Primjena bakteriocina bakterija mliječne kiseline u liječenju humanih urinarnih infekcija

Mrša, Marin

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:846266

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

PRIMJENA BAKTERIOCINA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U LIJEČENJU HUMANIH URINARNIH INFEKCIJA

DIPLOMSKI RAD

Marin Mrša

Zagreb, siječanj, 2021.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij:

Proizvodnja i prerada mlijeka

PRIMJENA BAKTERIOCINA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U LIJEČENJU HUMANIH URINARNIH INFEKCIJA

DIPLOMSKI RAD

Marin Mrša

Mentor: prof. dr. sc. Dubravka Samaržija

Neposredni voditelj: dr. sc. Darija Bendelja Ljoljić

Zagreb, siječanj, 2021.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Marin Mrša**, JMBAG 0178107880, rođen 31.05.1996. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

PRIMJENA BAKTERIOCINA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U LIJEČENJU HUMANIH URINARNIH INFEKCIJA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Marina Mrše**, JMBAG 0178107880, naslova

PRIMJENA BAKTERIOCINA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U LIJEČENJU HUMANIH URINARNIH INFEKCIJA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo: potpisi:

1. prof. dr. sc. Dubravka Samaržija mentor _____
2. doc. dr. sc. Iva Dolenčić Špehar član _____
3. doc. dr. sc. Milna Tudor Kalit član _____

Zahvala

Zahvaljujem mentorici Dubravki Samaržiji na ukazanoj prilici za obradu ovako zahtjevne teme i na povjerenju da ću istu uspiješno obraditi. Isto tako veliko hvala neposrednoj voditeljici Dariji Bendelji Ljoljić na susretljivosti i pomoći prilikom pisanja ovog rada.

Mojoj djevojci Stelli isto tako neizmjerno hvala što je bila podrška kroz cijeli moj period studiranja i što me podnosila za vrijeme brojnih ispitnih rokova, nikad gubila nadu i vjerovala u mene kada ni sam nisam. Hvala na svemu.

SADRŽAJ

1. Uvod 1

1.1. Cilj rada 2

2. Pregled dosadašnjih istraživanja 3

2.1. Urinarne infekcije 3

2.2. Patofiziologija urinarnih infekcija 5

2.3. Uzročnici infekcija urinarnog trakta 8

2.4. Faktori virulencije uropatogena 10

2.4.1. Adherencija 12

2.4.2. Proteaze i toksini 14

2.4.3. Ureaze 15

2.4.4. Biofilm 16

2.4.5. Lipopolisaharid (LPS) 16

2.4.6. Siderofori 16

3. Bakteriocini 19

3.1. Klasifikacija bakteriocina BMK 20

3.2. Mehanizam djelovanja bakteriocina 23

4. Bakteriocini bakterija mliječne kiseline u liječenju humanih urinarnih infekcija 26

5. Zaključak 42

6. Literatura 43

Sažetak

Diplomskog rada studenta **Marina Mrše**, naslova

PRIMJENA BAKTERIOCINA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U LIJEČENJU HUMANIH URINARNIH INFEKCIJA

Unutar infektivnih humanih bolesti, urinarna infekcija danas je postala globalni problem. Sama pojava urinarnih infekcija češća je kod žena i kod osoba s povećanim rizikom od neuspješnog liječenje (dijabetes, trudnoća, itd.), a učestalost nastanka urinarnih infekcija povezana je s godinama. Najčešći uzročnici urinarnih infekcija su uropatogena Escherichia coli (UPEC), Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus saprophyticus, Enterococcus faecalis, Enterococcus spp., Staphylococcus aureus i Candida spp. Bakteriocini bakterija mliječne kiseline (BMK) su heterogena skupina bioaktivnih antimikrobnih proteina koji imaju inhibitorno djelovanje prema mnogim mikrobnim vrstama i ne stvaraju rezistentnost. Stoga je u području medicine proizašao veliki interes za bakteriocinima koji već imaju široku primjenu u prehrambenoj industriji kao konzervansi. Interes za bakteriocine BMK u području medicine proizašao je iz alarmantnog porasta rezistentnosti patogenih bakterija na većinu danas poznatih antibiotika te njihovih štetnih učinaka na ljudski organizam. Porast otpornosti bakterija na antibiotike umanjuje učinkovitost same terapije pri liječenje urinarnih infekcija stoga je potrebno pronaći alternativnu zamjenu antibioticima. Usprkos širokoj primjeni bakteriocina BMK u prehrambenoj industriji, radi rigoroznih zakonskih propisa njihova je primjena u medicini uglavnom ograničena.

Ključne riječi: urinarne infekcije, uropatogeni, antibiotici, bakterije mliječne kiseline, bakteriocini

Summary

Of the master's thesis – student **Marin Mrša,** entitled

APPLICATION OF LACTIC ACID BACTERIA BACTERIOCINS IN THE URINARY TRACT INFECTIONS TREATMENT

Within infectious human diseases, urinary tract infections have become a global problem nowadays. Occurrence of urinary tract infections itself is more common in women and persons with higher risk of treatment failure (diabetes, pregnancy, etc.). Frequency of urinary tract infections is related to age. Most common pathogens of urinary tract are uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC), *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis, Enterococcus spp*., *Staphylococcus aureus* i *Candida spp.* Lactic acid bacteria (LAB) bacteriocins are heterogeneous group of bioactive antimicrobial proteins that have inhibitory activity against many microbial species and do not cause resistance. Therefore, in the field of medicine there has been great interest in bacteriocins which are already widely used in the food industry as preservatives. The interest in LAB bacteriocins in the field of medicine stemmed from the alarming increase in the resistance of pathogenic bacteria to most of the antibiotics known today and their harmful effects on the human body. The increase in bacterial resistance to antibiotics reduces the effectiveness of the therapy itself in the treatment of urinary tract infections, therefore it is necessary to find an alternative to antibiotics. Despite the widespread use of LAB bacteriocins in the food industry, due to rigorous legislation, their use in medicine is generally limited.

Keywords: urinary infections, uropathogens, antibiotics, lactic acid bacteria, bacteriocins

1. Uvod

Infekcije urinarnog trakta jedne su od najčešćih infekcija koje pogađaju otprilike 150 milijuna ljudi u svijetu godišnje, a 40-50% žena u svome životu najmanje jednom dožive infekciju urinarnog trakta. O učestalosti pojave urinarnih infekcija govori i podatak o godišnjim troškovima liječenja i odsutnosti s posla zbog bolovanja u USA iznose čak 3,5 milijarde američkih dolara (Flores-Mireles 2015.).

Urinarne infekcije nastaju ulaskom mikroorganizama u urinarni trakt preko uretre te njihovom kolonizacijom u bilo kojem dijelu urinarnog trakta. Glavni uzročnik koji zauzima 65-75% slučajeva urinarnih infekcija je uropatogena *Escherichia coli* (UPEC). Nekomplicirane urinarne infekcije tretiraju se kratkom antibiotskom terapijom dok je kod kompliciranih urinarnih infekcija potrebna duža i intenzivnija antibiotska terapija. Međutim, u današnje vrijeme problem predstavlja sve veća otpornost bakterija na najčešće korištene antibiotike što otežava uspješnost pri liječenju (Qiao i sur., 2013.). Sve veća rezistentnost na antibiotike dovela je do potrebe za novim rješenjima u borbi protiv uropatogena.

Zbog svojih karakterističnih svojstava upravo bi bakteriocini mogli zamijeniti antibiotike u liječenju urinarnih infekcija. Bakteriocini se definiraju kao antimikrobni peptidi sintetizirani u ribosomima većine bakterijskih vrsta a tradicionalno se koriste kao konzervansi u prehrambenoj industriji. Bakteriocini djeluju bakteriostatski ili baktericidno najčešće na srodne bakterijske vrste ili sojeve iste vrste pri čemu izazivaju staničnu smrt (Preciado i sur., 2016.). Djelotvorni su u niskim koncentracijama. Nemaju okus, boju, miris, djeluju u širokom pH rasponu i otporni su na visoke temperature. Osjetljivi su na proteolitičke enzime, međutim razgradnja je spora. S obzirom da se zbog svojih svojstava bakteriocini ne zadržavaju dugo u organizmu, bakterije ne razvijaju otpornost. Interes za bakteriocinima bakterija mliječne kiseline proizašao je iz činjenice da se BMK koriste u prehrambenoj industriji te se već godinama istražuju i dobro su poznate njihove osobine. Pri tome poistovjećivanje bakteriocina s antibioticima nije ispravno zbog zakonskih regulativa koje ne dopuštaju korištenje antibiotika u prehrambenoj industriji (Balciunas i sur., 2013.).

1.1. Cilj rada

Cilj ovog rada je komparativno i kritički objediniti dosadašnje rezultate istraživanja učinka bakteriocina bakterija mliječne kiseline u liječenju humanih urinarnih infekcija.

2. Pregled dosadašnjih istraživanja

2.1. Urinarne infekcije

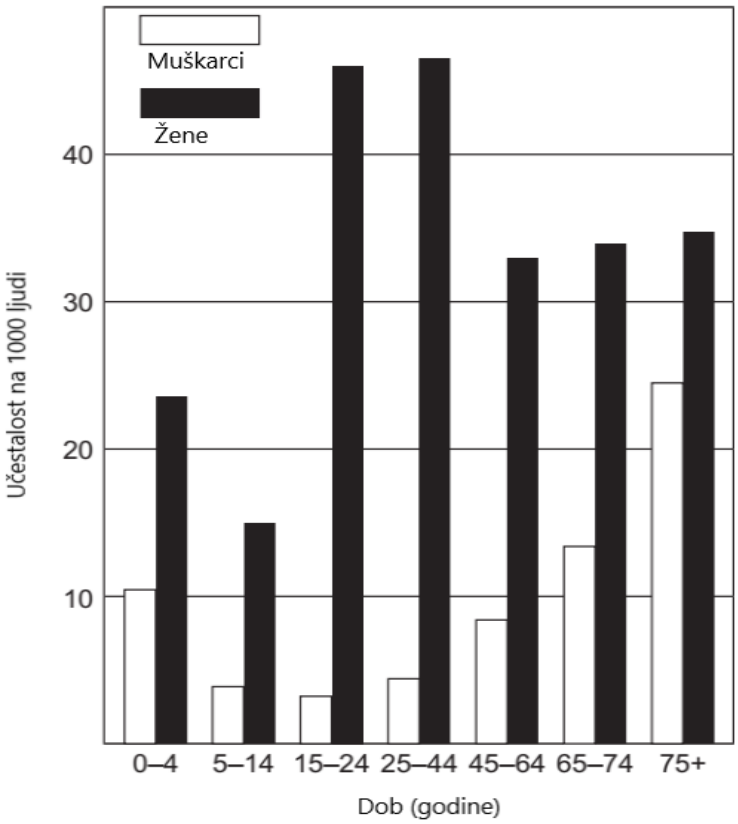
Urinarne infekcije zauzimaju drugo mjesto iza respiratornih infekcija kao najčešći oblik infekcija kod izvanbolničke populacije bolesnika (Cavallo i Tenke, 2012.). Uz to, urinarne infekcije zauzimaju prvo mjesto kao najčešći oblik infekcija povezanih sa zdravstvenom skrbi (Bratuša, 2014.). U Hrvatskoj je prema podatcima Hrvatskog zdravstveno-statističkog ljetopisa za period od 2016. do 2018. godine utvrđeno da od svih dijagnosticiranih slučajeva upale mokraćnog mjehura njih 55% nalazi se u dobnoj skupini između 20. i 64. godine života.

Općenito, urinarnom infekcijom naziva se svaka infekcija bilo kojeg dijela urinarnog trakta. Upale urinarnog trakta nastaju kada mikroorganizmi preko mokraćne cijevi dođu do mokraćnog mjehura i počnu se razmnožavati. Učestalo i bolno mokrenje, suprapubički pritisak te iznenadna potreba za mokrenjem najčešći su simptomi urinarnih infekcija (Foxman, 2013.). Prema mjestu nastanka urinarne infekcije možemo podijeliti na:

- Uretritis – odnosi se na infekciju uretre
- Cistitis – odnosi se na infekciju mokraćnog mjehura
- Pijelonefritis – odnosi se na infekciju bubrega (Johnson i Stamm, 1989.)

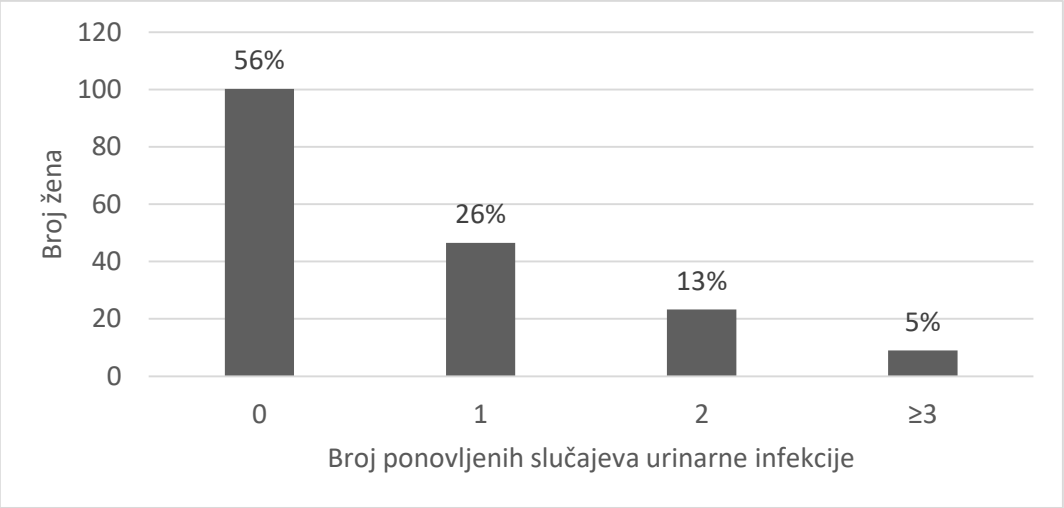
Flores-Mireles i sur. (2015.) dijele urinarne infekcije na upale donjeg urinarnog trakta – cistitis i na upale gornjeg urinarnog trakta – pijelonefritis.

Urinarne infekcije ovisne su o spolu i dobi te je njihova pojavnost učestalija kod žena nego kod muškaraca, odnosno u muškaraca u dobi od 15 – 45 godina te u žena starijih od 75 godina kako je prikazuje slika 2.1. (Sussman, 2015.).



Slika 2.1. Učestalost nastanka urinarnih infekcija u ovisnosti o godinama i spolu (Izvor: prilagođeno prema Sussman, 2015.)

Tijekom života, 20% žena ima problem s pojavom urinarnih infekcija, a 3% žena ima urinarne infekcije više od jednom godišnje (Anonymous , 1986.). Prema Locke (2018.) 53% žena i 14% muškaraca tijekom svog života ima barem jedan od oblika urinarne infekcije. Pri tome, osobe koje su preboljele urinarne infekcije imaju veće šanse za ponovno oboljenje u usporedbi s osobama koje nikada nisu imale niti jedan oblik urinarne infekcije. Istraživanjem Ikäheimo i sur. (1996.) na 179 odraslih žena u dobi od 17-82 godine tijekom perioda od godinu dana nakon pojave prve urinarne infekcije, utvrđeno je da se kod 44% žena urinarna infekcija ponovno pojavila u periodu od godinu dana nakon prve infekcije (Slika 2.2.).

