

# PROCJENA UČINKOVITOSTI DEZINFICIJENSA NA RAST FRANCISELLA NOVICIDA NAKON UZGOJA U ACANTHAMOEBA CASTELLANII

---

Špoljarić, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:084268>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Nikolina Špoljarić

**PROCJENA UČINKOVITOSTI DEZINFICIJENSA NA RAST  
*FRANCISELLA NOVICIDA* NAKON UZGOJA U *ACANTHAMOEBA*  
*CASTELLANII***

Diplomski rad

Rijeka, 2018.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Nikolina Špoljarić

**PROCJENA UČINKOVITOSTI DEZINFICIJENSA NA RAST  
*FRANCISELLA NOVICIDA* NAKON UZGOJA U *ACANTHAMOEBA*  
*CASTELLANII***

Diplomski rad

Rijeka, 2018.

**Mentorica rada: *Prof. dr. sc. Marina Šantić, dipl. sanit. ing.***

Rad je u potpunosti izrađen na Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Diplomski rad obranjen je dana **27.09.2018.**, u 8.30 sati, na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred Povjerenstvom u sastavu:

1. Doc. dr. sc. Nada Starčević Čizmarević, dipl. sanit. ing.
2. Prof. dr. sc. Saša Ostojić, dr. med.
3. Prof. dr. sc. Marina Šantić, dipl. sanit. ing.

Rad ima 67 stranica, 15 slika i 152 literaturna navoda.

## ZAHVALA

*Ovaj diplomski rad posvećujem svojoj Obitelji, ponajviše voljenim roditeljima, koji su me podučili pravim vrijednostima života, poštivanju, ljubaznosti i povjerenju prema drugima, pa i onda kada nam ne bude isto uzvraćeno. Hvala Tata, hvala Mama, na radosti i ponosu kojima ste pratili sve moje lijepe trenutke i, još veće Hvala za utjehu i podizanje kada bi naletjeli mračni dani.*

*Mojim najdražim i najbližim prijateljima, svim onim dragim ljudima koji su me na ovom petogodišnjem putu bodrili, veselili se i plakali, pa opet veselili, . . . hvala dragom Bogu, puno vas je i ne znam s čime sam zaslužila Vašu naklonost . . . moja druga obitelji!*

*Među tim dragim ljudima je i moja mentorica, Prof. dr. sc. Marina Šantić. Dragica mentorice, imala sam Vas tu čast poznavati i učiti od Vas. O francizelama, o životu,.. mnoge sam greške zaredala svojom nevinom zaigranošću, neiskustvom i naivnošću no, Vi ste uvijek bili tu za mene da na iste ukažete, savjetujete,.. Hvala od srca na svoj podršci u lijepim i teškim trenucima, razumijevanju, zauzimanju i vjeri koju ste u mene imali i prije negoli bih sama vjerovala da sam sposobna učiniti. Hvala!*

*Od svih ostalih nastavnika u ovih pet godina kojima dugujem zahvalu, jedan je koji mi to zapravo i nije bio, ali je bio Učitelj i inspiracija. Da je u životu zaista moguće ostvariti sve svoje snove i ne birati između onoga što manje ili više voliš, nego raditi baš sve što te ispunjava i veseli . . . da je u redu biti Mali Princ i kada si Velik . . . riječ je o jednom profesoru, prodekanu, znanstveniku, DJ-u, poeti, slikaru, motivacijskom predavaču, . . . Prof. dr. sc. Saši Ostojiću . . . Hvala Vam što ste me naučili onome čega nema u knjigama, što ste znali saslušati i usmijeriti.*

*Braće Branchetta 20, u meni će ostaviti neizbrisiv trag, ponajviše zbog ljudi, od 'malih' do 'velikih' i predivnih uspomena . . . one manje lijepe ćemo zaboraviti.*

*Vaša Nikolina*

*“Remember to look up at the stars and not down at your feet. Try to make sense of what you see and wonder about what makes the Universe exist. Be curious. And however difficult Life may seem, there is always something You can do and succeed at. It matters that you don't just give up.”*

*- Stephen Hawking*

## SAŽETAK

### PROCJENA UČINKOVITOSTI DEZINFICIJENSA NA RAST *FRANCISELLA NOVICIDA* NAKON UZGOJA U *ACANTHAMOEBA* *CASTELLANII*

*Francisella tularensis* je fakultativna unutarstanična gram-negativna bakterija i uzročnik zoonoze - tularemije. Dosad je prepoznato pet vrsta unutar roda *Francisella* koje se međusobno razlikuju prema virulentnim, genetskim i metaboličkim karakteristikama. To su redom: *F. tularensis*, *F. philomiragia*, *F. hispaniensis*, *F. noatunesis* i *F. novicida*. Bakterija je izolirana iz više od 250 divljih vrsta, uključujući stanice protozoa. *Francisella* ima sposobnost preživjeti u različitim tipovima stanica poput epitelnih stanica, neutrofila, makrofaga i ameba. Visoku virulentnost bakteriji daje sposobnost da izbjegne detekciju i imunološki odgovor te se brzo razmnoži unutar i izvan stanice domaćina. *Acanthamoeba castellanii* rezervoar je bakterije u okolišu. *Francisella* se u amebi razmnoži izbjegavanjem mehanizma autofagije. Bakterija je postala javnozdravstveni problem otkako je klasificirana kao smrtonosno biološko oružje koje se može prenijeti aerosolom. Stoga je vrlo važno utvrditi baktericidnu/bakteriostatsku učinkovitost dezinfekcijskih sredstava kada se koriste za inaktivaciju ovog uzročnika bolesti. U istraživanju je korištena avirulentna *F. novicida* kao modelni organizam te tri dezinficijensa različitih koncentracija i kemijskih komponenti. Prijašnji rezultati, provedeni na čistoj bakterijskoj kulturi, pokazali su kako 5%-tni Asepsol eko ima baktericidni učinak na *F. novicida*, dok 0,2%-tni Bigvasan i 1%-tni Descocid djeluju bakteriostatski. U ovome istraživanju, dodatno smo ispitali učinkovitost triju dezinficijensa (0,2%-tni, 0,5%-tni i 1,0%-tni Bigvasan; 0,2%-tni, 0,5%-tni i 1%-tni Descocid; 1%-tni, 2%-tni i 5%-tni Asepsol eko) na dekontaminaciju *F. novicida* nakon uzgoja bakterija u *A. castellanii* tijekom 48 sati. Rezultati su pokazali da Asepsol (1%-tni, 2%-tni i 5%-tni) i 1%-tni Descocid potpuno inhibiraju bakterijski porast, bez obzira na vrijeme izlaganja (10 sekundi, 1 minuta, 5, 10 i 15 minuta). Učinkovitost Bigvasana i Descocida ovisila je o koncentraciji i vremenu izloženosti *Francisella* uzgojenim u amebama. Iznenadujuće, u usporedbi s ranijim rezultatima, *F. novicida* uzgojena u amebi je osjetljivija na dekontaminaciju 1%-tnim Descocidom i 0,2%-tnim Bigvasanom. Zaključujemo kako među ispitanim dezinficijensima Asepsol eko, čije su aktivne supstance kvaterne amonijeve soli, čak kod četiri puta niže koncentracije od proizvođačeve preporuke pokazuje najbolju baktericidnu aktivnost protiv *F. novicida* uzgojene u amebi, dok se PHMB iz Bigvasana pokazao slabijim u nižim koncentracijama.

**Ključne riječi:** *Francisella novicida*, *Acanthamoeba*, dezinficijensi, PHMB, QAC, kinetika rasta.

## SUMMARY

### THE EVALUATION OF EFFECTIVENESS OF DISINFECTANTS ON THE GROWTH OF *FRANCISELLA NOVICIDA* AFTER CULTURING IN *ACANTHAMOEBA CASTELLANII*

*Francisella tularensis* is a facultative intracellular Gram-negative bacterium and the causative agent of zoonotic disease - tularemia. So far, five species have been recognized within the *Francisella* genus, which differ between virulent, genetic and metabolic characteristics, as follows: *F. tularensis*, *F. philomiragia*, *F. hispaniensis*, *F. noatunesis* and *F. novicida*. Bacteria are isolated from more than 250 wild species, including protozoa cells. *Francisella* has the ability to survive in various cell types such as epithelial cells, neutrophils, macrophages and amoeba cells. The ability to avoid detection and immune response and to rapidly multiply inside and outside of the host cell, gives bacteria a high virulence. *Acanthamoeba castellanii* is a reservoir of bacteria in the environment. *Francisella* is expanding in the amoeba cells by avoiding the autophagy mechanism. Bacteria have become a public health issue since it was classified as a deadly biological weapon that can be transmitted by aerosol. It is, therefore, very important to determine the bactericidal/bacteriostatic efficacy of disinfectants, when used to inactivate this pathogen. The avirulent *F. novicida* was used as a model organism and the three disinfectants of different concentrations and chemical components. Previous results, implemented on pure bacterial culture, showed that 5% Asepsol eko had a bactericidal effect on *F. novicida*, while 0,2% Bigvasan and 1% Descocid acted bacteriostatic. In this study, we have further investigated the effectiveness of three disinfectants (0,2%, 0,5% and 1,0% Bigvasan; 0,2%, 0,5% and 1% Descocid; 1%, 2% and 5% Asepsol eko) on decontamination of *F. novicida* after growing of the bacterium in *A. castellanii* for 48 hours. The results showed that Asepsol (1%, 2% and 5%) and 1% Descocid completely inhibit bacterial growth, regardless the exposure time (10 seconds, 1 minute, 5, 10 and 15 minutes). The efficacy of Bigvasan and Descocid was concentration and the time of the exposure dependent, on the *Francisella*-growing amoebae. Surprisingly, compared to earlier results, *F. novicida* in growing amoebae are more sensitive to decontamination by 1% of Descocid and 0,2 % of Bigvasan. We conclude that among the tested disinfectants Asepsol eko, with quaternary ammonium salts (QAC) as active substances, even at four times lower concentrations than the manufacturer's recommendation, exhibits the best bactericidal activity against *F. novicida* growth in amoeba, while the PHMB in Bigvasan showed weaker at lower concentrations.

**Key words:** *Francisella novicida*, *Acanthamoeba*, disinfectants, PHMB, QAC, growth kinetics

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. <i>Francisella</i> spp. ....	1
1.1.1. <i>F. tularensis</i> vs <i>F. novicida</i> .....	2
1.1.1.1. Taksonomija <i>Francisella</i> .....	4
1.1.1.2. Epidemiologija i geografska rasprostranjenost .....	4
1.1.1.3. Unutarstanični život i virulencija .....	6
1.1.1.3.1. <i>Francisella</i> lipopolisaharid i faktori virulencije .....	10
1.1.1.4. Klinička manifestacija tularemije .....	12
1.1.1.4.1. Dijagnostika .....	16
1.1.1.4.2. Terapija .....	16
1.1.1.4.3. Prevencija .....	16
a. Antibakterijska profilaksa .....	16
b. Cjepivo .....	17
1.1.2. <i>Francisella</i> u vodenom okolišu .....	18
1.2. <i>Acanthamoeba</i> spp. ....	19
1.2.1. <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	20
1.3. Interakcija između ameba i unutarstaničnih patogena .....	21
1.3.1. Javnozdravstveni značaj .....	21
1.4. Dezinficijensi .....	23
1.4.1. Mehanizam djelovanja na bakterijsku stanicu .....	24
1.4.2. Kvaterne amonijeve soli .....	25
1.4.3. Bigvanidi .....	28
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	31
3. MATERIJALI I METODE .....	32
3.1. Materijali .....	32
3.1.1. <i>Francisella novicida</i> .....	32
3.1.1.1. Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) agar .....	32
3.1.2. <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	33
3.1.3. Dezinfekcijska sredstva .....	33
3.1.3.1. Asepsol eko .....	34
3.1.3.2. Descocid .....	34
3.1.3.3. Bigvasan .....	34
3.2. Metode .....	35
3.2.1. Priprema bakterijske suspenzije .....	35
3.2.2. Priprema amebne kulture .....	35
3.2.3. <i>In vitro</i> infekcija <i>A. castellanii</i> s <i>F. novicida</i> .....	35
3.2.4. Ispitivanje učinka otopina dezinficijensa različitih koncentracija na rast <i>F. novicida</i> nakon porasta u <i>A. castellanii</i> u ovisnosti o vremenu.....	36
3.2.5. Statistička obrada podataka .....	38
4. REZULTATI .....	39



4.1.	Učinak različitih koncentracija otopine Asepsol eko na rast <i>F. novicida</i> nakon porasta u <i>A. castellanii</i> .....	39
4.2.	Učinak različitih koncentracija otopine Descocida na rast <i>F. novicida</i> nakon porasta u <i>A. castellanii</i> .....	40
4.3.	Učinak različitih koncentracija otopine Bigvasana na rast <i>F. novicida</i> nakon porasta u <i>A. castellanii</i> .....	42
5.	<b>RASPRAVA</b> .....	45
6.	<b>ZAKLJUČAK</b> .....	48
7.	<b>LITERATURA</b> .....	49
8.	<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	67

# 1. UVOD

## 1.1. *Francisella* spp.

Znanstvenici McCoy i Chapin, još 1911. godine u okrugu Tulare u Kaliforniji – Sjedinjene Američke Države, izolirali su malu gram-negativnu bakteriju iz uginulih vjeverica s bolešću koja je nalikovala kugi [1]. Prema području pronalaska, bakterija je nazvana *Bacterium tularense* [2]. Edward Francis, posvetivši svoju istraživačku karijeru izučavanju novootkrivenog organizma prepoznaje bakteriju, ne samo kao uzročnika bolesti u životinja, već i kao potencijalno kobnu bolest za čovjeka, koja od tada nosi naziv tularemija [3]. U čast velikim doprinosima za temelj današnjih saznanja o bakteriji, ona biva preimenovana u *Francisella tularensis*, prema Dr. Edwardu Francisu [4]. *F. tularensis* mala je, gram-negativna, kapsulirana i nepokretna bakterija koja za svoj rast treba aerobne uvijete [5].

Fakultativni unutarstanični patogen izoliran je iz više od 250 životinjskih vrsta i široko rasprostranjen u okolišu; prenosiv putem vektora i kontaktom sa zaraženim životinjama – zbog čega je bolest ujedno i zoonoza-tipa; prenosiv kontaminiranim aerosolom, hranom i vodom; sposoban preživjeti velike raspone uvjeta okoliša/medija u kojemu se nađe te razmnožavati rapidnom brzinom u stanicama domaćina poput humanih makrofaga, epitelnih stanica i neutrofila pa sve do slobodnoživućih ameba – pripadnika praživotinja, protozoa [6-8].

Rod *Francisella* pripadnikom je obitelji *Francisellaceae*. Unutar genoma, novija saznanja potvrđuju kako je identificirano i u rod *Francisella* klasificirano pet bakterijskih vrsta, a to su slijedom: visoko virulentna *F. tularensis*, potom *F. hispaniensis*, *F. noatunensis*, *F. philomiragia* i *F. novicida* [9].

### 1.1.1. *F. tularensis* vs *F. novicida*

*Francisella tularensis* je gram-negativan intracelularni patogen i uzročnik bolesti tularemije, opisane kod ljudi i životinja, s izrazitom sposobnošću fatalnog završetka za domaćina nositelja. *F. tularensis* se razvrstava u tri podvrste, sudeći prema staništu gdje obitava te razini virulentnosti, genetskih i metaboličkih značajki. To su redom: *F. tularensis* subspecies *tularensis* (tip A), *F. tularensis* subsp. *holarctica* (tip B) i *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*. Podvrsta *tularensis* (tip A) je najvirulentnija i oko 70% slučajeva tularemije u Sjevernoj Americi su rezultat *F. tularensis* tipa A, s infektivnom dozom za čovjeka od samo deset bakterija, 10 CFU (engl. *colony-forming units*, CFU), kada se unose inhalacijskim putem – aerosolom, što razvija i najteži oblik ove bolesti s lako mogućim smrtnim ishodom [11].

Soj živog cjepiva (engl. *Live Vaccine Strain*, LVS) je derivat ruskog soja S15, iz tadašnjeg Sovjetskog Saveza, dobivenog od *F. tularensis* subsp. *holarctica* (tip B). *F. tularensis* LVS ujedno je i najbolji pokušaj učinkovitog cjepiva no, zbog nestabilnosti i težih nuspojava kod cijepljenih osoba, osobito već imunokompromitiranih, nije odobren za masovna cijepljenja u SAD-u [12]. *F. tularensis* LVS je relativno avirulentan soj kod ljudi i stoga se obično koristi kao zamjena za više virulentniji SchuS4 soj u proučavanju patogeneze tularemije. *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, kao i *F. novicida*, rijetko su povezane s bolešću kod ljudi te su izolirani u Aziji, Sjevernoj Americi i Australiji [13]. U prošlosti je *F. tularensis* bila korištena u programima kreiranja biloškog oružja zbog vrlo male koncentracije bakterija koje bi se prenosile aerosolom. Danas se smatra potencijalnim biološkim agentom u tu svrhu [14].

*F. novicida* također ima tipične karakteristike francizela što se tiče morfološkog izgleda i unutarstaničnog života ali, suprotno virulentnijoj *F. tularensis*, nije bilo slučajeva izolacija iz životinja koji su se mogli dokazati, odnosno, ne smatra se zoonozom. Stanište bakterije je

okoliš. Osobito je se povezuje s vodenim ekosustavima, slanom i boćatom vodom, ledom i tlom [15-17]. Pri laboratorijskom uzgoju, *F. novicida* ne zahtjeva rad u BSL-3 komorama radi avirulentnosti prema čovjeku, već u BSL-2 zaštitnim komorama ili manje. Na hranjivoj podlozi poput cistein-glukoza krvnog (engl. *cysteine-glucose-blood agar*, CGBA) agara, kao i *F. tularensis*, zahtjeva prisutnost cisteina no, rast i formiranje bakterijskih kolonija na 37 °C koje se već nakon 24 sata mogu uočiti, a nakon 48-72 h izbrojiti, karakteristično je za *F. novicida*. Pri istim uvjetima, *F. tularensis* isto postiže tek nakon 3 do 7 dana [18].

