

Procjena učinkovitosti kemijskih dezinficijensa u smanjenju rasta *Francisella novicida*

Špoljarić, Nikolina

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:060897>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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

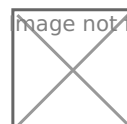


Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Nikolina Špoljarić

**PROCJENA UČINKOVITOSTI KEMIJSKIH DEZINFICIJENSA U
SMANJENJU RASTA *FRANCISELLA NOVICIDA***

Rijeka, 2016.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Nikolina Špoljarić

**PROCJENA UČINKOVITOSTI KEMIJSKIH DEZINFICIJENSA U
SMANJENJU RASTA *FRANCISELLA NOVICIDA***

Rijeka, 2016.

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.

Završni rad obranjen je dana _____ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred Povjerenstvom i sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad ima 44 stranice, 14 slika i 92 literaturna navoda.

SAŽETAK

PROCJENA UČINKOVITOSTI KEMIJSKIH DEZINFICIJENSA U SMANJENJU RASTA *FRANCISELLA NOVICIDA*

Francisella tularensis vrlo je infektivna, fakultativna gram-negativna unutarstanična bakterija koja može uzorkovati smrtonosnu bolest, tularemiju, opisanu u ljudi i životinja. Bakterija je sposobna preživjeti u različitim uvjetima te, pritom, zadržati svoju virulentnost. Kao unutarstanični organizam, ima složen životni ciklus koji joj osigurava proliferaciju i preživljavanje u različitim tipovima stanica sisavaca. Rod *Francisella* sadrži pet vrsta: *F. tularensis*, *F. philomiragia*, *F. hispaniensis*, *F. noatunesis* i *F. novicida*. U ovom istraživanju, pratili smo učinkovitost tri dezinficijensa (5%-tni Asepsol eko, 0,2%-tni Bigvasan i 1%-tni Descocid) na smanjenje rasta *F. novicida* nakon izlaganja različitim vremenskim periodima (10 sekundi, 1 minuta, 5, 10 i 15 minuta). Naši rezultati pokazuju da 5%-tni Asepsol potpuno inhibira rast bakterija, bez obzira na vrijeme izloženosti. Nasuprot tome, broj bakterija *F. novicida* ostao je isti nakon djelovanja 0,2%-tnog Bigvasana i 1%-tnog Descocida u vremenu od 10 sekundi. Međutim, niži bakterijski porast zabilježen je u produženom vremenu djelovanja (1 minuta, 5, 10 i 15 minuta). Možemo zaključiti kako 5%-tni Asepsol pokazuje baktericidnu aktivnost prema *F. novicida*, dok 0,2%-tni Bigvasan i 1%-tni Descocid samo smanjuju broj bakterijskih kolonija nakon izloženosti od 1 minute, 5, 10 i 15 minuta.

Ključne riječi: *Francisella novicida*; dezinficijensi; kinetika rasta

SUMMARY

EVALUATION OF EFFECTIVENESS OF CHEMICAL DISINFECTANTS ON REDUCING THE GROWTH OF *FRANCISELLA* *NOVICIDA*

Francisella tularensis is a highly infectious, facultative gram-negative intracellular bacterium that can cause a deadly disease, tularemia, described in humans and animals. The bacterium is able to survive in different temperature and environmental conditions, while retaining its virulence. As intracellular organism with a complex intracellular lifecycle that ensures its proliferation and survival in variety of mammalian cell types. Five species of the genus *Francisella* has been recognized: *F. tularensis*, *F. philomiragia*, *F. hispaniensis*, *F. noatunensis* and *F. novicida*. In this study, we investigated the effectiveness of three disinfectants (5% Asepsol eko, 0,2% Bigvasan and 1% Descocid) on reducing the growth of *F. novicida* after exposure to different times (10 seconds, 1 minute, 5, 10 and 15 minutes). Our results showed that 5% of Asepsol completely inhibit bacterial growth regardless the time of exposure. In contrast, when suspension of *F. novicida* was exposed to 0,2% Bigvasan and 1% Descocid, bacteria survived (10 seconds). However, bacterial growth was determined when bacterial suspension was exposed after 1 minute, 5,10 and 15 minutes. We can conclude that 5% Asepsol shows the bactericide activity to *F. novicida*, while 0,2% Bigvasan and 1% Descocid only reduce the number of bacterial colonies.

Key words: *Francisella novicida*; disinfectants; growth kinetics

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. <i>Francisella</i> spp.	1
1.1.1. <i>Francisella tularensis</i>	1
1.1.2. <i>Francisella novicida</i>	2
1.1.3. Geografska rasprostranjenost i epidemiologija	3
1.1.4. Tularemija	4
1.1.5. Unutarstanični život i virulencija <i>Francisella</i>	7
1.1.6. <i>Francisella</i> u stvaranju biofilma	10
1.1.7. Prevencija	10
1.1.8. Osjetljivost <i>Francisella</i> na antibiotike i dezinficijence	11
1.1.9. Dezinficijensi	12
1.2. Kvaterne amonijeve soli	14
1.3. Poliheksametilen bigvanid, PHMB	17
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	19
3. MATERIJALI I METODE	20
3.1. Materijali	20
3.1.1. Bakterija	20
3.1.1.1. Buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar	20
3.1.2. Dezinficijensi	22
3.2. Metode	23
3.2.1. Priprema bakterijske suspenzije	23
3.2.1.1. Spektrofotometrijsko određivanje broja bakterija po mililitru suspenzije	23
3.2.2. Priprema otopina dezinficijensa	23
3.2.3. Proces ispitivanja odabranih kemijskih dezinficijensa na smanjenje rasta <i>F. novicida</i> u ovisnosti o vremenu	24
4. REZULTATI	26
4.1. Određivanje broja kolonija <i>F. novicida</i> nakon djelovanja 5%-tnog Asepsola	26
4.2. Određivanje broja kolonija <i>F. novicida</i> nakon djelovanja 0,2%-tnog Bigvasana	27
4.3. Određivanje broja kolonija <i>F. novicida</i> nakon djelovanja 1%-tnog Descocida	28
5. RASPRAVA	29
6. ZAKLJUČAK	32
7. LITERATURA	33
8. ŽIVOTOPIS	44

1. UVOD

1.1. *Francisella* spp.

Kao jedina od obitelji *Francisellaceae*, unutar roda *Francisella* prepoznato je nekoliko vrsta: *Francisella tularensis*, *Francisella hispaniensis*, *Francisella noatunensis*, *Francisella philomiragia* i *Francisella novicida* [1].

1.1.1. *Francisella tularensis*

Francisella tularensis je virulentna, fakultativna gram-negativna bakterija te unutarstanični parazit koji uzrokuje bolest tularemiju kod glodavaca, zečeva i kunića, te ljudi [2,3]. Bakterija je široko rasprostranjena u prirodi te je dosad izolirana iz 250 vrsta divljih životinja [4].

Gotovo sva znanja o rodu *Francisella* proizašla su iz dugogodišnjeg proučavanja *F. tularensis*, još otkako je po prvi puta izolirana 1911. godine iz vjeverica uginulih od kuge-nalik bolesti u državi Tulare, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države [5]. U to vrijeme bakteriju su nazvali *Bacterium tularense* po pokrajini iz koje je izolirana, no već 1920. godine [6], prema Dr. Edward Francisu, zbog proučavanja tularemije tijekom cijele svoje karijere i otkrića na kojima su nastavljena sva dosadašnja istraživanja, ime bakterije je preimenovano u *Francisella tularensis* [7].

Unutar *F. tularensis* trenutno su prepoznate tri podvrste: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tip A), *F. tularensis* subsp. *holarctica* (tip B) i *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica*. Podvrste se međusobno razlikuju po virulentnosti i geografskoj rasprostranjenosti.

1.1.2. *Francisella novicida*

F. novicida je gram-negativna patogena bakterija čije kolonije na hranjivim podlogama rastu pleomorfno, u obliku koko i/ili kokobacila. Kao i za ostale vrste roda *Francisella*, i za nju je tipičan unutarstanični način rasta i razmnožavanja.

Suprotno od *F. tularensis*, *F. novicida* nikada nije bila izolirana iz divljih životinja što upućuje na to da po svojoj prirodi nije zoonoza. U slučaju vektora člankonožaca poput komaraca i krpelja koji se inficiraju sisući zaraženu krv životinje koja je domaćin francizeli, zbog nedovoljne istraženosti i izoliranosti *F. novicida* iz vektorskih organizama, ne može ju se povezati s uzročnikom bakterijemije u divljih životinja, a samim time i zoonozom. Vjerojatno je da *F. novicida* svoje prebivalište nalazi u okolišu te da se ondje širi mehanizmima koji ne uključuju sisavce ili člankonošce za domaćine. Zabilježeni slučajevi *F. novicida* u okolišu uključivali su vodene ekosustave, slanu i bočatu vodu, led, te tlo [8-10].

F. novicida manje je izbirljiv organizam u svom rastu za razliku od *F. tularensis*. Pri porastu na CGBA agaru (cysteine-glucose-blood agar, CGBA) na 37 °C kolonije *F. tularensis* vidljive su tek nakon 3 do 7 dana, dok se kolonije *F. novicida* uoče već nakon 24 sata, a tijekom 48 do 72 sata dovoljno su velike da bi ih se moglo izbrojiti [11].

Genom *F. novicida* (soj U112) uključuje 84 gena koji su inaktivirani kod *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu S4 i *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS [12]. Oni su uključeni u ciklus stvaranja energije, metabolizam ugljikohidrata, prijenos metabolita, biosintezu aminokiselina te prijenos i modifikaciju DNA. Smatraju se vrlo važnima u preživljavanju i održavanju *F. novicida* u okolišu, izvan životinjskog domaćina [13].

1.1.3. Geografska rasprostranjenost i epidemiologija

F. tularensis pronađena je u područjima Sjeverne polutke, ali neki slučajevi *Francisella spp.* izolirani su i južnije, poput *F. novicida* u Australiji [14].