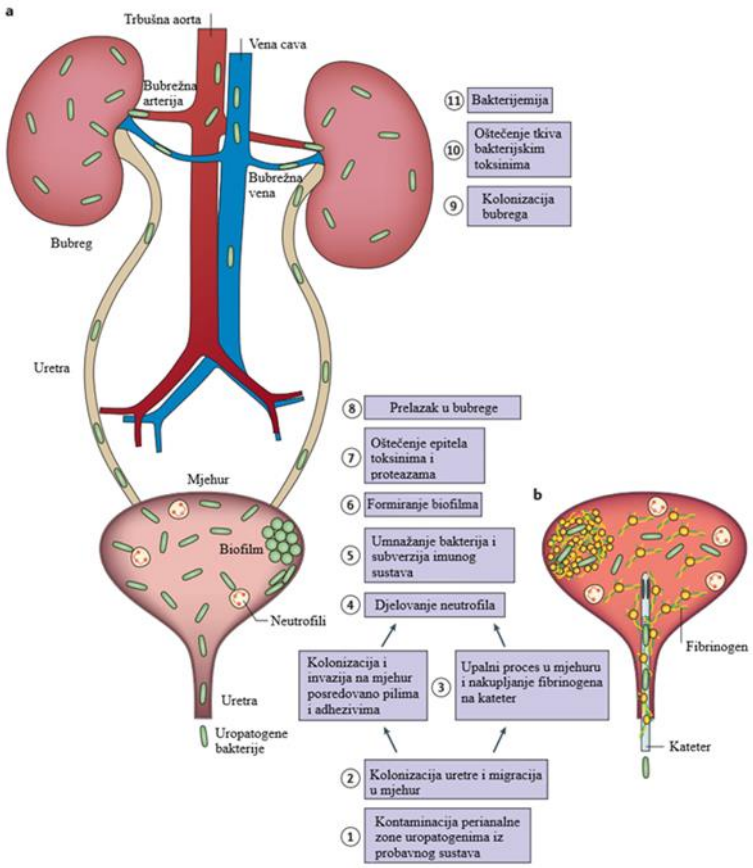


Slika 2.2. Ponavljajuće urinarne infekcije u razdoblju od godinu dana

(Izvor: prilagođeno prema Ikäheimo i sur., 1996)

2.2. Patofiziologija urinarnih infekcija

Urinarni trakt važan je organski sustav čovjeka koji stvara, sakuplja i izbacuje urin iz tijela te tako vrši regulaciju vode i elektrolita u organizmu. Urinarni trakt čine bubrezi koji filtriraju metaboličke otpadne tvari te uklanjaju višak vode i soli iz organizma. Iz svakog bubrega mokraćovod odvodi urin u mokraćni mjehur u kojem se urin skladišti te se preko mokraćne cijevi (uretre) izlučuje iz organizma (Song i Abraham, 2008.). Urinarni trakt sam je po sebi sterilan i zaštićen od patogenih organizama funkcijama mokrenja i imunosnim sustavom. Louis Pasteur prvi je utvrdio kako je urin odličan medij za rast i razmnožavanje bakterija. Kemijske i fizikalne osobine urina poput prisustva glukoze i aminokiselina, pH vrijednost i osmolalnost odnosno koncentracija otopljenih tvari u mokraći, imaju pozitivan učinak na rast i razmnožavanje bakterija (Asscher i sur., 1966.). Ipak, pojedine tvari u urinu imaju inhibitorno djelovanje na bakterije, a to su urea i organske kiseline sadržane u urinu (Kaye, 1968.). Bakterije u mokraćni sustav prodiru na tri načina, a to su hematogeni, limfogeni i ascendentni (uzlazni) put (Johnson i Stamm, 1989.). Hematogeni put je prodiranje bakterija u urinarni trakt putem krvi, a javlja se kod imunokompromitiranih osoba. Ulazak bakterija limfogenim putem može se dogoditi pri povišenom tlaku mokraćnog mjehura kada bakterije ulaze u bubrege (Mihaljević, 1994.). Ulazak bakterija ascendentnim putem najčešći je kada se radi o urinarnim infekcijama (Slika 2.3.).

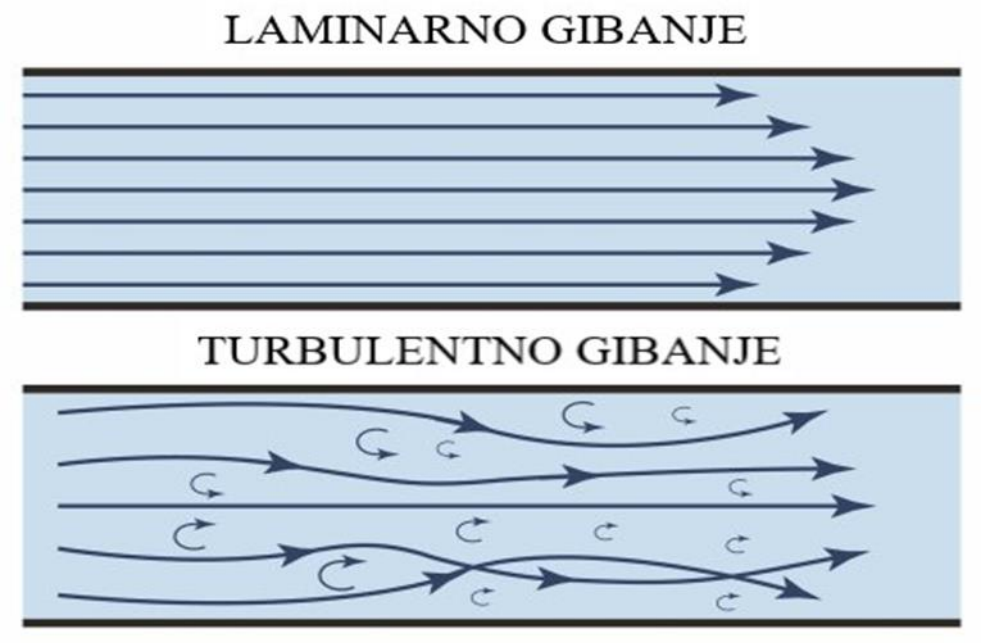


Slika 2.3. Patogeneza infekcije urinarnog trakta.

(Izvor: prilagođeno prema Flores-Mireles i sur., 2015.)

Žene imaju 14 puta veći rizik od ascendentnog ulaska bakterija od muškaraca zbog kraće uretre koja je usko povezana s perianalnom regijom. Uretra je kod muškaraca duža, a sekret prostate ima baktericidno djelovanje (Johnson i Stamm 1989.). Kraća uretra kod žena može dovesti do turbulentnog i retrogradnog kretanja urina (Hinman, 1996.). Normalni urinarni trakt ima glatku mukoznu stijenku koja se osim mjehura ispire kontinuiranim protokom urina. Nedvojbeno je da se prekid laminarnog i prelazak u turbulentno gibanje urina povezuje s pojavom urinarne infekcije (Slika 2.4.). Mjesta na kojima je glatka površina urinarnog trakta narušena, a gibanje urina turbulentno predstavljaju odgovarajuću sredinu za rast i razmnožavanje mikroorganizama. Ulaskom, bakterije prvo koloniziraju mokraćnu cijev, zatim mokraćni mjehur posljedično različitim mehaničkim podražajima i manipulacijama. Kod normalnog protoka urina do urinarnih infekcija neće doći. Narušenom dinamikom kretanja urina gdje dolazi do sporijeg protoka i izlučivanja urina stvaraju se uvjeti za nastanak urinarne infekcije (Begovac i sur., 2006.). Jednom kada se na takvom mjestu koloniziraju

mikroorganizmi oni predstavljaju inokulum za cijeli ekosistem urinarnog trakta. Između mokrenja, urin se zadržava u mjehuru te predstavlja medij gdje mikroorganizmi rastu i razmnožavaju se što ustvari predstavlja početak urinarne infekcije (Sussman, 2015.).



Slika 2.4. Laminarno i turbulento gibanje mokraće
(Izvor: prilagođeno prema: https://esfsciencenew.wordpress.com/2012/10/26/turbulent-flow-and-viscosity/ - Pristup 15.06.2020)

Nastanak urinarne infekcije ovisi i o samoj bakteriji odnosno o njenoj sposobnosti vezanja, pokretljivosti i hemolize. Isto tako bitan faktor je i sam broj bakterija, veći broj uzročnika u urinarnom traktu nosi veću vjerojatnost nastanka infekcije (Orlović, 2017.).

Prema Locku (2018.) faktori nastanka urinarnih infekcija jesu životna dob i navike povezane uz dob. Žene mlađe životne dobi koje su seksualno aktivne, imaju novog partnera unazad godinu dana, koriste prezervative, spermicide, dijafragmu ili su imale urinarne infekcije u mlađoj životnoj dobi imaju veći rizik od urinarnih infekcija (Handley i sur., 2002.). Učestalost spolnog odnosa također je važan čimbenik koji utječe na pojavu urinarnih infekcija. Uska odjeća, korištenje tampona i odabir sapuna pokazali su se kao čimbenici koji ne utječu na pojavu urinarnih infekcija (Scholes i sur., 2000.). Uz navedeno, Adatto i sur. (1979.) navode kako odgađanje mokrenja kod mladih žena ima značajan utjecaj na povećanje rizika od urinarnih infekcija. Također, i fiziološke promjene za vrijeme trudnoće povezane su sa

povećanim brojem slučajeva urinarnih infekcija (Locke, 2018.). Visoki rizik za ponavljajućim urinarnim infekcijama imaju žene:

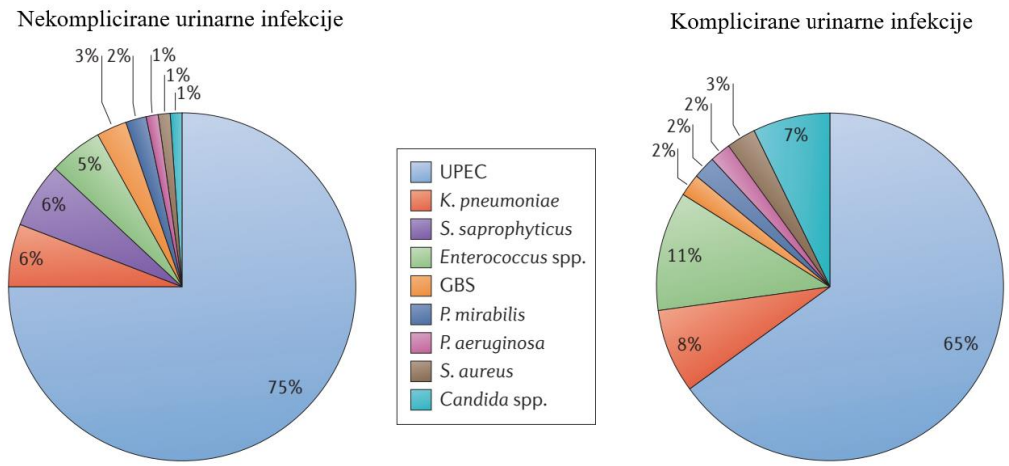
- u postmenopauzi koje boluju od dijabetesa
- koje su imale urinarne infekcije u predmenopauzi
- koje boluju od urinarne inkontinencije i nemogućnosti potpunog pražnjenja mjehura (Raz i sur., 2000.; Hu i sur., 2004.).

Rizični faktori za pojavu urinarnih infekcija za sve dobne skupine, a neovisno o spolu, su strana tijela poput bubrežnog kamenca i katetera kao i povijest urinarnih infekcija u obitelji (Locke, 2018.). Rizični faktori kod muškaraca su partnerica s urinarnom infekcijom, neobrezanost i hipertrofija prostate (Hooton i Stamm, 1997.).

2.3. Uzročnici infekcija urinarnog trakta

Infekcije urinarnog trakta uzrokuju Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije i neke gljivice (Foxman, 2014.). S obzirom na stupanj patogenosti, uzročnici urinarnih infekcija dijele se na primarne i sekundarne uropatogene. Primarni uropatogeni predstavljaju one mikroorganizme koji samostalno kod anatomski i funkcionalno normalnog urinarnog trakta mogu izazvati infekcije urinarnog trakta (Finger, 2004.). U primarne patogene od Gram-negativnih bakterija ubrajaju se *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, a od Gram-pozitivnih *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis* (Köves i Wullt, 2016.). Predstavnici sekundarnih uropatogena kod Gram-negativnih bakterija su: *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Providencia stuartii*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter cloacae*, a od Gram-pozitivnih *Staphylococcus aureus* i gljivice *Candida* spp. (Köves i Wullt, 2016.).

Najčešći uzročnik vezan za nekomplicirane i komplicirane urinarne infekcije je uropatogena bakterija *Escherichia coli* (UPEC). Uzročnici nekompliciranih urinarnih infekcija nakon UPEC po zastupljenosti su: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, grupa B *Streptococcus* (GBS), *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Candida* spp. (Ronald 2002., Klinke i sur., 2011.). Uzročnici kompliciranih urinarnih infekcija nakon UPEC uključuju bakterije: *Enterococcus spp*., *K. pneumoniae*, *Candida spp*., *S. aureus, P. mirabilis, P. aeruginosa* i GBS (Levison i Kaye, 2013.). Zastupljenost uzročnika urinarnih infekcija prikazana je na slici 2.5.



Slika 2.5. Zastupljenost uzročnika urinarnih infekcija

(Izvor: prilagođeno prema Flores-Mireles i sur., 2015.)

Corynebacterium urealyticum važan je uropatogen povezan s bolnicama odnosno s kateterizacijom u bolnicama. *S. saprophyticus* uzrokuje urinarne infekcije kod žena koje su seksualno aktivne te je odgovoran za 5–15% akutnog cistitisa u SAD. Koagulaza pozitivni stafilokoki mogu dospjeti u bubrege hematogenim putem i izazvati bubrežne apscese. Gljivice, posebno *Candida spp.* mogu izazvati urinarne infekcije kod pacijenata s uvedenim kateterom koji primaju antibiotsku terapiju (Lee i Pharm, 2018.). *Staphylococcus aureus* najčešće hematogenim putem dolazi do bubrega i uzrokuje intrarenalni ili perinefritički apsces (Sobel i Kaye, 2000.). *Proteus mirabilis* proizvodi velike količine enzima ureaze koja hidrolizira ureu na amonijak i hidroksil ion. Povećana koncentracija hidroksil iona dovodi do povećanja pH-vrijednosti urina na 7 uslijed čega dolazi do precipitacije fosfata, karbonata i magnezija i stvaranja bubrežnog kamenca (Miano, 2007.). Zastupljenost određenih patogena povezanih sa izvanbolničkom i bolničkom urinarnom infekcijom prikazana je u tablici 2.2. (Wilson i sur., 2004.).

Tablica 2.2. Zastupljenost uropatogena kod izvanbolničkih i bolničkih urinarnih infekcija

Uropatogen	Izvanbolnička populacija	Bolnička populacija
	Zastupljenost (%)	Zastupljenost (%)
Escherichia coli	53 - 72	17,5 - 56,7
Koagulaza negativni stafilokoki	2 - 7,5	2,1 - 12,5
Klebsiella spp.	6 - 12	6,2 - 15
Proteus spp.	4 - 6	3,8 - 8,2
Enterobacter spp.	0,6 - 5,8	0,9 - 6,5
Morganella morganii	3,1 - 4,4	4,7 - 6,0
Citrobacter spp.	0,1	0,2 - 0,3
Enterococcus spp.	1,7 - 12	6,5 - 15,8
Staphylococcus aureus	2	1,6 - 3,5
Staphylococcus saprophyticus	0,2 - 2	0,4
Pseudomonas spp.	0,1 - 4	1,3 - 11
Candida spp.	-	9,4 - 15,8
Ostale	3 - 8	1,8 - 26,3

(Izvor: Wilson i sur., 2004.)

2.4. Faktori virulencije uropatogena

Faktori virulencije (Tablica 2.3.) odnose se na svojstva koja omogućavaju rast i razmnožavanje mikroorganizama na ili unutar specifičnog domaćina. Isto tako pospješuju sposobnost izazivanja bolesti (Relman i sur., 2009.). Faktori virulencije uropatogene *E. coli* omogućuju joj otpornost na imunosni sustav domaćina, kao i mogućnost inhibiranja imunog odgovora domaćina što omogućava rast i razmnožavanje te posljedično tome i oštećenje tkiva. Faktori virulencije kodirani su na određenim genskim klasterima unutar DNA gdje djeluju kolektivno ili se mogu aktivirati odnosno deaktivirati tijekom infekcije (Hacker i sur., 1990., Johnson 1991.).