*F. novicida* avirulentna je za čovjeka. Genom *F. novicida* U112 soja, sadrži 84 evidentiranih gena koji su kod sojeva visoko virulentne *F. tularensis* subsp. *tularensis* – SchuS4 te LVS soja *F. tularensis* subsp. *holartica* – inaktivirani [19]. Za omogućavanje preživljavanja i održavanja *F. novicida* izvan stanica životinjskog domaćina, u vanjskom okolišu, ovi su se geni pokazali iznimno važnima u ciklusima proizvodnje energije i metabolizma ugljikohidrata, prijenosa metabolita, biosinteze aminokiselina, ali i prijenos te modifikaciju DNA molekule [20]. *F. novicida* U112 avirulentna je za imunokompromitirane osobe, ali vrlo virulentna za eksperimentalne miševe, gdje se pokazalo kako je samo nekolicina bakterija dovoljna da prouzroči bolest i smrtni ishod [21].

Ekstremna infektivnost i virulencija *F. tularensis* je u velikoj mjeri zbog sposobnosti izbjegavanja imunološkog otkrivanja i suzbijanja od strane urođenog imuniteta domaćina. Međutim, čimbenici i mehanizmi koji kodiraju *Francisella* i odgovorni su za izazivanje imunoloških supresija u domaćinu u kojeg invadira, nisu još potpuno razjašnjeni.

*F. novicida*, prema navedenome, prikladniji je modelni organizam u daljnjem izučavanju uzročnika tularemije.

#### 1.1.1.1. Taksonomija *Francisella*

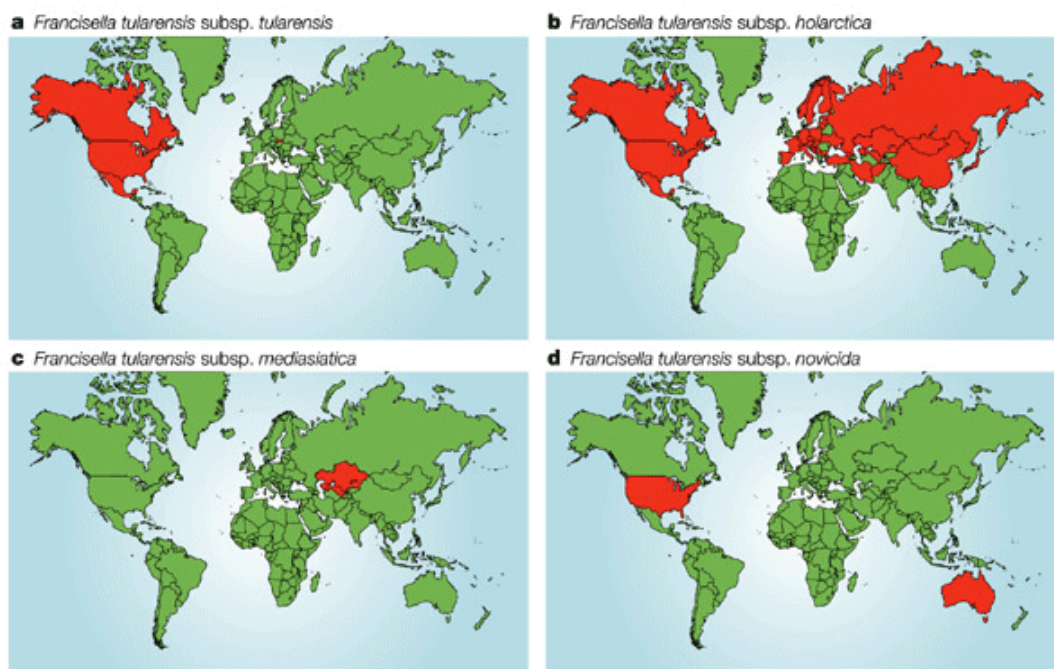
Francizele su mali, aerobni, nutritivno brzorastući, pleomorfni gram-negativne koccobacilli u rasponu veličine od 0,2 µm x 0,2 µm do 0,2 µm x 0,7 µm. Pleomorfizam se povećava s vremenom nakon aktivnog rasta na hranjivoj podlozi [22].

Posebni značaj je u staničnoj stijenci *Francisella*, gdje više od 50% gradivnih komponenti čine lipidi. *Francisella* je jedini rod unutar obitelji *Francisellaceae*, pripadnici γ-podskupine proteobakterija [23]. Zbog ranije povezanosti s etiološkim uzročnikom kuge, *Yersinia pestis*, kada je tek prvi puta bakterija izolirana iz uginulih vjeverica od bolesti nalik na kugu, novootkrivenu su bakteriju klasificirali u rod *Pasteurella*, zajedno s *Yersinia pestis* [23,1]. Obje su uzročnicima zoonotske infekcije uz kliničku sliku vrućice i limfadenopatije kod ljudi. Čovjek je slučajni domaćin *F. tularensis* [23].

#### 1.1.1.2. Epidemiologija i geografska rasprostranjenost

Bakterije iz roda *Francisella* pronađene su većim dijelom na području Sjeverne Zemljine polutke no, neke vrste izolirane su i potvrđene na Južnoj polutci, poput slučajeva *F. novicida* u Australiji [24].

*F. tularensis* subsp. *tularensis* (tip A) (Slika 1) obitava u Sjevernoj Americi odakle su izolirani brojni slučajevi razvoja bolesti [25] te je za ovo područje tip A gotovo endemska, dok su vrlo rijetki slučajevi zabilježeni u Europi [26]. Podvrsta *tularensis* najčešće se povezuje sa tularemijom nastalom prilikom kontakta sa zaraženim sisavcima, zečevima, primatima ili pak, putem krpeljnih vektora [27, 28]. Prije nego li je bila primjenjiva antibiotska terapija za oboljele, postotak smrtnost od ukupno oboljelih od tularemije tipa A kod ljudi je dosegala između 5% i 30% [29, 30]. U SAD-u je između 1927. i 1948. godine bilo 22 812 slučajeva oboljelih od tularemije sa stopom smrtnosti od 7,7% [31]. Od 1999. i 2000., godišnja brojka oboljelih kreće se oko 100-ak za područje SAD-a [32].



Nature Reviews | Microbiology

**Slika 1.** Prikaz geografske rasprostranjenosti (označeno crveno) četiri (tri) podvrste *F. tularensis* i *F. novicida*. Izvor: Petra C.F. Oyston, Anders Sjöstedt, Richard W. Titball (2004). *Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in Francisella tularensis*. Nature Reviews Microbiology. 2; 967-978.

*F. tularensis* subsp. *holarctica* (tip B) (Slika 1) izolirana je duž čitavog područja Sjeverne Polutke, od Japana, država Sjeverne Amerike i Europe, Skandinavije pa do Turske. Veći broj oboljelih uzorkovan tipom B zabilježen je u Švedskoj, gdje se uzročnik prenosio vektorski, putem komaraca [33-35]. U Turskoj je *holarctica* izolirana i povezuje se s ingestijom kontaminirane vode za piće, osobito u seoskim krajevima [36].

*F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* (Slika 1) nije još dovoljno istražena, ali je dokazano da ima nisku virulenciju prema zečevima i čovjeku. Izolirana je samo u Središnjoj Aziji [37].

Slučaj tularemije uzorkovan od *F. novicida* (Slika 1) koja se je ranije svrstavala kao podvrsta *F. tularensis*, prvi je puta zabilježen 1950. godine u američkoj saveznoj državi Utah [38, 39]. Uz vrste *F. philomiragia* i *F. hispaniensis*, povezuje se s vodenim okolišem.

*Francisella* može preživjeti tjednima u inficiranom tkivu životinja ili pak, mogu biti mjesecima sačuvane u vodi, zemlji, prašini i slami [40]. U zamrznutom mesu zeca, bakterija je sposobna preživjeti i nekoliko godina [41].

Sposobnost preživljavanja i razmnožavanja u vodenom okolišu, osobito u održivom i nekultiviranom obliku u vodi [42] i mogućnost rasta u slobodno-živućim amebama – *Acanthamoeba castellanii* [43], dovodi do pretpostavke da su protozoe potencijalni okolišni rezervoar za *F. tularensis*, i da upravo amebe mogu igrati važnu ulogu u prirodnom prijenosu patogena u okolišu, osobito vodenim ekosustavima [43].

Antropodni vektori koji su odgovorni za prijenos uzročnika između domaćina sisavaca u SAD-u su muhe i krpelji. U Europi su važni vektorski prijenosnici *Dermatocentor reticulatus* i *Ixodes ricinus*, uz krpelje i komarce u Skandinavskim zemljama [23].

Čovjek nije prirodni, već slučajni domaćin *Francisella*. Zarazi se najčešće prilikom kontakta s vektorima koji nose uzročnika te ga na čovjeka prenesu ugrizom ili ubodom, u dodiru s kožom inficirane životinje, inhalacijom aerosola ili ingestijom kontaminirane hrane i vode [23]. Interhumani prijenos uzročnika nije karakterističan. Zabilježeni slučaj dogodio se kada je slučajno došlo do prijenosa između majke i sina, prilikom tretiranja inficirane rane djeteta, dok je majka imala otvorenu ogrebotinu na palcu [44].

### **1.1.1.3. Unutarstanični život i virulencija**

Relativno malo je poznato o putevima virulencije *F. tularensis*. Visoki stupanj infektivnosti koji ova bakterija ima dokazale su visoke stope pojava infekcija među laboratorijskim osobljem koji rukuju s organizmom [45]. Rane studije prikazuju kako

inokulacijom s oko 10 bakterija, bilo subkutano ili putem aerosola, dolazi do razvoja tularemije kod ljudi [46,47].

*Francisella* nema toksine ili sekrecijske sustave koji su, primjerice, tipični za bakterije roda *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Legionella* ili *Brucella*. Umjesto toga, čini se da virulencija dosta ovisi o sposobnosti izbjegavanja imunološke obrane domaćina.

Kapsula bogata lipidima koju *F. tularensis* posjeduje, pruža zaštitu od komplementom-posredovane lize u izvanstaničnom okruženju [48]. Nije poznato pruža li kapsula bakteriji bilo kakvu prednost jednom kada se nađe unutar makrofaga. Kapsula nije dovoljno imunogena [23].

*Francisella* ima sposobnost preživjeti u različitim tipovima stanica domaćina, uključujući plućne epitelne stanice [49], fibroblaste [50], fagocitne stanice koje se sastoje od dendritičkih stanica [51], neutrofila [52] i makrofaga [53]. Makrofagi se smatraju primarnim ciljem i dosad već široko proučavanim tipom stanica u svrhu istraživanja *Francisella*. *F. tularensis* ima jedinstveni intramakrofagni životni ciklus koji uključuje ulazak [54], inhibiranje fagosom-lizosom fuzije [55-57], fagosomski bijeg te citosolnu replikaciju [58,59]. Također, pokazano je da se dio citosolnih *Francisella* translocira u vakuole sposobne izazvati autofagiju, već nakon samo nekoliko sati replikacije no, međutim, većina bakterija ipak ostaje unutar citosola i prolifera dalje u razmnožavanju, bez induciranja mehanizma autofagije domaćina [60]. U stanicama domaćina sisavaca, lokacija *Francisella* u citosolu nakon bijega iz vakuola/fagosoma je ključni korak ka produktivnom unutarstaničom razmnožavanju, dok se tijekom infekcije stanica ameba, poput *Acanthamoeba castellanii*, bakterija nalazi unutar fagosoma gdje se i razmnožava [43,61].



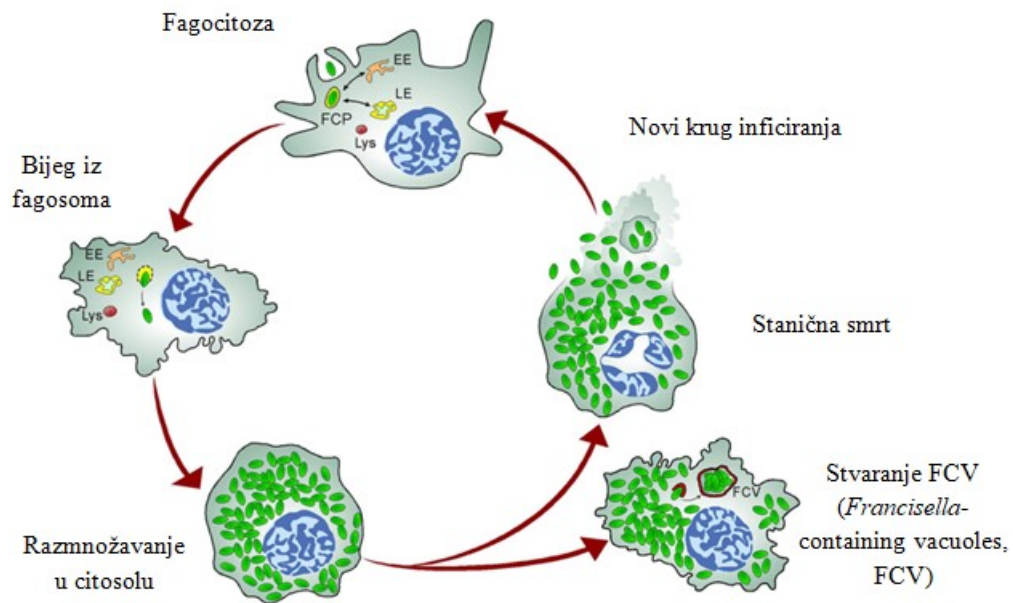
Izbjegavanje autofagije pretpostavlja se jednim od mehanizama kojime se *F. tularensis* služi kako bi se izbjegla imunološki odgovor domaćina i nastavila svoju proliferaciju i unutarstanični ciklus [62].

Prilikom prodiranja u stanice domaćina, *Francisella* iz unutarstaničnog okruženja mora preuzeti te za svoj rast iskoristiti sve dostupne anaboličke supstrate i izvore energije u citosolu stanica. Nutrijenti koji imaju najveći značaj za njen rast nisu odmah dostupni, već se nalaze u uskladištenima kompleksnim strukturama kao što su molekule glikogena, lipidnih kapljica i proteina [63]. Da bi došlo do proliferacije u stanicama, *Francisella* mora svojim metabolizmom razgraditi spomenute makromolekule na manje molekulske strukture poput ugljikohidrata, masnih kiselina i aminokiselina ili povećati unos hranjivih tvari [64,65].

*Francisella* inficira preko 200 različitih stanica, od humanih, antropodnih pa sve do stanica protozoa koje imaju važnu ulogu u održavanju *Francisella* u vodenom okolišu, dok su humani makrofazi najbitniji te najviše ispitivani u patogenezi uzročnika kod čovjeka [66].

Unutarstanični životni ciklus kod bakterija koje imaju takav način razmnožavanja uglavnom je isti za različite vrste stanica koje inficiraju, ali za bakterije roda *Francisella* ta teza ne važi. Iako, korak koji je ključan i zajednički u ciklusu je upravo bijeg ili ostanak u vakuoli stanice koju inficira, bilo da se radi o domaćinima protozoama ili sisavcima. Nekoliko minuta nakon ulaska u stanicu domaćina, protozoe ili sisavca, *Francisella* boravi u fagosomu/vakuoli manje od 2 sata. Kod sisavaca, fagosom se razvija i sazrijevanjem prelazi u oblik ranog endosoma (engl. *Early Endosome*, EE) reguliran s Rab5 GTP-aznim proteinom koji stvara rani endosomalni antigen 1 (engl. *Early Endosomal Antigen-1*, EEA-1). Rani endosom potom prelazi u kasni endosom (engl. *Late Endosome*, LE) koji također producira svoje kasne endosomalne markere, takozvane lizosomski povezane membranske proteine (engl. *Lysosomal Associated Membrane Protein*, LAMP) no, djelovanjem ATP protonske

pumpe dolazi do zakiseljavanja medija te ne dolazi do daljnjeg nastanka lizosoma. Ovisno o kojoj je stanici sisavca riječ, dovoljno je čak i oko 30 minuta od inficiranja stanice da se dogodi bijeg *Francisella* iz fagosoma. Bakterija se dalje vrlo brzo razmnožava u citosolu domaćina. Nadalje, zbog prevelikog broja namnoženih bakterija, stanica domaćina podliježe apoptozi i ispuštanju novonastalih bakterija na druge neinficirane stanice u okolišu domaćina čime iznova kreće krug inficiranja. Međutim, postoji i druga opcija kod domaćina sisavaca, a ta je da, nakon razmnožavanja u citosolu *Francisella*, nakon 24 sata, prelazi u autofagičnu vakuolu [67-71] (Slika 12).



**Slika 2.** Model unutarstaničnog životnog ciklusa *Francisella* u humanim stanicama makrofaga [66].

Kada se unutarstanični životni ciklus odvija u stanicama protozoa poput amebe – *A. castellani*, tada *Francisella* ne izlazi iz vakuole kao u stanica sisavaca, već se unutar vakuole

razmnožava [67]. Međutim, sam sastav i mehanizam nastanka vakuole, odnosno fagosoma, unutar koje se razmnožava bakterija nije još poznat.

Kompletan unutarstanični život *Francisella* je vrlo kompleksan, s brojnim i još nedovoljno istraženim mehanizmima i činiteljima virulencije koji ovu bakteriju čine multifunkcionalnim patogenom i potencijalnim biološkim oružjem.

#### **1.1.1.3.1. *Francisella* lipopolisaharid i faktori virulencije**

Faktori koji doprinose virulentnosti i infektivnosti francizela te svojstvenom načinu životnog ciklusa su brojni, iako još ne tako dovoljno istraženi.

Kao i većina gram-negativnih bakterija, *Francisella* spp. u vanjskoj membrani sadrži lipopolisaharide (engl. *Lipopolysaccharides*, LPSs). Struktura LPS-a sastoji se od tri glavne komponente: a) lipid A, koji veže lipopolisaharid za vanjsku membranu; b) polisaharidnu jezgru povezanu s lipidom A; c) oligosaharid ili O-antigen koji sadrži ponavljajući slijed tetrasaharida [72].

