

ISTRAŽIVANJE MEHANIZAMA REZISTENCIJE NA ANTIMIKROBNE LIJEKOVE U ŽIVOTINJSKIH IZOLATA BAKTERIJA IZ RODA ENTEROCOCCUS

Tumpa, Andrea

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:104200>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)





Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Andrea Tumpa

**ISTRAŽIVANJE MEHANIZAMA
REZISTENCIJE NA ANTIMIKROBNE
LIJEKOVE U ŽIVOTINJSKIH IZOLATA
BAKTERIJA IZ RODA *ENTEROCOCCUS***

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Andrea Tumpa

**ANTIMICROBIAL RESISTANCE
MECHANISMS OF BACTERIA WITHIN THE
GENUS *ENTEROCOCCUS* ISOLATED
FROM ANIMALS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2022



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

ANDREA TUMPA

**ISTRAŽIVANJE MEHANIZAMA
REZISTENCIJE NA ANTIMIKROBNE
LIJEKOVE U ŽIVOTINJSKIH IZOLATA
BAKTERIJA IZ RODA *ENTEROCOCCUS***

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Doc. dr. sc. Selma Pintarić

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Andrea Tumpa

**ANTIMICROBIAL RESISTANCE
MECHANISMS OF BACTERIA WITHIN THE
GENUS *ENTEROCOCCUS* ISOLATED
FROM ANIMALS**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Selma Pintarić, DVM, Assistant Professor

Zagreb, 2022



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

IZJAVA

Ja, Andrea Tumpa, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima do onih navedenih u radu.

Zagreb, 2022.

O MENTORICI

Doc. dr. sc. Selma Pintarić (rođena Mekić) rođena je u Zagrebu 17. listopada 1981. godine. Nakon završene Prve gimnazije u Zagrebu 2000. godine upisala je Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu gdje je diplomirala 2007. godine. Iste godine započinje vježbenički staž u Veterinarskoj stanici Jastrebarsko, a završava ga u Veterinarskoj ambulanti Plavi križ u Zagrebu godinu dana kasnije.

U rujnu 2008. godine zaposlena je na mjestu znanstvenog novaka na projektu „Mikoplazmoze i neke uvjetovane infektivne bolesti životinja“ voditeljice prof. dr. sc. Branke Šeol Martinec u Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Početkom 2009. godine upisala je doktorski studij iz veterinarskih znanosti u sklopu kojeg je izradila doktorsku disertaciju pod nazivom „Istraživanje mehanizama rezistencije na aminoglikozide i fluorokinolone u izolata bakterije *Pseudomonas aeruginosa* izdvojenih iz pasa“. Doktorirala je 2015. godine te je izabrana u zvanje više asistentice, a u znanstveno-nastavno zvanje docentice 2018. godine.

Aktivno sudjeluje u izvedbi nastave integriranog preddiplomskog i diplomskog studija iz tri obvezna kolegija na hrvatskom jeziku te dva obvezna kolegija na engleskom jeziku. Mentorica je dva doktorska rada na doktorskom studiju iz veterinarskih znanosti. Sudjeluje u radu Bakteriološkog laboratorija Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom. Svoje znanje u provedbi dijagnostičkih postupaka stekla je na znanstveno-stručnim usavršavanjima u Hrvatskom veterinarskom institutu i Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb.

Autorica je više znanstvenih i stručnih radova te je sudjelovala u više izlaganja na međunarodnim i domaćim znanstveno-stručnim skupovima. Jedna je od prevoditelja udžbenika Sveučilišta u Zagrebu „Veterinarska imunologija, Načela i primjena“ koji se koristi u nastavi obveznog kolegija „Veterinarska imunologija“. Znanstvena djelatnost doc. dr. sc. Selme Pintarić vezana je uz bakteriologiju. Uže područje njezinog znanstvenog djelovanja obuhvaća istraživanje različitih uvjetno patogenih mikroorganizama i mehanizama rezistencije mikroorganizama na antimikrobne lijekove. Rezultati tih istraživanja značajno doprinose poznavanju osjetljivosti pojedinih bakterija na antimikrobne lijekove i pojavi rezistencije na području Republike Hrvatske s naglaskom na koncept „Jedno zdravlje“.

PUBLIKACIJE U PROTEKLIH PET GODINA:

TUMPA, A., B. ŠEOL MARTINEC, Z. ŠTRITOF, S. PINTARIĆ (2021): Comparison of species-specific multiplex PCR and API 20 Strep for the identification of veterinary clinical *Enterococcus* isolates. *Acta Microbiol. Imm. H.* 68, 1; 124-124.

KAJMIĆ, A., A. JUTRIŠA, V. MOJČEC PERKO, J. HABUŠ, S. HAĐINA, S. PINTARIĆ, V. STEVANOVIĆ, M. PERHARIĆ, K. MARTINKOVIĆ, I. ZEČEVIĆ, M. CVETNIĆ, I. BENVIN, Z. ŠTRITOF (2021): High carriage rate of methicillin-resistant staphylococci in small animal veterinary clinicians – indirect evidence of zoonotic transmission. 9th International Congress Veterinary Science and Profession - Book of Abstracts, 9 October, Zagreb, Hrvatska, str. 46-46.

CVETNIĆ, M., V. MOJČEC PERKO, D. BROZIĆ, S. PINTARIĆ, S. HAĐINA, J. HABUŠ, V. STEVANOVIĆ, M. PERHARIĆ, K. MARTINKOVIĆ, I. ZEČEVIĆ, I. BENVIN, Z. ŠTRITOF (2021): Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter upsaliensis* isolated from dog feces. 9th International Congress Veterinary Science and Profession - Book of Abstracts, 9 October, Zagreb, Hrvatska, str. 45-45.

TUMPA, A., Z. ŠTRITOF, S. PINTARIĆ (2021): Incidence of infections caused by *Enterococcus* spp. in animals. 9th International Congress Veterinary Science and Profession - Book of Abstracts, 9 October, Zagreb, Croatia, str. 55-55.

HADŽIĆ, L., B. ŠEOL MARTINEC, S. PINTARIĆ (2021): Beta-laktamaze proširenog spektra bakterije *Escherichia coli*. *Hrvatski veterinarski vjesnik - Hrvatska veterinarska komora.* 29, 28-36.

TUMPA, A., B. ŠEOL MARTINEC, Z. ŠTRITOF, S. PINTARIĆ (2021): Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* strains isolated from clinical samples of cats and dogs. 2nd International Conference on “Theme: Recent Advancements in Treatment, Control and Elimination of Infectious Diseases, 05-06 March, Washington, SAD, str. 30-30.

ŠTRITOF, Z., R. MATIĆ, S. HAĐINA, J. HABUŠ, S. PINTARIĆ, M. PERHARIĆ, M. CVETNIĆ (2021): Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with respiratory disease. FEMS Online Conference on Microbiology: Electronic Abstract Book, 28-31 October, Beograd, Serbia, str. 5-5.

BRUKETA, T., T. AUGUSTIN, S. PINTARIĆ, B. ŠEOL MARTINEC; I. DOBRIĆ, B. BAKOTA (2019): Pilot Study: Internally Cooled Ortopedic Drills - Standard Sterilization is not Enough?. Acta Clin. Croat. 58, 379-385.

GALOVIĆ, M., B. ŠEOL MARTINEC, S. PINTARIĆ (2019): Mikoplazme pasa. Hrvatski veterinarski vjesnik - Hrvatska veterinarska komora. 27, 64-72.

GALOVIĆ, MIHAEL (2018): Mikoplazme pasa. Diplomski rad, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

PINTARIĆ, S., B. ŠEOL MARTINEC (2018): Rezistencija enterokoka na antibiotike i preporuke za liječenje. Veterinarska stanica. 49, 105-116.

PINTARIĆ, S., L. ŠPELIĆ, K. ZUBAK NOVAK, L. HADŽIĆ, B. ŠEOL MARTINEC (2017): Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from dogs. Book of Abstracts of the 7th International Congress "Veterinary Science and Profession". Brkljača Botegarro, Nika; Zdolec, Nevijo; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb; Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, str. 56-56.

PINTARIĆ, S., K. MATANOVIĆ, B. ŠEOL MARTINEC (2017): Fluoroquinolone susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs - comparing disk diffusion and microdilution methods. Vet. Arhiv. 87, 291-300.

Zahvale

Zahvaljujem prof. dr. sc. Branki Šeol Martinec na ukazanom povjerenju u jednom od najtežih trenutaka u mojem akademskom životu. Veliko joj hvala što me upoznala s doc. dr. sc. Selmom Pintarić i time mi omogućila znanstveni rad u mikrobiologiji, pa tako i izradu ovog doktorskog rada.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Zrinki Štritof što mi je omogućila boravak te samostalan i neometan rad u bakteriološkom laboratoriju. Od srca zahvaljujem i ostalim djelatnicima Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, koji su me tako lijepo i srdačno prihvatili. Hvala vam na svakoj toploj riječi, na svakom osmijehu, podijeljenom ručku, kavi... Posebno hvala Mariji, Vesni, Maji i Petri, bez vas velik dio ovoga ne bi bio moguć. Učinile ste mi protekle dvije i pol godine predivnim i nezaboravnim iskustvom!

Najveće hvala, potpuno zasluženno, ide mojoj mentorici doc. dr. sc. Selmi Pintarić. Veliko hvala što si se odlučila na našu suradnju i prihvatila me „pod svoje“ te mi otkrila nove čari i zanimljivosti mikrobiologije. Hvala na strpljenju, potpori i razumijevanju u napetim trenutcima te na smijehu i pričama iz života, bez kojih mi je danas teško zamisliti dan. Hvala ti što si bila uz mene i omogućila mi da napredujem i sazrijem, ne samo u akademskom već i u životnom pogledu. Naše zajedničko putovanje zauvijek će mi ostati u posebnom sjećanju, a zbog tebe i s tobom, sve bih to i ponovila!

Veliko hvala i cijeloj mojoj obitelji, Mateju i svim dragim prijateljima koji su mi bili neizostavna podrška svih ovih godina!

SAŽETAK

ISTRAŽIVANJE MEHANIZAMA REZISTENCIJE NA ANTIMIKROBNE LIJEKOVE U ŽIVOTINJSKIH IZOLATA BAKTERIJA IZ RODA *ENTEROCOCCUS*

Za ovo istraživanje prikupljeno je 100 izolata bakterija roda *Enterococcus* porijeklom iz kliničkih uzoraka domaćih životinja, većinom pasa (66) i mačaka (22). Najveći broj izolata izdvojen je iz uzoraka urina (34) i obrisaka zvučnog voda (16). U daljnje istraživanje uključeni su izolati identificirani kao *Enterococcus faecium* (21 izolat) i *Enterococcus faecalis* (62 izolata).

Kirby-Bauer disk-difuzijskim postupkom istražila se osjetljivost izolata navedenih vrsta na sljedeće antimikrobne lijekove: penicilin, ampicilin, vankomicin, enrofloksacin, ciprofloksacin, nitrofurantoin, rifampicin, tetraciklin, kloramfenikol, streptomycin i gentamicin. Streptomycin i gentamicin korišteni su za detekciju izolata s rezistencijom visokog stupnja na aminoglikozide. Najveći broj izolata bio je rezistentan na enrofloksacin i rifampicin (83 %), a najmanje izolata bilo je rezistentno na kloramfenikol (12 %). Rezistencija na vankomicin bila je prisutna u 23 % izolata, a 17 % posjedovalo je rezistenciju visokog stupnja na aminoglikozide. Vrsta *E. faecium* bila je rezistentna na više skupina lijekova od *E. faecalis*, a značajna razlika dokazana je u broju rezistentnih izolata na penicilin, ampicilin, ciprofloksacin, nitrofurantoin i tetraciklin.

Kod svih izolata rezistentnih na vankomicin i tetraciklin te onih s rezistencijom visokog stupnja na aminoglikozide, istražen je mehanizam rezistencije. Kod tri od 19 izolata rezistentnih na vankomicin dokazana je prisutnost *vanA* i *vanB* gena. Gen *tetM* bio je prisutan u 49 od 50 tetraciklin rezistentnih izolata, a gen *tetL* u njih 16. Izolati s rezistencijom visokog stupnja na gentamicin bili su pozitivni na gene *aph(3')-IIIa* i *aac(6)-Ie-aph(2'')-Ia*, dok su izolati s rezistencijom visokog stupnja na streptomycin bili pozitivni na gene *aph(3')-IIIa* i *ant(6)-Ia*.

Ključne riječi: enterokoki, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, domaće životinje, rezistencija, vankomicin

EXTENDED ABSTRACT

ANTIMICROBIAL RESISTANCE MECHANISMS OF BACTERIA WITHIN THE GENUS *ENTEROCOCCUS* ISOLATED FROM ANIMALS

Introduction: Bacteria belonging to the genus *Enterococcus* are extremely hardy and widely distributed in a variety of environmental habitats such as soil, sediments, beach sand, water, aquatic and terrestrial vegetation. In addition, enterococci are common inhabitants of the gastrointestinal tract of many animals, from insects to humans, as well as common opportunistic pathogens. Enterococci cause a number of infections in humans and animals; including urinary tract infections, mastitis, endocarditis, meningitis, intra-abdominal and wound infections. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* are the most prevalent species found in clinical samples, but also food and environmental specimens.

Enterococci are intrinsically resistant to several commonly used antimicrobial drugs. At the same time, they have a great capacity to acquire new resistance mechanisms that can lead to selection of multidrug-resistant isolates that can only be partially treated with currently available antimicrobial agents. In the last three decades, vancomycin-resistant strains have become particularly prominent in human medicine, becoming one of the leading causes of nosocomial infections. The World Health Organization has included *E. faecium* to the list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Enterococci are also becoming more common causative agents among the infections in animals, particularly in recurrent urinary tract infections.

Treatment of enterococcal infections can be challenging and complicated by the multidrug-resistant isolates and biofilm formation. There are several different therapeutic strategies available in human medicine, depending on the complexity of the infection or the species causing it; however, ideal and effective therapy does not exist. Fewer drugs are available in veterinary medicine, and optimal therapeutic strategies for patients with enterococcal infections are undefined.

As it seems, enterococci can develop resistance to any drug or combination of drugs used against them. Consequently, inappropriate and excessive use of antimicrobials leads to further selection of resistant bacterial strains. Transfer of resistant enterococci between animals and humans has already been observed, as well as the presence of enterococcal genes for multi-drug resistance in different gut bacteria in humans. Considering the close contact between

humans and animals, surveillance and control measures are crucial to prevent transmission of resistant enterococci from animals to humans. Since there are no new antimicrobials available, special attention should be paid to protect public health within one health continuum.

The aim of this study is to investigate the prevalence and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* species isolated from various clinical samples of domestic animals in Croatia. Secondly, to determine the mechanisms of resistance in isolates resistant to vancomycin, tetracycline or aminoglycosides.

Material and methods: One hundred *Enterococcus* isolates were isolated in the bacteriological laboratory at the Department for Microbiology and Infectious Diseases with Clinic at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb in the period from January 2016 until the end of September 2021. Isolates were recovered from various domestic animal samples, mostly from urine and ear swabs, followed by vagina, wound, nose and skin swabs. Most of the samples were from dogs and cats, and several samples were from pet rodents and farm animals (horses, cows, sheep, and goat).

Identification of the genus *Enterococcus* was carried out according to the procedure described by Markey et al. (2013). All isolates were tested in reaction with hydrogen peroxide, to demonstrate the absence of catalase. Furthermore, to distinguish members of the genus enterococcus from other gram-positive catalase-negative cocci, isolates were cultured on kanamycin-aesculin agar. Grey colonies with black surrounding area were considered to be enterococci. Multiplex PCR method with primers for species specific *ddl* genes was used to identify *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. Only isolates identified as *E. faecalis* and *E. faecium* were selected for further research.

Antimicrobial susceptibility of both species was determined by Kirby-Bauer disk-diffusion assay for eleven antimicrobials: penicillin, ampicillin, vancomycin, nitrofurantoin, rifampicin, tetracycline, chloramphenicol, enrofloxacin, ciprofloxacin, streptomycin and gentamicin. Streptomycin (300 µg) and gentamicin (120 µg) were used to test high-level aminoglycoside resistance. *E. faecalis* ATCC® 29212 was included in the study as a control strain. Inhibition zone diameters were interpreted according to criteria recommended in the Clinical and Laboratory Standards Institute document (CLSI, 2015).

Detection of mechanisms responsible for vancomycin, tetracyclin and aminoglycoside resistance was performed using molecular methods. Multiplex PCR was used for testing the vancomycin-resistant and tetracycline-resistant isolates. For detection of resistance mechanisms, the following genes were examined: *vanA* and *vanB*, as well as *tetL* and *tetM* in the case of vancomycin and tetracycline, respectively. In aminoglycoside-resistant isolates PCR screening for genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes *aph(3')-IIIa*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* and *ant(6)-Ia* was carried out.

For statistical analyses STATISTICA v.13.5 (Statistica, Inc., 2020) program was used. Fisher exact test was used to compare the differences between *E. faecium* and *E. faecalis* isolates, including differences in frequency of the species among isolates, in susceptibility to antimicrobial agents and in number of multidrug and high-level aminoglycoside resistant isolates.

Results: Isolates were mostly recovered from urine (34%) and ear swab (16%) samples and the majority were from dogs (66%) and cats (22%). Among 100 *Enterococcus* spp. isolates, 62 isolates were identified as *Enterococcus faecalis* and 21 as *Enterococcus faecium*. *E. faecalis* was the predominant species ($p < 0,05$) of the total number of tested isolates, as well as in those recovered from dogs.

Based on disk-diffusion assay results for both species cumulative, highest resistance was observed to enrofloxacin and rifampicin (83%), followed by ciprofloxacin and tetracycline (60%). Resistance to vancomycin was 23%, and the lowest resistance was to chloramphenicol (12%). Multidrug resistance is defined as acquired non-susceptibility to at least one agent in three or more antimicrobial drug classes. It was found in 60% of enterococci isolates. High-level streptomycin resistance was present in 17%, and high-level gentamicin resistance in 8% of isolates. Two isolates had high-level resistance to both streptomycin and gentamicin. In total, high-level aminoglycoside resistance was present in 20% of the isolates.

Comparing the susceptibility of the species, *E. faecium* showed the highest resistance to enrofloxacin and ciprofloxacin (90%), followed by tetracycline (85%) and penicillin, ampicillin, and rifampicin (81%). The lowest resistance was to chloramphenicol and vancomycin (5%). Multidrug resistance was found in 90% of the *E. faecium* isolates. High-level streptomycin resistance was present in 24%, and high-level gentamicin resistance in 5% of the isolates. One isolate had high-level resistance to both streptomycin and gentamicin.

E. faecalis isolates showed highest resistance to rifampicin (84%) and enrofloxacin (80%) followed by tetracycline (52%) and ciprofloxacin (50%). Resistance to vancomycin was present in 29% of the isolates. Lowest resistance was to nitrofurantoin (2%) and there was no isolate resistant to ampicillin or penicillin. Multidrug resistance was observed in 69% of the *E. faecalis* isolates. High-level streptomycin resistance was present in 15%, and high-level gentamicin resistance in 10% of isolates. One isolate had high-level resistance to both streptomycin and gentamicin.

E. faecium isolates were resistant to more classes of antimicrobials than *E. faecalis*. *E. faecium* isolates were significantly more resistant to penicillin, ampicillin, ciprofloxacin, nitrofurantoin and tetracycline, however, *E. faecalis* isolates were significantly more resistant to vancomycin (Fisher exact test, $p < 0, 05$).

Considering the high number of urine samples positive to enterococci growth, susceptibility of those isolates was revised separately. The highest resistance was observed to rifampicin (84%) and enrofloxacin (78%), followed by ciprofloxacin and tetracycline (68%). Resistance to vancomycin was present in 23% of the urine isolates. The lowest resistance of the isolates was to chloramphenicol (19%). Multidrug resistance was found in 72% of enterococci isolates from urine. High-level streptomycin resistance was present in 16%, and high-level gentamicin resistance in 9% of isolates.

Comparing the susceptibility of the species, *E. faecium* isolates from urine were resistant to more antimicrobials than *E. faecium* isolates from other specimens. Eleven out of twelve *E. faecium* isolates were resistant to penicillin, ampicillin, enrofloxacin, ciprofloxacin, rifampicin and tetracycline (92%). One isolate was resistant to vancomycin (8%), and no isolates were resistant to chloramphenicol. Multidrug resistance was found in 92% of the *E. faecium* isolates. High-level streptomycin resistance was present in 17%, and high-level gentamicin resistance in 8% of isolates. In total, high-level aminoglycoside resistance was present in 17% of the *E. faecium* isolates.

Among *E. faecalis* isolates from urine, highest resistance was observed to rifampicin (80%) and enrofloxacin (70%). Resistance to vancomycin was present in 35% of the isolates. There were no resistant isolates to penicillin, ampicillin and nitrofurantoin. Multidrug resistance was found in 60% of the *E. faecalis* isolates. High-level streptomycin resistance was present in 15%, and high-level gentamicin resistance in 10% of isolates.

E. faecium isolates from urine samples were resistant to more classes of antimicrobials than *E. faecalis*. There was significantly more resistant isolates of *E. faecium* to penicillin, ampicillin, ciprofloxacin, nitrofurantoin and tetracycline (Fisher exact test, $p < 0,05$).

Among 19 isolates resistant to vancomycin, PCR revealed the presence of the acquired resistance gene in three isolates. Two enterococci isolates were positive for *vanA* and one for *vanB* gene. Among 50 isolates resistant to tetracycline, PCR revealed the presence of *tetM* gene in 49 isolates and *tetL* gene in 16 isolates. All isolates that were carrying *tetL*, were also carrying *tetM* gene. Acquired resistance genes were not detected in one isolate. All isolates with high-level gentamicin resistance, were positive to *aph(3')-IIIa* and *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* genes. Six isolates with high-level streptomycin resistance were positive to *ant(6)-Ia* gene, and two of them also had *aph(3')-IIIa*. Acquired resistance genes were not detected in three isolates. One isolate which was phenotypically resistant to both gentamicin and streptomycin had all three genes present.

Conclusions: The vast majority of the *Enterococcus* spp. bacteria isolated from animal samples in Croatia belong to two species, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Enterococcus faecalis* is the dominant species among enterococci isolated from animal samples in Croatia.

Resistance of enterococci to penicillins is present only in isolates of the species *Enterococcus faecium*. Due to the possibility of transmission of resistant enterococci from animals to human, there is a risk of spreading penicillin-resistant strains of *Enterococcus faecium* to the human community. Since penicillins are the primary therapy for enterococcal infections, the spread of such isolates represents a public health problem.

Synergistic therapy of enterococcal infections with penicillin and aminoglycosides remains the primary choice in the treatment of animals with enterococcal infections because penicillin resistance with high-level aminoglycoside resistance is not common in enterococci of animal origin.

Despite its concentrating properties, enrofloxacin is not a good choice for the treatment of urinary tract infections caused by enterococci because the vast majority of the isolates tested are resistant to enrofloxacin.

Kirby-Bauer disk-diffusion method is not a reliable method for assessing the susceptibility of *Enterococcus* spp. isolates to vancomycin.

For the purpose of more precise determination of the mechanism responsible for a high-level streptomycin resistance, the presence of two genes, *ant(6)-Ia* and *ant(3'')-Ia*, should be examined by molecular methods.

Key words: Enterococci, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, domestic animals, resistance, vancomycin, aminoglycosides

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. DOSADAŠNJE SPOZNAJE	4
2.1. Rod <i>Enterococcus</i>	4
2.2. Morfološke, uzgojne i biokemijske osobine roda <i>Enterococcus</i>	5
2.3. Vrste enterokoka.....	6
2.4. Rezistencija enterokoka na antimikrobne lijekove	8
2.4.1. Rezistencija na beta-laktamske antibiotike	9
2.4.2. Rezistencija na vankomicin.....	10
2.4.3. Rezistencija na aminoglikozide	12
2.4.4. Rezistencija na tetraciklin	14
2.4.5. Rezistencija enterokoka na ostale lijekove.....	15
2.5. Enterokoki kao uzročnici infekcija	20
2.5.1. Infekcije kod ljudi.....	20
2.5.2. Infekcije kod životinja	21
2.6. Terapija infekcija uzrokovanih enterokokima.....	22
2.7. Enterokoki kao javnozdravstveni problem.....	24
2.8. Enterokoki kao indikatori fekalnog zagađenja	26
2.9. Enterokoki u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji	27
2.10. Enterokoki u Republici Hrvatskoj.....	28
3. OBRAZLOŽENJE TEME.....	29
4. MATERIJAL I METODE	31
4.1. Uzorci i kriteriji za odabir izolata za istraživanje	31
4.2. Identifikacija izolata do razine roda.....	31
4.2.1. Bojenje po Gramu	31
4.2.2. Reakcija katalaze	32
4.2.3. Rast na kanamicin-eskulin agaru	32

4.3.	Identifikacija izolata do razine vrste	33
4.3.1.	Izdvajanje bakterijske DNA	33
4.3.2.	Multipleks lančana reakcija polimerazom za identifikaciju vrsta	34
4.3.3.	Identifikacija produkata dobivenih lančanom reakcijom polimerazom.....	35
4.4.	Određivanje osjetljivosti izolata <i>E. faecium</i> i <i>E. faecalis</i> na antimikrobne lijekove disk-difuzijskim postupkom	36
4.5.	Dokazivanje gena za rezistenciju na vankomicin, tetracikline i aminoglikozide	38
4.5.1.	Dokazivanje gena za rezistenciju na vankomicin lančanom reakcijom polimerazom	38
4.5.2.	Dokazivanje gena za rezistenciju na tetracikline lančanom reakcijom polimerazom	40
4.5.3.	Dokazivanje gena za rezistenciju na aminoglikozide lančanom reakcijom polimerazom	41
4.6.	Statistička obrada podataka	44
5.	REZULTATI.....	45
5.1.	Porijeklo uzoraka	45
5.2.	Identifikacija roda <i>Enterococcus</i>	45
5.3.	Identifikacija vrsta <i>Enterococcus faecium</i> i <i>Enterococcus faecalis</i>	47
5.4.	Rezultati određivanja osjetljivosti na antimikrobne lijekove disk-difuzijskim postupkom.....	49
5.5.	Rezultati dokazivanja gena za rezistenciju lančanom reakcijom polimerazom	56
5.5.1.	Dokazivanje <i>vanA</i> i <i>vanB</i> gena za rezistenciju na vankomicin	56
5.5.2.	Dokazivanje <i>tetL</i> i <i>tetM</i> gena za rezistenciju na tetraciklin	58
5.5.3.	Dokazivanje <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> i <i>ant(6)-Ia</i> gena za rezistenciju visokog stupnja na aminoglikozide	59
6.	RASPRAVA	61
7.	ZAKLJUČCI.....	74
8.	LITERATURA.....	75

9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA	98
---	----

UVOD

Bakterije roda *Enterococcus* pripadaju skupini gram-pozitivnih koka, a karakterizira ih izrazita otpornost i dobro preživljavanje u nepovoljnim uvjetima. Široko su rasprostranjene u okolišu i nalaze se u biljkama, hrani, tlu, pjeskovitim plažama, moru i slatkim vodama, a dio su i fiziološke mikrobiote gastrointestinalnog i urogenitalnog trakta ljudi i životinja. *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis* dvije su najčešće vrste enterokoka koje prevladavaju u kliničkim uzorcima humanog i životinjskog porijekla te uzorcima hrane.

Iako se smatraju komenzalnim bakterijama i rijetko samostalno uzrokuju infekcije, enterokoki, kao uvjetno patogene bakterije, kod ljudi i životinja mogu uzrokovati različite infekcije. Dapače, oni su jedine patogene gram-pozitivne bakterije koje se povezuju s visokim rizikom od smrti. Kod ljudi najčešće uzrokuju infekcije mokraćnog sustava, endokarditis i bakterijemiju, dok su kod životinja najčešće uzročnici ponavljajućih i teško lječivih infekcija mokraćnog sustava te infekcija rana. Liječenje enterokoknih infekcija teško je i dugotrajno, a uvelike ovisi o složenosti i mjestu infekcije te vrsti enterokoka koja ju uzrokuje. Temeljni uzrok tome je urođena rezistencija na velik broj antimikrobnih tvari i činjenica da većina baktericidnih lijekova na enterokoke ima samo bakteriostatski učinak. Osim toga, enterokoki lako stječu nove mehanizme rezistencije te se broj djelotvornih lijekova još više smanjuje.

Enterokoki posjeduju urođene mehanizme rezistencije na brojne skupine antimikrobnih lijekova, kao što su polusintetski penicilini, kloksacilin, cefalosporini, klindamicin i kombinacija trimetoprima i sulfametoksazola, a pokazuju i smanjenu osjetljivost na penicilin i ampicilin te aminoglikozide. Uz to, tijekom liječenja drugih infekcija, kao dio fiziološke mikrobiote gastrointestinalnog trakta, nenamjerno su izloženi različitim antimikrobnim lijekovima. Tako enterokoki brzo i lako stječu rezistenciju na lijekove svih antimikrobnih skupina, uključujući kinolone, makrolide, tetracikline, streptogramine i glikopeptide, što rezultira nastankom multirezistentnih (MDR, engl. *Multi-drug resistant*) sojeva enterokoka za koje gotovo da ne postoji djelotvorna terapija.

Mehanizmi odgovorni za urođenu rezistenciju su raznoliki, a najčešći je aktivno izbacivanje lijeka iz stanice efluksnim pumpama. Enterokoki posjeduju velik broj kromosomski kodiranih pumpi koje izbacuju različite, za njih toksične, tvari kao što su lijekovi, metali i antiseptici, a mogu ugraditi i plazmide s genima koji kodiraju pumpe specifičnog djelovanja, što može posredovati u rezistenciji na tetracikline, kinolone, nitrofurantoin i/ili

kloramfenikol. Osim toga, svi enterokoki urođeno posjeduju gene koji kodiraju penicilin-vezujuće proteine PBP (engl. *Penicillin-binding protein*) slabog afiniteta. Stoga cefalosporini i većina penicilina, čije djelovanje ovisi o vezanju za PBP, ne djeluju na enterokoke. Nadalje, točkaste mutacije u tim genima mogu rezultirati rezistencijom na sve beta-laktamske antimikrobne tvari. Uz to, enterokoki imaju sposobnost stjecanja gena koji kodiraju proizvodnju beta-laktamaza, najčešće iz skupine *bla* gena, koje mogu dodatno pridonijeti rezistenciji na beta-laktame. Također, poznati su i drugi mehanizmi odgovorni za rezistenciju enterokoka na antimikrobne lijekove ostalih skupina, poput zaštite veznog mjesta za antimikrobni lijek (rezistencija na tetracikline, kinolone, rifampicin), promjene veznog mjesta (urođena slaba osjetljivost na kinolone i stečena rezistencija na glikopeptide) te modifikacije i/ili inaktivacije djelatne tvari enzimima (rezistencija na aminoglikozide, nitrofurantoin, kloramfenikol i rifampicin).

Pojava multirezistentnih sojeva enterokoka predstavlja opasnost za javno zdravlje, naročito zbog mogućnosti prijenosa gena odgovornih za rezistenciju na osjetljive bakterije. Brzo širenje takvih sojeva, pogotovo vankomicin-rezistentnih sojeva predstavlja izrazito velik problem, osobito kod prijenosa rezistencije na bakterije kojima je vankomicin jedini djelotvorni lijek što dodatno otežava terapiju infekcija uzrokovanih enterokokima. Tijekom posljednja tri desetljeća, vankomicin-rezistentni sojevi enterokoka, prije svega vrste *E. faecium* i *E. faecalis*, postali su jedni od vodećih uzročnika bolničkih infekcija. Upravo zbog multirezistencije, Svjetska zdravstvena organizacija (WHO, engl. *World Health Organisation*), uvrstila je vankomicin-rezistentne izolate vrste *E. faecium* u skupinu bakterija za koje je nužno proizvesti nove antimikrobne lijekove.

Zbog urođene rezistencije na velik broj lijekova i sposobnosti brzog stjecanja novih mehanizama rezistencije te mogućnosti vertikalnog i horizontalnog prijenosa gena mobilnim genskim elementima, enterokoki predstavljaju opasnost za zdravlje životinja i ljudi. Uz to, treba naglasiti kako je potvrđen prijenos rezistentnih i multirezistentnih sojeva enterokoka sa životinja na čovjeka pa se životinje smatraju potencijalnim rezervoarom gena odgovornih za rezistenciju. Stoga je prepoznavanje i dokazivanje rezistentnih sojeva od presudne važnosti, kako u humanoj tako i u veterinarskoj medicini. Kontinuirani nadzor nad širenjem rezistentnih sojeva enterokoka, uz multidisciplinarnu suradnju u okviru koncepta "Jedno zdravlje" (engl. *One health*) neophodan je kako bi se ovaj rastući problem pokušao držati pod kontrolom.

U veterinarskoj medicini, u Republici Hrvatskoj, gotovo da nema podataka o rezistenciji i mehanizmima rezistencije enterokoka, iako je zabilježen porast broja rezistentnih i multirezistentnih sojeva izdvojenih iz kliničkih uzoraka životinja i prehrambenih namirnica životinjskog porijekla.

DOSADAŠNJE SPOZNAJE

2.1. Rod *Enterococcus*

Enterokoki su bakterije koje su otkrivene kao crijevni gram-pozitivni koki, a kasnije su, zbog morfoloških i biokemijskih sličnosti, uključene u rod *Streptococcus*. Prihvatanjem serološke tipizacije streptokoka koje je 1933. godine predložila Rebecca Lancefield, enterokoki su svrstani u serološku skupinu D streptokoka. Tek su 1984. godine, temeljem genetskih različitosti, enterokoki dobili vlastiti rod – *Enterococcus*. Time se ime roda promijenilo iz *Streptococcus* u *Enterococcus*, a imena vrsta kojima su ih do tada opisivali ostala su nepromijenjena (*faecium*, *faecalis*, *durans*) (Cetinkaya i sur., 2000.; Torres i sur., 2018.).