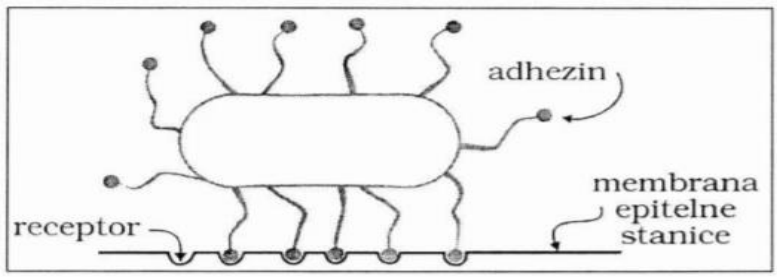
Tablica 2.3. Faktori virulencije glavnih uropatogena

Uropatogen	Faktor virulencije			
	Adherencija	Toksini	Obrana od imuniteta	Siderofori
Escherichia coli	F1C pili P pili S pili Pili tipa 1 Dr adhezini	HlyA CNF1	HlyA Kapsularni antigeni CNF1 Yersiniabactin	Aerobaktin Enterobaktin Salmokelin Yersiniabaktin
Klebsiella pneumoniae	Pili tipa 1 Pili tipa 3		Kapsula	Aerobaktin Enterobaktin
Proteus mirabilis	MR/P pili NAFs PMFs AipA adhezin Taap ahezin	HpmA Pta	Kapsula	Proteobaktin Yersiniabaktin
Pseudomonas aeruginosa	Izvanstanični DNA Egzopolisaharidi		Kapsula Elastaza ExoS Fosfolipaze Ramnolipidi	Piocelin Pioverdin
Enterococcus faecalis	Epb pili Ace adhezin Esp adhezin		Epa	
Enterococcus faecium	Ebp pili Esp adhezin			

(Izvor: Flores-Mireles i sur., 2015.)

2.4.1. Adherencija

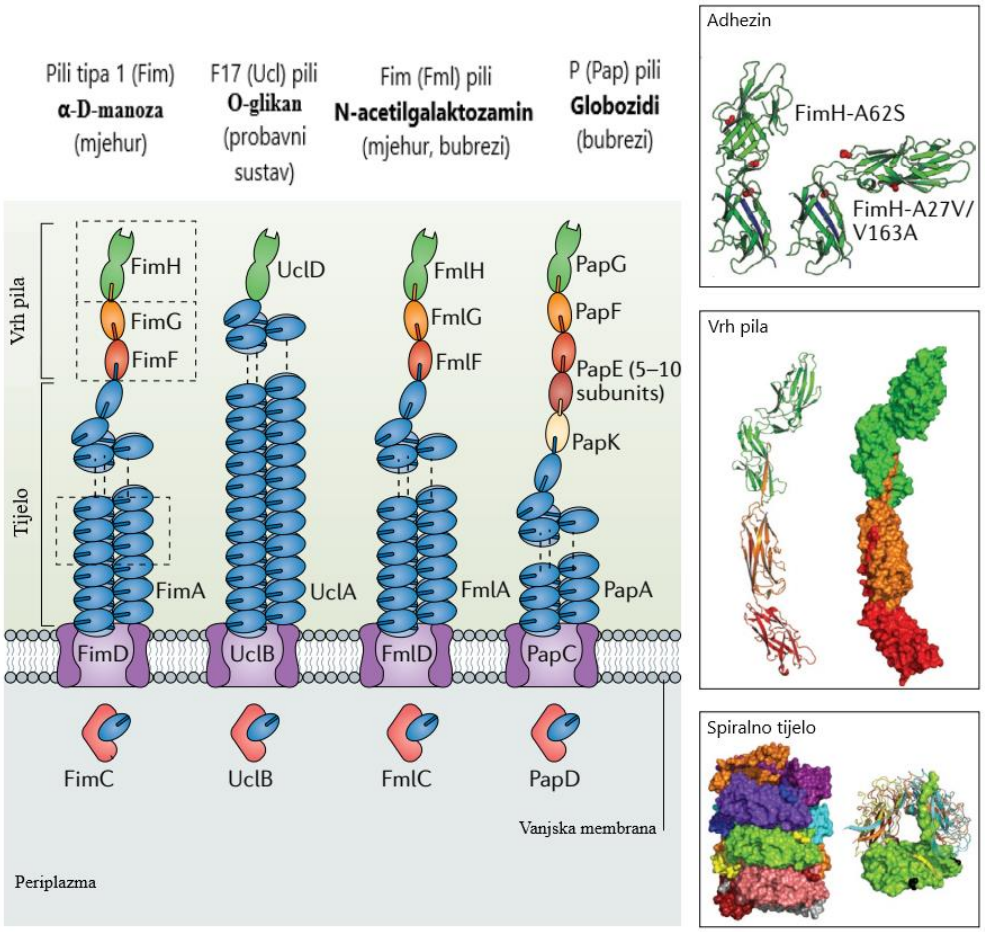
Adherencija je ključan faktor virulencije zbog kojeg nastaju urinarne infekcije. Stanični organeli pili koji se nalaze na staničnoj stjenci omogućuju bakterijama sposobnost adherencije te posljedično tome kolonizacije i migracije u urinarnom traktu. Kompatibilnost između domaćina i patogena u mjehuru određuje uspješnost kolonizacije ili eliminacije patogena (Flores-Mireles, 2015.). Bakterijski adhezini (slika 2.6.) prepoznaju receptore koji se nalaze na epitelnim stanicama mjehura i posreduju kolonizaciji (Vraneš, 1994.). Razmnožavanjem i izbjegavanjem imunološkog sustava uropatogeni se mogu naknadno dospjeti u bubrege te preko adhezina se ponovno vezati za epitelne stanice bubrega i proizvoditi bakterijske toksine (Flores-Mireles 2015.). Uropatogeni mogu proći kroz tubularni epitel bubrega i završiti u krvotoku gdje uzrokuju bakterijemije. Izolati iz fekalija, vrste izolirane kod asimptomatske bakteriurije i pijelonefritisa razlikuju se po sposobnosti vezanja za epitelne stanice urinarnog trakta što pokazuje kako je adherencija bitan faktor virulencije (Köves i Wullt, 2016.).



Slika 1.6. Mehanizam djelovanja adhezije uropatogena na epitelne stanice
(Izvor: Vraneš, 1994.)

P pili i pili tipa 1 (slika 2.7.) najvažniji su pili kada se govori o adherenciji uropatogena, a pogotovo kada se radi o *Escherichia coli*. Uropatogeni su karakterizirani kao organizmi sa velikim brojem pila i mogućnošću sintetiziranja više različitih pila uključujući P pile i pile tipa 1 (Köves i Wullt, 2016.). Ostali faktori adherencije osim P pila i pila tipa 1 slabo su proučeni te nisu se pokazali kao značajni pokazatelji virulencije uropatogena (Köves i Wullt, 2016.). P pili kodirani su od strane pap genetskog klastera, a adhezin PapG nalazi se na vrhu pila te posreduje povezivanje za epitelne stanice urinarnog trakta. PapG na vrhu povezuje se s globozidnim receptorima popraćeno aktivacijom imunog sustava domaćina (Wright, 2006.). P pili pokazali su snažnu vezu sa akutnim tijekom urinarnih infekcija posebice sa pijelonefritisom

(P = pijelonefiritogeni). Trećina sojeva koje uzrokuju cistitis sintetiziraju P pile (Köves i Wullt, 2016.).



Slika 2.7. Vrste i građa pila uropatogena

(Izvor: prilagođeno prema Klein i Hultgren, 2020.)

Pili tipa 1 kodirani su od strane FIM genskog klastera i izraženi su na većini izolata *E. coli* bez obzira na izvor. Adhezin FimH nalazi se na vrhu i nema specifičnog receptora ali se veže na manozne epitope i α3β1 transmembranski receptor koji se nalaze na površini epitelnih stanica urinarnog trakta (Rosen i sur., 2008.). Eksperimentalne studije pokazale su kako povezivanje pila tipa 1 za epitelne stanice urinarnog trakta prati formiranje unutarstaničnih bakterijskih zajednica (biofilm) koje mogu izazvati rekurentne upale (Wright i sur., 2007.).

Klebsiella pneumoniae kao i *E. coli* koristi pile tipa 1 za formiranje biofilma i kolonizaciju mjehura (Flores-Mireles i sur., 2015.). Iako su adhezini FimH visoko homologni sa FimH E.coli imaju različite specifičnosti vezanja. Heptil manoza inhibira *Klebsiella pneumoniae* FimH koji

posreduje stvaranju biofilma dok je kod *E. coli* FimH inhibiran od strane metil manoze (Stahlhut, 2009.). *Klebsiella pneumoniae* FimH adhezin ima slabija svojstva adhezije od FimH *E. coli* ali je bitan faktor virulencije tijekom kolonizacije i formiranja biofilma (Rosen i sur., 2008.). Isto tako *Klebsiella pneumoniae* sintetizira pile tipa 3 koji isto sudjeluju u kolonizaciji i formiranju biofilma (Murphy i sur., 2013.).

Proteus mirabilis sadrži pile koji se ne vežu za manozu takozvane manoza rezistentne pile (MR/P). MR/P pili potiču nastajanje biofilma, kolonizacije mjehura i bubrega (Nielubowicz i Mobley, 2010.). *Proteus mirabilis* tip pila važan je za kolonizaciju mjehura i bubrega, dok neaglutinirajući pili (NAFs) imaju sposobnost vezanja za epitelne stanice (Armbruster i Mobley, 2012.). *Proteus mirabilis* uz navedene pile sadrži i dva autotransportna sustava, trimerni autoaglutininski autotransporter (Taap) i autotransporter odgovoran za adheziju i invaziju (AipA) koji imaju važnu ulogu u infekciji mjehura i bubrega (Armbruster i Mobley, 2012.).

Enterococcus spp. kodiraju nekoliko adhezina, a to su adhezin kolagena (Ace), površinski protein enterokoka (Esp), antigen polisaharida enterokoka (Epa) i pili povezani sa endokarditisom i formiranjem biofilma. Imaju sposobnost vezanja na kateter i uzrokuju urinarne infekcije povezane sa kateterom (Arias i Murray, 2012.).

2.4.2. Proteaze i toksini

Escherichia coli sintetizira velike koncentracije α-hemolizina (HlyA) koji se u ovisnosti o Ca^{2+} oligomeracijom integrira u područja bogata kolesterolom unutar stanice (Dhakal i Mulvey 2012.). α-hemolizin formira pore unutar epitelnih stanica i izaziva lizu stanice i dolazi do oslobađanja željeza i nutrijenata. Toksin α-hemolizin uzrokuje eksfolijaciju stanica izlažući dublje slojeve epitelnih stanica kolonizaciji i širenje *Escherichia coli* u druge stanice domaćina gdje ima važnu ulogu u formiranju unutarstaničnih bakterijskih zajednica (Justice i Hunstad, 2012.). Isto tako *E. coli* izlučuje citotoksični nekrotizirajući faktor 1 (CNF1) koji utječe na preinake aktina u stanici domaćina. CNF1 ulazi u endocitozne vezikule unutar stanice vezanjem za adhezivnu molekulu bazalne stanice gdje dolazi do preinake aktina koji dovodi do boljeg inkorporiranja bakterije (Garcia i sur., 2013.).

Proteus mirabilis proizvodi dva toksina, hemolizin (HpmA) i toksični aglutinin Proteusa (Pta) koji sudjeluju u oštećenju tkiva i širenju prema bubrezima gdje uzrokuju akutni pijelonefritis (Jacobsen i sur., 2008.) HpmA je citolizin ovisan o Ca^{2+} koji destabilizira stanicu domaćina ulaskom u nju preko stanične membrane uzrokujući izbacivanje Na^{+} (Cestari i sur.,

2013.). Citotoksična proteaza aktivna je u alkalnom pH koji se postiže aktivnošću ureaze *Proteus mirabilis* (Alamuri i Mobley, 2008.). Citotoksična proteaza djeluje tako da izazove puknuće na staničnoj stjenci gdje dolazi do istjecanja citosola, osmotskog stresa i razlaganja filamenata aktina. Struktura same stanice je narušena što dovodi do oštećenja mjehura i bubrega (Armbruster i Mobley, 2012.)

Pseudomonas aeruginosa proizvodi elastaze, egzoenzim S i hemolitičku fosfolipazu C koje su uključene u nastajanje i širenje urinarnih infekcija te naknadnog nastajanja pijelonefritisa (Mittal i sur., 2006.). Egzoenzim S odgovoran je za adherenciju i morfologiju stanice (Rocha i sur., 2003.) dok elastaze uzrokuju oštećenje tkiva preko svojih proteaza čime se oslobađaju nutrijenti (uključujući željezo) potrebni za rast i razmnožavanje bakterije (Cathcart, 2011.). Fosfolipaza C je α-toksin koji hidrolizira fosfatidilkolin iz stanične membrane domaćina što dovodi do oštećenja tkiva (Meyers, 1992.). Ekspresija navedenih faktora virulencije regulirana je *quorum sensing* sustavom koji se aktivira prilikom velike gustoće stanica od strane malih signalnih molekula koji se nazivaju autoinduktori. Kada se postigne određena razina autoinduktora oni se vežu za proteine aktivatore i aktiviraju faktore virulencije (Senturk i sur., 2012.).

2.4.3. Ureaze

Nekoliko uropatogena sintetiziraju ureaze, a to su *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus saprophyticus* te su važne za kolonizaciju i preživljavanje tijekom infekcija uzrokovanih *Proteus mirabilis* i *Staphylococcus saprophyticus* (Flores-Mireles i sur., 2015.). Ureaze su enzimi koji kataliziraju hidrolizu uree na ugljikov dioksid i amonijak što dovodi do povećanja pH urina (Griffith i sur., 1976.) i proizvodnje kalcijevih soli i struvita u urinu i na površini katetera (Armbruster i Mobley, 2012.). Zbog povećane razine amonijaka u urinu on postaje toksičan za epitelne stanice mjehura i uzrokuje njihovo propadanje (Coker i sur., 2000.). Ureaza *P. mirablis* jedna je od najbolje proučenih ureaza povezanih s urinarnim infekcijama, radi se o metaloenzimu ovisnom o Ni^{2+} koji je neophodan za kolonizaciju mjehura i bubrega te potiče razvoj kalcijevih soli (Armbruster i Mobley, 2012.). Sintezu ureaze *P. mirablis* potiče urea iz mokraće i konstantno se sintetizira tijekom rasta *P. mirablis* u urinu, izrazito je aktivna te vrlo brzo dolazi do formiranja minerala koji ostaju zarobljeni u polisaharidima koje proizvode bakterije tvoreći „mineralni biofilm“ na kateterima (Kosikowska i Berlicki, 2011.). Takav biofilm štiti *P. mirablis* od imunog sustava

domaćina i antibiotika (Coker i sur., 2000.). Isto tako nastali biofilm može spriječiti odvodnju urina iz uretre što rezultira mogućem nastanku pijelonefritisa i septikemije (Armbruster i Mobley, 2012.).

2.4.4. Biofilm

Biofilm predstavlja zajednicu mikroorganizama unutar samorazvijenog polimernog matriksa povezanih na površinu. Biofilm u urinarnom traktu štiti uropatogene od neutrofila imunog sustava domaćina. Isto tako biofilm štiti uropatogene od antibiotika tako što unutar biofilma dospijevaju nedovoljne koncentracije koje bi potpuno uništile uropatogene (Köves i Wullt, 2016.). Formiranje biofilma ima važnu ulogu kod prisustva stranih tijela u urinarnom traktu poput katetera i kamenca. Bakterije unutar biofilma koloniziraju površinu stranih tijela čak i u prisustvu antibiotika što pogoduje nastanku urinarnih infekcija povezanih s kateterizacijom i ostalim stranim tijelima (Tenke i sur., 2014.).

