

ISSN 2744-1229

Jun 2022 Vol. 1



ZBORNIK RADOVA iz "Laboratorijske dijagnostike"

Komora medicinsko-laboratorijskih dijagnostičara FBiH

**Glavni urednik**

Doc. dr. sc. Amir Ibrahimagić

Redakcioni odbor

Alisa Prešić-Abduzaimović (BiH)

Sedina Omeragić (BiH)

Jasmina Kišija-Bajrić (BiH)

Jasminka Talapko (Hrvatska)

Sanela Hajro (BiH)

Berina Haračić (BiH)

Zijada Smailagić (BiH)

Mirjana Stupnišek (Hrvatska)

Esad Burgić (BiH)

Dženana Gušić (BiH)

Enver Ivanković (BiH)

Harisa Šido (BiH)

Ljiljana Benković (BiH)

Aida Mujičić (BiH)

Dženisa Čajić (BiH)

Magdalena Perić (Hrvatska)

Lejla Hasanbegović (BiH)

Lejla Tatlić (BiH)

Emina Muftić (BiH)

Amel Salkić (BiH)

Savka Petrić (BiH)

Emina Smajić (BiH)

Farah Kamberović (Španija)

Elma Salihović (BiH)

Vedina Kučuković (BiH)

Nemanja Jovičić (BiH)

Aleksandra Pašić (BiH)

Sekretar

Sanela Hajro

Zbornik radova Komore medicinsko-

laboratorijskih dijagnostičara FBiH

Adresa Komore:

Čekaluša 90

71000 Sarajevo, BiH

Adresa predsjednika:

Fra Ivana Jukića 2

72000 Zenica, BiH

0038761/614-147

www.kmldfbih.ba

[E-mail: kmldfbih2020@gmail.com](mailto:kmldfbih2020@gmail.com)

Poštovane i uvažene kolegice i kolege,

Komora medicinsko - laboratorijskih dijagnostičara FBiH formirana je kao prva matična Komora diplomiranih inženjera medicinsko-laboratorijske dijagnostike još davne 2010. godine i danas okuplja preko 200 članova svih nivoa obrazovanja (od I ciklusa dipl. ing. MLD do III ciklusa Doktora nauka laboratorijske djelatnosti).

Studenti, članovi Komore, pa i članovi drugih komora i udruženja imaju priliku pisati, pokazati i predočiti svoja stručna i naučno – stručna djela. Zbornik obuhvata teme iz različitih laboratorijskih djelatnosti i to: biohemijsko-hematoloških, mikrobioloških, imunoloških, citoloških, patohistoloških, transfuzioloških, bromatoloških, veterinarskih i drugih djelatnosti.

Danas smo svjedoci jačanja i promovisanja digitalizacije radi situacije u kojoj se planeta Zemlja našla, te će nam prvi Zbornik iz laboratorijske dijagnostike biti poveznica informisanja svih inovativnih stručnih i naučno-stručnih zbivanja u zajednici.

SADRŽAJ

1. Ispitivanje antibakterijske aktivnost različitih vrsta meda na bakterijskim vrstama <i>Streptococcus oralis</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> i <i>Staphylococcus aureus</i> Jasminka Talapko, Martina Juzbašić, Andrea Srb Milostić, Dubravka Holik, Stana Pačarić, Ivana Škrlec	1
2. <i>Escherichia coli</i> kao ljudski patogen Rusmira Hasandić - Mehmedagić	14
3. Uputstvo za autore	25



ISPITIVANJE ANTIBAKTERIJSKE AKTIVNOST RAZLIČITIH VRSTA MEDA NA BAKTERIJSKIM VRSTAMA *STREPTOCOCCUS ORALIS*, *STREPTOCOCCUS PYOGENES* I *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Talapko Jasminka, Juzbašić Martina, Srb Milostić Andrea, Holik Dubravka,
Pačarić Stana, Škrlec Ivana
Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek, Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku, Hrvatska

Sažetak

Oralni mikrobiom sastoji se od populacija bakterija koje održavaju ravnotežu potencijalno patogenih bakterija i utječu na oralno i opće zdravlje pojedinca. Med djeluje antimikrobno protiv brojnih vrsta bakterija, ali to varira ovisno o botaničkim i geografskim područjima. Cilj je bio ispitati antimikrobno djelovanje različitih uzoraka pčelinjeg meda na sojevima bakterija *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pyogenes* i *Staphylococcus aureus* metodom razrjeđivanja u agar-gelu. Med od kestena imao je najveće antimikrobno djelovanje na *Streptococcus pyogenes* i *Staphylococcus aureus*, dok su cvjetni i bagremov med pokazali istovjetno antimikrobno djelovanje na *Streptococcus oralis*. Dokazali smo da uzorci meda mogu imati antibakterijsko djelovanje na testirane bakterijske vrste, što bi nedvojbeno moglo činiti osnovu alternativnog pristupa u liječenju infekcija uzrokovanih određenim oralnim patogenima. Unatoč tome, opravdana su daljnja ispitivanja na temelju kojih bi se procijenila točna učinkovitost *in vivo*, osobito kada se uzmu u obzir biofilmovi i miješane infekcije.

1.UVOD

Autor za korespondenciju:

*Doc. dr. sc. Jasminka Talapko,
dipl. ing. MLD
Fakultet za dentalnu medicinu i
zdravstvo Osijek,
Crkvena 21, 31 000 Osijek,
Republika Hrvatska
E-mail: jtalapko@fdmz.hr*



Oralna mikrobiota sastoji se od komenzalnih populacija bakterija koje održavaju ravnotežu potencijalno patogenih bakterija kroz različite mehanizme (1). Ove mikrobne zajednice i njihove višestruke sinergističke i antagonističke interakcije utječu na oralno i opće zdravlje pojedinca (2). Usna šupljina i nazofarinks su regije koje se mogu smatrati anatomskim prijelazom između vanjskog i unutarnjeg okruženja (3). U oralnom biofilmu te bakterije tvore zajednicu koja tada djeluje kao barijera protiv antibiotika, antiseptika, dezinficijensa i mehaničkog uklanjanja (4). Također, bakterije unutar biofilma su tisuću puta otpornije na antibiotike od planktonskih (tj. slobodnoživućih)



mikroorganizama (5). Uočava se porast potencijalno štetnih bakterija u biofilmu kada je oralna higijena neprikladna, što pridonosi razvoju kronične infekcije (6,7). Štoviše, u biofilmu bakterije mogu zaobići imunološki sustav proizvodeći takozvane superantigene (8). Ipak, poznavanje specifičnog ponašanja i obrazaca osjetljivosti na antibiotike planktonskih bakterija koje se mogu izlučiti iz biofilma je vrlo važno ako se želimo sveobuhvatno pozabaviti ovim važnim pitanjem. Bakterija *Streptococcus oralis* (*S. oralis*) ima značajnu ulogu u oralnoj mikroflori. Sudjeluje u stvaranju dentalnog biofilma, primarnog etiološkog čimbenika karijesa i parodontalnih bolesti (9), a pripada mitis skupini streptokoka viridans. *S. oralis* otporan je na određene sintetičke antibiotike koji se rutinski propisuju u praksi dentalne medicine, poput penicilina, makrolida i tetraciklina (10). Opisan je slučaj imunodeficijencije kod koje je *S. oralis* izazvao meningitis uslijed kirurškog stomatološkog zahvata (11). *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*, također poznat kao beta-hemolitički streptokok grupe A) je uzročnik mnogih ljudskih bolesti i odgovoran je za 24% upala grla u dojenčadi, 37% svih upala grla u bolesnika mlađih od 16 godina i 5 do 15% u odraslih (12). *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) može uzrokovati razne oralne infekcije (npr. angularni heilitis, stafilokokni mukozitis) (13). U novije vrijeme, ovaj mikroorganizam je također povezan s odbacivanjem dentalnih implantata (14). Nadalje, istraživanja su pokazala da je *S. aureus* dominantan dio oralne flore, dok prisutnost uklonjivih proteza i proteza

predstavlja značajan čimbenik povećane prevalencije (15). Također, *S. aureus* je jedan od dominantnih oralnih patogena kod starijih kroničnih bolesnika, kao i kod bolesnika na intenzivnoj njezi (16). Pčelinjem medu se od davnina pripisuju ljekovita svojstva (17). Van Ketel je antibakterijsko djelovanje meda prepoznao još 1892. godine, dok su brojne studije pokazale antimikrobno djelovanje meda na rast određenih patogenih mikroorganizama (18). Ipak, stajališta istraživača imaju tendenciju da se razlikuju; dok jedni vjeruju da glavna antimikrobna aktivnost potječe od pčela, drugi smatraju da antimikrobna svojstva ovise o komponentama povezanim s medom koje se odnose na floru iz koje se med dobiva (19). Neki su autori zaključili da med od određenih biljaka ima značajniji antibakterijski učinak od drugih. Također se pokazalo da mogu postojati značajne razlike u aktivnosti različitih uzoraka iz istog biljnog izvora (20). Na temelju trenutno dostupnih istraživanja, nekoliko autora zaključilo je da su glavni antimikrobni čimbenici meda katalaza, razina vodikovog peroksida i glukoza oksidaza. Neperoksidni čimbenici kao što su lizozim, fenolne kiseline i flavonoidi mogu doprinijeti antimikrobnim svojstvima meda (20). Flavonoidi imaju antioksidativno i antimikrobno djelovanje. Najčešći flavonoidi koji se nalaze u medu su pinocembrin, apigenin, kempferol, kvercetin, galangin, krizin, pinobanksin, luteolin i hesperetin (21).