LPS *Francisella* spp. je unikatan te se razlikuje po strukturi i sadržaju komponenti od tipičnog LPS-a koje ima većina gram-negativnih bakterija. Od ključne važnosti je manjak fosfatnih ostataka u molekulskim strukturama što potom rezultira i vrlo niskom endotoksičnošću, budući da kod ostalih gram-negativnih bakterija s LPS-om to nije slučaj i one produciraju endotoksine. Također, gubitak O-antigena rezultirao bi povećanom osjetljivošću na baktericidno djelovanje komponenti aktivnih prema staničnim membranama, poput serumskih i antimikrobnih peptida, koji bi smanjili mogućnost unutarstaničnog preživljavanja *Francisella* spp. u stanicama domaćina te uvelike smanjili njihovu virulentnost [73].

Idući važni čimbenik virulencije svakako je *Francisella* patogeni otok (engl. *Francisella pathogenicity island*, FPI). *Francisella* patogeni otok identificiran je prilikom slučajne transpozicijske mutageneze zbog defekta tijekom unutarstaničnog razmnožavanja bakterije. Unutar FPI identificirano je 19 gena. Geni *iglABCD* i *pdpABCD* esencijalni su za virulentnost *Francisella* spp. [74]. *F. tularensis* subsp. *tularensis* i subsp. *holartica* posjeduju dvije, dok *F. novicida* samo jednu kopiju FPI što je jedan od razloga njene smanjene mogućnosti za virulentnost u odnosu na navedene *F. tularansis*, tip A i tip B [74].

*F. tularensis* i *F. novicida* različito luče FPI proteine. Nakon što *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS soj dovede do infekcije humanih makrofaga, 8 FPI proteina (IglE, IglC, IglJ, IglI, IglF, VgrF, PdpA i PdpE) se izlučuje, dok se nakon infekcije s *F. novicida* izlučuje samo 4 FPI proteina (IglE, IglC, PdpE i PdpA) [75-77].

Prije otkrića FPI, smatralo se da *Francisella* nema sekrecijske sustave kao većina sličnih unutarstaničnih gram-negativnih bakterija no, pokazalo se kako FPI posjeduje gene koji su homologni genima za kodiranje Tip 6 sekrecijskih sustava (engl. *Type 6 Secretion Systems*, T6SS) u sličnim bakterijama [78]. Homolozi *pdpB*, *iglA*, *vrgG* i *dotU* nalaze se unutar T6SS. U unutarnjoj membrani *Francisella* nalaze se i homolozi T6SS proteinima *DotU* i *IcmF*, odnosno *DotU* i *PdpB* [79]. Ukoliko dođe do mutacije *IglA* i *IglB*, bakterija neće biti sposobna pobjeći fagosomu te se razmnožavati u citosolu stanice [80].

*F. tularensis* *MglA* regulator je zadužen za aktiviranje procesa transkripcije gena koje kodira FPI, ali i drugih 90 gena. *MglA* i FPI zaslužni su za doprinos virulenciji *F. tularensis* u miševima, razmnožavanje u stanicama ameba i sisavaca [81], te za fagosomalni bijeg [82].

Ono što francizelama omogućava veću virulentnost prilikom infekcije domaćina, svakako je i sposobnost formiranja biofilma – zajednice bakterija koje su adherirane unutar izvanstaničnog polimernog matriksa [83,84]. Formirnje takve zajednice omogućava

komunikaciju među bakterijama, brži pronalazak nutrijenata, veću sigurnost i osjetljivost na razne vanjske utjecaje i opasnosti koje bi onemogućili normalno razmnožavanje bakterija. Biofilm *Francisella* spp. može formirati na više vrsta površina i medija [85]. Otkako je *F. novicida* povezana s transmisijom uzročnika putem vodenog medija, upravo je formacija biofilma ovdje ključna u preživljavanju i razmnožavanju *F. novicida* u vodenim staništima [86-88].

#### **1.1.1.4. Klinička manifestacija tularemije**

Klinička slika tularemije i težina oboljenja ovisi o ulaznom mjestu *Francisella* spp. u ljudski organizam. Prema mjestu inficiranja, stoga postoji sedam tipičnih oblika tularemije: glandularni, ulceroglandularni, okuloglandularni, angiozni, abdominalni, tifoidni i plućni oblik [89,90]. Inkubacija traje 3 do 10 dana. Tularemija ima nagli nastup. Javlja se povećana tjelesna temperatura, vrućica i opći algički sindromom. Istovremeno se javljaju i lokalni simptomi bolesti, ovisno o primarnom mjestu infekcije. Ukoliko se tularemija ne liječi, temperatura će ostati povišena i 10-ak dana, uz svakodnevne oscilacije [89,90].

Ulceroglandularni oblik razvija se prilikom dolaska u kontakt sa zaraženom životinjom gdje se na ruci, obično prstima, formira primarni afekt u obliku bezbolne papule koja s vremenom nekrotizira (Slika 3). Na području pazuha ili lakta zabilježeno je povećanje limfnih čvorova, odnosno limfadenitis [89,90].



**Slika 3.** Ulceroglandularna tularemija – primarni afekt na palcu ruke u obliku papule s započetom nekrotizacijom. Izvor: *Tularemija*, Medicina (autor nepoznat). URL:

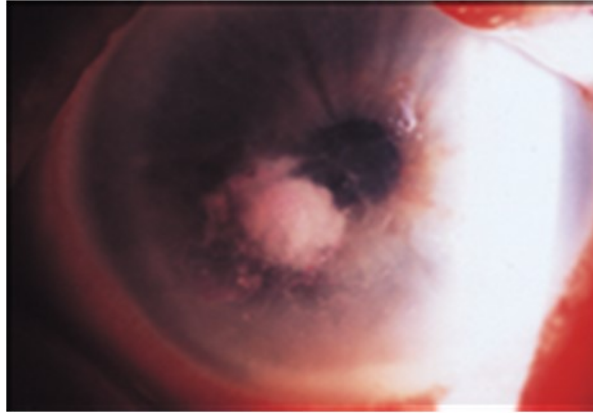
<https://zdravlje.eu/medicina/infektologija/tularemija/>

Glandularnog oblik (Slika 4) bilježi samo limfadenitis, dok je kod okuloglandularnog oblika tularemije razvijen jednostran konjunktivitis (Slika 5) uz limfadenitis ispred uške i kod susjednih vratnih limfnih čvorova [89,90].



**Slika 4.** Glandularna tularemija – limfadenitis vratnih limfnih čvorova. Izvor: Radić, M. *Tularemija*. Veterina.info; URL: [http://veterina.info/vesti/25-goveda/bolesti-goveda/196-](http://veterina.info/vesti/25-goveda/bolesti-goveda/196-tularemija)

tularemija

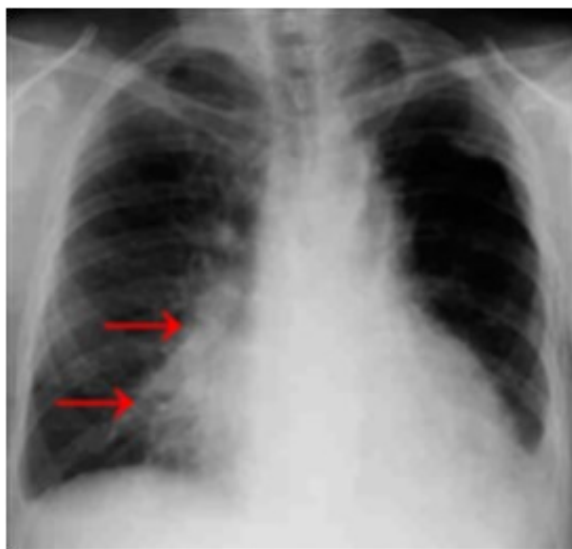


**Slika 5.** Okuloglandularna tularemija – konjuktivitis [89].

Angiozni oblik tularemije ima razvijen primarni afekt na jednoj ili obje tonzile, u obliku ulceromembranozne nakupine ili nekroze.

Abdominalni oblik bolesti razvija ulceracije u crijevima i uzrokuje povećane mezenterijalne limfne čvorove. Tifoidna tularemija ide bez tipičnih limfadenitisa i primarnog afekta već, prema kliničkoj slici bolesnika, nalikuje trbušnom tifusu ili sepsi [89,90].

Plućni oblik tularemije pojavljuje se s karakterističnom atipičnom pneumonijom (Slika 6) uz afekciju traheobronhalnih limfnih čvorova. Ovaj oblik bolesti može biti najsmrtonosniji, ukoliko bi nepravodobno tretirana infekcija bila izazvana visoko virulentnom *F. tularensis* tipa A, za koju je dovoljno unijeti u organizam čovjeka tek 10-ak bakterija inhalacijski, aerosolom, da prouzroči teški plućni oblik bolesti s mogućim letalnim ishodom [89,90].



**Slika 6.** Plućni oblik tularemije – atipična pneumonija na RTG snimci bolesnika. Izvor: autor nepoznat; URL: <http://path.upmc.edu/cases/case186/images/gross2.jpg>

Infekcije uzorkovane s *F. novicida* rijetko su bile povezane sa zdravim čovjekom, poradi čega je teško postaviti točnu dijagnozu prilikom identifikacije uzročnika [91]. Zabilježeno je samo 12 sigurnih slučajeva bolesti gdje je kod pacijenata izolirana *F. novicida* [92,93]. Klinička slika te bolesti nije nalikovala tipičnoj tularemiji. Od 11 pacijenata, devetero ih je bilo imunokompromitirano. Svi su pokazivali samo akutne simptome i povišenu tjelesnu temperaturu. Od evidentiranih, kod dvojice se zdravih pojedinaca infekcija s *F. novicida* razvila u lokalni limfadenitis, ali bez značajnijeg povišenja tjelesne temperature i bez prisustva općih simptoma. Ulceroglandularni, okuloglandularni, orofaringealni ili plućni oblici kliničke slike tularemije nisu uočeni prilikom zaraze s *F. novicida*, i to kod prethodno zdravih pojedinaca.



#### **1.1.1.4.1. Dijagnostika**

Dijagnoza tularemije često se odgađa, odnosno teže se točno identificira, zbog nespecifičnog kliničkog stanja manifestacije simptoma, jedinstvenih nutritivnih zahtjeva za rasta organizma ili pak zbog nedostatka epidemiološke podrške povijesti bolesti što sve može dovesti do pogrešne dijagnoze. Uobičajene metode su identifikacija bakterije iz biološkog uzorka oboljelog, nasađivanjem na specifične hranjive agare koji u sastavu imaju cistein, radi dokaza porasta kolonija *Francisella*. Također, moguća je i izolacija DNA koristeći PCR (engl. *Polymerase chain reaction*, PCR) metodu [94].

#### **1.1.1.4.2. Terapija**

U terapiji se koriste antibiotici. Otkako se od 1946. pokazao djelotvornim, pripadnik skupine aminoglikozida – streptomycin, postaje lijekom prvog izbora za sve kliničke oblike tularemije, osim meningitisa. Minimalna doza je 7,5-10 mg/kg streptomicina, danog intramuskularno svakih 12 sati tijekom 7-14 dana. Od ostalih antibiotika djelotvoran je i tetraciklin, prema *F. tularensis*. Oralno se mogu primjeniti florokinoloni za tip A ili tip B *F. tularensis*, iako je učinak minimalan [94].

#### **1.1.1.4.3. Prevencija**

Agencija za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC ) klasificirala je *F. tularensis* subsp. *tularensis* u A kategoriju potencijalnog biološkog oružja [94].

##### **a. Antibakterijska profilaksa**

Antibiotska profilaksa uključivala bi tetraciklin, doksiciklin i ciprofloksacin jer su se pokazali dobrom zaštitom kod volontera izloženih aerosolu *F. tularensis*, a s ciljem da se ispita zaštitni učinak za razvoj obrambenog „mehanizma“ ukoliko bi došlo do bioterorističkog

napada s ovim virulentnim patogenom putem aerosola na velike mase ljudi. Iako, upitna je pravovremena primjena profilakse zbog male vjerojatnosti da bi se za takav napad znalo 14 do 28 dana ranije, koliko je bilo potrebno da se kod ispitanika postigne smanjena osjetljivost na razvoj najteže kliničke slike tularemije, što upućuje na potrebu za bržim rješenjem [94].

## **b. Cjepivo**

Potreba za efikasnim cjepivom za široku humanu uporebu koji će biti stabilan protiv genskih mutacija te efektivan prema uzročniku tularemije je velika. Cjepivo sa živim oslabljenim uzročnikom proizvedeno je iz *F. tularensis* subsp. *holarctica* u Sovjetskom Savezu 1952. godine – takozvani LVS, soj živog cjepiva (engl. *Live Vaccine Strain*, LVS). Poradi podložnosti genskim mutacijama, nestabilnosti i loše reakcije kod imunokompromitiranih ljudi, ono još uvijek nije odobreno za široku upotrebu [47].

*F. novicida*, kao modelni organizam, posljednjih se godina sve više proučavana u svrhu izrade kompletnog cjepiva protiv tularemije uzorkovane, za čovjeka, virulentnijom *F. tularensis* [95,96].

### 1.1.2. *Francisella* u vodenom okolišu

*F. tularensis* može preživjeti u vodi dugi vremenski period. Opstanak organizma u steriliziranoj vodi iz slavine bio je prijavljen u dvije odvojene *in vitro* studije. Korištenje postupaka temeljenih na održivosti bakterijske kulture pokazalo se da *F. tularensis* subsp. *holarctica* (NY98) normalno preživljava u sterilnoj vodi iz slavine na 8°C tijekom 28 dana, dok *F. tularensis* subsp. *holartica* soj LVS tijekom 21 dana [97]. Pod sličnim uvjetima, LVS soj se mogao očitati, u sve manjim koncentracijama, još 70 dana [98].

Studije s *F. novicida* i *F. philomiragia* u vodi pokazale su da interakcija s amebama može povećati njihovo preživljavanje u vodenom okolišu [99]. *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS soj u ko-kulturi s slobodno-živućim amebama, *A. castellanii*, pronađena je u oba oblika amebe – trophozoitesu i cisti. Bakterija se umnožila unutar unutarstaničnih vakuola i ubila mnoge stanice domaćina [43].

Pretpostavlja se da bi *F. tularensis* mogla formirati biofilmove, što bi ovoj najvirulentnijoj vrsti roda *Francisella* povećalo preživljavanje u vodenom okolišu [84]. Formiranje biofilma bi bilo u skladu s načinom života mnogih drugih bakterija. U laboratorijskim studijama *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS soj, *F. novicida* i *F. philomiragia* inducirali su formiranje biofilmova u dubljim plastičnim pločama [100,101]. Značaj stvaranja biofilmova i interakcija sa slobodno-živućim amebama u odnosu na postojanost *F. tularensis* u vodenom okolišu tek čeka daljnje razjašnjenje.

## 1.2. *Acanthamoeba spp.*

Slobodno-živeće amebe (engl. *Free-living amoebae*, FLA) pripadnice su praživotinja, široko rasprostranjene u prirodi te normalni stanovnici slatkovodnih mikrobnih ekosustava [102,103]. Ipak, amebe imaju i veliki utjecaj na dinamiku multimikrobnih biofilmova budući se hrane različitim mikroorganizmima, pridonoseći tako recikliranju hranjivih tvari [104].

Iako se amebe hrane bakterijama, odnosno u odnosu na njih su predatori, neke su bakterije razvile sposobnost unutarstaničnog života s amebama, i tada imaju nekoliko koristi: sposobnost da izbjegnu predatorstvo ameba te rastu u njihovoj prisutnosti koji bi bakteriju inače normalno fagocitirali i probavili nerrezistentne bakterijske vrste; sposobnost izbjegavanja unutarstanične lize i preživljavanje unutar same amebe; sposobnost da se neometano razmnožavaju i rastu u vegetativnom obliku amebe, trofozoitu [105].

Životni ciklus FLA uključuje najmanje dvije faze, hranidbeni trofozoiti (vegetativni oblik) i „uspavanu“ cistu. Cista se sastoji od dva sloja, ektociste i endocista [105].

Trofozoit je aktivna faza i razmnožava se binarnom diobom. To je tipična eukariotska stanica koja sadrži jezgru s velikim središnjim jezgrićom, endoplazmatski retikulum, ribosome, Golgijev aparat, mitohondrij, mikrotubule i različite vakuole. Citoplazmatska membrana okružuje citoplazmatski (citosol) sadržaj trofozoita koji na površini posjeduje pseudopodije s pomoću kojih se pokreće kroz medij. Citosolne vakuole uključuju kontraktilne vakuole, koji su regulatori osmoze, tj. kontrole sadržaja vode u stanici. Sekretorne vakuole obično sadrže enzime za specifične funkcije kao kod digestije hrane [106]. Trofozoit uzima potrebni kisik iz vode koja prolazi kroz polupropusnu staničnu membranu, dok se raspadni produkti CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O potom eliminiraju kroz staničnu membranu. Trofozoiti *Acanthamoeba* duljine su 25 do 40 μm, ovisno o vrsti, s rasponom temperature potrebne za rast od 12 °C do 45 °C [107].

Trofozoit se hrani bakterijama, algama i kvascima u okolišu, ali također može uzeti i hranjive tvari u tekućem obliku putem pinocitoze [108,109].

Iz javnozdravstvene perspektive, amebe, a naročito amebne ciste, mogu biti vrlo otporne na različita fizikalna i kemijska stanja te stoga tako mogu zaštititi bilo koji unutarstaničan mikroorganizam od štetnih okolišnih uvjeta koji bi ih inače ubio [110-112].

Struktura ciste ameba može objasniti njihovu otpornost na ekstremne temperature [113], dezinfekciju nekih vrsta biocida [114], antibiotika [115] i razine klora koja bi mogla biti prisutna u adekvatno spremištima vode [116].

### **1.2.1. *Acanthamoeba castellanii***

*A. castellanii* je mala ubikvitorna ameba koja je izolirana iz različitih prirodnih izvora okoliša kao što su tlo, svježa voda, prašina, zrak, ali i iz antropogenih ekosustava [117]. *A. castellanii* uzrokuje granulomatozni amebni encefalitis, kobnu infekciju središnjeg živčanog sustava koja se pojavljuje kod pacijenata s imunološkim poremećajima. Ameba uzrokuje i bolni keratitis koji može rezultirati sljepoćom koja se javlja čak i kod zdravih osoba. Infekcija je često pogrešno dijagnosticirana i teško ju je liječiti, jer su amebe otporne na mnoga terapijska sredstva [118,103,119].