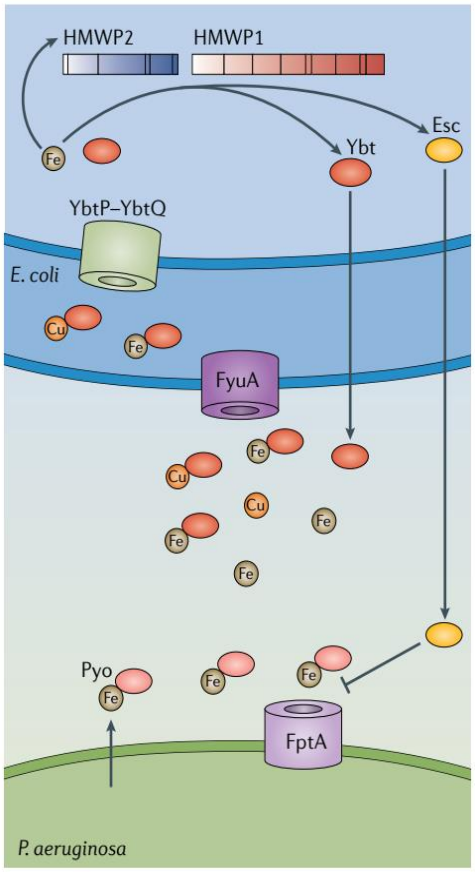
2.4.5. Lipopolisaharid (LPS)

Lipopolisaharid je važan dio vanjske membrane Gram-negativnih bakterija i doprinosi samoj strukturi bakterije. Kod infekcija uzrokovanih Gram-negativnim bakterijama lipopolisaharid je uzročnik upalnih procesa domaćina i glavni uzročnik septičkog šoka uzrokovanog Gram-negativnim bakterijama (Köves i Wullt, 2016.). Lipopolisaharid se sastoji od tri komponente povezane kovalentnim vezama. Unutarnji disaharid s masnim kiselinama naziva se lipid A i on je glavni endotoksin, zatim sljedi oligosaharid koji predstavlja jezgru LPS-a i na kraju se nalazi oligosaharidni lanac zvan O antigen ili O-specifični bočni lanac (Köves i Wullt, 2016.). Dokazano je da lipopolisaharid komunicira sa ostalim faktorima virulencije i da štiti bakterijsku stanicu od imunog sustava domaćina (Dobrindt i sur., 2010.).

2.4.6. Siderofori

Odgovor domaćina na nastanak urinarne infekcije očituje se kao sinteza proteina koji na sebe vežu željezo kako bi ga uskratili patogenom mikroorganizmu. Pošto je urinarni trakt siromašan željezom koji je potreban uropatogenima za rast u takvom okruženju uropatogeni su razvili sideroforni sustav za sakupljanje željeza (Caza i Kronstad, 2013.). *E. coli* proizvodi više siderofora od kojih su za urinarne infekcije najvažniji aerobaktin i yersiniabaktin.

Aerobaktin se sintetizira u velikim količinama, stabilan je pri niskom pH i pokazuje veći afinitet prema željezu od enterobaktina. Yersiniabaktin je važan u formiranju biofilma u urinu, za sakupljanje željeza i bakra te ima zaštitnu ulogu protiv lize uzrokovanu viškom bakra (Klein i Hultgren, 2020.).



Slika 2.8. Sideroforni sustav uropatogena (Izvor: Klein i Hultgren, 2020.)

Yersiniabaktin (Ybt) se povezuje s ionima željeza ili bakra i odvodi ih do vanjskog membranskog sustava (FyuA) za prihvat iona željeza i bakra. Za sintezu yersiniabaktina odgovoran je protein 2 visoke molekulske mase (HMWP2) kojeg kodira irp2 gen reguliran je okolišnom koncentracijom željeza. HMWP2 zajedno s proteinom 1 visoke molekulske mase (HMWP1) katalizira sintezu yersiniabaktina pri niskim koncentracijama željeza. Isto tako siderofori imaju ulogu mikrobnih antagonista gdje eschericelin (Esc) produkt u sintezi yersiniabaktina kod E. coli ometa siderofor piocelin (Pyo) u sakupljanju željeza za *Pseudomonas aeruginosa* (Slika 2.8.) (Johnson, 2018.). *Klebsiella pneumoniae* sintetizira enterobaktin i aerobaktin, *Proteus mirabilis* koristi proteobaktin, siderofor sličan

yersiniabaktinu te *Pseudomonas aeruginosa* koristi piocelin i pioverdin (Klein i Hultgren, 2020.).

3. Bakteriocini

Bakteriocini predstavljaju peptide ili proteine sintetizirane u ribosomima bakterijske stanice i arheja koji kada izađu iz stanice domaćina imaju bakteriostatski ili baktericidni učinak prema drugim srodnim ili nesrodnim mikroorganizmima (Preciado i sur., 2016.). Bakteriocini su prvi puta otkriveni 1925. godine kada je Gratia opazio inhibiciju *Escherichia coli* S od strane *Escherichia coli* V. Fredericq je 1946. godine utvrdio kako je inhibitorno djelovanje bakteriocina određeno specifičnim receptorima na površini stanice te je tako objašnjen limitirani spektar djelovanja prema određenoj vrsti i soju (Güllüce i sur., 2013.). Naziv „bakteriocin“ potječe iz 1953. godine kada je odlučeno definirati kolicine, peptidne inhibitore, koje sintetizira *Escherichia coli* ali se danas ovaj naziv koristi za peptidne inhibitore bilo koje vrste (Molloy i Hill, 2011.). Kod većine bakterijskih vrsta utvrđena je velika raznolikost sintetiziranih bakteriocina, a neke vrste sintetiziraju više različitih bakteriocina (Cintas i sur., 2001.). U zadnjem desetljeću porastao je interes za istraživanje bakeriocina posebice bakteriocina bakterija mliječne kiseline te za njihovom primjenom u prehrambenoj industriji kao konzervans i u medicini kao zamjena za antibiotike (Cleveland i sur., 2001.; Cotter i sur., 2013.). Bakterije ne stvaraju otpornost na bakteriocine što se pripisuje njihovom brzom djelovanju pri niskim koncentracijama te laganom proteolitičkom razgradnjom (Cotter i sur., 2013). Zbog tih svojstava bakteriocini se ne zadržavaju dugo u organizmu domaćina stoga bakterije nemaju mogućnost razviti otpornost. Bastos i sur. (2015.) navode kako je otpornost bakterija na bakteriocine moguća promjenom sastava stanične membrane, dok se otpornost na antibiotike ostvaruje inaktiviranjem aktivne komponente. Bakteriocini su otporni na visoke temperature te djeluju u širokom pH rasponu, nemaju okus, boju i miris. Bakteriocini se često u literaturi poistovjećuju s antibioticima ili ostalim peptidima s antimikrobnim svojstvima ali oni to nisu što je bitno zbog zakonskih regulativa koje ne dopuštaju korištenje antibiotika u industriji (Balciunas i sur., 2013.). Uspoređujući bakteriocine i antibiotike (Tablica 3.1.), bakteriocini se prirodno sintetiziraju ribosomalno dok se antibiotici proizvode putem više enzimatskih kompleksa. Bakteriocini pokazuju uzak spektar djelovanja te djeluju na sojeve iste vrste ili srodne vrste dok antibiotici imaju širok spektar djelovanja. Bakteriocini djeluju pri nižim koncentracijama u usporedbi s antibioticima. Bakteriocini se lako razgrađuju i većinom nisu toksični za eukariotske stanice dok se antibiotici ne razgrađuju u toj mjeri i imaju toksični učinak za većinu eukariotskih stanica (Perez i sur., 2014.). Bakteriocini se sintetiziraju u ranom

ili kasnom stadiju rasta bakterije, mogu ih otpustiti u okolinu ili zadržati ektracelularno (Preciado i sur., 2016.). Bakteriocini bakterija mliječne kiseline najviše se proučavaju zbog svog sigurnosnog statusa (GRAS) s obzirom da se bakterije mliječne kiseline i njihovi metaboliti koriste u prehrambenoj industriji (Zacharof i sur., 2012.).

Tablica 3.1. Usporedba karakteristika bakteriocina i antibiotika

Karakteristike	**Bakteriocini**	**Antibiotici**
Primjena	Prehrana/medicina	Medicina
Sinteza	Ribosomalna	Sekundarni metaboliti
Spektar djelovanja	Uglavnom uzak	Uglavnom širok
Koncentracija	Nano-mikro molarni raspon	Mikro-mili molarni raspon
Proteolitičko-enzimska razgradnja	Visoka	Umjerena do nepostojeća
Termostabilnost	Visoka	Niska
pH raspon	Širok	Uzak
Boja/okus/miris	Ne	Da
Sklonost bioinžinjeringu	Da	Ne
Stvaranje rezistentnosti	Promjene u sastavu stanične membrane	Inaktivacija aktivne komponente genetskim promjenama
Djelovanje	Stvaranje pora, inhibicija biosinteze stanične stijenke	Stanična membrana ili unutarstanična aktivnost
Toksičnost prema eukariotskim stanicama	Većinom ne	Da

(Izvor: Perez i sur., 2014.)

3.1. Klasifikacija bakteriocina BMK

Bakteriocini se klasificiraju na temelju različitih kriterija poput porijekla, molekularne mase, fizikalnih osobina, kemijske strukture i načinu djelovanja (Güllüce i sur., 2013.). U početku bakteriocini su se prema Klaenhammeru klasificirali u četiri kategorije. Prema toj

klasifikaciji skupina 1 ili lantibiotici karakterizirani su termostabilnošću, niskom molekularnom masom (<5 kDa), prisutnošću lantionina i njegovih derivata. Najpoznatiji primjer lantibiotika je nizin. U skupinu 2 spadaju mali termostabilni peptidi do 10 kDa bez lantionina i njegovih derivata, a sastoji se od tri podskupine IIa (pediocin i enterocin), IIb (laktocin G) i IIc (laktocin B). U skupinu 3 spadaju termolabilni peptidi velike molekularne mase (>30 kDa), a predstavnik ove skupine je helveticin J. Četvrta skupina predstavlja velike peptide u kombinaciji s ugljikohidratima ili lipidima (Klaenhammer, 1993.; Balciunas i sur., 2013.). Prema Cleveland i sur. (2001.) kompleksne strukture bakterocina četvrte skupine nedovoljno su pročišćeni ostatci nastali povezivanjem bakteriocina zbog njihovog kationskog i hidrofobnog svojstva s makromolekulama, a ne četvrta skupina bakteriocina. Cotter i sur. (2005.) predlažu novu klasifikaciju u kojoj postoje samo dvije skupine, prva skupina (lantibiotici) i druga skupina (ostali peptidi koji ne sadrže lantionin). Prema istoma autoru termolabilni peptidi visoke molekulske mase ne svrstavaju se pod bakteriocine nego pod bakteriolizine, a četvrtu skupinu bi trebalo u potpunosti izbaciti. Tako su Drider i sur. (2006.) podijelili bakteriocine u tri skupine (Tablica 3.2.) na osnovu genetskih i biokemijskih karakteristika.

Tablica 3.2. Podjela bakteriocina na osnovu genetikih i biokemijskih karakteristika

Klasifikacija	Karakteristike	Podkategorije	Primjer
Skupina I (Lantibiotici)	Sadrže lantionin ili β-lantionin	Tip A (linearna molekula)	nizin, subtilin epidermin
		Tip B (globularna molekula)	mersacidin
Skupina II	Heterogena skupina malih termostabilnih peptida	Podskupina IIa (anitlisterijalni pediocini)	pediocin, enterocin, sakacin
		Podskupina IIb (sastoji se od dva peptida)	plantaricin, laktacin F
		Podskupina IIc (ostali bakterocini)	laktocin
Skupina III	Veliki termolabilni peptidi		helveticin J, milericin B

(Izvor: Drider i sur., 2006.)

Skupina I ili lantibiotici mali su i termostabilni peptidi sačinjeni od 19-38 aminokiselina. Termostabilnost se pripisuje lantioninu ili β-lantioninu koji su prisutni u strukturi ovih peptida (Balciunas i sur., 2013.). Nizin je najpoznatiji bakteriocin skupine I i najistraživaniji, a proizvodi ga nekoliko sojeva *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Sastoji se od 34 aminokiseline i postoje dva oblika nizina, nizin A i Z. Oba oblika imaju istu molekulsku strukturu, a razlikuju se u jednoj amiokiselini. Postoji nova varijanta nizina, nizin U izoliran iz *Streptococcus uberis* sa 78% sličnosti s nizinom A (Nes i sur., 2007.; Balciunas i sur., 2013.).

Druga skupina čini veliku i raznoliku grupu anitmikrobnih peptida koji imaju jednostavniju strukturu u usporedbi s lantibioticima upravo zbog nedostatka lantionina ili β-lantionina. To su mali (<10 kDa) termostabilni peptidi spiralne amfifilne forme (Güllüce i sur., 2013.). Podskupina IIa sadrži bakteriocine poput pediocina, enterocina i sakacina sa snažnom antilisterijalnom aktivnosti. Sintetiziraju ih mnoge vrste BMK, poput *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp. i *E. faeacium* (Cintas i sur., 2001.). Sadrže kationsku hidrofilnu regiju i dvije molekule cisteina međusobno povezane disulfidnim mostom. Karakterizira ih visoka homolognost aminokiselinskog slijeda (38-80%) posebno u N-terminalnom području. S druge strane C-terminalno područje je više hidrofobno i diferencirano (Nes i sur., 2007.; Karpinski i Szkaradkiewicz, 2016.). Podskupinu IIb čine heterodimerni bakteriocini sačinjeni od dva međusobno povezana peptida. Bakteriocini podskupine IIb moraju zadovoljiti tri kriterija, a to su:

- Za potpunu antimikrobnu aktivnost potrebna je aktivnost oba peptida, dok samostalno peptidi pokazuju malu ili nikakvu aktivnost
- Jedan imuno protein je dostatan za otpornost stanice
- Bakteriocini sadrže dvije genske sekvence strukturnih gena koji individualno kodiraju peptide i jedan gen za imunost (Cintas i sur., 2001.; Güllüce i sur., 2013.)

Laktokokcin G prvi je otkriveni bakteriocin ove skupine i njegova antimikrobna aktivnost ovisi o α- i β-peptidima. Plantaricin i laktacin F isto su važni predstavnici ove skupine. Iako je prisutnost oba peptida potrebna za potpunu antimikrobnu aktivnost, Nes i sur., (2007.) navode da se pojedinačni peptidi mogu ponašati kao zaostali antimikrobi sa skromnim učinkom. Također, bakteriocini podskupine IIa mogu se izlučivati općim sekretornim sistemom (Cintas i sur., 1997.). Podskupinu IIc čine bakteriocini koji imaju cikličku strukturu zahvaljujući kovalentnim vezama između C i N terminalnog dijela (Balciunas i sur., 2013.). Kovalentna veza

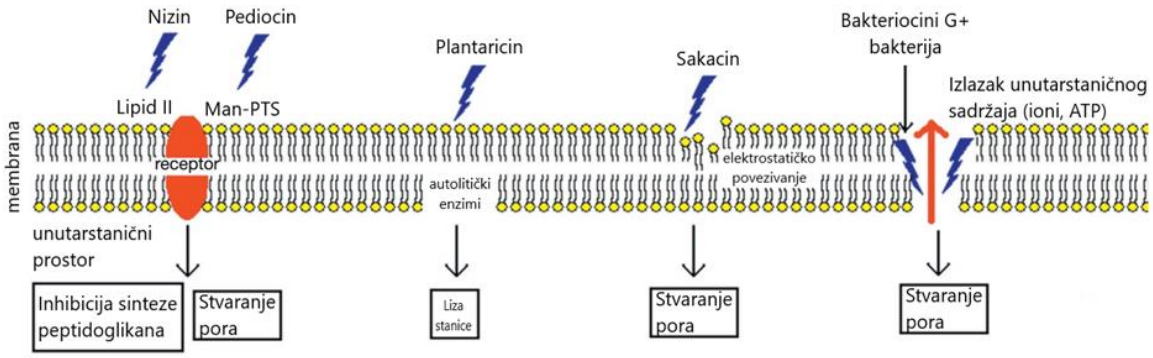
između C i N terminalnog dijela daje ovoj skupini izrazito stabilnu strukturu (Perez i sur., 2014.). Nes i sur. (2007.) opisuju podskupinu IIc kao predstavnika bakteriocina koji se izlučuju općim sekretornim sistemom. Predstavnici, a ujedno i najistraživaniji bakteriocini ove skupine su AS-48, cirkularin A i reutericiklin (Balciunas i sur., 2013.).