2. CILJ RADA

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati antimikrobno djelovanje različitih uzoraka pčelinjeg meda na sojevima bakterija *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pyogenes* i *Staphylococcus aureus*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Bakterijski sojevi

Ovo istraživanje je provedeno na tri bakterijska soja i to na ATCC 10557 (*American Type Culture Collection*) *S. oralis*, dok su *S. pyogenes* (beta-hemolitički streptokok skupine A) i *S. aureus* sojevi dobiveni iz kliničkih uzoraka. Dio su zbirke bakterijskih sojeva u Laboratoriju za mikrobiologiju, Fakulteta za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek (Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku). Soj *S. pyogenes* potvrđen je prema CLSI standardu, pripravku obojenom po Gramu i bacitracinskim testom gdje je zona inhibicije > 15 mm bila prisutna oko diska bacitracina (10 µg) (Bio-Rad Laboratories, Inc., California, Sjedinjene Američke države). Soj *S. aureus* potvrđen je testom katalaze s 3% H₂O₂ i DNK testom provedenim na hranilištu koje sadrži 0,2% DNK (Certifikat, Vukovar, Hrvatska).

3.1.2. Uzorci meda

Testirana su tri uzorka meda dobivena od istog lokalnog proizvođača (Tabela 1), koji su bili pohranjeni na sobnoj

temperaturi u mraku do upotrebe za antimikrobna ispitivanja. Med je razrijeđen sterilnom destiliranom vodom do koncentracija: 75% v/v, 50% v/v i 25% v/v. Točnije, za dobivanje 75% otopine meda (v/v), ukupno 0,75 ml specifičnog meda je razrijeđeno u 0,25 ml sterilizirane destilirane vode. Dodana su serijska razrjeđenja od po 0,5 ml, kao i od 0,25 ml meda i 0,75 ml sterilne destilirane vode kako bi se dobilo 50% odnosno 25% otopine meda (v/v). Priređene otopine dodane su u jažice u agar gelu.

3.2. Metode

Osjetljivost odabranih bakterijskih sojeva na razne vrste meda ispitana je metodom razrjeđivanja u agar gelu, s jažicama, prema smjernicama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI standardi) (22). Suspenzije bakterijskih sojeva pripravljene su u fiziološkom API suspenzijskom mediju 2 ml (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska), vorteksirane na Vortex V-1 plus (Bio San, Riga, Latvija). Zamućenost je podešena na 0,5 McFarlanda (10⁸ CFU/ml), mjereno na denzitometru DEN 1 McFarland Densitometer (Biosan, Riga, Latvija).

Tako pripravljene suspenzije bakterijskih sojeva *S. oralis* i *S. pyogenes* nanosene su na Müller-Hinton agar s 5% defibrinirane ovčje krvi (Certificat, Vukovar, Hrvatska) sterilnim brisevima (Copan Italia SpA, Brescia, Italija), okrećući ploču za 60° u tri smjera. Suspenzija od 0,5 MF soja *S. aureus* aplicirana je na Müller-Hinton bezkrvni agar (Certifikat, Vukovar, Hrvatska).



Tabela 1. Vrste meda testirane na antimikrobnu aktivnost.

Vrsta meda	Aktivne tvari	Proizvođač
Kestenov med	Vodikov peroksid, metilglioksal, pčelinji defenzin 1	Lokalni proizvođač
Cvjetni med	Vodikov peroksid, metilglioksal, pčelinji defenzin 1	Lokalni proizvođač
Bagremov med	Vodikov peroksid, metilglioksal, pčelinji defenzin 1	Lokalni proizvođač

Za svaki ispitivani soj pripremljena je ploča na koju je uz pomoć sterilnog tipsa izbušeno pet jažica promjera 8 mm. U pripremljenu ploču dodane su različite koncentracije ispitivanih uzoraka meda u količini od 100 μ l. Negativna kontrola bila je sterilna fiziološka otopina, dok je pozitivna kontrola bila benzilpenicilin disk PNG1 1 IU (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, Sjedinjene Države). Pripremljene ploče inkubirane su u aerobnim uvjetima 18-24 sata na temperaturi od 36°C (\pm 1 °C) u aerobnom termostatu (BINDER GmbH, Tuttlingen, Njemačka). Sljedećeg dana ravnalom su mjerene zone inhibicije u milimetrima. Sva ispitivanja i mjerenja obavljena su u triplikatima za svaku koncentraciju i svaku vrstu uzorka meda.

3.3. Statističke analize

Svi rezultati su izraženi kao medijan i interkvartilni raspon (IQR). Kruskal-Wallis test korišten je za određivanje značaja antimikrobnog djelovanja. P vrijednosti jednaka ili manja od 0,05 ukazuje na statistički značajnu razliku.

Sve statističke analize provedene su SPSS statističkim programom (verzija 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

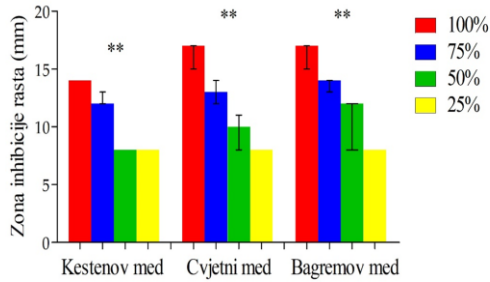
4.1. Rezultati

Testirana su tri uzorka meda u početnoj koncentraciji i nakon razrjeđenja na 75, 50 i 25% (v/v). Rezultati su pokazali značajne varijacije u zonama inhibicije različitih uzoraka meda. Metodom razrjeđivanja u agar gelu dokazano je da su svi testirani uzorci meda imali antimikrobnu učinkovitost na sojevima *S. oralis*, *S. pyogenes* i *S. aureus* (Tabela 2, Slika 1, Slika 2, Slika 3). Međutim, nisu svi ispitani uzorci meda posjedovali antimikrobnu učinkovitost na soj *S. pyogenes* nakon razrjeđivanja na 75% ili manje (Slika 2). Nasuprot tome, med od kestena izgubio je antimikrobnu aktivnost na soju *S. oralis* nakon razrjeđivanja do 50% (Tablica 2, Slika 1).

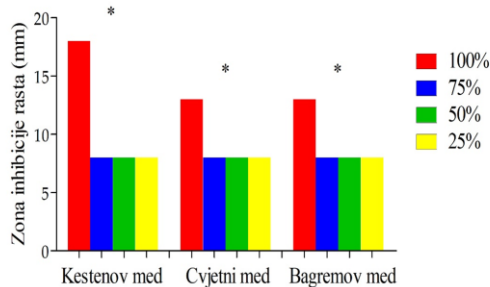


Tabela 2. Zone inhibicije nakon djelovanja različitih vrsta meda na sojevima *S. oralis*, *S. pyogenes*, i *S. aureus* prikazano kao medijan i interkvartilni raspon (IQR).

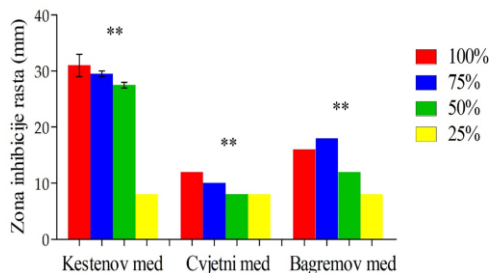
Med	<i>S. oralis</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. aureus</i>
Kestenov med 100%	14 (13-14)	18 (18-18)	31 (29-31)
Kestenov med 75%	12 (12-12)	8 (8-8)	29.5 (29-29.5)
Kestenov med 50%	8 (8-8)	8 (8-8)	27.5 (27-27.5)
Kestenov med 25%	8 (8-8)	8 (8-8)	8 (8-8)
Cvjetni med 100%	17 (15-17)	13 (13-13)	12 (12-12)
Cvjetni med 75%	13 (12-13)	8 (8-8)	10 (10-10)
Cvjetni med 50%	10 (8-10)	8 (8-8)	8 (8-8)
Cvjetni med 25%	8 (8-8)	8 (8-8)	8 (8-8)
Bagremov med 100%	17 (15-17)	13 (13-13)	16 (16-16)
Bagremov med 75%	14 (13-14)	8 (8-8)	18 (18-18)
Bagremov med 50%	12 (8-12)	8 (8-8)	12 (12-12)
Bagremov med 25%	8 (8-8)	8 (8-8)	8 (8-8)
Benzylpenicilin 1 IU	23	33	30



Slika 1. Antimikrobni učinak različitih koncentracija i uzoraka meda na *S. oralis*. Podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. Kruskal-Wallis test ** $p < 0,001$.

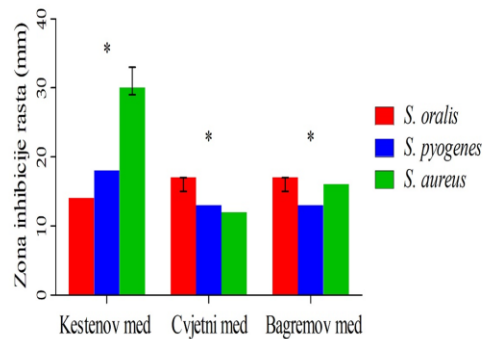


Slika 2. Antimikrobni učinak različitih koncentracija i uzoraka meda na *S. pyogenes*. Podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. Kruskal-Wallis test * $p < 0,05$.



Slika 3. Antimikrobni učinak različitih koncentracija i uzoraka meda na *S. aureus*. Podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. Kruskal-Wallis test ** $p < 0,001$.

Med od kestena imao je veći antimikrobni učinak na *S. aureus* nego na druga dva bakterijska soja. Suprotno tome, najznačajniji antimikrobni učinak na *S. oralis* imao je cvjetni i bagremov med (Slika 4).



Slika 4. Antimikrobna učinkovitost različitih uzoraka meda između *S. oralis*, *S. pyogenes* i *S. aureus*. Podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. Kruskal-Wallis test * $p < 0,05$.



4.2. RASPRAVA

U ovoj *in vitro* studiji ispitana je antibakterijska aktivnost tri uzorka meda lokalnih proizvođača u koncentracijama od 100%, 75%, 50% i 25% mase po volumenu na sojevima *S. oralis*, *S. pyogenes* i *S. aureus*.