F. tularensis subsp. *tularensis* (tip A) izolirana je jedino u Sjevernoj Americi [15] te je ondje gotovo endemska, dok su vrlo rijetki slučajevi zabilježeni u Europi [16]. Tip A je u Sjevernoj Americi najčešće povezan s tularemijom uzrokovanom kontaktom s inficiranim sisavcima, zečevima, primatima te putem krpeljnih vektora [17,18]. Prije primjene antibiotika, smrtnost od tularemije tipa A kod ljudi je bila između 5% i 30% [19,20].

F. tularensis subsp. *holarctica* izolirana je u Japanu, Sjevernoj Americi i Europi. Značajan broj oboljelih od tularemije uzorkovan *F. tularensis* tip B zabilježen je u Švedskoj, gdje se uzročnik prenosi preko vektora komaraca [21-23]. U Turskoj je podvrsta *holarctica* izolirana i povezana s zagađenom vodom i njenom upotrebom u svrhu pića, osobito u seoskim krajevima [24].

F. tularensis subsp. *mediaasiatica* umjereno je virulentna za zečeve i ljude, te je izolirana jedino u Središnjoj Aziji [25].

Francisella novicida prvi je puta izolirana 1950. godine u američkoj državi Utah [26,27]. Zajedno s *F. philomiragia* i *F. hispaniensis* povezana je s vodenim okolišem.

Francisella može preživjeti dugi period u okolišu pa se tako bakterije mogu pronaći još tjednima i mjesecima u inficiranom tkivu životinja ili pak, sačuvane u vodi, zemlji, prašini i slami [28].

1.1.4. Tularemija

Ovisno o ulaznom mjestu *Francisella* u ljudski organizam, različite su i kliničke slike bolesti, no, sedam je tipičnih: ulceroglandularni, okuloglandularni, glandularni, angiozni, plućni, abdominalni te tifoidni [29,30]. Poslije inkubacije od 3 do 10 dana tularemija nastupa naglo s povećanom tjelesnom temperaturom, vrućicom i općim algičkim sindromom, uz istovremenu pojavu i lokalnih simptoma, opet ovisno o početnom mjestu infekcije. Ukoliko se ne liječi, temperatura ostaje povišena i do 10-ak dana, uz dnevne oscilacije.

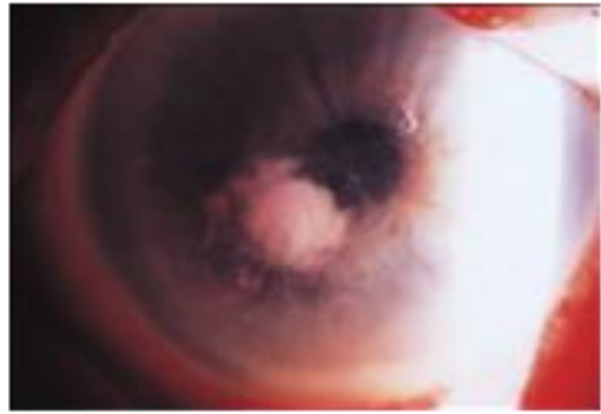
Ulceroglandularni oblik javlja se kod kontakta sa zaraženom životinjom te se na ruci stvara primarni afekt u obliku bezbolne papule koja se potom i nekrotizira (Slika 1), dok se na području pazuha ili lakta javlja povećanje limfnih čvorova, limfadenitis.



Slika 1. Primarni afekt na prstu u obliku papule s nekrotizacijom.

Izvor: <http://medicinabih.info/medicina/infektologija/tularemija/> ;
Pristupljeno 10.08.2016.

Kod glandularnog oblika (Slika 2) zapažen je samo limfadenitis, dok je kod okuloglandularnog prisutan jednostran konjunktivitis (Slika 3) uz otok limfnih čvorova ispred uške i susjednih vratnih.



is kod glandularnog

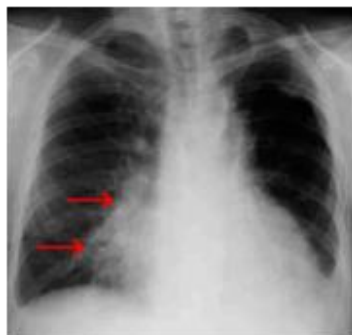
Slika 3. Konjuktivitis prisutan kod okuloglandularnog oblika tularemije.

a.info/vesti/25-eda/196-tularemija ;
2016.

Izvor: F. Mihaljević, J. Fališevac, B. Bezjak, B. Mravunac: "Specijalna klinička infektologija" 8. izd.. Medicinska naklada, Zagreb.

Angiozni oblik ima jednostrani ili obostrani primarni afekt u obliku ulceromembranozne ili pak nekrotične angine.

Za plućni je oblik karakteristična atipična pneumonija (Slika 4) s afekcijom traheobronhalnih limfnih čvorova.



Slika 4. Rendgenska snimka atipične pneumonije kod plućnog oblika tularemije.

Izvor: <http://path.upmc.edu/cases/case186/images/gross2.jpg> ;

Pristupljeno 10.08.2016.

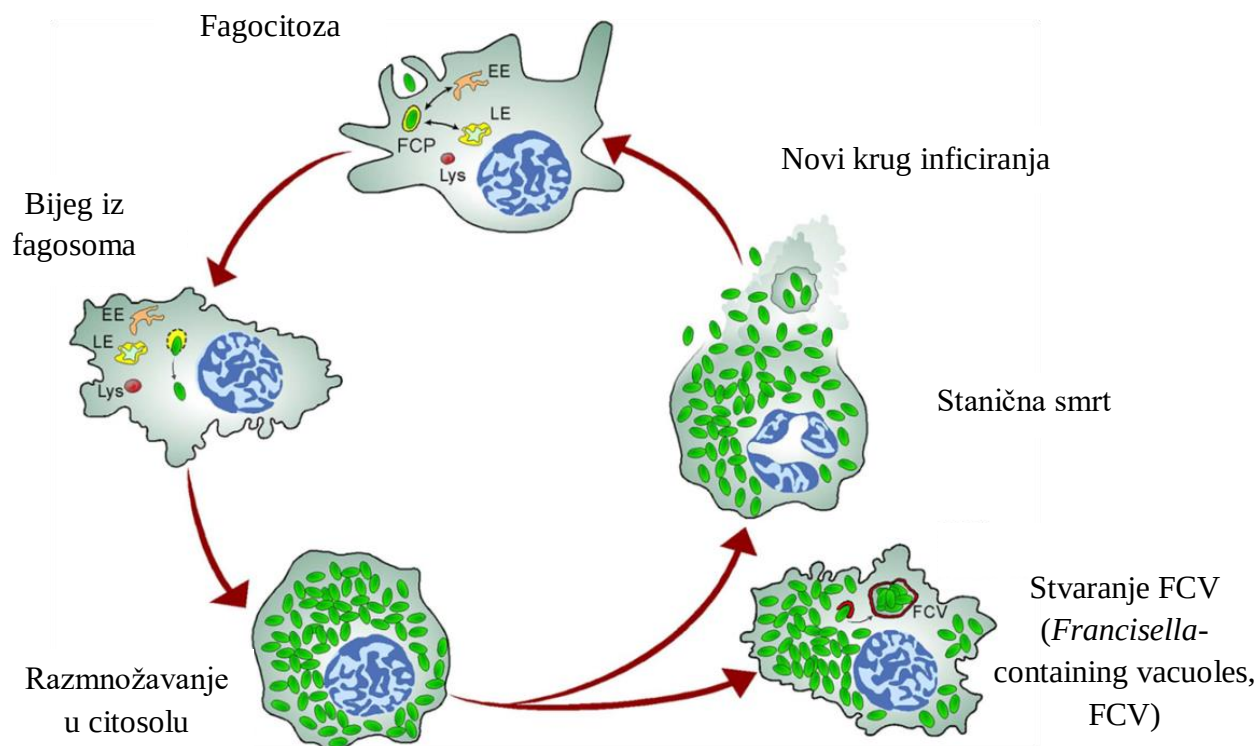
U abdominalnom obliku, zapažene su ulceracije unutar crijeva te povećanje mezenterijalnih limfnih čvorova, dok je tifoidni oblik bez limfadenitisa i primarnog afekta, već po kliničkoj slici nalikuje sepsi ili trbušnom tifusu.

Uspoređujući s *F. tularensis*, infekcije uzorkovane *F. novicida* nisu povezane sa zdravim čovjekom te su iznimno rijetke, zbog čega je vrlo teško postaviti točnu dijagnozu [31]. Dosad je zabilježeno 12 slučajeva bolesti kod ljudi koje su prouzročene *F. novicida* [32,33]. Bolest koja se kod većine njih razvila nije nalikovala tipičnoj tularemiji. Od 11 pacijenata, čiji su klinički podaci bili dostupni, devetero je bilo imunokompromitirano ili oslabljenog zdravlja. Pokazivali su akutne simptome i povećanu tjelesnu temperaturu. Kod dvojice zdravih pojedinaca infekcija s *F. novicida* očitovala se kao lokalno povećanje limfnih čvorova i bez značajnog porasta temperature te prisustva općih simptoma. Klasični oblici tularemije: ulceroglandularni, plućni, orofaringealni i okuloglandularni; nisu uočeni kod zdravih osoba prilikom zaraze s *F. novicida*.

1.1.5. Unutarstanični život i virulencija *Francisella*

Kada unutarstanični bakterijski patogen prodire u stanicu domaćina, on mora iskoristiti dostupne izvore energije i anaboličke supstrate iz nutritivno limitiranog unutarstaničnog okoliša. Najveći dio potencijalnih nutrijenata uskladišteni su u kompleksnim strukturama poput glikogena, proteina i lipidnih kapljica, koji nisu odmah dostupni patogenu [34]. Za svoju proliferaciju u stanicu, bakterija mora degradirati ove kompleksne strukture na manje komponente kao što su masne kiseline, ugljikohidrati i aminokiseline ili pak, povećati uvoz hranjivih tvari [35,36].