Skupina III predstavlja bakteriocine visoke molekulske mase (>30 kDa) koji u usporedbi s bakteriocinima prve i druge skupine ne podnose visoke temperature te se inaktiviraju na 60 – 100 °C/10 – 15 minuta (Cintas i sur., 1997.). Karakteristika treće skupine bakteriocina je njihova kompleksna aktivnost i sinteza proteina koji imaju drugačiji mehanizam djelovanja od ostalih bakteriocina gdje induciraju lizu stanične stijenke ciljanog mikroorganizma. N-terminalni dio djeluje kao endopeptidaza dok C-terminalni dio prepoznaje ciljani mikroorganizam (Balciunas i sur., 2013.). Karpinski i Szkaradkiewicz (2016.) dijele ovu skupinu na bakteriolizine (enterolizin A) i antimikrobne proteine koji ne uzrokuju lizu (helveticin J).

3.2. Mehanizam djelovanja bakteriocina

Bakteriocini mogu djelovati bakteriostatski ili baktericidno i tako izazvati staničnu smrt ili produžiti log fazu bakterija na koje djeluju. Trenutno su poznata četiri antibakterijska mehanizma djelovanja bakteriocina (Slika 3.1.), a to su:

- Baktericidna aktivnost uzrokovana formacijom pora na staničnoj membrani
- Inhibicija biosinteze komponenata stanične stijenke
- Aktivacija enzima odgovornih za autolizu
- Inhibicija stvaranja bakterijskih spora



Slika 3.1. Mehanizam djelovanja bakteriocina

(Izvor: prilagođeno prema Karpinski i Szkaradkiewicz, 2016.)

Trenutno je nekoliko hipoteza o djelovanju bakteriocina, a najvjerovatniji je takozvani model klina koji je nastao na temelju interakcija lantibiotika i površine stanične membrane ciljanih stanica (Karpinski i Szkaradkiewicz, 2016.). Ovaj model karakterističan je za lantibiotike i sve pozitivno nabijene elastične peptidne molekule. Kontakt između bakteriocina i ciljane stanice dolazi elektrostatskom interakcijom između pozitivno nabijenih hidrofobnih bakteriocina i negativno nabijenih fosfolipida u staničnoj membrani ciljane stanice. Prodiranje peptida unutar fosfolipidnog dvosloja inducira lokalno uništenje uređene strukture membrane (Cleveland i sur., 2001.). Nizin ulazi u reakciju s lipidom II na membrani i omogućuje lantibioticima vezanje za staničnu membranu. Ovaj mehanizam uključuje stvaranje tranzitnih pora i ionskih kanala na staničnoj membrani. Posljedično tome dolazi do izlaska malih molekula poput iona kalija, magnezija i fosfora, aminokiselina i ATP-a, posljedično dolazi do disbalansa u membranskom potencijalu i pH. Niska razina ATP-a i iona rezultira inhibicijom DNA, RNA, proteina i sintezi polisaharida što dovodi do smrti bakterijske stanice (Karpinski i Szkaradkiewicz, 2016.).

Bakteriocini druge skupine formiraju pore na staničnoj membrani na dva načina te ona postaje propusna. Prvi model takozvani model „tepiha“ u kojem se pojedinačni peptidi paralelno smještaju s površinom membrane bez stvaranja nakupina. Dolazi do interakcije i preslagivanja dvoslojne membrane i nastajanja lokalnih i propusnih perforacija (Karpinski i Szkaradkiewicz, 2016.). Kod modela „bačve“ hidrofilni dio amfipatskog peptida α-heliksa formira pore u staničnoj membrani. Vanjski hidrofobni dio α-heliksa povezuje se s masnim kiselinama koji čine fosfolipide. Posrednik u povezivanju bakteriocina na staničnu membranu je manoza fosfotransferaza koja predstavlja membranski receptor. Ovakva vrsta povezivanja karakteristična je za bakteriocine bakterija mliječne kiseline iz skupine IIa. Smrtonosna aktivnost očituje se u poremećaju ionske ravnoteže i gubitku anorganskih fosfata kroz nastale pore. Unutarstanična koncentracija ATP-a drastično se smanjuje zbog povećane potrošnje kako bi se održao električni potencijal unutar stanice (Moll i sur., 1999.). Bakteriocini skupine IIb djeluju modelom „tepiha“ i pokazuju snažna ionska svojstva. Nastale pore djelovanjem laktokokcina G propusne su za Na^+, K^+ i kolin, djelovanjem plantaricina E/F pore su propusne za Na^+, K^+, H^+ i kolin, a kod djelovanja laktacina F propusne su za K^+ i fosfate. Stanična smrt nastaje kao posljedica gubitka iona kalija praćena hidrolizom ATP-a. Peptidi bakteriocina podskupine IIb mogu se neovisno vezati za staničnu membranu ali za stvaranje pora potrebna

je sinergija koja se postiže interakcijom između dva komplementarna peptida bakteriocina (Moll i sur., 1999.; Karpinski i Szkaradkiewicz, 2016.).

Drugi mehanizam djelovanja bakteriocina uključuje njihovu sposobnost induciranja lize bakterijskih stanica. Proces započinje interakcijom bakteriocina s teikoičnom i lipoteikoičnom kiselinom koje predstavljaju komponente stanične membrane. Interakcija između bakteriocina i kiselina iz stanične membrane rezultira otpuštanjem i aktivacijom autolitičkih enzima što rezultira autolizom stanice. Bakteriocini koji pripadaju skupini lantibiotika mogu dodatno poremetiti proces biosinteze stanične stijenke inhibirajući sintezu peptidoglikana (Karpinski i Szkaradkiewicz, 2016.)

4. Bakteriocini bakterija mliječne kiseline u liječenju humanih urinarnih infekcija

Rezistentnost na antibiotike predstavlja prilagodbu bakterije i njen rast u prisustvu antibiotika. Stjecanje rezistentnosti povezano je s učestalošću korištenja antibiotika među kojima mnogi spadaju u istu skupinu, stoga rezistentnost na jedan antibiotik može dovesti do rezistentnosti na cijelu skupnu (Smelov i sur., 2016.). Nepravilnim i prekomjernim unosom antibiotika u organizam dolazi do povećanja stope rezistentnosti na njih same. Otprilike 20-50% svih prepisanih antibiotika u američkim bolnicama povezanih s akutnim oboljenjima prepisani su nepotrebno ili neadekvatno (CDC, 2013.). Isto tako loša kvaliteta lijekova u kojima se često nalaze preniske koncentracije aktivne tvari pospješuju stjecanje rezistentnosti (Smelov i sur., 2016.).

U Osječko-baranjskoj županiji Pastuović i sur. (2007.) izolirali su iz 28 097 uzoraka urina izvanbolničkih pacijenata uropatogene od kojih je *E. coli* činila 46,5%. Kod tih 46,5% uzoraka u kojima je bila prisutna *E. coli* određivali su rezistentnost na antibiotike. *E. coli* pokazala se visokorezistentnom prema amoksicilinu (57,8%), sulfometoksazol-trimetoprimu (33,8%) i cefaleksinu (10,8%). Kinoloni antibiotici koji inače pokazuju dobru eradikciju prema uropatogenima nisu se pokazali učinkoviti te je *E. coli* bila rezistentna u 16% uzoraka. Tablica 4.1. prikazuje rezistentnost *E. coli* na sve korištene antibiotike u istraživanju.

Tablica 4.1. Rezistentnost *E. coli na antibiotike*

Antibiotik	Rezistentnost *E. coli* (%)
Amoksicilin	57,8
Sulfometoksazol + trimetoprim	33,8
Norfloksacin	16,1
Ciprofloksacin	15,5
Cefaleksin	10,8
Gentamicin	5,7
Amoksicilin + klavulanska kiselina	2,6
Nitrofurantoin	2,6
Netilmicin	1,1
Cefuroksim	0,8
Ceftibuten	0,5

(Izvor: Pastuović i sur., 2007.)

Andrašević i sur. (2009.) proveli su studiju na 325 hospitaliziranih i 337 ambulantno liječenih bolesnika koja je uključivala ispitivanje rezistentnosti *E. coli* na antibiotike. Rezistentnost *E. coli* promatrana je zasebno kod hospitaliziranih i ambulantno liječenih pacijenata s kompliciranom i s rekurirajućom (ponavljanom) urinarnom infekcijom, a dobiveni podatci uspoređeni su s prosjekom rezistentnosti *E. coli* kod svih oblika urinarnih infekcija (tablica 4.2.).

Tablica 4.2. Rezistentnost *E. coli* kod hospitaliziranih i ambulantno liječenih pacijenata s kompliciranim i rekurirajućim urinarnim infekcijama

Antibiotik	Rezistentnost *E. coli* (%)				
	Hospitalizirani		Ambulantno liječenje		Prosjek
	Komplicirana	Rekurirajuća	Komplicirana	Rekurirajuća	
Amoksicilin	42	43	55	44	44
Amoksicilin/ klavulanska kiselina	4	4	4	5	4
Ceftazidim	4	2	2	1	2
Ciprofloksacin	1	2	12	5	3
Gentamicin	8	10	12	2	6
Netilmicin	3	0	2	0	1
Nitrofurantoin	0	0	0	0	0
Ko-trimoksazol	14	18	39	33	22

(Izvor: Andrašević i sur., 2009.)

Qiao i sur. (2013.) su izolirali uropatogene (*E. coli, Klebsiella pneumoniae* i *Proteus spp.*) iz urina pacijenata te ih uzgajali na hranjivoj podlozi i tretirali antibioticima u proporcionalnim dozama sa standardnom terapijom kod liječenja. Od 87 izolata *E. coli* njih 49,4% bilo je rezistentno na levofloksacin, 50,6% na cefalosporin druge generacije i 57,5% na cefalosporin treće generacije. Rezistentnost *E. coli* na ostale antibiotike prikazana je u tablici 4.3.

Rezistentnost *Klebsiella pneumoniae* na 9 uzoraka kao i *Proteus spp.* koji su bili izloženi antibioticima koji se uobičajeno koriste u liječenju urinarnih infekcija. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4.3.

Tablica 4.3. Rezistentnost *K. pneumoniae*, *Proteus spp. i E.coli* na antibiotike

Antibiotik	Rezistentnost (%)		
	K. pneumoniae	*Proteus spp.*	*E. coli*
Fosfomicin trometamol	0	22,2	2,3
Levofloksacin	33,3	33,3	50,6
Cefdinir	55,6	44,4	54
Cefiksim	44,4	22,2	50,55
Cefaklor	55,6	55,6	54
Cefprozil	55,6	55,6	55,21
Cefuroksim	55,6	55,6	57,5
Amoksicilin/ klavulanska kiselina	0	11,1	4,6
Cefotaksim	44,4	33,3	54
Nitrofuraton	11,1	11,1	2,3

(Izvor: Qiao i sur., 2013.)

Rezistentnost koagulaza negativnih stafilokoka ispitana je na 26 uzoraka. Rezistentnost na antibiotik azitromicin iznosila je 84,6% i na levofloksacin 50%. Koagulaza negativni stafilokoki pokazali su najmanju rezistentnost na nitrofurantoin koja je iznosila 0% i na fosfomicin trometamol koja je iznosila 3,8% kao i cefotaksim. Rezistentnost *E. faecalis* ispitana je na 15 uzoraka te kao i koagulaza negativni stafilokoki najveću rezistentnost pokazuju prema azitromicinu 84,6% i levofloksacin 56,2% dok na fosfomicin trometamol, cefotaksim i nirofurantoin ne pokazuju nikakvu rezistentnost. Rezistentnost na ostale antibiotike prikazana je u tablici 4.4.

Tablica 1.4. Rezistentnost koagulaza negativnog *Staphylococcus spp.* i *E. faecalis* na antibiotike

Antibiotik	Rezistentnost (%)	
	Koagulaza negativni *Staphylococcus spp.*	*E. faecalis*
Fosfomicin trometamol	3,8	0
Levofloksacin	50	56,2
Moksifloksacin	26,9	25
Cefdinir	26,9	31,2
Cefaklor	11,5	12,5
Cefprozil	11,5	12,5
Cefuroksim	11,5	12,5
Amoksicilin/ klavulanska kiselina	11,5	12,5
Cefotaksim	3,8	0
Azitromicin	84,6	81,2
Nitrofurantoin	0	0
Oksacilin	61,5	62,5

(Izvor: Qiao i sur., 2013.)

Akter i sur. (2013.) proveli su studiju u kojoj su izolirali uropatogene iz 96 uzoraka urina pacijenata s urinarnom infekcijom i testirali ih na rezistentnost na antibiotike. Dobivene rezultate za *E. coli* i *Klebsiela spp.* usporedili su s prijašnjim istraživanjima (Talukder i sur., 1987., Rahman i sur., 1990., Zakaria i sur., 2002., Islam i sur., 2009.) kako bi utvrdili dali se rezistentnost na antibiotike povećava. Rezultati istraživanja Aktera i sur. (2013.) prikazani su u tablici 4.5., a usporedba s prijašnjim istraživanjima prikazana je u tablici 4.6.

Tablica 4.5. Rezistentnost uropatogena na antibiotike

Antibiotik	Rezistentnost (%)				
	E. coli (n=19)	*Klebsiella spp.* (n=10)	*Staphylococci* (n=11)	*Pseudomonas spp.* (n=5)	Ostali Gram-bacili (n=10)
IMP	5	12	0	40	20
AZT	52,6	30	54,5	80	80
CIP	52,6	40	63,6	80	40
TE	78,9	80	100	100	40
AMP	78,9	60	45,5	100	70
SXT	89,5	70	36,4	60	60
GM	73,7	40	27,3	80	70
ATH	15,8	40	90,91	40	40
NA	68,4	60	81,8	80	50
NI	73,7	80	90,91	100	100
CFX	42,1	50	36,4	100	70

(Izvor: Akter i sur., 2013.)

IMP: imipenem, AZT: aztreonam, CIP: ciprofloksacin, TE: tetraciklin, AMP: amoksicilin, SXT: sulfometoksazol + trimetoprim, GM: gentamicin, ATH: azitromicin, NA: nalidiksična kiselina, NI: nitrofurantoin, CFX: cefaleksin

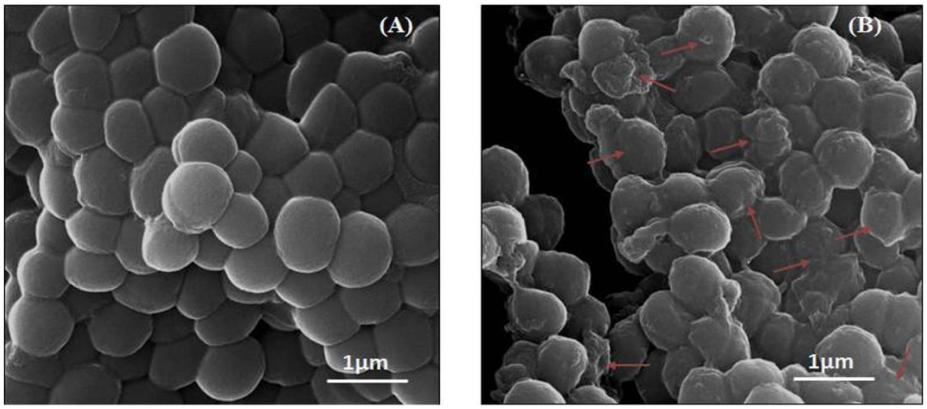
Rezistentnost *E. coli* iznosila je više od 50% na 8/11 antibiotika, dok je *Klebsiella spp.* bila rezistentna više od 40% na 6/11 antibiotika. *Pseudomonas spp*. pokazao je potpunu rezistentnost na tetraciklin, amoksicilin, nitrofurantoin i cefaleksin i visoku rezistenciju prema aztreonamu, ciprofloksacinu, gentamicinu i nalidiksičnoj kiselini. Rezistentnost uropatogena na antibiotike je visoka i alarmantna što za posljedicu ima brojna neuspjela liječenja. Uspoređujući rezultate (Tablica 4.6.) vidljiv je porast rezistentnosti *E. coli* i *Klepsiella spp*. s godinama na cefaleksin, nalidiksičnu kiselinu, nitrofurantoin i gentamicin.