Citoplazmatska membrana *Acanthamoeba* sastoji se od oko 25% fosfolipida [120]. Karakteristična osobina amoebnih fosfolipida je prisutnost C20 [121-123] i, nedavno otkrivenih, C28 i C30 masnih kiselina [124]. To su poprilično neobični masni kiselinski ostaci i mogu biti vrlo korisnim pokazateljima, lipidnim biomarkerima, na prisutnost ovog mikroorganizma.

### 1.3. Interakcija između ameba i unutarstaničnih patogena

Posljednjih nekoliko desetljeća opstanak i razmnožavanje unutar domaćina, tj. unutarstanični način preživljavanja bakterija u protozoama, kao obrambena strategija, dobiva sve više pažnje [125,126]. Ovakvu strategiju koristi nekoliko patogena poput: *Salmonella enterica*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, *Vibrio cholerae* i *Francisella tularensis*, koje sve mogu izbjeći degradaciju unutar predatorskih protozoa [127-130].

Rezervoar u okolišu *F. tularensis* subsp. *holarctica* (tip B) je dugo vremena bio nepoznat, ali dokazi koji upućuju na stil života u vodenom ekosustavu stalno su se povećavali. Istraživanja povezana s vodom pokazala su da se tip B može naći u vodenim zonama u blizini žarišta infekcije [5,131] što upućuje da su okolišni rezervoar bakterije upravo vodeni sustavi.

U amebi se bakterija umnaža unutar hranidbene vakuole/fagosoma [61]. Unatoč razlikama u mehanizmu preživljavanja u stanicama protozoa i sisavaca, otkriveno je da su IglC-protein i njegov regulator MglA neophodni za degradaciju avirulentnih sojeva, *F. tularensis* LVS i *F. novicida*, u amebi i makrofazima sisavaca. IglC-protein, stoga je vrlo važan za proliferaciju kod ameba i makrofazima sisavaca [68,81,82]. Sličnost amoeba i makrofaga sisavaca ključ je za relativno nekomplikiran korak od vode do zemlje, gdje bi ove avirulentne bakterije mogle postići potpunu virulentnost. Zapravo, toliko su slični da se postavlja pitanje jesi li amebe preciznije makrofaga [120].

#### 1.3.1. Javnozdravstveni značaj

Američki centri za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC) klasificiraju *F. tularensis* kao agens bioterorizma, u kategoriji A, zbog vjerojatne upotrebe takvog oružja radi lakoće širenja zrakom putem aerosola, potencijalnog uzrokovanja bolesti, vjerojatnog smrtnog

ishoda, utjecaja na javno zdravlje i vjerojatnost stvaranja društvenih poremećaja [132]. *F. tularensis* je postala javnozdravstveno pitanje zbog svoje potencijalne uporabe u biološkom ratovanju od strane organiziranih vojnih ili nezavisnih terorističkih skupina. Poznavanje epidemiologije, patofiziologije i kliničke bolesti organizma omogućit će stručnjacima zdravstvene skrbi da bolje identificiraju neobične uzroke tularemije koji mogu nastati kao posljedica upotrebe kao biooružja [132].

U slučaju bioterorističkog napada, tularemija će vjerojatno biti otpuštena u aerosoliziranom obliku u gusto naseljenom urbanom okruženju [45]. Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World health organisation*, WHO) je 1970. procijenila kako bi oslobađanje 50 kg *F. tularensis* zrakoplovom iznad područja s 500 000 ljudi, rezultiralo sa 30 000 slučajeva smrti i 125 000 onesposobljenih. Također su primijetili da bi cijepljeni pojedinci biti samo djelomično zaštićeni od aerosolne izloženosti. Godine 1997., CDC je procijenio da bi izlaganje 100 000 osoba u aerosol *F. tularensis* rezultiralo s 82 500 slučajeva tularemije i 6 188 smrtnih slučajeva (6,2% smrtnosti), a troškovi bi dosegali između 456 milijuna i 561,88 milijuna dolara [133].

## 1.4. Dezinficijensi

Dezinficijensi su kemijski aktivne otopine koje se koriste u postupcima dezinfekcije gdje se žele ukloniti, inaktivirati ili uništiti svi vegetativni oblici mikroorganizma, ali ne i bakterijske spore. Dezinfekcija se može izvoditi na površini tijela i predmeta, u vodi i prostorijama ili, pak, na namirnicama [134,135].

Da bi se neki dezinficijens mogao nazvati učinkovitim i staviti u promet, on mora: imati široki spektar primjenjivosti; biti aktivan u niskim koncentracijama, uz prisutnost organskih tvari; brzo djelovati pri sobnim temperaturama i na temperaturi ljudskog tijela; biti što je manje moguće toksičan prema čovjeku i okolišu te ne smije razvijati otpornost mikroorganizama na kemijske tvari; biti jednostavan i siguran za primjenu; biti hidrosolubiln; biti otporan prema stvaranju pjene. Zatim, ne smije biti eksplozivan i zapaljiv, a djelovanje mora biti aktivno i djelotvorno i poslije duljeg vremenskog perioda od nanošenja na površinu koja se je tretirala [134,135].

Učinkovitost dezinficijensa često će ovisiti o čimbenicima poput temperature, pH, vremenskog perioda izlaganja i vrsti mikroorganizama na koje se želi djelovati, a ponajviše o koncentraciji pripremljene otopine [134,135].

Dezinficijense dijelimo prema stupnju djelotvornosti na: a) visoki stupanj – baktericidno i sporocidno djelovanje; b) srednji stupanj – ne djeluje sporocidno, već inaktivira bakterije iz roda *Mycobacterium*; c) niski stupanj - ubija vegetativne oblike bakterija i nekih virusa (u ovu se skupinu ubrajaju kvaterne amonijeve soli)[134,135].

Prema aktivnim tvarima, u dezinficijensima mogu biti sadržane: kiseline, lužine, alkoholi, fenoli i derivati, halogeni spojevi, aldehidi, bigvanidi, tenezidi (kvaterne amonijeve soli) ili oksidacijska sredstva [134,135]. Bigvanidi djeluju bakteriostatski, jednako kao i tenezidi.



Kvaterni amonijevi spojevi uzrokuju inaktiviranje produkcije enzima, a potom i denaturaciju bjelančevina [134].

#### **1.4.1. Mehanizam djelovanja na bakterijsku stanicu**

Dezinficijensi, prema mehanizmu djelovanja, za primarni cilj imaju denaturaciju bjelančevina, oštećenje citoplazmatske membrane bakterije i onemogućavanje formiranja stanične stjenke ili pak, mogu ometati izmjenu i resorpciju tvari zbog djelovanja na enzimske procese [134,135].

Dezinficijensi djeluju na sljedeće stanične dijelove [136-139]:

##### *a) Vanjska membrana stanične stjenke*

Bakterija je zaštićena od svoje okoline pomoću vanjske membrane, čija je postojanost bitna za opstanak bakterije u okolišu. Ova se membrana sastoji od bazičnih spojeva poput fosfolipida i lipopolisaharida, inače važnog faktora virulencije *F. tularensis*, te je stabilizirana kationima magnezija i kalcija. Stoga, ako su ionizirane dezinficijske molekule apsorbirane ili odbijene zbog elektrostatskih sila pri prvom kontaktu i stadiju apsorpcije, teoretski su moguće reakcije:

- nepolarne molekule mogu se otopiti i ući u lipidnu fazu,
- specifični sustavi prenošenja tvari propuštati će druge molekule kroz membranu,
- druge molekule će ulaskom moći poremetiti organizaciju membrane vezajući se za određene dijelove stjenke;

##### *b) Stanična stjenka*

Stanična stjenka bakterijama vrlo bitna, jer im daje oblik i otpornost te prema njoj razlikujemo gram-pozitivne od gram-negativnih bakterija. Ta raznolikost vodi do velikih varijacija u afinitetima hidrofilnih dezinficijensa;

*c) Citoplazmatska membrana*

Aktivna molekula iz dezinficijensa, poput hranjivih tvari, može prodrijeti u citoplazmatsku membranu na sljedeće načine:

- pasivnom difuzijom (nespecifična i spora),
- aktivnim transportom (specifična – omogućava nakupljanje aktivne molekule dezinficijensa u bakterijama nakon transformacije ili vezanja na membranski protein);

*d) Metabolizam energije*

Neki dezinficijensi djeluju na proizvodnju adenozin trifosfataze (ATP), enzima zaduženog za normalni metabolizam stvaranja energije;

*e) Citoplazmu i jezgru*

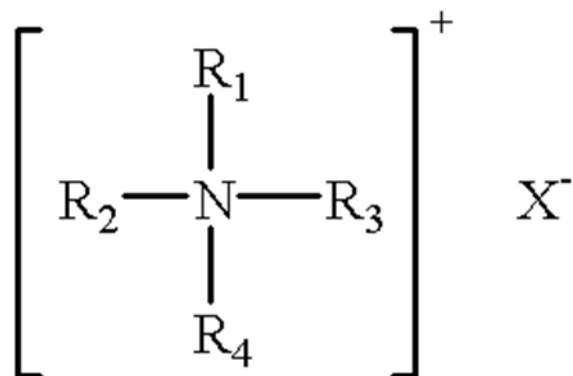
Mehanizam djelovanja aktivne molekule dezinficijensa može djelovati na citoplazmu i jezgri na razini kromosoma;

*f) Bakterijske spore*

Nepropusnost i prisutnost dipikolinske kiseline u bakterijskim sporama čini spore mnogo otpornije na dezinficijense nego kada se djeluje na vegetativne oblike bakterije. Aktivno djelovanje dezinficijensa uključuje tvari visoke oksidacijske sposobnosti, kao što su vodikov peroksid i klor, što uvelike može destabilizirati tu strukturu u bakterijskim sporama.

#### **1.4.2. Kvaterne amonijeve soli**

Kvaterni amonijevi spojevi kationske su i površinski aktivne tvari koje u svojoj strukturi sadrže tetra-amonijeve soli i karakterizira ih pozitivno nabijen kvaterni dušikov atom, po kojemu i nose ime, odnosno ovi spojevi imaju 4 funkcionalne skupine koje su kovalentno vezane na centralni dušikov atom pozitivnog naboja (Slika 7).



**Slika 7.** Opća molekulska struktura kvaternih amonijevih soli, gdje R predstavlja funkcionalnu skupinu - alkilnu, metilnu, benzilnu; dok X<sup>-</sup> predstavlja negativno nabijen ion kao, npr. Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> ili NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Izvor: <https://www.google.com/patents/US6306805>

Kvaterni amonijevi spojevi (engl. *Quaternary ammonium compounds*, QACs) se nepovratno vežu na fosfolipide i proteine membrane, čime se smanjuje njezina propusnost. Kapacitet bakterijske stanice da apsorbira takve molekule utječe na osjetljivost, kako slijedi [140-144]:

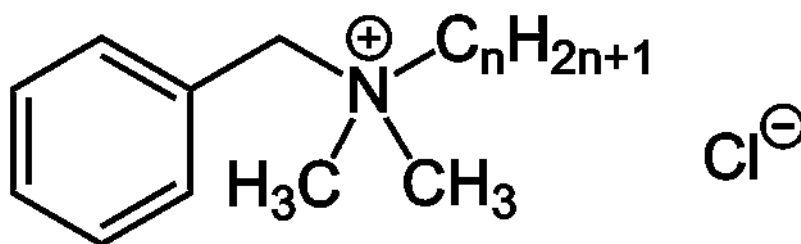
- antimikrobna aktivnost kvaternog amonijaka s alkilnim lancem povezana je s lipofilijom – lanci duljine od 12 do 16 ugljikovih atoma za gram-pozitivne i gram-negativne bakterijske sojeve;
- nekoliko aktivnih QAC spojeva ima manji inhibitorski učinak na rod *Pseudomonas* nego na rod *Bacillus*, a sve zbog prisustva većeg udjela lipoproteina i liposaharida u vanjskoj ovojnici sloja peptidoglikana;
- kod *Pseudomonas* spp., veći sadržaj fosfolipida i neutralnih lipida povećava rezistenciju na QAC. Benzalkonijev klorid čini stanicu propusnijom, a isti fenomen se opaža i kod *Enterobacter cloacae*.

- kod gram-pozitivnih bakterija, QAC se veže za proteine membrane i na taj način mogu lako ući i uništiti membranu;

- jedinstvena apsorpcija može se promatrati i kod gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, gdje dolazi do oštećenja membrana i povećanja propusnosti tvari.

Manja akutna toksičnost djelovanja kvaternih amonijevih spojeva detaljno je ispitivana na glodavcima i raznim vodenim organizmima [145]. Genotoksičnost za ljude još treba biti istraženom, ukoliko je vjerojatna.

Djelovanje benzalkonijevog klorida (engl. *Benzalconium chloride*, BAC) (Slika 8) na ljudskim stanicama, izvedenom u *in vitro* studiji [146] uočeno je da BAC uzrokuje relevantne promjene na molekuli DNA kod većeg broja respiratornih epitelnih stanica i to u komercijalno dostupnim preparatima za nosnu šupljinu.

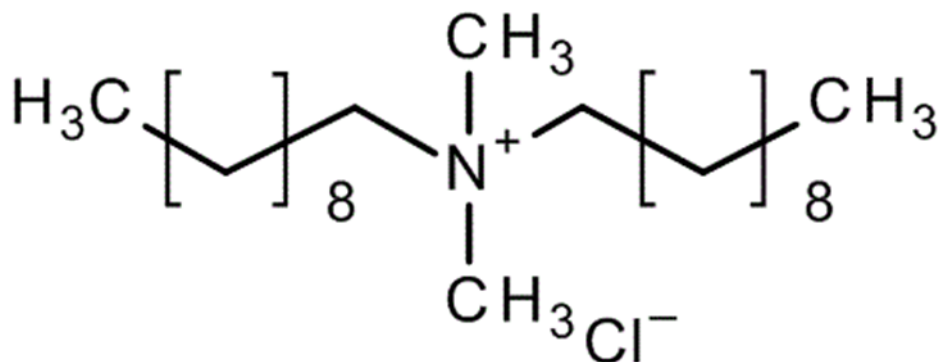


$$n = 8, 10, 12, 14, 16, 18$$

**Slika 8.** Molekulska struktura benzalkonijevog klorida gdje  $n$  predstavlja broj ugljikovih i vodikovih atoma u spoju. Izvor: [https://en.wikipedia.org/wiki/Benzalkonium\\_chloride](https://en.wikipedia.org/wiki/Benzalkonium_chloride)

Ispitivanja genotoksičnog učinka didecildimetilamonijevog klorida (engl. *Didecyl dimethylammonium chloride*, DDAC) (Slika 9) pokazale su negativne rezultate na genotoksičnost prema stanicama glodavaca no, dulje izlaganje kod čovjeka dovodi do slabije

kožne iritacije, iritacije očiju i/ili probavnog sustava [147]. DDAC inače je aktivan sastojak u nekim antisepticima i dezinficijensima.

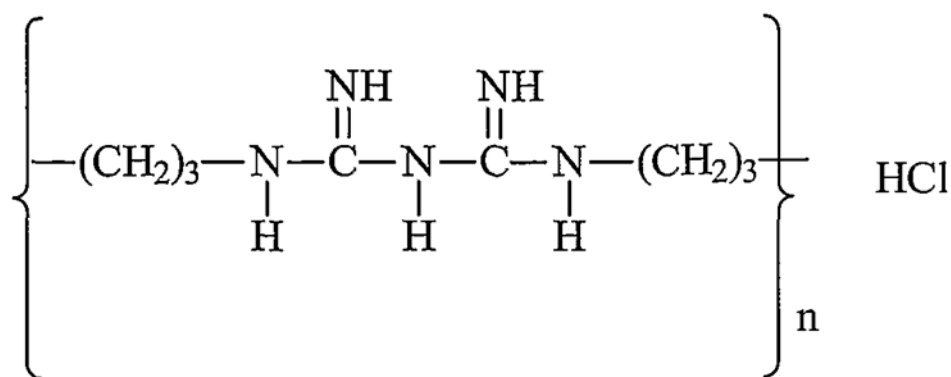


**Slika 9.** Molekulska struktura didecildimetilamonijevog klorida. Izvor:

[http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Didecyltrimethylammonium-chloride,MDA\\_CHEM-814364?ReferrerURL=https://www.google.hr/](http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Didecyltrimethylammonium-chloride,MDA_CHEM-814364?ReferrerURL=https://www.google.hr/)

### 1.4.3. Bigvanidi

Način djelovanja skupine poliheksametilen bigvanida (PHMB) (Slika 10), koji uključuje i spoj klorheksidin, opisan je u brojnim publikacijama [138, 139, 148, 149]. Koriste se u antisepticima, konzervansima u kozmetici, za zarašćivanje rana i, općenito, kao dezinficijens široke upotrebe i spektra djelovanja.



**Slika 10.** Molekulska struktura poliheksametilen bigvanida; *n* označava broj jedinaka (4 do 19) i predstavlja duljinu alkilnog lanca. Izvor:

<http://www.google.com.ar/patents/WO2005040323A1?hl=hr&cl=en>

Primarno mjesto djelovanja je citoplazmatska membrana, koja rezultira modifikacijom propusnosti membrane. Taj je učinak zapažen zbog elektrostatske interakcije PHMB s kiselim fosfolipidima u citoplazmatskoj membrani. S obzirom na veličinu molekula PHMB, to podrazumijeva stvarnu adsorpciju na citoplazmatske membrane gram-pozitivnih ili gram-negativnih bakterija, što dovodi do destruktivnog djelovanja na ovoj razini. Za razliku od nekih antibiotika (penicilini, bacitracin i novobiocin), nema akumulacije bakterijskih membranskih prekursora, odnosno uništavanje je uzrokovano raskidom membrane i gubitkom propusnosti bez lize stanične stjenke.