F. tularensis kao unutarstanični patogen inficira preko 200 različitih vrsta, od ameba do čovjeka [37]. Visoko virulentni soj *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu S4 ima infektivnu dozu od nekoliko do 25 bakterija te stopu smrtnosti, za netretirani plućni oblik, od 30% do 60% [38,39]. Također, u studijima je dokazano kako rod *Francisella* inficira različite tipove stanica, od makrofaga [40-43] koji su važni za njihovu intracelularnu replikaciju (Slika 5) do epitelnih i endotelnih stanica [44,45].



Slika 5. Model unutarstaničnog životnog ciklusa *F. tularensis* prilagođen prema makrofagima.

Izvor: Chong, A., Celli, J. The *Francisella* intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. *Frontiers in Microbiol.* 2010. (1) 138.

Bakterija ulazi u stanicu domaćina koristeći proces fagocitoze. Nakon ulaska u stanicu boravi u fagosomu svega 2 sata. Izlaskom iz fagosoma, brzo se replicira u citoplazmi te kod inficirane stanice domaćina uzrokuje apoptozu zbog velikog broja namnoženih bakterija koje se potom dalje šire na druge, neinficirane stanice, i tako započinje s novim krugom infekcije (Slika 5).

Unutarstanični je životni ciklus *F. tularensis* kompleksan i nije dovoljno istražena uloga pojedinih gena u tom procesu.

Kada je slučajnom transpozicijskom mutagenезom došlo do defekta u unutarstaničnom razmnožavanju bakterije, identificiran je *Francisella* patogeni otok (engl. *Francisella pathogenicity island*, FPI). FPI sadrži 19 gena, uključujući *iglABCD* i *pdpABCD*, koji su se pokazali esencijalnim za virulentnost *Francisella* [46]. Dok *F. novicida* sadrži samo jednu kopiju FPI, podvrste *tularensis* i *holarctica* posjeduju dvije kopije FPI.

Lučenje FPI proteina razlikuje se između *F. tularensis* i *F. novicida*. Nakon infekcije makrofaga, 8 FPI proteina (IglE, IglC, IglI, IglJ, IglF, VgrF, PdpE i PdpA) je izlučeno od *F. tularensis* subsp *holarctica* LVS soja, dok su nakon infekcije s *F. novicida* izlučena samo 4 (IglE, IglC, PdpE i PdpA) [47].

FPI sadrži gene homologne genima koji kodiraju tip 6 sekrecijske sustave (eng. type 6 secretion systems, T6SS) u drugim bakterijama [48]. Homolozi *iglA*, *pdpB*, *dotU* i *vrgG* većinom su pronađeni unutar T6SS. DotU i PdpB komponente su unutarnje membrane i homolozi T6SS proteinima DotU i IcmF [49]. Mutacije u *IglA* i *IglB* prisutne su kod bakterija koje nisu sposobne pobjeći fagosomu i razmnožavati se unutar stanice [50].

F. tularensis MglA regulator zadužen je za aktivaciju transkripcije gena kodiranih od FPI, kao i 90 drugih gena. MglA i FPI doprinose virulenciji *F. tularensis* u miševima, repliciranju u stanicama sisavaca i ameba [51], te fagosomalnom bijegu [52].

1.1.6. *Francisella* u stvaranju biofilma

Biofilm je definiran kao prirodno formirana adherentna zajednica bakterija unutar ekstracelularnog polimernog matriksa [53,54].

Formiranje zajednice unutar biofilma omogućava bakterijama bolju međusobnu komunikaciju, quorum sensing, radi lakšeg pronalaska nutrijenata, razmnožavanja i izbjegavanja opasnosti. Bakterije unutar sigurnosti biofilma razvijaju i veću osjetljivost na vanjske agente, poput dezinficijensa.

U *in vitro* uvjetima rod *Francisella* pokazuje sposobnost formiranja biofilma na različitim površinama [55].

1.1.7. Prevencija

Ovaj gram-negativni kokobacil klasificiran je u A kategoriju potencijalnih bioloških oružja od strane CDC agencije (Centers for Disease Control and Prevention).

Iako je potreba za efikasnim cjepivom protiv uzročnika tularemije velika, niti jedno još nije odobreno za humanu upotrebu. Cjepiva s živim oslabljenim uzročnikom pokazala su se djelotvornim protiv plućnog oblika tularemije.

Najuspješnije cjepivo s živim oslabljenim uzročnikom bilo je LVS, soj živog cjepiva (*engl.* Live Vaccine Strain, LVS) razvijen 1952. godine od tadašnjeg Sovjetskog Saveza, iz *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Međutim, zbog upitne genske pozadine, stabilnosti i virulencije u imunokompromitiranih osoba, još uvijek nije odobren za ljude [56].

U novijim istraživanjima sve je više proučavana *F. novicida* u svrhu izrade cijepiva protiv tularemije [57,58].

1.1.8. Osjetljivost *Francisella* na antibiotike i dezinficijense

Standardna antimikrobna terapija u liječenju tularemije odobrena je od američke Uprave za hranu i lijekove (*engl.* United States Food and Drug Administration; U.S. FDA) te uključuje aminoglikozide, tetracikline i kloramfenikol. Iako su ciprofloksacin i drugi fluorokinoloni antibiotici trenutno neodobreni od FDA za tretiranje tularemije, oni pokazuju vrlo dobar učinak protiv *F. tularensis* u *in vitro* uvjetima, kod životinja i u ljudi [59,60].

Od svih antibiotika koji su trenutno u upotrebi protiv tularemije, streptomycin iz skupine aminoglikozida pokazuje najbolju terapijsku učinkovitost [61]. Maurin, M., i sur. prikazali su kako aktivnost aminoglikozida prema *F. tularensis* raste s vremenom izlaganja, te dostiže svoj maksimum nakon 72 sata inkubacije bakterijske kulture [62]. Mehanizmom pinocitoze aminoglikozidi prodiru u eukariotske stanice gdje, već nakon 48 do 72 sata kontakta antibiotika sa stanicama, dosežu visoku unutarstaničnu aktivnost [63]. Prema Ikaheimou i sur., klinički sojevi *F. tularensis* tip A i tip B pokazali su visoku otpornost prema β -laktamskim antibioticima, ali i osjetljivost na aminoglikozide (streptomycin i gentamicin), kinolone, tetracikline, rifampicin i kloramfenikol [64].

F. tularensis moguće je inaktivirati putem klora ili monokloramina u vodi, iako učinak ovisi o pH i temperaturi vode. Koncentracija klora od 1,5 mg/L ubija *F. tularensis* [65]. Tretman s paraformaldehidom, tijekom 1 sata pri sobnoj temperaturi, potpuno inaktivira *F. tularensis* LVS soj [66].

Francisella ne stvara otporne strukture te je relativno osjetljiva na sve standardne procedure inaktivacije. Dobru osjetljivost pokazuje prema hipokloritu i sličnim kemijskim spojevima koji se i inače koriste u postupcima dezinfekcije [67].

1.1.9. Dezinficijensi

Dezinfekcija je postupak kojim se uklanjaju, inaktiviraju ili uništavaju vegetativni oblici mikroorganizama, ne nužno i bakterijske spore. Provodi se u vodi, na tijelu, predmetima, namirnicama ili u prostorijama. Može biti mehanička, fizikalna ili kemijska, pomoću primjene dezinficijensa [68].

Dezinficijensi su kemijski aktivne čija učinkovitost često ovisi o mnogim čimbenicima poput temperature, perioda izlaganja, pH, vrsti mikroorganizama na koje trebaju djelovati ili o koncentraciji u kojoj se pripremaju.

Da bi dezinficijens bio dobar on treba imati široki spektar primjene, biti aktivan pri niskim koncentracijama i uz prisustvo organskih tvari, brzo djelovati pri sobnoj temperaturi te temperaturi tijela. Zatim mora biti što manje toksičan za čovjeka i ne smije stvarati otpornost mikroorganizama na kemijske tvari. Treba biti jednostavan, siguran za primjenu i topiv u vodi, bez stvaranja pjene. Ne smije biti eksplozivan niti zapaljiv, te njegovo djelovanje treba biti aktivirano i tijekom duljeg perioda nakon nanošenja na površinu koja se tretirala.

Prema mehanizmu djelovanja, dezinficijensi imaju za cilj denaturirati bjelančevine, oštetiti citoplazmatsku membranu, onemogućavati stvaranje stanične stijenke ili pak, ometati izmijenu tvari zbog djelovanja na enzimatske procese u mikroorganizmima.

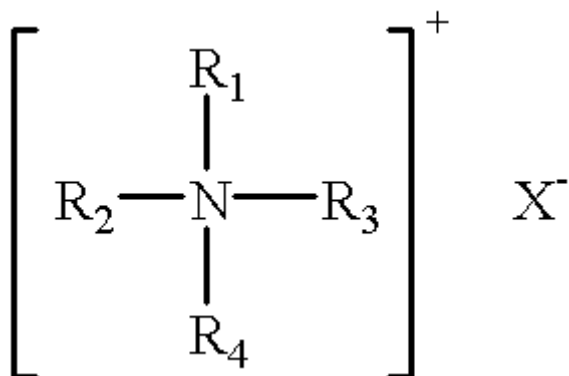
Prema vrsti aktivne tvari koje sadrže, postoje nekoliko skupina dezinficijensa, a to su lužine, kiseline, alkoholi, fenoli i njegovi derivati, aldehidi, halogeni spojevi, tenezidi (među kojima su kvaterne amonijeve soli), bigvanidi i oksidacijska sredstva.

Bigvanidi su dezinficijensi s bakteriostatskim djelovanjem, kao i tenezidi čiji kvaterni amonijeve spojevi uzrokuju inaktivaciju stvaranja enzima te denaturaciju bjelančevina.