Tablica 4.6. Rezistentnost *E. coli* i *Klebsiella spp.* na antibiotike

Uropatogen	Antibiotik	Rezistentnost (%)				
		Talukder (1987.)	Rahman (1990.)	Zakaria (2002.)	Islam (2009.)	Akter (2013.)
E. coli	Cefaleksin	-	33	61,4	-	42,1
	Nalidiksična kiselina	15	20	65,3	32,3	68,4
	Nitrofurantoin	10	18,5	43,6	3,2	73,7
	Gentamicin	0	22	41,6	48,4	73,7
Klebsiella spp.	Cefaleksin	-	30	48,8	-	50
	Nalidiksična kiselina	-	36	44	-	60
	Nitrofurantoin	-	24	34,4	-	80
	Gentamicin	-	30	20,8	-	40

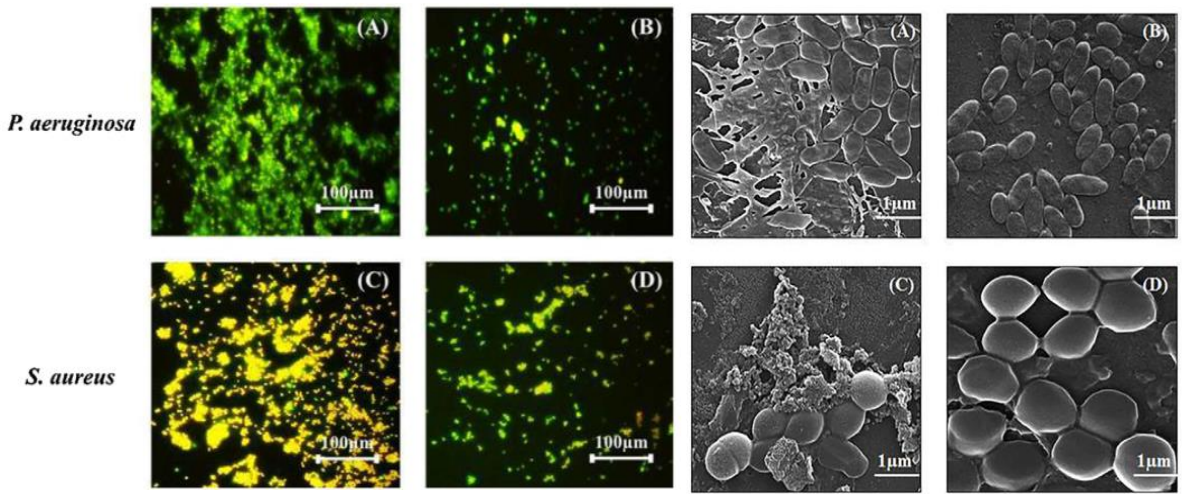
(Izvor: Akter i sur., 2013.)

Sve veća rezistentnost uropatogena na antibiotsko liječenje dovelo je do potrebe za istraživanjem antimikrobnih tvari kako bi se pronašla adekvatna zamjena za antibiotike koji pokazuju sve manju uspješnost u liječenju urinarnih infekcija. Amirta i sur. (2019.) istraživali su aktivnost bakteriocina protiv biofilma i antibakterijsku aktivnost bakteriocina koje proizvodi *Lactobacillus plantarum* SJ33 na kateterima. Bakterijske stanice *Staphylococcus aureus* tretirali su bakteriocinima *Lactobacillus plantarum* SJ33 te su usporedili s netretiranim stanicama. Promatrajući kroz elektronski mikroskop (Slika 4.1.) uočili su kako su netretirane stanice očuvane, pravilnog oblika i odvojene jedna od druge. Stanice tretirane s bakteriocinima bile su deformirane sa značajnim porama na staničnoj membrani iz kojih izlazi unutarstanični sadržaj što potvrđuje baktericidni mehanizam djelovanja bakteriocina.



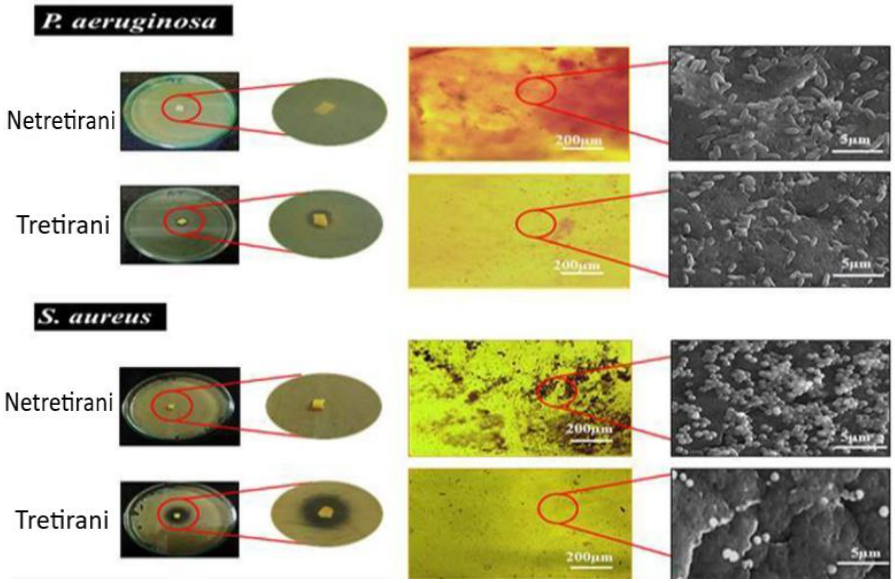
Slika 4.1. Netretirane (A) i tretirane (B) stanice *Staphylococcus aureus* bakteriocinom kojeg sintetizira *Lactobacillus plantarum* SJ33 promatrane pod elektronskim mikroskopom (Izvor: Amirta i sur. 2019.)

Netretirani biofilm *P. aeruginosa* imao je optičku gustoću (600 nm) 2,0 dok je *S. aureus* imao 1,5. Biofilm *P. aeruginosa* nakon tretiranja s bakteriocinom pokazao je 56% inhibicije, dok je biofilm *S. aureus* pokazao 62% inhibicije (Slika 4.2.). Tretirani biofilm *P. aeruginosa* i *S. aureus* s nepročišćenim bakteriocinom pokazuje manju aktivnost i inhibiciju 44% biofilma *P. aeruginosa* i 15% biofilma *S. aureus.*



Slika 4.2. Netretirani (A) i (C) i tretirani (B) i (D) biofilm *P. aeruginosa* i *S. aureus* bakteriocinom *Lactobacillus plantarum* SJ33 promatrane pod flourescentnim i elektronskim mikroskopom (Izvor: Amirta i sur., 2019.)

Svojstvo inhibicije uropatogena na kateteru proveli su tako da je manji dio katetera obložen bakteriocinom dok drugi dio nije tretiran. Zona inhibicije promatrana je na kateterima obloženim bakteriocinom protiv *P. aeruginosa i S. aureus* te uspoređena s netretiranim kateterima. Utvrđene su razlike u bakterijskoj adherenciji i inhibiciji biofilma između bakteriocinom obloženog katetera i neobloženog katetera pri čemu je kod obje vrste bakterija vidljiva zona inhibicije ali je ta zona jasnija kod katetera sa *S. aureus* nego *P. aeruginosa.* (Slika 4.3.).



Slika 4.3. Inhibicija *P. aeruginosa* i *S. aureus* na dijelu katetera obloženim bakteriocinom (Izvor: prilagođeno prema Amirta i sur., 2019.)

Trivedi i sur. (2013.) izolirali su bakteriocin DT24 kojeg proizvodi *Lactobacillus brevis* DT24 i ispitali njegovu učinkovitost protiv uropatogene *E. coli* i ostalih uropatogena. Na temelju dobivenih rezultata zaključili su da bakteriocin DT24 ima širok spektar djelovanja. Bakteriocin DT24 pokazao je visoka antimikrobna svojstva prema uropatogenima *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* i *E. faecium* ali loša antimikrobna svojstva prema *P. aeruginosa* (Tablica 4.7.).

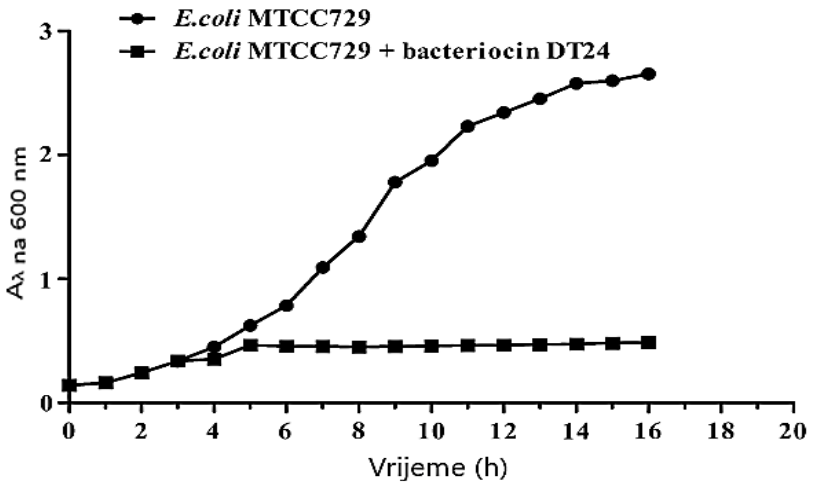
Tablica 4.7. Inhibicija uropatogena bakteriocinom DT24

Uropatogen	Inhibicijski prsten (mm)
Escherichia coli MTCC 729	29 ± 0,03

Escherichia coli MTCC 443	26 ± 0,01
Enterococcus faecium	26 ± 0,27
Enterococcus faecalis	23 ± 0,30
Staphylococcus aureus MTCC 737	21 ± 0,15
Pseudomonas aeruginosa MTCC 1688	16 ± 0,21

(Izvor: Trivedi i sur., 2013.)

Isto tako ispitali su utjecaj bakteriocina DT24 na *E. coli* u ranoj eksponencionalnoj fazi rasta u periodu od 16 sati. Uzorak uropatogena *E. coli* tretiran s bakteriocinom DT24 pokazao je povećanje optičke gustoće sa 0,142 na 0,457 u razdoblju od 7 sati. Kontrolni uzorak u kojem se nalazi uropatogena *E. coli* netretirana bakteriocinom pokazao je povećanje optičke gustoće sa 0,142 na 1,094 tijekom 7 sati (Slika 4.4.). Bakteriocin DT24 pokazao se najuspješnijim u inhibiciji uropatogene *E. coli, E. faecium, E. faecalis* i *S. aureus* te se pri tome pokazao stabilnost u širokom pH rasponu (2,0 - 10,0) i otpornost na temperaturu od 30 – 100 °C. Na temelju dobivenih rezultata bakteriocin DT24 ima potencijalnu upotrebu u prevenciji i liječenju urinarnih infekcija ali su potrebna daljnja istraživanja.



Slika 4.4. Optička gustoća *E. coli* i *E. coli* s bakteriocinom DT24 u periodu od 16 sati

(Izvor: Trivedi i sur., 2013.)

Tako su Ramasamy i Suyambulingam (2015.) izolirali *Lactobacillus spp*. iz usirenog mlijeka i ispitali utjecaj njihovih bakteriocina na uropatogene kod osoba s dijabetesom. Sojevi su indentificirani na temelju 16S rRNA sekvence te su sa 100%-tnim podudaranjem identificirani

L. casei XM2-1, *L. acidophilus* JCM1132, *L. fermentum* BCS25, *L. plantarum* ATCC8041. Izolirani uropatogeni iz urina osoba s dijabetesom koji imaju urinarnu infekciju su *Streptococcus spp*. VAMC 3076, *Staphylococcus aureus* CLRSA3, *Escherichia coli* KVP104, *Pseudomonas aeruginosa* AU04. Najveću antimikrobnu aktivnost prema svim uropatogenima imali su bakteriocini *L. fermentum* BCS25 (osim kod *Pseudomonas spp.*) i *L. acidophilus* JCM1132 dok bakteriocini *L. casei* XM2-1 i *L. plantarum* ATCC8041 pokazuju nisku ili nikakvu aktivnost prema uropatogenima što je prikazano u tablici 4.8. Autori navode kako su potrebna daljnja klinička istraživanja kako bi se potvrdili dobiveni rezultati u ovom preliminarnom istraživanju. Isto tako kritični faktor u liječenju urinarnih infekcija bakteriocinima odnosno probioticima je adekvatan odabir vrste koja će uspješno inhibirati uzročnika urinarne infekcije.

Tablica 4.8. Antimikrobno djelovanje bakteriocina *Lactobacillus spp*. na uropatogene

Uropatogen	Inhibicijski prsten (mm)			
	L. casei XM2-1	*L. acidophilus* JCM1132	*L. fermentam* BCS25	*L. plantarum* ATCC8041
Streptococcus spp.	0	11	22	0
Staphylococcus spp.	1	9	21	2
E.coli	0	12	19	0
Pseudomonas spp.	0	9	2	2

(Izvor: Ramasamy i Suyambulingam, 2015.)

Mahdi i sur. (2020.) su izolirali bakteriju *K. pneumonia* iz 47 uzoraka od kojih je 16 uzoraka uzeto s katetera i 31 uzoraka iz urina. Od ukupno 47 uzoraka, njih 25 je imalo snažnu sposobnost tvorbe biofilma, 16 blagu i 6 slabu sposobnost. Izolati su tretirani antibioticima koji se uobičajeno koriste u liječenju urinarnih infekcija te su svi pokazali visoku rezistentnost na antibiotike osim na antibiotik amikacin. Djelovanje amikacina kao jedinog uspješnog antibiotika protiv *K. pneumonia* daljnje je uspoređeno s djelovanjem bakteriocina enterocina kojeg sintetizira *E. faecalis* na *K. pneumonia* (tablica 4.9.). Korišteni izolati *K. pneumonia* u usporedbi amikacina i enterocina imali su formiran biofilm. Očitanja optičke gustoće nakon tretiranja enterocinom najvjerovatnije pokazuju vrijednosti koje se odnose na preostale egzopolisaharide bakterije. Učinkovitost enterocina i amikacina ispitana je i na manjim dijelovima katetera koji su podijeljeni u 4 grupe:

I) kateter bez *K. pneumonia* bez tretiranja, visina površine katetera 7,34 nm

II) *K. pneumonia* na kateteru bez tretiranja, visina površine katetera 20,31 nm

III) *K. pneumonia* na kateteru i tretiran enterocinom, visina površine katetera 7,27 nm

IV) *K. pneumonia* tretiran amikacinom, visina površine katetera 9,19 nm.

Na temelju dobivenih rezultata istraživanja enterocin se pokazao djelotvorniji od najdjelotvornijeg antibiotika amikacina te se može koristiti u tretiranju urinarnih infekcija izazvanih uropatogenom *K. pneumonia.*

Tablica 4.9. Optička gustoća i broj kolonija *K. pneumonia* biofilma nakon tretiranja s amikacinom i pročišćenim enterocinom

K. pneumonia izolat	Parametar	Prije tretmana	Nakon tretmana	
			Enterocin	Amikacin
K16	Optička gustoća	0,903 ± 0,238	0,466 ± 0,05	0,62± 0,016
	Broj kolonija (CFU/ml)	649668 ± 7765,45	0	5433±1997,5
K19	Optička gustoća	2,224± 0,89	0,585 ± 0,074	1,071 ± 0,075
	Broj kolonija (CFU/ml)	8541662 ± 208169	0	969410 ± 14640,13
K44	Optička gustoća	0,531 ± 0,19	0,169 ± 0,029	0,466± 0,107
	Broj kolonija (CFU/ml)	3976432 ± 3055,04	0	5475 ± 208,17
K46	Optička gustoća	0,615 ± 0,127	0,456 ± 0,049	0,84± 0,181
	Broj kolonija (CFU/ml)	401668 ± 4142,45	0	451,665± 30,913

(Izvor: Mahdi i sur., 2020.)