Otpuštanje sastojaka stanica nastaje pri vrlo niskim koncentracijama. Na visokom koncentracijama koje se koriste pod antiseptičkim uvjetima, baktericidni učinak je vrlo brz, zbog koagulacije citoplazme. Stoga, bakterijska smrt nije rezultat samo zbog propuštanja sastojaka stanica u svim (zapravo, samo nižim) koncentracijama PHMB.

PHMB, osim što djeluje nepovoljno na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije, ima i virucidan učinak za neke viruse. Stabilan je pri rasponu pH od 1 do 11, nema u sastavu formaldehid i ne pjenu se.

Preporučene koncentracije u humanoj medicini za postupke dezinfekcije opreme, površina i predmeta su 0,2%, 0,4%, 0,8% i 1,0%,.

PHMB u koncentraciji od 0,2% koristi se za higijenu usne šupljine u sprječavanju nastanka zubnog plaka, pritom ne oštećujući sluznicu [150], a zbog netoksičnog djelovanja predlaže se u toj koncentraciji i za tretiranje težih površinskih infekcija.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj rada bio je odrediti učinak različitih koncentracija otopina dezinficijensa Asepsol eko, Bigvasan i Descocid na rast *F. novicida* u dva aspekta, kao čiste bakterijske kulture i nakon što je bakterija bila inficirana i rasla u amebi – *A. castellanii*.

Specifični cilj bio je usporediti učinke kemijskih supstanci očitavanjem porasta kolonija na BCYE ploči kada dezinficijensi djeluju na čistu bakterijsku suspenziju *F. novicida*, odnosno kada djeluju na bakterijsku suspenziju *F. novicida* nakon unutarstaničnog života u *A. castellanii*.

Hipoteza je da će *F. novicida*, nakon infekcije i unutarstaničnog ciklusa u amebi, biti rezistentnijom na djelovanje ispitanih dezinficijansa, nego li čista kultura *F. novicida*.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. *Francisella novicida*

*F. novicida* soj U112 uzgojena je na BCYE (engl. *Buffered Charcoal Yeast Extract*, BCYE) agaru, tijekom 48 sati na temperaturi  $35\pm 2$  °C. Nakon inkubacije na BCYE ploči su porasle sivo-bijele kolonije *F. novicida* soj U112 (Slika 11).



**Slika 11.** Nakon inkubacije pri  $35\pm 2$  °C/24 h na BCYE ploči porasle su sivo-bijele kolonije *F. novicida* soja U112.

##### 3.1.1.1. Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) agar

BCYE agar, 1978., razvio je Freely sa suradnicima, a potom modificirao Edelstein dodajući mu  $\alpha$ -ketoglutarat radi bolje stimulacije rasta mikroorganizama i veće osjetljivosti medija.

U hranjivoj podlozi nalazi se ekstrakt kvasca koji bakteriji osigurava potrebu za vitaminima, dušikom i ugljikom. Aktivni ugljen ima ulogu u razgradnji toksičnih produkata, poput vodikovog peroksida, te veže CO<sub>2</sub>. ACES pufer dodan je radi održavanja optimalnog pH za rast ( $6,9 \pm 0,2$ , pri 25 °C). Željezo (III) pirofosfat pruža izvor željeza, a esencijalna aminokiselina L-cistein nužna je za rast *Francisella* na hranjivoj podlozi.

### **3.1.2. *Acanthamoeba castellanii***

*A. castellanii* dobavljena je iz ATCC (*American Type Culture Collection*, ATCC) 30234 kulture te uzgojena u mediju 30234 na 25 °C.

### **3.1.3. Dezinfekcijska sredstva**

U istraživanju su korištena tri dezinficijensa: Asepsol eko, Descocid i Bigvasan. Za provedbu eksperimenta korištene su po tri koncentracije za svaki od dezinficijensa.

Otopina Asepsola pripravljena je u koncentracijama od 1%, 2% i 5%. Otopina Descocida pripravljena je u koncentracijama od 0,2%, 0,5% i 1%. Otopina Bigvasana pripravljena je, također, u koncentracijama od 0,2%, 0,5% i 1%.

Sigurnosno-tehničke liste za svaki od dezinficijensa, o njihovom sastavu i namjeni, sukladne su Uredbi 1907/2006 i dostupne na web stranici Hrvatskog Zavoda za toksikologiju i antidoping.

#### **3.1.3.1. Asepsol eko**

Asepsol eko pripremljen je u tri otopine od 100 mL, koncentracija 1%, 2% i 5%. Početna otopina razrijedi se s vodovodnom vodom u omjeru 1:99 mL, 2:98 mL i 5:95 mL, kako bi dobili željene koncentracije dezinficijensa.

#### **3.1.3.2. Descocid**

Descocid je pripremljen u tri otopine od 100 mL, koncentracija 0,2%, 0,5% i 1%. Početna otopina razrijedi se s vodovodnom vodom u omjeru 0,2:99,8 mL, 0,5:99,5 mL i 1:99 mL, kako bi dobili željene koncentracije dezinficijensa.

#### **3.1.3.3. Bigvasan**

Bigvasan je pripremljen u tri otopine od 100 mL, koncentracija 0,2%, 0,5% i 1%. Početna otopina razrijedi se s vodovodnom vodom u omjeru 0,2:99,8 mL, 0,5:99,5 mL i 1:99 mL, kako bi dobili željene koncentracije dezinficijensa.

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Priprema bakterijske suspenzije**

S sterilnom ezom pokupi se određena količina poraslih 48-satnih kolonija *F. novicida* na BCYE ploči te suspendira u 10 mL fiziološke otopine kako bi, nakon spektrofotometrijski izmjerene apsorbancije (OD 1), dobili bakterijsku suspenziju *F. novicida* s otprilike  $10^9$  CFU/mL.

### **3.2.2. Priprema amebne kulture**

Za pripremu inokuluma *A. castellanii* je sakupljena iz flaska nakon kultivacije u ATCC 30234 mediju, centrifugirana (350xg, 30 min), resuspendirana u puferiranoj slanoj otopini (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS) te su se potom stanice ameba brojale u Neubauerovoj komorici svjetlosnim mikroskopom. Broj iznosio je  $10^5$  stanica ameba po mililitru.

### **3.2.3. In vitro infekcija *A. castellanii* s *F. novicida***

Za pripremu *F. novicida* inficiranih u *A. castellanii*, stanice prethodno prebrojanih ameba u flasku su inokulirane s pripremljenom suspenzijom *F. novicida* kako bi dobili MOI (engl. *multiplicity of infection*, MOI) 10 tijekom 60 minuta termostiranja na 27 °C. Nakon 60 minuta, suspenzija se ispiru s ATCC medijem (bez glukoze) kako bi se uklonile izvanstanične bakterije koje nisu inficirale amebu. Dodaje se svježi ATCC medij i sadržaj u flasku inkubira u termostatu tijekom idućih 48 sati pri 27 °C.

Nakon inkubacije, stanice ameba se razaraju s Triton x 100 (0.1%) otopinom tijekom 10 minuta i ispiru u PBS-u. Takva suspenzija, u kojoj su sada oslobođene *F. novicida* nakon unutarstaničnog rasta u amebi, nasadije se L-štapićem na BCYE agar kako bi, nakon termostiranja na 37 °C tijekom 48 sati, bile kultivirane kolonije *F. novicida* uzgojene u *A. castellanii*.

### 3.2.4. Ispitivanje učinka otopina dezinficijensa različitih koncentracija na rast *F. novicida* nakon porasta u *A. castellanii* u ovisnosti o vremenu

Porasle kolonije 48-satne BCYE kulture *F. novicida* koje su prethodno uzgojene u amebama uzimaju se za pripremu bakterijske suspenzije u 10 mL fiziološke otopine. Broj bakterija određuje se spektrofotometrijski, uz slijepu probu – fiziološku otopinu. Bakterijska suspenzija koncentracije  $10^9$  CFU/mL dalje se koristi u eksperimentu ispitivanja učinka pripremljenih otopina triju dezinficijensa, različitih koncentracija, u ovisnosti o vremenskom periodu izlaganja: 10 sekundi, 1 minuta, 5, 10 i 15 minuta. Izvode se deseterostruka razrijeđenja u mikrotitarskim pločicama, u duplikatima. Postupak je isti za sva tri dezinficijensa i svaku od triju koncentracija. Kao kontrola, koristi se čista kultura *F. novicida* koja je u prethodnom istraživanju bila izložena najvećima od pripremljenih koncentracija: 5%-tnom Asepsolu eko, 1%-tnom Descocidu i 1%-tnom Bigvasanu.

Postupak je identičan i preuzet od našeg prošlog istraživanja učinka istih dezinficijensa na čistu bakterijsku kulturu *F. novicida*, opisanim u završnom radu: Špoljarić, N., Šantić, M.<sup>1</sup> (2016). *Procjena učinkovitosti kemijskih dezinficijensa u smanjenju rasta Francisella novicida*. Medicinski fakultet, UNIRI.

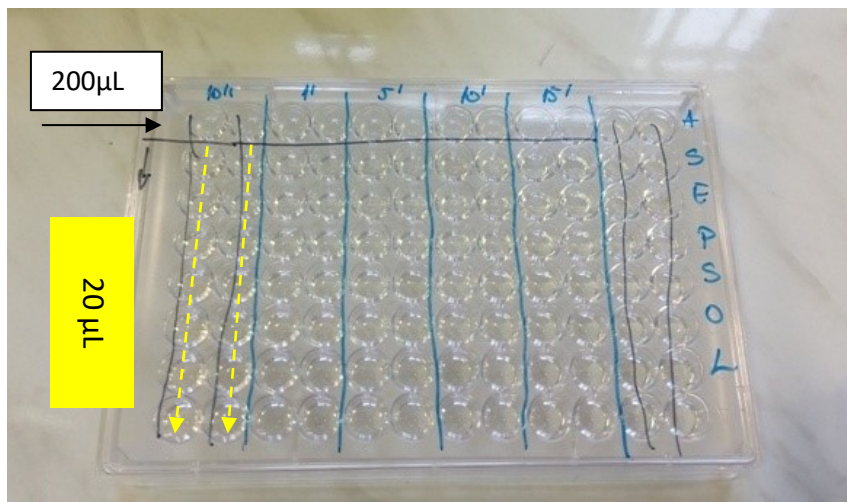
**Postupak:** Volumen od 0,5 mL, od pripremljenih otopina Asepsola eko (1%, 2%, 5%), Bigvasana (0,2%, 0,5%, 1%) i Descocida (0,2%, 0,5% i 1%), dodali smo u 15 epruveta, po 5 za svaki dezinficijens, gdje svaka epruveta predstavlja vremenski period (10 sekundi, 1 minuta, 5, 10 i 15 minuta) izlaganja dezinficijensa bakterijskoj suspenziji *F. novicida* uzgojenih u *A. castellanii*.

Prije no što se pomiješa s bakterijom uzgojenom u amebi, u mikrotitar pločicama potrebno je u triplicatima pripremiti deseterostruka razrijeđenja na način da se, počevši od

---

<sup>1</sup> Mentorica završnog rada: Prof. dr. sc. Marina Šantić

drugog reda nadalje, dodaje po 180  $\mu\text{L}$  fiziološke otopine. Potom se u epruvetu s 0,5 mL dezinficijensa pomiješa 0,5 mL bakterijske suspenzije *F. novicida* uzgojene u *A. castellani* te se u tom trenutku starta vrijeme na 10 sekundi, koliko iznosi prvi period izlaganja bakterije djelovanju dezinficijensa. Prije inokulacije, sadržaj suspenzije potrebno je promiješati, a potom 200  $\mu\text{L}$  prenijeti u prvi red mikrotitar pločice. Time dobivamo nulto razrijeđenje. Zatim se iz prvog reda, pomoću multikanalne pipete, istodobno prebacuje po 20  $\mu\text{L}$  suspenzije iz reda u red, kako je to pokazano na Slici 12.



**Slika 12.** Postupak deseterostrukog razrijeđivanja bakterijske suspenzije u duplikatima mikrotitar jažica.

Prilikom svakog prijenosa potrebno je uvijek dobro resuspendirati sadržaj te mijenjati nastavke. Na četvrtastim BCYE pločama pravilno se ispišu svi podaci te nakapava suspenzija iz mikrotitar jažica na BCYE agar. Po 10  $\mu\text{L}$  suspenzije iz svake jažice na agar se prenosi pomoću pipete, bez zamjene nastavaka, na način da se krene od najnižih koncentracija (zadnji red jažica) ka višima. Isti postupak ponavlja se i za preostale vremenske periode izlaganja (1

minuta, 5, 10 i 15 minuta) te za svaki dezinficijens. Nasađene BCYE ploče inkubiraju se na  $35\pm 2$  °C kroz 24 sata.

### 3.2.5 Statistička obrada podataka

Statistička obrada rezultata izrađena je u programu MedCalc. Izvodi se test komparacije (comparison of means), odnosno Student t-test, za izračun statističke značajnosti (p).

U izračunu se koriste broj ponavljanja, prosječan broj poraslih bakterija (average) i standardna devijacija rezultata očitavanja porasta bakterija za svaki dezinficijens i koncentraciju.

Dvije su grupe rezultata koje uspoređujemo u ovisnosti o vremenu i koncentraciji: uspoređuju se podaci uzorka (*F. novicida* uzgojene u *A. castellanii*) s kontrolom (*F. novicida*) iste koncentracije; međusobno se uspoređuju podaci uzoraka preostalih ispitivanih koncentracija nižih od koncentracije kontrole (*F. novicida*) i pripadajućeg uzorka iste koncentracije.

Kontrola za 5%-tni Asepsol eko u ispitivanju učinka na *F. novicida* uzgojenu u *A. castellanii* bili su rezultati dobiveni prethodnim ispitivanjem učinka 5%-tnog Asepsola eko na rast *F. novicida*. Kontrola za 1%-tni Descocid u ispitivanju učinka na *F. novicida* uzgojenu u *A. castellanii* jesu rezultati dobiveni prethodnim ispitivanjem učinka 1%-tne otopine Descocida na rast *F. novicida*. Kontrola za 1%-tni Bigvasan u ispitivanju učinka na *F. novicida* uzgojenu u *A. castellanii* jesu rezultati dobiveni prethodnim ispitivanjem učinka 1%-tne otopine Bigvasana na rast *F. novicida*.

<sup>2</sup>\*P < 0,05 i P < 0,001 prihvaćene su kao statistički značajna razlika.

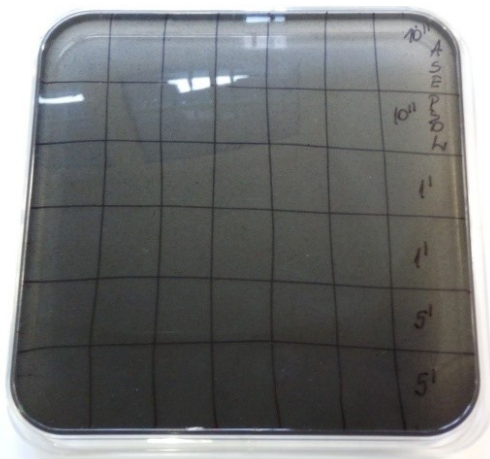
---

<sup>2</sup> \*na grafovima označava statistički značajnu razliku kontrole s uzorkom ( p < 0,05)

## 4. REZULTATI

### 4.1. Učinak različitih koncentracija otopine Asepsol eko na rast *F. novicida* nakon porasta u *A. castellanii*

Naši rezultati pokazuju izostanak bakterijskih kolonija *F. novicida* nakon uzgoja u amebi (MOI 10), izolacije i inokulacije u suspenzije s 1%-tnim, 2%-tnim i 5%-tnim Asepsolom eko tijekom svih ispitanih vremenskih perioda djelovanja (10 sekundi, 1 minuta, 5, 10 i 15 minuta) (Slika 13). Kontrola sa čistom kulturom *F. novicida* tretiranom 5%-tnim Asepsolom eko također nije bilježila nikakav porast bakterija na BCYE agaru (Slika 13). Statistički značajne razlike nema.



**Slika 13. Učinak različitih koncentracija otopine Asepsol eko na rast *F. novicida* nakon porasta u *A. castellanii*.** *F. novicida* nakon uzgoja u stanicama ameba je izolirana, inokulirana u suspenziju od 1%-tnog, 2%-tnog i 5%-tnog Asepsola eko i tako izložena djelovanju dezinficijensa tijekom perioda od 10 sekundi, 1 minute 5, 10 i 15 minuta. Kinetika rasta *F. novicida* nakon uzgoja u amebi određena je porastom na BCYE agaru. Kao kontrola, korištena je čista kultura *F. novicida* izložena 5%-tnom Asepsolu eko. Reprezentativna BCYE ploča ne pokazuje rast bakterija.



#### 4.2. Učinak različitih koncentracija otopine Descocida na rast *F. novicida* nakon porasta u *A. castellanii*

Nakon termostatiranja 24 sata pri 37 °C, na BCYE agaru naši rezultati pokazuju da je došlo do porasta bakterijskih kolonija *F. novicida* nakon uzgoja u amebi (MOI 10), izolacije i inokulacije u suspenzije s 0,2%-tnim i 0,5%-tnim Descocidom. Poslije 10 sekundi djelovanja 0,2%-tnog Descocida na suspenziju *F. novicida* poraslih u amebi s  $10^9$  CFU/mL, broj opada na prosječan broj bakterija od  $1,75 \cdot 10^6$  CFU/mL. Nakon 1 minute djelovanja nastavlja se smanjivati na  $2,05 \cdot 10^5$  CFU/mL. U produljenom vremenu djelovanja (5, 10 i 15 minuta) 0,2%-tnog Descocida na *F. novicida* nakon uzgoja u *A. castellanii*, nije došlo do porasta bakterija na BCYE agaru (Slika 14).