Bakterije roda *Enterococcus* pripadaju skupini gram-pozitivnih koka, izrazito su otporne, dobro preživljavaju u nepovoljnim uvjetima, rastu u širokom spektru temperatura (10 – 45 °C), u hipotoničnim, hipertoničnim, kiselim i alkalnim uvjetima (Byappanahalli i sur., 2012., Čanžek Majhenič, 2006.). Nadalje, ovaj rod bakterija otporan je na temperature pasterizacije i do 30 minuta (Čanžek Majhenič, 2006.). Enterokoki su široko rasprostranjeni u okolišu, nalaze se u biljkama, hrani, tlu, pjeskovitim plažama, moru i slatkim vodama, a dio su i fiziološke mikrobiote gastrointestinalnog i urogenitalnog trakta ljudi i životinja (Byappanahalli i sur., 2012.; Torres i sur., 2018.).

Iako se smatraju komenzalnim bakterijama i rijetko samostalno uzrokuju infekcije, kao uvjetno patogene bakterije, kod ljudi mogu uzrokovati infekcije mokraćnog sustava, endokarditis i bakterijemiju. Također mogu uzrokovati meningitis, intraabdominalne infekcije i infekcije površinskih rana (Byappanahalli i sur., 2012.; Ngbede i sur., 2017.). Kod životinja, enterokoki su najčešće uzročnici teško lječivih urinarnih infekcija i infekcija rana, a mogu uzrokovati mastitis, dijareju, kao i endokarditis i bakterijemiju (Aarestrup i sur., 2002.; Bisgaard i sur., 2010.; Nam i sur., 2010.; Torres i sur., 2018.; Vela i sur., 2010.; Willis i sur., 2019.).

Enterokoki se ubrajaju u skupinu multirezistentnih bakterija pod akronimom ESKAPE (*Enterococci* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.) koju je WHO istaknula kao sve češće uzročnike bolničkih i rezistentnih infekcija u posljednjim desetljećima (Čivljak i sur., 2014.).

2.2. Morfološke, uzgojne i biokemijske osobine roda *Enterococcus*

Bakterije roda *Enterococcus* su gram-pozitivni koki koji se nalaze u parovima ili kratkim nizovima, fakultativno su anaerobni i kemoorganotrofni organizmi s fermentativnim metabolizmom. Uobičajeno su homofermentativni, proizvode mliječnu kiselinu kao krajnji produkt glikolize pri čemu ne proizvode plin (Byappanahalli i sur., 2012.). Ne proizvode oksidazu ni katalazu (Ben Braïek i Smaoui, 2019.). Neke vrste, poput *Enterococcus gallinarum* i *Enterococcus casseliflavus*, pokretljive su (Byappanahalli i sur., 2012.).

Enterokoki dobro rastu na uobičajenim hranjivim podlogama sa ili bez dodatka krvi. Na čvrstim podlogama rastu kao male okrugle kolonije glatkih rubova, a pojedini sojevi mogu biti slabo alfa-hemolitični i tada je oko kolonija prisutan uski prsten hemolize (Rogoz i sur., 2018.). Boja kolonija ovisi o vrsti – najčešće su bijele, ali mogu biti i u spektru sive ili žute. Pigmentirane vrste češće se izdvajaju iz uzoraka biljaka (Aarestrup, 2002.; Byappanahalli i sur., 2012.). Optimalna temperatura rasta im je 35 °C, no mogu rasti u temperaturnom rasponu od 10 do 45 °C. Također, rastu u kiselim i alkalnim uvjetima te u mediju s višim udjelom natrijeva klorida ($W(\text{NaCl}) = 6,5 \%$) ili u mediju s 40 % žučnih soli i eskulinom (Byappanahalli i sur., 2012.; Torres i sur., 2018.). Zbog sposobnosti hidrolize eskulina, za razlikovanje enterokoka od drugih gram-pozitivnih koka koristi se selektivni kanamicin-eskulin agar na kojem enterokoki rastu kao tamnosive kolonije, pri čemu se podloga oboji u crno (Torres i sur., 2018.; Zaheer i sur., 2020.).

Enterokoki na površini posjeduju polisaharidnu kapsulu, adhezine, pilije i agregacijske tvari. Zbog toga imaju sposobnost tvorbe biofilma, koji im omogućuje adheziju na medicinske instrumente i pomagala poput katetera, zubnih proteza i srčanih zalistaka. Nakupljanje bakterijskih stanica s tvorbom biofilma uzrokuje infekcije okolnog tkiva. S obzirom na to da biofilm onemogućuje prodiranje i djelovanje antimikrobnih tvari do bakterijskih stanica, ove infekcije izrazito se teško liječe. Uz enterokoke, u biofilmu se mogu nalaziti i druge vrste bakterija pa je tada riječ o polimikrobnom biofilmu, a infekcije koje uzrokuju kompleksnije su za liječenje (Said i sur., 2021.).

Enterokoki, kao i većina bakterija mliječne kiseline, proizvode bakteriocine. Enterokokni bakteriocini nazivaju se enterocini, mogu biti širokog ili uskog spektra djelovanja, a uglavnom inhibiraju gram-pozitivne bakterije. Najvažnije vrste koje proizvode enterocine su *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis*, a njihovi enterocini pripadaju drugoj (II) skupini bakteriocina, odnosno u male, toplinski stabilne i membranski aktivne peptide (Ben Braïek i Smaoui, 2019.; Vukušić i Zdolec, 2020.). Zbog izrazito dobrih antimikrobnih svojstava

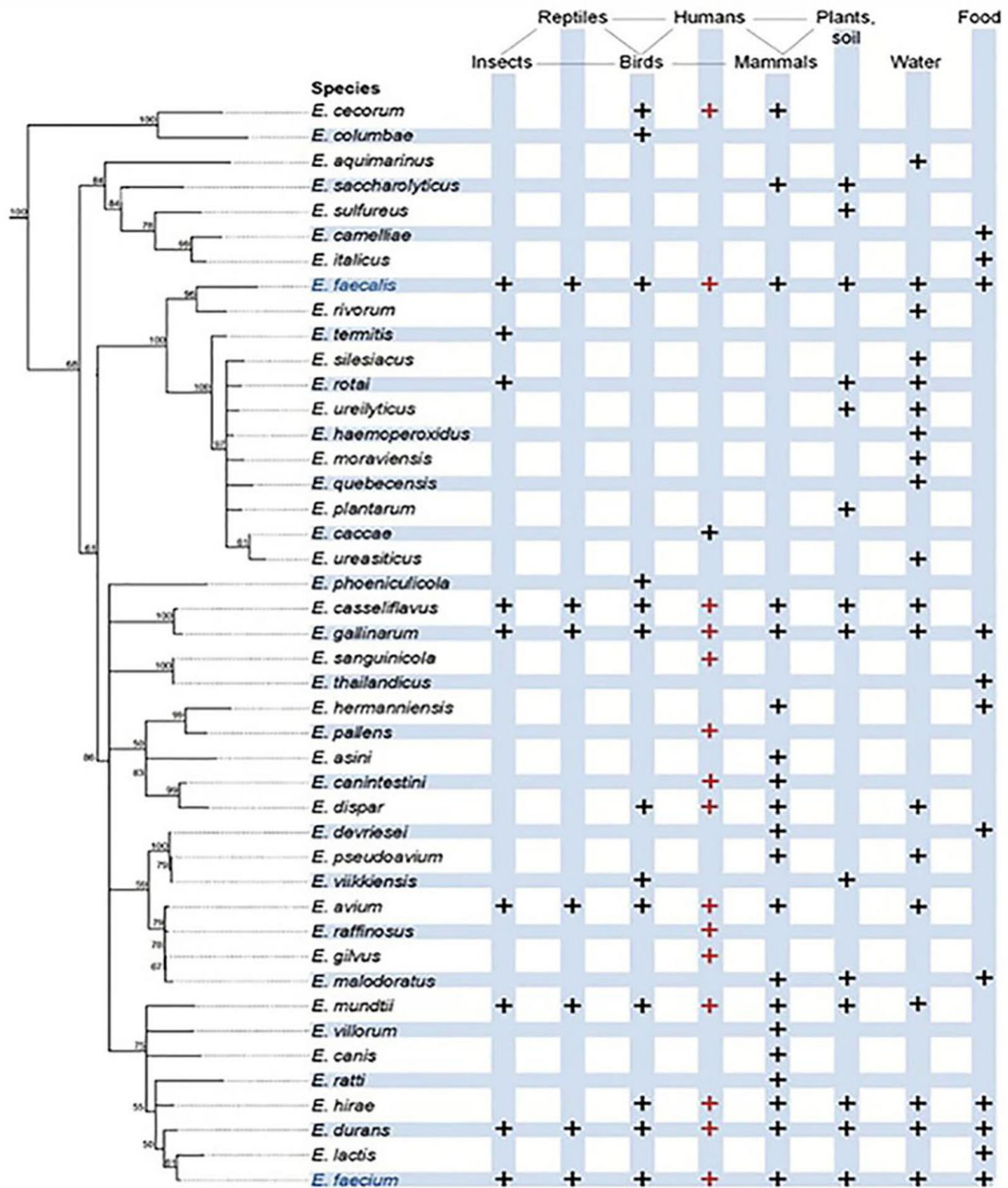
enterocina otkrivenih u posljednim godinama, razmatra se mogućnost njihova korištenja u liječenju različitih infekcija (Ankaiah i sur., 2018.; Belguesmia i sur., 2021.; Ben Braïek i Smaoui, 2019.; Mahdi i sur., 2020.; Valledor i sur., 2022.).

Enterokoki su urođeno otporni na više vanjskih štetnih čimbenika i na veći broj kemikalija od drugih srodnih bakterija, a kao najotpornije vrste ističu se *E. faecium* i *E. faecalis*. Bakterije ovog roda otporne su na većinu antiseptika i dezinficijensa, a preživljavaju UV zračenje i isušivanje što im omogućuje dugo preživljavanje u vanjskom okolišu. To je osobit problem u bolnicama, gdje većina uobičajenih postupaka čišćenja nije dovoljno djelotvorna za njihovo uklanjanje (Selleck i sur., 2019.). Različita istraživanja dokazala su veliku sposobnost enterokoka na prilagodbu nepovoljnim uvjetima okoliša. Autori su, izlaganjem sojeva enterokoka niskim, nesmrtonosnim koncentracijama antiseptika, soli, deterdženata i niskom pH, potaknuli selekciju sojeva otpornih na znatno više koncentracije navedenih tvari i sojeve otporne na inače smrtonosni niski pH (Flahaut i sur., 1996., 1997., 1998.; Rince i sur., 2000.). Stoga je važno istaknuti kako je potrebno pridržavati se preporuka za korištenje antiseptika i dezinficijensa, koje podrazumijevaju korištenje preparata u odgovarajućim količinama kroz odgovarajuće vrijeme, u svrhu sprječavanja razvoja i selekcije otpornih sojeva.

2.3. Vrste enterokoka

Rodu *Enterococcus* pripada 58 bakterijskih vrsta (Said i sur., 2021.), među kojima su najzastupljenije *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum* i *E. casseliflavus* (Said i sur., 2021.). *E. faecium* i *E. faecalis* vrste su koje prevladavaju u kliničkim uzorcima, uzorcima hrane i zastupljene su kod gotovo svih skupina životinja kao dio gastrointestinalne (GI) mikrobiote (Aarestrup, 2002.; Byappanahalli i sur., 2012.; Torres i sur., 2018.).

Na slici 1. prikazane su filogenetske veze vrsta unutar roda *Enterococcus*, porijeklo pojedine vrste i pojednostavljeni prikaz prehrambenog lanca, kao i vrste koje se smatraju uzročnicima infekcija.



Slika 1. Distribucija bakterijskih vrsta roda *Enterococcus* u prirodi. Crvenim križićima označene su vrste koje se smatraju uzročnicima infekcija u ljudi, dok su crnima označene vrste koje se smatraju dijelom mikrobiote pojedine skupine životinja. (Preuzeto iz rada Lebreton i sur., 2014.)

2.4. Rezistencija enterokoka na antimikrobne lijekove

Enterokoki posjeduju urođene mehanizme rezistencije na neke skupine antimikrobnih lijekova koji se često koriste u liječenju, kao što su polusintetski penicilini, kloksacilin, cefalosporini, klindamicin i kombinacija trimetoprima i sulfametoksazola, a pokazuju i smanjenu osjetljivost na penicilin, ampicilin i aminoglikozide, koji se stoga ne bi trebali koristiti samostalno u terapiji (Pintarić i Šeol Martinec, 2018.; Repac Antić i sur., 2018.). Uz to, bakterije roda *Enterococcus* izrazito brzo i lako stječu rezistenciju na ostale antimikrobne lijekove, uključujući kinolone, makrolide, tetracikline, streptogramine i glikopeptide, što može rezultirati nastankom multirezistentnih sojeva enterokoka (Arias i Murray, 2012.; Hammerum, 2012.).

Enterokoki mogu steći i rezistenciju visokog stupnja na aminoglikozide (HLAR, engl. *High-level aminoglycoside resistance*), čime ta skupina lijekova postaje potpuno nedjelotvorna u terapiji, čak i u inače djelotvornoj sinergijskoj kombinaciji s penicilinima i glikopeptidima (Chow, 2000.).

Pojedine vrste enterokoka međusobno se razlikuju prema urođenoj rezistenciji i mogućnostima stjecanja nove rezistencije na neki lijek ili skupinu antimikrobnih lijekova. Tako su, primjerice, vrste *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* i *E. flavescens* urođeno rezistentne na vankomicin (Frye i Jackson, 2013.), dok je vrsta *E. faecalis* urođeno rezistentna na streptogramin A (Singh i Murray, 2005.). Sojevi vrste *E. faecium*, osobito klinički izolati, vrlo često posjeduju stečenu rezistenciju na peniciline i vankomicin (Arias i Murray, 2008.; Selleck i sur., 2019.; Weiner i sur., 2016.). Gotovo svi sojevi vrste *E. faecium* izdvojeni iz bolničkih pacijenata u Hrvatskoj rezistentni su na ampicilin (Tambić Andrašević i sur., 2018.).

Sposobnost stjecanja rezistencije i njeno širenje u proteklih 50 godina učinili su enterokoke vodećim uzročnicima bolničkih infekcija (Prabaker i Weinstein, 2011.; Werner i sur., 2008.).

2.4.1. Rezistencija na beta-laktamske antibiotike

Djelovanje beta-laktamskih antibiotika temelji se na inhibiciji sinteze bakterijske stanične stijenke. Vežu se na enzime koji sudjeluju u završnoj fazi sinteze peptidoglikana stanične stijenke, a uobičajeno se nazivaju proteini koji vežu peniciline (PBP, engl. *Penicillin Binding Proteins*). Vezanje beta-laktamskih antibiotika na PBP rezultira propadanjem stanice (Šeol i sur., 2010.). S obzirom na mehanizam djelovanja, ovi antimikrobni lijekovi ne mogu djelovati na bakterije koje u svojoj građi nemaju staničnu stijenku, kao što su mikoplazme.

Za enterokoke je specifično sintetiziranje molekule PBP5 koja ima niski afinitet za beta-laktamske antibiotike (Miller i sur., 2014.). Stoga enterokoki pokazuju nisku razinu osjetljivosti na ampicilin i penicilin, a rezistentni su na djelovanje polusintetskih penicilina i cefalosporina (Pintarić i Šeol Martinec, 2018.).

Zbog urođene smanjene osjetljivosti enterokoka na penicilin i ampicilin, uobičajen baktericidan učinak ovih lijekova izostaje. Navedeni se lijekovi mogu primjenjivati, ali u višim dozama nego što je to uobičajeno za liječenje streptokoknih ili drugih infekcija uzrokovanih srodnim gram-pozitivnim bakterijama (Hollenbeck i Rice, 2012.; Kristich i sur., 2014.). Unatoč višim dozama, i dalje se postiže samo bakteriostatski učinak navedenih lijekova. Baktericidan učinak može se postići primjenom izrazito visokih doza koje graniče s toksičnim te se u praksi ne primjenjuju (Hollenbeck i Rice, 2012.). Kako bi se zaobišla toksičnost, a postiglo baktericidno djelovanje, koristi se kombinirana terapija penicilina i lijekova koji s penicilinima imaju sinergijski učinak. Najčešće se takva sinergija postiže s aminoglikozidima (Giguère i sur., 2013.). Iako točan mehanizam sinergije nije u potpunosti razjašnjen, smatra se kako aminoglikozidi, zbog oštećene stijenke uslijed djelovanja penicilina, mogu prodrijeti u stanicu u većoj koncentraciji i postići svoj antimikrobni učinak (Kristich i sur., 2014.). Stoga su ampicilin i penicilin i dalje lijekovi izbora u liječenju enterokoknih infekcija, ali samo u kombinaciji s aminoglikozidima (Pintarić i Šeol Martinec, 2018.).

Stečena rezistencija na penicilin i ampicilin izrazito je česta kod vrste *E. faecium* te predstavlja problem i izazov u liječenju infekcija uzrokovanih ovom vrstom. Rezistencija može biti posljedica djelovanja beta-laktamaze (Miller i sur., 2014.), točkastih mutacija gena odgovornih za ekspresiju/sintezu PBP molekula, poglavito PBP5 molekula (Hollenbeck i Rice, 2012.) ili kombinacije oba mehanizma. Beta-laktamaze kodirane su *bla* genima koji se nalaze na plazmidima, a takva je rezistencija obično niskog stupnja i može se izbjeći primjenom penicilina i inhibitora beta-laktamaze (Miller i sur., 2014.). Međutim, točkaste mutacije u

pravilu uvijek dovode do razvoja rezistencije visokog stupnja pri čemu terapija penicilinima postaje u potpunosti nedjelotvorna (Hollenbeck i Rice, 2012.).

2.4.2. Rezistencija na vankomicin

Vankomicin je antibiotik odobren 1958. godine, no zbog toksičnosti i istovremene pojave sigurnijih lijekova, meticilina i cefalotina, nije bio korišten, osim u rijetkim slučajevima teških infekcija kod osoba alergičnih na peniciline (Levine, 2006.). U širu primjenu ulazi 80-ih godina 20. stoljeća, prije svega za liječenje pseudomembranoznog enterokolitisa (Levine, 2006.), a od 1990-tih preuzima ulogu ampicilina u liječenju infekcija kod ljudi uzrokovanih sojevima bakterije *E. faecium* rezistentnih na ampicilin i penicilin (Hammerum, 2012.).

U humanoj medicini, prvi izolati vankomicin-rezistentnih enterokoka (VRE, engl. *Vancomycin resistant enterococci*) izdvojeni su 1988. godine u Engleskoj (Uttley i sur., 1988.), a ubrzo su prijavljeni i u bolnicama u Francuskoj i na istočnoj obali Sjedinjenih Američkih Država (Cetinkaya i sur., 2000.). Sve češća upotreba vankomicina, posebice u bolnicama krajem 20. stoljeća, dovela je do neočekivano naglog i brzog porasta broja sojeva enterokoka rezistentnih na vankomicin. Pojava rezistencije osobito je uočena u sojeva vrste *E. faecium*, iako se javlja i u vrste *E. faecalis* (Cetinkaya i sur., 2000.; Hollenbeck i Rice, 2012.; Levine, 2006.).

U istom periodu, također u UK-u, zabilježena je i prva pojava VRE izdvojenih iz životinja kod kojih vankomicin nikada nije korišten (Bates i sur., 1993.). Pretpostavlja se da je uzrok rezistencije kod životinjskih izolata česta i kontinuirana upotreba antibiotika avoparcina koji pripada istoj skupini antimikrobnih tvari kao i vankomicin, a korišten je od 1970-ih godina u subterapijskim dozama kao promotor rasta u uzgoju farmskih životinja (Garcia-Migura i sur., 2014.; Rogóž i sur., 2019.).

Vankomicin je antibiotik iz skupine glikopeptida, kojoj pripada i teikoplanin. Baktericidnog je djelovanja na većinu gram-pozitivnih bakterija, dok zbog nemogućnosti prolaska kroz vanjsku membranu koju posjeduju gram-negativne bakterije na njih ne djeluje (Šeol i sur., 2010.). Djelovanje mu se temelji na inhibiciji sinteze peptidoglikana stanične stijenke vezanjem na peptidni alanin-alanin (D-Ala-D-Ala) kraj prekursora peptidoglikana. U humanoj medicini najčešće se upotrebljava u liječenju bolničkih infekcija prouzročenih rezistentnim i multirezistentnim gram-pozitivnim bakterijama, kao što su meticilin-rezistentni

sojevi bakterije *Staphylococcus aureus* (MRSA, engl. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) i multirezistentni enterokoki (Šeol i sur., 2010., Kristich i sur., 2014.).

Mehanizam rezistencije na glikopeptide temelji se na promjenama ciljnog mjesta vezanja ovih antibiotika enzimima ligazama. Točnije, jedan od alanina, u prethodno spomenutom prekursoru sinteze peptidoglikana, zamjenjuje se laktatom ili serinom (D-Ala-D-Lac ili D-Ala-D-Ser), što dovodi do značajnog smanjenja afiniteta vezanja glikopeptida. U slučaju nastajanja D-Ala-D-Lac peptida, afinitet glikopeptida pada na tisućinu, odnosno sedminu afiniteta u slučaju D-Ala-D-Ser peptida. Do sada je kod enterokoka opisano devet skupina gena odgovornih za ovaj mehanizam rezistencije: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* i *vanN*. Ovi geni kodiraju enzime iz skupine ligaza koji sudjeluju u sintezi stanične stjenke, a svaki *van* gen kodira jednu od dvije ligaza odgovorne za rezistenciju na glikopeptide, D-Ala-D-Lac ligazu ili D-Ala-D-Ser ligazu. Nastali enzimi međusobno se razlikuju prema strukturi i prema mjestu vezanja. Geni koji kodiraju D-Ala-D-Lac ligaze odgovorni su za razvoj rezistencije umjerenog i visokog stupnja, a geni koji kodiraju D-Ala-D-Ser ligaze za razvoj rezistencije nižeg stupnja. Sami *van* geni razlikuju se prema smještaju u genomu (na plazmidu ili u kromosomu) o čemu ovisi i prijenos na druge enterokoke, prema inducibilnosti, odnosno konstitutivnoj aktivnosti te stupnju rezistencije na vankomicin i/ili teikoplanin koju uzrokuju (Courvalin, 2006.; Miller i sur., 2014.).

Geni *vanA* i *vanB* su stečeni geni odgovorni za rezistenciju i najčešći su razlog rezistencije enterokoka na vankomicin (Miller i sur., 2014.). Gen *vanA* kodira enzim D-Ala-D-Lac ligazu, a vrsta *E. faecium* smatra se glavnim rezervoarom tog gena. Gen je inducibilan i odgovoran je za rezistenciju visokog stupnja na vankomicin i teikoplanin. Najčešće se prenosi transpozonom Tn1546. Gen *vanB* također kodira tvorbu enzima D-Ala-D-Lac ligaze, no za razliku od gena *vanA*, uzrokuje rezistenciju enterokoka samo na vankomicin. Rezistencija je inducibilna, a može biti umjerenog i visokog stupnja. Gen se prenosi transpozonima Tn1547 i Tn1549 koji se mogu nalaziti na plazmidu ili biti uklopljeni u kromosom (Fry i Jackson, 2013.; Jahansepa i sur., 2018.; Kak i Chow, 2002.; Rogoz i sur., 2018.).

Vrste *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* i *E. flavescens* urođeno su rezistentne na vankomicin, a rezistencija je posljedica gena *vanC* koji se nalazi u bakterijskom kromosomu. Navedeni gen kodira D-Ala-D-Ser ligazu, a uzrokuje rezistenciju niskog stupnja na vankomicin koja može biti konstitutivna ili inducirana (Fry i Jackson, 2013.; Rogoz i sur., 2018.).

Ostali *van* geni od manjeg su značaja, stečeni su i pojavljuju se sporadično. Gen *vanD* kodira D-Ala-D-Lac ligazu, odgovoran je za umjerenu rezistenciju na vankomicin i teikoplanin glikopeptida, a ona može biti konstitutivna ili inducirana. Smješten je na kromosomu te se

stoga ne prenosi horizontalno s bakterije na bakteriju konjugacijom. Za razliku od njega, gen *vanM* je prenosiv jer se nalazi na plazmidu. On također kodira D-Ala-D-Lac ligazu, ali je odgovoran za visoku rezistenciju na oba glikopeptida i inducibilan je. Geni *vanE*, *vanG* i *vanL* kodiraju D-Ala-D-Ser ligazu, odgovorni su za nisku rezistenciju na vankomicin, a ne uzrokuju rezistenciju na teikoplanin. Sva tri gena su inducibilna, smještena na kromosomu i nije ih moguće prenijeti na druge bakterijske vrste (Boyd i sur., 2015.; Courvalin, 2006.; Kak i Chow, 2002.; Rogoz i sur., 2018.). Najnovije otkriveni gen, *vanN*, odgovoran je za rezistenciju niskog stupnja na vankomicin, a ujedno je i jedini gen za D-Ala-D-Ser ligazu koji je prenosiv konjugacijom (Lebreton i sur., 2011.; Nomura i sur., 2012.). Smatra se da je ova rezistencija konstitutivna i da ovaj fenotip može proći neprimijećen uobičajenim dijagnostičkim metodama koje se trenutačno koriste u mikrobiološkim laboratorijima (Lebreton i sur., 2018.).

2.4.3. Rezistencija na aminoglikozide

Aminoglikozidi su skupina antibiotika sličnog antimikrobnog djelovanja, farmakokinetičkih svojstava i toksičnosti. Svojstveno im je da remete sintezu bakterijskih proteina djelujući na bakterijske ribosome, na 30S podjedinicu. Aminoglikozidi djeluju baktericidno samo na aerobne bakterije, a ne mogu djelovati na anaerobne bakterije ili aerobne bakterije koje se nalaze u anaerobnim uvjetima (Giguère i sur., 2013.; Šeol i sur., 2010.).

Kako bi iskazali svoje antibakterijsko djelovanje, aminoglikozidi moraju prodrijeti u bakterijsku stanicu. Aktivnim transportom, uz prisutnost kisika, aminoglikozidi prolaze staničnu stijenku i ulaze u stanicu (Giguère i sur., 2013.). Vezanje aminoglikozida na staničnu stijenku uvelike ovisi o količini samog antibiotika, stoga njihovo djelovanje ovisi o primijenjenoj dozi (Mckellar i sur., 2004.). Liječenje se preporučuje provoditi jednom dnevno visokom dozom kako bi se povećalo antimikrobno, a smanjilo toksično djelovanje ovih antibiotika (Mckellar i sur., 2004., Giguère i sur., 2013.). Aminoglikozidi imaju i značajan postantibiotski učinak, jer tijekom terapije oštećuju bakterijske stanice koje su zatim podložnije djelovanju obrambenih imunskih mehanizama domaćina. Što je početna doza aminoglikozida veća, to je postantibiotski učinak dulji (Giguère i sur., 2013.).

Enterokoki urođeno očituju nizak stupanj rezistencije na sve aminoglikozide, odnosno otporni su na koncentracije aminoglikozida koje je terapijski moguće postići u tkivu (Kristich i sur., 2014.). Ova je pojava posljedica smanjenog unosa antibiotika u bakterijsku stanicu zbog promjene propusnosti membrane, smanjenog transporta kroz membranu i povećanog

izbacivanja efluks pumpama (Galimand i sur., 2011.) Osim smanjenog unosa aminoglikozida u stanicu, urođena rezistencija može biti posljedica enzimatske modifikacije aminoglikozida ili promjene ciljnog mjesta na ribosomu (Pintarić i Šeol Martinec, 2018.). Vrsta *E. faecium* primjer je za oba mehanizma urođene rezistencije. Ona posjeduje gene za aminoglikozid-modificirajući enzim acetiltransferazu (AAC(6')-Ii) koji može inaktivirati tobramicin, sisomicin, kanamicin i netilmicin (Chow, 2000.). Osim toga, mnogi sojevi sintetiziraju i enzim fosforiltransferazu APH(3')-IIIa koji djeluje na kanamicin i amikacin. Također, *E. faecium* ima sposobnost promjene ciljnog mjesta na ribosomu pomoću rRNA metiltransferaze (EfmM) što ju čini otpornom na kanamicin i tobramicin (Galimand i sur., 2011.).

Zbog svega navedenoga, na enterokoke mogu djelovati samo dva aminoglikozida, gentamicin i streptomycin (Miller i sur., 2014.). Uz to, aminoglikozidi kod enterokoka mogu iskazati svoje antimikrobno djelovanje jedino u kombinaciji s penicilinima ili glikopeptidima. Sinergija se postiže samo uz uvjet da nije prisutna stečena rezistencija na peniciline, glikopeptide i same aminoglikozide (Pintarić i Šeol Martinec, 2018.).

Stečena rezistencija na aminoglikozide kod enterokoka definira se kao rezistencija visokog stupnja. Takva rezistencija rezultat je mutacija gena koji ciljno mijenjaju mjesta djelovanja lijeka i/ili stjecanja gena koji kodiraju aminoglikozid-modificirajuće enzime. Ti geni prenose se plazmidima ili transpozonomima, a kodiraju tri tipa enzima: acetiltransferaze (AAC), adeniltransferaze (AAD) ili nukleotidiltransferaze (ANT) i fosforiltransferaze (APH) (Kristich i sur., 2014.). Enterokoki mogu steći rezistenciju visokog stupnja na sve lijekove iz skupine aminoglikozida, no s obzirom na to da su streptomycin i gentamicin jedini koji se koriste u terapiji, ispituje se samo stečena rezistencija na njih (Chow, 2000.). Ako se ispitivanjem dokaže rezistencija visokog stupnja na gentamicin, smatra se kako je izolat rezistentan na sve aminoglikozide izuzev streptomicina. Stečenu rezistenciju visokog stupnja na streptomycin potrebno je provjeriti zasebno (CLSI, 2015).

Kod enterokoka, rezistenciju visokog stupnja na gentamicin najčešće uzrokuje bifunkcionalni enzim AAC(6')-Ie/APH(2'')-Ia. Sojevi koji nose gen za ovaj enzim rezistentni su na sve aminoglikozide osim streptomicina (Hollenbeck i Rice, 2012.). Rezistenciju na gentamicin uzrokuju i enzimi fosforiltransferaze iz porodice APH(2'')-I, ali ona često nije tako visokog stupnja. Unatoč tome, bakterija koja proizvodi ovaj enzim rezistentna je na sinergijsko djelovanje gentamicina i penicilina ili glikopeptida (Chow, 2000.).

Rezistencija visokog stupnja na streptomycin najčešće je posljedica mutacija gena koje dovode do promjena na ciljnom mjestu vezanja aminoglikozida (Eliopoulos i sur., 1984.), a

može biti i posljedica djelovanja stečenih gena za adeniltransferaze ANT(6')-Ia i ANT(3'')-Ia (Chow, 2000.).

2.4.4. Rezistencija na tetraciklin

Tetraciklini su skupina antimikrobnih tvari bakteriostatskog djelovanja koji inhibiraju sintezu proteina vezanjem na 30S podjedinicu, čime sprječavaju vezanje aminoacil-tRNA na ribosom. Širokog su spektra djelovanja, uključujući gram-pozitivne i gram-negativne bakterije, klamidije, mikoplazme, rikecije i protozoe. Zbog dobrih antimikrobnih svojstava i niske toksičnosti, jedni su od najčešće korištenih lijekova u humanoj i veterinarskoj medicini (Chopra i Roberts, 2001.; EMA/58183/2021).

Osim u liječenju, tetraciklini su se godinama koristili u subterapijskim dozama kao promotori rasta u intenzivnom uzgoju životinja, što je rezultiralo selekcijom velikog broja tetraciklin-rezistentnih sojeva bakterija pa tako i tetraciklin-rezistentnih enterokoka (Chopra i Roberts, 2001; Poeta i sur., 2006.). S obzirom na to da su enterokoki rezistentni na tetracikline često istovremeno rezistentni i na druge antimikrobne tvari (npr. eritromicin, vankomicin, gentamicin), pretjerana upotreba tetraciklina u veterinarskoj medicini zabrinjavajuća je jer pogoduje selekciji multirezistentnih sojeva (Hammerum, 2012.; Ngbede i sur., 2017.). Nadalje, istraživanja su pokazala kako upotreba tetraciklina u uzgoju svinja i peradi može utjecati i na pojavu rezistencije na makrolide, linkozamid i streptogramin B koji se koriste i u humanoj i u veterinarskoj medicini, a važni su kao alternativna terapija kompliciranih enterokoknih infekcija kod ljudi (De Leener i sur., 2005.; Cauwerts i sur. 2007.). Osim kod životinja u uzgoju, visoki postotci tetraciklin-rezistentnih enterokoka zabilježeni su i kod kućnih ljubimaca (Kataoka i sur., 2014.).

Rezistencija na tetracikline može biti posljedica djelovanja efluks pumpi, zaštite ciljnog mjesta vezanja antibiotika proteinima i enzimatske inaktivacije lijeka. Otkriveno je 18 *tet* i jedan *otr* gen koji se povezuju s efluksom tetraciklina iz bakterijskih stanica te sedam *tet* i jedan *otr* gen odgovornih za zaštitu ciljnog mjesta proteinima. Osim njih, otkriven je i jedan gen koji kodira enzim za inaktivaciju tetraciklina (*tetX* gen), međutim, smatra se kako ta rezistencija nema kliničku važnost jer je rad enzima ovisan o kisiku, a gen je otkriven samo u anaerobnim bakterijama (Chopra i Roberts, 2001.).

Kod enterokoka su zastupljena dva mehanizma rezistencije na tetracikline, efluks i zaštita veznog mjesta na ribosomu. Efluks pumpe specifične za tetracikline kodirane su genima

tetK i *tetL*, a odgovorne su za rezistenciju na tetraciklin i klortetraciklin, ali ne i na minociklin ili glicilcikline. Gen *tetL* znatno je prošireniji od gena *tetK*, a oba se nalaze na malim prenosivim plazmidima (Chopra i Roberts, 2001.).