Ilayajara i sur. (2011.) proveli su istraživanje u cilju izolacije *Lactobacillus fermentum* iz humanog mlijeka. Utvrđena je antimikrobna aktivnost bakteriocina prema uropatogenim bakterijama: *Staphylococcus aureus, Proteus spp., Enterococcus spp., Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella spp.* Uropatogene bakterije tretirane su bakteriocinom probiotičke bakterije *Lactobacillus fermentum* na hranjivoj podlozi kroz 24 sata inkubacije na 37 °C nakon čega je izmjeren inhibicijski prsten. Svi uropatogeni pokazali su osjetljivost na bakteriocin bakterije *Lactobacillus fermentum.* Najveću osjetljivost prema bakteriocinu pokazali su uropatogeni *Staphylococcus aureus i Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli i Klebsiella spp.* dok je najmanja osjetljivost prisutna kod uropatogena *Enterococcus spp.* i *Proteus spp.* Provedeno istraživanje ukazuje da *Lactobacillus fermentum* izoliran iz humanog mlijeka ima sposobnost inhibiranja uropatogena izvanstaničnim bakteriocinima koje sintetizira. Glavni cilj probiotičkog djelovanja pri liječenju urinarnih infekcija je spriječiti nagli porast uropatogena u urinarnom traktu dok se prirodna mikrobiota ponovno ne uspostavi.

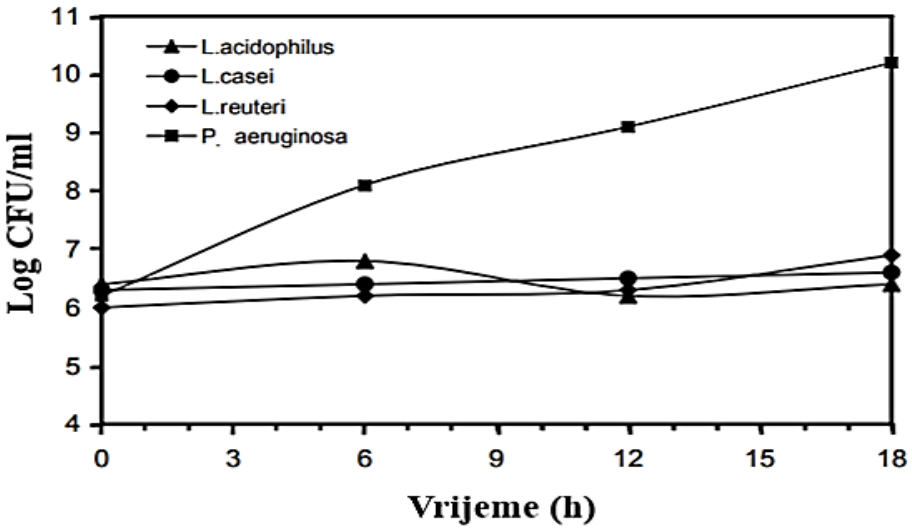
Bakteriocini kao antimikrobni proteini mogu djelovati i u kombinaciji sa drugim spojevima poput mliječne kiseline i vodikovog peroksida. Mokoena (2017.) navodi kako bakteriocini u kombinaciji sa mliječnom kiselinom i vodikovim peroksidom ne moraju uvijek biti odgovorni za antimikrobno djelovanje ali su odgovorni za kolonizaciju urinarnog trakta djelovanjem bakterija mliječne kiseline. Jamalifar i sur. (2011.) istraživali su antimikrobna svojstva različitih *Lactobacillus* vrsta na antibiotik rezistentne izolate uropatogena *Pseudomonas aeruginosa. Lactobacillus* vrste izolirane su iz dječjeg fecesa te su uzgajane na čvrstoj hranjivoj podlozi. Najaktivnije vrste izabrane su za ispitivanje inhibicije 10 antibiotik rezistentnih sojeva *Pseudomonas aeruginosa,* a to su *Lactobacillus plantarium, Lactobacillus acidophilus* JFSH*, Lactobacillus casei, Lactobacillus fermentum*. Uz autohtone *Lactobacillus* vrste u istraživanje su uključene i komercijalne vrste *Lactobacillus acidophilus* iz proizvoda za intimnu njegu i *Lactobacillus reuteri* iz proizvoda za higijenu usne šupljine. U Muller-Hinton bujon dodani su supernatanti *Lactobacillus* vrsta i *Pseudomonas aeruginosa* (4×10^5 CFU/ml) u istom omjeru nakon čega je izmjerena optička gustoća pri 580 nm. Na temelju optičke gustoće utvrđen je postotak inhibicije *Pseudomonas aeruginosa* u periodu od 48 i 72 sata (tablica 4.10.). Ukupan broj bakterija određen je metodom razmazivanja i prebrojavanja u petrijevoj zdjelici.

Tablica 4.10. Inhibicija antibiotik rezistentnih sojeva *Pseudomonas aeruginosa* s *Lactobacillus* vrstama

Lactobacillus vrste	Inhibicija *Pseudomonas aeruginosa* (%)	
	48 h	72 h
Lactobacillus plantarium	40	80
Lactobacillus acidophilus JFSH	40	90
Lactobacillus casei	10	90
Lactobacillus fermentum	60	20
Lactobacillus acidophilus (komercijalni)	0	0
Lactobacillus reuteri	20	70

(Izvor: Jamalifar i sur., 2011.)

Lactobacillus acidophilus JFSH izoliran iz dječjeg fecesa pokazao je najveću aktivnost u inhibiciji *Pseudomonas aeruginosa* tijekom 72 h. *Lactobacillus plantarium* i *Lactobacillus casei* nakon 72 h pokazuju visoku inhibiciju u usporedbi s *Lactobacillus casei* koji u prvih 48 sati pokazuje izrazito nisku inhibiciju prema *Pseudomonas aeruginosa. Lactobacillus reuteri* pokazuje srednju inhibiciju, dok *Lactobacillus acidophilus* (komercijalni) ne pokazuje nikakvu inhibiciju *Pseudomonas aeruginosa*. Iako *Lactobacillus casei, Lactobacillus reuteri* i *Lactobacillus acidophilus* (komercijalni) imaju manji postotak inhibicije u bujonu, pokazali su značajno bolju inhibiciju prema *Pseudomonas aeruginosa* na čvrstoj hranjivoj podlozi (Slika 4.5.).



Slika 4.5. Inhibicija *Pseudomonas aeruginosa* probiotičkim bakterijama *L. acidophilus*, *L. casei, L. reuteri* na čvrstoj hranjivoj podlozi u periodu od 18 sati (Izvor: Jamalifar i sur., 2011.)

Dobiveni rezultati upućuju na to da odabrani sojevi *Lactobacillus spp.* odnosno mliječna kiselina, vodikov peroksid i bakteriocini koje sojevi sintetiziraju imaju inhibitorni odnosno bakteriostatsko djelovanje na uropatogene sojeve *Pseudomonas aeruginosa* te spriječavaju njihov daljni rast ali nemaju bakteriocidnu sposobnost. Isto tako primjećena je različita aktivnost *Lactobacillus spp*. u bujonu i krutom hranjivom mediju. *L. acidophilus, L. casei, L. reuteri* pokazali su bolju aktivnost u krutom hranjivom mediju što se pripisuje boljoj difuziji sintetiziranih antimikrobnih tvari *Lactobacillus spp*. Laktobacili imaju sposobnost inhibiranja *P. aeruginosa* različitim mehanizmima. Ove korisne bakterije mogu poslužiti kao prirodni ljekoviti mikroorganizmi s ciljem sprječavanja rasta i razmnožavanja uropatogena *P. aeruginosa* u urinarnom traktu.

Abdulwahab i sur. (2013.) izolirali su i identificirali vaginalne laktobacillus vrste od kojih su najzastupljenije bile *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus fermentum* i *Lactobacillus delbrueckii.* Uspješnost inhibicije *E. coli* mjerena je dijametrom inhibicijskog prstena na hranjivoj podlozi, a dijametar veći od 5 mm utvrđen je u 72,7% uzoraka. Autori navode kako je minimalna koncentracija mliječne kiseline potrebna za inhibiciju uropatogenih sojeva *E. coli* 2,82 mg/ml ali da isto tako mliječna kiselina nije jedina odgovorna za inhibiciju uropatogena nego i vodikov peroksid, bakteriocini i površinski aktivni spojevi koje sintetiziraju laktobacili. Dobiveni rezultati pokazuju potencijalnu primjenu nekih vaginalnih sojeva *Lactobacilus spp.* u cilju probiotičkog terapijskog liječenja ili kao profilaksa kod urinarnih infekcija.

U radu Butlera i sur. (2016.) istražen je utjecaj probiotičke bakterije *Lactobacillus crispatus* odnosno njenog soja CTV-05 u obnavljanju prirodne zaštitne mikrobiote na sluznici uretre u cilju sprječavanja rekurentnih urirarnih infekcija. Istraživanje je pokazalo kako *L. crispatus* CTV-05 prilikom inkubacije s vaginalnim epitelnim stanicama nema citotoksično djelovanje na iste odnosno nema vidljivih staničnih smrti ili oštećenja. Za usporedbu, ispitana je citotoksičnost uropatogenih sojeva *E. coli* R45 i *E. coli* J96 na vaginalne epitelne stanice koji su se pokazali izrazito citotoksični pri 10^3 CFU/ml. Isto tako vaginalne epitelne stanice bile su inokulirane s 10^8 CFU/ml *L. crispatus* CTV-05 jedan sat prije dodavanja 10^3 CFU/ml uropatogenih sojeva *E. coli* R45 i *E. coli* J96 kako bi se utvrdila zaštitna funkcija *L. crispatus* CTV-05. Dobiveni rezultati pokazali su značajnu razliku u živom broju vaginalnih epitelnih stanica nakon 8 sati u uzorcima koji su bili inokulirani *L. crispatus* CTV-05 jedan sat prije dodavanja uropatogena *E. coli* R45 i *E. coli* J96. Ovakvo djelovanje na uropatogene pripisuje se organskim kiselinama prvenstveno mliječnoj i octenoj kiselini, vodikovom peroksidu i bakteriocinima koje sintetizira *L. crispatus* CTV-05. Vaginalne epitelne stanice inokulirane s *L. crispatus* CTV-05 i uropatogenima *E. coli* R45 i *E. coli* J96 pokazuju manji upalni proces odnosno manju koncentraciju interleukina 1 beta koji je prirodni imuni odgovor u borbi protiv infekcije u odnosu na vaginalne epitelne stanice inokulirane samo s uropatogenima. Dobiveni rezultati pokazuju zaštitnu ulogu probiotičke bakterije *L. crispatus* CTV-05 u smanjenju rizika od rekurirajuće urinarne infekcije.

Bulgasem i sur. (2015.) proveli su istraživanje kako bi utvrdili sposobnost bakterija mliječne kiseline izoliranih iz meda u svrhu sprječavanja stvaranja biofilma *Candida spp*. Bakterije mliječne kiseline koje su pokazale djelovanje protiv *Candida spp*. izolirane su u 10 od 15 uzoraka meda. Identifikacijom na temelju 16S rDNA utvrđeno je da su izolirane BMK vrste *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus curvatus, Pediococcus acidilactici, Pediococcus pentosaceus.* Navedene BMK pokazale su dobru aktivnost u sprječavanju rasta i razmožavanja i adhezije *Candida spp*. U svom radu Atanassova i sur. (2003.) navode kako *L. paracasei subsp. paracasei* M3 izoliran iz bugarskog sira ima antimikrobno djelovanje prema gljivicama *Candida spp.* Ogunshe i sur. (2011.) u svome su radu isto zaključuju kako *L. acidophilus* i *L. plantarum* izolirani iz prirodne mikrobiote vaginalne sluznice imaju antimikrobno djelovanje na sojeve uropatogene *Candida spp.*

5. Zaključak

Urinarne infekcije kao jedne od najčešćih infekcija kod izvanbolničke populacije i hospitaliziranih bolesnika predstavljaju veliki problem za javno zdravstvo. Dodatni problem predstavljaju sve veća rezistentnost na antibiotike te produženo vrijeme njihova korištenja. Jedno od mogućih alternativnih rješenja su bakteriocini bakterija mliječne kiseline koji pokazuju dobre rezultate dosadašnjih istraživanja o njihovom antimikrobnom učinku na uropatogene. Unatoč pozitivnim rezultatima istraživanja o učincima bakteriocina na humane uroinfekcije, za rutinsku primjenu potrebna su dodatna *in vivo* i *in vitro* istraživanja.

6. Literatura

1.Abdulwahab M., Abdulazim A., Nada M.G., Radi N.A. (2013). A study on the inhibitory effect of vaginal lactobacilli on uropathogenic *Escherichia coli*. Life Science Journal. 10: 773–778.

2.Adatto K., Doebele K. G., Galland L. (1979). Behavioral factors and urinary tract infection. JAMA 241 (23): 2525–2526.

3.Akter T., Mia Z., Shahriar M. (2013). Antibiotic sensitivity of pathogens causing urinary tract infection. Bangladesh Pharmaceutical Journal. 16 (1): 53-58.

4.Alamuri P., Mobley H.L.T. (2008). A novel autotransporter of uropathogenic *Proteus mirabilis* is both a cytotoxin and an agglutinin. Molecular Microbiology. 68 (4): 997–1017.

5.Andrašević S., Vranić-Ladavac M., Pristaš, I., Škerk, V. (2009). Uzročnici infekcija mokraćnog sustava i njihova osjetljivost na antibiotike. Infektološki glasnik. 29 (4): 165-170.

6.Anonymous (1986). Morbidity Statistics in General Practice. Third National Study. London: Her Majesty's Stationery Office, 1981-1982.

7.Antibiotic resistance threats in the United States (2013). Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Department of Health and Human Services; https://www.cdc.gov/drugresistance/Threat-Report-2013/pdf/ar-Threats-2013-508.pdf

8.Arias C.A., Murray B.E. (2012). The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. Nature reviews. Microbiology. 10 (4): 266–278.

9.Armbruster C.E., Mobley, H.L.T. (2012). Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. Nature reviews. Microbiology. 10 (11): 743–754.

10.Asscher A.W., Sussman M., Waters W.E., Davis R.H., Chick, S. (1966). Urine as a medium for bacterial growth. The Lancet. 288 (7472): 1037–1041.

11.Atanassova M., Choiset Y., Dalgalarrondo M., Chobertb J.M., Doussetc X., et al. (2003). Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and

anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. International Journal of Food Microbiology 87: 63-73.

12. Balciunas E.M., Castillo Martinez F.A., Todorov S.D., Franco B.D.G., de M., Converti A., Oliveira R. P. de S. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. Food Control, 32 (1): 134–142.
13. Bastos M., Coelho M.L., Santos O.C. (2015). Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria, Microbiology (Reading, England), 161(Pt 4), 683–700.87.
14. Begovac J., Božinović D., Lisić M., Barišić B., Schönwald S. (2006). Infektologija, Profil International, Zagreb.
15. Bratuša P.K. (2014). Skup mjera u prevenciji urinarnih infekcija povezanih s upotrebom urinarnog katetera, Diplomski rad, Sveučiliše u Zagrebu Medicinski fakultet, Zagreb, 1 – 29.
16. Bulgasem B.Y., Hassan Z., Abdalsadiq N.K.A., Yusoff W.M.W., Musa E.M.M.T., Lani M.N. (2015). Anti-adhesion activity of lactic acid bacteria supernatant against human pathogenic *Candida* species biofilm. Health Science Journal. 9 (6):1–9.
17. Butler D., Silvestroni A., Stapleton A.E. (2016). Cytoprotective effect of *Lactobacillus crispatus* CTV-05 against uropathogenic *E. coli*. Pathogens. 5 (1), 27.
18. Cathcart G.R., Quinn D., Greer B., Harriott P., Lynas J.F., Gilmore B.F., Walker B. (2011). Novel inhibitors of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor LasB: a potential therapeutic approach for the attenuation of virulence mechanisms in pseudomonal infection. Antimicrobial agents and chemotherapy. 55 (6): 2670–2678.
19. Cavallo J.D., Tenke P. (2012). Urinary tract infections. U: European manual of clinical microbiology (Cornaglia G., Courcol R., Herrmann J.L., Gunnar Kahlmeter G.), European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 133-43.
20. Caza M., Kronstad J.W. (2013). Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 3, 80.
21. Cestari S.E., Ludovico M.S., Martins F.H., da Rocha S.P.D., Elias W.P., Pelayo J.S. (2013). Molecular detection of HpmA and HlyA hemolysin of uropathogenic *Proteus mirabilis*. Current Microbiology. 67 (6): 703–707.