Med ima nekoliko svojstava koja pridonose njegovom antimikrobnom djelovanju. Mehanizmi antibakterijskog djelovanja meda temelje se na njegovim fizikalno-kemijskim svojstvima (osmolarnost, viskoznost, pH vrijednost i/ili kiselost) ili kemijskim tvarima prisutnim u njemu (vodikov peroksid, metilglioksal, antimikrobni peptid pčelinjeg porijekla defenzin-1 i fenolni spojevi) (23). Upotreba meda je jednostavna, a određene vrste meda (kao što je Manuka med) pokazuju veliku antimikrobnu aktivnost i potencijal za kliničku primjenu (24). U ovom istraživanju ispitivano je antimikrobno djelovanje tri uzorka meda na *S. oralis*, *S. pyogenes* i *S. aureus*.

Pozitivan antibakterijski učinak meda na te patogene može se prevesti u njegovu kliničku upotrebu kao potpurnu terapiju, npr. u liječenju tonzilofaringitisa (25). Uočili smo da 100% med od bagrema i med od kestena pokazuje maksimalno antimikrobno djelovanje, kao što je prikazano u Tabeli 2. Nije bilo antimikrobnog učinka pri koncentracijama meda od 50% i 25%, što se razlikuje od drugih studija u kojima je ispitivana antimikrobna aktivnost meda (26,27).

Takve razlike u antimikrobnoj učinkovitosti posljedica su različitih vrsta meda, a njihova je učinkovitost promjenjiva. Značajnu ulogu u antimikrobnom djelovanju meda ima

njegovo botaničko podrijetlo i zemljopisni položaj (28). Terapeutski učinak meda rezultat je raznih antioksidativnih molekula, uključujući fenolne spojeve, kao što su fenolne kiseline i flavonoidi (29). Fenolni spojevi dobiveni iz biljnog nektara predloženi su kao bitni čimbenici za neperoksidno antibakterijsko djelovanje meda (23,30). Utvrđeno je da boja meda pozitivno korelira sa sadržajem antioksidansa u medu; točnije, tamniji i neprozirniji uzorci meda učinkovitije inhibiraju rast bakterija u usporedbi sa medom svjetlije boje (31). Kestenov med ima tamnu boju i jak miris te se tradicionalno koristi za liječenje rana zbog visokog sadržaja fenola i flavonoida (32). Također, tamniji med (med od kestena) ima veći sadržaj bjelancevina i enzimsku aktivnost od svjetlijeg meda (bagremov med) (33). Studija Gošliškog i sur. pokazala je da je više polifenola prisutno u medu od kestena (34). Međutim, manji udio polifenola otkriven je u medu od bagrema, što sugerira da su flavonoidi odgovorni za antioksidativna svojstva meda (34). Dakle, tamni med ima bolja antioksidativna svojstva od svijetlog meda. Sve bi to moglo objasniti zašto je u ovoj studiji uočena veća antimikrobna aktivnost kestenovog meda na *S. pyogenes* i *S. aureus* u odnosu na bagremov i cvjetni med. Sve vrste meda imaju posebnu kiselost zbog organskih kiselina koje pridonose okusu meda i njegovom antimikrobnom djelovanju (29). Većina uzoraka meda je kisela (tj. $\text{pH} < 7$). pH cvjetnog meda kreće se između 3,3 i 4,6, dok je med od kestena iznimka, s relativno visokim pH od 5 do 6 (35).



Štoviše, polifenoli su uključeni u inaktivaciju slobodnih radikala, inhibiciju oksidacije kao i stvaranje vodikovog peroksida (28). Vodikov peroksid jedan je od glavnih čimbenika antimikrobnog djelovanja meda, a različite koncentracije u različitim vrstama meda rezultiraju njihovim različitim antimikrobnim djelovanjem (28). Enzim dobiven od pčela, glukoza oksidaza, katalizira oksidaciju glukoze u D-glukono- δ -lakton i vodikov peroksid (28). Neka istraživanja su pokazala da se učinkovitost proizvodnje vodikovog peroksida pomoću glukoza oksidaze povećava s razrjeđivanjem meda zbog olakšanog pristupa enzima supstratu (28,36,37). To bi moglo biti moguće objašnjenje zašto je u ovom istraživanju bagremov med u 75% imao veći antimikrobni učinak na *S. aureus* nego u 100% koncentraciji. Više razine polifenola rezultiraju većom proizvodnjom vodikovog peroksida (28). Tamniji med (kesten) ima višu razinu polifenola i značajniji je proizvođač vodikovog peroksida, dok bagremov med proizvodi oko polovicu količine vodikovog peroksida (36). Strelec i sur. nisu pokazali korelaciju između aktivnosti glukoza-oksidaze i udjela vodikovog peroksida, što znači da aktivnost glukoza-oksidaze nije pouzdan parametar za predviđanje sadržaja vodikovog peroksida u medu (36). Većina antimikrobnih aktivnosti meda ovisi o prisutnosti vodikovog peroksida, osim kada je riječ o Manuka medu (36). Neperoksidno antimikrobno djelovanje meda povezano je s metilglioksalom, posebno u medicinski značajnom Manuka medu (28,29).

Metilglioksal djeluje na bakterije mijenjajući strukturu bakterijskih fimbrija i flagela (28). Međutim, Manuka med, koji ima visok sadržaj metilglioksala, inhibira rast bakterijskih vrsta bez fimbrija i flagela, kao što je *S. aureus* (28). Neka istraživanja su pokazala da su koncentracije metilglioksala veće u kestenovom nego u bagremovom medu (38), što može objasniti poboljšano antimikrobno djelovanje kestenovog meda na *S. pyogenes* i *S. aureus* u usporedbi s antimikrobnim djelovanjem bagremovog meda u ovoj studiji. Koncentracije metilglioksala u kestenovom i cvjetnom medu su slične (38). Stoga metilglioksal nije razlog za uočene razlike u antimikrobnim učincima kestenovog i cvjetnog meda na ispitivane sojeve bakterija u ovom istraživanju. Zanimljivo je da se tijekom skladištenja meda razina metilglioksala zapravo povećava (28). Pčelinji defenzin-1 je protein dobiven iz pčela koji je odgovoran za antimikrobnu učinkovitost meda (28). Pčelinji defenzin-1 proizvod je žlijezda pojedinih pčela, te stoga njegove razine mogu varirati između različitih uzoraka meda (28). Štoviše, pčelinji defenzin-1 sudjeluje u imunološkom odgovoru pčela na kvasac i druge gljivice, kao i na Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije (28). Valachová i sur. pokazali su da cvjetni med ima veću koncentraciju pčelinjeg defenzina-1 od bagremovog meda (39). Međutim, u našem istraživanju dokazano je da bagremov med ima veći antimikrobni učinak na *S. oralis* i *S. aureus*. Istodobno, djelovanje na *S. pyogenes*



identično je djelovanju cvjetnog meda. Poznato je da osim pčelinjeg defenzina-1, bitnu ulogu u antimikrobnom djelovanju meda imaju i druge molekule poput metilglioksala, fenolnih spojeva i vodikovog peroksida.

Med ima širok raspon antimikrobnog djelovanja i obećava kao učinkovito antibakterijsko sredstvo (40). Raznolikost rezultata ispitivanja antimikrobne aktivnosti meda ukazuje na to da nisu svi uzorci meda jednaki i da njihova učinkovitost može biti varijabilna (28). Na modelima miševa, Manuka med je pokazao aktivnost *in vivo* čak i protiv vrlo otpornih bakterijskih sojeva koji proizvode New Delhi metalo-beta-laktamaze (41), dok je usporedni 75% hidrogel meda i hitozana pokazao veću aktivnost zacjeljivanja rana (42). Slijedom toga, *in vivo* studije o upotrebi meda u oralnim infekcijama bit će utemeljene na temeljnim istraživanjima sličnim ovome.

Ova studija ima određena ograničenja. Iako je poznato da je biofilm karakteristično obilježje oralne mikrobiote, istraživanje je provedeno na planktonskim bakterijama; međutim, vjerujemo da ova vrsta pristupa može dati informaciju daljnjim i ciljanijim istraživačkim nastojanjima na oralnim biofilmovima. Nadalje, usporedba rezultata dobivenih metodom razrjeđenja u agar gelu može biti otežana činjenicom da različiti spojevi mogu imati različita svojstva difuzije; usprkos tome, nastojali smo u našem metodološkom pristupu maksimalno očuvati ponovljivost eksperimenata. Konačno, ispitivanjem metodom razrjeđenja u agar gelu utvrdili smo MIC/MBC ispitivanih medova u ovoj studiji.

5. ZAKLJUČCI

Iako su uzorci meda pokazali raznoliku antibakterijsku aktivnost, jedan od važnih nalaza je da se ograničeno, ali učinkovito djelovanje može primijetiti kod soja *S. pyogenes*. Posljedično, takvi rezultati podupiru upotrebu meda kao dodatne terapije za infekcije uzrokovane *S. pyogenes*, npr. tonzilofaringitis. Ipak, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdila *in vivo* aktivnost meda od kestena i meda od bagrema protiv *S. pyogenes*. U svakom slučaju, ovakvi istraživački poduhvati mogli bi pružiti alternativne pristupe liječenju određenih infekcija, dok bi upotreba meda u medicini mogla biti sve prisutnija u budućnosti, što je još jedna opcija u borbi protiv očekivanog porasta bakterijske rezistentnosti na više lijekova. Na temelju rezultata *in vitro* istraživanja bit će potrebna dodatna istraživanja kako bi se utvrdila *in vivo* učinkovitost različitih vrsta meda u širem spektru bakterijskih vrsta.

Ovaj rad je financiran iz sredstava Institucijskog projekta IP11-FDMZ-2021 „Ispitivanje antimikrobne aktivnosti konvencionalnih i nekonvencionalnih oralnih antiseptika te pentadekapeptida BPC 157 na najčešćim oralnim patogenima“, voditeljica projekta doc. dr. sc. Jasminka Talapko.



