge gram-pozitivne bakterije, kao npr. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* ili *Streptococcus pyogenes*, o enterokoknim čimbenicima virulencije i njihovoj ulozi u patogenezi IMS-a se relativno malo zna. Kao potencijalno značajni faktori spominju se citolizin i proteolitički enzimi, adhezini te polisaharidi kapsule i staničnog zida⁶. U naših smo izolata, realtivno jednostavnim fenotipskim testovima, istražili produkciju proteaza (kazeinaze i želatinaze) i lipaze. Lipolitičku aktivnost pokazala je većina ispitanih uropatogenih

izolata enterokoka (95 % sojeva *E. faecalis* i 75 % sojeva *E. faecium*). U istraživanjima Biswasa i sur. produkcija lipaze dokazana je u većine enterokoka izoliranih iz uzoraka rana, ali potpuno izostaje, npr. u vrste *E. gallinarum*⁷. Iako uloga lipaze u kliničkih izolata enterokoka, kao i uloga u patogenezi IMS-a još uvijek nije poznata, pretpostavljamo da pridonosi formiranju biofilma, kao i u nekih drugih gram-pozitivnih bakterija. Eksperimentalno je dokazano kako mutante zlatnog stafilokoka s delecijom gena koji kodira produkciju lipaze imaju značajno smanjenu sposobnost stvaranja biofilma te intraperitonealnog apscesa. Poznato je da je lipolitička aktivnost odgovorna za mikrobnog kvarenje hrane, kao i da lipaza nekih bakterija, kao što su *Propionibacterium acnes* i *Staphylococcus epidermidis*, razgrađujući lipide na površini kože, olakšava adherenciju, odnosno omogućava bakterijsku kolonizaciju i perzistenciju^{8,9}.

Proteolitička aktivnost enterokoka nešto je bolje istražena. Produkciju kazeinaze detektirali smo u 41 % uropatogenih sojeva *E. faecalis* te samo u jednog soja (5 %) *E. faecium*. Želatinazu je produciralo 62 % *E. faecalis*, dok to svojstvo nije posjedovao niti jedan soj *E. faecium*. Nedostatak želatinaze, ili izuzetno rijetko pozitivne sojeve *E. faecium*, objavljuju i drugi autori^{10,11}. Želatinaza producirajući enterokoki virulentni su i invazivni uzročnici endokarditisa u animalnom modelu. Uz kliničke sojeve, želatinazu podjednako uspješno produciraju sojevi izolirani iz peradi kao i mliječni enterokoki¹⁰⁻¹². Xu i sur. nedavno su pokazali da je upravo mokraćni sustav idealni okoliš za optimalnu ekspresiju enterokoknih proteaza te da je povećanje njihove koncentracije u urinu ovisno o detekciji kvoruma u enterokoknom biofilmu¹³. Naši rezultati govore da je proteolitička aktivnost enterokoka, naročito produkcija želatinaze u *E. faecalis* čimbenik virulencije značajan za formiranje biofilma i patogenezi IMS-a. Osim adhezina, invazina i toksina, u čimbenike virulencije neke bakterije možemo ubrojiti i sposobnost izbjegavanja imunog odgovora domaćina, a u širem smislu i razvoj antimikrobne rezistencije. Lizozim je jedinstvena supstancija prirodnog podrijetla prisutna u različitim stanicama i tjelesnim tekućinama. Nalazi se u polimorfonuklearima, makrofagima, slini, suzama, znoju, urinu i dr. sekretima kao jedan od važnih faktora nespecifične lokalne

imunosti. Primarna funkcija lizozima je hidroliza peptidoglikana u staničnom zidu bakterija te degradacija same bakterijske stanice, zbog čega ga često nazivaju prirodnim tjelesnim antibiotikom. U ovoj studiji, većina ispitivanih uropatogenih enterokoka uspješno je rasla pri koncentracijama lizozima do 60 mg/ml. Visok stupanj rezistencije prema lizozimu (> 60 mg/ml) zabilježili smo u 85 % testiranih sojeva *E. faecium* te 68 % sojeva *E. faecalis*. Za različite vrste bakterija u literaturi se spominju dva osnovna mehanizma rezistencije prema lizozimu. Prvi mehanizam povezan je s modifikacijom strukture peptidoglikana. U gram-pozitivnih bakterija geni koji su odgovorni za ove aktivnosti kodiraju proteine OatA (O-acetiltransferaze A) i PgdA (peptidoglikan N-acetilglukozamin deacetilazu A)¹⁴. Drugi mehanizam temelji se na proizvodnji inhibitora lizozima koji imaju zaštitnu funkciju¹⁵. Međutim, točan mehanizam odgovoran za enterokoknu rezistenciju, za sada, ostaje nepoznat.