Geni *tetM*, *tetO* i *tetS* kodiraju za zaštitne proteine koji se vežu na ciljno mjesto vezanja tetraciklina i tako uzrokuju rezistenciju enterokoka na tetraciklin, doksiciklin i minociklin (Chopra i Roberts, 2001.). Kod enterokoka najrašireniji je gen *tetM*, odgovoran za rezistenciju na tetraciklin i minociklin, a najčešće je smješten na konjugativnom transpozonu Tn916 (Aarestrup i sur., 2000.; Friedman i sur., 2006.). Ovaj transpozon i njemu slični genski elementi najčešći su način širenja rezistencije među gram-pozitivnim bakterijama, a u *in vitro* uvjetima dokazan je i prijenos *tetM* gena iz enterokoka u gram-negativne bakterije (Swartley i sur., 1993.). Osim na transpozonu, gen *tetM* može biti smješten i na plazmidu, zajedno s genom *ermB*, odgovornim za rezistenciju na makrolide, linezolid i streptogramin B (Cauwerts i sur., 2007.).

Gen *tetU* posljednji je u nizu otkrivenih *tet* gena odgovornih za rezistenciju enterokoka na tetracikline (Chopra i Roberts, 2001.). Otkriven je u vrsti *E. faecium* (Ridenhour i sur., 1996.), a pretpostavlja se da je zaslužan za rezistenciju niskog stupnja na tetracikline (Roberts, 2005.). Međutim, s obzirom na to da točan mehanizam rezistencije još uvijek nije razjašnjen, postavlja se pitanje je li gen *tetU* uopće odgovoran za rezistenciju na tetracikline (Caryl i sur., 2012.).

2.4.5. Rezistencija enterokoka na ostale lijekove

2.4.5.1. Rezistencija na fluorokinolone

Fluorokinoloni, antimikrobni lijekovi razvijeni iz kinolona, inhibiraju aktivnost DNA giraze i topoizomeraze IV, dvaju enzima važnih za umnažanje bakterijske DNA. Ovi lijekovi slabo do umjereno djeluju na enterokoke, a za to su odgovorni različiti urođeni mehanizmi rezistencije. Enterokoki posjeduju kromosomske gene za DNA girazu i topoizomerazu IV s urođenim mutacijama zbog kojih nije moguće učinkovito vezanje fluorokinolona na ciljna mjesta (Oyamada i sur., 2006.; Werner i sur., 2010.). Osim navedenih promjena ciljnih mjesta, na rezistenciju enterokoka utječu i mnogobrojne urođeno prisutne efluks pumpe. Efluks pumpe sprječavaju postizanje potrebne koncentracije fluorokinolona u stanici pa, iako su oni uobičajeno baktericidnog djelovanja, na enterokoke djeluju samo bakteriostatski (Davis i sur., 2001.; Oyamada i sur., 2006.). Treći urođeni mehanizam rezistencije enterokoka na

fluorokinolone je zaštita ciljnih mjesta na enzimima. Ovaj oblik rezistencije prvotno je otkriven kod enterobakterija, a posredovan je proteinima Qnr porodice koje kodiraju geni smješteni na plazmidima. U genomu vrste *E. faecalis* otkriven je homologan protein, EfsQnr, koji se povezuje s urođenom i potencijalno prenosivom rezistencijom na fluorokinolone (Arsène i Leclercq, 2007.; Kristich i sur., 2014.).

2.4.5.2. Rezistencija na nitrofurantoin

Nitrofurantoin je antimikrobni lijek bakteriostatskog djelovanja koje u visokim dozama ili kiselim pH mokraće postaje baktericidno. Osim samog nitrofurantoina, i njegovi metaboliti imaju antimikrobno djelovanje (Wijma i sur., 2018.). Kako bi nitrofurantoin iskazao svoje djelovanje, potrebna je njegova aktivacija redukcijom enzima nitroreduktazom ili nitrofuran-reduktazom. Nakon aktivacije, lijek sprječava replikaciju DNA, blokira stanično disanje i metabolizam piruvata, a veže se i na ribosome te remeti njihovu funkciju (Macrobid, 2013.; Tu i McCalla, 1975.). Kod enterokoka, rezistencija na nitrofurantoin najprije je dokazana i danas se najčešće javlja kod sojeva vrste *E. faecium*. Mehanizmi rezistencije dugo nisu bili poznati, a neki od njih razjašnjeni su tek 2021. godine (Zhang i sur., 2021.). Navedeni autori kod rezistentnih su izolata dokazali hiperekspresiju gena koji kodiraju za efluksne pumpe i delecije u genima koji kodiraju enzime nitroreduktaze. Još uvijek se smatra da su potrebna dodatna istraživanja mehanizama odgovornih za rezistenciju na nitrofurantoin, kao i razloga zašto je znatno učestalija kod sojeva *E. faecium* nego sojeva *E. faecalis*.

2.4.5.3. Rezistencija na rifampicin

Rifampicin je antibiotik koji se veže na bakterijsku RNA polimerazu i tako sprječava sintezu bakterijskih proteina. Rezistencija enterokoka na rifampicin posljedica je mutacije gena *rpoB*, koji kodira beta podjedinicu RNA polimeraze, čime se mijenja dio veznog mjesta i smanjuje afinitet rifampicina za polimerazu. Mutacije navedenog gena dokazane su kod različitih bakterijskih vrsta, a nastaju vrlo brzo, već tijekom terapije, pa se lijek vrlo rijetko koristi samostalno (Kristich i sur., 2014.). Osim mutacija, rezistenciju kod nekih bakterija može uzrokovati i inaktivacija lijeka enzimom ADP-ribozilazom (Baysarowich i sur., 2008.; Kristich i sur., 2014.).

2.4.5.4. Rezistencija na kloramfenikol

Kloramfenikol je bakteriostatski lijek širokog spektra djelovanja. Inhibira peptidil-transferazu, odnosno zaustavlja sintezu bakterijskih proteina (Šeol i sur., 2010.). Iako su neke novootkrivene vrste enterokoka urođeno rezistentne (Sedlaček i sur., 2013.), većinom su za rezistenciju enterokoka na kloramfenikol odgovorni stečeni mehanizmi kao što su inaktivacija lijeka enzimima acetiltransferazama i metiltransferazama, izbacivanje lijeka efluksnim pumpama i mutacije na 23S podjedinici ribosoma, čime se mijenja vezno mjesto lijeka (Kristich i sur., 2014.). Geni koji kodiraju za kloramfenikol-inaktivirajuće enzime nalaze se na plazmidima. Plazmid pIP501 nosi gen *cat* za acetiltransferazu (Schwarz i sur., 2004.), a *in vitro* je dokazan njegov prijenos između enterokoka, streptokoka i stafilokoka (Kristich i sur., 2014.). Uz *cat* gen, enterokoki mogu steći i *cfr* gen za metiltransferazu, odgovoran za križnu rezistenciju na kloramfenikol, sve oksazolidine, linkozamid, streptogramin A i pleuromutiline (Liu i sur., 2012., Liu i sur., 2013.; Long i sur., 2006.). Također, plazmidima se prenose i geni za efluks pumpe, primjerice gen *optrA* za efluks pumpu koja kod enterokoka posreduje u rezistenciji na kloramfenikol, florfenikol, linezolid i tedizolid (Wang i sur., 2015.). Unatoč detaljnim istraživanjima soja *E. faecalis* V583 (vankomicin-rezistentan soj *E. faecalis*), nisu pronađeni specifični kromosomski geni ili njihove mutacije, koji bi bili odgovorni za rezistenciju na kloramfenikol. Primijećeno je preko 600 gena koji su bili ili pojačano eksprimirani ili suprimirani, a odgovorni su za sintezu transportnih proteina, proteina membrane i ribosomalnih proteina (Aakra i sur., 2010.).

2.4.5.5. Rezistencija na "novije" lijekove

Daptomicin je lipopeptidni antibiotik baktericidnog djelovanja, čiji se mehanizam djelovanja znatno razlikuje od mehanizama ostalih antimikrobnih tvari. Nakon adhezije ugrađuje se u bakterijsku staničnu membranu pri čemu nastaju porozni kanali koji omogućuju brz i lak izlazak iona kalija. Time daptomicin dovodi do depolarizacije membrane, a posljedično se zaustavlja sinteza DNA i proteina (Silverman i sur., 2003.). Daptomicin je u SAD-u u upotrebi od 2003. godine, a u Europi od 2006. godine (Bender i sur., 2018.), a rezistencija enterokoka dokazana je vrlo brzo nakon uvođenja lijeka u terapiju (Lesho i sur., 2006.; Long i sur., 2005.; Sabol i sur., 2005.). Rezistencija je posljedica mutacija različitih gena odgovornih za naboj i sastav membrane te za odgovor na stres, kao što su gen *cls* koji kodira enzim sintazu kardiolipina, gen *gdpD* za enzim glicerofosforildiester-

-fosfodiesterazu i gen *liaF* koji sudjeluje u odgovoru na stres. Navedene mutacije rezultiraju promjenama u metabolizmu i strukturi fosfolipida i citoplazmatske membrane, što dovodi do promjene polariteta membrane i smanjene mogućnosti vezanja daptomicina (Arias i sur., 2011.; Bender i sur., 2018.; Palmer i sur., 2011.). Ove mutacije samo djelomično objašnjavaju rezistenciju na daptomicin, a smatra se da prilagodba enterokoka na okolinu i mogućnost ugradnje različitih lipida dostupnih *in vivo* uzrokuje rezistencije zasad nepoznatog mehanizma (Saito i sur., 2014.).

Linezolid je prvi oksazolidinonski antibiotik. Odobren je za upotrebu 2000. godine, a već 2001. u SAD-u te 2002. u UK-u su zabilježeni prvi VRE izolati rezistentni na linezolid (Auckland i sur., 2002.; Gonzales i sur., 2001.). Vezanjem na 50S podjedinicu ribosoma, linezolid inhibira početni korak u sintezi bakterijskih proteina. Smatra se lijekom s bakteriostatskim djelovanjem, no za pneumokoke, streptokoke grupe A, *Bacteroides fragilis* i *Clostridium perfringens* je baktericidan (Norrby, 2001.). Rezistencija enterokoka na linezolid posljedica je mutacija u 23S podjedinici ribosoma kojom se smanjuje afinitet vezanja lijeka ili se njegovo vezanje u potpunosti sprječava (Bender i sur., 2018.; Marshall i sur., 2002.). Također, otkriveno je da pojedini sojevi enterokoka mogu ugraditi plazmide koji nose *cfp* gen za metiltransferazu koja uzrokuje metilaciju na poziciji A2503 u 23S podjedinici ribosoma što mijenja vezno mjesto za antibiotik (Diaz i sur., 2012.). Gen *cfp* ujedno je odgovoran za križnu rezistenciju na sve oksazolidine, linkozamid, streptogramin A, pleuromutiline i kloramfenikol (Bender i sur., 2018.; Liu i sur., 2012., Liu i sur., 2013.; Long i sur., 2006.). Gen *optrA* jedan je od kasnije otkrivenih gena odgovornih za rezistenciju enterokoka na linkozamid. Smješten je na plazmidu, a kodira efluks pumpu i uzrokuje rezistenciju na oksazolidinone i fenikole (Bender i sur., 2018.). Osim poznatih mehanizama rezistencije, mnogo je onih o kojima se ne zna gotovo ništa i koje tek treba istražiti (Bender i sur., 2018.). Rezistencija na linezolid proširila se izrazito brzo, a dokazana je među enterokokima humanog, životinjskog i okolišnog porijekla te enterokokima u hrani.

Streptogramini A i B koriste se u kombinaciji u lijeku kvinupristin/dalfopristin, pri čemu je dalfopristin streptogramin A (70 % lijeka), a kvinupristin streptogramin B (preostalih 30 %) (Linden i sur., 2001.). Streptogramini u ovoj kombinaciji djeluju sinergijski i iskazuju baktericidni učinak na većinu gram-pozitivnih koka djelujući na ribosome pri čemu remete sintezu bakterijskih proteina (Pintarić i Šeol Martinec, 2018.). Vrsta *E. faecalis* urođeno je rezistentna na streptogramin A, stoga se ova kombinacija streptogramina

koristi samo u liječenju infekcija uzrokovanih vankomicin-rezistentnim sojevima vrste *E. faecium*. Urođena rezistencija vrste *E. faecalis* posljedica je ekspresije integriranog membranskog proteina Lsa, kodiranog *lsa* genom, koji nije prisutan ni u jednoj drugoj vrsti enterokoka (Singh i Murray, 2005.). Protein Lsa ima ulogu transportnog proteina unutar efluksne pumpe koja izbacuje toksične tvari iz bakterijske stanice, a među njima i molekule streptogramina A, pleuromutilina i linkozamida, što rezultira rezistencijom vrste *E. faecalis* na navedene lijekove (Singh i sur., 2002.). Stečena rezistencija enterokoka na streptogramine može se razviti kao posljedica promjene ciljnog mjesta vezanja lijeka, inaktivacije lijeka i izbacivanja lijeka efluksnim pumpama, a obično je potrebno istovremeno djelovanje više mehanizama za postizanje visokog stupnja rezistencije i potpune nedjelotvornosti ovog lijeka (Hollenbeck i Rice, 2012.). Rezistencija na streptogramin A može biti posljedica stjecanja *cfr* gena, jednako kao i kod rezistencije na linezolid (Bender i sur., 2018.; Cercenado i sur., 2010.; Diaz i sur., 2012.). Uz to, rezistencija može biti posljedica acetilacije (ako bakterije prime *VatH* gen) i efluksa (zbog transportnog proteina kodiranog *Vga* genom) (Kak i Chow, 2002.). Rezistencija na streptogramin B najčešće je kodirana genom *ermB* koji je izrazito proširen među enterokokima, osobito u izolatima vrste *E. faecium*. Ovaj gen kodira enzim eritromicin metilazu koja uzrokuje promjenu ciljnog mjesta na ribosomu. Ciljno mjesto zajedničko je makrolidima, linkozamidu i streptograminu B pa je posljedica djelovanja ovog enzima križna rezistencija na navedene antimikrobne lijekove, a može biti inducibilna i konstitutivna. Iako su bakterije s ovim genom rezistentne na streptogramin B, lijek kvinupristin/dalfopristin i dalje je djelotvoran (Kristich i sur., 2014.).

Tigeciklin je derivat minociklina, pripadnik je glicilciklina i bakteriostatskog je djelovanja, a aktivan je protiv širokog spektra mikroorganizama. Djeluje vezanjem za 30S podjedinicu ribosoma i koči sintezu proteina (Bender i sur., 2018.). Iako ima dobro *in vitro* djelovanje protiv enterokoka, u krvi se teško postižu potrebne koncentracije te se najčešće ne koristi kao monoterapija (Selleck i sur., 2019.). U liječenju enterokoknih infekcija koristi se u kombinaciji s drugim lijekovima, osobito ako je infekcija uzrokovana vankomicin-rezistentnim enterokokima. Rezistencija na ovaj lijek posljedica je mutacija u genima *tetM* i *tetL*, odgovornima za rezistenciju enterokoka na tetracikline. Zbog mutacije, geni su hiperekprimirani te se uz rezistenciju na tetracikline razvija i rezistencija na tigeciklin (Cattoir i sur., 2015.; Fiedler i sur., 2016.). Nadalje, otkriveno je da se rezistencija javlja i zbog mutacija gena *rpsJ* koji kodira 10S podjedinicu ribosoma (Beabout i sur., 2015.; Cattoir i sur., 2015.; Fiedler i sur., 2016.; Niebel i sur., 2015.).

2.5. Enterokoki kao uzročnici infekcija

Bakterije roda *Enterococcus* smatraju se uvjetno patogenim bakterijama koje rijetko uzrokuju infekcije. Ipak, u posljednjih 50 godina infekcije uzrokovane ovim bakterijama su u porastu, a u humanoj medicini enterokoki su vrlo visoko na listi najčešćih uzročnika bolničkih infekcija. Najznačajnije i najčešće vrste izdvojene iz kliničkih uzoraka humanog i životinjskog porijekla su *E. faecium* i *E. faecalis* (Lebreton i sur., 2014.; Malani i sur., 2002.; Zaheer i sur., 2020.). Osim njih, infekcije sporadično uzrokuju i vrste *E. durans*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* i *E. avium*, znatno češće kod životinja nego kod ljudi (Lebreton i sur., 2014.; Said i sur. 2021.).

Do sredine 90-ih godina prošlog stoljeća, vrsta *E. faecalis* dominirala je među kliničkim izolatima enterokoka (90 – 95 %), dok se vrsta *E. faecium* znatno rjeđe izdvajala (Huycke i sur. 1998.). Značajan porast broja izolata vrste *E. faecium* u kliničkim uzorcima započinje krajem 20. stoljeća, osobito izolata rezistentnih na ampicilin, fluorokinolone i vankomicin (Arias i Murray, 2012.; Gilmore i sur., 2013.; Said i sur., 2021.).

2.5.1. Infekcije kod ljudi

Enterokoki su jedine patogene gram-pozitivne bakterije koje se povezuju s visokim rizikom od smrti (Hammerum, 2012.). Većina infekcija uzrokovanih enterokokima su bolničke infekcije, a u proteklim desetljećima enterokoki su zbog svoje rezistencije postali jedni od najčešćih uzročnika kompliciranih i teško lječivih infekcija (Guzman Prieto i sur., 2016.; Hidron i sur., 2008.; Said i sur., 2021.).

Enterokoki mogu uzrokovati različite infekcije kod ljudi, a najčešće su to infekcije mokraćnog sustava, endokarditis, bakterijemija i infekcije rana (Selleck i sur., 2019.). Uzrokuju 5 – 15 % slučajeva infektivnog endokarditisa, najozbiljnije enterokokne infekcije kod ljudi, a vrsta *E. faecalis* je najčešći uzročnik (Murdoch i sur., 2009.). Smrtnost je nešto niža nego u endokarditisa uzrokovanih drugim bakterijama, ali ipak je značajna i kreće se između 9 i 15 % (McDonald i sur., 2005.).

Enterokoki su drugi po učestalosti uzročnici bolničkih bakterijemija (Ceci i sur., 2015.; Hidron i sur., 2008.; Said i sur., 2021.), čija se smrtnost kreće između 25 i 50 % (Selleck i sur., 2019.). Bakterijemije uzrokovane vrstom *E. faecium* učestalije su od onih uzrokovanih vrstom

E. faecalis, a imaju i veću stopu smrtnosti koja kod kroničnih bolesnika može iznositi i do 75 % (Perez-Garcia i sur., 2015.; Selleck i sur., 2019.).

U jedinicama intenzivne njege, 15 – 20 % svih bolničkih infekcija mokraćnog sustava uzrokovano je enterokokima, a VRE izolati su postali jedni od vodećih uzročnika (Ceci i sur., 2015.; Hidron i sur., 2008.; Said i sur., 2021.).

Osim navedenih infekcija, enterokoki mogu uzrokovati i infekcije mekih tkiva koje su najčešće multikauzalne, dok kao jedini uzročnik mogu dovesti do peritonitisa. Često su uzročnici infekcija korijena zuba, a rjeđe uzrokuju meningitis, hematogeni osteomijelitis, septički artritis i upalu pluća. Uz to, mnoge studije povezuju povećanu zastupljenost enterokoka u okolišu s dermatološkim bolestima i bolestima probavnog sustava (Higuita i Huycke, 2014.; Selleck i sur., 2019.).

2.5.2. Infekcije kod životinja

Gastrointestinalni trakt životinja predstavlja najveći izvor enterokoka u biosferi (Gilmore i sur., 2013.). Iako su enterokoki kod životinja, kao i kod ljudi, primarno komenzalne bakterije, oni mogu biti uzročnici različitih infekcija. Većinom uzrokuju infekcije mokraćnog sustava, rana, zvukovoda i genitalnog sustava ženki. Također, uzrokuju i upalne bolesti crijeva, poput enterokolitisa, a rijetko mogu uzrokovati i endokarditis i meningoencefalitis (Cartwright i sur., 2020.; Harvey i sur., 2021.; Szaluš-Jordanow i sur., 2021.; Torres i sur., 2018.; Van Loon i sur., 2020.; Willis i sur., 2019.). Zbog obitavanja u usnoj šupljini, slično kao i kod ljudi, enterokoke se povezuje s parodontalnom bolesti pasa (Oliviera i sur., 2016.).

Enterokoki mogu uzrokovati mastitis kod goveda, koza i ovaca, dijareju kod pasa, mačaka, ždrjebadi, goveda i svinja te endokarditis i bakterijemiju kod peradi (Aarestrup i sur., 2002.; Bisgaard i sur., 2010.; El-Zamkan i Mohamed, 2021.; Jang i sur., 2019.; Nam i sur., 2010.). Također, dokazan je i spondilitis u peradi uzrokovan enterokokima (Borst i sur., 2017.).

Prisutnost pojedinih rezistentnih sojeva enterokoka izdvojenih iz životinja potvrđena je i kod ljudi te se smatra potvrdom njihova prijenosa na ljude (Hammerum, 2012.).

2.6. Terapija infekcija uzrokovanih enterokokima

Liječenje enterokoknih infekcija teško je i dugotrajno, a uvelike ovisi o složenosti i mjestu infekcije te vrsti enterokoka koja ju uzrokuje. Osnovni problem je urođena rezistencija enterokoka na velik broj antimikrobnih tvari, kao i činjenica da velik broj lijekova inače baktericidnog djelovanja kod enterokoka ima samo bakteriostatski učinak (Arias i Murray, 2012.; Weese i sur., 2021.). Uz to, enterokoki lako stječu nove mehanizme rezistencije pa se izbor djelotvornih lijekova smanjuje (Arias i Murray, 2012.). U terapiji teških infekcija, poglavito endokarditisa, nužan je baktericidan učinak lijeka zbog nedostupnosti bakterija imunosnom sustavu (Arias i sur., 2010.; Munita i sur., 2012.). To se može postići tek istovremenom primjenom barem dvaju djelotvornih antimikrobnih lijekova (Arias i Murray, 2008.; Munita i sur., 2012.). Daljnji problem u liječenju predstavlja odabir djelotvornog lijeka kod infekcija uzrokovanih multirezistentnim sojevima enterokoka (Arias i sur., 2010.; Munita i sur., 2012.).

Prije terapije, i u humanoj i u veterinarskoj medicini, nužno je odrediti osjetljivost izolata na antimikrobne lijekove koji mogu poslužiti u terapiji, što u humanoj medicini, osobito kod bolničkih infekcija, podrazumijeva i ispitivanje osjetljivosti na vankomicin. Također, kod teških, za po život opasnih infekcija ljudi, kao što su endokarditis, bakterijemija i meningitis, preporučuje se provesti identifikaciju uzročnika do vrste kako bi se rezultati osjetljivosti mogli tumačiti s većom sigurnošću (Cetinkaya i sur., 2000.).

U humanoj medicini postoje smjernice za liječenje i preporuke za optimalne kombinacije lijekova ovisno o infekciji, no u veterinarskoj medicini takvih specifičnih smjernica za liječenje enterokoknih infekcija nema (KuKanich i Lubbers, 2015.). Jedina preporuka preuzeta je iz humane medicine, a odnosi se na primarnu terapiju enterokoknih infekcija koja uključuje upotrebu ampicilina ili penicilina G za jednostavnije infekcije te kombinaciju penicilina i aminoglikozida za komplicirane infekcije (Šeol i sur., 2010.; Weese i sur., 2021.). Najveći problem u liječenju predstavlja odabir djelotvorne terapije kod infekcija uzrokovanih multirezistentnim sojevima, osobito ako je riječ o mješovitim infekcijama ili prisutnosti biofilma (Dorsch i sur., 2019.).

Prepoznavanje sinergizma penicilina i aminoglikozida te uočavanje baktericidnog učinka ove kombinacije lijekova, značajno je utjecalo na uspjeh liječenja teških enterokoknih infekcija, endokarditisa i bakterijemije (Arias i sur., 2010.; Munita i sur., 2012.). Danas se u terapiji endokarditisa koristi kombinacija penicilina ili aminopenicilina s aminoglikozidom (Baddour i sur., 2005.; Munita i sur., 2012.; Šeol i sur., 2010.). Smatra se da su aminopenicilini

bolji izbor od penicilina jer su potrebne znatno niže koncentracije lijeka da bi se postigao jednak učinak, ali nužno je kod uzročnika isključiti prisutnost beta-laktamaza (Murray, 2000.; Weese i sur., 2021.). Od aminoglikozida, gentamicin pokazuje nešto bolji sinergijski učinak od streptomicina pa se smatra boljim izborom za liječenje (KuKanich i Lubbers, 2015.).

Velik broj izolata vrste *E. faecium* humanog porijekla rezistentno je na ampicilin, a porast rezistencije uočen je i u veterinarskoj medicini (Damborg i sur., 2009.; Oteo i sur., 2007.). Umjesto penicilina i ampicilina, u humanoj se medicini može koristiti i vankomicin (Fraser i sur., 2021.) S obzirom na to da njegova upotreba nije dozvoljena u veterinarskoj medicini, u slučaju penicilin-rezistentnih sojeva, koriste se antibiotici drugih skupina, kao što su tetraciklini ili fluorokinoloni (Weese i sur., 2021.).

U liječenju infekcija donjeg mokraćnog sustava, i u humanoj i u veterinarskoj medicini, preporuka je koristiti nitrofurantoin zbog svojstva ukoncentriravanja u mokraćnom mjehuru (Weese i sur., 2021.). Također, iz istog razloga mogu se koristiti i fosfomicin ili doksiciklin (Heintz i sur., 2010.; Weese i sur., 2021.).

Fluorokinoloni slabo djeluju na enterokoke te se ne preporučuju u liječenju teških infekcija kod ljudi (Arias i Murray, 2008.), no mogu se koristiti u liječenju nekomplikiranih infekcija kože, mekih tkiva i jednostavnih infekcija mokraćnog sustava ljudi i životinja (Landman i Quale, 1997.; Weese i sur., 2021.).

Kloramfenikol se vrlo rijetko koristi; u veterinarskoj medicini samo za liječenje infekcija uzrokovanih multirezistentnim enterokokima za koje više nema drugog izbora lijeka (Weese i sur., 2021.). U humanoj medicini koristi se u liječenju teških infekcija (bakterijemije i endokarditisa) uzrokovanih VRE izolatima, poglavito vrstom *E. faecium* (Arias i Murray, 2010.; Čivljak i sur., 2014.; Norris i sur., 1995.; Safdar i sur., 2002). Osim toga, koristi se i u liječenju infekcija središnjeg živčanog sustava, poput meningitisa i ventrikulitisa (Scapellato i sur., 2005.). Zbog velike toksičnosti za koštanu srž, kloramfenikol je lijek koji se koristi samo kad su svi lijekovi i sve kombinacije lijekova nedjelotvorne (Kristich i sur., 2014.).

Noviji lijekovi koji se mogu upotrijebiti za liječenje enterokoknih infekcija, čak i onih uzrokovanih VRE izolatima, su daptomicin i linezolid (Arias i Murray, 2008.; Falagas i sur., 2006.; Jenkins, 2007.; Mohr i sur., 2009.; Selleck i sur., 2019.). Koriste se isključivo u humanoj medicini, u bolničkoj sredini sa strogom kontrolom koncentracija lijekova i samo za teške, po život opasne infekcije (bakterijemija i endokarditis) (Arias i Murray, 2010.). Rezistencija enterokoka na oba lijeka je rijetka, ipak, pojedine zemlje bilježe porast broja rezistentnih izolata (Jahansepa i sur., 2018.; Tambić Andrašević i sur., 2019.).

Za infekcije uzrokovane vankomicin-rezistentnim izolatima vrste *E. faecium*, u humanoj se medicini koristi i kombinacija streptogramina A i B, odnosno lijek kvinupristin/dalfopristin (Arias i Murray, 2010.). Zbog urođene rezistencije na streptogramin A, lijek se ne koristi za liječenje infekcija uzrokovanih vrstom *E. faecalis* (Singh i Murray, 2005.). Prema novim istraživanjima, i rezistencija na ovaj lijek sve je prisutnija, primjerice, Jahansepa i sur. (2018.) u svojem su istraživanju ustanovili kako je 100 % izdvojenih VRE izolata *E. faecium* bilo rezistentno na ovu kombinaciju lijekova.

Tigeciklin je lijek odobren za liječenje infekcija uzrokovanih vrstom *E. faecalis*, i to infekcija kože i mekih tkiva (Arias i Murray, 2010.). Iako su neki sojevi vrsta *E. faecium* osjetljivi, upotreba tigeciklina se kod infekcija uzrokovanih ovom vrstom ne preporučuje (Rubinstein i Vaughan, 2005.). U liječenju teških infekcija, uzrokovanih vankomicin-rezistentnim enterokokima, tigeciklin se može kombinirati s daptomicinom, no zbog teških nuspojava ova se kombinacija koristi samo u slučajevima kad nema drugog izbora lijeka (Jenkins, 2007.).

2.7. Enterokoki kao javnozdravstveni problem

Zbog urođene rezistencije i velike sposobnosti stjecanja novih mehanizama rezistencije te mogućnosti horizontalnog i vertikalnog prijenosa gena odgovornih za rezistenciju, enterokoki predstavljaju opasnost za zdravlje životinja i ljudi.

Defekacijom životinja i ljudi, enterokoki dospijevaju u okoliš – u tlo, vode i na biljke. Zbog obitavanja u gastrointestinalnom sustavu praktički svih životinja široko su rasprostranjeni, a s njima i svi njihovi geni, pa tako i geni odgovorni za rezistenciju. Zbog svoje otpornosti na vanjske uvjete dugo se zadržavaju u prirodi, što im omogućuje kontakt s raznim životinjama. Kućne muhe poznate su kao prenosioci različitih patogenih mikroorganizama, pa tako i enterokoka s kojima su bile u kontaktu tijekom leta i hranjenja (Ghosh i sur., 2014.; Khamesipour i sur., 2018.). Istraživanja provedena na farmama velikih životinja istaknula su kako muhe i drugi kukci mogu biti rezervoari i vektori rezistentnih enterokoka (Ahmad i sur., 2011.; Macovei i sur., 2008.). Osim na farmama, muhe kao nosioci rezistentnih enterokoka dokazane su i u restoranima brze hrane, a potvrđen je i prijenos enterokoka iz muha na gotovu hranu (Macovei i Zurek, 2006.; Macovei i sur., 2008.).

Osim muha, koje su prisutne u svim staništima, novi način širenja enterokoka i gena za rezistenciju postaju komarci i termiti, iz kojih su izdvojene dvije novije vrste enterokoka, *E.*

rotai i *E. termitis* (Sedláček i sur., 2013.; Švec i sur., 2006). Rezistentni enterokoki izdvojeni su iz uzoraka različitih divljih životinja, kućnih ljubimaca i farmskih životinja s kojima je čovjek u neposrednom kontaktu: peradi, svinja i goveda.

Prema Cauwerts i sur. (2007.), rezistentni sojevi enterokoka prisutni u crijevima peradi gene odgovorne za rezistenciju mogu prenijeti na druge patogene bakterije. Nadalje, enterokoki se mogu, izravno ili posredno, prenijeti na čovjeka i uzrokovati infekciju ili predstavljati izvor gena odgovornih za rezistenciju drugim bakterijama gastrointestinalnog sustava čime posredno predstavljaju opasnost za ljudsko zdravlje (Cauwerts i sur., 2007.; Hammerum, 2012.). Larsen i sur. (2011.) dokazali su prisutnost genetski identičnih izolata kod svinja i ljudi te time potvrdili mogućnost prijenosa patogenih bakterija sa životinje na čovjeka i obratno te ukazali na realnu opasnost prijenosa patogenih sojeva.

Jedan od uzroka nastanka i širenja rezistentnih i multirezistentnih izolata enterokoka upotreba je antibiotika u subterapijskim dozama u svrhu promocije rasta životinja koje služe za prehranu ljudi. Stoga je u svim zemljama Europske unije zabranjeno korištenje svih antimikrobnih tvari kao aditiva u hrani za životinje. Unatoč zabrani i vremenskom odmaku od 20-ak godina, VRE i druge MDR bakterije i dalje su prisutne u životinjama i okolišu (Herrero i sur., 2004.; Ngbede i sur., 2017.).

Enterokoki izdvojeni iz kućnih ljubimaca slabo su istraženi, iako je dokazano da je vjerojatnost infekcije ljudi izolatima iz kućnih ljubimaca veća nego onima porijeklom iz farmskih životinja (Ossiprandi i Zerbini, 2015.). Neka od istraživanja potvrdila su prisutnost MDR sojeva enterokoka u ljubimcima te ih se smatra mogućim rezervoarom gena za rezistenciju (Cinquelpalmi i sur., 2013.; Damborg i sur., 2009.; Jackson i sur., 2009.; Kataoka i sur., 2014.; Troscianczyk i sur., 2021.).

Pojava multirezistentnih i vankomicin rezistentnih sojeva enterokoka te mogućnost prijenosa gena rezistencije na osjetljive bakterije, poglavito one kojima je vankomicin jedini djelotvorni lijek (npr. MRSA), predstavlja opasnost za javno zdravlje (Armin i sur., 2017.; Levine, 2006.; Rogóż i sur., 2019.). Velik broj bolničkih sojeva već je rezistentan na peniciline ili posjeduje rezistenciju visokog stupnja na aminoglikozide, čime je onemogućeno korištenje navedenih lijekova u terapiji (Said i sur., 2021.; Tambić Andrašević i sur., 2015., 2020.). Uz to, brzo širenje VRE izolata predstavlja iznimno velik problem u liječenju enterokoknih infekcija jer su oni u pravilu uvijek i multirezistentni. Pored toga, istraživanja iz cijelog svijeta svakodnevno otkrivaju sojeve enterokoka rezistentne i na novije lijekove poput linezolida, kvinupristin/dalfopristin, tigeciklina i/ili daptomicina (Bender i sur., 2020.; Egan i sur., 2021.; Hassani i sur., 2018.; Wardenburg i sur., 2019.).

Tijekom posljednja tri desetljeća, vankomicin-rezistentni sojevi enterokoka, osobito vrsta *E. faecium* i *E. faecalis*, postali su jedni od vodećih uzročnika bolničkih infekcija (Ngbede i sur., 2017.; Repac Antić i sur., 2018.; Said i sur., 2021.). Upravo zbog multirezistencije Svjetska zdravstvena organizacija uvrstila je vrstu *E. faecium* u skupinu bakterija za koje je nužno proizvesti nove antimikrobne lijekove (WHO, 2017.).