Dezinficijensi se mogu podijeliti i prema stupnju djelotvornosti. Tako postoje dezinficijensi visokog stupnja djelotvornosti koji djeluju baktericidno i sporocidno. Zatim dizinficijensi srednjeg stupnja djelotvornosti koji ne djeluju sporocidno, ali inaktiviraju bakterije iz roda *Mycobacterium*, te dezinficijensi niskog stupnja djelotvornosti u koje se ubrajaju i kvaterni amonijevi spojevi, a njihov učinak je u vidu uništavanja vegetativnih oblika bakterija i nekih virusa [68].

1.2. Kvaterne amonijeve soli

Kvaterni amonijevi spojevi su kationske površinski aktivne tvari koje sadrže tetra-amonijeve soli i karakterizirani su pozitivnim nabojem kvaternog dušikovog atoma, odnosno imaju četiri funkcionalne skupine kovalentno vezane za centralno smješten dušikov atom pozitivnog naboja (Slika 6).



Slika 6. Općenita molekulska struktura kvaternih amonijevih soli (R predstavlja funkcionalnu skupinu; X^- predstavlja negativan ion poput Cl^- , Br^- ili NO_3^-)

Izvor: <https://www.google.com/patents/US6306805> ; Pristupljeno 12.08.2016.

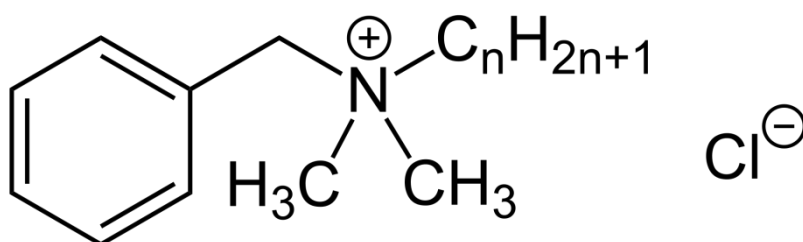
Funkcionalne grupe, R, uključuju barem jedan dugačak lanac alkilne skupine, dok preostale čine metilne ili benzilne skupine [69].

Kao kationske površinski aktivne tvari djeluju na smanjenje površinske napetosti medija u kojem se nalaze, te se zato često koriste u dezinfekcijskim sredstvima, gdje u korisnom vremenu inaktiviraju ili ubijaju vegetativne oblike svih vrsta bakterija, kao i većih ovijenih virusa, dok na gljive i *Mycobacterium tuberculosis* ne djeluju [70].

Zbog njihovog pozitivnog naboja svi spojevi snažno adsorbiraju negativno nabijene tvari poput površine mulja, tla i sedimenata pa se koriste i u industrijama. Isto tako zabilježeno je da imaju sposobnost vezivanja na masne kiseline u staničnoj membrani organizama, što ih pak čini korisnim u svrhu biocida [71,72].

Akutno toksično djelovanje kvaternih amonijevih spojeva detaljno je ispitivano na glodavcima i raznim vodenim organizmima [73], dok potencijalna genotoksičnost još treba biti istražena.

Za djelovanje benzalkonijevog klorida (*engl.* benzalconium chloride, BAC) (Slika 7) u studiji izvedenoj na ljudskim stanicama pokazano je kako BAC uzrokuje relevantne DNA promjene u većini respiratornih epitelnih stanica, u *in vitro* uvjetima, i to u koncentracijama koje se koriste u komercijalno dostupnim preparatima za nos [74].



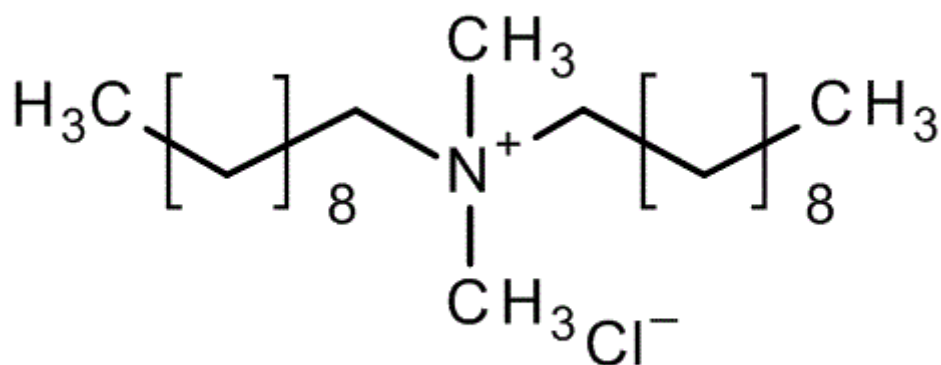
$$n = 8, 10, 12, 14, 16, 18$$

Slika 7. Struktura benzalkonijevog klorida (BAC)

(*n* predstavlja broj ugljikovih i vodikovih atoma u spoju)

Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Benzalkonium_chloride ; Pristupljeno 12.08.2016.

Istraživanja provedena na genotoksičnom učinku didecildimetilamonijevog klorida, (*engl.* didecyldimethylammonium chloride, DDAC) (Slika 8) koji je aktivan sastojak u antisepticima i dezinficijensima, pokazuju negativne rezultate na gonotoksičnost za stanice glodavaca, dok dulje izlaganje za čovjeka može rezultirati kroz slabije iritacije kože, očiju ili probavnog sustava [75].

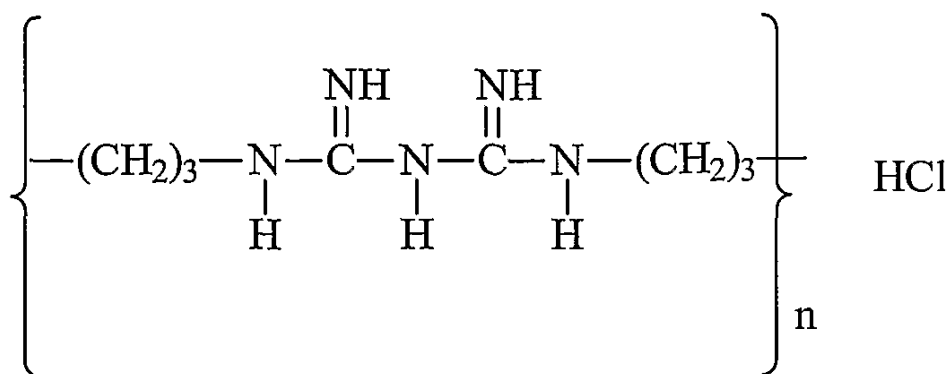


Slika 8. Struktura didecidimetilamonijevog klorida (DDAC)

Izvor: http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Didecyldimethylammonium-chloride,MDA_CHEM-814364?ReferrerURL=https://www.google.hr/ ; Pristupljeno 12.08.2016.

1.3. Poliheksametilen bigvanid, PHMB

Poliheksametilen bigvanid (polyhexamethylene biguanide, PHMB) (Slika 9) koristi se u svrhu antiseptika, zaraščivanja rana, konzervansa u kozmetici, proizvodima osobne higijene i u svrhu dezinficijensa širokog spektra djelovanja.



Slika 9. Struktura poliheksametilen bigvanida (PHMB)

(*n* može biti od 4 do 19, a predstavlja duljinu alkilne skupine)

Izvor: <http://www.google.com.ar/patents/WO2005040323A1?hl=hr&cl=en> ;
Pristupljeno 12.08.2016.

Laboratorijska ispitivanja pokazala su kako je učinkovit protiv nekoliko bakterijskih vrsta za koje je poznato da koloniziraju rane, uključujući *Staphylococcus aureus* (meticilin-osjetljiv i MRSA soj) [76]. Baktericidno djelovanje zabilježeno je i protiv *E. coli* u koncentraciji većoj od 10 mg/L [77].

Ovaj biocid širokog spektra pri niskim koncentracijama efikasno djeluje na uništavanje gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, ali i virucidno. Stabilan je u pH rasponu od 1 do 11, ne sadrži formaldehid te se ne pjeni.

Koncentracije koje se uobičajno koriste i preporučene su od strane proizvođača su 0,2%, 0,4%, 0,8% i 1,0%, za dezinficiranje površina, predmeta i opreme u humanoj medicini.

PHMB djeluje na vanjsku i unutarnju citoplazmatsku membranu bakterijske stanice. Adheriranjem oštećuje njihove membrane, što uzrokuje da komponente stanične citoplazme, poput iona kalija, izlaze iz njih. Tako dolazi do smrti zahvaćene stanice [78].

0,2%-tni PHMB koristi se u otopinama za higijenu usne šupljine gdje se pokazao uspješnim u sprječavanju nastanka zubnog plaka, bez da oštećuje sluznicu [79], te se u tim koncentracijama predlaže i za površinske tretmane teških infekcija zbog svog netoksičnog djelovanja.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj dezinficijensa Asepsol eko, Bigvasan i Descocid na rast i razmnožavanje *F. novicida*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Bakterija

Za uzgoj *F. novicida* korišten je BCYE agar (eng. Buffered charcoal yeast extract, BCYE) na 35 ± 2 °C tijekom 24 sata.

Nakon inkubacije na ploči su porasli sivo-bijele kolonije *F. novicida* (Slika 10).



Slika 10. Porasle sivo-bijele kolonije *F. novicida* na BCYE agaru nakon inkubacije na 35 ± 2 °C/24 h.

3.1.1.1. BCYE agar

BCYE agar razvio je Freely sa sur., a zatim modificirao Edelstein s dodatkom α -ketoglutarata radi stimulacije rasta mikroorganizama i veće osjetljivosti medija.

U podlozi se također nalazi ekstrakt kvasca koji osigurava potrebu za vitaminima te dušikom i ugljikom; aktivni ugljen razgrađuje toksični produkt, vodikov peroksid, i veže CO₂; ACES pufer održava normalni pH za rast ($6,9 \pm 0,2$; 25 °C); željezo (III) pirofosfat izvor je željeza, te esencijalna aminokiselina L-cistein.

3.1.2. Dezinficijensi

U provedenom istraživanju koristili smo tri kemijska dezinficijensa, Asepsol eko, Bigvasan i Descocid, u različitim koncentracijama (Asepsol eko, 5%; Bigvasan, 0,2%; Descocid, 1%), čije su aktivne tvari i mehanizam djelovanja na bakterijsku stanicu prethodno opisani.