6. LITERATURA

1. Lamont, R. J.; Koo, H.; Hajishengallis, G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 2018, 16, 745–759.
2. Chen, L.; Chakraborty, B.; Zou, J.; Burne, R. A.; Zeng, L. Amino sugars modify antagonistic interactions between commensal oral streptococci and *Streptococcus mutans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019, 85, e00370–19.
3. Carrouel, F.; Conte, M. P.; Fisher, J.; Gonçalves, L. S.; Dussart, C.; Llodra, J. C.; Bourgeois, D. COVID-19: A Recommendation to Examine the Effect of Mouthrinses with β -Cyclodextrin Combined with Citrox in Preventing Infection and Progression. *J. Clin. Med.* 2020, 9, 1126.
4. Jiao, Y.; Tay, F. R.; Niu, L. na; Chen, J. hua Advancing antimicrobial strategies for managing oral biofilm infections. *Int. J. Oral Sci.* 2019, 11, 1–11.
5. Talapko, J.; Škrlec, I. The Principles, Mechanisms, and Benefits of Unconventional Agents in the Treatment of Biofilm Infection. *Pharmaceuticals* 2020, 13, 299, doi:10.3390/ph13100299.
6. Berger, D.; Rakhimova, A.; Pollack, A.; Loewy, Z. Oral Biofilms: Development, Control, and Analysis. *High-throughput* 2018, 7, 24.
7. Larsen, T.; Fiehn, N. E. Dental biofilm infections – an update. *APMIS* 2017, 125, 376–384.
8. Maina, I. W.; Patel, N. N.; Cohen, N. A. Understanding the Role of Biofilms and Superantigens in Chronic Rhinosinusitis. *Curr. Otorhinolaryngol. Rep.* 2018, 6, 253–262.
9. Ihara, Y.; Takeshita, T.; Kageyama, S.; Matsumi, R.; Asakawa, M.; Shibata, Y.; Sugiura, Y.; Ishikawa, K.; Takahashi, I.; Yamashita, Y. Identification of Initial Colonizing Bacteria in Dental Plaques from Young Adults Using Full-Length 16S rRNA Gene Sequencing. *mSystems* 2019, 4, e00360–19.
10. Haque, M.; Sartelli, M.; Haque, S. Z. Dental infection and resistance-global health consequences. *Dent. J.* 2019, 7, 22.
11. Patel, K.; Memon, Z.; Prince, A.; Park, C.; Sajan, A.; Ilyas, N. *Streptococcus oralis* meningitis from right sphenoid Meningoencephalocele and cerebrospinal fluid leak. *BMC Infect. Dis.* 2019, 19, 960.
12. Wijesundara, N. M.; Lee, S. F.; Cheng, Z.; Davidson, R.; Rupasinghe, H. P. V. Carvacrol exhibits rapid bactericidal activity against *Streptococcus pyogenes* through cell membrane damage. *Sci. Rep.* 2021, 11, 1487.
13. Lugović-Mihić, L.; Pilipović, K.; Crnarić, I.; Šitum, M.; Duvančić, T. Differential diagnosis of cheilitis – How to classify cheilitis? *Acta Clin. Croat.* 2018, 57, 342–351.
14. Pye, A. D.; Lockhart, D. E. A.; Dawson, M. P.; Murray, C. A.; Smith, A. J. A review of dental implants and infection. *J. Hosp. Infect.* 2009, 72, 104–110.



15. Harriz Azmi, A.; Noor Adnalizawati Adnan, S.; Malik, N. A. The Prevalence of *Staphylococcus aureus* in the Oral Cavity of Healthy Adults in Malaysia. *Sains Malaysiana* 2020, 49, 583–591.
16. Scannapieco, F. A.; Cantos, A. Oral inflammation and infection, and chronic medical diseases: implications for the elderly. *Periodontol.* 2000 2016, 72, 153–175.
17. Owayss, A. A.; Elbanna, K.; Iqbal, J.; Abulreesh, H. H.; Organji, S. R.; Raweh, H. S. A.; Alqarni, A. S. In vitro antimicrobial activities of Saudi honeys originating from *Ziziphus spinachristi* L. and *Acacia gerrardii* Benth. trees. *Food Sci. Nutr.* 2020, 8, 390–401.
18. Nweze, J. A.; Olovo, C. V.; Nweze, E. I.; John, O. O.; Paul, C. Therapeutic Properties of Honey. In *Honey Analysis - New Advances and Challenges*; IntechOpen, 2020.
19. Albaridi, N. A. Antibacterial Potency of Honey. *Int. J. Microbiol.* 2019, 2019, 2464507.
20. Silici, S.; Sagdic, O.; Ekici, L. Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of *Rhododendron* honeys. *Food Chem.* 2010, 121, 238–243.
21. Olas, B. Honey and Its Phenolic Compounds as an Effective Natural Medicine for Cardiovascular Diseases in Humans? *Nutrients* 2020, 12, 283.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition; Wayne, USA, 2015.
23. Gobin, I.; Vuckovic, D.; Lusic, D. Antibacterial properties of honey. *Med. Flum.* 2014, 50, 150–157.
24. Mittal, L.; Kakkar, P.; Verma, A.; Dixit, K.; Mehrotra, M. Antimicrobial activity of honey against various endodontic microorganisms – an in vitro study. *J. Int. Dent. Med. Res.* 2012, 5, 9–13.
25. Kotris, I.; Talapko, J.; Drenjančević, D. Evaluation of Antibacterial Activity of Two Different Honeys against Clinical Isolates of β -hemolytic *Streptococci* Group A. *Southeast. Eur. Med. J.* 2017, 1, 67–73.
26. Stagos, D.; Soulitsiotis, N.; Tsadila, C.; Papaeconomou, S.; Arvanitis, C.; Ntontos, A.; Karkanta, F.; Adamou-Androulaki, S.; Petrotos, K.; Spandidos, D. A.; Kouretas, D.; Mossialos, D. Antibacterial and antioxidant activity of different types of honey derived from Mount Olympus in Greece. *Int. J. Mol. Med.* 2018, 42, 726–734.
27. Anand, S.; Deighton, M.; Livanos, G.; Morrison, P. D.; Pang, E. C. K.; Mantri, N. Antimicrobial Activity of Agastache Honey and Characterization of Its Bioactive Compounds in Comparison With Important Commercial Honeys. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 263.
28. Nolan, V. C.; Harrison, J.; Cox, J. A. G. Dissecting the Antimicrobial Composition of Honey. *Antibiotics* 2019, 8, 251.



29. Cianciosi, D.; Forbes-Hernández, T. Y.; Afrin, S.; Gasparri, M.; Reboredo-Rodríguez, P.; Manna, P. P.; Zhang, J.; Lamas, L. B.; Flórez, S. M.; Toyos, P. A.; Quiles, J. L.; Giampieri, F.; Battino, M. Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. *Molecules* 2018, 23, 2322.
30. Lee, H.; Churey, J.; Worobo, R. Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. *Int. J. Food Microbiol.* 2008, 126, 240–244.
31. Taormina, P. J.; Niemira, B. A.; Beuchat, L. R. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int. J. Food Microbiol.* 2001, 69, 217–225.
32. Alissandrakis, E.; Tarantilis, P. A.; Pappas, C.; Harizanis, P. C.; Polissiou, M. Investigation of organic extractives from unifloral chestnut (*Castanea sativa* L.) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill.) honeys and flowers to identification of botanical marker compounds. *LWT - Food Sci. Technol.* 2011, 44, 1042–1051.
33. Flanjak, I.; Strelec, I.; Kenjeric, D.; Primorac, L. Croatian produced unifloral honeys characterised according to the protein and proline content and enzyme activities. *J. Apic. Sci.* 2016, 60, 39–48.
35. Bogdanov, S.; Jurendic, T.; Sieber, R.; Gallmann, P. Honey for nutrition and health: A review. *J. Am. Coll. Nutr.* 2008, 27, 677–689.
36. Strelec, I.; Crevar, B.; Kovac, T.; Bilic Rajs, B.; Primorac, L.; Flanjak, I. Glucose oxidase activity and hydrogen peroxide accumulation in Croatian honeys. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 2018, 10, 33–41.
37. Bucekova, M.; Bugarova, V.; Godocikova, J.; Majtan, J. Demanding new honey qualitative standard based on antibacterial activity. *Foods* 2020, 9, 1263.
38. Karasawa, K.; Kato, M.; Arakawa, H. Analysis of Bactericidal Components in Japanese Honeys. *Am. J. Anal. Chem.* 2020, 11, 309–321.
39. Valachová, I.; Bučková, M.; Majtán, J. Quantification of bee-derived peptide Defensin-1 in Honey by Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, a New Approach in Honey Quality Control. *Czech J. Food Sci.* 2016, 34, 233–243.
40. Combarros-Fuertes, P.; Fresno, J.M.; Estevinho, M.M.; Sousa-Pimenta, M.; Tornadijo, M.E.; Estevinho, L.M. Honey: Another Alternative in the Fight against Antibiotic-Resistant Bacteria? *Antibiotics (Basel)* 2020, 9, 774.
41. Qamar, M.U.; Saleem, S.; Toleman, M.A.; Saqalein, M.; Waseem, M.; Nisar, M.A.; Khurshid, M.; Taj, Z.; Jahan, S. In vitro and in vivo activity of Manuka honey against NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11. *Future Microbiol.* 2018, 13, 13–26.
42. El-Kased, R.F.; Amer, R.I.; Attia, D.; Elmazar, M.M. Honey-based hydrogel: In vitro and comparative in vivo evaluation for burn wound healing. *Sci. Rep.* 2017, 7, 9692.



TESTING OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF DIFFERENT TYPES OF HONEY ON BACTERIAL SPECIES *STREPTOCOCCUS ORALIS*, *STREPTOCOCCUS PYOGENES* AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Talapko J, Juzbašić M, Srb Milostić A, Holik D, Pačarić S, Škrlec I.