2.8. Enterokoki kao indikatori fekalnog zagađenja

Enterokoki su jedne od prvih bakterija koje koloniziraju gastrointestinalni sustav, a u fecesu čovjeka nalaze se u velikom broju, $10^4 - 10^6$ bakterija po gramu fecesa (Layton i sur., 2010.). Zbog toga, kao i činjenice da su prisutni kod svih ljudi, smatraju se pokazateljima fekalnog zagađenja. Prisutnost enterokoka na rukama na rukama ljudi također se koristi i kao pokazatelj higijene ruku (Boehm i Sassoubre, 2014.).

Upotreba enterokoka kao pokazatelja fekalnog zagađenja nije jednostavna jer se enterokoki nalaze u GI sustavu gotovo svih životinja, na biljkama, u tlu i vodama pa je procjena, je li zaista riječ o zagađenju uzrokovanom ljudskom djelatnošću ili je prisutnost enterokoka posljedica njihove prirodne rasprostranjenosti u biosferi, otežana (Byappanahalli i sur., 2012.; Layton i sur., 2010.; Nowakiewicz i sur., 2020.). Identifikacija vrste ili genetička karakterizacija ljudima specifičnih enterokoka uvelike bi pomogla u procjeni porijekla zagađenja, odnosno razlikovanju humanog fekalnog zagađenja i prirodne prisutnosti bakterija. Primjerice, vrste *E. faecium* i *E. faecalis* znatno češće obitavaju u GI sustavu ljudi nego u okolišu, za razliku od vrsta *E. casseliflavus* i *E. mundtii*, za koje se smatra da obitavaju prvenstveno u okolišu, posebice na biljkama (Byappanahalli i sur., 2012.; Zaheer i sur., 2020.). Unatoč jasnoj ideji i postojanju molekularnih metoda, gotovo je nemoguće definirati vrste ili barem sojeve enterokoka specifične za čovjeka jer se mnogi sojevi, izvorno smatrani humanima, sve češće izdvajaju i iz uzoraka životinjskog porijekla i okoliša, u kojem nema vidljivog fekalnog zagađenja (Boehm i Sassoubre, 2014.).

Zbog važnosti enterokoka kao pokazatelja fekalnog zagađenja te potrebe za brzim i pouzdanim otkrivanjem enterokoka u različitim uzorcima (bazenske i kopnene vode, more, tlo, proizvodi životinjskog porijekla, biljke, feces), razvijene su različite analitičke i mikrobiološke metode prilagođene pojedinom tipu uzorka, ali i prostoru i uvjetima u kojima se provodi kontrola fekalnog zagađenja (Edge i Boehm, 2010.).

2.9. Enterokoki u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji

Enterokoki se već stoljećima koriste u proizvodnji tradicionalnih fermentiranih proizvoda, no izostaje njihova upotreba i u suvremenoj industriji hrane i farmaceutskoj industriji probiotika. Glavni razlog tome je dvojaka uloga enterokoka u biosferi, kao komenzala i uzročnika infekcija. Zbog gena odgovornih za rezistenciju, koje ove bakterije vrlo često nose, uključujući i sojeve vezane isključivo uz prehrambene proizvode, bakterije ovog roda nemaju status GRAS bakterija (GRAS, engl. *Generally recognised as safe*) te je njihova upotreba limitirana i strogo kontrolirana (Ben Braïek i Smaoui, 2019.; Vukušić i Zdolec, 2020.).

Kao predstavnici bakterija mliječne kiseline, enterokoki imaju važnu ulogu u mikrobiologiji hrane. Smatra se da su tome pogodovala njihova tolerancija na širok spektar temperatura, niska toksičnost te sposobnost fermentacije i zakiseljavanja okoliša, kao i činjenica da uobičajeno kontaminiraju sirovo meso i mliječne proizvode (Franz i sur., 2011.). Enterokoki sudjeluju u procesu zrenja i razvoju organoleptičkih svojstava hrane svojim proteolitičkim i esterolitičkim svojstvima, čime doprinose većoj kvaliteti proizvoda (Foulquié Moreno i sur., 2006.; Franz i sur., 2011.; Giraffa, 2002.; Manolopoulou i sur., 2003.). Unatoč pozitivnoj ulozi u dozrijevanju hrane, enterokoke se povezuje i s njezinim kvarenjem. Ipak, zbog sposobnosti stvaranja enterocina, kojima sprečavaju rast mnogih gram-pozitivnih bakterija, i dalje se smatraju važnima u prehrambenoj industriji (Alonso-Calleja i sur., 2004.; Vukušić i Zdolec, 2020.). Enterokoki, najčešće vrste *E. faecium* i *E. faecalis*, koriste se na prostoru Mediterana u proizvodnji tradicionalnih sireva. Osim toga, važni su u proizvodnji fermentiranih suhomesnatih proizvoda, španjolskih maslina te azijskih i afričkih fermentiranih proizvoda biljnog porijekla (Ben Braïek i Smaoui, 2019.; Foulquié Moreno i sur., 2006.; Giraffa, 2002.; De Castro i sur., 2002.).

Zbog dobrih probiotskih svojstava, nekoliko sojeva bakterije *E. faecium* istraživano je kao mogući probiotik. Soj *E. faecium* SF68 najbolje je ispitan te je ponegdje i u primjeni kao probiotik za liječenje dijareje u ljudi (Greuter i sur., 2020.; Holzapfel i sur., 2018.). Usto, istraživana je njegova upotreba u probiotskim prehrambenim proizvodima u svrhu smanjenja kolesterola ili ublažavanja simptoma iritabilnog crijeva. Osim u humanoj medicini, ovaj se soj koristi i u veterinarskoj medicini, kao promotor rasta u uzgoju peradi, imunomodulator kod kućnih ljubimaca i za liječenje dijareje kod svinja, u sinergiji sa sojem *E. faecium* DSM 10633. Osim navedenih sojeva, i soj *E. faecium* EF212 koristi se u veterinarskoj medicini, poglavito u stočarstvu kao preventivna terapija u sprječavanju metaboličke acidoze goveda i kao promotor rasta teladi (Ben Braïek i Smaoui, 2019.; Franz i sur., 2011.; Selleck i sur., 2019.). Usprkos

općenito dobroj učinkovitosti i sigurnosti, upotreba enterokoknih probiotika ograničena je te je odobrena u manjem broju zemalja (Aarestrup i sur., 2002.; Ben Braïek i Smaoui, 2019.; Franz i sur., 2011.; Holzapfel i sur., 2018.).

2.10. Enterokoki u Republici Hrvatskoj

U Hrvatskoj je objavljeno tek nekoliko istraživanja s enterokokima kao uzročnicima infekcija. Sva se odnose na enterokokne infekcije kod ljudi i govore u prilog maloj zastupljenosti vankomicin-rezistentnih izolata enterokoka. Međutim, zabilježena je rezistencija na druge antibiotike, poglavito rezistencija na peniciline i rezistencija visokog stupnja na aminoglikozide, što predstavlja problem u izboru djelotvorne terapije (Bielen i sur., 2018.; Gverić Grginić i sur., 2014.; Jakovac i sur., 2017.; Repac Antić i sur., 2018.).

S obzirom na opasnost od selekcije multirezistentnih izolata i njihova brzog širenja, osobito u bolničkom okruženju, enterokoki su uključeni u godišnje izvještaje o nadzoru rezistencije bakterija u Republici Hrvatskoj (Tambić Andrašević i sur., 2015., 2017., 2018., 2020.; Vodnica-Martucci i Krilanović, 2019.). Iz najnovijeg izvještaja, vidljivo je kako vrsta *E. faecalis* dominira među izoliranim enterokokima, ali i kako je vrsta *E. faecium* u većem postotku rezistentna. Rezistencija na vankomicin još je uvijek rijetka kod vrste *E. faecalis* (< 1 %), dok je kod vrste *E. faecium* u stalnom porastu (1 % u 2012. godini, 5 % u 2013., 7 % u 2014., 15 % u 2015., 17 % u 2016., 16 % u 2017., 18 % u 2018., 33 % u 2019.). Od 2015. godine, osim što je uočen porast rezistencije na vankomicin, vankomicin-rezistentni *E. faecium* izolati se počinju većom učestalošću pojavljivati u raznim regijama Hrvatske, a ne samo u zagrebačkim bolnicama, kao što je to bilo u početku. Također, najnoviji izvještaj potvrđuje velik broj izolata *E. faecium* s rezistencijom visokog stupnja na aminoglikozide i s rezistencijom na fluorokinolone (Tambić Andrašević i sur., 2020.).

U veterinarskoj medicini, istraživanja enterokoka vezana su uz enterokoke kao bakterije mliječne kiseline, odnosno uz njihovu ulogu u očuvanju i kvarenju hrane te utjecaju na organoleptička svojstva hrane (Leboš Pavunc i sur., 2013.; Zdolec i sur., 2022., 2020., 2016.; Vukušić i Zdolec, 2020.). Podataka o enterokokima kao uzročnicima infekcija kod domaćih životinja, njihovoj učestalosti ili rezistenciji ima vrlo malo (Tumpa i sur., 2021a, 2021b), a ciljano praćenje enterokoka i njihove rezistencije u Hrvatskoj ne postoji.

OBRAZLOŽENJE TEME

Bakterije roda *Enterococcus* čine dio crijevne mikrobiote kod većine životinja i ljudi. Iako se smatraju oportunističkim bakterijama slabe virulentnosti, posljednjih desetljeća bilježi se porast broja infekcija uzrokovanih enterokokima i to kao primarnim uzročnicima. Dvije najčešće vrste koje se povezuju s kliničkim simptomima kod životinja i ljudi su *E. faecium* i *E. faecalis*. Kod životinja najčešće uzrokuju infekcije mokraćnog sustava i rana, dok kod ljudi, uz navedeno, uzrokuju još i izrazito ozbiljne endokarditise i meningitise te su jedni od najčešćih uzročnika teških bolničkih infekcija.

Enterokoki su urođeno rezistentni na brojne skupine antimikrobnih lijekova koji se uobičajeno koriste u humanoj i veterinarskoj medicini te je liječenje enterokoknih infekcija otežano i dugotrajno. Uz urođenu rezistenciju, brzo i lako stječu nove oblike rezistencije pa je velik broj sojeva enterokoka istovremeno rezistentan na više skupina lijekova. Nadalje, neki sojevi enterokoka stvaraju biofilm i time dodatno umanjuju djelotvornost lijekova.

Prije terapije nužno je provesti ispitivanje osjetljivosti izolata na antimikrobne lijekove kako bi liječenje bilo uspješno i kako bi se spriječio nastanak i prijenos rezistencije. S obzirom na to da je dokazan prijenos enterokoka sa životinja na čovjeka, pojava rezistentnih sojeva enterokoka kod životinja predstavlja rastući problem za javno zdravlje.

U ovom istraživanju odredit će se učestalost klinički značajnih vrsta *E. faecium* i *E. faecalis* među izolatima enterokoka izdvojenih iz uzoraka životinjskog porijekla. Disk-difuzijskim postupkom istražit će se osjetljivost izolata navedenih vrsta na pojedine antimikrobne lijekove iz različitih skupina. Izolatima rezistentnima na vankomicin i tetraciklin rezistencija će se potvrditi molekularnim metodama. Uz to, istražit će se i rezistencija visokog stupnja na aminoglikozide. Kod izolata koji će fenotipski odgovarati navedenoj rezistenciji, ona će se potvrditi dokazivanjem stečenih gena koji kodiraju za aminoglikozid-modificirajuće enzime.

Pregledom dobivenih podataka o rezistenciji izolata *E. faecium* i *E. faecalis* dobit će se uvid u proširenost stečene rezistencije klinički najvažnijih enterokoka među životinjama na području Republike Hrvatske. Osim toga, podaci o rezistenciji će, zajedno s podacima o pojavnosti vrsta, dati bolji uvid u stvarni rizik za javno zdravlje zbog mogućeg prijenosa rezistentnih bakterija sa životinje na čovjeka.

Iz svega navedenoga slijedi hipoteza ovog znanstvenog rada:

Izolati enterokoka izdvojeni iz uzoraka životinjskog porijekla u Republici Hrvatskoj većinom pripadaju vrsti *Enterococcus faecalis* i posjeduju stečene mehanizme rezistencije.

Ciljevi rada su:

1. ustanoviti učestalost klinički važnih vrsta *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis* u uzorcima životinjskog porijekla
2. istražiti osjetljivost izolata *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis* na pojedine antimikrobne lijekove iz različitih skupina
3. dokazati stečene mehanizme rezistencije kod sojeva fenotipski rezistentnih na vankomicin i tetraciklin koristeći molekularne metode
4. dokazati stečene mehanizme rezistencije kod sojeva koji fenotipski pokazuju visok stupanj rezistencije na aminoglikozide koristeći molekularne metode.

MATERIJAL I METODE

4.1. Uzorci i kriteriji za odabir izolata za istraživanje

Iz uzoraka dostavljenih u bakteriološki laboratorij Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta izdvojeni su izolati bakterija roda *Enterococcus*. Uzorci su prikupljeni u Klinikama Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te veterinarskim stanicama i ambulantomama s područja Republike Hrvatske, a uzeti su prilikom kliničkog pregleda životinja te poslani u laboratorij na bakteriološku pretragu.

Uzorci su prikupljeni u razdoblju od početka siječnja 2016. do kraja rujna 2021. godine, a sačinjavali su ih uzorci urina i obrisci zvukovoda te obrisci kože, sluznica (konjunktive, nosnice, ždrijelo, vagina), rana, punktati abdomena.

Za istraživanje su odabrani izolati bakterija roda *Enterococcus* izdvojeni iz uzoraka porijeklom iz domaćih životinja (pas, mačka, kunić, glodavac, konj, koza, ovca, govedo). Istraživanje će se usmjeriti na klinički najznačajnije vrste enterokoka, *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis*, te će svi izdvojeni enterokoki navedenih domaćih životinja proći kroz postupak identifikacije do vrste, a samo oni koji će pripadati ciljnim vrstama koristit će se u daljnjem istraživanju.

4.2. Identifikacija izolata do razine roda

Zaprimljeni uzorci su tijekom rutinske bakteriološke pretrage naciepljeni na krvni agar (Bio-Rad, Francuska) i inkubirani pri 37 °C tijekom 24 sata. Nakon morfološkog pregleda poraslih kolonija, one koje su odgovarale osnovnim karakteristikama enterokoka uzete su u daljnju obradu i postupak identifikacije. Rod *Enterococcus* potvrđen je temeljem morfoloških, uzgojnih i fizioloških osobina – bojenjem po Gramu, reakcijom katalaze i rastom na kanamicin-eskulin agaru (Markey i sur., 2013.).

4.2.1. Bojenje po Gramu

Bojenje po Gramu odrađeno je prema uputama Markey i sur. (2013). Iz kolonije je vrhom sterilne eze uzet mali volumen kolonije, razmučen je u kapi fiziološke otopine na predmetnici i tako pripremljena suspenzija razvučena je u tankom sloju. Pripremljeni mokri

preparati osušeni su na sobnoj temperaturi i fiksirani provlačenjem kroz plamen Bunsenova plamenika. Za bojenje po Gramu korištene su dvije boje, kristalviolet i safranin. Najprije je preko cijelog preparata nanescna boja kristalviolet i ostavljena da djeluje tri minute. Boja je zatim fiksirana Lugolovom otopinom jednu minutu. Preparat je temeljito ispran 96 %-tnim etalomom čime je izvršeno odbojavanje bakterijskih stanica te je zatim ispran destiliranom vodom. Slijedilo je bojenje safraninom, jednu minutu, nakon čega je preparat ispran vodom. Gledano pod mikroskopom, gram-pozitivne bakterije bit će obojene plavo-ljubičasto, a gram-negativne bakterije crveno.

Bakterije roda *Enterococcus* pripadaju gram-pozitivnim bakterijama.

4.2.2. Reakcija katalaze

Izolati kod kojih je bojenjem po Gramu utvrđeno da su gram-pozitivni koki, ispitani su u reakciji s 2 %-tnim vodikovim peroksidom kako bi se provjerila njihova katalitička sposobnost. Mali uzorak ispitivane kolonije resuspendiran je u kapljici vodikova peroksida. Pojava pjene i mjehurića zraka smatra se pozitivnom reakcijom; ako ne dolazi do promjena, reakcija je negativna.

Bakterije roda *Enterococcus* ne posjeduju enzim katalazu te daju negativnu reakciju s vodikovim peroksidom.

4.2.3. Rast na kanamicin-eskulin agaru

Svi izolati za koje je dokazano da ne tvore enzim katalazu naci jepljeni su na kanamicin-eskulin (KE) agar. Kanamicin-eskulin agar (Merck, Njemačka) selektivna je podloga za izdvajanje enterokoka. Ispitivani izolati naci jepljeni su sterilnom ezom na KE agar i inkubirani 24 sata na 37 °C. Enterokoki na ovoj podlozi rastu kao tamnosive kolonije, a sam agar boji se u crno zbog svojstva enterokoka da pregrade eskulin koji zatim s ionima željeza stvara crne komplekse.

Izolati koji su zadovoljili sva tri kriterija identifikacije roda pohranjeni su u brain-heart (BH) bujon s dodatkom 30 % glicerola na temperaturu od -80 °C.

4.3. Identifikacija izolata do razine vrste

Identifikacija vrsta *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis* provedena je molekularnom metodom lančane reakcije polimerazom (PCR, engl. Polymerase Chain Reaction) i to multipleks PCR tehnikom, odnosno u istoj PCR reakciji ispitana je pripadnost navedenim vrstama.

4.3.1. Izdvajanje bakterijske DNA

Iz svih izolata uključenih u istraživanje izdvojena je DNA pomoću pripravka Chelex-100 (Bio-Rad, SAD). Za izolaciju DNA korištene su svježe bakterijske kulture uzgojene na Columbia agaru (Mast Diagnostics, Njemačka) pri temperaturi od 37 °C. Chelex-100 pripravak je u obliku praha koji je potrebno resuspendirati u sterilnoj redestiliranoj vodi kako bi se dobila 2 %-tna otopina. Postupak pripreme otopine je sljedeći:

1. odvagati 0,1 g pripravka Chelex-100 u sterilnu staklenu čašicu
2. dodati 5 mL sterilne redestilirane vode i sterilan magnet
3. miješati sadržaj na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi.

Suspenzija Chelex-100 vrlo se brzo taloži te je važno miješanjem održavati suspenziju homogenom i koristiti ju odmah nakon pripreme.

Postupak izdvajanja DNA:

1. U Eppendorf epruvete volumena 2 mL uliveno je 300 µL pripremljene 2 %-tne suspenzije Chelex-100 izravno iz čašice tijekom miješanja.
2. Bakteriološkom ušicom uzete su svježe uzgojene kolonije s polovice podloge te su resuspendirane u suspenziji Chelex-100.
3. Suspenzija je kuhana 10 minuta pri 100 °C u termobloku TS-100 Thermo Shaker (Bio-San, Latvija).
4. Suspenzija je centrifugirana na 13 000 okretaja u minuti tijekom 15 minuta.
5. Supernatant, u kojem se nalazila izdvojena DNA, prenesen je u nove sterilne Eppendorf epruvete označene odgovarajućim brojevima.
6. Izdvojena DNA pohranjena je na -20 °C do daljnje upotrebe.

4.3.2. Multipleks lančana reakcija polimerazom za identifikaciju vrsta

Lančanom reakcijom polimerazom ispitivana je prisutnost dva *ddl* gena (D-alanin-D-alanin ligaza) od kojih je svaki specifičan za jednu od istraživanih vrsta, *E. faecium* ili *E. faecalis*. Početnice za oba gena izrađene su prema radu Kariyama i sur. (2000.).

ddl gen vrste *E. faecium*

5' TTGAGGCAGACCAGATTGACG 3'

5' TATGACAGCGACTCCGATTCC 3'

ddl gen vrste *E. faecalis*

5' ATCAAGTACAGTTAGTCTTTATTAG 3'

5' ACGATTCAAAGCTAACTGAATCAGT 3'

Kao pozitivna kontrola korištena je DNA izolata prethodno identificiranih kao *E. faecium* i *E. faecalis* ustupljenih ljubaznošću dr. sc. Gordana Kompesa. Kao negativna kontrola korištena je reakcijska otopina bez DNA.

U svakoj multipleks PCR reakciji, ukupnog volumena 20 μ L, korištene su:

1. početnice za oba ispitivana *ddl* gena ($V = 0,5 \mu$ L)
2. komercijalna mješavina oligonukleotida (dNTP), magnezijeva klorida (MgCl), Taq polimeraze i pufera (Syber Green PCR Master Mix, TaKaRa Bio Inc., Japan) ($V = 10 \mu$ L)
3. sterilna destilirana voda (ultraPURE Distilled Water, DNase, RNase-free, Invitrogen, SAD) ($V = 7 \mu$ L)
4. bakterijska DNA ($V = 1 \mu$ L).

Za izvođenje lančane reakcije polimerazom korišten je uređaj Mastercycler nexus GSX1 (Eppendorf, Njemačka), a reakcija je obavljena prema sljedećem programu:

▪ početna denaturacija	94 °C, 10 min	} 30 ciklusa
▪ denaturacija	94 °C, 30 s	
▪ vezanje početnica	58 °C, 90 s	
▪ produljivanje lanaca	72 °C, 60 s	
▪ završno produljivanje lanaca	72 °C, 10 min	

4.3.3. Identifikacija produkata dobivenih lančanom reakcijom polimerazom

Proizvodi lančane reakcije polimerazom analizirani su elektroforezom u 1 %-tnom agaroznom gelu. Postupak pripreme gela bio je sljedeći:

1. Odvagano je 0,75 g agaroze (Sigma Aldrich, SAD) u tikvicu.
2. Dodano je 75 mL 1 %-tnog tris-acetat-EDTA pufera.
3. Agaroz se otopila zagrijavanjem na 100 °C, a potom ohladila na 50 °C.
4. U ohlađenu agaroznu otopinu dodano je 0,5 µL boje za DNA (Diamond™ Nucleic Acid Dye, Promega, USA).
5. Otopina je izlivena u kalup s češljicom za jažice te je kalup ostavljen na sobnoj temperaturi kako bi gel polimerizirao.
6. Polimerizirani gel odmah je upotrijebljen za elektroforezu.

Za izvođenje elektroforeze u gelu upotrijebljen je uređaj za elektroforezu (Clever Scientific Ltd, UK). Kadica uređaja bila je ispunjena 1 %-tnim tris-acetat-EDTA puferom, a kalup s gelom uronjen tako da je dio gela s jažicama bio okrenut prema katodi. Prije nanošenja, svi uzorci (PCR produkti) razrijeđeni su destiliranom vodom u omjeru 1 : 10. Zatim su na parafilmu pripremljeni za nanošenje na gel, 4 µL razrijeđenog PCR produkta pomiješano je s 1 µL pufera za nanošenje uzoraka (10X Blue Juice, Gel Loading Buffer, Invitrogen, SAD). Za određivanje veličine PCR produkata korišten je standardizirani biljeg (100 pb PCR Molecular Ruler, Bio-Rad, Francuska).

Elektroforeza je trajala 60 minuta uz upotrebu istosmjerne struje napona 100V. Nakon završetka elektroforezerezultati su analizirani i snimljeni pomoću uređaja Gel Doc 200 (Bio-Rad, SAD) koji se sastoji od ultraljubičastog prosvjetlivača, kamere za snimanje gelova i kompjutorskog programa za obradu fotografije gela (Quantity One Basic analysis software). Veličina umnoženog PCR produkta određena je usporedbom dobivenog produkta sa standardiziranim biljegom.

Izolati kojima je bio dokazan jedan od dva ispitivana gena bili su uključeni u daljnje istraživanje.

4.4. Određivanje osjetljivosti izolata *E. faecium* i *E. faecalis* na antimikrobne lijekove disk-difuzijskim postupkom

Disk-difuzijski postupak za određivanje osjetljivosti izolata na antimikrobne lijekove proveden je prema preporukama Clinical and Laboratory Standards Institute-a (CLSI) (CLSI, 2018.). Korištene su 24-satne bakterijske kulture uzgojene na krvnom agaru. Bakterijska suspenzija napravljena je od nekoliko kolonija u sterilnoj fiziološkoj otopini natrijeva klorida optičke gustoće 0,5 po McFarlandu ($1-2 \times 10^8$ CFU/mL) određene denzitometrom (Densimat, bioMerieux, Francuska). Suspenzija je nanescna na površinu Mueller-Hintonovog agara (Biolife, Italija) sterilnim vatiranim štapićem u tri smjera, rotirajući Petrijevu zdjelicu za 60 stupnjeva. Petrijeve zdjelice s podlogom bile su promjera 90 mm, a podloga debljine 4 mm. Nakon sušenja podloge tijekom pet minuta, sterilnom pincetom na površinu agara postavljeni su dijagnostički diskovi s antimikrobnim lijekovima te su Petrijeve zdjelice inkubirane 24 sata pri temperaturi od 37 °C.

Mjerenjem zone inhibicije rasta bakterijske kulture određena je osjetljivost izolata na sljedeće antimikrobne lijekove: penicilin, ampicilin, vankomicin, enrofloksacin, ciprofloksacin, nitrofurantoin, rifampicin, tetraciklin, kloramfenikol, streptomycin i gentamicin. Prema CLSI kriterijima, izolati su podijeljeni u skupine osjetljiv (S), umjereno osjetljiv (I) i rezistentan (R) (CLSI, 2015, 2018). Popis antimikrobnih lijekova, nazivi i količine aktivnih tvari koje sadrže, naziv proizvođača te kriteriji za procjenu rezultata navedeni su u tablici 1. Za kontrolu provođenja disk-difuzijskog postupka korišteni su referentni sojevi bakterija *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 i *E. faecalis* ATCC® 29212.

Tablica 1. Antimikrobni lijekovi korišteni u disk-difuzijskom postupku i kriteriji za procjenu rezultata

Antimikrobni lijek	Koncentracija	Kriteriji za procjenu osjetljivosti (promjer zona inhibicije u mm)			Proizvođač
		S	I	R	
Penicilin	10 U	≥ 15	-	≤ 14	
Ampicilin	10 µg	≥ 17	-	≤ 16	
Vankomicin	30 µg	≥ 17	15 – 16	≤ 14	
Enrofloksacin	5 µg	≥ 23	17 – 22	≤ 16	
Ciprofloksacin	5 µg	≥ 21	16 – 20	≤ 15	
Nitrofurantoin	300 µg	≥ 17	15 – 16	≤ 14	Mast Diagnostics, Njemačka
Rifampicin	5 µg	≥ 20	17 – 19	≤ 16	
Tetraciklin	30 µg	≥ 19	15 – 18	≤ 14	
Kloramfenikol	30 µg	≥ 18	13 – 17	≤ 12	
Gentamicin	120 µg	≥ 10	7 – 9 ^{Ic}	6	
Streptomycin	300 µg	≥ 10	7 – 9 ^{Ic}	6	

S – osjetljiv; I – umjereno osjetljiv; R – rezistentan; Ic – (*engl. Inconclusive*) nejasan rezultat, potrebno ga je provjeriti mikrodilucijskom metodom

4.5. Dokazivanje gena za rezistenciju na vankomicin, tetracikline i aminoglikozide

U izolata kod kojih je disk-difuzijskim postupkom za određivanje osjetljivosti na antimikrobne lijekove fenotipski uočena rezistencija na vankomicin, tetraciklin i aminoglikozide, molekularnom metodom PCR dokazivani su oni geni koji se najčešće povezuju s navedenim rezistencijama.

4.5.1. Dokazivanje gena za rezistenciju na vankomicin lančanom reakcijom polimerazom

U sojeva fenotipski rezistentnih na vankomicin, multipleks PCR-om istražena je prisutnost gena za rezistenciju *vanA* i *vanB*. Pri tome su korištene početnice koje umnažaju odsječak gena *vanA* veličine 732 parova baza (pb) i odsječak gena *vanB* veličine 650 pb, izrađene prema radu Kariyama i sur. (2000.).

vanA gen

5' CATGAATAGAATAAAAAGTTGCAATA 3'

5' CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA 3'

vanB gen

5' GTGACAAACCGGAGGCGAGGA 3'

5' CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA 3'

Kao pozitivne kontrole korištene su DNA prethodno potvrđenih vankomicin-rezistentnih izolata *E. faecium* i *E. faecalis*, ustupljenih ljubaznošću dr. sc. Gordana Kompesa. Kao negativna kontrola korištena je reakcijska otopina bez DNA.

U svakoj multipleks PCR reakciji, ukupnog volumena 20 μ L, korištene su:

1. početnice za *vanA* gen ($V = 0,5 \mu\text{L}$)
2. početnice za *vanB* gen ($V = 0,25 \mu\text{L}$)
3. komercijalna mješavina oligonukleotida (dNTP), magnezijeva klorida (MgCl), Taq polimeraze i pufera (Syber Green PCR Master Mix, TaKaRa Bio Inc., Japan) ($V = 10 \mu\text{L}$)
4. sterilna destilirana voda (ultraPURE Distilled Water, DNase, RNase-free, Invitrogen, SAD) ($V = 7,5 \mu\text{L}$)
5. bakterijska DNA ($V = 1 \mu\text{L}$).

Za izvođenje lančane reakcije polimerazom korišten je uređaj Mastercycler nexus GSX1 (Eppendorf, Njemačka), a reakcija je obavljena prema sljedećem programu:

- | | | |
|--------------------------------|---------------|--------------|
| ▪ početna denaturacija | 95 °C, 10 min | } 30 ciklusa |
| ▪ denaturacija | 94 °C, 30 s | |
| ▪ vezanje početnica | 58 °C, 30 s | |
| ▪ produljivanje lanaca | 72 °C, 30 s | |
| ▪ završno produljivanje lanaca | 72 °C, 10 min | |

Proizvodi lančane reakcije polimerazom analizirani su elektroforezom u 1 %-tnom agaroznom gelu prema postupku opisanom kod dokazivanja *ddl* gena u potpoglavlju 4.3.3.

4.5.2. Dokazivanje gena za rezistenciju na tetracikline lančanom reakcijom polimerazom

U sojeva fenotipski rezistentnih na tetraciklin, multipleks PCR-om istražena je prisutnost gena za rezistenciju *tetM* i *tetL*. Korištene su početnice koje umnažaju odsječak gena *tetM* veličine 576 pb te odsječak gena *tetL* veličine 456 pb. Početnice za navedene gene izrađene su prema radu Aarestrup i sur. (2000.).

tetM gen

5' GTTAAATAGTGTTCTTGGAG 3'

5' CTAAGATATGGCTCTAACAA 3'

tetL gen

5' CATTTGGTCTTATTGGATCG 3'

5'ATTACACTTCCGATTTCGG 3'

Kao pozitivna kontrola korištena je DNA prethodno potvrđenih tetraciklin-rezistentnih izolata *E. faecium* i *E. faecalis*, ustupljenih ljubaznošću dr. sc. Gordana Kompesa. Kao negativna kontrola korištena je reakcijska otopina bez DNA.

U svakoj multipleks PCR reakciji, ukupnog volumena 20 μ L, korištene su:

1. početnice za *tetM* i *tetL* gene (V = 0,5 μ L)
2. komercijalna mješavina oligonukleotida (dNTP), magnezijeva klorida (MgCl), Taq polimeraze i pufera (Syber Green PCR Master Mix, TaKaRa Bio Inc., Japan) (V = 10 μ L)
3. sterilna destilirana voda (ultraPURE Distilled Water, DNase, RNase-free, Invitrogen, SAD) (V = 7 μ L)
4. bakterijska DNA (V = 1 μ L).

Za izvođenje lančane reakcije polimerazom korišten je uređaj Mastercycler nexus GSX1 (Eppendorf, Njemačka), a reakcija je obavljena prema sljedećem programu:

▪ početna denaturacija	95 °C, 10 min	} 30 ciklusa
▪ denaturacija	94 °C, 30 s	
▪ vezanje početnica	58 °C, 30 s	
▪ produljivanje lanaca	72 °C, 30 s	
▪ završno produljivanje lanaca	72 °C, 10 min	

Proizvodi lančane reakcije polimerazom analizirani su elektroforezom u 1 %-tnom agaroznom gelu prema postupku opisanom kod dokazivanja *ddl* gena u potpoglavlju 4.3.3.

4.5.3. Dokazivanje gena za rezistenciju na aminoglikozide lančanom reakcijom polimerazom

U svih izolata kod kojih je postupkom disk-difuzije ustanovljena rezistencija visokog stupnja na jedan ili oba antibiotika iz skupine aminoglikozida (gentamicin i streptomycin), lančanom reakcijom polimerazom istražena je prisutnost sljedećih triju gena za rezistenciju: *aph(3')-IIIa*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* i *ant(6)-Ia*.

4.5.3.1. Dokazivanje gena *aph(3')-IIIa* i *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* lančanom reakcijom polimerazom

U izolata s ustanovljenom rezistencijom visokog stupnja na aminoglikozide, multipleks PCR-om istražena je prisutnost gena za rezistenciju *aph(3')-IIIa* i *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*. Pri tome su korištene početnice koje umnažaju odsječke gena veličine 523 pb i 348 pb. Početnice za navedene gene izrađene su prema radu El Mahdy i sur. (2018.).

aph(3')-IIIa gen

5' GGCTAAAATGAGAATATCACCGG 3'

5' CTTTAAAAAATCATAACAGCTCGCG 3'

aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia gen

5' CAGAGCCTTGGGAAGATGAAG 3'

5' CCTCGTGTAATTCATGTTCTGGC 3'

Kao pozitivna kontrola korištena je DNA rezistentnih izolata *E. faecium* i *E. faecalis* (kod kojih su prethodno dokazani geni *aph(3')-IIIa* i *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*), ustupljeni ljubaznošću dr. sc. Gordana Kompesa. Kao negativna kontrola korištena je reakcijska otopina bez DNA.

U svakoj multipleks PCR reakciji, ukupnog volumena 20 µL, korištene su:

1. početnice za *aph(3')-IIIa* i *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* gene (V = 0,5 µL)
2. komercijalna mješavina oligonukleotida (dNTP), magnezijeva klorida (MgCl), Taq polimeraze i pufera (Syber Green PCR Master Mix, TaKaRa Bio Inc., Japan) (V = 10 µL)
3. sterilna destilirana voda (ultraPURE Distilled Water, DNase, RNase-free, Invitrogen, SAD) (V = 7 µL)
4. bakterijska DNA (V = 1 µL).