22. Cintas L.M., Casaus M.P., Herranz C., Nes I.F., Hernández, P.E. (2001). Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. Food Science and Technology International. 7(4): 281–305.
23. Cintas L.M., Casaus P., Håvarstein L.S., Hernández P.E., Nes, I.F. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. Applied and Environmental Microbiology. 63(11): 4321–4330.
24. Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F., Chikindas M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology. 71(1): 1–20.
25. Coker C., Poore C.A., Li X., Mobley, H.L.T. (2000). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. Microbes and infection. 2(12), 1497–1505.
26. Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature reviews. Microbiology. 3(10): 777–788.
27. Cotter P.D., Ross R.P., Hill C. (2013). Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? Nature reviews. Microbiology. 11(2): 95–105.
28. Dhakal B.K., Mulvey M.A. (2012). The UPEC pore-forming toxin α-hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. Cell host & microbe. 11(1): 58–69.
29. Dobrindt U., Hacker J. (2010). Uropathogens and virulence factors. U: Urogenital infections (Naber K.G., Schaeffer A.J., Heyns C.F., Matsumoto T., Shoskes D.A., Bherklunc Johansen T.E.), Arnhem, The Netherlands: European Association of Urology, 4–22.
30. Drider D., Fimland G., Hechard Y., McMullen L.M., Prevost H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 70 (2): 564–582.
31. Finer G., Landau, D. (2004). Pathogenesis of urinary tract infections with normal female anatomy. The Lancet Infectious Diseases. 4(10): 631–635.
32. Flores-Mireles A.L., Walker J.N., Caparon M., Hultgren S.J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nature Reviews Microbiology. 13 (5): 269-284.

33. Foxman B. (2014). Urinary tract infection syndromes. Infectious Disease Clinics of North America. 28(1): 1–13.
34. Foxman, B. (2013). Urinary tract infections. U: Women and Health (Goldman M.B., Troisi R., Rexrode K.M.), London, Elsevier Inc., 553-564.
35. Garcia T.A., Ventura C.L., Smith M.A., Merrell D.S., O'Brien A.D. (2012). Cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin from uropathogenic *Escherichia coli* elicit different host responses in the murine bladder. Infection and Immunity. 81(1): 99–109.
36. Griffith D.P., Musher D.M., Itin, C. (1976). Urease. The primary cause of infection-induced urinary stones. Investigative urology. 13(5): 346–350.
37. Güllüce M., Karadayı M., Bariş Ö. (2013). Bacteriocins: promising natural antimicrobials. U: Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education (Méndez-Vilas, A.), Badajoz: Formatex Research Center, 1016 – 1027.
38. Hacker J., Bender L., Ott M., Wingender J., Lund B., Marre R., Goebel W. (1990). Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extra intestinal *Escherichia coli* isolates. Microbial Pathogenesis. 8(3): 213–225.
39. Handley M.A., Reingold A.L., Shiboski S., Padian N.S. (2002). Incidence of acute urinary tract infection in young women and use of male condoms with and without nonoxynol-9 spermicides, Epidemiology. 13 (4): 431–436.
40. Hinman Jr. F. (1966). Mechanism for the entry of bacteria and the establishment of urinary infection in female children. The Journal of Urology. 96(4): 546–550.
41. Hooton T.M., Stamm W.E. (1997). Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. Infectious Diseases Clinics of North America. 11(3): 551–581.
42. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2016. godinu, Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Zagreb, 2016.
43. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2017. godinu, Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Zagreb, 2017.
44. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2018. godinu, Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Zagreb, 2018.
45. Hu K.K., Boyko E.J., Scholes D. (2004). Risk factors for urinary tract infections in postmenopausal women. Archives of Internal Medicine. 164(9): 989–993.

46.Ikäheimo R., Siitonen A., Heiskanen T. (1996). Recurrence of urinary tract infection in a primary care setting: analysis of a 1-year followup of 179 women, Clin Infect Dis 22(1): 91–99.

47.Ilayajara R., Radhamadhavan P. A., Nirmala C. B. (2011). Assessment for potential use of bacteriocin producing *Lactobacillus fermentum* isolated from human milk for preventing urinary tract infections. Journal of Pharmacy Research. 4(10): 3445–3447.

48.Islam M.A., Saha R.R., Zakaria M.M. (2009). Incidence and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from clinical samples at Gonoshasthaya Hospital, Savar. Bangladesh J. Med. Sci. 15, 141-142.

49.Jacobsen S.M., Stickler D.J., Mobley H.L.T., Shirtliff M.E. (2008). Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. Clinical Microbiology Reviews. 21(1): 26–59.

50.Jamalifar H., Rahimi H., Samadi N., Shahverdi A., Sharifian Z., Hosseini F., Eslahi H., Fazeli M. (2011). Antimicrobial activity of different *Lactobacillus* species against multi - drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Iranian Journal of Microbiology. 3(1): 21–25.

51.Johnson J.R., Stamm W.E. (1989). Urinary tract infections in women: diagnosis and treatment. Annals of Internal Medicine. 111(11): 906-917.

52.Johnson J.R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clinical Microbiology Reviews. 4(1): 80–128.

53.Johnson J.R., Magistro G., Clabots C., Porter S., Manges A., Thuras P., Schubert S. (2018). Contribution of yersiniabactin to the virulence of an *Escherichia coli* sequence type 69 ("clonal group A") cystitis isolate in murine models of urinary tract infection and sepsis. Microbial Pathogenesis. 120: 128–131.

54.Justice S.S., Hunstad D.A. (2012). UPEC hemolysin: more than just for making holes. Cell host & microbe. 11(1): 4–5.

55.Karpiński T.M., Szkaradkiewicz A.K. (2016). Bacteriocins. Encyclopedia of Food and Health. 312–319.

56.Kaye, D. (1968). Antibacterial activity of human urine. Journal of Clinical Investigation. 47(10): 2374–2390.

57.Klaenhammer T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews. 12(1-3): 39–85.

58. Klein R.D., Hultgren S.J. (2020). Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host–pathogen interactions and new treatment strategies. Nature Reviews Microbiology. 18(4): 211-226.
59. Kline K.A., Schwartz D.J., Lewis W.G., Hultgren S.J., Lewis A.L. (2011). Immune activation and suppression by group B *Streptococcus* in a murine model of urinary tract infection. Infection and Immunity. 79(9): 3588–3595.
60. Kosikowska P., Berlicki Ł. (2011). Urease inhibitors as potential drugs for gastric and urinary tract infections: a patent review. Expert opinion on therapeutic patents. 21(6): 945–957.
61. Köves B., Wullt B. (2016). The roles of the host and the pathogens in urinary tract infections. European Urology Supplements. 15(4): 88–94.
62. Lee S.H., Le J. (2018). Urinary tract infections, PSAP 2018 BOOK 1: Infectious Diseases, 7 – 28.
63. Levison M.E., Kaye D. (2013). Treatment of complicated urinary tract infections with an emphasis on drug-resistant Gram-negative uropathogens. Current Infectious Disease Reports. 15(2): 109–115.
64. Locke, A.B. (2018). Urinary tract infection (UTI), Integrative Medicine, Chapter 22, 211–217.
65. Mahdi L.H., Ghufran Nazem A.H., Auda I.G. (2020). Evidence of anti - K. pneumoniae biofilm activity of novel *Entrococcus faecalis* enterocin GLHM. Microbial Pathogenesis. 147, 1-35.
66. Meyers D.J., Palmer K.C., Bale L.A., Kernacki K., Preston M., Brown T., Berk R.S. (1992). In vivo and in vitro toxicity of phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. Toxicon. 30(2): 161–169.
67. Miano R., Germani S., Vespasiani G. (2007). Stones and urinary tract infections. Urologia Internationalis. 79(1): 32–36.
68. Mihaljević F., Fališevac J., Bezjak B., Mravunac B. (1994). Specijalna klinička infektologija. Medicinska naklada, Zagreb, 1994.
69. Mittal, R., Khandwaha, R.K., Gupta, V., Mittal, P.K., Harjai, K. (2006). Phenotypic characters of urinary isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and their association with mouse renal colonization. The Indian Journal of Medical Research. 123(1): 67-72.

70. Mokoena M.P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. Molecules. 22(8): 1255, 1 – 13.
71. Moll G.N., Konings W.N., Driessen A.J. (1999). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. Antonie van Leeuwenhoek. 76(1-4): 185–198.
72. Molloy E.M., Hill C., Cotter P.D., Ross R.P. (2011). Bacteriocins. Encyclopedia of Dairy Sciences, 420–429.
73. Murphy C.N., Mortensen M.S., Krogfelt K.A., Clegg S. (2013). Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. Infection and Immunity. 81(8): 3009–3017.
74. Nes I.F., Yoon S.S., and Diep D.B. (2007). Ribosomally synthesiszed antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. Food Science and Biotechnology. 16(5): 675-690.
75. Nielubowicz G.R., Mobley H.L.T. (2010). Host–pathogen interactions in urinary tract infection. Nature Reviews Urology 7(8), 430–441.
76. Ogunshe A.A., Omotoso M.A., Bello V.B. (2011). The in vitro antimicrobial activities of metabolites from lactobacillus strains on *Candida* species implicated in *Candida vaginitis*. Malaysian Journal of Medical Sciences. 18: 13-25.
77. Orlović M. (2017). Kliničke značajke hospitaliziranih bolesnika s infekcijom mokraćnog sustava, Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek.
78. Pastuović T., Bogdanić Lj., Vuković V., Samardžić S. (2008). Infekcije mokraćnog sustava uzrokovane *Escherichia coli* i njihova rezistencija na antibiotike u Osječko-baranjskoj županiji. Hrvatski časopis za javno zdravstvo. 4(15): 1-3.
79. Perez R.H., Zendo T., Sonomoto K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. Microbial Cell Factories. 13 (Suppl 1), S3.
80. Preciado G.M., Michel M.M., Villarreal-Morales S.L., Flores-Gallegos A.C., Aguirre-Joya J., Morlett-Chávez J., Rodríguez-Herrera R. (2016). Bacteriocins and its use for multidrug-resistant bacteria control. Antibiotic Resistance. 329–349.
81. Qiao L.D., Chen S., Yang Y., Zhang K., Zheng B., Guo H.F., Yang B., Niu Y.J., Wang Y., Shi B.K., Yang W.M., Zhao X.K., Gao X.F., Chen M., Tian Y. (2013). Characteristics of urinary

tract infection pathogens and their in vitro susceptibility to antimicrobial agents in China: data from a multicenter study, BMJ open, 3(12).

82. Rahman T., Haq F. (1990). Urinary tract infecton (UTI) in diabetic and non-diabetic patients-A comparaive bacteriological study. Bangladesh Renal Journal 9, 8-12.

83. Ramasamy T., Suyambulingam K. (2015). Molecular characterization of *Lactobacillus* sp, from Indian curd and its antagonistic effects on uropathogens of diabetic patients. International Research Journal of Biological Sciences. 4(8): 14-22.

84. Ray Mohapatra A., Jeevaratnam, K. (2019). Inhibiting bacterial colonization on catheters: Antibacterial and antibiofilm activities of bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* SJ33. Journal of Global Antimicrobial Resistance. 19, 85–92.

85. Raz R., Gennesin Y., Wasser J. (2000). Recurrent urinary tract infections in postmenopausal women. Clinical Infectious Diseases. 30(1): 152–156.

86. Relman D., Falkow S. (2009). A molecular perspective of microbial pathogenicity. U: Principles and practice of infectious diseases (Mandell G. L., Bennett J. E., Dolin R.) 7th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier.

87. Rocha C.L., Coburn J., Rucks E.A., Olson J.C. (2003). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S as a bifunctional enzyme in J774A.1 macrophages. Infection and Immunity. 71(9): 5296–5305.

88. Ronald A. (2002). The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. The American Journal of Medicine. 113 (1): 14–19.

89. Rosen D.A., Pinkner J.S., Walker J.N., Elam J.S., Jones J.M., Hultgren S.J. (2008). Molecular variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* FimH affect function and pathogenesis in the urinary tract. Infection and Immunity. 76(7): 3346–3356.

90. Scholes D., Hooton T.M., Roberts P.L., Stapleton A.E., Gupta K., Stamm W.E. (2000). Risk factors for recurrent urinary tract infection in young women. The Journal of Infectious Diseases. 182 (4): 1177–1182.

91. Senturk S., Ulusoy S., Bosgelmez-Tinaz G., Yagci A. (2012). Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during urinary tract infections. Journal of Infection in Developing Countries. 6 (6): 501–507.

92. Smelov V., Naber K., Bjerklund Johansen, T.E. (2016). Improved classification of urinary tract infection: future considerations. European Urology Supplements. 15(4): 71–80.

93. Sobel J. D., Kaye D. (2000): Urinary tract infections. U: Principles and practice of infectious diseases (Mandell G. L., Bennett J. E., Dolin R.), 5th ed. London: Churchill Livingstone, 773–805.
94. Song J., Abraham S.N. (2008). Innate and adaptive immune responses in the urinary tract. European Journal Clinical Investigation, Vol 38, Duke University Medical Centre, Durham, NC, USA, 21-28.
95. Stahlhut S.G., Tchesnokova V., Struve C., Weissman S.J., Chattopadhyay S., Yakovenko O., Aprikian P., Sokurenko E.V., Krogfelt K.A. (2009). Comparative structure-function analysis of mannose-specific FimH adhesins from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 191(21): 6592–6601.
96. Sussman M. (2015). Urinary tract infections: A Clinical Overview, Chapter 44, Institute of Cell and Molecular Biosciences, Medical School, Newcastle upon Tyne, UK, 1365-1371.
97. Talukder M.A.S., Bakheshwain S.M., Altasan F. (1987). Urinary tract infection in children at the Armed Forces Hospital, Riyadh, Saudi Arabia-A pilot study, Bangladesh Journal of Child Health. 11, 55-58.
98. Tenke P., Köves B., Johansen T.E. (2014). An update on prevention and treatment of catheter-associated urinary tract infections. Current opinion in infectious diseases. 27(1): 102–107.
99. Trivedi D., Jena P.K., Patel J.K., Seshadri S. (2013). Partial purification and characterization of a bacteriocin DT24 produced by probiotic vaginal *Lactobacillus brevis* DT24 and determination of its anti-uropathogenic *Escherichia coli* potential. Probiotics and Antimicrobial Proteins. 5(2): 142–151.
100. Vraneš, J. (1994). Adhezini uropatogenih sojeva *Escherichia coli* i njihovo značenje u patogenezi infekcija mokraćnog sustava. Medicinski vjesnik. 26 (1-4): 51-58.
101. Wilson M.L., Gaido, L. (2004). Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. Clinical Infectious Diseases. 38 (8): 1150–1158.
102. Wright K.J., Hultgren S.J. (2006). Sticky fibers and uropathogenesis: bacterial adhesins in the urinary tract. Future Microbiology. 1(1): 75–87.

103. Wright K.J., Seed P.C., Hultgren S.J. (2007). Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic Escherichia coli depends on type 1 pili. Cellular Microbiology. 9(9): 2230–2241.

104. Zacharof M.P., Lovitt R.W. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. APCBEE Procedia. 2, 50–56.

105. Zakaria M.M., Talukder A. S., Chowdhury E.K. (2002). Prevalence and drug sensitivity of microorganisms in patients with urinary tract infection attending a semi-rural hospital in Bangladesh. Bangladesh Journal of Medical Science. 8, 111-114.