Faculty of Dental Medicine and Health Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Croatia

ABSTRACT

The oral microbiome consists of populations of bacteria that maintain the balance of potentially pathogenic bacteria and affect an individual's oral and general health. Honey acts antimicrobial against many species of bacteria, but this varies depending on the botanical and geographical areas. Therefore, the aim was to examine the antimicrobial activity of different bee honey samples on strains of *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pyogenes*, and *Staphylococcus aureus* by agar gel dilution. Chestnut honey had the most excellent antimicrobial action on *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus*, while flower and acacia honey showed the same antimicrobial activity on *Streptococcus oralis*. We have shown that honey samples can have a preventive antibacterial effect on the tested bacterial species, which could undoubtedly form the basis of an alternative approach to treating infections caused by certain oral bacteria. Nevertheless, further studies to justify accurate *in vivo* efficacy are justified, especially when biofilms and mixed infections are considered.

Corresponding author:

***Jasminka Talapko, Ass. Prof.
Faculty of Dental Medicine and Health
Osijek, Croatia
E-mail: jtalapko@fdmz.hr***



ESCHERICHIA COLI KAO LJUDSKI PATOGEN

Rusmira Hasandić-Mehmedagić

Sažetak

Bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) normalni je stanovnik ljudskog probavnog sustava, ali također i jedna od najučestalijih uzročnika infekcija. Premda najčešće dovodi do infekcija mokraćnog i probavnog sustava, može uzrokovati i upalu žuči, upalu pluća, meningitis kod novorođenčadi, kao i teške oblike sepse. Ovaj mikroorganizam prvi je opisao znanstvenik Theodor Escherich 1885. godine kad ga je izolirao iz stolice novorođenčadi, a kompletni genom je sekvencioniran 1997. godine. Mikrobiološki se radi o gram-negativnoj štapičastoj bakteriji koja može biti odvojena ili u paru, a kretanje joj omogućuje specifična rotacija trepetiljki. Metabolizam joj je fakultativno anaeroban, što znači da može rasti bez kisika, ali ga može iskoristiti ako je prisutan.

Ljudski probavni trakt se ovom bakterijom uglavnom kolonizira unutar 40 sati po rođenju vezanjem za sloj sluzi koja oblaže sluznicu crijeva. Unatoč činjenici da se radi o glavnom fakultativno anaerobnom mikroorganizmu u probavnom sustavu, na *E. coli* otpada tek malen dio ukupne bakterijske mikroflore. Primjerice, anaerobna vrsta *Bacteroides* nadmašuje broj *E. coli* u omjeru od barem 20:1. Ipak, zbog redovite prisutnosti *E. coli* u ljudskim crijevima i stolici, ovaj uzročnik nam često služi kao indikator fekalne kontaminacije, tj. zagađenja hrane i vode. Uslijed specifičnih promjena u genetskom materijalu određeni sojevi *E. coli* mogu postati patogeni te dovesti do vrlo raznolikih bolesti uz pomoć tzv. čimbenika virulencije s učincima na stanične procese.

Autor za korespondenciju:

**Rusmira Hasandić-Mehmedagić dipl.
Ing. MLD
Kantonalna bolnica Zenica
Služba za mikrobiološku dijagnostiku
E-mail rusmira.hasandic@hotmail.com
Tel: 0038761/ 368-214**



1.UVOD

Bakteriju *Escherichia coli* (grč. colon – dio debelog crijeva), otkrio je Theodor Escherich 1885. godine, kao uzročnika proljeva u novorođenčadi i nazvao *Bacterium coli commune*, a njemu u čast su je Castellani i Chalmers, 1919. godine nazvali *Escherichia coli* (2).

E. coli je fekalna koliformna bakterija iz porodice Enterobacteriaceae. Normalni je dio mikroflore potrebne za fiziološki rad crijeva domaćina, ljudi i toplokrvnih životinja. Kako se uobičajeno pronalazila u ljudskom i životinjskom fecesu, ali ne i u prirodi, 1892. godine Shardinger ju je predložio za indikatora fekalnog zagađenja (2).



Naziv koliformne bakterije nisu taksonomska klasifikacija već zajednički naziv za Gram negativne nesporogene, fakultativno anaerobne štapičaste bakterije koje koristeći laktozu, u prisutnosti površinski aktivnih tvari ili ekvivalentnih agensa, za 48 sati na temperaturi od 35 °C stvaraju kiselinu i plin. EIJKMAN (1903., cit. FENG i WEAGANT, 2002.) je prvi put definirao fekalne koliformne kao podskupinu koliformnih bakterija koje za razliku od ostalih rastu dobro na temperaturi od 44°C do 45,5°C, a čiji je glavni predstavnik upravo vrsta *E. coli*. Sojevi *E. coli* su u biokemijskim reakcijama indol pozitivni, metil-crveno pozitivni, Vogues– Proskauer negativni, te ne mogu koristiti citrat. Indol pozitivni sojevi primarno potječu iz crijeva. Za razlikovanje bakterije *E. coli* od ostalih koliforma koristi se i aktivnost β -glukuronidaze - enzima kojeg posjeduje oko 96% sojeva *E. coli*, uključujući i one koji ne stvaraju plin (anaerogene) (1,2).

ESCHERICHIA COLI KAO LJUDSKI PATOGEN

E. coli ne uključuje samo komenzalne sojeve, već i patogene kao uzročnike različitih ljudskih bolesti. Patogenost određenog soja ovisna je o različitim čimbenicima virulencije, gdje se, na temelju površinskih antigena i mogućnosti stvaranja toksina, mogu dijagnosticirati. Patogeni se sojevi mogu podijeliti, na temelju kliničke slike i patoloških stanja koje uzrokuju, u dvije skupine, a to su crijevne i izvancrijevne infekcije (3).

Sojevi, kao uzročnici izvancrijevnih infekcija, uglavnom su domaćini crijevne flore zdravih životinja, a možemo ih podijeliti u četiri serotipova:

- *ptičji patogeni soj*,
- *uropatogeni soj*,
- *septikemijski soj*
- *soj kao uzročnik meningitisa u djece*

Mogu uzrokovati infekcije mokraćnog sustava i rana, upalu pluća, meningitis kod novorođenčadi, osteomijelitis, apscese te sepsu (3).

Crijevne patogene možemo klasificirati prema specifičnostima u njihovoj patogenezi, a posebno treba istaknuti one koji imaju mogućnost stvaranja citotoksina, kao inhibitora sinteze proteina u eukariotskih stanica, a uobičajeno ih nazivamo verotoksinima (VT) koji utječu na Vero stanice i Shiga toksinima (STX) koji su slični onima u *Shigella dysenteriae*. Sojevi koji stvaraju Shiga toksin nazivamo STEC, a one koji produciraju verotoksine VTEC (3).

VTEC infekcije povezane su s verotoksičnom *E. coli* O 157:H7, a bolesti se manifestiraju posebice kod male djece i starijih osoba izazivajući hemoragijski kolitis te hemolitički uremijski sindrom (4).

Crijevni patogeni *E. coli* posjeduju određene čimbenike virulencije zbog čega ih i nazivamo patotipovi. U tu skupinu ubrajamo enterotoksičnu (ETEC), enteropatogenu (EPEC), enteroagregativnu (EAEC), enteroinvazivnu (EIEC), enterohemoragičnu (EHEC, STEC) te difuzno adherentnu *E. coli* (DEAC) (3).



Enterotoksična *E. coli* (ETEC) posjeduje dva termolabilna toksina, kao činitelja virulencije, a uglavnom kolonizira tanko crijevo čovjeka, koza, goveda, psa te svinja. Klinička slika obično podrazumijeva vodenasti proljev kod dojenčadi i male djece, a posebno je česta za zemlje u razvoju. Poznata je i pod imenom „proljev putnika“, a prenosi se s kontaminiranom hranom ili vodom. Stečena imunost, na ovaj patotip, nije rijetkost pa pojavnost bolesti kod odraslih nije moguća (1,3).

Enteropatogeni tip (EPEC) na svojoj membrani posjeduje pile te protein intimin kao glavni i odgovorni za izazivanje dijareje. Domaćini su najčešće djeca na području razvijenih zemalja, a mogu biti i domaće životinje poput psa, mačke, konja ili kunića. Zbog obilnih proljeva može doći do dehidracije i naposljetku, smrti (3). Enteroinvazivni soj (EIEC) uglavnom napada djecu mlađu od 5 godina, odrasle, imunokompromitirane te putnike. Nastanjuje debelo crijevo izazivajući vodenast proljev, s mogućnošću prelaska u dizenterični sindrom koji je popraćen krvlju u stolici. Također, ima potencijal da izazove hemolitičko-uremički sindrom (HUS) (1,3). Enteroagregativna *E. coli* (EAEC) i difuznoagregacijski sojevi (DAEC) posjeduju fimbrije kojima se bakterija uspješno adherira i vrši agregaciju na epitelne stanice tankog crijeva, a dodatni čimbenik virulencije im je i plazmidni toksin. Obično kolonizira probavni trakt kod male djece u nerazvijenim zemljama uz pojavu vodenastog proljeva, kojeg još nazivamo i proljevom putnika (3).

Enterohemoragična *E. coli* (EHEC) poznata kao i VTEC ili STEC posjeduje pile te Shiga-toksin 1 i 2 kao skupinu virulentnih čimbenika kojima izaziva vodenaste proljeve koji postaju krvavi (hemoragični kolitis), a u 10% slučajeva može nastati hemolitičko-uremijski sindrom (HUS) i naposljetku zatajenje bubrega (1,3).