Za izvođenje lančane reakcije polimerazom korišten je uređaj Mastercycler nexus GSX1 (Eppendorf, Njemačka), a reakcija je obavljena prema sljedećem programu:

▪ početna denaturacija	95 °C, 10 min	} 30 ciklusa
▪ denaturacija	94 °C, 30 s	
▪ vezanje početnica	58 °C, 30 s	
▪ produljivanje lanaca	72 °C, 30 s	
▪ završno produljivanje lanaca	72 °C, 10 min	

Proizvodi lančane reakcije polimerazom analizirani su elektroforezom u 1 %-tnom agaroznom gelu prema postupku opisanom kod dokazivanja *ddl* gena u potpoglavlju 4.3.3.

4.5.3.2. Dokazivanje gena *ant(6)-Ia* lančanom reakcijom polimerazom

U izolata s utvrđenom rezistencijom visokog stupnja na aminoglikozide, PCR-om je istražena prisutnost gena za rezistenciju *ant(6)-Ia*. Korištene početnice umnažaju odsječak gena veličine 563 pb. Početnice za navedeni gen izrađene su prema radu El Mahdy i sur. (2018.).

ant(6)-Ia gen

5' CGGGAGAATGGGAGACTTTG 3'

5' CTGTGGCTCCACAATCTGAT 3'

Kao pozitivna kontrola korištena je DNA rezistentnih izolata *E. faecium* i *E. faecalis* kod kojih je prethodno dokazan gen *ant(6)-Ia*, ustupljenih ljubaznošću dr. sc. Gordana Kompeša. Kao negativna kontrola korištena je reakcijska otopina bez DNA.

U svakoj multipleks PCR reakciji, ukupnog volumena 20 μ L, korištene su:

1. početnice za *ant(6)-Ia* gen (V = 0,5 μ L)
2. komercijalna mješavina oligonukleotida (dNTP), magnezijeva klorida (MgCl), Taq polimeraze i pufera (Syber Green PCR Master Mix, TaKaRa Bio Inc., Japan) (V = 10 μ L)
3. sterilna destilirana voda (ultraPURE Distilled Water, DNase, RNase-free, Invitrogen, SAD) (V = 8 μ L)
4. bakterijska DNA (V = 1 μ L).

Za izvođenje lančane reakcije polimerazom korišten je uređaj Mastercycler nexus GSX1 (Eppendorf, Njemačka), a reakcija je obavljena prema sljedećem programu:

▪ početna denaturacija	95 °C, 10 min	} 30 ciklusa
▪ denaturacija	94 °C, 30 s	
▪ vezanje početnica	58 °C, 30 s	
▪ produljivanje lanaca	72 °C, 30 s	
▪ završno produljivanje lanaca	72 °C, 10 min	

Proizvodi lančane reakcije polimerazom analizirani su elektroforezom u 1 %-tnom agaroznom gelu prema postupku opisanom kod dokazivanja *ddl* gena u potpoglavlju 4.3.3.

4.6. Statistička obrada podataka

Varijable dobivene ovim istraživanjem kvalitativne (kategoričke) su. Za usporedbu varijabli korišten je Fisherov egzaktni test.

Izračunata je učestalost i apsolutni udio (%) pojedinih vrsta uzoraka iz kojih su izdvojeni izolati. Fisherovim egzaktnim testom provjereno je postojanje statistički značajnih razlika u pojavnosti vrsta *E. faecium* i *E. faecalis* u ukupnom broju izolata enterokoka.

Prema rezultatima dobivenima disk-difuzijskom metodom, izolati su podijeljeni u skupine: osjetljiv (S), umjereno osjetljiv (I) i rezistentan (R). Uspoređivano je postoje li statistički značajne razlike između ove dvije vrste enterokoka u osjetljivosti na pojedine antimikrobne tvari te u pojavi multirezistentnih sojeva i sojeva s rezistencijom visokog stupnja na aminoglikozide.

Za potrebe prikaza i analizu podataka korišten je statistički program STATISTICA v.13.5 (Statistica, Inc., 2020). Rezultati statističke analize smatrani su statistički značajnima ako je dobivena p vrijednost iznosila $p < 0,05$.

REZULTATI

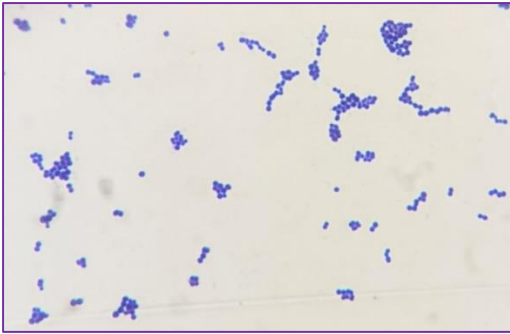
5.1. Porijeklo uzoraka

U razdoblju od početka siječnja 2016. do kraja rujna 2021. godine izdvojeno je 100 izolata bakterija roda *Enterococcus*. Izolati su izdvojeni iz različitih uzoraka domaćih životinja dostavljenih u bakteriološki laboratorij Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Najviše izolata enterokoka izdvojeno je iz pasa (66 %) i mačaka (22 %), tri izolata izdvojena su iz uzoraka kunića, po dva iz uzoraka štakora, konja i goveda te po jedan izolat iz uzoraka zamorčića, koze i ovce.

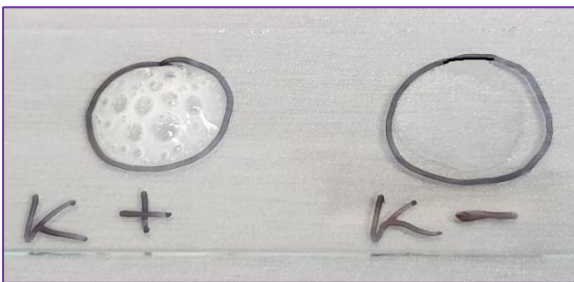
Najveći broj izolata roda *Enterococcus* izdvojen je iz uzoraka urina (34 %) i obrisaka zvukovoda (16 %). Iz uzoraka obrisaka vagina izdvojeno je devet, iz obrisaka rana osam, nosnica šest, a kože četiri izolata (9 %, 8 %, 6 % i 4 %). Iz uzoraka obrisaka ždrijela izdvojena su tri izolata (3 %) te su po dva izolata enterokoka (2 %) izdvojena iz uzoraka obrisaka stidnice i konjunktiva te punktata abdomena i tkiva jetre. Osim navedenih uzoraka, po jedan izolat (1 %) izdvojen je iz uzoraka organa (pluća, maternica, žučni mjehur), mlijeka, apscesa, fistule, trahealnog ispirka te obrisaka endometrija, peritoneuma, rascjepa nepca, vimena i ortopedskog vijka.

5.2. Identifikacija roda *Enterococcus*

Izolati koji su bojenjem po Gramu odgovarali gram-pozitivnim kokima (slika 1.), imali negativnu reakciju katalaze (slika 2.) i koji su rasli kao tamnosive kolonije na kanamicin-eskulin agaru (slika 3.) smatrani su bakterijama roda *Enterococcus*. Ukupno je identificirano 100 izolata roda *Enterococcus* koji su podvrgnuti identifikaciji do vrste.



Slika 2. Gram-pozitivni koki



Slika 3. Pozitivna i negativna reakcija katalaze

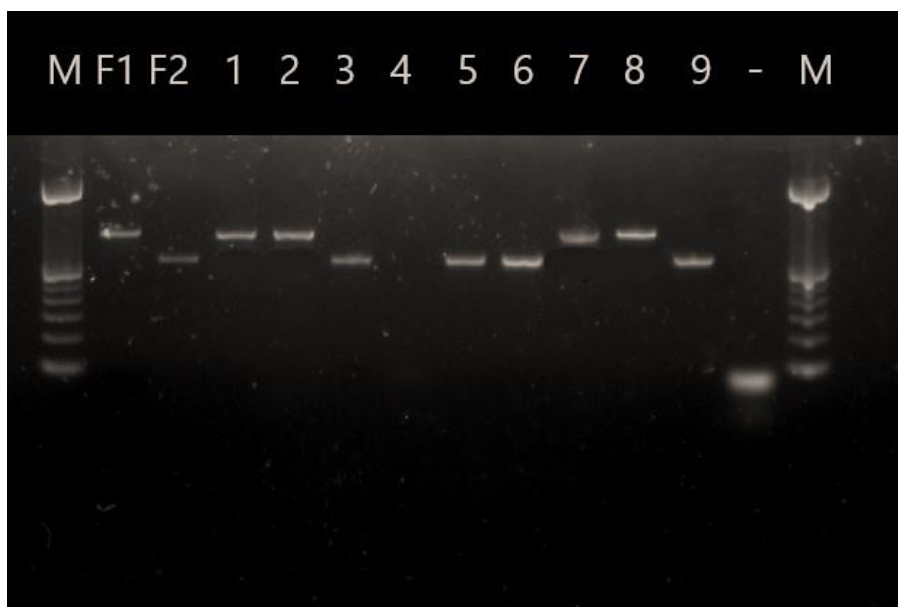


Slika 4. Pozitivan rast enterokoka na kanamicin-eskulin agaru

5.3. Identifikacija vrsta *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis*

Identifikacija vrsta *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis* provedena je molekularnom metodom multipleks PCR, a ispitivana je prisutnost *ddl* gena specifičnih za istraživane vrste. Od ukupno 100 izolata enterokoka, 83 izolata pripadala su istraživanim vrstama, 62 izolata identificirana su kao vrsta *E. faecalis*, a 21 kao vrsta *E. faecium*. Tih 83 izolata uključeno je u daljnje istraživanje.

Primjer agaroznog gela nakon provedenog PCR-a i elektroforeze u svrhu identifikacije vrsta prikazan je na slici 5. Ukupni rezultati identifikacije vrsta i udio pojedinih vrsta enterokoka među izolatima iz različitih životinja prikazani su u tablici 2.



Slika 5. Agarozni gel nakon provedene elektroforeze PCR produkata dobivenih u ispitivanju prisutnosti *ddl* gena specifičnih za vrste *E. faecium* i *E. faecalis*

M: 100 pb DNA biljeg; F1: pozitivna kontrola za *ddl* gen vrste *E. faecalis*; F2: pozitivna kontrola za *ddl* gen vrste *E. faecium*; 1, 2, 7, 8: izolati vrste *E. faecalis*; 3, 5, 6, 9: izolati vrste *E. faecium*; 4: izolat negativan na ispitivane gene; -: negativna kontrola

Tablica 2. Razdioba izolata prema vrstama životinja i vrsti enterokoka

Životinjska vrsta	Svi izolati <i>Enterococcus</i> spp.	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	Preostale <i>Enterococcus</i> vrste
Sve životinjske vrste	100	21	62*	17
Pas	66	12	46*	8
Mačka	22	7	11	4
Kunić	3	-	2	1
Glodavci (zamorčić, štakor)	3	-	3	-
Konj	2	1	-	1
Preživači (govedo, ovca, koza)	4	1	-	3

* označava statistički značajnu razliku u broju izolata pojedine vrste, Fisherov egzaktni test, $p < 0,05$

Među istraživanim izolatima enterokoka statistički značajno više izolata pripada vrsti *E. faecalis* no ijednoj drugoj vrsti.

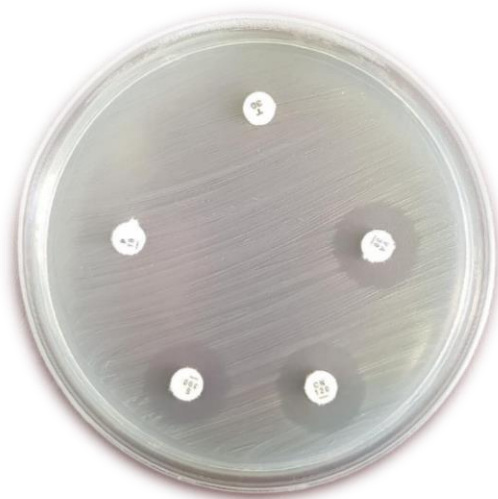
Gledano prema pojedinim životinjskim vrstama, *E. faecalis* bila je najčešća vrsta izdvojena iz uzoraka malih životinja (pas, mačka, kunić i glodavci), a nije bila zastupljena u uzorcima izdvojenima iz konja i preživača. Statistički značajna razlika u korist *E. faecalis* potvrđena je jedino kod izolata izdvojenih iz uzoraka pasa.

5.4. Rezultati određivanja osjetljivosti na antimikrobne lijekove disk-difuzijskim postupkom

Disk-difuzijskim postupkom ispitana je osjetljivost enterokoka na 11 antimikrobnih lijekova. Devet lijekova (penicilin, ampicilin, vankomicin, enrofloksacin, ciprofloksacin, nitrofurantoin, rifampicin, tetraciklin i kloramfenikol) upotrijebljeno je za detekciju rezistencije, dok su dva (streptomycin i gentamicin) korištena za detekciju izolata s rezistencijom visokog stupnja na aminoglikozide.

Multirezistentnim izolatima smatrani su oni izolati koji su bili rezistentni na najmanje tri antimikrobna lijeka iz različitih skupina, ne uključujući rezistenciju visokog stupnja na aminoglikozide.

U tablici 3. prikazani su ukupni rezultati osjetljivosti obje vrste enterokoka, a u tablici 4. pojedinačni rezultati ciljnih vrsta. Statistički su uspoređene razlike u osjetljivosti dviju vrsta. S obzirom na veći broj izolata iz uzoraka urina, u tablicama 5. i 6. prikazani su njihovi rezultati osjetljivosti.



Slika 6. Petrijeva zdjelica s disk-difuzijskim postupkom određivanja osjetljivosti na antimikrobne lijekove

Tablica 3. Zbirni rezultati osjetljivosti na antimikrobne lijekove ciljnih izolata bakterija *E. faecium* i *E. faecalis*

Antimikrobni lijek	<i>E. faecium</i> i <i>E. faecalis</i>		
	N = 83 (%)		
	S	I	R
Penicilin	66 (80)	-	17 (20)
Ampicilin	66 (80)	-	17 (20)
Vankomicin	30 (36)	34 (41)	19 (23)
Enrofloksacin	1 (1)	13 (16)	69 (83)
Ciprofloksacin	2 (3)	31 (37)	50 (60)
Nitrofurantoin	63 (76)	4 (5)	16 (19)
Rifampicin	5 (6)	9 (11)	69 (83)
Tetraciklin	25 (30)	8 (10)	50 (60)
Kloramfenikol	53 (64)	20 (24)	10 (12)
Streptomicin	69 (83)	-	14 (17)
Gentamicin	76 (92)	-	7 (8)

S – osjetljiv; I – umjereno osjetljiv; R – rezistentan

Od ukupnog broja ciljnih izolata, najviše je bilo rezistentnih na enrofloksacin i rifampicin (83 %). Više od polovice izolata (60 %) bilo je rezistentno na ciprofloksacin i tetraciklin, dok ih je 23 % bilo rezistentno na vankomicin. Najmanje je bilo izolata rezistentnih na kloramfenikol (12 %).

Pedeset izolata (60 %) bilo je multirezistentno (MDR), odnosno rezistentno na tri ili više antimikrobnih lijekova iz različitih skupina.

Kod 17 % izolata uočena je rezistencija visokog stupnja na streptomicin, a kod 8 % na gentamicin. Od toga su četiri izolata (5 %) bila rezistentna na oba ispitivana aminoglikozida.

Tablica 4. Pojedinačno prikazani rezultati osjetljivosti na antimikrobne lijekove vrsta *E. faecium* i *E. faecalis*

Antimikrobni lijek	<i>E. faecium</i> N = 21 (%)			<i>E. faecalis</i> N = 62 (%)		
	S	I	R	S	I	R
Penicilin	4 (19)	-	17 (81)*	62 (100)	-	0
Ampicilin	4 (19)	-	17 (81)*	62 (100)	-	0
Vankomicin	19 (90)	1 (5)	1 (5)	11 (18)	33 (53)	18 (29)*
Enrofloksacin	2 (10)	0	19 (90)	1 (2)	11 (18)	50 (80)
Ciprofloksacin	1 (5)	1 (5)	19 (90)*	5 (8)	26 (42)	31 (50)
Nitrofurantoin	3 (14)	3 (14)	15 (72)*	59 (95)	2 (3)	1 (2)
Rifampicin	1 (5)	3 (14)	17 (81)	3 (5)	7 (11)	52 (84)
Tetraciklin	2 (10)	1 (5)	18 (85)*	22 (35)	8 (13)	32 (52)
Kloramfenikol	14 (67)	6 (28)	1 (5)	36 (58)	17 (27)	9 (15)
Streptomycin	16 (76)	-	5 (24)	53 (85)	-	9 (15)
Gentamicin	20 (95)	-	1 (5)	56 (90)	-	6 (10)

S – osjetljiv; I – umjereno osjetljiv; R – rezistentan

* označava statistički značajnu razliku u aktivnosti antimikrobne tvari između dviju vrsta, Fisherov egzaktni test, $p < 0,05$

Među izolatima vrste *E. faecium*, najveći je broj izolata bio rezistentan na enrofloksacin i ciprofloksacin (90 %). Više od 80 % izolata bilo je rezistentno na tetraciklin (85 %), penicilin, ampicilin i rifampicin (81 %). Najmanje izolata bilo je rezistentno na kloramfenikol i vankomicin (5 %).

Multirezistencija je ustanovljena kod 19 izolata (90 %) vrste *E. faecium*.

Kod 24 % izolata vrste *E. faecium* uočena je rezistencija visokog stupnja na streptomycin, dok je na gentamicin bio rezistentan jedan izolat (5 %). Izolat koji je imao rezistenciju visokog stupnja na gentamicin bio je ujedno rezistentan i na streptomycin.

Najviše izolata vrste *E. faecalis* bilo je rezistentno na rifampicin (84 %) i enrofloksacin (80 %). Rezistencija na tetraciklin i ciprofloksacin ustanovljena je kod 52 %, odnosno 50 % izolata. Svi izolati vrste *E. faecalis* bili su osjetljivi na penicilin i ampicilin te su gotovo svi bili osjetljivi na nitrofurantoin (95 %). Za razliku od izolata vrste *E. faecium*, veći postotak izolata vrste *E. faecalis* bio je rezistentan na vankomicin (29 %).

Multirezistencija je ustanovljena kod 43 izolata (69 %) vrste *E. faecalis*.

Rezistencija visokog stupnja na streptomycin uočena je kod 15 % izolata, dok je na gentamicin bilo rezistentno 10 % izolata. Od toga su tri izolata (5 %) bila rezistentna na oba ispitivana aminoglikozida.

Fisherovim egzaktnim testom ($p < 0,05$) ispitana je statistička značajnost razlike u osjetljivosti vrsta na antimikrobne tvari, HLAR i MDR. Značajna razlika dokazana je u postotku rezistentnih izolata vrste *E. faecium* na penicilin, ampicilin, ciprofloksacin, nitrofurantoin i tetraciklin te u postotku rezistentnih izolata vrste *E. faecalis* na vankomicin.

Tablica 5. Zbirni rezultati osjetljivosti na antimikrobne lijekove ciljnih izolata bakterija *E. faecium* i *E. faecalis* izdvojenih iz uzoraka urina

Antimikrobni lijek	<i>E. faecium</i> i <i>E. faecalis</i>		
	N = 32 (%)		
	S	I	R
Penicilin	21 (66)	0	11 (34)
Ampicilin	21 (66)	0	11 (34)
Vankomicin	13 (41)	11 (34)	8 (25)
Enrofloksacin	2 (6)	5 (16)	25 (78)
Ciprofloksacin	0	10 (32)	22 (68)
Nitrofurantoin	20 (63)	3 (9)	9 (28)
Rifampicin	5 (16)	0	27 (84)
Tetraciklin	5 (16)	5 (16)	22 (68)
Kloramfenikol	17 (53)	9 (28)	6 (19)
Streptomycin	27 (84)	-	5 (16)
Gentamicin	29 (91)	-	3 (9)

S – osjetljiv; I – umjereno osjetljiv; R – rezistentan

Najviše izolata enterokoka izdvojenih iz uzoraka urina bilo je rezistentno na rifampicin (84 %) i enrofloksacin (78 %). Postotak rezistentnih izolata na ciprofloksacin i tetraciklin bio je 68 %. Na vankomicin je bilo rezistentno 25 % izolata, a najmanje je rezistentnih izolata bilo na kloramfenikol (19 %).

Multirezistencija je ustanovljena kod 23 izolata (72 %) ciljnih enterokoka izoliranih iz uzoraka urina.

Rezistencija visokog stupnja na streptomycin uočena je kod 16 % izolata, a na gentamicin kod 9 % izolata. Dva izolata (6 %) su bila rezistentna na oba ispitivana aminoglikozida.

Tablica 6. Pojedinačno prikazani rezultati osjetljivosti na antimikrobne lijekove izolata *E. faecium* i *E. faecalis* izdvojenih iz uzoraka urina

Antimikrobni lijek	<i>E. faecium</i> N = 12 (%)			<i>E. faecalis</i> N = 20 (%)		
	S	I	R	S	I	R
Penicilin	1 (8)	-	11 (92)*	20 (100)	-	0
Ampicilin	1 (8)	-	11 (92)*	20 (100)	-	0
Vankomicin	1 (8)	10 (83)	1 (8)	3 (15)	10 (50)	7 (35)
Enrofloksacin	0	1 (8)	11 (92)	2 (10)	4 (20)	14 (70)
Ciprofloksacin	0	1 (8)	11 (92)*	0	9 (45)	11 (55)
Nitrofurantoin	1 (8)	2 (17)	9 (75)*	19 (95)	1 (5)	0
Rifampicin	1 (8)	0	11 (92)	4 (20)	0	16 (80)
Tetraciklin	1 (8)	0	11 (92)*	4 (20)	5 (25)	11 (55)
Kloramfenikol	9 (75)	3 (25)	0	8 (40)	6 (30)	6 (30)
Streptomycin	10 (83)	-	2 (17)	17 (85)	-	3 (15)
Gentamicin	11 (92)	-	1 (8)	18 (90)	-	2 (10)

S – osjetljiv; I – umjereno osjetljiv; R – rezistentan

* označava statistički značajnu razliku u rezistenciji na antimikrobnu tvar između dvije vrste, Fisherov egzaktni test $p < 0,05$

Među izolatima vrste *E. faecium* izdvojenih iz uzoraka urina primijećen je velik broj izolata rezistentnih na šest od 11 antimikrobnih lijekova: penicilin, ampicilin, enrofloksacin, ciprofloksacin, rifampicin i tetraciklin (92 %). Najmanje je bilo izolata rezistentnih na vankomicin (8 %), a svi su izolati bili osjetljivi na kloramfenikol.

Multirezistencija je ustanovljena kod 11 izolata (92 %) vrste *E. faecium* izdvojenih iz uzoraka urina.

Rezistencija visokog stupnja na streptomycin uočena je kod 17 % izolata vrste *E. faecium*, dok je na gentamicin bio rezistentan jedan izolat (8 %). Isti izolat bio je ujedno rezistentan i na streptomycin.

Među izolatima vrste *E. faecalis* izdvojenih iz uzoraka urina najviše je bilo izolata rezistentnih na rifampicin (80 %). Postotak izolata rezistentnih na enrofloksacin bio je 70 %. Svi izolati vrste *E. faecalis* bili su osjetljivi na penicilin i ampicilin te nitrofurantoin.

Multirezistencija je ustanovljena kod 12 izolata (60 %) vrste *E. faecalis* izdvojenih iz uzoraka urina.

Rezistencija visokog stupnja na streptomycin uočena je kod 15 % izolata vrste *E. faecalis*, dok je na gentamicin bilo rezistentno 10 % izolata. Jedan izolat bio je rezistentan na oba ispitivana aminoglikozida.

Fisherovim egzaktnim testom ($p < 0,05$) ispitana je statistička značajnost razlike u osjetljivosti vrsta na antimikrobne tvari, HLLAR i MDR. Značajna razlika postajala je u postotku rezistentnih izolata vrste *E. faecium* na penicilin, ampicilin, ciprofloksacin, nitrofurantoin i tetraciklin.

5.5. Rezultati dokazivanja gena za rezistenciju lančanom reakcijom polimerazom

5.5.1. Dokazivanje *vanA* i *vanB* gena za rezistenciju na vankomicin

Kod izolata fenotipski rezistentnih na vankomicin molekularnom metodom PCR ispitana je prisutnost *vanA* i *vanB* gena odgovornih za rezistenciju na vankomicin.



Slika 7. Agarozni gel nakon provedene elektroforeze PCR produkata dobivenih u ispitivanju prisutnosti *vanA* i *vanB* gena za rezistenciju na vankomicin

M: 100 pb DNA biljeg; B+: pozitivna kontrola za *vanB* gen; A+: pozitivna kontrola za *vanA* gen; 1 – 6: izolati negativni na ispitivane gene; 7: izolat broj 101, pozitivan na *vanB* gen; 8: izolat negativan na ispitivane gene; -: negativna kontrola

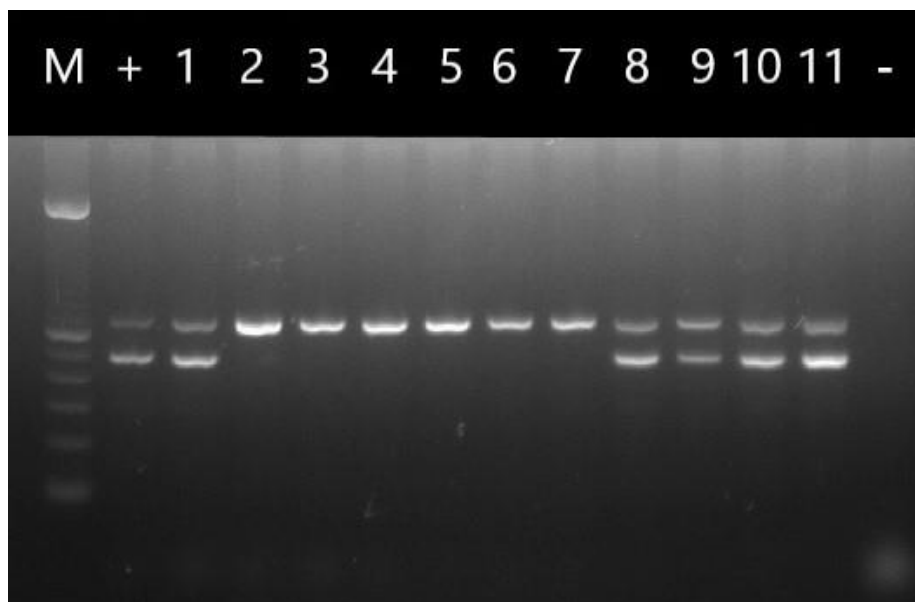
Tablica 7. Rezultati ispitivanja prisutnosti *vanA* i *vanB* gena kod fenotipski rezistentnih izolata enterokoka

Vrsta	Fenotipska rezistencija na vankomicin	<i>vanA</i> gen	<i>vanB</i> gen
<i>E. faecium</i>	1	1	0
<i>E. faecalis</i>	18	1	1
Ukupno	19	2	1

Fenotipska rezistencija na vankomicin uočena je kod 19 izolata. Nakon molekularnog ispitivanja prisutnosti *vanA* i *vanB* gena rezistencija je potvrđena kod tri izolata, odnosno 16 % od fenotipski rezistentnih izolata. U ukupnom broju enterokoka rezistencija na vankomicin molekularno je dokazana kod 4 % izolata.

5.5.2. Dokazivanje *tetL* i *tetM* gena za rezistenciju na tetraciklin

Kod izolata fenotipski rezistentnih na tetraciklin molekularnom metodom PCR ispitana je prisutnost *tetL* i *tetM* gena odgovornih za rezistenciju na tetraciklin.



Slika 8. Agarozni gel nakon provedene elektroforeze PCR produkata dobivenih u ispitivanju prisutnosti *tetL* i *tetM* gena za rezistenciju na tetraciklin

M:100 pb DNA biljeg; +: pozitivna kontrola za *tetL* i *tetM* gene; 1: izolat pozitivan na oba ispitivana gena; 2 – 7: izolati pozitivni na *tetM* gen; 8 – 11: izolati pozitivni na oba ispitivana gena; -: negativna kontrola

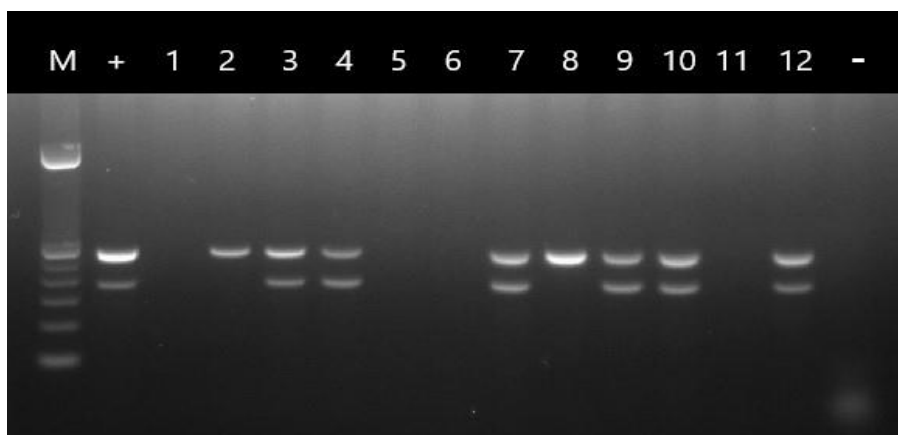
Tablica 8. Rezultati ispitivanja prisutnosti *tetL* i *tetM* gena kod fenotipski rezistentnih izolata enterokoka

Vrsta	Fenotipska rezistencija na tetraciklin			Oba gena
		<i>tetL</i> gen	<i>tetM</i> gen	
<i>E. faecium</i>	18	11	18	11
<i>E. faecalis</i>	32	5	31	5
Ukupno	50	16	49	16

Fenotipska rezistencija na tetraciklin uočena je kod 50 izolata. Nakon molekularnog ispitivanja prisutnosti *tetL* i *tetM* gena rezistencija je potvrđena kod 49 izolata, 98 % od fenotipski rezistentnih izolata. Svi izolati koji su posjedovali *tetL* gen imali su i *tetM* gen. U ukupnom broju enterokoka rezistencija na vankomicin molekularno je dokazana kod 59 % izolata.

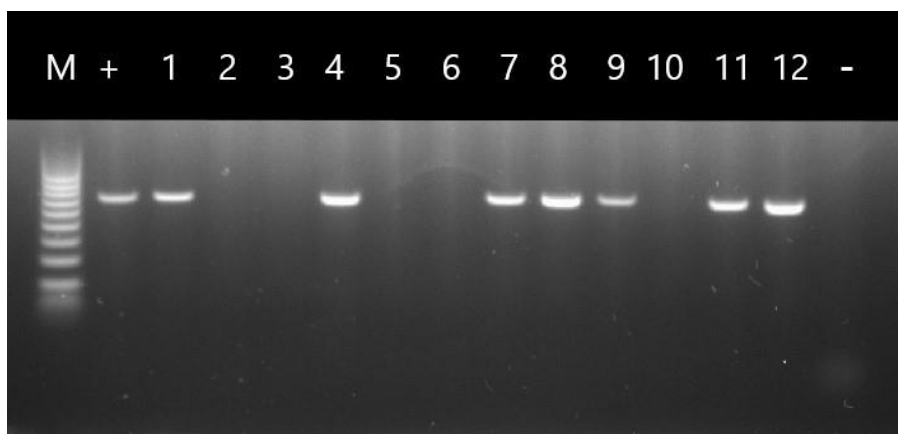
5.5.3. Dokazivanje *aph(3')-IIIa*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* i *ant(6)-Ia* gena za rezistenciju visokog stupnja na aminoglikozide

Kod izolata kojima je disk-difuzijskim postupkom ustanovljena rezistencija visokog stupnja na jedan ili oba aminoglikozida, molekularnom metodom PCR ispitana je prisutnost *aph(3')-IIIa*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* i *ant(6)-Ia* gena odgovornih za tu rezistenciju.



Slika 9. Agarozni gel nakon provedene elektroforeze PCR produkata dobivenih u ispitivanju prisutnosti *aph(3')-IIIa* i *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* gena za rezistenciju visokog stupnja na aminoglikozide

M: 100 pb DNA biljeg; +: pozitivna kontrola za *aph(3')-IIIa* i *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* gene; 1, 5, 6, 11: izolati negativni na oba ispitivana gena; 2, 8: izolati pozitivni na *aph(3')-IIIa* gen; 3, 4, 7, 9, 10, 12: izolati pozitivni na oba ispitivana gena; -: negativna kontrola



Slika 10. Agarozni gel nakon provedene elektroforeze PCR produkata dobivenih u ispitivanju prisutnosti *ant(6)-Ia* gena za rezistenciju visokog stupnja na aminoglikozide

M:100 pb DNA biljeg; +: pozitivna kontrola za *ant(6)-Ia* gen; 1, 4, 7, 8, 9, 11, 12: izolati pozitivni na ispitivani gen; 2, 3, 5, 6, 10: izolati negativni na ispitivani gen; -: negativna kontrola

Tablica 9. Rezultati ispitivanja prisutnosti *aph(3')-IIIa*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* i *ant(6)-Ia* gena kod izolata enterokoka s rezistencijom visokog stupnja na aminoglikozide

Aminoglikozid	Broj fenotipski ustanovljenih HLAR izolata	Gen <i>aph(3')-IIIa</i>	Gen <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	Gen <i>ant(6)-Ia</i>
Streptomycin	9	2	-	6
Gentamicin	3	3	3	-
Gentamicin i streptomycin	4	3	3	1

HLAR – High level aminoglycoside resistance

Fenotipska rezistencija visokog stupnja na aminoglikozide ustanovljena je u 16 izolata ciljnih enterokoka. Nakon molekularnog ispitivanja prisutnosti *aph(3')-IIIa*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* i *ant(6)-Ia* gena, rezistencija je potvrđena kod 13 izolata, odnosno 84 % ispitanih izolata. Tri izolata kod kojih nije dokazana prisutnost nijednog od navedenih gena imali su fenotipski uočenu rezistenciju visokog stupnja na streptomycin.

Svi izolati koji su posjedovali *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* gen imali su i *aph(3')-IIIa* gen.