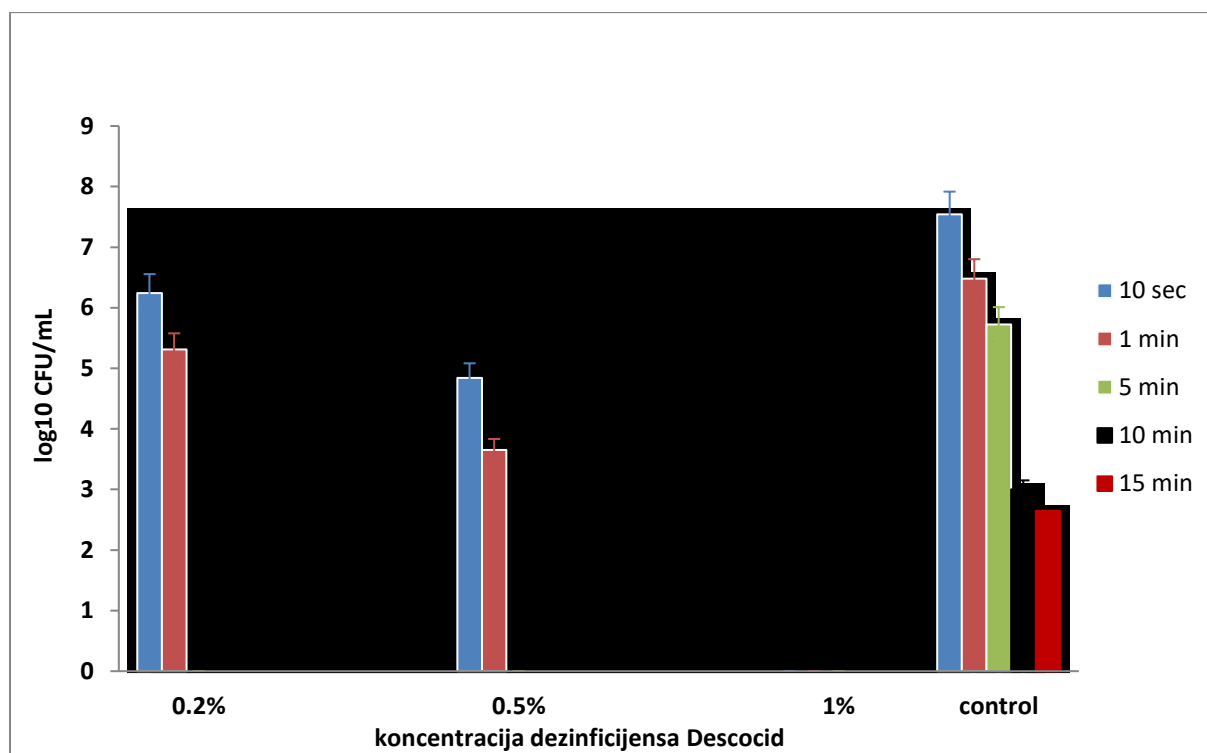
Za djelovanje 0,5%-tnog Descocida na suspenziju *F. novicida* poraslih u amebi s početnih  $10^9$  CFU/mL, nakon 10 sekundi, očitano smanjene broja na  $7 \cdot 10^4$  CFU/mL, a nakon 1 minute djelovanja broj se smanjuje na  $4,5 \cdot 10^3$  CFU/mL. U produljenom vremenu djelovanja (5, 10 i 15 minuta) 0,5%-tnog Descocida na *F. novicida* nakon uzgoja u *A. castellanii*, nije došlo do porasta bakterija na BCYE agaru (Slika 14).

Između u 0,2%-tnog i 0,5%-tnog Descocida u tretmanu inokulacije s *F. novicida* uzgojene u *A. castellanii* postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ) za rezultate očitane prilikom izlaganja periodima od 10 sekundi i 1 minute, dok kod produljenog vremena (5, 10 i 15 min) rasta kolonija, kod oboje, nema te statistički značajna razlika ne postoji (Slika 14).

Nakon inokulacije *F. novicida* uzgojenih u *A. castellanii* u suspenziju s 1%-tnim Descocidom na BCYE agaru ne bilježimo očitavanje porasta bakterijskih kolonija tijekom izlaganja svim vremenskim periodima (10 sec, 1 min, 5,10 i 15 min) (Slika 14).

U tretmanu s kontrolom – suspenzija *F. novicida* s  $10^9$  CFU/mL inokuliranom u otopinu 1%-tnog Descocida, rast kolonija *F. novicida* se očitava na BCYE agaru tijekom svih vremenskih perioda izlaganja (10 sec, 1 min, 5,10 i 15 min) gdje se nakon 10 sekundi broj

kolonija smanjio na  $3,5 \cdot 10^7$  CFU/mL, a nakon 15 minuta djelovanja iznosio je  $4,5 \cdot 10^2$  CFU/mL. Uspoređujući rezultate kontrole (*F. novicida* u tretmanu s 1%-tnim Descocidom) s rezultatima dobivenim u tretmanu otopine 1%-tnog Descocida na *F. novicida* uzgojene u *A. castellanii* gdje ne dolazi do rasta bakterijskih kolonija na BCYE agaru, prisutna je statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ) (Slika 14).



**Slika 14. Učinak različitih koncentracija otopine Descocida na rast *F. novicida* nakon porasta u *A. castellanii*.** *F. novicida* nakon uzgoja u stanicama ameba je izolirana, inokulirana u suspenziju od 0,2%-tnog, 0,5%-tnog i 1%-tnog Descocida i tako izložena djelovanju dezinficijensa tijekom perioda od 10 sekundi, 1 minute 5, 10 i 15 minuta. Kinetika rasta *F. novicida* nakon uzgoja u amebi određena je porastom na BCYE agaru. Kao kontrola, korištena je čista kultura *F. novicida* izložena 1%-tnom Descocidu. Zvezdice ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) između kontrole (*F. novicida* u tretmanu s 1%-tnim Descocidom) i rezultata dobivenih nakon tretiranja *F. novicida* uzgojene u amebi s 1%-tnim Descocidom.

### 4.3. Učinak različitih koncentracija otopine Bigvasana na rast *F. novicida* nakon porasta u *A. castellanii*

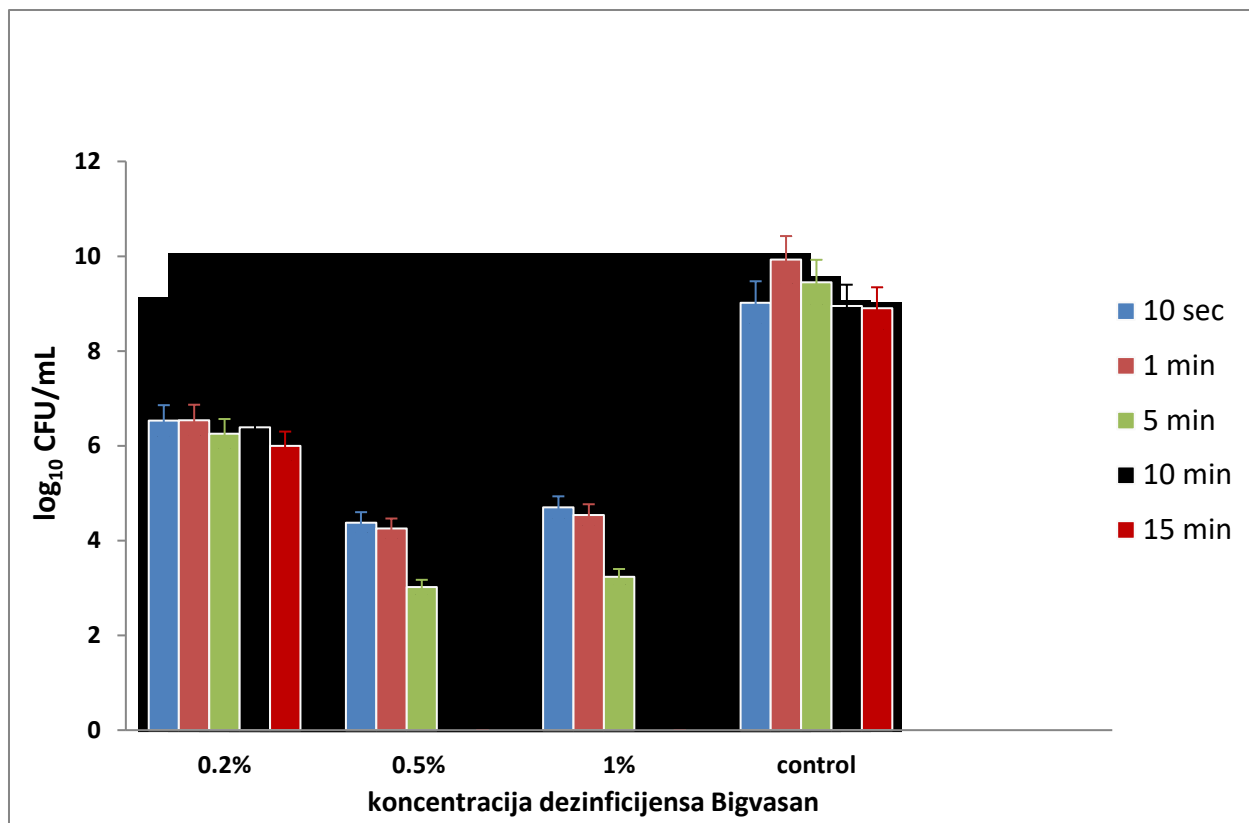
Nakon termostatiranja 24 sata pri 37 °C, na BCYE agaru naši rezultati pokazuju da je došlo do porasta bakterijskih kolonija *F. novicida* nakon uzgoja u amebi (MOI 10), izolacije i inokulacije u suspenzije s 0,2%-tnim, 0,5%-tnim i 1%-tnim Bigvasanom (Slika 15). Poslije 10 sekundi tretmana s 0,2%-tnim Bigvasanom nakon inokulacije *F. novicida* uzgojene u amebi s  $10^9$  CFU/mL u suspenziju dezinficijensa, broj kolonija se smanjuje na prosječan broj bakterija od  $3,65 \cdot 10^6$  CFU/mL no, tijekom daljnjeg izlaganja (1 min, 5, 10 i 15 min) broj bakterija blago oscilira u smanjenu, ali je još uvijek  $10^6$  CFU/mL (Slika 15).

Nakon 10 sekundi tretmana s 0,5%-tnim i 1%-tnim Bigvasanom, nakon što smo inokulirali pripremljenu bakterijsku suspenziju *F. novicida* uzgojene u amebi s  $10^9$  CFU/mL u suspenziju s dezinficijensom, početni broj *F. novicida* uzgojenih u amebi ( $10^9$  CFU/mL) naglo se smanjuje na  $10^4$  CFU/mL, za obje koncentracije otopine Bigvasana. Poslije 5 minuta djelovanja, za obje koncentracije, broj bakterija smanjuje se na  $10^3$  CFU/mL, a u produljenom vremenu djelovanja (10 i 15 minuta) na BCYE agaru ne očitavamo rast bakterijskih kolonija *F. novicida* uzgojenih u *A. castellanii* (Slika 15).

Između u 0,5%-tnog i 1%-tnog Bigvasana u tretmanu inokulacije s *F. novicida* uzgojene u *A. castellanii* postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) za rezultate očitane prilikom izlaganja periodima od 10 i 15 minuta, dok kod produljenog vremena (5, 10 i 15 min) rast kolonija na BCYE ne očitavamo, kod obje koncentracije, te nema statistički značajna razlike (Slika 15).

U tretmanu s kontrolom – suspenzija *F. novicida* s  $10^9$  CFU/mL inokuliranom u otopinu 1%-tnog Bigvasana, rast kolonija *F. novicida* se očitava na BCYE agaru tijekom svih vremenskih perioda izlaganja (10 sec, 1 min, 5, 10 i 15 min) gdje je broj kolonija nakon 10

sekundi tretmana visokih  $10^9$  CFU/mL, a u produljenom vremenu do 15 minuta taj broj blago oscilira ali se zadržava u visokoj koncentraciji. Uspoređujući rezultate kontrole (*F. novicida* u tretmanu s 1%-tnim Bigvasanom) s rezultatima dobivenim u tretmanu otopine 1%-tnog Bigvasana na *F. novicida* uzgojene u *A. castellanii*, postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) za svih pet ispitanih vremenskih parametara (10 sec, 1 min, 5, 10 i 15 min). U tretmanu otopine 1%-tnog Bigvasana na *F. novicida* uzgojene u *A. castellanii* i inokulirane u otopinu dezinficijensa, poslije 10 sekundi izlaganja početnog broj bakterija ( $10^9$  CFU/mL) se smanjuje na  $10^4$  CFU/mL, dok u produljenom vrmenu djelovanja (10 i 15 minuta) rast bakterija na BCYE agaru se ne očitava (Slika 15).



**Slika 15. Učinak različitih koncentracija otopine Bigvasana na rast *F. novicida* nakon porasta u *A. castellanii*.** *F. novicida* nakon uzgoja u stanicama ameba je izolirana, inokulirana u suspenziju od 0,2%-tnog, 0,5%-tnog i 1%-tnog Bigvasana i tako izložena djelovanju dezinficijensa tijekom perioda od 10 sekundi, 1 minute 5, 10 i 15 minuta. Kinetika rasta *F. novicida* nakon uzgoja u amebi određena je porastom na BCYE agaru. Kao kontrola, korištena je čista kultura *F. novicida* izložena 1%-tnom Bigvasanu. Zvezdice ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) između kontrole (*F. novicida* u tretmanu s 1%-tni Bigvasanom) i rezultata dobivenih nakon tretiranja *F. novicida* uzgojene u amebi s 1%-tnim Bigvasanom.

## 5. RASPRAVA

Sposobnost preživljavanja i razmnožavanja u vodenom okolišu i mogućnost rasta u slobodno-živućim amebama poput *A. castellanii* [42,43], razvilo je pretpostavke da su protozoe potencijalni rezervoar bakterije u vodenom ekosustavu [43]. *F. novicida* se, uz *F. philomiragia* i *F. hispaniensis*, povezuje s vodenim okolišem [40], gdje stvara biofilm radi veće sposobnosti preživljavanja i razmnožavanja *F. novicida* u vodenim staništima [86-88].

U *A. castellanii*, unutarstaničnim razmnožavanjem, *Francisella* ne izlazi iz vakuole domaćina kao kod inficiranja stanica sisavaca, već se razmnožava unutar hranidbene vakuole (fagosoma) amebe [61,67] što bi bakteriji trebalo povećati otpornost na vanjske utjecaje zbog preuzimanja dijela amebnih gena za rezistenciju zbog kojih one dobro opstaju u raznim uvjetima. Primjerice, klor dioksid, se pokazao najefektivnijim u studiji kontrole *Legionella pneumophila* u vodenim sustavima no, kada se primjenio na amebe, one su potpuno preživjele djelovanje te na taj način legionelama služe kao rezervoari, omogućujući im brzu rekolonizaciju jer, braneći sebe od djelovanja klor dioksida, ujedno i štite legionelu [151].

Ovakve informacije trebale bi poduprijeti i tezu da će, kada *Francisella* inficira amebe, nakon unutarstaničnog ciklusa, kao i slična *L. pneumophila* imati veću otpornost na vanjske činitelje, jednom kada napusti amebu.

U našem istraživanju hipoteza je bila da će nakon infekcije i rasta u *A. castellanii*, *F. novicida* biti rezistentnija na djelovanje aktivnih tvari iz dezinficijensa. Rezultati koje smo dobili pobijaju tu hipotezu. Iznenadujuće, ali djelovanjem Asepsola eko, Descocida i Bigvasana na *F. novicida* nakon porasta u *A. castellanii*, bakterija je bila još više osjetljivija nego u prijašnjoj studiji s čistom kulturom *F. novicida* [152].

Djelovanje svo troje dezinficijensa ispitivano je u istim uvjetima, unutar BSL-2 komore, te se najučinkovitijim pokazao Asepsol eko. U svim koncentracijama koje su rađene (1%, 2%,

5%), imao je potpuno baktericidan učinak na *F. novicida* poraslu u amebi, za sve vremenske intervale izlaganja tijekom pokusa (10 sekundi, 1 minuta, 5, 10 i 15 minuta). Kontrola je bila čista kultura *F. novicida* tretirana s 5%-tnim Asepsolom eko, gdje je učinak također baktericidan i rast bakterijskih kolonija nije očit. Između kontrole i uzorka ne postoji statistički značajna razlika – potvrđen je baktericidan učinak u oba slučaja.

Glavna aktivna komponenta Asepsola eko jesu kvaterne amonijeve soli – didecildimetilamonijev klorid i benzalkonijev klorid.

Rezultati nastali djelovanjem Descocida, koji u svom sastavu ima također kvaterne amonijeve soli, pri koncentracijama od 0,2% i 0,5% djelovao je bakteriostatski mnogo efikasnije nego što je to bio sposoban Bigvasan u koncentracijama od 0,2%, 0,5% i 1%, gdje se je broj početnih bakterija ( $10^9$  CFU/mL) reducirao na još uvijek visokih  $10^6$  CFU/mL za 0,2%-tni, tj. na  $10^4$  CFU/mL za 0,5%-tni i 1%-tni Bigvasan. Rast bakterija na BCYE ploči kod svih je koncentracija bio očit u svim vremenskim intervalima izlaganja, te se je moglo uočiti bakteriostatsko djelovanje koje bi se, pretpostavljamo, produciralo i u duljem vremenu izlaganja od 15 minuta, s ne značajnijim smanjenjem broja kolonija. S Descocidom to nije slučaj. Prema *F. novicida* porasloj u *A. castellanii* on je sve više djelotvorniji kao bakteriostatik, ovisno kako raste koncentracija i vrijeme izloženosti, djelovanje prelazi i u biocidno. Nakon izlaganja 1%-tnom Descocidu, nema očitavanja rasta kolonija *F. novicida* poraslih u amebama. Ovdje postoji statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu (*F. novicida*) pri djelovanju Descocida iste koncentracije, jer je zabilježen rast kolonija, ali s opadanjem s vremenom – bakteriostatski učinak.