Najpoznatiji serotip EHEC sojeva je zloglasna *E. coli* O157:H7 čiji je Shiga-toksin, kao produkt spomenutog serotipa, prepoznat tek 1982. te od tada postaje važan zdravstveni problem zbog učestale kontaminacije hrane i vode. Uz jake grčeve i proljev izaziva i hemolitički kolitis te HUS što se očituje kao sekundarna pojava trombocitopenije, hemolitičke anemije i zatajenja bubrega. Čvrsta potrbušnica primarni je dijagnostički pregled kod zaraze jer toksin uzrokuje crijevni vaskulitis i upalu. Epidemiološkim istraživanjima utvrdilo se da je glavni rezervoar serotipa upravo domaća stoka, nakon što je, posebice kod goveda, izbila enterohemoragična dijareja. Prenosi se feko-oralnim putem, a najčešće konzumacijom nedovoljno termički obrađenog mesa te mlijeka. Također moguć je i prijenos preko vode, povrća i voća te nepasteriziranih pića. Uzrok je tome sekundarno onečišćenje prilikom gnojidbe obradivih površina kontaminiranih sa serotipom O157:H7 (5).

RAST I PREŽIVLJAVANJE *E. COLI* U PRIRODNOM OKOLIŠU

Istraživanja ističu da bakterija, izvan crijevnog trakta, može ne samo preživjeti, već se i razmnožavati u tlu, pijesku, te sedimentu tropskih, suptropskih i



i umjerenih klima. Određeni se tipovi *E. coli* mogu naturalizirati, odnosno postati dio normalne flore u sredinama u kojima se nalaze (6).

Byappanahalli i suradnici otkrivaju jedan od najčešćih patogenih gena u okolišu koji kodira intimin EPEC-a, a to je *eaeA* gen koji je otkriven u morskoj vodi na nakupinama alga *Cladophora*. Isto tako, na morskim plažama, pomoću qPCR-a, otkriveni su *ftsZ*, *uidA* i *eaeA* geni specifični za *E. coli*, što sugerira da, kada uvjeti postanu povoljni, bakterija može rasti u takvim okruženjima i imati utjecaj na kakvoću morske vode (6).

Primijećeno je da određeni enterički patogeni, koji se mogu naći na povrtnim biljkama, imaju sposobnost kolonizacije povrća jer uključuju slične gene koje su im potrebne pri kolonizaciji crijeva 27 domaćina (2). Također, otkriveni su i različiti geni koji čine bakteriju otpornom na određene antibiotike. To su bili sojevi izolirani iz okoliša, odnosno iz rijeke Yeongsan u Južnoj Koreji (4).

Znanstvenici su utvrdili da se serotipovi *E. coli*, koji se nalaze u samom sedimentu rijeke, genetski razlikuju od onih koji se nalaze slobodni u vodi. Isto tako, su primijetili da za vrijeme ljetnih mjeseci, odnosno za vrijeme kišne sezone kada je protok vode veći, dolazi do resuspendiranja sedimenta i same vode te bakterije imaju mogućnost da međusobno razmjenjuju gene, a samim time se povećava broj genotipova *E. coli*. Osim resuspendiranja sedimenta i vode, na veću raznolikost genotipova u ljeti u odnosu na zimske mjeseci utječe temperatura i veći izvor hranljivih sastojaka. Osim toga, neprekidno unošenje fekalija, bilo ljudskih ili životinjskih, također može biti uzrok genetskih promjena, štoviše adaptivnih

mutacija populacijske genetike *E. coli* (6,7).

Nekoliko je važnih okolišnih faktora koji utječu na rast i preživljavanje *E. coli*, a oni mogu biti biotičke ili abiotičke prirode. Abiotski faktori uključuju dostupnost hranljivih tvari i vode, temperaturu, pH te sučevo UV zračenje. Biotski faktori, pak uključuju sposobnost bakterije da nabavlja hranu, prisutnost drugih mikroba i njihova međusobna borba te stvaranje biofilмова u okolišu koji ih okružuje (2).

Kao najvažniji faktor koji utječe na rast i preživljavanje *E. coli* je temperatura. 36-40 °C optimalna je temperatura za stanični rast koje posjeduju i životinje i ljudi, no postoje temperaturne amplitude na koje se bakterija uspješno prilagodi. Kad se bakterija nađe u prirodnom okruženju, brže odumire na višim temperaturama (>30°C), negoli na hladnim (<15°C).

Poznato je da kod velikih suša bakterije naprežu svoje mehanizme da bi prilagodile membranu i reguliraju gena koji bi im omogućili prilagodbu na surove uvjete. Ustanovljeno je da je isušeno tlo negativno utjecalo na bakterijski rast, dok je nakon rehidracije bakterija pokazala pozitivni porast iz čega se da zaključiti da voda ima značajnu ulogu u životnom ciklusu *E. coli* (14). Dostupnost nutrijenata kao što su dušik, ugljik i fosfor od esencijalne je važnosti za opstanak bakterije (14). Određeni sojevi preživljavaju selektivno ovisno o pH okolišnog tla. Uglavnom sojevima *E. Coli* odgovara viši pH. *E. coli*, da bi se oduprjela niskom pH koristi mehanizme kao što je sistem otpornosti na kiseline ovisne o dekarboksilazi / antiporistu (2).



Kada govorimo o utjecaju drugih mikroorganizama na postojanost *E. coli*, bitno je spomenuti da na broj *E. coli*, bilo u vodenom okolišu ili zemlji, utječu predatori poput protozoa i virusa koji imaju mogućnost lizirati bakterijske stanice te antagonizam i borba za hranljive tvari s drugim bakterijama (5). Prema određenim istraživanjima pokazalo se da *E. coli* u slatkovodnoj vodi slabije preživljava, negoli u morskoj vodi te da sunčeva svjetlost često bude glavni faktor kod ranih faza raspadanja dok je biotička uloga veća u kasnijim fazama odumiranja bakterija (7).

E. coli također se natječe s drugim mikrobama za izvore hranljivih tvari i brani se od antagonizma, a to potvrđuje i istraživanje da su vrste *E. coli* bolje rasle u sterilnom tlu, nego u sterilnom (2). Isto tako, na genetske osobine *E. coli* utječu okolišni uvjeti u kojima bakterija obitava. Prema istraživanju okolišni se sojevi razlikuju od enteričkih, koji nastanjuju GI-sustav toplokrvnih sisavaca. Filogenetskom analizom genoma određenih sojeva ustanovljeno je da sojevi adaptirani na okolišne uvjete na koje utječu biotski i abiotski faktori, bolje preživljavaju u vanjskom okruženju nego u crijevu čovjeka. Pokazano je i da populacije okolišnih sojeva *E. coli* međusobno razmjenjuju gene, ali ne i sa sojevima unutar probavnog sustava čovjeka što ukazuje na moguće ekološke prepreke glede protoka gena (2).

PATOVAROVI BAKTERIJE *E. COLI*

Bakterija *E. coli* koja normalno obitava u crijevu je najčešće bezopasna za domaćina iako neki sojevi izazivaju oboljenje (dijareju) u ljudi. Ti se sojevi obično nazivaju dijarogeni ili samo patogene *E. coli*. Patogenost i infektivnost bakterijske stanice proizlaze iz sposobnosti adherencije na stjenku crijeva, što je povezano s antigenima stanične membrane i sposobnosti proizvodnje toksina *E. coli* koji uzrokuju crijevna oboljenja. S obzirom na virulentne faktore i mehanizme uz pomoć kojih uzrokuju bolest označavaju se kao intestinalni patovarovi (8).

Mehanizmi djelovanja u crijevima mogu biti različiti. *E. coli* može invadirati crijevnu sluznicu s umnažanjem u epitelnim stanicama i probojem u laminu propriju, a mogu adherirati na površinu sluznica s poslijedičnim smanjivanjem ili nestajanjem mikroresica i poremećajem stanične funkcije (7). Bakterije izlučuju enterotoksine koji narušavaju metabolizam soli i vode u stanicama bez mijenjanja morfologije stanice, te izlučuju citotoksine (verotoksine) koji izravno smanjuju stanične funkcije oštećujući crijevnu površinu i djelujući sistemski na endotel različitih organa (8).



Prema kliničkoj slici bolesti i promjenama koje ove bakterije uzrokuju, razlikujemo sedam različitih intestinalnih patovarova:

- enteroinvazivna *E. coli* (EIEC),
- enterotoksigena *E. coli* (ETEC),
- enteropatogena *E. coli* (EPEC),
- enterohemoragijska (EHEC) – verocitotoksigeni sojevi *E. coli* (VTEC),
- enteroagregativna *E. coli* (EaggEC-EAEC),
- difuzno adherentna *E. coli* (DAEC)
- prihvaćajuća (engl. attaching and effacing) *E. coli* (AEEC).

Ovi različiti patovarovi dijarogenih *E. coli* međusobno se preklapaju u posjedovanju virulentnih faktora pa su sa oboljenjima nastalima konzumacijom hrane ili vode povezane prve četiri skupine (8).

KLINIČKA SLIKA I PATOGENEZA

Opći simptomi oboljenja

Iako je bakterija *E. coli* dio normalne flore crijeva, kada se nađe na pogrešnom mjestu, može izazvati infekciju gotovo svakog organa i tkiva. U probavni trakt bakterije ulaze kao posljedica loše higijene ili kontaminiranom hranom i vodom. Inkubacija u slučaju infekcije s verotoksigenim sojevima *E. coli* traje uglavnom duže od inkubacije kod salmoneloze (12 do 36 sati) ili kampilobakterioze (3-5 dana) (6).

Infekcija s VTEC sojem može uzrokovati asimptomatsku infekciju, simptome blagog do krvavog proljeva s abdominalnim grčevima (hemoragični kolitis - HC) do po život opasnog zatajenja bubrga (hemolitički uremički sindrom - HUS). HUS je karakterističan

po simptomima akutnog bubrežnog sindroma, mikroangiopatskoj hemolitičkoj anemiji i moguće trombocitopeničnoj purpuri (TTP). S komplikacijama bolest može završiti i smrtnim ishodom (9).

Klasični HUS je češći u djece radi nerazvijenosti imunog sistema i zbog opadanja imunosti u starijih osoba, a javlja se par dana nakon simptoma vodenastog krvavog proljeva (9).