RASPRAVA

U Republici Hrvatskoj objavljen je nevelik broj radova koji obrađuju problematiku bakterija roda *Enterococcus*. Većina radova vezana je uz prehrambenu industriju u kojoj se enterokoke promatra isključivo kao bakterije mliječne kiseline, odnosno istražuje se njihov utjecaj na organoleptička svojstva u proizvodnji hrane, djelovanje njihovih bakteriocina te utjecaj enterokoka na očuvanje i kvarenje hrane (Leboš Pavunc i sur., 2013.; Vukušić i Zdolec, 2020.; Zdolec i sur., 2022., 2020., 2016.). Osim u prehrambenoj industriji, enterokoki se spominju kao indikatori fekalnog zagađenja te su jedan od čimbenika u ispitivanju kvalitete voda za piće i napajanje životinja te kopnenih i bazenskih voda za rekreaciju (Dekić i Hrenović, 2017.; Denžić Lugomer i sur., 2019., 2016.; Ptiček Siročić i sur., 2018.). Praćenje rezistencije izolata bakterija roda *Enterococcus* provodi se isključivo u humanoj medicini, uglavnom kao dio praćenja uzročnika bolničkih infekcija (Tambić Andrašević i sur., 2015., 2017., 2018., 2020.; Vodnica-Martucci i Krilanović, 2019.). Usprkos navedenom, u hrvatskoj literaturi i znanosti zamjetan je nedostatak istraživanja o enterokokima kao uzročnicima infekcija u domaćih životinja te pojavi i širenju rezistencije enterokoka u veterinarskoj medicini. Također, nedostaje istraživanja o prijenosu ili mogućem prijenosu enterokoka, kao i njihovih gena rezistencije, sa životinja na čovjeka.

S obzirom na potencijalnu opasnost za javno zdravlje koju enterokoki predstavljaju, ispitivanje njihove osjetljivosti na antimikrobne lijekove i dokazivanje gena odgovornih za rezistenciju koji se mogu prenijeti na druge bakterije, nužno je u Hrvatskoj.

U razdoblju od siječnja 2016. do kraja rujna 2021. godine, u bakteriološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, izdvojeno je 100 izolata bakterija roda *Enterococcus* iz materijala porijeklom od domaćih životinja. Najveći broj izolata enterokoka izdvojen je iz pasa (66 %) i mačaka (22 %), što je očekivano s obzirom da je i većina pristiglih uzoraka u istraživanju porijeklom od pasa i mačaka. Većina izolata izdvojena je iz uzoraka urina (34 %) i obrisaka zvukovoda (16 %), a slijede ih izolati iz uzoraka rana i vagina. Uzorci ostalih dijelova tijela bili su zastupljeni s manje od 3 %. Podaci o učestalosti pojedine vrste uzorka u skladu su s učestalošću enterokoknih infekcija urogenitalnog sustava te infekcija zvukovoda i rana u životinja (Selleck i sur., 2019.).

Lančanom reakcijom polimerazom, pomoću početnica za specifične *ddl* gene, od ukupno 100 pretraženih izolata enterokoka, 62 izolata identificirana su kao vrsta *E. faecalis*, a njih 21 kao vrsta *E. faecium*. Značajno veći broj izolata vrste *E. faecalis* odgovara podacima

dobivenim u većini drugih istraživanja. Ova vrsta prevladava u svim kliničkim uzorcima u humanoj medicini, obuhvaćajući izolate enterokoka iz različitih infekcija (Barišić i Punda-Polić, 2000.; El-Mahdy i sur., 2018.; Tambić Andrašević i sur. 2018.). Iako je zabilježeno više vrsta enterokoka koji uzrokuju infekcije kod životinja, u kliničkim uzorcima također prevladava vrsta *E. faecalis* (Aarestrup i sur., 2000.; Butaye i sur., 2001.). Izolati vrste *E. faecium* zabilježeni su češće u fecesu zdravih životinja te u uzorcima iz životinja na intenzivnoj njezi (Ghosh i sur., 2011.; Iseppi i sur., 2015.; Ngbede i sur., 2017.; Poeta i sur., 2006.).

U ovom istraživanju disk-difuzijskom metodom je ispitana osjetljivost izolata vrsta *E. faecium* i *E. faecalis* na 11 antimikrobnih lijekova. Korišteni lijekovi su penicilin G, ampicilin, enrofloksacin, ciprofloksacin, tetraciklin, rifampicin, nitrofurantoin, kloramfenikol, vankomicin, streptomycin i gentamicin. Posljednja dva navedena lijeka služila su za ispitivanje rezistencije visokog stupnja na aminoglikozide. Prema rezultatima dobivenim disk-difuzijskim postupkom, izolati su razvrstani u interpretacijske skupine: osjetljiv, umjereno osjetljiv i rezistentan. Zastupljenost interpretacijskih skupina promatrana je na razini dviju istraživanih vrsta te za obje vrste objedinjeno, odnosno kao ukupni rezultat osjetljivosti enterokoka. Nadalje, zbog većeg udjela izolata izdvojenih iz uzoraka urina te podataka iz literature koji govore o većoj vjerojatnosti izdvajanja multirezistentnih enterokoka iz urina, rezultati osjetljivosti izolata urina interpretirani su zasebno.

Najveći broj izolata enterokoka u ovom je istraživanju bio rezistentan na rifampicin (83 %). Ovako veliki postotak rezistencije je neočekivan jer se ovaj lijek ne koristi u liječenju životinja u Hrvatskoj (VMP, 2022). Iako je broj istraživanja koja ispituju osjetljivost enterokoka na rifampicin malen, u jednome je istraživanju, provedenom na izolatima iz uzoraka fecesa i rektalnih obrisaka pasa, postotak rifampicin-rezistentnih enterokoka iznosio 52 %, dok je u drugom, provedenom na uzorcima fecesa goveda i peradi, taj postotak manji i iznosi 34 % (Damborg i sur., 2009.; Ngbede i sur., 2017.). Promatrajući osjetljivost pojedinih vrsta uključenih u ovo istraživanje, dobiveni su gotovo jednaki postotci rezistentnih izolata kao i sveukupno za obje vrste, *E. faecalis* 84 % i *E. faecium* 81 %. Slični rezultati objavljeni su i u istraživanju provedenom na uzorcima pasa gdje je postotak rezistentnih izolata vrste *E. faecalis* iznosio 89 %, a vrste *E. faecium* 81 % (Ossiprandi i Zerbini, 2011.). Visok postotak rifampicin-rezistentnih izolata objavljen je i u istraživanju s enterokokima izdvojenim iz urina ljudi, gdje je 94 % izolata vrste *E. faecium* i 71 % izolata vrste *E. faecalis* bilo rezistentno na ovaj lijek (Jahansepas i sur., 2018.). U ovom istraživanju, gotovo svi izolati vrste *E. faecium* iz uzoraka

urina, njih 11 od 12 (92 %), bili su rezistentni na rifampicin, dok je postotak rezistentnih izolata vrste *E. faecalis* bio nešto niži, 80 %.

Zbog urođenih mehanizama rezistencije, fluorokinoloni slabije djeluju na enterokoke (Kristich i sur., 2014.; Oyamada i sur., 2006.; Werner i sur., 2010.). Osim toga, učestalom primjenom u veterinarskoj medicini u liječenju infekcija uzrokovanih različitim bakterijama, enterokoki su, kao dio fiziološke mikrobiote, stalno izloženi ovoj skupini lijekova te je česta selekcija rezistentnih sojeva. U ovom istraživanju ispitana je osjetljivost na dva fluorokinolona, enrofloksacin i ciprofloksacin.

Postotak enrofloksacin-rezistentnih izolata enterokoka iznosio je 83 %, što je nešto veći postotak od onih objavljenih u dostupnoj literaturi (56 – 77 %) (Marques i sur., 2017.; Rodrigues i sur., 2002.). Promatrano po vrstama, najviše je izolata vrste *E. faecium* bilo rezistentno upravo na enrofloksacin (90 %), dok je kod vrste *E. faecalis* 80 % izolata bilo rezistentno na ovaj lijek. Objavljeni radovi iz područja veterinarske medicine navode 75 % - 97 % enrofloksacin-rezistentnih izolata vrste *E. faecium* dok je udio enrofloksacin-rezistentnih izolata vrste *E. faecalis* niži i kreće se između 32 % i 56 % (Ghosh i sur., 2011.; Kukanich i Lubbers, 2015.; Ossiprandi i Zerbini, 2011.).

Postotak ciprofloksacin-rezistentnih izolata enterokoka iznosio je 60 %, što je gotovo jednako kao i u dosadašnjim istraživanjima (56 – 73 %) (Marques i sur., 2017.; Rodrigues i sur., 2002.). Svi izolati koji su u ovom istraživanju bili rezistentni na ciprofloksacin bili su rezistentni i na enrofloksacin. Ciprofloksacin-rezistentnih izolata vrste *E. faecium* bilo je 90 %, jednako kao i enrofloksacin-rezistentnih izolata ove vrste. Kod vrste *E. faecalis* 50 % izolata bilo je rezistentno na ciprofloksacin. Druga istraživanja bilježe između 41 % i 90 % ciprofloksacin-rezistentnih izolata vrste *E. faecium* te između 7 % i 41 % rezistentnih izolata vrste *E. faecalis* (Jackson i sur., 2009.; Ossiprandi i Zerbini, 2011.; Šeputiene i sur., 2012.).

Kada usporedimo rezultate dobivene za pojedine vrste enterokoka, statistički je značajno više izolata *E. faecium* bilo rezistentno na ciprofloksacin. Osim toga, u ovom istraživanju, gotovo svi izolati vrste *E. faecium* iz uzoraka urina, njih 11 od 12 (92 %), bili su rezistentni na oba istraživana fluorokinolona.

Iz rezultata ovoga istraživanja vidljivo je kako je veća učestalost enrofloksacin i ciprofloksacin-rezistentnih izolata kod vrste *E. faecium*. Jednake rezultate objavila su mnoga istraživanja provedena u humanoj i u veterinarskoj medicini (Barišić i Punda-Polić, 2000.; Jackson i sur., 2009.; Jahansepa i sur., 2018.; Ossiprandi i Zerbini, 2011.; Poeta i sur., 2006.). Najvjerojatniji uzrok tome jest bolja prilagodba i sposobnost vrste *E. faecium* za selekciju rezistentnih izolata, u usporedbi s vrstom *E. faecalis*. Rezistencija na fluorokinolone

ustanovljena u ovom istraživanju je najvjerojatnije posljedica mutacija u kromosomskim genima za DNA girazu i topoizomerazu IV kojima se mijenjaju vezna mjesta za antibiotike. Također, s obzirom na mnogobrojne urođeno prisutne efluks pumpe kod enterokoka, lako je moguće kako zbog kontinuiranog kontakta s lijekovima ove skupine dolazi i do hiperekspresije gena koji ih kodiraju.

Zbog širokog spektra djelovanja i veće dostupnosti, tetraciklini su, odmah nakon penicilina, drugi najčešće korišteni lijekovi u veterinarskoj medicini u Europi (EMA, 2021). Stoga je velik broj rezistentnih izolata u ovom istraživanju (60 %) bio očekivan. Slične, ali i veće postotke rezistentnih izolata, bilježe istraživanja provedena na izolatima enterokoka iz uzoraka različitih domaćih životinja (60 % - 90 %) (Cinquelpalmi i sur., 2013.; De Leener i sur., 2005.; Kwon i sur., 2012.; Marques i sur., 2017.; Nam i sur., 2009.; Willis i sur., 2019.). Promatrajući osjetljivost pojedine vrste, u ovom je istraživanju čak 85 % izolata vrste *E. faecium* bilo rezistentno na tetraciklin. Suprotno navedenom, tetraciklin-rezistentnih izolata vrste *E. faecalis* bilo je statistički značajno manje, 52 %. U dosadašnjim istraživanjima provedenim na životinjskim uzorcima, postotak tetraciklin-rezistentnih izolata je viši te se za vrstu *E. faecium* kreće između 71 % - 94 %, a za vrstu *E. faecalis* između 75 % - 89 % (Damborg i sur., 2009.; Ossiprandi i Zerbini, 2011.; Troscianczyk i sur., 2021.; Šeputiene i sur., 2012.). U istraživanjima provedenima s vankomicin-rezistentnim izolatima vrste *E. faecium* izdvojenim iz uzoraka fecesa pasa te izolatima *E. faecium* izdvojenim iz urina pasa, zabilježeno je 100 % tetraciklin-rezistentnih izolata (Herrero i sur., 2004.; Kirkan i sur., 2019.). Vrlo često izolati obiju vrsta imaju gotovo jednak postotak rezistentnih izolata, što nije slučaj u ovom istraživanju. Također, neka istraživanja objavila su rezultate s većim postotcima rezistentnih izolata kod enterokoka životinjskog porijekla u odnosu na izolate humanog porijekla (Aarestrup i sur., 2000.; Kwon i sur., 2012.; Poeta i sur., 2006.). Moguće je kako je to posljedica izrazito raširene primjene tetraciklina u veterinarskoj medicini, od uzgoja i liječenja farmskih životinja do liječenja svih kućnih ljubimaca.

Rezistencija enterokoka na tetracikline kodirana je velikim brojem gena, a kao najčešći navode se *tetM* i *tetL* geni koji se prenose plazmidima, stoga su i odabrani u ovom istraživanju za molekularnu potvrdu fenotipski ustanovljene rezistencije (Chopra i Roberts, 2001.). Kao što je navedeno, pedeset izolata (60 %) enterokoka bilo je fenotipski rezistentno na tetracikline, a genotipska rezistencija potvrđena je u njih 49. Svih 49 izolata bilo je pozitivno na prisustvo *tetM* gena, odnosno rezistencija je posljedica sinteze zaštitnih proteina koji su onemogućili vezanje tetraciklina na ciljna mjesta. Gen *tetM* odgovoran je za rezistenciju na tetraciklin i

minociklin. Gen *tetL* kodira za efluksne pumpe koje izbacuju tetraciklin i klortetraciklin, a dokazan je u 16 izolata; 11 izolata vrste *E. faecium* i 5 izolata vrste *E. faecalis*. Za ispoljavanje rezistencije izolata na terapijske doze lijeka dovoljno je prisustvo *tetM* gena, no uz *tetL* gen izolat pokazuje rezistenciju visokog stupnja, odnosno, može preživjeti i znatno više koncentracije tetraciklina u *in vitro* uvjetima (Chopra i Roberts, 2001.). U ovom istraživanju, kod 11 od 18 tetraciklin-rezistentnih izolata vrste *E. faecium* dokazana su oba ispitivana *tet* gena, za razliku od vrste *E. faecalis* kod koje je samo pet od 32 izolata posjedovalo oba gena. Iz rezultata molekularnog ispitivanja, vidljivo je kako je rezistencija visokog stupnja češća kod vrste *E. faecium*, što još jednom dokazuje veću sposobnost ove vrste u razvoju rezistentnih i multirezistentnih izolata.

Vankomicin je glikopeptidni antibiotik, jedan od kritično važnih lijekova (CIA, engl. *Critically Important Antimicrobials*) u humanoj medicini (WHO, 2019). Iako u Republici Hrvatskoj nije odobren za upotrebu u veterinarskoj medicini, zbog važnosti njegove uloge u humanoj medicini u ovom je istraživanju ispitana osjetljivost izolata enterokoka i na vankomicin. S obzirom da nije registriran za liječenje životinja, a upotreba vankomicinu srodnog antibiotika, avoparcina, kao promotora rasta nije dozvoljena u Hrvatskoj, nismo očekivali vankomicin-rezistentne izolate. Ipak, ispitivanjem osjetljivosti izolata ustanovljeno je 23 % rezistentnih izolata enterokoka i čak 41 % izolata umjereno osjetljivih na vankomicin. Među njima, samo je jedan izolat (5 %) vrste *E. faecium* bio fenotipski rezistentan na vankomicin, za razliku od 18 (29 %) izolata vrste *E. faecalis*. Postotak rezistentnih izolata uočen u ovom istraživanju razlikuje se od istraživanja iz 2019. godine u kojem je ustanovljeno čak 45 % izolata vrste *E. faecium* iz urina pasa rezistentnih na vankomicin. Takav rezultat je vjerojatno posljedica manjeg broja izolata enterokoka uključenih u istraživanje te činjenice kako su svi izolati pripadali vrsti *E. faecium*, za koju je dosad uočena češća pojava rezistencije na vankomicin (Kirkan i sur., 2019.).

Rezultati disk-difuzijskog ispitivanja osjetljivosti na vankomicin iz ovog istraživanja značajno se razlikuju od onih zabilježenih u brojnim istraživanjima provedenim na izolatima izdvojenim iz uzoraka pasa, mačaka, glodavaca, konja i farmskih životinja. U tim se istraživanjima navodi kako nema vankomicin-rezistentnih izolata roda *Enterococcus* (Butaye i sur., 2001.; Cinquepalmi i sur., 2013.; Ghosh i sur., 2011.; Jackson i sur., 2009.; Kataoka i sur., 2014.; Ngbede i sur., 2017.; Poeta i sur., 2006.; Rodrigues i sur., 2002.; Šeputiene i sur., 2012.; Troscianczyk i sur., 2021.; Willis i sur., 2019.).

U posljednjih pet godina, istraživanja u humanoj medicini navode rezistenciju vankomicin-rezistentnih izolata vrste *E. faecium* koja se kreće između 14 % i 52 % te vrste *E. faecalis* između 2 % i 23 % (Jahansepas i sur., 2017.; Goel i sur., 2016.; Said i Abdelmegeed, 2019.). Dostupna literatura s područja Hrvatske obuhvaća VRE i MDR enterokoke izdvojene iz uzoraka ljudi, i to u svrhu praćenja rezistencije bakterija na nacionalnoj razini. Prema posljednjim podacima za 2019. godinu, broj VRE izolata u Hrvatskoj vrste *E. faecalis* je manji od 1 %, no postotak je značajno veći kada je riječ o VRE izolatima vrste *E. faecium* i iznosi 33 %. Osim toga, zabilježen je i porast rezistencije u proteklome desetljeću (Tambić Andrašević i sur., 2015., 2017., 2018., 2020.; Vodnica-Martucci i Krilanović, 2019.). Vrlo slični brojevi vankomicin-rezistentnih izolata u humanoj medicini objavljeni su i u Njemačkoj (Werner i sur., 2021.).

S obzirom na razliku u osjetljivosti izolata na vankomicin između ovog i drugih istraživanja, molekularnom smo metodom, osim dokazivanja ključnih gena odgovornih za rezistenciju neposredno provjerili i točnost rezultata dobivenih disk-difuzijskim postupkom. Prema preporuci u CLSI dokumentu, izolate koji su umjereno rezistentni na vankomicin potrebno je provjeriti mikrodilucijskom ili molekularnom metodom (CLSI, 2015). S obzirom na preporuku, uz rezistentne izolate, i svi umjereno osjetljivi izolati pretraženi su na prisutnost *vanA* i *vanB* gena. To su geni koji kodiraju enzime za modifikaciju veznih mjesta antibiotika te se posljedično tome mijenja afinitet za vankomicin.

Od 19 VRE izolata, njih 18 je pripadalo vrsti *E. faecalis*, a samo jedan vrsti *E. faecium*. Molekularnom pretragom dokazana je prisutnost pretražvanih gena u samo tri izolata, od kojih su dva izolata posjedovala *vanA* gen, a jedan izolat *vanB* gen. Od 18 izolata vrste *E. faecalis* kod kojih je fenotipski utvrđena rezistencija na vankomicin, genotipski je ona dokazana u samo dva izolata, jedan je posjedovao *vanA*, a drugi *vanB* gen. Može se zaključiti kako je jedan od izolata, zbog prisutnosti *vanA* gena, rezistentan na vankomicin i teikoplanin, dok je drugi, s *vanB* genom, rezistentan samo na vankomicin. Usporedbom rezultata disk-difuzijskog i molekularnog ispitivanja, rezistencija na vankomicin je dokazana u samo 11 % ispitanih izolata vrste *E. faecalis*.

Jedan izolat vrste *E. faecium* fenotipski je pokazao rezistenciju na vankomicin i kod njega je molekularnom metodom dokazana prisutnost *vanA* gena.

Svi izolati koji su disk-difuzijskim ispitivanjem interpretirani kao umjereno osjetljivi na vankomicin bili su negativni na prisustvo istraživanih *van* gena, odnosno, smatraju se osjetljivim na vankomicin. Genotipski je rezistencija na vankomicin ustanovljena u samo 4 % ukupnog broja izolata enterokoka ispitivanih u ovom istraživanju. Razlika u postotku

rezistentnih izolata odnosi se samo na vrstu *E. faecalis*. Ovaj rezultat bolje odgovara i prethodno navedenim istraživanjima iz područja veterinarske medicine, prema kojima nema vankomicin-rezistentnih izolata izdvojenih iz uzoraka životinja (Kataoka i sur., 2014.; Ngbede i sur., 2017.; Šeputiene i sur., 2012.; Troscianczyk i sur., 2021.; Willis i sur., 2019.).

Prema EUCAST (EUCAST, engl. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) dokumentu, disk-difuzijski postupak smatra se pouzdanim za ispitivanje osjetljivosti enterokoka na vankomicin, osobito kod izolata kod kojih je dokazan *vanA* gen. Također, smatraju ga pouzdanijim za otkrivanje *vanB* genotipa od automatiziranog postupka određivanja osjetljivosti VITEK[®] (bioMérieux, USA) i mikrodilucije, s naglaskom na strogo pridržavanje uputa o izradi i očitavanju rezultata (EUCAST, 2017). Od ukupnog broja fenotipski vankomicin-rezistentnih enterokoka, samo je 16 % bilo i genotipski potvrđeno u ovom istraživanju. Iako dobiveni rezultati daju naslutiti kako disk-difuzijski postupak ispitivanja osjetljivosti enterokoka na vankomicin nije pouzdan, zbog malog broja ispitanih uzoraka to se ne može tvrditi sa sigurnošću. Ovako veliko odstupanje između rezultata dviju korištenih metoda trebalo bi provjeriti s većim brojem vankomicin-rezistentnih enterokoka izdvojenih iz životinjskih uzoraka.

Penicilin G i ampicilin su antimikrobni lijekovi iz skupine penicilina, preporučeni za upotrebu u liječenju enterokoknih infekcija. Temeljem rezultata ispitivanja osjetljivosti enterokoka na penicilin G, može se procijeniti osjetljivost izolata na cijelu skupinu penicilina. Ipak, u ovom istraživanju ispitana je i osjetljivost na ampicilin, prije svega kako bi se usporedili dobiveni rezultati rezistencije na ova dva lijeka. Ispitivanje je pokazalo kako su svi ampicilin-rezistentni izolati ujedno i penicilin G-rezistentni, odnosno rezistentni su na sve lijekove iz skupine penicilina. Upotreba penicilina u liječenju, kao i kombinacije penicilina i aminoglikozida, kod rezistentnih izolata nije učinkovita. Postotak penicilin-rezistentnih *Enterococcus* spp. izolata iznosio je 20 %, što je u skladu s rezultatima dvaju istraživanja provedenima na izolatima enterokoka iz fecesa pasa i mačaka (Ossiprandi i Zerbini, 2015.; Rodrigues i sur., 2002.). U drugim istraživanjima provedenim na izolatima enterokoka iz uzoraka fecesa ili obrisaka rektuma domaćih životinja (pasa, mačaka, goveda, pilića) broj ampicilin-rezistentnih izolata je veći i kreće se između 30 i 50 % (Cinquelpalmi i sur., 2013.; Issepi i sur., 2020.; Ngbede i sur., 2017.; Willis i sur., 2019.). Suprotno tome, u istraživanju Marques i sur. (2018.), provedenom na izolatima enterokoka izdvojenih iz urina pasa i mačaka, dokazano je 12 % izolata rezistentnih na ampicilin, no ako se promatra samo vrsta *E. faecium*, gotovo svi izolati bili su rezistentni (89 %). Kirkan i sur. (2019.), objavili su kako je 100 %

enterokoka vrste *E. faecium*, izoliranih iz urina pasa s infekcijom mokraćnog sustava, rezistentno na ampicilin.

U većini istraživanja provedenih na izolatima vrsta *E. faecium* i *E. faecalis* iz uzoraka životinjskog porijekla, objavljeni su slični rezultati. Rezistencija na peniciline uglavnom se javlja kod vrste *E. faecium* i kreće se između 70 % i 82 %, dok je vrsta *E. faecalis* osjetljiva na ovu skupinu lijekova (Ghosh i sur., 2011.; Jackson i sur., 2009.; Kwon i sur., 2012.; Ossiprandi i Zerbini, 2015.). I u ovom istraživanju dobiveni su jednaki rezultati ako se promatra rezistencija na peniciline pojedinačno za svaku od dvije ispitivane vrste. Kod vrste *E. faecium*, 81 % izolata je bilo rezistentno, dok su svi izolati vrste *E. faecalis* bili osjetljivi. Uspoređujući izolate koji su u ovom istraživanju izdvojeni iz urina, 92 % izolata vrste *E. faecium* bilo je rezistentno na ovu skupinu lijekova.

Iz ovih je rezultata vidljivo kako ukupna rezistencija izolata roda *Enterococcus* na peniciline proizlazi isključivo iz rezistentnih izolata vrste *E. faecium*. Također, dobiveni podaci potvrđuju i tvrdnju EUCAST-a, prema kojoj je rezistencija na ampicilin česta kod vrste *E. faecium*, a rijetka kod vrste *E. faecalis* (EUCAST, 2021). U humanoj medicini rezistencija na peniciline prisutna je u obje vrste, također s većom učestalošću u vrste *E. faecium*. U dosadašnjim se istraživanjima postotak ampicilin-rezistentnih izolata *E. faecalis* kretao između 9 % i 36 %, a kod vrste *E. faecium* postotci ampicilin-rezistentnih izolata su u rasponu od 45 % do 99 % (Barišić i Punda-Polić, 2000.; Goel i sur., 2016.; Jahansepa i sur., 2018.; Zhang i sur., 2021.). Sve se češće bilježi i 100 % ampicilin-rezistentnih izolata vrste *E. faecium* izdvojenih iz kliničkih uzoraka humanog porijekla (El-Mahdy i sur., 2018.; Kwon i sur., 2012.; Said i Almagedeer, 2019.).

Glavnim mehanizmom rezistencije enterokoka na peniciline smatraju se mutacije u genima koji kodiraju PBP molekule. Prve takve mutacije uočene su kod vrste *E. faecium*, a s obzirom da su navedeni geni smješteni na kromosomu, jasno je zašto je rezistencija uglavnom vezana uz tu vrstu te zašto nema horizontalnog prijenosa i širenja rezistencije na peniciline među drugim vrstama enterokoka.

U veterinarskoj medicini u Hrvatskoj nitrofurantoin se ciljano koristi samo za liječenje infekcija donjeg dijela mokraćnog sustava, slično preporukama u humanoj medicini (Weese i sur., 2021.). S obzirom da se lijek gotovo u potpunosti izlučuje urinom (> 95 %), enterokoki GI sustava ljudi i životinja nisu izloženi djelovanju antibiotika pa je vjerojatnost stjecanja i širenja rezistencije mala. Uz to, da bi djelovanje nitrofurantoina u potpunosti izostalo, u izolatu istovremeno mora biti prisutno više mehanizama rezistencije, primjerice hiperekspresija gena

koji kodiraju efluksne pumpe i delecije u genima koji kodiraju enzime nitroreduktaze (Tu i Mccalla, 1975.; Wijma i sur., 2018.; Zhang i sur., 2021.). S obzirom na sve navedeno, u ovom istraživanju očekivan je mali postotak rezistencije na nitrofurantoin. Ta je pretpostavka potvrđena i rezultatom od samo 19 % nitrofurantoin-rezistentnih enterokoka. Promatrajući vrste pojedinačno, statistički značajno više izolata vrste *E. faecium* pokazalo je rezistenciju na nitrofurantoin, odnosno 15 od 21 izolata (71 %), u usporedbi sa samo jednim rezistentnim izolatom vrste *E. faecalis*. Istraživanja provedena na izolatima izdvojenim iz pasa, mačaka, peradi i svinja također govore o postojanju rezistencije na nitrofurantoin samo u sojevima vrste *E. faecium*. U navedenim istraživanjima, postotak rezistentnih izolata ove vrste kreće se između 27 % i 67 %, dok su svi izolati vrste *E. faecalis* osjetljivi na nitrofurantoin (Ghosh i sur., 2011.; Jackson i sur., 2009.; Šeputiene i sur., 2015.).

Istraživanja provedena na kliničkim izolatima enterokoka iz humanih uzoraka dala su slične rezultate, no rezistencija je prisutna i kod malog broja izolata vrste *E. faecalis*. Rezistencija se kod vrste *E. faecium* kretala između 4 % i 24 %, a kod vrste *E. faecalis* između 1 % i 14 % (Barišić i Punda-Polić, 2000.; Goel i sur., 2016.; Jahansepas i sur., 2018.; Swaminathan i Alangaden, 2010.). Ipak, kad je riječ o enterokokima izdvojenim iz urina tijekom infekcija mokraćnog sustava ljudi, postotak rezistentnih izolata je veći, 50 % (El-Mahdy i sur., 2018.). U ovome je istraživanju također opažen veći postotak izolata rezistentnih na nitrofurantoin izdvojenih iz urina (28%), u odnosu na izolate iz ostalih uzoraka. Pritom je rezistencija zabilježena samo kod vrste *E. faecium*. O samim mehanizmima rezistencije nedostaje znanstvenih spoznaja, no trenutno prevladava mišljenje kako je riječ o mutacijama u bakterijskom kromosomu, a ne o stjecanju gena plazmidima. Ova teorija govori u prilog zapaženome zadržavanju rezistencije u jednoj vrsti.

Kloramfenikol je lijek koji se koristi prvenstveno u humanoj medicini. Prema preporukama ISCAID-a (ISCAID, engl. *International Society for Companion Animal Infectious Diseases*), rezerviran je za liječenje urinarnih infekcija uzrokovanih multirezistentnim bakterijama za koje nije preostala ni jedna druga terapijska opcija (Weese i sur., 2021.). Upotreba ovog lijeka zabranjena je za liječenje životinja namijenjenih ishrani ljudi (Giguère i sur., 2013.). S obzirom na to da se u veterinarskoj medicini gotovo ne koristi, malen broj izolata rezistentnih na kloramfenikol u ovom istraživanju bio je očekivan (12 %), čineći ovu rezistenciju najmanje zastupljenom među istraživanim izolatima. Promatrajući vrste pojedinačno, kod vrste *E. faecalis* 15 % izolata bilo je rezistentno na kloramfenikol, a kod vrste

E. faecium 5 % je rezistentnih izolata. Kada izolate iz urina promatramo zasebno, 30 % njih je bilo kloramfenikol-rezistentno, a svi su pripadali vrsti *E. faecalis*.

Gore navedeni podaci u skladu su s velikim brojem istraživanja koja bilježe mali broj enterokoka rezistentnih na kloramfenikol. U istraživanjima provedenim na uzorcima pasa i mačaka, postotak kloramfenikol-rezistentnih enterokoka kreće se između 4 % i 31 % (Cinquelpalmi i sur., 2013.; Kukanich i Lubbers, 2015.; De Leener i sur., 2005.; Kataoka i sur., 2014.; Poeta i sur., 2006.). Slični rezultati objavljeni su i u istraživanjima provedenim na uzorcima konja, peradi, goveda i svinja, sa 6 - 17 % kloramfenikol-rezistentnih izolata *E. faecium* i 8 - 33 % rezistentnih *E. faecalis* izolata (Ngbede i sur., 2017.; Poeta i sur., 2006.; Šeputiene i sur., 2012.; Willis i sur., 2019.). Iako je rezistencija na kloramfenikol u pojedinim istraživanjima veća (30 - 33%), to su i dalje vrlo mali, ako ne i najmanji, postotci rezistentnih izolata u odnosu na druge ispitivane lijekove u navedenim istraživanjima (De Leener i sur., 2005.; Kataoka i sur., 2014.; Šeputiene i sur., 2012.). Iz navedenoga je vidljivo kako je učestalost kloramfenikol-rezistentnih izolata veća u vrste *E. faecalis*, za razliku od ostalih istraživanih lijekova na koje je rezistencija češće ustanovljena u vrste *E. faecium*.

Većinom su za rezistenciju enterokoka na kloramfenikol odgovorni enzimi za inaktivaciju lijeka, kodirani *cat* i *cfr* genima. Zbog očekivane niske rezistencije te izrazito rijetke upotrebe ovog lijeka u veterinarskoj medicini, navedeni geni nisu dokazivani u ovom istraživanju. Ipak, važno je imati na umu kako je *cfr* gen odgovoran za križnu rezistenciju enterokoka na kloramfenikol, sve oksazolidine, linkozamid, streptogramin A i pleuromutiline, kritično važne lijekove u humanoj medicini. Zbog opasnosti od prijenosa kloramfenikol-rezistentnih enterokoka sa životinje na čovjeka, preporuka je ispitati prisutnost ovih gena u narednim istraživanjima enterokoka izoliranih iz uzoraka životinja.

Rod *Enterococcus* odlikuje se urođenom rezistencijom niskog stupnja na aminoglikozide, stoga se lijekovi ove skupine ne mogu koristiti kao monoterapija kod infekcija uzrokovanih enterokokima. Njihova primjena može biti učinkovita samo u kombinaciji s lijekovima koji inhibiraju sintezu bakterijske stijenke (penicilini i glikopeptidi). Zbog urođenih mehanizama rezistencije, na enterokoke djeluju samo dva aminoglikozida, gentamicin i streptomycin, pri čemu je gentamicin nešto djelotvorniji. Prije odabira terapije nužno je razlikovati izolate s urođenom rezistencijom od izolata sa stečenom rezistencijom visokog stupnja. Prema CLSI-u, visok stupanj rezistencije dokazuje se fenotipski disk-difuzijskim postupkom, ali uz primjenu antibiotskih diskova s visokom koncentracijom lijeka. Potrebni su diskovi streptomicina s koncentracijom lijeka 300 µg, te disk gentamicina s koncentracijom lijeka 120 µg. Ukoliko se

ispitivanjem dokaže rezistencija visokog stupnja na gentamicin, smatra se kako je izolat rezistentan na sve aminoglikozide, izuzev streptomocina. Stečenu rezistenciju visokog stupnja na streptomocin uvijek je potrebno provjeriti zasebno (CLSI, 2015.).