Podaci o sastavu i namjeni dezinfekcijskih sredstava preuzeti su iz Sigurnosno-tehničkih listi za kemikalije, sukladno Uredbi 1907/2006, koje su dostupne na web stranicama Hrvatskog Zavoda za toksikologiju i antidoping.

3.2. Metode

3.2.1. Priprema bakterijske suspenzije

Sa sterilnom ezom pokupi se određena količina kolonija *F. novicida* poraslih na BCYE ploči te suspendira u 10 mL fiziološke otopine kako bi, nakon izmjerene apsorbancije, dobili bakterijsku suspenziju s otprilike 10^9 CFU/mL.

3.2.1.1. Spektrofotometrijsko određivanje broja bakterija po mililitru suspenzije

Automatskom pipetom potrebno je uzeti 450 μ L pripremljene bakterijske suspenzije i staviti u kivetu za uzorak. Apsorbancija se mjeri na spektrofotometru, uz obaveznu negativnu kontrolu za koju smo koristili 450 μ L fiziološke otopine.

Izmjerena vrijednost iznosila je 1,010 što odgovara broju od 10^9 CFU/mL. Ukoliko je apsorbancija prevelika, suspenziju je potrebno razrijediti s fiziološkom otopinom.

3.2.2. Priprema otopina dezinficijensa

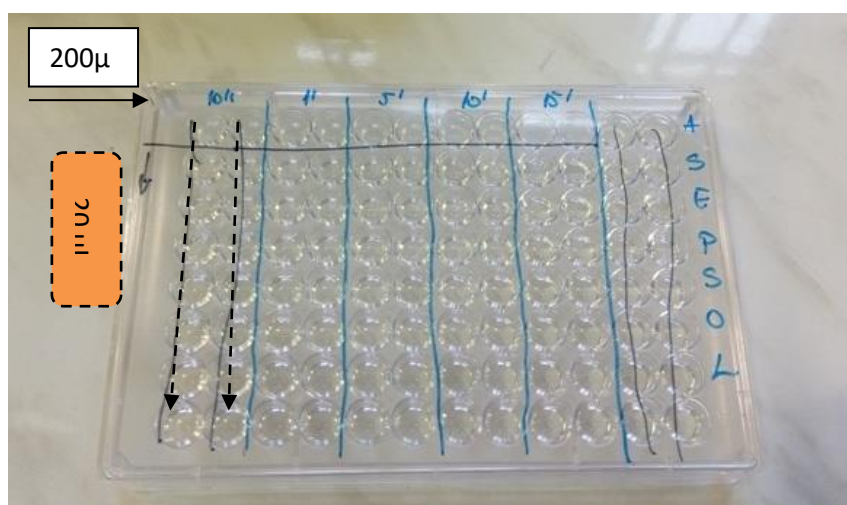
Otopine dezinficijensa pripremle su se razrjeđivanjem određenog volumena koncentrirane otopine s određenim volumenim vodovodne vode kako bi se dobila dezinfekcijska sredstva u koncentracijama: Asepsol eko, 5%; Bigvasan, 0,2%; Descocid, 1%.

3.2.3. Proces ispitivanja odabranih kemijskih dezinficijensa na smanjenje rasta *F. novicida* u ovisnosti o vremenu

Volumen od 0,5 mL, od pripremljenih otopina 5%-tnog Asepsola, 0,2%-tnog Bigvasana i 1%-tnog Descocida, 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.

Prije no što se pomiješa s bakterijom, u mikrotitar pločicama potrebno je u duplikatima pripremiti deseterostruka razrijeđenja na način da se, počevši od drugog reda nadalje, dodaje po 180 μ L fiziološke otopine.

Potom se u epruvetu s 0,5 mL dezinficijensa pomiješa 0,5 mL bakterijske suspenzije 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 μ L prenijeti u prvi red mikrotitar pločice. Time dobivamo nulto razrijeđenje. Zatim se iz prvog reda, pomoću multikanalne pipete, istodobno prebacuje po 20 μ L suspenzije iz reda u red, kako je to pokazano na Slici 11.



Slika 11. 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 μ 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.

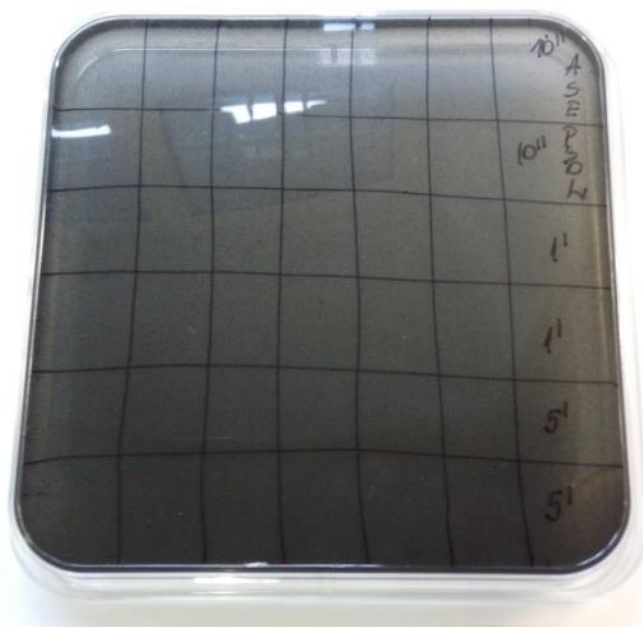
Nasađene ploče inkubiraju se na 35 ± 2 °C kroz 24 sata.

4. REZULTATI

4.1. Određivanje broja kolonija *F. novicida* nakon djelovanja 5%-tnog Asepsola

Nakon završene inkubacije slijedi očitavanje BCYE ploča. Za svaki od korištenih dezinficijensa odredili smo broj poraslih bakterija po mililitru, u ovisnosti o izloženom vremenu djelovanja (10 sekundi, 1 minuta, 5, 10 i 15 minuta).

Naši rezultati pokazuju kao je 5%-tna otopina Asepsola vrlo učinkovita u suzbijanju rasta i razmnožavanja *F. novicida*. Tako ni poslije 10 sekundi izlaganja ovom dezinficijensu, na BCYE agaru ne bilježimo nikakav bakterijski porast (Slika 12).

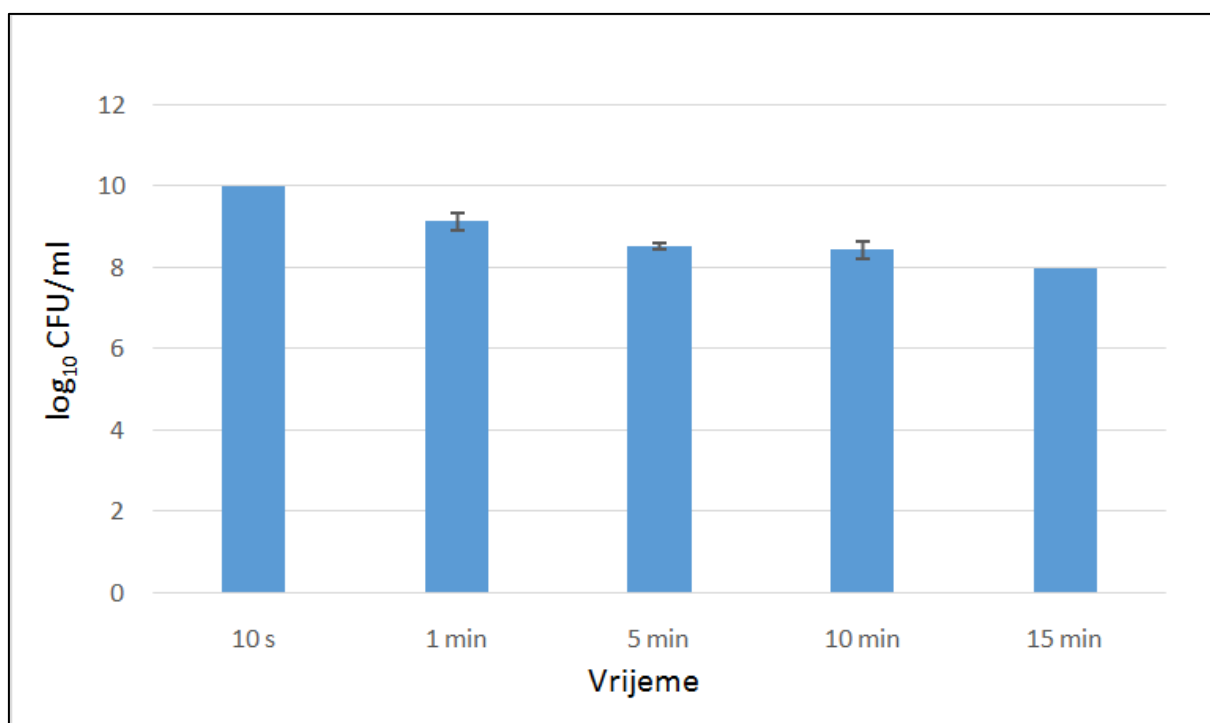


Slika 12. 5%-tni Asepsol; nema porasta *F. novicida* na BCYE ploči nakon 10", 1' i 5'.

Isti učinak vidljiv je u svim razrijeđivanjima i nakon izlaganja bakterije periodu od 1 minute, 5, 10 i 15 minuta.

4.2. Određivanje broja kolonija *F. novicida* nakon djelovanja 0,2%-tnog Bigvasana

Nakon perioda od 10 sekundi bakterije su prisutne u broju od $1 \cdot 10^{10}$ CFU/mL, a poslije 1 minute djelovanja 0,2%-tnog Bigvasana na bakteriju, broj se smanjuje na $1,5 \cdot 10^9$ CFU/mL. U periodu od 5 minuta broj je smanjen na $3,5 \cdot 10^8$ CFU/mL. Nakon 10 minuta iznosio je $3 \cdot 10^8$ CFU/mL te se nastavio polako kontinuirano smanjivati, te je nakon izloženosti od 15 minuta broj bakterija bio $1 \cdot 10^8$ CFU/mL (Slika 13).