Simptomi TTP su karakteristični po neurološkim znacima i trombocitopeničnoj purpuri, a češća je u starosne skupine od oko trideset godina (9).

Oralno uneseni VTEC sojevi obično u vrlo maloj dozi, moraju preživjeti u kiselom sadržaju želuca, a zatim se natječu s drugim mikroorganizmima u crijevima. Ako prežive, bakterije u lumen crijeva otpuštaju verotoksin Stx (shiga toksin), kojeg apsorbira crijevni epitel, a potom se resorbira u krv. Ovo omogućava dostavu toksina do površine ciljanih stanica različitih tkiva, te razvoj lokalnih i sistemskih simptoma (7). Ukratko, bakterije prolaze kroz tanko crijevo, a virulentni geni se uključuju potaknuti signalima u debelom crijevu. VTEC se hvataju za enterocite debelog crijeva karakterističnim intimnim prianjanjem, te uništavaju mikrovile i uzrokuju proljev (9). Ako je proizvedeno dovoljno Stx, lokalno oštećuju krvne žila debelog crijeva što uzrokuje krvavi proljev, a kada se dovoljna količina Stx apsorbira u krvotok, mjesta bogata toksin receptorima vaskularnog endotela se oštećuju što dovodi do smanjenja funkcije bubrega, često oštećenja središnjeg živčanog sustava i razvoja



HUS-a. Histopatološki, HUS je prepoznatljiv po raširenim sterilnim mikroangiopatskim lezijama karakterističnim za sistemsku toksemiju, koje se razvijaju u bubregu, crijevima, mozgu i pankreasu, a posljedica su skvrčavanja endotelne stanice, stvaranje fibrinoznih trombova i posljedičnim začepljenjem kapilara (8,9).

ESCHERICHIA COLI I ANTIBIOTSKA REZISTENCIJA

E. coli je osjetljiva na uobičajena dezinfekcijska sredstva no rezistentna je na različite antibiotike. Antimikrobna rezistencija sve je veća prijetnja javnom zdravlju. Složenost antimikrobne rezistencije u gram negativnih bakterija kao što je *E. coli* predstavlja značajne dijagnostičke i terapijske izazove. Izvanbolnički sojevi *E. coli* obično su osjetljivi na amoksicilin, cefalosporin, penicilin, karbapeneme, sulfametoksazol i druge antimikrobne lijekove. Od posebnog značaja ima razvoj rezistencije na beta-laktamske antibiotike, zatim na trimetoprim-sulfametoksazol i na fluorirane kinolone. Ovi antibiotici su važni za liječenje invazivnih infekcija. Pretjerana i neopravdana konzumacija i propisivanje antibiotika često dovodi do mutacija. S obzirom da je *E. coli* stalni pripadnik crijevnog flore ljudi, izložena je selekcijskom tlaku antibiotika prilikom svake konzumacije antibiotika, a zbog takve ubikvitarnosti je zapravo otežana kontrola širenja nastalih rezistentnih klonova. Danas je odprilike 50% *E. coli* rezistentno na ampicilin posredovan proizvodnjom beta-laktamaze (14).

Upravo bi se zbog toga antibiotsko liječenje uvijek trebalo voditi testovima *in vitro*. Ako je prisutna rezistencija na cefalosporine I, II i/ili III generacije (npr. ceftriakson), ampiciline, aminoglikozide, trimetoprim-sulfametoksazol, doksiciklin i nitrofurantoin, uvijek postoji alternativa u smislu korištenja kinolona, (npr. norfloksacin, ofloksacin, ciprofloksacin), imipenema ili meropenema. U svakom slučaju, odabir odgovarajućih antibiotika ovisi o dijagnozi (14).



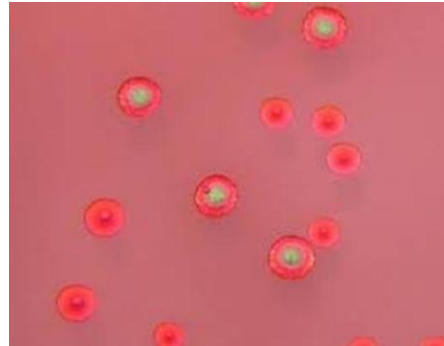
Slika 1 Antibiogram, osjetljivost *E. coli* na sve testirane antibiotike (Izvor: <https://www.microbiologyinpictures.com/esc-herichia%20coli.html>)



LABORATORIJSKO-DIJAGNOSTIČKA OBRADA

Svi pacijenti kod kojih postoji sumnja na infekciju s bakterijom *E. coli* za početka bi trebali napraviti kompletnu i diferencijalnu krvnu sliku kako bi se vidjelo je li povećan broj leukocita te postoji li skretanje u lijevo (pojava veće učestalosti nesegmentiranih neutrofilnih granulocita) (10). Definitivna dijagnoza postavlja se mikrobiološkom obradom, tj. izolacijom mikroorganizma u laboratoriju iz kliničkih uzoraka kao što su urin, stolica, krv, iskašljaj ili cerebrospinalni likvor. *E. coli* raste dobro na hranjivim podlogama koje se koriste u rutinskom laboratorijskom radu, a bojanjem po Gramu moguće je uočiti specifičnu morfologiju uzročnika (11).

Uvriježeni laboratorijski kriterij koji govori u prilog infekcije mokraćnoga trakta jest prisutnost 10 na 5 ili više bakterija u mililitru mokraće. Kao uzorak za urinokulturu koristi se srednji mlaz prvog jutarnjeg urina, prije čega se može napraviti i pregled urina test trakom (10). Sojevi *E. coli* koji izazivaju proljev ne mogu se razlikovati u kulturi, već pomoću testova koji nisu u širokoj upotrebi, kao što su DNA probe i lančana reakcija polimerazom (PCR). Jedino se enterohemoragična *E. coli* (EHEC) serotip O157:H7 može lako detektirati s obzirom da za nju postoje komercijalne selektivne podloge i specifični serološki testovi (11).



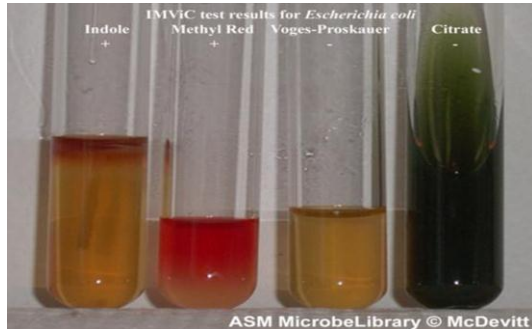
Slika 2 Izgled *E. coli* na endo agaru (Izvor: <https://www.microbiologyinpictures.com/esc/herichia%20coli.html>)



Slika 3 Izgled *E. coli* na MacConkey agaru (Izvor: <https://www.microbiologyinpictures.com/esc/herichia%20coli.html>)



Slika 4 Izgled *E. coli* na krvnom agaru (Izvor: <https://www.microbiologyinpictures.com/esc/herichia%20coli.html>)



Slika 5 Biokemijski testovi na *E. coli* (Izvor <https://microbeonline.com/imvic-testsprinciple-procedure-and-results/>)

LIJEČENJE INFEKCIJA UZROKOVANIH BAKTERIJOM *ESCHERICHIA COLI*

U liječenju infekcija mokraćnog sustava najčešće se koriste antibiotici. Pri izboru adekvatnog lijeka u obzir se uzimaju čimbenici poput spektra aktivnosti, osjetljivosti uzročnika u antibiogramu, mogućih nuspojava, farmakokinetike antibiotika, ali i ekološke i ekonomske posljedice liječenja (12). Idealan lijek bi se trebao izlučivati preko mokraćnog sustava kako bi postigao visoku koncentraciju u mokraći. Preparati brusnice sadrže tvar pod nazivom proantocijanidin koja sprječava vezanje uropatogenih sojeva *E. coli* za stanice domaćina, dok fruktoza iz soka pokazuje djelovanje na sojeve *E. coli* s fimbrijama tipa 1. Sok brusnice također dokazano smanjuje pH urina te sprječava stvaranje biofilma, stoga predstavlja dobar izbor kao pomoćno sredstvo u prevenciji urinarnih infekcija. Korisnim se pokazuje i šećer D-manoza koji se čvrsto veže na površinske izdanke *E. coli* (12).

Liječenje proljeva uzrokovanog s *E. coli* uglavnom je simptomatsko uz nadoknadu tekućine i elektrolita. Kako je poznato da enterohemoragični sojevi razgrađuju antibiotike zbog čega mogu dovesti do ispuštanja još veće količine Shiga-like toksina, najvažnije od svega jest spriječiti dehidraciju pacijenta. Hemolitičko-uremički sindrom tretira se isključivo u jedinici intenzivne njege, s obzirom da su zbog anemije, smanjenja broja trombocita i oštećenja bubrežne funkcije potrebne učestale transfuzije krvi te bubrežna dijaliza. U pacijenata s upalom žučnog mjehura i apscesima uzrokovanim *E. coli* nerijetko je potreban kirurški zahvat (13).

ZAKLJUČAK

E. coli je bakterija koja se normalno nalazi u našim crijevima, no u određenim slučajevima i patogen koji može dovesti do pojave različitih bolesti. Zbog toga na umu uvijek valja imati prevenciju koja u slučaju infekcija mokraćnog sustava uključuje adekvatnu higijenu, odjeću, prehranu te primjenu odgovarajućih preparata. Pridržavanje osnovnih načela pravilnog postupanja s hranom može spriječiti prijenos većine patogenih mikroorganizama odgovornih za bolesti koje se prenose hranom i vodom, a između ostaloga i sojeva *E. coli* koji dovode do proljeva.