Osim veće rezistencije prema lizozimu, *E. faecium* pokazuje i viši stupanj prirodne te sposobnost bržeg razvoja stečene rezistencije prema različitim antibioticima¹⁶. U kliničkom, terapijskom i epidemiološkom smislu, posebno je značajna rezistencija prema glikopeptidnim antibioticima, vankomicinu i teikoplaninu. Među uropatogenim sojevima *E. faecalis* nismo zabilježili glikopeptidnu, niti rezistenciju prema imipenemu. Visok stupanj rezistencije prema gentamicinu detektirali smo u 24 %, a prema kinolonima u 21 % sojeva. Vankomicin rezistentni enterokoki (VRE) prisutni su isključivo među sojevima *E. faecium*. U svim slučajevima radilo se o VanA fenotipu, s obzirom na to da je istovremeno detektiran visok stupanj rezistencije i prema vankomicinu i teikoplaninu. Karakteristika VRE izolata je višestruka rezistencija, pa je i u našoj studiji bila prisutna rezistencija prema imipenemu, ampicilinu, kao i gentamicinu. Zabrinjavajući su podaci o rezistenciji prema onim antibioticima koji se koriste za liječenje vankomicin rezistentnih enterokoka (VRE) kao što su linezolid, tigeciklin ili daptomicin¹⁷⁻¹⁹.

ZAKLJUČAK

S obzirom na rastuću važnost vrsta iz roda *Enterococcus* kao uzročnika hospitalnih i izvanbolničkih

infekcija te sve veću učestalost glikopeptidne rezistencije, utvrđivanje čimbenika virulencije od posebnog je značenja. U ovoj studiji većina sojeva uropatogenih enterokoka pokazivala je lipolitičku aktivnost, za razliku od produkcije želatinaze i kazeinaze koje su dominantna karakteristika *E. faecalis*, a izostaje u *E. faecium*. Utvrđivanje uloge ovih čimbenika u patogenezi IMS-a, kao i ispitivanje supstancija prirodnog podrijetla koje mogu inhibirati njihovo djelovanje, tema su naših budućih istraživanja.

Zahvala

Rad je izrađen uz financijsku potporu Sveučilišta u Rijeci (projekt br. 13.06.1.1.07) i bilateralnog srpsko-hrvatskog znanstveno-tehnološkog projekta „*Arbutus unedo* L. – prirodni pristup u kontroli infekcija mokraćnog sustava“ 2016. – 2017. god.

Izjava o sukobu interesa: autorice izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

1. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 2009;155:1749-57.
2. Billström H, Lund B, Sullivan A, Nord CE. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32:374-7.
3. Rathnayake IU, Hargreaves M, Huygens F. Antibiotic resistance and virulence traits in clinical and environmental *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. *Syst Appl Microbiol* 2012;35:326-33.
4. Media preparation for EUCAST disk diffusion testing and determination of MIC values by the broth microdilution method Version 4.0 June 2014 [Internet][cited 2018 Mar 22]. Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf.
5. Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 2012;10:266-78.
6. Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 2004;22:822-30.
7. Biswas PP, Dey S, Adhikari L, Sen A. Virulence markers of vancomycin resistant enterococci isolated from infected and colonized patients. *J Infect Dis* 2014;6:157-63.
8. Moreno FMR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vyust L. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 2006;106:1-24.
9. Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, van Heuvel M, Misset O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* 1994;15:29-63.
10. Poeta P, Costa D, Klibi N, Rodrigues J, Torres C. Phenotypic and genotypic study of gelatinase and beta-haemol-

- ysis activities in faecal enterococci of poultry in Portugal. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2006; 53:203-8.
11. Elsner HA, Sobottka I, Mack D, Claussen M, Laufs R, Wirth R. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *J Clin Microbiol* 2000;19:39-42.
 12. Lopes Mde F, Simões AP, Tenreiro R, Marques JJ, Crespo MT. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *Int J Food Microbiol* 2006; 112:208-14.
 13. Xu W, Flores-Mireles AL, Cusumano ZT, Takagi E, Hultgren SJ, Caparon MG. Host and bacterial proteases influence biofilm formation and virulence in a murine model of enterococcal catheter-associated urinary tract infection. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2017;3:28.
 14. Vollmer W, Tomasz A. The *pgdA* gene encodes for a peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* 2000;275: 20496-501.
 15. Hébert L, Courtin P, Torelli R, Sanguinetti M, Chapot-Chartier MP, Auffray Y et al. *Enterococcus faecalis* constitutes an unusual bacterial model in lysozyme resistance. *Infect Immun* 2007;75:5390-8.
 16. Galloway-Peña JR, Nallapareddy SR, Arias CA, Eliopoulos GM, Murray BE. Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. *J Infect Dis* 2009;200: 1566-73.
 17. Bi R, Qin T, Fan W, Ma P, Gu B. The emerging problem of linezolid-resistant enterococci. *J Antimicrob Resist* 2017; 13:11-9.
 18. Freitas AR, Novais C, Correia R, Monteiro M, Coque TM, Peixe L. Non-susceptibility to tigecycline in enterococci from hospitalised patients, food products and community sources. *Int J Antimicrob Agents* 2011;38:174-6.
 19. Kelesidis T, Humphries R, Chow AL, Tsiodras S, Uslan DZ. Emergence of daptomycin-non-susceptible enterococci urinary tract isolates. *J Med Microbiol* 2013; 62:1103-5.