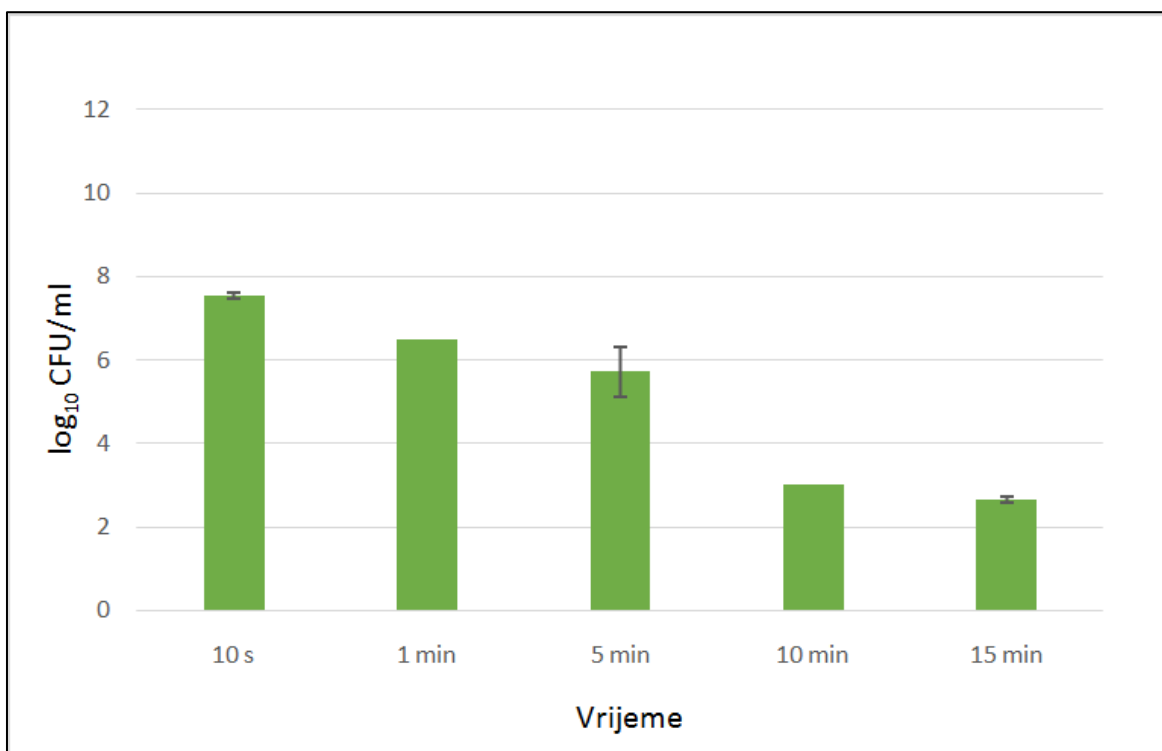


Slika 13. Kinetika rasta *F. novicida* nakon djelovanja 0,2%-tnog Bigvasana u ovisnosti o vremenu. 24-satna bakterijska kultura *F. novicida* s prethodno određenim brojem bakterija (10^9 CFU/mL), u omjeru 1:1, izložena je djelovanju 0,2%-tnog Bigvasana tijekom različitih vremenskih perioda (10", 1', 5', 10' i 15'). U mikrotitar pločicama izrađena su deseterostruka razrjeđenja suspenzije, pojedinačno za svako vrijeme izloženosti, koja su potom pipetom prenesena na označene BCYE ploče i inkubirane 24h/35±2 °C.

4.3. Određivanje broja kolonija *F. novicida* nakon djelovanja 1%-tnog Descocida

Poslije 10 sekundi djelovanja dezinficijensa na bakterijsku suspenziju, broj bakterija iznosio je $3,5 \cdot 10^7$ CFU/mL. Nakon 1 minute bio je $3 \cdot 10^6$ CFU/mL, a poslije izloženosti od 5 minuta broj je pao na $8 \cdot 10^5$ CFU/mL. Dalje, u produljenom vremenu djelovanja, broj bakterija smanjio se za dvije potencije, na $1 \cdot 10^3$ CFU/mL tijekom 10 minuta, dok je nakon 15-minutnog djelovanja broj *F. novicida* iznosio $4,5 \cdot 10^2$ CFU/mL, za prvi i $4,00 \cdot 10^2$ CFU/mL za drugi slijed.

Dobiveni rezultati prikazani su i grafički (Slika 14).



Slika 14. Kinetika rasta *F. novicida* nakon djelovanja 1%-tnog Descocida u ovisnosti o vremenu. 24-satna bakterijska kultura *F. novicida* s prethodno određenim brojem bakterija (10^9 CFU/mL), u omjeru 1:1, izložena je djelovanju 1%-tnog Descocida tijekom različitih vremenskih perioda (10", 1', 5', 10' i 15'). U mikrotitar pločicama izrađena su deseterostruka razrijeđenja suspenzije, pojedinačno za svako vrijeme izloženosti, koja su potom pipetom prenesena na označene BCYE ploče i inkubirane 24h/35±2 °C.

5. RASPRAVA

Avirulentna za zdravog čovjeka, a visoko virulentna za miševe [80], *F. novicida* pogodna je za proučavanje eksperimentalne tularemije zbog uzrokovanja istih simptoma kod miševa kao *F. tularensis* u ljudi. Ova vrsta ne zahtijeva rad u laboratorijima visokog stupnja zaštite. Iz navedenog razloga u posljednje je vrijeme sve češća njena upotreba u različitim znanstvenim proučavanjima.

U našem istraživanju izvrnuli smo 24-satnu bakterijsku kulturu *F. novicida* djelovanju trima dezinficijensa u otopinama različitih koncentracija. Na taj smo način pratili učinak 5%-tnog Asepsola, 0,2%-tnog Bigvasana te 1%-tnog Descocida na smanjenje bakterijskog porasta kroz vrijeme izlaganja od 10 sekundi, 1 minute, 5, 10 i 15 minuta.

Rezultati koje smo očitali nakon inkubacijskog vremena, potvrdili su hipotezu da će svi ispitani dezinficijensi upravo djelovati u smislu reduciranja broja bakterija, zbog njihovih kemijskih supstanci koje su se u dosadašnjim istraživanjima na različitim organizmima pokazale učinkovitima, poput utjecaja PHBM na smanjenje incidencije fagocitoze kod ameba i u uspješnoj primjeni u terapiji *Acanthamoeba* keratitisa [81], te u smanjenju patogenih bakterija koje se koloniziraju i uzrokuju akutne i kronične infekcije rana [82].

Od triju dezinficijensa, otopina Asepsola pokazala je najbolje rezultate, odnosno djelovala je potpuno biocidno na rast i razmnožavanje *F. novicida*. Svoj biocidni učinak Asepsolu daju njegove aktivne tvari – didecildimetilamonijev klorid (DDAC) i izopropilni alkohol.

DDAC pripada kemijskoj skupini kvaternih amonijevih soli V. generacije koje se često koriste u dezinfekcijskim sredstvima. Njihova baktericidna aktivnost zabilježena je kod *E. coli*, *L. pneumophilla*, *L. monocytogenes* i *S. aureus* [83] – uključujući i MRSA soj.

Za 1%-tnu otopinu Descocida broj bakterija nakon inkubacije za 10 sekundi iznosio je $\approx 10^7$ CFU/mL, te se u svakom sljedećem vremenu izlaganja (1 minuta, 5 i 10 minuta) on reducira, te nakon 15 minuta iznosi približno 10^2 CFU/mL. Aktivne tvari u Descocidu također čine kvaterne amonijeve soli. Zbog njihove prisutnosti broj početnih kolonija relativno se brzo smanjuje s $\approx 10^7$ CFU/mL na niskih 10^2 CFU/mL, kroz 15 minuta. Prema proizvođačevoj preporuci, za 1%-tnu radnu otopinu baktericidnog djelovanja, na 1 L vode potrebno je dodati 10 mL koncentrata, tj. 1 mL za 100 mL otopine, a vrijeme izloženosti trebalo bi iznositi 30 minuta. Stoga, ukoliko bi vrijeme izlaganja produljili za još 10 do 15 minuta, pretpostavljamo da bi broj *F. novicida* iznosio 0 CFU/mL.

U rezultatima za 0,25%-tni Bigvasan očitavamo sporiji baktericidni učinak na *F. novicida* u odnosu na preostala dva dezinficijensa. Broj bakterija za 10 sekundi izlaganja iznosio je $\approx 10^{10}$ CFU/mL, a zatim je tijekom naredne 1 minute bio $\approx 10^9$ CFU/mL te kontinuirano nastavio padati na $\approx 10^8$ CFU/mL nakon 5 minuta. Nadalje, u vremenu djelovanja od 10 i 15 minuta broj bakterija se ne mijenja značajno te i dalje iznosi $\approx 10^8$ CFU/mL. Objašnjenje ovakvog ponašanja leži u ključnoj komponenti Bigvasana, poliheksametilen bigvanidu (PHMB). Pri nižim koncentracijama, obično u rang od 1 do 10 mgL⁻¹, gdje ulazi i koncentracija i našeg dezinficijensa, učinak PHMB-a je bakteriostatski, dok je u većim koncentracijama baktericidni. Ipak, baktericidna aktivnost i inhibicija rasta bakterija može biti povećana uslijed povećanja polimeriziranosti molekule PHMB [84,85] koja je zapravo polimer.

Mnoga su istraživanja provedena ispitivajući PHMB na različitim organizmima. Primjerice, tijekom proučavanja biofilmova u zajednici s *E. coli* i *S. epidermidis* primjećeno je kako su spojevi koji imaju visoku aktivnost protiv planktonskih, slobodnoživućih, bakterija [86], uključujući i PHMB, najefektivniji u suzbijanju sesilnih bakterija adheriranih unutar biofilmova [87].