Zašto su naši rezultati suprotni postavljenoj hipotezi da će *F. novicida* biti osjetljivija održi li svoj unutarstanični životni ciklus u *A. castellanii* prije tretiranja s dezinficijensima, trebalo bi još biti istraženim na staničnoj i molekularnoj razini interakcije aktivnih komponenti

ovih dezinficijensa – kvaterne amonijeve soli i PHMB – sa komponentama stanice *F. novicida*. Ono što se može uzeti u obzir kao razlog ovakvog ponašanja, ležao bi u samoj interakciji i vrsti molekula koje dolaze u interakciju. Stijenka *Francisella* ima više od 50% lipidnog udijela, dok se citoplazmatska membrana *Acanthamoeba* sastoji se od oko 25% fosfolipida [120]. Molekule kvaternih amonijevih soli koje su se nalazile u ispitivanim dezinficijensima imaju duge alkilne lance koji su nepolarnog karaktera. U stijenci i membrani *F. novicida* nalaze se lipidi i fosfolipidi koji kao nepolarne molekule u dezinfekcijskom mediju reagiraju sa aktivnim supstancama dezinficijensa te, prema pravilu „slično se otapa u sličnome“, zbog čega dolazi do mogućnosti oštećenja vanjskih membrana i prodiranja tvari u citosol i jezgru stanice – razaraju bakteriju.

Prema strukturi, dugolančane kvaterne amonijeve soli i bigvanid mogu se ubrojiti u površinski aktivne tvari (surfaktante) za koje je karakteristično da u strukturi sadrže polarni hidrofilni dio i nepolarni, hidrofobni, odnosno lipofilni dio (dugi alkilni lanci) što im omogućava slaganje u dvosloje ili micelle. Tim strukturama slaganja, kao i samim strukturama molekula, nalikuju i stanične membrane, zbog fosfolipidnog dvosloja. Tu dolazi do interakcija spojeva s membranskim dijelovima stanica. Elektrostatskom interakcijom između negativno nabijenih fosfatnih skupina i pozitivno nabijenih amonijevih iona te lipofilne interakcije između alkilnih lanaca fosfolipida i surfaktanata došlazi do razaranja stanične membrane *F. novicida*.

Što se na molekularnoj razini točno dogodilo, između organskih molekula u staničnoj strukturi bakterije i molekula aktivnih tvari iz dezinficijensa, da je *F. novicida* nakon porasta u amebi bila još osjetljivijom trebalo bi još istražiti, kao i sa čistom kulturom *F. novicida* kada interreagira s ovim supstancama.



## 6. ZAKLJUČAK

Kompletan unutarstanični život bakterija iz roda *Francisella* vrlo je kompleksan, s brojnim mehanizmima i činiteljima virulencije koji su još nedovoljno istraženi, ali koji francizele čine interesantnima za proučavanje. Također i opasnim, multifunkcionalnim, patogenom koji može biti korišten kao efikasno biološko oružje za transmisiju aerosolom, za koje trenutačno ne bi postojao efektivan lijek. Iz tog su razloga francizele uvijek aktualnim javnozdravstvenim pitanjem, a osobito zbog sve češćeg potvrđivanja kako uz pomoć okolišnog rezervoara – ameba, *F. novicida*, može biti očuvana u vodenom okolišu i ondje stvarati biofilmove.

Naši rezultati pokazali su kako *F. novicida* nakon uzgoja u *A. castellanii* ima još veću osjetljivost na dezinficijense s aktivnim supstancama – kvaternim amonijevim solima i bigvanidima. Asepsol eko još se jednom pokazao potpuno biocidnim sredstvom za *F. novicida*, pa i nakon kultivacije u amebi. Čak i u koncentraciji četiri puta manjoj od preporučene, učinak je bio isti, dok su Descocid i Bigvasan djelovali bakteriostatski na rast *F. novicida* nakon porasta u *A. castellanii*, s jačinom učinka ovisnim o koncentraciji i vremenu izloženosti, gdje Descocid ima bolje rezultate.

## 7. LITERATURA

- [1] **McCoy, G.W. & Chapin, C.W.** (1912). *Further observations plague-like disease of rodents with a preliminary note on the causative agent, Bacterium tularensis*. J Infect Dis **10**, 61-72.
- [2] **Chapin, C.W.** (1920). *Review of our knowledge of Bacterium tularensis*. The American Journal of Public Health. 1920; 529-532.
- [3] **Francis, E.** (1927). *Microscopic changes of tularemia in the tick Dermacentor andersoni and the bedbug Cimex lectularius*. Public Health Rep **42**, 2763-2772.
- [4] **Dorefe'ev, K.A.** (1947). *Classification of the causative agent of tularemia*. Symp Res Works Inst Epidemiol Mikrobiol Chita **1**, 170-180.
- [5] **Hopla, C.E.** (1974). *The ecology of tularemia*. Adv. Vet. Sci. Comp. Med **27**:1601- 1608.
- [6] **Karakašević, B.** *Mikrobiologija i parazitologija*. Medicinska knjiga. 4. Izdanje, Beograd – Zagreb.
- [7] **Foshay, L.** (1950). *Tularemia*. Annu Rev Microbiol **4**, 131-330.
- [8] **Morner, T., Addison, E.** (2001). *Tularemia*. In: *infectious disease of wild animals*. E. S. Williams & I. K. Barker 2001;303-312.
- [9] **Clarridge, J.E., T. J. Raich, A. Sjostedt, et al.** (1996). *Characterization of two unusual clinically significant Francisella strains*. J. Clin. Microbiol. **34**:1995-2000.
- [11] **Pechous, R.D., McCarthy, T.R., and Zahrt, T.C.** (2009). *Working toward the future: insights into Francisella tularensis pathogenesis and vaccine development*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **73**, 684–711.

- [12] **Barry, E.M., Cole, L.E., and Santiago, A.E.** (2009). *Vaccines against tularemia*. *Hum. Vaccin.* 5, 832–838.
- [13] **Oyston, P.C., Sjostedt, A., and Titball, R.W.** (2004) *Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in Francisella tularensis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 967–978.
- [14] **Dennis, D.T., Inglesby, T.V., Henderson, D.A., et al** (2001). *Tularemia as a biological weapon: medical and public health management*. *JAMA* 285, 2763–2773.
- [15] **Larson, C.L., Wicht, W., Jellison, W.L.** (1955). *A new organism resembling P. tularensis isolated from water*. *Public Health Rep.* 70(3):253-8.
- [16] **Petersen, J.M., Carlson, J., Yockey, B., et al** (2009). *Direct isolation of Francisella spp. from environmental samples*. *Lett Appl Microbiol.* 48(6):663-7.
- [17] **Whitehouse, C.A., Kesterson, K.E., Duncan, D.D., et al** (2012). *Identification and characterization of Francisella species from natural warm springs in Utah, USA*. *Lett Appl Microbiol.* 54(4):313-24.
- [18] **Owen, C.R., Buker, E.O., Jellison, W.L., et al** (1964). *Comparative studies of Francisella tularensis and Francisella novicida*. *Journal of Bacteriology.* **87** (3): 676–683.
- [19] **Rohmer, L., Fong, C., Abmayr, S., et al.** (2007). *Comparison of Francisella tularensis genomes reveals evolutionary events associated with the emergence of human pathogenic strains*. *Genome Biol.* 8(6):R102.
- [20] **Gallagher, L.A., McKevitt, M., Ramage, E.R., Manoil, C.** (2008). *Genetic dissection of the Francisella novicida restriction barrier*. *J Bacteriol.* 190(23):7830-7.

- [21] **Ozanic M, Gobin I, Brezovec M, Marecic V, Trobonjaca Z, Abu Kwaik Y, Santic M** (2016) *F. novicida*-Infected *A. castellanii* Does Not Enhance Bacterial Virulence in Mice. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6:56.
- [22] **Eigelsbach, H.T., McGann, V.G.** (1984). *Genus Francisella*. Doroféev 1947, 176AL. U: Krieg, N.R., and Holt, J.G. (eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 394–399.
- [23] **Penn, R.L.** (2005). *Francisella tularensis (tularemia)*. U: Mandell, G., Bennett, J., Dolan, R. (eds.), **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**, 6. Izdanje. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, pp. 2674–2685.
- [24] **Whipp, M.J., Davis, J.M., Lum, G., et al** (2003). *Characterization of a novicida like subspecies of Francisella tularensis isolated in Australia*. *J of Med Microbiol.* 52: 839-842.
- [25] **Farlow, J., Wagner, D.M., Dukerich, M., et al** (2005). *Francisella tularensis in the United States*. *Emerg Inf Diseases* (2005),11.
- [26] **Gurycova, D.** (1998). *First isolation of Francisella tularensis in Europe*. *Eur. J. Epidemiol.* 14: 797-802.
- [27] **Jellison, W.L.** (1974). *Tularemia in North America, 1930-1974*. Missoula (MT): University of Montana (1974).
- [28] **Hayes, E., Marshall, S., Dennis, D., Feldman, K.** (2002). *Tularemia-United States, 1990-2000*. *MMWR MorbMortal Wkly Rep* 2002; 51:181-184.
- [29] **Dienst, J., F. T.** (1963). *Tularemia – a perusal of three hundred thirty nine cases*. *J. La. State Med. Soc.* 115: 114-127.

- [30] **Evans, M. E., D. W. Gregory, W. Schaffner & Z. A. McGee.** 1985. Tularemia: a 30 year experience with 88 cases. *Medicine (Baltimore)* **64**; 251-269.
- [31] **Larson, C.L.** (1970). *Tularemia*. U: Tice, F., Sanford, J.P. (eds), **Tice's Practice of Medicine**. Vol. 3. Harper & Row Publishers, Inc., Hagerstown, MD, pp. 663–676.
- [32] **Hornick, R.** (2001). *Tularemia revisited*. *N. Engl. J. Med.* 345:1637–1639.
- [33] **Lundstrom, J.O., Andersson, A.C., Backman, S., et al** (2011). *Transstadial Transmission of Francisella tularensis holartica in Mosquitoes, Sweden*. *Emerg infect Dis.* 17; 2011.
- [34] **Thelaus, J., Andersson, A., Broman, T., et al** (2014). *Francisella tularensis subsp. holartica Occurrs in Swedish Mosquitoes, Persist Throuhg the developmental Stages of Laboratory-Infected Mosquitoes and Is Transmissible During Blood Feeding*. *Microb Ecol* (2014) 67; 96-107.
- [35] **S. Cavalli-Bjorkman Hellstorm** (2013). *Francisella tularensis subsp. holartica: The Curious Case of a Water – and Mosquito Associated Bacterium in Sweden*. SLU.
- [36] **Ulu Kilic, A., Kilic, S., Sencan, I., et al** (2011). *A water- bone tularemia outbreak caused by Francisella tularensis subsp. holartica in Central Anatolia region*. *Mikrobiyol Bul.* 2011.
- [37] **Olsufjev, N.G., Mescheryakova, I.S.** (1983). *Subspecific taxonomy of Francisella tularensis*. *Int J Syst Bacteriol.* 33: 872-874.
- [38] **Clarridge, J. E., III, T. J. Raich, A. Sjostedt, et al** (1996). *Characterization of two unusual clinically significant Francisella strains*. *J. Clin. Microbiol.* 34:1995-2000.

- [39] **Hollis, D. G., Weaver, R. E., Steigerwalt, A. G., et al.** *Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup *novicida* (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. *J. Clin. Microbiol.* 27:1601-1608.
- [40] **CFSPH. Iowa State University.** Tularemia. 2009.
- [41] **Franz, D.R., Jahrling, P.B., Friedlander, A.M., et al** (1997). *Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents.* *J.A.M.A.* 278:399–411.
- [42] **Ellis, J., Oyston, P.C., Green, M., Titball, R.W.** (2002). *Tularemia.* *Clin. Microbiol. Rev.* 15:631–646.
- [43] **Abd, H., Johansson, T., Golovliov, I., et al** (2003). *Survival and growth of Francisella tularensis in Acanthamoeba castellanii.* *Appl. Environ. Microbiol.* 69:600–606.
- [44] **Harris, C.E.** (1926). *Tularemia.* *Colo. Med.* 23:328–334.
- [45] **Dennis, D.T., Inglesby, T.V., Henderson, D.A., et al** (2001). *Tularemia as a biological weapon: medical and public health management.* *J.A.M.A.* 285:2763–2773.
- [46] **Saslaw, S., Eigelsbach, H.T., Wilson, H.E., et al** (1961). *Tularemia vaccine study. I. Intracutaneous challenge.* *Arch. Intern. Med.* 107:689–701.
- [47] **Saslaw, S., Eigelsbach, H.T., Prior, J.A., et al** (1961). *Tularemia vaccine study. II. Respiratory challenge.* *Arch. Intern. Med.* 107:702–714.
- [48] **Sandstrom, G., Lofgren, S., Tarnvik, A.** (1988). *A capsule-deficient mutant of Francisella tularensis LVS exhibits enhanced sensitivity to killing by serum but diminished sensitivity to killing by polymorphonuclear leukocytes.* *Infect. Immun.* 56:1194–1202.

- [49] **Melillo, A., Sledjeski, D.D., Lipski, S., et al** (2006). *Identification of a Francisella tularensis LVS outer membrane protein that confers adherence to A549 human lung cells.* FEMS Microbiol. Lett. 263; 102–108.
- [50] **Horzempa, J., O’Dee, D.M., Shanks, R. M., Nau, G.J.** (2010). *Francisella tularensis  $\Delta$ pyrF mutants show that replication in nonmacrophages is sufficient for pathogenesis in vivo.* Infect. Immun. 78; 2607–2619.
- [51] **Ben Nasr, A., Haithcoat, J., Masterson, J. E., et al** (2006). *Critical role for serum opsonins and complement receptors CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in phagocytosis of Francisella Antioxidant Enzymes Modulate Macrophage Function Francisella tularensis by human dendritic cells (DC): uptake of Francisella leads to activation of immature DC and intracellular survival of the bacteria.* J. Leukocyte Biol. 80; 774–786.
- [52] **Schwartz, J.T., Barker, J.H., Long, M.E., et al** (2012). *Natural IgM mediates complement-dependent uptake of Francisella tularensis by human neutrophils via complement receptors 1 and 3 in nonimmune serum.* J. Immunol. 189; 3064–3077.
- [53] **Sjöstedt, A.** (2006). *Intracellular survival mechanisms of Francisella tularensis, a stealth pathogen.* Microbes Infect. 8; 561–567.
- [54] **Geier, H., Celli, J.** (2011). *Phagocytic receptors dictate phagosomal escape and intracellular proliferation of Francisella tularensis.* Infect. Immun. 79: 2204–2214.
- [55] **Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G., Griffiths, G.** (1994). *Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus.* J. Cell Biol. 124; 677–688.

- [56] **Patki, V., Virbasius, J., Lane, W. S., et al** (1997). *Identification of an early endosomal protein regulated by phosphatidylinositol 3-kinase*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94; 7326–7330.
- [57] **Simonsen, A., Lippé, R., Christoforidis, S., et al** (1998). *EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion*. Nature 394; 494–498.
- [58] **Clemens, D. L., Lee, B. Y., Horwitz, M. A.** (2004). *Virulent and avirulent strains of Francisella tularensis prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages*. Infect. Immun. 72; 3204–3217.
- [59] **Golovliov, I., Baranov, V., Krocova, Z., Kovarova, H., Sjöstedt, A.** (2003). *An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium Francisella tularensis can escape the phagosome of monocytic cells*. Infect. Immun. 71; 5940–5950.
- [60] **Checroun, C., Wehrly, T. D., Fischer, E. R., et al** (2006). *Autophagy-mediated reentry of Francisella tularensis into the endocytic compartment after cytoplasmic replication*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103; 14578–14583.
- [61] **Santic, M., Ozanic, M., Semic, V., Pavokovic, G., Mrvacic, V., Kwaik, Y.A.** (2011). *Intra-vacuolar proliferation of F. novicida within H. vermiformis*. Front Microbiol. 2:78.
- [62] **Case, E. D., Chong, A., Wehrly, T. D., et al** (2014). *The Francisella O-antigen mediates survival in the macrophage cytosol via autophagy avoidance*. Cell. Microbiol. 16; 862–877.
- [63] **Shaun, S., Brunton, J., Ziehr, B., Taft-Benz, S., Moorman, N., Kawula, T.F.** (2013). *Tularensis Harvest Nutrients Derived via ATG5-Independent Autophagy to Support Intracellular Growth*. PLOS. Pathogens. (2013) 9; 8.



- [64] **Deretic, V., Levine, B.** (2009). *Autophagy, immunity and microbial adaptations*. Cell Host Microbe 5(6): 527-549.
- [65] **Meijer, A.J., Codogno, P.** (2011). *Autophagy: Regulation by energy sensing*. Curr Biol 21(6): R227-229.
- [66] **Chong, A., Celli, J.** The *Francisella* intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. *Frontiers in Microbiol.* 2010. (1) 138.
- [67] **Petra C.F. Oyston, Anders Sjöstedt, Richard W. Titball** (2004). *Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in Francisella tularensis*. Nature Reviews Microbiology. 2; 967-978.
- [68] **Šantić, M., Molmeret, M., Abu Kwaik, J.** (2005). *Modulation of biogenesis of the Francisella tularensis subsp. novicida-containing phagosome in quiescent human macrophages and its maturation into a phagolysosome upon activation by IFN-gamma*. Cell Microbiol. 7(7); 957-967.
- [69] **Baron, G.S., Francis, E.N.** (1998). *MglA and MglB are required for the intramacrophage growth of Francisella novicida*. Mol Microbiol. 29(1); 247-259.
- [70] **Lauriano, C.M., Barker, J.R., Francis, E.N., et al** (2004). *MglA regulates transcription of virulence factors necessary for Francisella tularensis intraamoebae and intramacrophage survival*. PNAS. 111(12); 4246-4249.
- [71] **Maggio, S., Takeda, K., Stark, F., et al** (2015). *Control of Francisella tularensis intracellular growth by pulmonary epithelial cells*. PLOS ONE (2015).
- [72] **Okan, N.A., Kasper, D.L.** (2013). *The atypical lipopolysaccharide of Francisella*. Carbohydr Res. (2013) 378; 79–83.