U ovome je istraživanju rezistencija visokog stupnja na streptomocin češća (17 %) od rezistencije visokog stupnja na gentamicin (8 %). Promatrajući osjetljivost pojedinih vrsta, veći je postotak izolata vrste *E. faecium* koji posjeduje rezistenciju visokog stupnja na streptomocin (24 %), u odnosu na vrstu *E. faecalis* (15 %). Rezistencija visokog stupnja na gentamicin rjeđa je od rezistencije visokog stupnja na streptomocin, a dokazana je u 5 % izolata *E. faecium* i 10 % izolata *E. faecalis*.

Mnoga istraživanja enterokoka životinjskog porijekla bilježe veću učestalost HLAR izolata kod vrste *E. faecalis* te češću pojavu rezistencije visokog stupnja na streptomocin kod te vrste (5 - 43 % izolata *E. faecium* te 7 - 47 % izolata *E. faecalis*). Rezistenciju visokog stupnja na gentamicin posjeduje između 3 i 21 % izolata *E. faecium* te između 3 i 30 % izolata *E. faecalis* (Butaye i sur., 2001.; Ghosh i sur., 2011.; Marques i sur., 2017.; Nam i sur., 2009.; Ngbede i sur., 2017.; Poeta i sur., 2006.). U ovom istraživanju ukupno četiri izolata, jedan izolat *E. faecium* i tri izolata *E. faecalis*, bila su rezistentna na oba ispitivana aminoglikozida.

U humanoj medicini zabilježena je veća pojavnost HLAR izolata koji većinom pripadaju vrsti *E. faecium*, a rezistencija visokog stupnja na gentamicin je nešto učestalija. Tako je kod vrste *E. faecium* zabilježeno 48 % - 86 % izolata s rezistencijom visokog stupnja na gentamicin, a kod vrste *E. faecalis* između 25 % i 80 %. Što se tiče rezistencije visokog stupnja na streptomocin, ona se kod izolata vrste *E. faecium* kreće između 48 % i 71 %, a kod vrste *E. faecalis* između 24 % i 66 % (Barišić i Punda-Polić, 2000.; El-Mahdy i sur., 2018.; Goel i sur., 2016.; Jahansepa i sur., 2018.; Lee, 2013.; Said i Abdelmegeed, 2019.).

Rezistencija na peniciline u kombinaciji s HLAR znatno smanjuje terapijske opcije. Srećom, ovim istraživanjem dokazana su samo četiri izolata (5 %) rezistentna na obje skupine lijekova. Od ova četiri izolata, dva su bila izolirana iz urina. Niska pojavnost ove dvostruke rezistencije govori kako je kombinirana terapija i dalje djelotvorna te ostaje terapija izbora u liječenju enterokoknih infekcija kod životinja.

Kod izolata kojima je disk-difuzijskim postupkom ustanovljena fenotipska rezistencija visokog stupnja na jedan ili oba aminoglikozida, molekularnom metodom ispitana je prisutnost gena *aph(3')-IIIa*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* i *ant(6)-Ia*. Gen *ant(6)-Ia* kodira aminoglikozid-modificirajući enzim adeniltransferazu te uzrokuje rezistenciju visokog stupnja na streptomocin. Od devet izolata s rezistencijom visokog stupnja na streptomocin, šest je posjedovalo *ant(6)-Ia* gen, a kod dva izolata je uz taj gen dokazan i gen *aph(3')-IIIa*. Iako gen

aph(3')-IIIa uzrokuje rezistenciju višeg stupnja na gentamicin, njegova prisutnost u izolatima ne poništava sinergijsko djelovanje gentamicina i penicilina (Chow, 2000.). Imajući to na umu, može se zaključiti kako svih šest izolata posjeduje samo rezistenciju visokog stupnja na streptomycin te bi terapija gentamicinom i penicilinom trebala biti djelotvorna. Kod preostala tri izolata s visokom rezistencijom na streptomycin, prisutnost *ant(6)-Ia* gena nije dokazana, čime se može zaključiti kako je njihova rezistencija posljedica rjeđe zastupljenog gena *ant(3'')-Ia* koji kodira slični enzim, a koji nije dokazivan u ovom istraživanju. Rezistencija visokog stupnja na streptomycin može biti i posljedica mutacije u ribosomu kojom se mijenja vezno mjesto lijeka (Chow, 2000.).

Rezistenciju visokog stupnja na gentamicin najčešće uzrokuje bifunkcionalni aminoglikozid-modificirajući enzim kodiran genom *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*. Sojevi koji nose gen za ovaj enzim rezistentni su na sve aminoglikozide osim streptomycina (Hollenbeck i Rice, 2012.). U ovom istraživanju, tri su izolata enterokoka imala rezistenciju visokog stupnja na gentamicin, a sva tri su imala prisutan navedeni gen te uz njega i gen *aph(3')-IIIa*.

Četiri izolata pokazala su fenotipski rezistenciju visokog stupnja na oba aminoglikozida. Analizom genotipa, tri su izolata (75 %) bila pozitivna na barem jedan od ispitivanih gena. Geni *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* i *aph(3')-IIIa*, odgovorni za rezistenciju visokog stupnja na gentamicin, bili su prisutni u sva tri izolata. Samo jedan od izolata, uz navedene gene, posjedovao je i gen *ant(6)-Ia* odgovoran za rezistenciju visokog stupnja na streptomycin. U preostala dva izolata, nije ustanovljen mehanizam rezistencije visokog stupnja na streptomycin. Ovi rezultati ukazuju na potrebu za ispitivanjem prisustva oba gena, *ant(6)-Ia* i *ant(3'')-Ia*, budući da se mehanizam rezistencije ne može potvrditi prisustvom samo gena *ant(6)-Ia*.

Fenotipska rezistencija visokog stupnja na aminoglikozide ustanovljena je kod 16 izolata enterokoka. Nakon molekularnog ispitivanja prisutnosti gena za aminoglikozid-modificirajuće enzime, mehanizam rezistencije je potvrđen kod 13 izolata. Za tri izolata, s visokim stupnjem rezistencije na streptomycin, nije dokazan mehanizam rezistencije.

Od ukupno 83 izolata enterokoka uključenih u ovo istraživanje, za njih 50 (60 %) je utvrđen multirezistentni fenotip, odnosno bili su rezistentni na jednu ili više antimikrobnih tvari iz barem tri različite skupine antimikrobnih lijekova. Promatramo li izolate izdvojene iz urina, multirezistentni fenotip je učestaliji i zastupljen je u 72 % izolata. Slični rezultati, sa 60 % ili više multirezistentnih izolata, objavljeni su u prethodnim istraživanjima s enterokokima izdvojenim iz različitih uzoraka domaćih životinja i ljudi (Cinquelpalmi i sur., 2013.; El-Mahdy

i sur., 2018.; Goel i sur., 2016.; Jackson i sur., 2009.; Jahansepas i sur., 2018.; Kataoka i sur., 2014.; Ngbede i sur., 2017.; Ossiprandi i Zerbini, 2015.; Šeputiene i sur., 2012.; Willis i sur., 2019.).

Promatrajući zasebno dvije istraživane vrste, multirezistentni fenotip je ustanovljen kod 90 % izolata vrste *E. faecium* te kod 69 % izolata vrste *E. faecalis*. Češću pojavu rezistencije kod vrste *E. faecium* uočili su i autori drugih sličnih istraživanja s izolatima enterokoka iz humanih i životinjskih uzoraka (Ghosh i sur., 2011.; Goel i sur., 2016.; Jackson i sur., 2009.; Ossiprandi i Zerbini, 2015.; Šeputiene i sur., 2012.). Uz to, u ovome istraživanju, multirezistentni izolati vrste *E. faecium* većinom su bili rezistentni na pet različitih skupina antimikrobnih lijekova, dok su multirezistentni izolati vrste *E. faecalis* bili rezistentni na tri ili četiri različite skupine antimikrobnih lijekova.

Statistički značajna razlika u postotku rezistentnih izolata vrste *E. faecium* dokazana je na penicilin, ampicilin, ciprofloksacin, nitrofurantoin i tetraciklin (Fisherov egzaktni test, $p < 0,05$). Analizom rezultata fenotipski ispitivane osjetljivosti, uočena je statistički značajna razlika u postotku vankomicin-rezistentnih izolata vrste *E. faecalis*. S obzirom na to da molekularnim ispitivanjem nisu potvrđeni svi rezistentni izolati, u konačnici nije bilo značajne razlike u broju vankomicin-rezistentnih izolata između dviju ispitivanih vrsta.

Nije dokazana statistički značajna razlika u broju MDR i HLAR izolata, vjerojatno zbog manjeg broja uzoraka vrste *E. faecium*. Slične rezultate, odnosno značajno veći postotak rezistencije na ampicilin i ciprofloksacin kod vrste *E. faecium* zabilježili su i autori u istraživanjima provedenim na izolatima iz pasa i uzoraka humanog porijekla (Ossiprandi i Zerbini, 2011.; Barišić i Punda-Polić, 2000.)

Uspoređujući izolate ovih dviju vrsta izdvojenih iz urina, statistički značajna razlika dokazana je u postotku rezistentnih izolata vrste *E. faecium* na penicilin, ampicilin, ciprofloksacin, nitrofurantoin i tetraciklin (Fisherov egzaktni test $p < 0,05$).

ZAKLJUČCI

1. Većina bakterija roda *Enterococcus* izoliranih iz uzoraka životinjskog porijekla u Republici Hrvatskoj pripada dvjema vrstama, *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis*. Vrsta *Enterococcus faecalis* je najčešća vrsta roda *Enterococcus* izdvojena iz uzoraka životinjskog porijekla u Republici Hrvatskoj.
2. Rezistencija enterokoka na peniciline prisutna je samo u izolatima vrste *Enterococcus faecium*. Zbog mogućnosti prijenosa rezistentnih enterokoka sa životinje na čovjeka, postoji realna opasnost od širenja penicilin-rezistentnih sojeva *Enterococcus faecium* u ljudsku populaciju. S obzirom na to da su penicilini prvi izbor za liječenje enterokoknih infekcija, mogućnost širenja takvih sojeva predstavlja prijetnju javnom zdravlju.
3. Istovremena rezistencija enterokoka životinjskog porijekla na peniciline i aminoglikozide nije česta te je kombinacija penicilina i aminoglikozida lijek izbora za liječenje životinja s enterokoknim infekcijama.
4. Unatoč svojstvu ukoncentriravanja, enrofloksacin nije dobar izbor za empirijsko liječenje urinarnih infekcija uzrokovanih enterokokima zato što je većina pretraženih izolata rezistentna na enrofloksacin.
5. Kirby-Bauer disk-difuzijska metoda nije pouzdana metoda za procjenu osjetljivosti na vankomicin izolata bakterija roda *Enterococcus* izdvojenih iz životinja. Sve izolate rezistentne prema disk-difuzijskom postupku treba potvrditi molekularnom ili mikrodilucijskom metodom.
6. U svrhu preciznijeg određivanja mehanizma odgovornog za rezistenciju visokog stupnja na streptomycin, potrebno je molekularnim metodama ispitati prisutnost dvaju stečenih gena, *ant(6)-Ia* i *ant(3'')-Ia*.

LITERATURA

AAKRA, A., H. VEBØ, U. INDAHL, L. SNIPEN, O. GJERSTAD, M. LUNDE, I. F. NES (2010): The Response of *Enterococcus faecalis* V583 to Chloramphenicol Treatment. *Int. J. Microbiol.* 483048, 1-7.

AARESTRUP, F. M., Y. AGERSO, P. GERNER–SMIDT, M. MADSEN, L. B. JENSEN (2000): Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn. Micr. Infec. Dis.* 37, 127-137.

AARESTRUP, F. M., P. BUTAYE, W. WITTE (2002): Nonhuman reservoirs of enterococci. In M. S. Gilmore, D. B. Clewell, P. Courvalin, G. M. Dunny, B. E. Murray, & L. B. Rice (Eds.), *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*. Washington, D. C., ASM, str. 55-100.

AHMAD, A., A. GHOSH, C. SCHAL, L. ZUREK (2011): Insects in confined swine operations carry a large antibiotic resistant and potentially virulent enterococcal community. *BMC Microbiol.* 11, 1-13.

ALONSO-CALLEJA, C., B. MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, M. PRIETO, R. CAPITA (2004): Microbiological quality of vacuum-packed retail ostrich meat in Spain. *Food Microbiol.* 21, 241–246.

ANKAIAH, D., E. PALANICHAMY, C. B. ANTONYRAJ, R. AYYANNA, V. PERUMAL, S. I. B. AHAMED, V. ARUL (2018): Cloning, overexpression, purification of bacteriocin enterocin-B and structural analysis, interaction determination of enterocin-A, B against pathogenic bacteria and human cancer cells. *Int. J. Biol. Macromol.* 116, 502-512.

ARIAS, C. A., B. E. MURRAY (2008): Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. *Expert Rev. Anti-Infe.* 6, 637–655.

ARIAS, C. A., G. A. CONTRERAS, B. E. MURRAY (2010): Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clin. Microbiol. Infec.* 16, 555-562.

ARIAS, C. A., D. PANESSO, D. M. MCGRATH, X. QIN, M. F. MOJICA, C. MILLER, L. DIAZ, T. T. TRAN, S. RINCON, E. M. BARBU, J. REYES, J. H. ROTH, E. LOBOS, E.

SODERGREN, R. PASQUALINI, W. ARAP, J. P. QUINN, Y. SHAMOO, B. E. MURRAY, M. WEINSTOCK (2011): Genetic basis for *in vivo* daptomycin resistance in Enterococci. N. Engl. J. Med. 365, 892-900.

ARIAS, C. A., B. E. MURRAY (2012): The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. Nat. Rev. Microbiol. 10, 266–278.

ARMIN, S., F. FALLAH, A. KARIMI, M. RASHIDAN, M. SHIRDUST, L. AZIMI (2017): Genotyping, antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of vancomycin resistance *Enterococcus faecalis* isolated from blood culture. Microb. Pathogenesis. 109, 300-304.

ARSÈNE S., R. LECLERCQ (2007): Role of a *qnr*-Like Gene in the Intrinsic Resistance of *Enterococcus faecalis* to Fluoroquinolones. Antimicrob. Agents Ch. 51, 3254–3258.

AUCKLAND, C., L. TEARE, F. COOKE, M. E. KAUFMANN, M. WARNER, G. JONES, K. BAMFORD, H. AYLES, A. P. JOHNSON (2002): Linezolid-resistant enterococci: report of the first isolates in the United Kingdom. J. Antimicrob. Chemoth. 50, 743–746.

BADDOUR, L. M., W. R. WILSON, A. S. BAYER, V. G. FOWLER JR, A. F. BOLGER, M. E. LEVISON, P. FERRIERI, M. A. GERBER, L. Y. TANI, M. H. GEWITZ, D. C. TONG, J. M. STECKELBERG, R. S. BALTIMORE, S. T. SHULMAN, J. C. BURNS, D. A. FALACE, J. W. NEWBURGER, T. J. PALLASCH, M. TAKAHASHI, K. A. TAUBERT (2005): Infective endocarditis: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications. Circulation. 111, 394–434.

BARIŠIĆ, Z., V. PUNDA-POLIĆ (2000): Antibiotic resistance among enterococcal strains isolated from clinical specimens. Int. J. Antimicrob. Agents. 16, 1, 65-68.

BATES, J., Z. JORDENS, J. B. SELKON (1993): Evidence for an animal origin of vancomycin-resistant enterococci. Lancet. 342, 490–491.

BAYSAROWICH, J., K. KOTEVA, D. W. HUGHES, L. EJIM, E. GRIFFITHS, K. ZHANG, M. JUNOP, G. D. WRIGHT (2008): Rifamycin antibiotic resistance by ADP-ribosylation: structure and diversity of Arr. P. Natl. A. Sci. 105, 4886-4891.

BEABOUT, K., T. G. HAMMERSTROM, A. M. PEREZ, B. F. MAGALHAES, A. G. PRATER, T. P. CLEMENTS, C. A. ARIAS, G. SAXER, Y. SHAMOO (2015): The ribosomal S10 protein is a general target for decreased tigecycline susceptibility. *Antimicrob. Agents Ch.* 59, 5561–5566.

BELGUESMIA, Y., G. SPANO, D. DRIDER (2021): Potentiating effects of leaderless enterocin DD14 in combination with methicillin on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* S1 strain. *Microbiol. Res.* 252, 126864.

BEN BRAÏEK, O., S. SMAOUI (2019): Enterococci: between emerging pathogens and potential probiotics. *BioMed Res. Int.* 2019, 5938210.

BENDER, J. K., I. KLARE, C. FLEIGE, G. WERNER (2020): A nosocomial cluster of tigecycline- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* Isolates and the Impact of *rpsJ* and *tet(M)* mutations on tigecycline resistance. *Microb. Drug Resist.* 26, 576-582.

BENDER, J. K., V. CATTOIR, K. HEGSTAD, E. SADOWY, T. M. COQUE, H. WESTH, A. M. HAMMERUM, K. SCHAFFER, K. BURNS, S. MURCHAN, C. NOVAIS (2018): Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: towards a common nomenclature. *Drug Resist. Update.* 40, 25-39.

BIELEN, L., R. LIKIĆ, V. ERDELJIĆ, I. MAREKOVIĆ, N. FIRIS, M. GRGIĆ-MEDIĆ, A. GODAN, I. TOMIĆ, B. HUNJAK, A. MARKOTIĆ, D. BEJUK, V. TICIĆ, S. BALZAR, B. BEDENIĆ (2018): Activity of fosfomicin against nosocomial multiresistant bacterial pathogens from Croatia: A multicentric study. *Croat. Med. J.* 59, 56–64.

BISGAARD, M., A. M. BOJESEN, J. P. CHRISTENSEN, H. CHRISTENSEN (2010): Observations on the incidence and aetiology of valvular endocarditis in broiler breeders and detection of a newly described taxon of *Pasteurellaceae*, *Avibacterium* endocarditidis. *Avian Pathol.* 39, 177-181.

BOEHM, A. B., L. M. SASSOUBRE (2014): Enterococci as indicators of environmental fecal contamination. In: Gilmore, M. S., D. B. Clewell, Y. Ike and N. Shankar: *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, str. 101-123.

BORST, L. B., M. M. SUYEMOTO, A. H. SARSOOR, M. C. HARRIS, M. P. MARTIN, J. D. STRICKLAND, E. O. OVIEDO, H. J. BARNES (2017): Pathogenesis of enterococcal spondylitis caused by *Enterococcus cecorum* in broiler chickens. *Vet. Pathol.* 54, 61-73.

BOULIANNE, M., J. ARSENAULT, D. DAIGNAULT, M. ARCHAMBAULT, A. LETELLIER, L. DUTIL (2016): Drug use and antimicrobial resistance among *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. Isolates from chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. *Can. J. Vet. Res.* 80, 49–59.

BOYD, D. A., S. LÉVESQUE, A. C. PICARD, G. R. GOLDING (2015): Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* harbouring vanN in Canada: a case and complete sequence of pEfm12493 harbouring the vanN operon. *J. Antimicrob. Chemoth.* 70, 2163-2165.

BUTAYE, P., L. A. DEVRIESE, F. HAESEBROUCK (2001): Differences in antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from farm and pet animals. *Antimicrob. Agents Ch.* 45, 1374-1378.

BYAPPANAHALLI, M. N., M. B. NEVERS, A. KORAJKIC, Z. R. STALEY, V. J. HARWOOD (2012): Enterococci in the Environment. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 76, 685–706.

CARTWRIGHT, J. A., J. PÉREZ-ACCINO, C. TIMOTHY, K. W. SIMPSON, S. SALAVATI SCHMITZ (2020): Acute Ulcerative Enterocolitis With Severe Protein Loss Due to Mucosal Invasion With *Enterococcus* spp. in a Dog With Exocrine Pancreatic Insufficiency: A Case Report. *Frontiers in Veterinary Science.* 7, 721.

CARYL, J. A., G. COX, S. TRIMBLE, A. J. O'NEILL (2012): “tet (U)” is not a tetracycline resistance determinant. *Antimicrob. Agents Ch.* 56, 3378-3379.

CATTOIR, V., C. ISNARD, T. COSQUER, A. ODHIAMBO, F. BUCQUET, F. GUÉRIN, J.-C. GIARD (2015): Genomic analysis of reduced susceptibility to tigecycline in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Ch.* 59, 239–44.

CAUWERTS, K., A. DECOSTERE, E. M. DE GRAEF, F. HAESEBROUCK, F. PASMANS (2007): High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the erm(B) gene. *Avian Pathol.* 36, 395–399.

CECI, M., G. DELPECH, M. SPARO, V. MEZZINA, S. S. BRUNI, B. BALDACCINI (2015): Clinical and microbiological features of bacteremia caused by *Enterococcus faecalis*. *J. Infect. Dev. Countr.* 9, 1195-1203.

CERCENADO, E., M. MARÍN, R. INSA, E. BOUZA (2010): Emergence of linezolid-resistant Gram-positive clinical isolates due to cfr-methylase gene production associated with G2576T mutation in the 23S rRNA. *20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Vienna: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

CETINKAYA, Y., P. FALK, C. G. MAYHALL (2000): Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 686–707.

CHOPRA, I., M. ROBERTS (2001): Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 65, 232-260.

CHOW, J. W. (2000): SPECIAL SECTION: ANTIMICROBIAL RESISTANCE Aminoglycoside Resistance in Enterococci. *Clin. Infect. Dis.* 31, 586–589.

CINQUEPALMI, V., R. MONNO, L. FUMAROLA, G. VENTRELLA, C. CALIA, M. F. GRECO, D. DE VITO, L. SOLEO (2013): Environmental contamination by dog's faeces: A public health problem? *Int. J. Environ. Res. Pu.* 10, 72–84.

CLSI (2015): Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 3rd ed. CLSI supplement VET01S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute

CLSI (2018): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute

COURVALIN P. (2006): Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin. Infect. Dis.* 42, 25–34.

ČANŽEK MAJHENIČ, A. (2006): Enterococci: yin-yang microbes. *Mljekarstvo.* 56, 1, 5-20.

ČIVLJAK, R., M. GIANNELLA, S. DI BELLA, N. PETROSILLO (2014): Could chloramphenicol be used against ESKAPE pathogens? A review of in vitro data in the literature from the 21st century. *Expert Rev. Anti-infe.* 12, 249-264.

- DAMBORG, P., J. TOP, A. P. A. HENDRICKX, S. DAWSON, R. J. L. WILLEMS, L. GUARDABASSI (2009): Dogs are a reservoir of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* lineages associated with human infections. *Appl. Environ. Microb.* 75, 2360–2365.
- DAVIS, D. R., J. B. MCALPINE, C. J. PAZOLES, M. K. TALBOT, E. A. ALDER, C. WHITE, B. M. JONAS, B. E. MURRAY, G. M. WEINSTOCK, B. L. ROGERS (2001): *Enterococcus faecalis* multi-drug resistance transporters: application for antibiotic discovery. *J. Mol. Microb. Biotech.* 3, 179–184.
- DE CASTRO, A., A. MONTAÑO, F. CASADO, A. SÁNCHEZ, L. REJANO (2002): Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiol.* 19, 637–644.
- DEKIĆ, S., J. HRENOVIĆ (2017): Bacteriological analysis of spring water in the vicinity of popular visitor spots in the Nature Park Medvednica. *Hrvatske vode.* 25, 13-16.
- DE LEENER, E., A. DECOSTERE, E. M. DE GRAEF, H. MOYAERT, F. HAESEBROUCK (2005): Presence and mechanism of antimicrobial resistance among enterococci from cats and dogs. *Microb. Drug Resist.* 11, 395–403.
- DENŽIĆ LUGOMER, M., V. JAKI TKALEC, D. PAVLIČEK, M. KIŠ, J. SOKOLOVIĆ, D. MAJNARIĆ (2016): Analiza pitke vode na sabiralištima mlijeka Bjelovarsko-bilogorske županije. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam.* 11, 176-181.
- DENŽIĆ LUGOMER, M., D. PAVLIČEK, M. KIŠ, V. JAKI TKALEC, S. FURMEG, J. SOKOLOVIĆ, D. MAJNARIĆ (2019): Kvaliteta vode za napajanje na farmama sjeverozapadne Hrvatske. *Veterinarska stanica.* 50, 0-0.
- DIAZ, L., P. KIRATISIN, R. E. MENDES, D. PANESSO, K. V. SINGH, C. A. ARIAS (2012): Transferable plasmid-mediated resistance to linezolid due to *cfr* in a human clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Ch.* 56, 3917–22.
- DORSCH, R., S. TEICHMANN-KNORRN, H. SJETNE LUND (2019): Urinary tract infection and subclinical bacteriuria in cats: A clinical update. *J. Feline Med. Surg.* 21, 1023–1038.

EDGE, T. A., A. B. BOEHM (2010): Classical and Molecular Methods to Measure Fecal Bacteria. In M. J. Sadowsky & R. L. Whitman (Eds.), *The Fecal Bacteria*. Washington, D. C., ASM, str. 241-273.

EGAN, S. A., A. C. SHORE, B. O'CONNELL, G. I. BRENNAN, D. C. COLEMAN (2020): Linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from hospitalized patients in Ireland: high prevalence of the MDR genes *optrA* and *poxxA* in isolates with diverse genetic backgrounds. *J. Antimicrob. Chemoth.* 75, 1704-1711.

ELIOPOULOS, G. M., B. F. FARBER, B. E. MURRAY, C. WENNERSTEN, R. C. MOELLERING (1984): Ribosomal resistance of clinical enterococcal to streptomycin isolates. *Antimicrob. Agents Ch.* 25, 398-399.

EL-MAHDY, R., A. MOSTAFA, G. EL-KANNISHY (2018): High level aminoglycoside resistant enterococci in hospital-acquired urinary tract infections in Mansoura, Egypt. *Germes.* 8, 186-190.

EL-ZAMKAN, M. A., H. M. MOHAMED (2021): Antimicrobial resistance, virulence genes and biofilm formation in *Enterococcus* species isolated from milk of sheep and goat with subclinical mastitis. *PloS one.* 16, e0259584.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, EUCAST (2017): EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.01.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, EUCAST (2021): Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Ver. 11.0.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2021. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020. (EMA/58183/2021)

FALAGAS, M. E., K. G. MANTA, F. NTZIORA, K. Z. VARDAKAS (2006): Linezolid for the treatment of patients with endocarditis: a systematic review of the published evidence. *J. Antimicrob. Chemoth.* 58, 273–280.

FIEDLER, S., J. K. BENDER, I. KLARE, S. HALBEDEL, E. GROHMANN, U. SZEWZYK, J. WERNER (2016): Tigecycline resistance in clinical isolates of *Enterococcus faecium* is mediated by an upregulation of plasmid-encoded tetracycline determinants *tet(L)* and *tet(M)*. J. Antimicrob. Chemoth. 71, 871–881.

FLAHAUT, S., A. HARTKE, J.-C. GIARD, A. BENACHOUR, P. BOUTIBONNES, Y. AUFFRAY (1996): Relationship between stress response towards bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. FEMS Microbiol. Lett. 138, 49–54.

FLAHAUT, S., A. HARTKE, J. C. GIARD, Y. AUFFRAY (1997): Alkaline stress response in *Enterococcus faecalis*: adaptation, cross-protection, and changes in protein synthesis. Appl. Environ. Microb. 63, 812–4.

FLAHAUT, S., J. M. LAPLACE, J. FRÈRE, Y. AUFFRAY (1998): The oxidative stress response in *Enterococcus faecalis*: Relationship between H₂O₂ tolerance and H₂O₂ stress proteins. Lett. Appl. Microbiol. 26, 259–264.

FOULQUIÉ MORENO, M. R., P. SARANTINOPOULOS, E. TSAKALIDOU, L. DE VUYST (2006): The role and application of enterococci in food and health. Int. J. Food Microbiol. 106, 1-24.

FRANZ, C. M., M. HUCH, H. ABRIOUEL, W. HOLZAPFEL, A. GÁLVEZ (2011): Enterococci as probiotics and their implications in food safety. Int. J. Food Microbiol. 151, 125–140.

FRASER, S. L., C. J. DONSKEY, R. A. SALATA (2021): Enterococcal Infections. Medscape. <https://emedicine.medscape.com/article/216993-overview>

FRIEDMAN, L., J. D. ALDER, J. A. SILVERMAN (2006): Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Ch. 50, 2137–2145.

FRYE, J. G., C. R. JACKSON (2013): Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. food animals. Front. Microbiol. 4, 1-22.

GALIMAND, M., E. SCHMITT, M. PANVERT, B. DESMOLAIZE, S. DOUTHWAITE, Y. MECHULAM, P. COURVALIN (2011): Intrinsic resistance to aminoglycosides in *Enterococcus faecium* is conferred by the 16S rRNA m5C1404- specific methyltransferase EfmM. RNA. 17, 251-262.

GARCIA-MIGURA, L., R. S. HENDRIKSEN, L. FRAILE, F. M. AARESTRUP (2014): Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. Vet. Microbiol. 170, 1–9.

GHOSH, A., M. AKHTAR, C. HOLDERMAN, L. ZUREK (2014): Significance and survival of Enterococci during the house fly development. J. Med. Entomol. 51, 63-67.

GHOSH, A., S. E. DOWD, L. ZUREK (2011): Dogs leaving the ICU carry a very large multi-drug resistant enterococcal population with capacity for biofilm formation and horizontal gene transfer. PLoS One. 6, e22451.

GIGUÈRE, S., J. F. PRESCOTT, P. M. DOWLING (2013): Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 5th Edition, Wiley Blackwell.

GILMORE, M. S., F. LEBRETON, W. VAN SCHAIK (2013): Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. Curr. Opin. Microbiol. 16, 10–6.

GIRAFFA G. (2002): Enterococci from foods. FEMS Microbiol. Rev. 26, 163–171.

GOEL, V., D. KUMAR, R. KUMAR, P. MATHUR, S. SINGH (2016): Community acquired enterococcal urinary tract infections and antibiotic resistance profile in North India. J. Lab. Physicians. 8, 50-54.

GONZALES, R. D., P. C. SCHRECKENBERGER, M. B. GRAHAM, S. KELKAR, K. DENBESTEN, J. P. QUINN (2001): Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. Lancet. 357, 1179.

GREUTER, T., M. C. MICHEL, D. THOMANN, H. WEIGMANN, S. R. VAVRICKA (2020): Randomized, placebo-controlled, double-blind and open-label studies in the treatment and prevention of acute diarrhoea with *Enterococcus faecium* SF68. Front. Microbiol. 7, 276.

GUZMAN PRIETO, A. M., W. VAN SCHAIK, M. R. ROGERS, T. M. COQUE, F. BAQUERO, J. CORANDER, R. J. WILLEMS (2016): Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones? *Front. Microbiol.* 7, 788.

GVERIĆ GRGINIĆ, A., R. GROZDEK, Z. BOŠNJAK, A. BUDIMIR (2014): Multidrug-resistant microorganisms and surgical antibiotic prophylaxis – prevalence at the University Hospital Centre Sestre milosrdnice. *Signa vitae: J. intensive care Emerg. Med.* 9, 13–17.

HAMMERUM, A. M. (2012): Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clin. Microbiol. Infec.* 18, 619–625.

HARVEY, B., J. TARRANT, M. MCCLOSKEY, O. NATHANSON, S. COLE (2021): *Enterococcus* spp. Meningoencephalitis, Ventriculitis, and Hypophysitis in a Dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 57, 290-293.

HASSAN, R. M., D. M. GHAITH, D. K. ISMAIL, M. M. ZAFER (2018): Reduced susceptibility of *Enterococcus* spp. isolates from Cairo University Hospital to tigecycline: Highlight on the influence of proton pump inhibitors. *J. Glob. Antimicrob. Re.* 12, 68-72.

HEINTZ, B. H., J. HALILOVIC, C. L. CHRISTENSEN (2010): Vancomycin-resistant enterococcal urinary tract infections. *Pharmacotherapy.* 30, 1136–1149.

HERRERO, I. A., J. F. FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, M. A. MORENO, L. DOMÍNGUEZ (2004): Dogs Should Be Included in Surveillance Programs for Vancomycin-Resistant Enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1384–1385.

HIDRON, A. I., J. R. EDWARDS, J. PATEL, T. C. HORAN, D. M. SIEVERT, D. A. POLLOCK, S. K. FRIDKIN (2008): National Healthcare Safety Network Team. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect. Cont. Hosp. Ep.* 29, 996–1011.

HIGUITA, N. I. A., M. M. HUYCKE (2014): Enterococcal disease, epidemiology, and implications for treatment. In: Gilmore, M. S., D. B. Clewell, Y. Ike and N. Shankar: *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection.* Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, str. 65-101.

HOLLENBECK, B. L., L. B. RICE (2012): Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. *Virulence*. 3, 421-433.

HOLZAPFEL, W., A. ARINI, M. AESCHBACHER, R. COPPOLECCHIA, B. POT (2018): *Enterococcus faecium* SF68 as a model for efficacy and safety evaluation of pharmaceutical probiotics. *Benef. Microbes*. 9, 375-388.

HUYCKE, M. M., D. F. SAHM, M. S. GILMORE (1998): Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 239–249.

ISEPPI, R., P. MESSI, I. ANACARSO, M. BONDI, C. SABIA, C. CONDÒ, S. DE NIEDERHAUSERN (2015): Antimicrobial resistance and virulence traits in *Enterococcus* strains isolated from dogs and cats. *New Microbiol.* 38, 369-378.

JACKSON, C. R., P. J. FEDORKA-CRAY, J. A. DAVIS, J. B. BARRETT, J. G. FRYE (2009): Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from dogs and cats in the United States. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1269–1278.

JAHANSEPAS, A., M. AHANGARZADEH REZAEI, A. HASANI, Y. SHARIFI, M. RAHNAMAYE FARZAMI, A. DOLATYAR, M. AGHAZADEH (2018): Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *E. faecalis* and *E. faecium* isolated from clinical specimens in the Northwest of Iran. *Microb. Drug Resist.* 24, 1165-1173.