Antimikrobni učinak PHMB demonstriran je i kod slobodnoživućih ameba, *Acanthamoeba hatchetti*, *A. polyphaga* te kod *A. castellanii* [88-90] koja je ujedno i rezervoar *F. tularensis* u okolišu.

Dodatna učinkovitost PHMB Barker i sur. [91] prikazali su u tretmanu pročišćavanja otpadnih voda gdje su testirali djelovanje PHMB na smanjenje rasta *L. pneumophila* u *A. polyphaga*. Ovaj uzročnik legionarske bolesti može biti pronađen u vodenim sustavima, klimatskim uređajima i rashladnim tornjevima. Njihovi podaci pokazali su odlične rezultate u inhibiranju rasta bakterije, ali i *A. polyphaga* kao domaćina[91].

Također, rezultati utjecaja 0,2%PHMB na *E. faecalis*, *P. aeruginosa* i *C. albicans* pokazali su baktericidan učinak kod većine ispitanih uzoraka korijenskog kanala zuba [92].

Rezultati dobiveni našim istraživanjem ukazuju na razlike u dinamici i intenzitetu djelovanja između troje ispitanih dezinficijensa, odnosno između njihovih aktivnih komponenti, kvaternih amonijevih soli i poliheksametilen bigvanida. *F. novicida* pokazuje povećanu osjetljivost na njihovo djelovanje kroz kratko vremensko razdoblje izlaganja, i to izrazito prema kvaternim amonijevim solima.

6. ZAKLJUČAK

Francisella tularensis fakultativni je intracelularni patogen koji izaziva bolest tularemiju. Zbog svoje niske infektivne doze, visoke stope smrtnosti i sposobnosti raspršivanja aerosolom, i danas se smatra potencijalnim bioterorističkim oružjem. Našim istraživanjem učinka kemijskih dezinficijensa na smanjenje rasta *F. novicida*, došli smo do zaključka kako najbolju baktericidnu funkciju ima 5%-tni Asepsol eko nakon čijeg djelovanja nema nikakvog porasta kolonija. Zatim ga slijede 1%-tni Descocid koji porasle kolonije vrlo brzo reducira, te 0,2%-tni Bigvasan čiji se bakteriostatski učinak pri ovoj koncentraciji pokazao slabijim, ali ipak efektnim u smislu da je početni broj izraslih kolonija reducirao.

Glavne komponente naših dezinficijensa, kvaterne amonijeve soli i poliheksametilen bigvanid, dosad nisu ispitani na rodu *Francisella* te bi podaci dobiveni ovim istraživanjem mogli poslužiti za buduća istraživanja mehanizama njihovog djelovanja na ovu bakteriju i njen okoliš.

7. LITERATURA

- [1] **Clarridge, J. E., III, T. J. Raich, A. Sjostedt, G. Sandstrom, R. O. Darouiche, R. M. Shawar, P. R. Georghiou, C. Osting, and L. Vo.** 1996. Characterization of two unusual clinically significant *Francisella* strains. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1995-2000.
- [2] **Karakašević B.** Mikrobiologija i parazitologija. 4. Izdanje. Beograd – Zagreb: *Medicinska knjiga*.
- [3] **Foshay, L.** (1950). Tularemia. *Annu Rev Microbiol* **4**, 131-330.
- [4] **Morner T, Addison E.** Tularemia. In: infectious disease of wild animals. E. S. Williams & I. K. Barker 2001;303-312.
- [5] **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.
- [6] **Francis, E.** (1927). Microscopic changes of tularemia in the tick *Dermacentor andersoni* and the bedbug *Cimex lectularius*. *Public Health Rep* **42**, 2763-2772.
- [7] **Dorefe'ev, K. A.** (1947). Classification of the causative agent of tularemia. *Symp Res Works Inst Epidemiol Mikrobiol Chita* **1**, 170-180.
- [8] **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.
- [9] **Petersen JM, Carlson J, Yockey B, Pillai S, Kuske C, Garbalena G, Pottumarthy S, Chalcraft L.** (2009). Direct isolation of *Francisella* spp. from environmental samples. *Lett Appl Microbiol.* 48(6):663-7.

- [10] **Whitehouse CA, Kesterson KE, Duncan DD, Eshoo MW, Wolcott M.** (2012). Identification and characterization of *Francisella* species from natural warm springs in Utah, USA. *Lett Appl Microbiol.* 54(4):313-24.
- [11] **Owen, C.R., Buker, E. O., Jellison, W.L., Lackman, D.B., Bell, J.F.,** (1964). Comparative studies of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *Journal of Bacteriology.* **87** (3): 676–683.
- [12] **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.
- [13] **Gallagher, L.A., McKeivitt, M., Ramage, E.R., Manoel, C.** (2008). Genetic dissection of the *Francisella novicida* restriction barrier. *J Bacteriol.* 190(23):7830-7.
- [14] **Whipp, M. J., Davis, J.M., Lum, G., de Boer, J., Zhou, Y., Bearden, S.W., Petersen, J. M., Chu, M. C. & Hogg, G.** Characterization of a *novicida* like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *J of Med Microbiol* (2003), **52**: 839-842.
- [15] **Farlow, J., Wagner, D. M., Dukerich, M., Stanley, M., Chu, M., Kubota, K., Petersen, J. & Keim, P.** *Francisella tularensis* in the United States. *Emerg Inf Diseases* (2005), **11**.
- [16] **Gurycova, D.** 1998. First isolation of *Francisella tularensis* in Europe. *Eur. J. Epidemiol.* **14**: 797-802.
- [17] **Jellison, W.L.,** Tularemia in North America, 1930-1974. *Missoula (MT): University of Montana*; 1974.
- [18] **Hayes E, Marshall S, Dennis D, Feldman K.** Tularemia-United States, 1990-2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002; **51**:181-184.

- [19] **Dienst, J., F. T.** 1963. Tularemia- a perusal of three hundred thirty nine cases. *J. La. State Med. Soc.* **115**: 114-127.
- [20] **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.
- [21] **Lundstrom, J. O., Andersson, A. C., Backman, S., Schafer, M. L., Forsman, M., Thelaus, J.** Transstadial Transmission of *Francisella tularensis holartica* in Mosquitoes, Sweden. *Emerg infect Dis.* **17**; 2011.
- [22] **Thelaus, J., Andersson, A., Broman, T., Backman, S., Granberg, M., Karlsson, L., Kuoppa, K., Larsson, E., Lundstrom, J.O., Mathisen, P., Naslund, J., Schafer, M., Wahab, T., Forsman, M.** *Francisella tularensis* subsp. *holartica* Occurs in Swedish Mosquitoes, Persist Throuhg the developmental Stages of Laboratory-Infected Mosquitoes and Is Transmissible During Blood Feeding. *Microb Ecol* (2014) **67**; 96-107.
- [23] **S. Cavalli-Bjorkman Hellstorm** (2013). *Francisella tularensis* subsp. *holartica*: The Curious Case of a Water – and Mosquito Associated Bacterium in Sweden. SLU.
- [24] **Ulu Kilic A, Kilic S, Sencan I, Cicek Senturk G, Gurbuz Y, Tutuncu EE, Celebi B, Kiciman O, Ergonul O.** A water- bone tularemia outbreak caused by *Francisella tularensis* subsp. *holartica* in Central Anatolia region. *Mikrobiyol Bul.* 2011.
- [25] **Olsufjev, N. G., Mescheryakova, I. S..** 1983. Subspecific taxonomy of *Francisella tularensis*. *Int J Syst Bacteriol.* **33**: 872-874.
- [26] **Clarridge, J. E., III, T. J. Raich, A. Sjostedt, G. Sandstrom, R. O. Darouiche, R. M. Shawar, P. R. Georghiou, C. Osting, and L. Vo.** 1996. Characterization of two unusual clinically significant *Francisella* strains. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1995-2000.

- [27] **Hollis, D. G., Weaver, R. E., Steigerwalt, A. G., Wenger, J. D., Moss, C. W., Brenner, D. J.** *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.
- [28] **CFSPH. Iowa State University.** Tularemia. 2009.
- [29] **Mihaljević, F., Fališevac, J., Bezjak, B., Mravunac, B.** Specijalna klinička infektologija. **8 izdanje.** Zagreb: Medicinska naklada, 1994.
- [30] **Sviben, M., Horvat-Krejči, D., Mlinarić Missoni, E.,** Infekcije uzorkovane slobodnoživućim amebama – etiologija, kliničke osobitosti, dijagnostika, terapija i prevencija. *Medicina* 2007;**43**:27-33.
- [31] **Brett M, Doppalapudi A, Respicio-Kingry LB, Myers D, Husband B, Pollard K, Mead P, Petersen JM, Whitener CJ (2012).** *Francisella novicida* bacteremia after a near-drowning accident. *J Clin Microbiol.* 50(8):2826-9.
- [32] **Leelaporn A, Yongyod S, Limsrivanichakorn S, Yungyuen T, Kiratisin P (2008).** *Francisella novicida* bacteremia, Thailand. *Emerg Infect Dis.* 14(12):1935-7.
- [33] **Respicio-Kingry L. B., Yockey M., Yendell B., Ratard S., Hand R., Balsamo J., et al.** (2012). Laboratory analysis of a *Francisella novicida* outbreak among prisoners at a Louisiana correctional facility, 2011, in 7th International Conference on Tularemia (Breckenridge, Colorado:).
- [34] **Shaun, S.; Brunton, J., Ziehr, B., Taft-Benz, S., Moorman, N., Kawula, T..** *F. tularensis* Harvest Nutrients Derived via ATG5-Independend Autophagy to Support Intracellular Growth. *PLOS. Pathogens.* 2013. **9**; 8.