- [73] **Gunna, S.J., Ernst, K.R.** (2007). *The Structure and Function of Francisella Lipopolysaccharide*. Ann N Y Acad Sci. (2007) 1105; 202–218.
- [74] **Šantić, M., Molmeret, M., Barker, J. R., Klose, K. E., Dekanić, A., Dorić, M., Abu Kwaik, Y.** (2007). *A Francisella tularensis pathogenicity island protein essential for bacterial proliferation within the host cell cytosol*. Cell Microbiol. 9; 2391-2403.
- [75] **Gray, C.G., Cowley, S.C., Cheung, K. K. M., Nano, F. E.** (2002) . *The identification of five genetic loci of Francisella novicida associated with intracellular growth*. FEMS Microbiol Lett. 215; 53-56.
- [76] **Ojeda, S.S., Mares, C.A., Alvarez, J.I., et al** (2011). *Virulence factors involved in passage of Francisella tularensis subsp. novicida through an air blood barrier model*. Bioterr Biodef. (2011); S3.
- [77] **Bröms, J.E., Meyer, L., Sun, K., Lavander, M., Sjöstedt, A.,** (2012). *Unique substrates secreted by the type VI secretion system of Francisella tularensis during intramacrophage infection*. PLoS One. 7(11); e50473.
- [78] **de Bruin, O.M., Ludu, J.S., Nano, F.E.** (2008). *The Francisella pathogenicity island protein IglA localizes to the bacterial cytoplasm and is needed for intracellular growth*. BMC Microbiol. 7;1.
- [79] **Bingle, L.E., Bailey, C.M., Pallen, M.J.** (2008). *Type VI secretion: a beginner's guide*. Curr Opin Microbiol. 11(1); 3–8.
- [80] **Lindgren, H., Golovliov, I., Baranov, V., Ernst, R.K., Telepnev, M., et al** (2004). *Factors affecting the escape of Francisella tularensis from the phagolysosome*. J Med Microbiol. 53(10); 953–958.

- [81] **Lauriano, C. M., et al** (2004). *MglA regulates transcription of virulence factors necessary for Francisella tularensis intraamoebae and intramacrophage survival*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101; 4246–4249.
- [82] **Santic, M., et al.** (2005). *The Francisella tularensis pathogenicity island protein IglC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm*. Cell. Microbiol. 7; 969–979.
- [83] **Huq A., Whitehouse C. A., Grim C. J., et al** (2008). *Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission*. Curr Opin Biotechnol. 19; 244-247.
- [84] **Van Hoek, M.L.** (2013). *Biofilms - an advancement in our understanding of Francisella species*. Virulence. 4(8); 833-846.
- [85] **Lau G. W., Hasset D.J., Britigan B. E.** (2005). *Modulation of lung epithelial functions by Pseudomonas aeruginosa*. Trends Microbiol. 13; 389-397.
- [86] **Durham-Colleran M.W., Verhoeven A.B., van Hoek M.L.** (2010). *Francisella novicida forms in vitro biofilms mediated by an orphan response regulator*. Microb Ecol. 59; 457–465.
- [87] **Margolis, J.J., El-Etr, S., Joubert, L.M., et al** (2010). *Contributions of Francisella tularensis subsp. novicida chitinases and Sec secretion system to biofilm formation on chitin*. Appl Environ Microbiol. 76; 596–608.
- [88] **Verhoeven, A.B., Durham-Colleran, M.W., Pierson, T., Boswell, W.T., Hoek, M.L.** (2010). *Francisella philomiragia biofilm formation and interaction with the aquatic protist Acanthamoeba castellanii*. Biol Bull. 219; 178–188.

- [89] **Mihaljević, F., Fališevac, J., Bezjak, B., Mravunac, B.** (1994). *Specijalna klinička infektologija*. Medicinska naklada, Zagreb. 8. izdanje.
- [90] **Sviben, M., Horvat-Krejči, D., Mlinarić Missoni, E.** (2007). *Infekcije uzorkovane slobodnoživućim amebama – etiologija, kliničke osobitosti, dijagnostika, terapija i prevencija*. Medicina. 2007;43; 27-33.
- [91] **Brett, M., Doppalapudi, A., Respicio-Kingry, L.B., et al** (2012). Francisella novicida bacteremia after a near-drowning accident. J Clin Microbiol. 50(8); 2826-9.
- [92] **Leelaporn, A., Yongyod, S., et al** (2008). Francisella novicida bacteremia, Thailand. Emerg Infect Dis. 14(12); 1935-7.
- [93] **Respicio-Kingry, L. B., Yockey, M., Yendell, B., et al** (2012). Laboratory analysis of a Francisella novicida outbreak among prisoners at a Louisiana correctional facility. 7th International Conference on Tularemia, 2011. (Breckenridge, Colorado).
- [94] **Fong, W.I., Alibek, K.** (2009). U: *Bioterrorism and Infectious Agents: A New Dilemma or the 21st Century*; **Hodges, L., Penn, L.R.:** *Tularemia and Bioterrorism*. 3. poglavlje; 71-95.
- [95] **Cunningham, A.L, Guentzel, M.N., et al** ( 2015). *Vaccination with the Live Attenuated Francisella novicida mutant FTN0109 protects against pulmonary tularemia*. World Jun of Vaccines. 5; 25-36.
- [96] **Chu, P., Cunningham, A.L., et al** (2014). *Live Attenuated Francisella novicida vaccine protects against Francisella tularensis pulmonary challenge in rats and non- human primates*. PLOS Pathogens. 10(10).

- [97] **Gilbert, S.E., Rose, L.J.** (2012). *Survival and Persistence of Non-spore Forming Biothreat Agents in Water*. *Letters in Applied Microbiology*. 55;3:189.
- [98] **Parker, R.R., Steinhaus, E.A., Kohls, G.M., Jellison, W.L.** (1951). *Contamination of Natural Waters and Mud With *Pasturella tularensis* and Tularemia in Beavers and Muskrats in the Northwestern United States*. National Institutes of Health Bulletin, No. 193. US Government Printing Office, Washington.
- [99] **Verhoeven, A.B., Durham-Colleran, et al** (2010). *Francisella philomiragia Biofilm Formation and Interaction With the Aquatic Protist *Acanthamoeba castellanii**. *Biological Bulletin*. 219; 2:178.
- [100] **Mahajan, U.V., Gravgaard, J., Turnbull, M., et al** (2011). *Larval Exposure to *Francisella tularensis* LVS Affects Fitness of the Mosquito *Culex quinquefasciatus**. *FEMS Microbiology Ecology*. 78; 3:520.
- [101] **Margolis, J.J., El-Etr, S., Joubert, L.M., et al** (2010). *Contributions of *Francisella tularensis* subsp. *novicida* chitinases and Sec Secretion System to Biofilm Formation on Chitin*. *Applied and Environmental Microbiology*. 76; 2:596.
- [102] **Rodriguez-Zaragoza, S.** (1994). *Ecology of free-living amoebae*. *Crit Rev Microbiol*. 20; 225–241.
- [103] **Khan, N.A.** (2006). *Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health*. *FEMS Microbiol Rev* 30; 564–595.
- [104] **Pedersen, K.** (1982). *Factors regulating microbial biofilm development in a system with slowly flowing seawater*. *Appl Environ Microb*. 44; 1196–1204.

- [105] **Greub, G., Raoult, D.** (2004). *Microorganisms resistant to freeliving amoebae*. Clin Microbiol Rev. 17; 413–433.
- [106] **Bowers, B., and Korn, E. D.** (1968). *The fine structure of Acanthamoeba castellanii. I. The trophozoite*. J Cell Biol. 39; 95-111.
- [107] **Preston, T.M., King, C.A.** (1984). *Amoeboid locomotion of Acanthamoeba castellanii with special reference to cell-substratum interactions*. J Gen Microbiol. 130; 2317-2323.
- [108] **Bowers, B.** (1977). *Comparison of pinocytosis and phagocytosis in Acanthamoeba castellanii*. Exp Cell Res. 110; 409-417.
- [109] **Bowers, B., Olszewski, T.E.** (1983). *Acanthamoeba discriminates internally between digestible and indigestible particles*. J Cell Biol. 97; 317-322.
- [110] **King, C.H., Shotts, E.B. Jr, Wooley, R.E., Porter, K.G.** (1988). *Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination*. Appl Environ Microb. 54; 3023-3033.
- [111] **Kilvington, S.** (1998). *Reducing the risk of microbial keratitis in soft contact lens wearers*. Optician. 217; 28–31.
- [112] **Barker, J., Brown, M.R., Collier, P.J., Farrell, I., Gilbert, P.** (1992). *Relationship between Legionella pneumophila and Acanthamoeba polyphaga: physiological status and susceptibility to chemical inactivation*. Appl Environ Microb. 58; 2420–2425.
- [113] **Brown, T.J., Cursons, R.T.** (1977). *Pathogenic free-living amebae (PFLA) from frozen swimming areas in Oslo, Norway*. Scand J Infect Dis. 9; 237-240.

- [114] **Greub, G., Raoult, D.** (2003). *Biocides currently used for bronchoscope decontamination are poorly effective against free-living amoebae.* Infect Control Hosp Epidemiol. 24;784-786.
- [115] **Turner, N.A., Harris, J., Russell, A.D., Lloyd, D.** (2000). *Microbial differentiation and changes in susceptibility to antimicrobial agents.* J Appl Microbiol. 89; 751-759.
- [116] **Sanden, G.N., Morrill, W.E., Fields, et al** (1992). *Incubation of water samples containing amoebae improves detection of legionellae by the culture method.* Appl Environ Microbiol. 58; 2001-2004.
- [117] **Brindley, N., Matin, A., Khan, N.A.** (2009). *Acanthamoeba castellanii: High antibody prevalence in racially and ethnically diverse populations.* Exp Parasitol. 121; 254–256.
- [118] **Marciano-Cabral, F., Cabral, G.** (2003). *Acanthamoeba spp. as agents of disease in humans.* Clin Microbiol Rev. 16; 273–307.
- [119] **Visvesvara, G.S., Moura, H., Schuster, F.I.** (2007). *Pathogenic and opportunistic freeliving amoebae: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia diploidea.* FEMS Immunol Med Microbiol. 50; 1–26.
- [120] **Siddiqui, R., Khan, N.A.** (2012). *Biology and pathogenesis of Acanthamoeba.* Parasit Vectors. 5; 6.
- [121] **Ulsamer, A.G., Smith, F.R., Korn, E.D.** (1969). *Lipids of Acanthamoeba castellanii. Composition and effects of phagocytosis on incorporation of radioactive precursors.* J Cell Biol 43; 105–114.

- [122] **Sayanova, O., Haslam, R., et al** (2006). *A bifunctional  $\Delta 12$ ,  $\Delta 15$ -desaturase from *Acanthamoeba castellanii* directs the synthesis of highly unusual *n-1* series unsaturated fatty acids.* J Biol Chem. 281; 36533–36541.
- [123] **Korn, E.D.** (1964). *Biosynthesis of unsaturated fatty acids in *Acanthamoeba* spp.* J Biol Chem. 239; 396–400.
- [124] **Palusinska-Szyszk, M., Turska-Szewczuk, A., et al** (2009). *Occurrence of new polyenoic very long chain acyl residues in lipids from *A. castellanii*.* Acta Protozool. 48; 63-72.
- [125] **Harb, O.S., et al** (2000). *From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens.* Environ Microbiol. 2; 251-265.
- [126] **Jacquier, N., et al** (2013). *Discovery of new intracellular pathogens by amoebal coculture and amoebal enrichment approaches. Journal of visualized experiments.* JoVE:e51055.
- [127] **Gao, L.Y., et al** (1997). *Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa.* Infect Immun. 65; 4738-4746.
- [128] **Abd, H., et al** (2008). **Pseudomonas aeruginosa* Utilises Its Type III Secretion System to Kill the Free-Living Amoeba *Acanthamoeba castellanii*.* J Eukaryot Microbiol. 55; 235-243.
- [129] **Denoncourt, A.M., et al** (2014). *Potential role of bacteria packaging by protozoa in the persistence and transmission of pathogenic bacteria.* Front Microbiol 5.



- [130] **Thomas, V., McDonnell, G.** (2007). *Relationship between mycobacteria and amoebae: ecological and epidemiological concerns*. Lett Appl Microbiol. 45;349-357.
- [131] **Broman, T., et al.** (2011). *Molecular detection of persistent Francisella tularensis subspecies holarctica in natural waters*. International journal of microbiology, 2011.
- [132] **Sewell, D.L.** (2003). *Laboratory safety practices associated with potential agents of biocrime or bioterrorism*. J. Clin. Microbiol. 41; 2801–2809.
- [133] **Kaufmann, A.F., Meltzer, M.I., Schmid, G.P.** (1997). *The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and postattack intervention programs justifiable?* Emerg. Infect. Dis. 3; 83–94.
- [134] **Volner, Z.** (2008). *Opća medicinska mikrobiologija s epidemiologijom i imunologijom*. Školska knjiga, Zagreb. 5. izdanje: 108-114.
- [135] **Hajsig, D., Delaš, F.** (2016). *Priručnik za vježbe iz opće mikrobiologije*. Hrv. Mikrobiol. Društvo. Zagreb, 2016. 1. Izdanje: poglavlje 2: 16-17.
- [136] **Bellon-Fontaine, M.N., Cerf, O.** (1988). *Nettoyage et désinfection dans les industries alimentaires*. Actualités Sci. Tech. en Ind. Agro-Alim., 40.
- [137] **Centre National d'études Vétérinaires et Alimentaires (CNEVA)** (1989). *Symposium Européen sur les désinfectants*. Fougères, 1989. CNEVA, Laboratoire des médicaments vétérinaires, Fougères, 235 pp.
- [138] **Dauphin, A., Darbord, J.C.** (1988). *Hygiène hospitalière pratique*. 2nd Ed. Association de pharmacie hospitalière de l'Ile-de-France. Editions médicales internationales, 715 pp.

- [139] **Russell, A.D.** (1983). *Principles of antimicrobial activity. In Disinfection, sterilization and preservation.* 3rd Ed. (S.S. Block, ed.). Lea & Febiger, Philadelphia, 717-745.
- [140] **Daoud, N.N., Dickinson, N.A., Gilbert, P.** (1983). *Antimicrobial activity and physical properties of some alkyl dimethyl benzyl ammonium chlorides.* Microbios. 37; 73-85.
- [141] **Mayaudon, J., El-Zayat** (1985). *The mode of action and cell destruction of disinfectants.* Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 9; 11-13.
- [142] **Osanai, S., Abey** (1985). *Chirality, antimicrobial relationship of quaternary ammonium cationics.* J. chem. tech. Biotechnol. 35B; 43-45.
- [143] **Richards, R.M.E., Cavill, R.H.** (1976). *Electron microscope study of effect of benzalkonium and edetate de sodium on cell envelope of Pseudomonas aeruginosa.* J. pharm. Sci. 65; 76-79.
- [144] **Sakagami, Y., Yokoyama, H., et al** (1989). *Mechanism of resistance to benzalkonium chloride by Pseudomonas aeruginosa.* Appl. environ. Microbiol. 55; 2036-2040.
- [145] **Ostrumov, S. A.** (2006). *Biological effects of surfactants.* CRC Press, Boca Raton, FL.
- [146] **Deutschle, T., Porkert, U. Reiter, R., et al.** (2006). *In vitro genotoxicity and cytotoxicity of benzalkonium chloride.* Toxicol. In Vitro. 20; 1472-1477.
- [147] **Henderson, N. D.** (1992). *A review of the environmental impact and toxic effects of DDAC.* Environmental Protection Division, BC, Ministry of Environment, Lands and Parks, Victoria, BC.
- [148] **Kuyyakanond, T., Quesnel, L.B.** (1992). *The mechanism of action of Chlorhexidine.* FEMS Microbiol. Letters. 100; 211-216.

- [149] **Schnuch, A., Geier, J., Uter, W, et al** (2007). *The biocide polyhexamethylene biguanide remains an uncommon contact allergen.* Contact Dermatitis. 56(4); 235-239.
- [150] **Rosin, M., Welk, A., Kocher, T., Majic-Todic, A., et al** (2002). *The effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse compared to an essential oil rinse and a chlorhexidine rinse on bacterial counts and 4-day plaque regrowth.* J Clin Periodontol. 29(5); 392-399.
- [151] **Thomas, V., Bouchez, T., et al** (2004). *Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in Legionella persistence.* Journal of Applied Microbiology. 97; 950-963.
- [152] **Špoljarić, N., Jurčić-Momčilović, D., Ožanić, M., Marečić, V., Šantić, M.** (2016). *Ispitivanje djelotvornosti dezinficijensa 0, 2% Bigvasan, 1% Descocid i 5% Asepsol eko na uništavanje Francisella tularensis subsp. novicida.* 3. kongres sanitarne profesije s međunarodnim sudjelovanjem. Opatija, Hrvatska, 11/2016.

## 8. ŽIVOTOPIS

Nikolina Špoljarić rođena je u Rijeci, 29. studenoga 1993. godine., u obitelji oca Milana, majke Marijane, starijeg brata Maria i mlađe sestre Mandice. Djetinjstvo provodi na Grobinštini, u mjestu Čavle, gdje završava i istoimenu Osnovnu Školu. Od 2008. do 2012. godine školuje se u Medicinskoj školi u Rijeci. Tijekom osnovnoškolskog i srednješkolskog obrazovanja sudjeluje na brojnim natjecanjima iz prirodnih znanosti, vannastavnim sportskim aktivnostima i likovnim smotrama. Srednješkolsko obrazovanje završava kao učenica generacije i strukovnim zvanjem Sanitarni tehničar. Svoj akademski put započinje 2013. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, Studiju sanitarnog inženjerstva, od kuda započinje uviđati sve veći interes za znanost, akademskim i društvenim djelovanjem kroz sudjelovanja na simpozijima i kongresima, osmišljavanjem i vođenjem projekata za širi javnozdravstveni i društveni značaj unapređenja kvalitete življenja, očuvanja zdravlja i prevencije bolesti. Zvanje sveučilišne Prvostupnice sanitarnog inženjerstva stječe 2016. godine, s temom završnog rada „Procjena učinkovitosti kemijskih dezinficijensa u smanjenju rasta *Francisella novicida*“ pod mentorstvom Prof. dr. sc. Marine Šantić, a izrađenim na Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju. Bogati petogodišnji studentski put na Medicinskom fakultetu, završiti će 2018., obranom diplomske teze „Procjena učinkovitosti dezinficijensa na rast *Francisella novicida* nakon uzgoja u *Acanthamoeba castellanii*“ pod vodstvom iste mentorice i steći zvanje sveučilišne Magistre sanitarnog inženjerstva.