4. LITERATURA

1. Croxen MA, et. Al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbial Reviews*, 2013; 26(4): 822-880.
2. Hur HG, et. al. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications a review, 2017; 123(3): 570-581.
3. Humski A. *Escherichia coli*. Opomena sustavu kontrole sigurnosti hrane. *Veterinarska stanica*, 2011; 42(4)58.
4. Lozica L, Gottstein Ž, Tomić DH. Molekulska karakterizacija APEC sojeva *E. coli* izdvojenih na farmama peradi Republike Hrvatske. *Veterinar*, 2017; 55 (2).
5. Gossman W, Wasey A, Salen P. *Escherichia coli* (*E. coli* O157:H7) 2019. Stat Pearis.
6. Jang J, et. al. Dynamic changes in the population structure of *Escherichia coli* in the Yeongsan River basin of South Korea. *FEMS Microbiol Ecol*, 2015; 91(11).
7. Korajkic A, et. al. Differential Decay of *Enterococci* and *Escherichia coli* Originating from Two fecal Pollution Sources. *Appl Environ Microbiol*, 2013; 79(7): 2488-2492.
8. Hofmann J. Geographic distribution and magnitude of disease Burden. *Netters Infectious Disease*, 2012.
9. Soto E, Revan F. Culturability and persistence of *Francisella noatunesis* subsp. *orientalis* in sea and freshwater microsome. *Micrb. Ecol*, 2012; 63(3): 398-404.
10. https://www.google.com/search?q=e.coli+kod+ljudi+zakljucak&rlz=1C1GIGM_enBA848BA848&ei=D77WYr7WCcfd7_UPw-y7OA&ved=0ahUKEwj-mcusk4X5AhXH7rsIHUP2DgcQ4dUDCA4&uact=5&oq=e.coli+kod+ljudi+zakljucak&gs_lcp=Cgdnd3Mtd2l6EAMyBQghEKABOgcIABBHELADOGYIABAEBY6CAghEB4QFhAdSgQIQRgASgQIRhgAUMYHWP0dYLogaAFwAXgAG9AYgBtgqSAQQwLjEwmAEAoAEBYAEIwAEB&sclient=gws-wiz
11. https://www.google.com/search?q=e.coli+metode+dokazivanja&rlz=1C1GIGM_enBA848BA848&oq=e.coli+metode+dokazivanja&aqs=chrome..69i57j33i160.7130j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8
12. https://www.google.com/search?q=e.coli+kod+ljudi&rlz=1C1GIGM_enBA848BA848&ei=x73WYobhJOaX9u8PqJeK2AI&ved=0ahUKEwjG4LuKk4X5AhXmi_0HHaiLAisQ4dUDCA4&uact=5&oq=e.coli+kod+ljudi&gs_lcp=Cgdnd3Mtd2l6EAMyBggAEB4QFjoFCAAQgAQ6BQghEKABOggIIRAEeBYQHUoECEYYAUoECEYYAFDYB1j8F2DLGmgBcAB4AIBnAGIAdcHkgEDMy42mAEAoAEBwAEB&sclient=gws-wiz
13. Chapman GH. A Culture Medium for Detecting and Confirming *Escherichia coli* in Ten Hours. *Am. J. Public Health*, 1951; 41:1381.
14. Šantić M, et. al. Mikrobiologija hrane i vode za studente preddiplomskog studija sanitarnog inženjerstva: Priručnik za vježbe iz Mikrobiologije hrane i Mikrobiologije vode. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju. Rijeka, 2014.



***ESCHERICHIA COLI* AS A HUMAN PATHOGEN**

Hasandić-Mehmedagić R.

ABSTRACT

The bacterium *Escherichia coli* (*E. coli*) is a normal inhabitant of the human digestive system, but also one of the most common causes of infections. Although it most often leads to infections of the urinary and digestive systems, it can also cause inflammation of the bile, pneumonia, meningitis in newborns, as well as severe forms of sepsis. This microorganism was first described by the scientist Theodor Escherich in 1885 when he isolated it from the stool of newborns, and the complete genome was sequenced in 1997. Microbiologically, it is a Gram-negative rod-shaped bacterium that can be isolated or in pairs, and its movement is enabled by the specific rotation of the cilia. Its metabolism is facultatively anaerobic, which means it can grow without oxygen, but can use it if it is present.

The human digestive tract is generally colonized by this bacterium within 40 hours of birth by binding to the mucus layer lining the intestinal mucosa. Despite the fact that it is the main facultatively anaerobic microorganism in the digestive system, *E. coli* accounts for only a small part of the total bacterial microflora. For example, the anaerobic species *Bacteroides* outnumbers *E. coli* by at least 20:1. However, due to the regular presence of *E. coli* in human intestines and stool, this causative agent often serves us as an indicator of fecal contamination, i.e. food and water pollution. Due to specific changes in the genetic material, certain strains of *E. coli* can become pathogenic and lead to very diverse diseases with the help of the so-called of virulence factors with effects on cellular processes.

Corresponding author:

Rusmira Hasandić-Mehmedagić
B.Sc. Ing. MLD
Cantonal Hospital Zenica
Department for Microbiology diagnostics
Email rusmira.hasandic@hotmail.com
Tel: 0038761 / 368-214



Uputstvo za autore

Strukturu rada čini:

1. naslovna strana,
2. sažetak
3. glavni dio (razrada teme),
4. zaključak,
5. spisak literature i
6. prilozi (po potrebi).

1. Naslovna strana je prva strana rada. Ona treba da pruži osnovne informacije o autoru i radu, hronološkim redom (koristiti Times New Roman, font 12):

- Naziv/naslov rada
- Autor/i (ime i prezime)
- naziv Institucije/a,
- naziv Odjeljenja ili Službe (ukoliko je osoba zaposlena),
- podatke o osobi za korespondenciju (ime i prezime, institucija, adresa, broj telefona, E-mail).

2. Sažetak na originalan način prezentira suštinu problema koji se razmatra u radu, ukazuje na njegov značaj, razloge (motive) za njegovu obradu i daje kratak pregled sadržaja rada. Obim sažetka je poželjno da bude u 300 riječi. Sažetak pisati na jezicima naroda BiH, te na engleskom jeziku.

3. Glavni dio (razrada teme) je osmišljen, temeljan i argumentovan prikaz teorijske utemeljenosti teme (analiza literature i prethodnih srodnih istraživanja) i praktičnih (ilustrativni primjeri, po pravilu originalni) rezultata koji se odnose na zadatak temu, metodološkog pristupa istraživanju i

rezultata istraživanja i njihove interpretacije. On je najvažniji i svakako najobimniji dio rada (obično čini 70–80% rada). Njime treba obuhvatiti sve ono što je u sažetku napisano. Ukoliko je autor koristio praktični dio i posjeduje rezultate, onda na početku glavnog dijela navodi sekciju „Materijal i metode“, te na kraju glavnog dijela sekciju „Rezultati“.

4. Zaključak je finalni dio rada. U njemu se na sistematičan i koncizan način saopštavaju najvažnija saznanja do kojih se došlo. On proizilazi iz čitavog sadržaja rada, pa se preporučuje autoru da detaljno pročita sve ono što je prethodno napisao. U zaključku treba da se ocijeni, po mogućnosti kritički, tema koja je bila predmet razrade, procjene stanja ili situacije, potvrde ili odbace postavljene hipoteze, iskažu poruke i doprinos rada, kao i da se ukaže na probleme i pitanja koja bi trebalo dalje obraditi i proučiti.

5. Spisak literature je sistematski pregled svih izvora koji direktno ili indirektno tretiraju sadržaj teme rada i koji su korišteni tokom izrade. Postoje različiti sistemi navođenja referenci u literaturi.

Molimo pisati radove po vankuverskom sistemu. Vankuverski sistem navođenja izvora poznat je i kao numerički sistem, jer se oslanja na upotrebu brojkama pri navođenju referenci u spisku literature i to npr (1) ili ako imate slijed više referenci (1-5). Navedene brojke koriste se i za objašnjavanje autorstva u



otvorenom tekstu. Ovaj sistem je dobio ime prema Međunarodnom udruženju urednika medicinskih časopisa (International Committee of Medical Journal Editors – ICMJE) koje je ustanovilo obrazac za naučne radove koji se podnose medicinskim časopisima. Udruženje je poznato i kao Vankuverska grupa koja je prvi sastanak održala u Vankuveru 1978. godine. Popis referenci (izvora) u spisku literature reda se redoslijedom kojim se pojavljuju u tekstu.

Primjeri

Knjiga jednog autora: 1. Uzunović-Kamberović S. Medicinska mikrobiologija, Zenica: Fojnica, 2009.

Knjiga dva autora: 2. Durmišević S, Ibrahimagić A. Higijena i zdravstvena ekologija – praktikum dopunjeno izdanje. Univerzitet u Zenici, 2018.

Članak iz časopisa:

1. Prinarhis EE, Miriagou V, Tzelepi E, Gozouli M, Tzouvelekis LS. Emergence of an inhibitor-resistant β -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:838-40.
2. Bedenić B, Žagar Ž. Increased Beta-Lactamase Activity in *Branhamella Catarrhalis* after Exposure to Amoxicilin and Clavulanic Acid. *J Chemother* 1994; 6(6):383-7.

3. Članak preuzet sa internet sajta: Navesti autora i naslov te [Internet].Dostupno na: http://ppf.unsa.ba/Dokumenti/uputstvo_za_izradu_ms_rada.pdf [pristupljeno 30. 03. 2016].

6. Prilozi

Slike, tabele, grafikoni i sl. mogu se dati u sklopu teksta, a ako su obimniji na posebnoj stranici u prilogu. U podnožju slike piše se redni broj slike i njen naziv. Ako je slika preuzeta od drugog autora, onda se ispod naziva slike navodi izvor iz koga je slika preuzeta.

Tabele sadrže neophodne podatke prikazane na pregledan način. Iznad tabele se stavlja redni broj tabele i naziv u što kraćem obliku, a ako je tabela preuzeta iz nekog izvora onda se u podnožju tabele navode bibliografski podaci tog izvora i stranica sa koje je tabela preuzeta.