- [35] **Deretic, V., Levine, B.** (2009). Autophagy, immunity and microbial adaptations. *Cell Host Microbe* **5(6)**: 527-549.
- [36] **Meijer, A.J., Codogno, P.**, (2011). Autophagy: Regulation by energy sensing. *Curr Biol* **21(6)**: R227-229.
- [37] **Keim, P., Johansson, A., Wagner, D. M.** (2007) Molecular epidemiology, evolution and ecology of *Francisella*. *Ann N Y Acad Sci* **1105**: 30-66.
- [38] **Saslaw, S., Eigelsbach, H. T., Prior, J. A., Wilson, H. E., Carhart, S.** (1961) Tularemia vaccine study. II respiratory challenge. *Arch Intern Med* **107**: 702-714.
- [39] **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.
- [40] **Chong, A., Celli, J.** The *Francisella* intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. *Frontiers in Microbiol.* 2010. (1) 138.
- [41] **Šantić, M., Molmeret, M., Abu Kwaik, J.** 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* (2005) **7(7)**, 957-967.
- [42] **Baron, G. S., Francis, E. N.** MglA and MglB are required for the intramacrophage growth of *Francisella novicida*. *Mol Microbiol* (1998) **29(1)**, 247-259.
- [43] **Lauriano, C. M., Barker, J. R., Francis, E. N., Arulanandam, B. P., Hassett, D. J., Klose, K. E.** MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. *PNAS.* (2004)**111(12)**, 4246-4249.

- [44] **Ojeda, S. S., Mares, C. A., Alvarez, J. I., Qun Li, Orihuela, C. J., Teale, J. M.** Virulence factors involved in passage of *Francisella tularensis* subsp. *novicida* through an air blood barrier model. *Bioterr Biodef.* 2011, S3.
- [45] **Maggio, S., Takeda, K., Stark, F., Meierovics, A. I., Yabe, I., Cowley, S. C.** Control of *Francisella tularensis* intracellular growth by pulmonary epithelial cells. *PLOS ONE* (2015).
- [46] **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.
- [47] **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.
- [48] **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.
- [49] **Bingle, L.E., Bailey, C.M., Pallen, M.J.** (2008) Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr Opin Microbiol* **11**(1): 3–8.
- [50] **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.
- [51] **Lauriano, C. M., et al.** (2004). MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intramacrophage and intramacrophage survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**:4246–4249.

- [52] **Santic, M., et al.** (2005). The *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IgIC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm. *Cell. Microbiol.* 7: 969–979.
- [53] **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.
- [54] **Monique L. Van Hoek** (2013). Biofilms- an advancement in our understanding of *Francisella* species. *Virulence.* 4(8): 833-846.
- [55] **Lau G. W., Hassett D. J., Britigan B. E.** (2005). Modulation of lung epithelial functions by *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends Microbiol.* **13**: 389-397.
- [56] **Saslaw, S., Eigelsbach, H. T., Prior, J. A., et al.** (1961). Tularemia vaccine study. II. Respiratory challenge. *Archives of Internal Medicine.* **107**: 702-714.
- [57] **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.
- [58] **Chu, P., Cunningham, A. L., Yu, J-J., Nbuyen, J.Q., et al.** (2014). Live Attenuated *Francisella novicida* vaccine protects against *Francisella tularensis* pulmonary challenge in rats and non- human primates. *PLOS Pathogens.* 10(10).
- [59] **Johansson, A., Berglund, L., et al.** (2000). Ciprofloxacin for treatment of tularemia in children. *Pediatr Infect Dis J.* 19(5):449-53.
- [60] **Johansson A, Urich SK, et al.** (2002). *In vitro* susceptibility to quinolones of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *Scand J Infect Dis.* 34(5):327-30.

- [61] **Enderlin, G., et al.** (1994). Streptomycin and alternative agents for the treatment of tularemia: review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 19: 42-47.
- [62] **Maurin, M., et al.** (2000). Bactericidal activities of antibiotic against intracellular *Francisella tularensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(12): 3428-3431.
- [63] **Tulkens, P., Trouet, A.** (1978). The uptake and intracellular accumulation of aminoglycoside antibiotics in lysosomes of cultured rat fibroblasts. *Biochem. Pharmacol.* 27: 415-424.
- [64] **Ikaheimo, I., et al.** (2000). *In vitro* antibiotic susceptibility of *F. tularensis* isolated from humans and animals. *J. of Antimicrob. Chemoth.* 46(2): 287-290.
- [65] **Stoenner, H., et al.** (1980). CRC Handbook series in zoonoses section A: Bacterial, Rickettsial and Mycotic diseases; **Bell, J. F.:** Tularemia. *CRC press, Boca Raton, Florida, SAD.* 1. izdanje: 161-193.
- [66] **Baron, S. D., et al.** (2007). Inactivated *F. tularensis* LVS protects against respiratory tularemia by intranasal vaccination in an immunoglobulin A-dependent fashion. *ASM.* 75: 2151-2162.
- [67] **Motarjem, Y., Moy, G., Todd, E.** (2014). Encyclopedia of Food Safety. *Elsevier, Inc.* 1. izdanje: 442-444.
- [68] **Volner, Z.** (2008). Opća medicinska mikrobiologija s epidemiologijom i imunologijom. *Školska knjiga, Zagreb.* 5. izdanje: 108-114.
- [69] **Boethling, R. S, Lynch, D. G.** (1992). Quaternary ammonium surfactants. In Oude, N. T. And Hutzinger, O., Anthropogenic compounds. Detergents. *The Handbook of Environm. Chemistry.* 3: 144-177.

- [70] **Scheraga, D.** (1998). On the positive side with cationic surfactants. *Chem. Mark. Rep.*
- [71] **Nagamune, H., Maeda, T., Ohkura, K., et al.** (2000). Evaluation of the cytotoxic effects of bis-quaternary ammonium antimicrobial reagents on human cells. *Toxicol. In vitro.* **14**:139-147.
- [72] **Xia, W. J., (2000) Onyuksel, H. H. (2000).** Mechanistic studies on surfactant induced membrane permeability enhancement. *Pharm. Res.* **17**:612-618.
- [73] **Ostrumov, S. A.** (2006). Biological effects of surfactants. *CRC Press*, Boca Raton, FL.
- [74] **Deutschle, T., Porkert, U. Reiter, R., et al.** (2006). *In vitro* genotoxicity and cytotoxicity of benzalkonium chloride. *Toxicol. In Vitro.* **20**: 1472-1477.
- [75] **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.
- [76] **Mulder, G. D., Cavorsi, J. P., Lee, D. K.** (2007). Polyhexamethylene biguanide (PHMB): an addendum to current topical antimicrobials. *Wounds.* **19**: 173-182.
- [77] **Allen, M. J., White, G. F., Morby, A. P.** (2006). The response of *Escherichia coli* to the biocide polyhexamethylene biguanide. *Microbiology.* **154**: 4, 989-1000.
- [78] **Schnuch, A., Geier, J., Uter, W, et al.** (2007). The biocide polyhexamethylene biguanide remains an uncommon contact allergen. *Contact Dermatitis.* **56**(4): 235-239.
- [79] **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.

- [80] **Semić, V., Brezovec, M., Lazarić, I., Šantić, M.** (2009). Ekologija, domaćini i vektori bakterije *Francisella tularensis*. *Medicina*. **45**(2): 154-159.
- [81] **Judith A., et al.** (2002). Phagocytosis affects biguanide sensitivity of *Acanthamoeba* spp.. *Antimicrob. Agents and Chemoth.* 46(7): 2069-2076.
- [82] **Eberlen, T., Assadian, O.** (2010). Clinical use of polihexanide on acute and chronic wounds for antisepsis and decontamination. *Skin Pharmacol Physiol*. 23(1): 45-51.
- [83] **Kim, C. H., Choi, J. W., Chun, H. J., et al.** (1997). Synthesis of chitosan derivatives whit quaternary ammonium salt and their antibacterial activity. *Polymer Bulletin*. 38: 387-393.
- [84] **Broxton, P., Woodcock, P. M., Gilbert, P.** (1983). A study of the antibacterial activity of some polyhexamethylene biguanides towards *Escherichia coli* ATCC 8739. *J Appl Bacteriol*. 54: 345-353.
- [85] **Gilbert, P., Pemberton, D., Wilkinson, D. E.** (1990). Barrier properties of the Gram-negative cell envelope towards high molecular weight polyhexamethylene biguanides. *J Appl Bacteriol*. 69: 585-592.
- [86] **World of Microbiology and immunology** (2003). Plancton and Planctonic Bacteria. <http://www.encyclopedia.com>; Pristupljeno 06.07.2016.
- [87] **Gilbert, P. Das, J. R., Jones, M. V., et al.** (2001). Assessment of resistance towards biocides following the attachment to micro-organisms to, and growth on surfaces. *J Appl Microbiol*. 91(2): 248-254.
- [88] **Hughes, R., Heaselgrave, W., Kilvington, S.** (2003). *Acanthamoeba polyphaga* strain age methos of cyst production influence the observed efficacy of therapeutic agents and concant lens disinfectants. *Antimicrob agents Chemother*. **47**(10): 3080-3084.

- [89] **Burger, R. M., Franco, R. J., Drilica, K.** (1994). Killing *Acanthamoebae* with polyaminopropyl biguanide: quantitation and kinetics. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**(4): 886-888.
- [90] **Hiti, K., Walochnik, J., et al.** (2002). Viability of *Acanthamoeba* after exposure to a multipurpose disinfecting contact lens solution and two hydrogen peroxide systems. *Br J Ophthalmol.* **86**(2): 144-146.
- [91] **Barker, J., Brown, M .R., et al.** (1992). Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl Env Microbiol.* **58**(8): 2420-2425.
- [92] **Medvedec Mikić, I., Tambić Andrašević, A., i sur.** (2013). Utjecaj poliheksametilenova bigvanida na mikroorganizme u korijenskom kanalu zuba, *Acta stomatol Croat.* **47**(2): 120-126.

8. ŽIVOTOPIS

Datum i mjesto rođenja:

29. studenog 1993., Rijeka, Republika Hrvatska

Obrazovanje:

2000. – 2008.: Osnovna škola „Čavle“, Čavle

2008. – 2012.: Medicinska škola u Rijeci; smjer Sanitarni tehničar

2013. – 2016.: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci; Preddiplomski Sveučilišni studij
Sanitarnog inženjerstva