JAKOVAC, S., E. F. BOJIĆ, M. A. IBRIŠIMOVIĆ, B. TUTIŠ, M. OSTOJIĆ, M. HUKIĆ (2017): Characteristics of Vancomycin-Resistant *Enterococcus* Strains in the West Balkans: A First Report. *Microb. Drug Resist.* 23, 122–126.

JANG, S., S. SHIN, S. H. KIM, H. KIM, C. MOON (2019): Diagnosis of *Enterococcus hirae* infection in association with piglet diarrhea. *Journal of Biomedical and Translational Research*. 20, 115-120.

JENKINS I. (2007): Linezolid- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* endocarditis: successful treatment with tigecycline and daptomycin. *J. Hosp. Med.* 2, 343–344.

JONAS, B. M., B. E. MURRAY, G. M. WEINSTOCK (2001): Characterization of EmeA, a NorA homolog and multidrug resistance efflux pump, in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Ch.* 45, 3574–3579.

KATAOKA, Y., Y. UMINO, H. OCHI, K. HARADA, T. SAWADA (2014): Antimicrobial susceptibility of enterococcal species isolated from antibiotic-treated dogs and cats. *J. Vet. Med. Sci.* 76, 1399–1402.

KAK, V., J. W. CHOW (2002): Acquired antibiotic resistances in enterococci. In M. S. Gilmore, D. B. Clewell, P. Courvalin, G. M. Dunny, B. E. Murray, & L. B. Rice (Eds.), *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*. Washington, D. C., ASM, str. 355-383.

KARIYAMA, R., R. MITSUHATA, J. W. CHOW, D. B. CLEWELL, H. KUMON (2000): Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3092-3095.

KHAMESIPOUR, F., K. B. LANKARANI, B. HONARVAR, T. E. KWENTI (2018): A systematic review of human pathogens carried by the housefly (*Musca domestica* L.). *BMC Public Health.* 18, 1-15.

KIRKAN, S., U. PARIN, G. BALAT (2019): Antimicrobial resistance of *Enterococcus faecium* isolated from the urinary system of dogs. *Maced. Vet. Rev.* 42, 15–21.

KRISTICH, C. J., L. B. RICE, C. A. ARIAS (2014): Enterococcal infection - Treatment and antibiotic resistance. In: Gilmore, M. S., D. B. Clewell, Y. Ike and N. Shankar: *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, str. 123-185.

KUKANICH, K. S., B. V. LUBBERS (2015): Review of enterococci isolated from canine and feline urine specimens from 2006 to 2011. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 51, 148–154.

KWON, K. H., B. Y. MOON, S. Y. HWANG, Y. H. PARK (2012): Detection of CC17 *Enterococcus faecium* in Dogs and a Comparison with Human Isolates. *Zoonoses Public Health.* 59, 375–378.

LANDMAN D., J. M. QUALE (1997): Management of infections due to resistant enterococci: a review of therapeutic options. *J. Antimicrob. Chemoth.* 40, 161–170.

LARSEN, J., H. C. SCHØNHEYDER, K. V. SINGH, C. H. LESTER, S. S. OLSEN, L. J. PORSBO, L. GARCIA-MIGURA, L. B. JENSEN, M. BISGAARD, B. E. MURRAY, A. M.

HAMMERUM (2011): Porcine and human community reservoirs of *Enterococcus faecalis*, Denmark. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 2395-2397.

LAYTON, B. A., S. P. WALTERS, L. H. LAM, A. B. BOEHM (2010): *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.* 109, 539–547.

LEBOŠ PAVUNC, A., B. KOS, J. BEGANOVIĆ, K. UROIĆ, D. BUČAN, J. ŠUŠKOVIĆ (2013): Antibiotic susceptibility and antimicrobial activity of autochthonous starter cultures as safety parameters for fresh cheese production. *Mljekarstvo.* 63, 185–194.

LEBRETON, F., F. DEPARDIEU, N. BOURDON, M. FINES-GUYON, P. BERGER, S. CAMIADE, R. LECLERCQ, P. COURVALIN, V. CATTOIR (2011): D-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents. Ch.* 55, 4606–4612.

LEBRETON, F., R. J. WILLEMS, M. S. GILMORE (2014): *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization. In: Gilmore, M. S., D. B. Clewell, Y. Ike and N. Shankar: *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, str. 5-65.

LEBRETON, F., M. D. VALENTINO, K. SCHAUFLER, A. M. EARL, V. CATTOIR, M. S. GILMORE, (2018): Transferable vancomycin resistance in clade B commensal-type *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chemoth.* 73, 1479-1486.

LESHO, E., G. W. WORTMANN, D. CRAFT, K. A. MORAN (2006): Letters to the Editor De Novo Daptomycin Nonsusceptibility in a Clinical Isolate. *J. Clin. Microbiol.* 44, 673.

LEVINE, D. P. (2006): Vancomycin: A History. *Clin. Infect. Dis.* 42, 5–12.

LINDEN, P. K., R. C. MOELLERING JR, C. A. WOOD, S. J. REHM, J. FLAHERTY, F. BOMPART, G. H. TALBOT (2001): Treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infections with quinupristin/dalfopristin. *Clin. Infect. Dis.* 33, 1816-1823.

LIU, Y., Y. WANG, C. WU, Z. SHEN, S. SCHWARZ, X.-D. DU, L. DAI, W. ZHANG, Q. ZHANG, J. SHEN (2012): First report of the multidrug resistance gene *cf*r in *Enterococcus faecalis* of animal origin. *Antimicrob. Agents. Ch.* 56, 1650-1654.

LIU, Y., Y. WANG, S. SCHWARZ, Y. LI, Z. SHEN, Q. ZHANG, C. WU, J. SHEN (2013): Transferable multiresistance plasmids carrying *cfr* in *Enterococcus* spp. from swine and farm environment. *Antimicrob. Agents. Ch.* 57, 42-48.

LONG, J. K., T. K. CHOUEIRI, G. S. HALL, R. K. AVERY, M. A. SEKERES (2005): Daptomycin-Resistant *Enterococcus faecium* in a Patient With Acute Myeloid Leukemia CASE REPORT. *Mayo Clin. Proc.* 80, 1215–1216.

LONG, K. S., J. POEHLGAARD, C. KEHRENBURG, S. SCHWARZ, B. VESTER (2006): The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A antibiotics. *Antimicrob. Agents. Ch.* 50, 2500-2505.

MACOVEI, L., B. MILES, L. ZUREK (2008): Potential of houseflies to contaminate ready-to-eat food with antibiotic-resistant enterococci. *J. Food Protect.* 71, 435-439.

MACOVEI L., L. ZUREK (2006): Ecology of antibiotic resistance genes: characterization of enterococci from houseflies collected in food settings. *Appl. Environ. Microb.* 72, 4028-4035.

MACROBID (2013): Preuzeto s: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/020064s021lbl.pdf (pristupljeno: 1. veljače 2022.)

MAHDI, L. H., G. N. ABDUL-HUR, I. G. AUDA (2020): Evidence of anti-*K. pneumoniae* biofilm activity of novel *E. faecalis* enterocin GLHM. *Microb. Pathogenesis.* 147, 104366.

MALANI, P. N., C. A. KAUFFMAN, M. J. ZERVIS (2002): Enterococcal disease, epidemiology and treatment. In M. S. Gilmore, D. B. Clewell, P. Courvalin, G. M. Dunny, B. E. Murray, & L. B. Rice (Eds.), *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*. Washington, D. C., ASM, str. 385-408.

MANOLOPOULOU, E., P. SARANTINOPOULOS, E. ZOIDOU, A. AKTYPIS, E. MOSCHOPOULOU, I. G. KANDARAKIS (2003): Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 153–161.

MARKEY, B., F. LEONARD, M. ARCHAMBAULT, A. CULLINANE, D. MAGUIRE (2013): *Clinical veterinary microbiology*, 2nd ed., Elsevier Health Sciences. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto. 121-134.

MARSHALL, S. H., C. J. DONSKEY, R. HUTTON-THOMAS, R. A. SALATA, L. B. RICE (2002): Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents. Ch.* 46, 3334–3336.

MARQUES, C., A. BELAS, A. FRANCO, C. ABOIM, L. T. GAMA, C. POMBA (2018): Increase in antimicrobial resistance and emergence of major international high-risk clonal lineages in dogs and cats with urinary tract infection: 16 year retrospective study. *J. Antimicrob. Chemoth.* 73, 377–384.

MCDONALD J. R. , L. OLAISON, D. J. ANDERSON, B. HOEN, J. M. MIRO, S. EYKYN, E. ABRUTYN, V. G. JR FOWLER, G. HABIB, C. SELTON-SUTY, P. A. PAPPAS, C. H. CABELL, G. R. COREY, F. MARCO, D. J. SEXTON (2005): Enterococcal endocarditis: 107 cases from the international collaboration on endocarditis merged database. *Am. J. Med.* 118, 759-66.

MCKELLAR, Q. A., S. F. SANCHEZ BRUNI, D. G. JONES (2004): Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 27, 503-514.

MILLER, W. R., J. M. MUNITA, C. A. ARIAS (2014): Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert. Rev. Anti-Infe.* 12, 1221-1236.

MOHR, J. F., L. V. FRIEDRICH, S. YANKELEV, K. C. LAMP (2009): Daptomycin for the treatment of enterococcal bacteraemia: results from the Cubicin Outcomes Registry and Experience (CORE). *Int. J. Antimicrob. Ag.* 33, 543–548.

MUNITA, J. M., C. A. ARIAS, B. E. MURRAY (2012): Enterococcal endocarditis: can we win the war? *Curr. Infect. Dis. Rep.* 14, 339-349.

MURDOCH, D. R., G. R. COREY, B. HOEN, J. M. MIRÓ, V. G. FOWLER JR, A. S. BAYER, A. W. KARCHMER, L. OLAISON, P. A. PAPPAS, P. MOREILLON, S. T. CHAMBERS, V. H. CHU, V. FALCÓ, D. J. HOLLAND, P. JONES, J. L. KLEIN, N. J. RAYMOND, K. M. READ, M. F. TRIPODI, R. UTILI, A. WANG, C. W. WOODS, C. H. CABELL (2009): Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Pro prospective Cohort Study. *JAMA Intern. Med.* 169, 463–473.

- MURRAY, B. E. (2000): Vancomycin-resistant enterococcal infections. *New Engl. J. Med.* 342, 710–721.
- NAM, H. M., S. K. LIM, J. S. MOON, H. M. KANG, J. M. KIM, K. C. JANG, J. M. KIM, M. I. KANG, Y. S. JOO, S. C. JUNG (2010): Antimicrobial resistance of enterococci isolated from mastitic bovine milk samples in Korea. *Zoonoses Public Health.* 57, 59-64.
- NGBEDE, E. O., M. A. RAJI, C. N. KWANASHIE, J. K. P. KWAGA (2017): Antimicrobial resistance and virulence profile of enterococci isolated from poultry and cattle sources in Nigeria. *Trop. Anim. Health Pro.* 49, 451–458.
- NIEBEL, M., J. QUICK, A. M. PRIETO, R. L. HILL, R. PIKE, D. HUBER, M. DAVID, M. HORNSEY, D. WAREHAM, B. OPPENHEIM, N. WOODFORD, W. VAN SCHAİK, N. LOMAN (2015): Deletions in a ribosomal protein-coding gene are associated with tigecycline resistance in *Enterococcus faecium*. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 46, 572–575.
- NOMURA, T., K. TANIMOTO, K. SHIBAYAMA, Y. ARAKAWA, S. FUJIMOTO, H. IKE, H. TOMITA (2012): Identification of VanN-type vancomycin resistance in an *Enterococcus faecium* isolate from chicken meat in Japan. *Antimicrob. Agents. Ch.* 56, 6389-6392.
- NORRBY, R. (2001): Linezolid - a review of the first oxazolidinone. *Expert Opin. Pharmaco.* 2, 293-302.
- NORRIS, A. H., J. P. REILLY, P. H. EDELSTEIN, P. J. BRENNAN, M. G. SCHUSTER (1995): Chloramphenicol for the treatment of vancomycin-resistant enterococcal infections. *Clin. Infect. Dis.* 20, 1137–1144.
- NOWAKIEWICZ, A., P. ZIĘBA, S. GNAT, A. TROŚCIAŃCZYK, M. OSIŃSKA, D. ŁAGOWSKI, U. KOSIOR-KORZECKA, I. PUZIO (2020): A significant number of multi-drug resistant *Enterococcus faecalis* in wildlife animals; long-term consequences and new or known reservoirs of resistance? *Sci. Total Environ.* 705, 135830.
- OSSIPRANDI, M., C., L. ZERBINI (2015): Antimicrobial Susceptibility of Enterococcal Species Isolated from Italian Dogs. *U: Antimicrobial Resistance - An Open Challenge In Tech. Rijeka.* 1399–1402.

OTEO, J., O. CUEVAS, C. NAVARRO, B. ARACIL, J. CAMPOS (2007): Trends in antimicrobial resistance in 3469 enterococci isolated from blood (EARSS experience 2001–06, Spain): increasing ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chemoth.* 59, 1044-1045.

OYAMADA, Y., H. ITO, M. INOUE, J.-I. YAMAGISHI (2006): Topoisomerase mutations and efflux are associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. *J. Med. Microbiol.* 55, 1395–1401.

PALMER, K. L., A. DANIEL, C. HARDY, J. SILVERMAN, M. S. GILMORE (2011): Genetic basis for daptomycin resistance in enterococci. *Antimicrob. Agents. Ch.* 55, 3345-3356.

PÉREZ-GARCÍA, A., J. J. BEUNZA, A. GEA, M. F. LANDECHO, E. MAULEÓN, J. L. DEL POZO (2015): Predictores de mortalidad y mal pronóstico en el paciente oncológico con bacteriemia enterocócica. In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. Vol. 38, No. 1, Gobierno de Navarra. Departamento de Salud, str. 71-77.

PINTARIĆ, S., B. ŠEOL MARTINEC (2018): Rezistencija enterokoka na antibiotike i preporuke za liječenje. *Veterinarska stanica.* 49, 105-116.

POETA, P., D. COSTA, J. RODRIGUES, C. TORRES (2006): Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 27, 131–137.

PRABAKER, K., R. A. WEINSTEIN (2011): Trends in antimicrobial resistance in intensive care units in the United States. *Curr. Opin. Crit. Care* 17, 472–479.

PTIČEK SIROČIĆ, A., S. KOVAČ, A. HAJDINJAK (2018): Korelacijska analiza pokazatelja kakvoće vode jezera Motičnjak. *Hrvatske vode.* 26, 203-210.

REPAC ANTIĆ, D., I. GOBIN, G. BEGIĆ, M. ABRAM (2018): Fenotipska karakterizacija i antimikrobni profil uropatogenih enterokoki. *Medicina Fluminensis.* 54, 304–311.

RIDENHOUR, M. B., H. M. FLETCHER, J. E. MORTENSEN, L. DANEO-MOORE (1996): A Novel Tetracycline-Resistant Determinant, tet(U), Is Encoded on the Plasmid pKQ10 in *Enterococcus faecium*. *Plasmid.* 35, 71-80.

RINCE, A., S. FLAHAUT, Y. AUFRAY (2000): Identification of general stress genes in *Enterococcus faecalis*. Int. J. Food Microbiol. 55, 87-91.

ROBERTS, M. C. (2005): Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiol. Lett. 245, 195-203.

RODRIGUES, J., P. POETA, A. MARTINS, D. COSTA (2002): The importance of pets as reservoirs of resistant *Enterococcus* strains, with special reference to vancomycin. J. Vet. Med. B. 49, 278-280.

ROGÓŻ, W., D. SYPNIEWSKI, I. BEDNAREK (2019): Analysis of Selected Genetic Traits, Phenotypes, and the Epidemiological Threat of *Enterococcus* Bacteria Resistant To Vancomycin. Postępy Mikrobiol. - Adv. Microbiol. 58, 35–48.

RUBINSTEIN E., D. VAUGHAN (2005): Tigecycline: a novel glycycline. Drugs. 65, 1317–1336.

SABOL, K., J. E. PATTERSON, J. S. LEWIS II, O. AARON, J. CADENA, J. H. JORGENSEN (2005): Emergence of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy. Antimicrob. Agents. Ch. 49, 1664–1665.

SAFDAR, A., C. S. BRYAN, S. STINSON, D. E. SAUNDERS (2002): Prosthetic valve endocarditis due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: treatment with chloramphenicol plus minocycline. Clin. Infect. Dis. 34, 61–63.

SAID, H. S., E. S. ABDELMEGEED (2019): Emergence of multidrug resistance and extensive drug resistance among enterococcal clinical isolates in Egypt. Infection and Drug Resistance. 12, 1113.

SAID, M. S., E. TIRTHANI, E. LESHU (2021): *Enterococcus* Infections. StatPearls. Treasure Island: StatPearls Publishing. 2022 Jan. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567759/>

SAITO, H. E., J. R. HARP, E. M. FOZO (2014): Incorporation of exogenous fatty acids protects *Enterococcus faecalis* from membrane-damaging agents. Appl. Environ. Microbiol. 80, 6527–6538.

SCAPELLATO, P. G., C. ORMAZABAL, J. L. SCAPELLATO, E. G. BOTTARO (2005): Meningitis due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* successfully treated with

combined intravenous and intraventricular chloramphenicol. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3578–3579.

SCHWARZ, S., C. KEHRENBERG, B. DOUBLET, A. CLOECKAERT (2004): Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 519–542.

SEDLÁČEK, I., HOLOCHOVÁ P., MAŠLAŇOVÁ I., KOSINA M., SPRÖER C., BRYNDOVÁ H., P. VANDAMME, I. RUDOLF, Z. HUBÁLEK, P. ŠVEC (2013): *Enterococcus ureilyticus* sp. nov. and *Enterococcus rotai* sp. nov. two novel urease producing enterococci from the environment. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 63, 502–510.

SELLECK, E. M., D. VAN TYNE, M. S. GILMORE (2019): Pathogenicity of enterococci. *Microbiology spectrum.* 7, 1-10.

SILVERMAN, J. A., N. G. PERLMUTTER, H. M. SHAPIRO (2003): Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Ch.* 47, 2538-2544.

SINGH, K. V., B. E. MURRAY (2005): Differences in the *Enterococcus faecalis* *lsa* locus that influence susceptibility to quinupristin-dalfopristin and clindamycin. *Antimicrob. Agents. Ch.* 49, 32–39.

SINGH, K. V., G. M. WEINSTOCK, B. E. MURRAY (2002): An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (*Lsa*) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob. Agents. Ch.* 46, 1845-1850.

SWAMINATHAN, S., G. J. ALANGADEN (2010): Treatment of resistant enterococcal urinary tract infections. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 12, 455–464.

SWARTLEY, J. S., C. F. MCALLISTER, R. A. HAJJEH, D. W. HEINRICH, D. S. STEPHENS (1993): Deletions of Tn916-like transposons are implicated in *tetM*-mediated resistance in pathogenic *Neisseria*. *Mol. Microbiol.* 10, 299–310.

SZALUŚ-JORDANOW, O., M. STABIŃSKA-SMOLARZ, M. CZOPOWICZ, A. MOROZ, M. MICKIEWICZ, A. ŁOBACZEWSKI, D. CHROBAK-CHMIEL, M. KIZERWETTER-ŚWIDA, M. RZEWUSKA, R. SAPIERZYŃSKI, M. GRZEGORCZYK (2021): Focused

Cardiac Ultrasound Examination as a Tool for Diagnosis of Infective Endocarditis and Myocarditis in Dogs and Cats. *Animals*. 11, 3162.

ŠEOL, B., K. MATANOVIĆ, S. TERZIĆ (2010): Antimikrobna terapija u veterinarskoj medicini. Medicinska naklada. Zagreb.

ŠEPUTIENE, V., A. BOGDAITE, M. RUŽAUSKAS, E. SUŽIEDELIENE (2012): Antibiotic resistance genes and virulence factors in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from diseased farm animals: Pigs, cattle and poultry. *Pol. J. Vet. Sci.* 15, 431–438.

ŠVEC, P., M. VANCANNEYT, I. SEDLÁČEK, S. M. NASER, C. SNAUWAERT, K. LEFEBVRE, B. HOSTE, J. SWINGS (2006): *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 56, 577–581.

TAMBIĆ ANDRAŠEVIĆ, A., M. GUŽVINEC, A. BUKOVAC, S. LUCIĆ, S. ŠOPREK (2015): Uspon i pad rezistentnih bakterija. *Infektološki Glasnik*. 35, 89–96.

TAMBIĆ ANDRAŠEVIĆ, A., T. TAMBIĆ, V. KATALINIĆ-JANKOVIĆ, L. ŽMAK, M. OBROVAC, M. PAYER PAL, D. DEBELEC, S. BUKOVSKI, B. HUNJAK, A. BABIĆ-ERCEG, T. UNUKIĆ, A. PEJNOVIĆ, A. BUDIMIR, Z. BOŠNJAK, Z. HERLJEVIĆ, A. STADNIK, V. PLEČKO, I. BUTIĆ, S. ŠOPREK, S. LUCIĆ (2017): Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2016. g.

TAMBIĆ ANDRAŠEVIĆ, A., T. TAMBIĆ, L. ŽMAK, M. OBROVAC, P. P. MARINA, D. DEBELEC, S. BUKOVSKI, B. HUNJAK, T. UNUKIĆ, S. BOŠNJAK, A. BABIĆ-ERCEG, I. BUTIĆ, S. ŠOPREK, I. PRISTAŠ, S. LUCIĆ (2018): Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2017. g. Antibiotic resistance in Croatia 2017.

TAMBIĆ ANDRAŠEVIĆ, A., T. TAMBIĆ, L. ŽMAK, M. OBROVAC, M. P. PAL, S. BUKOVSKI, B. HUNJAK, S. BOŠNJAK, A. BABIĆ-ERCEG, I. BUTIĆ, S. ŠOPREK, I. PRISTAŠ, S. LUCIĆ (2020): Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2019. g. *Akad. Med. Znan. Hrvat.*

TORRES, C., C. A. ALONSO, L. RUIZ-RIPA, R. LEÓN-SAMPEDRO, R. DEL CAMPO, T. M. COQUE (2018): Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiology spectrum*. 6, 6-4.

TROŚCIAŃCZYK, A., A. NOWAKIEWICZ, S. GNAT, D. ŁAGOWSKI, M. OSIŃSKA (2021): Are dogs and cats a reservoir of resistant and virulent *Enterococcus faecalis* strains and a potential threat to public health? J. Appl. Microbiol. 131, 2061-2071.

TU, Y., D. R. MCCALLA (1975): Effect of activated nitrofurans on DNA. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis. 402, 142-149.

TUMPA, A., B. ŠEOL MARTINEC, Z. ŠTRITOF, S. PINTARIĆ (2021a): Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* strains isolated from clinical samples of cats and dogs. 2nd International Conference on “Theme: Recent Advancements in Treatment, Control and Elimination of Infectious Diseases”. Washington, SAD, str. 30-30.

TUMPA, A., Z. ŠTRITOF, S. PINTARIĆ (2021b): Incidence of infections caused by *Enterococcus* spp. in animals. 9th International Congress Veterinary Science and Profession - Book of Abstracts. Zagreb, Croatia, str. 55-55.

UTTLEY, A. H. C., C. H. COLLINS, J. NAIDOO, R. C. GEORGE (1988): Vancomycin-resistant enterococci. Lancet. 57–58.

VALLEDOR, S. J. D., C. M. DIOSO, J. E. V. BUCHELI, Y. J. PARK, D. H. SUH, E. S. JUNG, B. KIM, W. H. HOLZAPFEL, S. D. TODOROV (2022): Characterization and safety evaluation of two beneficial, enterocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from kimchi, a Korean fermented cabbage. Food Microbiol. 102, 103886.

VAN LOON, A. C., L. J. LOCQUET, L. BOSSELER, F. MORTIER, D. PAEPE, P. M. SMETS (2020): Infective vegetative endocarditis of the mitral, aortic, and pulmonary valves due to *Enterococcus hirae* in a cat with a ventricular septal defect. J. Vet. Cardiol. 30, 69-76.

VELA, A. I., A. FERNÁNDEZ, B. MORENO, A. CASAMAYOR, G. CHACÓN, A. VILLA, J. COMENGE, J. F. FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL (2010): Isolation of *Enterococcus hirae* from suckling rabbits with diarrhoea. Vet. Rec. 167, 345.

VMP, Popis veterinarsko-medicinskih proizvoda (2022): Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane. Ministarstvo poljoprivrede. www.veterinarstvo.hr/default.aspx?id=140

VODNICA-MARTUCCI, M., M. KRILANOVIĆ (2019): Antimikrobna rezistencija u Dubrovačko-neretvanskoj županiji. Vjesnik Zavoda za javno zdravstvo Dubrovačko-neretvanske županije. 51, 6-11.

VUKUŠIĆ, N., N. ZDOLEC (2020): The effect of enterococcal bacteriocins on selected foodborne pathogens. Veterinarska stanica. 51, 139-143.

WANG, Y., Y. LV, J. CAI, S. SCHWARZ, L. CUI, Z. HU, R. ZHANG, J. LI, Q. ZHAO, T. HE, D. WANG (2015): A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. J. Antimicrob. Chemoth. 70, 2182-2190.

WARDENBURG, K. E., R. F. POTTER, A. W. D'SOUZA, T. HUSSAIN, M. A. WALLACE, S. ANDLEEB, C. A. D. BURNHAM, G. DANTAS (2019): Phenotypic and genotypic characterization of linezolid-resistant *Enterococcus faecium* from the USA and Pakistan. J. Antimicrob. Chemoth. 74, 3445-3452.

WEESE, J. S., J. BLONDEAU, D. BOOTHE, L. G. GUARDABASSI, N. GUMLEYG, M. PAPICHH, L. R. JESSENI, M. LAPPINJ, S. RANKIN, J. L. WESTROPP, J. SYKES (2021): International Society for Companion Animal Infectious Diseases (ISCAID) guidelines for the diagnosis and management of bacterial urinary tract infections in dogs and cats. J. Jpn. Ass. Vet. Nephrology and Urology. 13, 46-63.

WEINER, L. M., A. K. WEBB, B. LIMBAGO, M. A. DUDECK, J. PATEL, A. J. KALLEN, J. R. EDWARDS, D. M. SIEVERT (2016): Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. Infect. Cont. Hosp. Ep. 37, 1288–1301.

WERNER, G., T. M. COQUE, A. M. HAMMERUM, R. HOPE, W. HRYNIEWICZ, A. JOHNSON, I. KLARE, K. G. KRISTINSSON, R. LECLERCQ, C. H. LESTER, M. LILLIE, C. NOVAIS, B. OLSSON-LILJEQUIST, L. V. PEIXE, E. SADOWY, G. S. SIMONSEN, J. TOP, J. VUOPIO-VARKILA, R. J. WILLEMS, W. WITTE, N. WOODFORD (2008): Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. Eurosurveillance. 13, 19046.

WERNER, G., C. FLEIGE, B. EWERT, J. A. LAVERDE-GOMEZ, I. KLARE, W. WITTE (2010): High-level ciprofloxacin resistance among hospital-adapted *Enterococcus faecium* (CC17). *Int. J. Antimicrob. Ag.* 35, 119–125.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2017): Preuzeto s: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (pristupljeno: 9. studenoga 2021.)

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2019): Critically important antimicrobials for human medicine (6th revised ed.). Geneva: World Health Organization.

WIJMA, R. A., A. HUTTNER, B. C. KOCH, J. W. MOUTON, A. E. MULLER (2018): Review of the pharmacokinetic properties of nitrofurantoin and nitroxoline. *J. Antimicrob. Chemoth.* 73, 2916-2926.

WILLIS, A. T., K. G. MAGDESIAN, B. A. BYRNE, J. M. EDMAN (2019): *Enterococcus* infections in foals. *Vet. J.* 248, 42-47.

ZAHEER, R., S. R. COOK, R. BARBIERI, N. GOJI, A. CAMERON, A. PETKAU, R. O. POLO, L. TYMENSEN, C. STAMM, J. SONG, S. HANNON (2020): Surveillance of *Enterococcus* spp. reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One-Health continuum. *Sci. Rep.* 10, 1-16.

ZDOLEC, N., T. BOGDANOVIĆ, J. GRBAVAC (2022): Biogenic Amine Content in Retailed Cheese Varieties. *Produced.* 1–10.

ZDOLEC, N., T. BOGDANOVIĆ, V. PAŽIN, V. ŠIMUNIĆ-MEŽNARIĆ, N. MARTINEC, J. M. LORENZO (2020): Control of biogenic amines in dry sausages inoculated with dairy-originated bacteriocinogenic *Enterococcus faecalis* ef-101. *Vet. Arhiv.* 90, 77–85.

ZDOLEC, N., V. DOBRANIĆ, I. BUTKOVIĆ, A. KOTURIĆ, I. FILIPOVIĆ, V. MEDVID (2016): Osjetljivost na antimikrobne tvari bakterija izdvojenih iz mlijeka zdravih i liječenih vimena krava. *Vet. Arhiv.* 86, 163–172.

ZHANG, Y., L. WANG, C. ZHOU, Y. LIN, S. LIU, W. ZENG, K. YU, T. ZHOU, J. CAO (2021): Unraveling mechanisms and epidemic characteristics of nitrofurantoin resistance in uropathogenic *Enterococcus faecium* clinical isolates. *Infect. Drug Resist.* 14, 1601-1611.

ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Andrea Tumpa rođena je 10. siječnja 1991. godine u Zagrebu. Nakon završene V. gimnazije (prirodoslovno-matematička) u Zagrebu, 2009. godine upisala je Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu, smjer medicinska biokemija. Diplomirala je 2014. godine i stekla titulu magistra medicinske biokemije. Tijekom studija sudjelovala je u radu dviju studentskih udruga, u timovima odgovornim za organizaciju predavanja, radionica i laboratorijskih vježbi iz kemije i mikrobiologije te promociju znanosti.

Nakon završetka studija, godinu dana radila je u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku i položila je državni stručni ispit. Od 1. travnja 2016. godine zaposlena je kao asistentica na Zavodu za kemiju i biokemiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od tada aktivno sudjeluje u izvođenju praktičnog dijela nastave integriranog preddiplomskog i diplomskog studija veterinarske medicine na predmetima Biokemija u veterinarskoj medicini i Veterinarska laboratorijska dijagnostika. Sudjeluje u izvođenju nastave na hrvatskom i engleskom jeziku. Osim rada u nastavi, od ak. god. 2016./2017. pohađa Doktorski studij iz veterinarskih znanosti.

U zimskom semestru ak. god. 2019./2020. provela je tri mjeseca na Sveučilištu u Cardiffu, stipendijom British Scholarship Trust. Krajem 2019. godine započela je edukaciju u bakteriološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom u svrhu izrade doktorske disertacije. Tijekom dokorskog studija sudjelovala je u desetak radionica i četiri ljetne škole, a dodatno se obrazovala u području kliničke biokemije, proteomike, molekularne biologije, radu sa staničnim kulturama i laboratorijskim metodama u molekularnoj biologiji. Kao autor i koautor objavila je 7 znanstvenih radova.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA:

TUMPA, A., B. ŠEOL MARTINEC, Z. ŠTRITOF, S. PINTARIĆ (2021): Comparison of species-specific multiplex PCR and API 20 Strep for the identification of veterinary clinical *Enterococcus* isolates. *Acta Microbiol. Imm. H.* 68, 124-124.

TUMPA, A., Z. ŠTRITOF, S. PINTARIĆ (2021): Incidence of infections caused by *Enterococcus* spp. in animals. 9th International Congress Veterinary Science and Profession - Book of Abstracts, 9 October, Zagreb, Croatia, str. 55-55.

TUMPA, A., B. ŠEOL MARTINEC, Z. ŠTRITOF, S. PINTARIĆ (2021): Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* strains isolated from clinical samples of cats and dogs. 2nd International Conference on "Theme: Recent Advancements in Treatment, Control and Elimination of Infectious Diseases, 05-06 March, Washington, SAD, str. 30-30.

TUMPA, A., i R. BARIĆ RAFAJ (2020): Koagulacijske pretrage u veterinarskoj medicini. *Veterinarska stanica.* 51, 238185, 18.

TUMPA, A., i R. BARIĆ RAFAJ (2019): Metabolički poremećaji i upala u pretilih pasa, mačaka, konja i goveda. *Veterinarska stanica.* 50, 481-494.

TVARIJONAVICIUTE, A., R. BARIĆ-RAFAJ, A. HORVATIĆ, A. MUÑOZ-PRIETO, N. GUILLEMIN, E. LAMY, A. TUMPA, J. CERON, S. MARTINEZ-SUBIELA, V. MRLJAK (2019): Identification of changes in serum analytes and possible metabolic pathways associated with canine obesity-related metabolic dysfunction. *Vet. J.* 244, 51-59.

AGHAZADEH ARDEBILI, A., G. GAJSKI, L. JURECSKA, M. KIŠ, A. TUMPA (2019): PlantPower – Phytoremediation of Contaminated Soils in Former Minefields of the Western Balkan Area. *Danube:Future Interdisciplinary School 2017 Proceedings: Cultural and social implications of global change on the Danube river basin.* Hanus, Christian; Steiner, Gerald (ur.). Krems, Austria: Danube University Krems, 2019. str. 78-89.

BARIĆ RAFAJ, R., A. TUMPA, P. BILIĆ, J. GOTIĆ, V. MRLJAK (2018): Thrombocytopenia in dogs with babesiosis – the role of extracellular histones. *Platelets 2018, 10th International Symposium, 21-25 April, Tel Aviv, Izrael, str. 1-1*

BARIĆ RAFAJ, R., J. KULEŠ, A. MARINCULIĆ, A. TVARIJONAVICIUTE, J. CERON, Ž. MIHALJEVIĆ, A. TUMPA, V. MRLJAK (2017): Plasma markers of inflammation and hemostatic and endothelial activity in naturally overweight and obese dogs. BMC Vet. Res. 13, 13-1.

TUMPA, A., I. BARŠIĆ, D. ROGIĆ (2016): Arterijska krv kao uzorak za mjerenje elektrolita i metabolita na POCT uređajima. Knjiga sažetaka - LOKUS 2016, 08-09 April, Tuheljske Toplice, Hrvatska, str. 70-70.

TUMPA, A. (2014): Optimizacija metode izolacije makrolidnih antibiotika u medu. Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska