

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Aleksandra M. Šmitran

**UTICAJ SUBINHIBITORNIH KONCENTRACIJA
ANTIBIOTIKA NA FORMIRANJE BIOFILMA I
VEZIVANJE ZA KOMPONENTE MATRIKSA
INVAZIVNIH I NEINVAZIVNIH IZOLATA
BETA HEMOLITIČKOG STREPTOKOKA GRUPE A**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Aleksandra M. Šmitran

**INFLUENCE OF THE SUBINHIBITORY
CONCENTRATION OF ANTIBIOTICS TO BIOFILM
PRODUCTION AND ADHERENCE TO MATRIX
PROTEINS OF INVASIVE AND NONINVASIVE
ISOLATES OF GROUP A BETA-HEMOLYTIC
STREPTOCOCCUS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Mentor doktorske disertacije:

prof. dr Lazar Ranin, redovni profesor, Institut za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu

Komisija za ocjenu i odbranu doktorske teze:

1. prof. dr Tanja Jovanović, redovni profesor, mikrobiologija, Institut za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

2. prof. dr Nataša Vučković Opavski, vanredni profesor, mikrobiologija, Institut za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

3. prof. dr Marina Milenković, redovni profesor, mikrobiologija, Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu

Rezime doktorske teze:

Infekcije izazvane bakterijama koje proizvode biofilm su jedan od najaktuelnijih problema u bakteriologiji. Biofilm je način odbrane bakterija od djelovanja antibiotika i imunskog sistema domaćina. Terapija infekcija izazvanih biofilmom je uglavnom neuspješna, jer su za eradikaciju biofilma potrebne visoke koncentracije antibiotika koje bi bile izuzetno toksične po domaćina. Zbog neodgovarajuće i neuspješne terapije, bilo bi veoma značajno otkriti faktore i uslove sredine koji dovode do nastanka biofilma ili ga čak i indukuju. *Streptococcus pyogenes* ili streptokok grupe A (GAS) je jedan od najučestalijih humanih patogena, koji izaziva širok spektar oboljenja, koje se na osnovu patogenetskih mehanizama nastanka mogu podijeliti na piogene infekcije, toksemične infekcije i poststreptokokne sekvele. Ovako širok spektar oboljenja GAS može da zahvali mnogobrojnim faktorima virulencije. Sposobnost formiranja biofilma kao dodatnog faktora virulencije je još uvijek nedovoljno ispitana za GAS, iako je biofilm kao značajan faktor virulencije potvrđen kod mnogobrojnih bakterija. Početni i najvažniji korak u formiranju biofilma je adherencija za supstrat, bilo da su u pitanju adherencija za ćelije domaćina ili za vještačke materijale. *Streptococcus pyogenes* raspolaže sa znatnim brojem adhezina koji mu omogućavaju adherenciju za različite humane ćelije. Najveći značaj adherencije je u pripajanju za ćelije domaćina, agregaciji blisko postavljenih bakterija, stvaranju signala za prelazak u kolektivni način života, pri kojem bakterije dobijaju zaštitni matriksni omotač, koji u planktonskom načinu života ne postoji, a koji je odgovoran za većinu odbrambenih mehanizama kojima bakterije u biofilmu izbjegavaju eradikaciju sa mjesta infekcije. Smatra se da produkcija biofilma omogućava *in vitro* osjetljivim sojevima rezistenciju na antibiotike i dovodi do terapijskog neuspjeha. Uočeno je da su bolji produktori neinvazivni sojevi različitih vrsta streptokoka u odnosu na invazivne sojeve, kao i da su GAS sojevi osjetljivi na eritromicin bolji produktori u odnosu na eritromicin rezistentne sojeve. Takođe, pretpostavlja se da streptokokno

kliconoštvo najvjerojatnije nastaje prodorom bakterija u epitelne ćelije ili stvaranjem biofilma u kriptama tonzila.

Na osnovu dostupne literature postavili smo radnu hipotezu da subinhibitorne koncentracije antibiotika dovode do izmjene u vezivanju neinvazivnih izolata iz zdravih kliconoša (SK grupa), slabo invazivnih izolata od pacijenata sa tonzilofaringitisom (ST grupa) i jako invazivnih izolata (SI grupa) za polistirensku površinu i za laminin, što dovodi do promjene u njihovoj sposobnosti formiranja biofilma. U skladu sa ovom hipotezom postavili smo i dodatne ciljeve kojim smo željeli da utvrdimo prvo da li postoji razlika između netretiranih grupa izolata (neinvazivni, slabo invazivni i jako invazivni) u odnosu na sposobnost adherencije, hidrofobnost, produkciju cistein proteaze SpeB i formiranje biofilma. Nakon toga smo željeli da utvrdimo da li subinhibitorne koncentracije antibiotika (penicilin, ceftriakson, rifampicin, eritromicin, klindamicin) utiču na adherenciju, hidrofobnost, produkciju cistein proteaze SpeB i formiranje biofilma kod ispitivanih grupa izolata, te da li nakon uticaja antibiotika postoje razlike između grupa po pitanju ispitivanih osobina.

U radu smo primijenjivali najnovije metode za ispitivanje adherencije, hidrofobnosti, produkcije cistein proteaze SpeB i produkcije biofilma.

GAS spada u grupu bakterija slabo adherentnih za vještačke materijale, tako da ne dovodi do nastanka infekcija vezanih za različite implantate i proteze. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa tim i pokazuju da ne postoji razlika u adherenciji za neobloženu mikrotitarsku ploču između tri ispitivane grupe izolata. Da bismo ispitali uticaj kapsule na vezivanje za neobloženu mikrotitarsku ploču, izolate smo tretirali hijaluronidazom i zatim opet ispitivali adherenciju. Ovim eksperimentom je utvrđeno da je grupa ST značajno slabije adherisala u odnosu na druge

dvije grupe. Na osnovu ovog rezultata bi se moglo zaključiti da neinvazivni izolati od kliconoša (SK grupa) i jako invazivni izolati (SI grupa) raspolažu većim brojem površinskih adhezina ili imaju adhezine većeg afiniteta, koji su prekriveni kapsularnim polisaharidima. Za mikrotitarsku ploču obloženu lamininom najbolje adherisali izolati SI grupe, zatim izolati SK grupe, a najslabije izolati ST grupe. Efikasnije vezivanje za laminin jako invazivne grupe izolata u odnosu na ostale grupe objašnjava se boljom produkcijom SpeB. Zbog toga smo ispitali da li kod naših izolata postoji razlika u produkciji cistein proteaze, SpeB . Našim eksperimentom nije utvrđena razlika u produkciji SpeB između ispitivanih grupa.

S obzirom da se produkcija biofilma odvija tokom dužeg vremenskog perioda, naša namjera je bila da utvrdimo da li postoji razlika između ispitivanih grupa izolata u sposobnosti formiranja biofilma tokom zadatog vremena inkubacije (12, 24 i 48 sati) i da li se sve tri grupe isto ponašaju tokom zadatog perioda inkubacije. Nakon inkubacije od 12 sati nije utvrđena razlika između grupa. Razlike su uočene nakon 24 i 48 časova. U oba slučaja su izolati SI grupe najslabije produkovali biofilm. Sve ispitivane grupe su slabi i nestabilni produktori biofilma, jer nijedna grupa nije pokazala stabilnu i dobru produkciju biofilma tokom vremena. Ovo potvrđuje činjenicu da GAS nije značajan uzročnik infekcija vezanih za biofilm i različite vještačke implantate.

Nakon inkubacije sa subinhibitornim koncentracijama antibiotika između grupa pojavile su se razlike u odnosu na adherenciju za neobloženu mikrotitarsku ploču. Nakon dejstva rifampicina, ceftriaksona i klindamicina, ST grupa je bolje adherisala u odnosu na SK grupu, a eritromicin i ceftriakson su doveli do bolje adherencije SI grupe u odnosu na SK grupu. Jedino su SK izolati bolje adherisali nakon uticaja penicilina, i to u odnosu na ST grupu. U odnosu na netretirane izolate, eritromicin i klindamicin su poboljšali adherenciju ispitivanih izolata, dok su ostali

antibiotici smanjili adherenciju za neobloženu mikrotitarsku ploču. Penicilin i eritromicin su smanjili adherenciju izolata za laminin, pri čemu je penicilin značajno više oslabio adherenciju sojeva u odnosu na eritromicin. Najveći uticaj oba antibiotika su postigla na izolate iz grupe ST, koji su najslabije adherisali za laminin.

Izolati SK grupe su nakon tretmana svih antibiotika pokazali veću hidrofobnost u odnosu na ST grupu, a nakon rifampicina i penicilina su imali veću hidrofobnost i u odnosu na SI grupu. Izolati SI grupe su imali veću hidrofobnost u odnosu na ST grupu nakon dejstva rifampicina i klindamicina. Svi ispitivani antibiotici su smanjili hidrofobnost ispitivanih grupa izolata.

U odnosu na netretirane izolate, produkcija SpeB se značajno smanjila nakon uticaja svih antibiotika. Nije uočena razlika između grupa.

Nakon inkubacije sa rifampicinom, ST grupa je bolje produkovala biofilm u odnosu na druge dvije grupe. Nakon inkubacije sa penicilinom, SK grupa je bolje produkovala biofilm u odnosu na ST grupu. Izolati SI grupe su bolje produkovali biofilm u odnosu na druge dvije grupe nakon inkubacije sa eritromicinom. Ove rezultate smatramo veoma značajnim, jer smo dokazali da *in vitro* i na vještačkoj podlozi za koju GAS nema značajne adhezine, izolati od kliconoša (SK grupa) pokazuju stalno bolju produkciju biofilma, kako u odnosu na druge grupe, tako i u odnosu na netretirane izolate. Ovi rezultati direktno ukazuju i skreću pozornost na značaj pravovremenog uzimanja antibiotika tokom streptokoknog tonzilofaringitisa.

Ključne riječi: *Streptococcus pyogenes*, adherencija, hidrofobnost, biofilm, subinhibitorne koncentracije antibiotika

Naslov doktorske teze:

Uticaj subinhibitornih koncentracija antibiotika na formiranje biofilma i vezivanje za komponente matriksa invazivnih i neinvazivnih izolata beta hemolitičkog streptokoka grupe A

naučna oblast: mikrobiologija

uža naučna oblast: bakteriologija

Resume:

Biofilms have been increasingly recognized as being important in human disease. Problems associated with human biofilm infections result from two distinct characteristics of all biofilms. First, biofilms are highly resistant to immune killing and clearance, and to treatment with antimicrobial agents. Second, protected biofilms might be capable of shedding individual bacteria and sloughed pieces of biofilm into surrounding tissues and the circulatory system. Such shed cells might be responsible for acute illness, which might recur despite vigorous antimicrobial treatments. So, it is important to establish factor that induce biofilm production.

Group A Streptococcus (GAS) is a beta-hemolytic, Gram- positive human pathogen capable of causing a wide variety of human disease ranging from noninvasive diseases, such as pharyngitis and impetigo, to more severe, invasive infections, including necrotizing fasciitis, sepsis, and toxic shock-like syndrome. A large number of secreted or cell-attached virulence factors expressed by this microorganism have been investigated so far. Recent observations suggesting that biofilm may also have a role in *S. pyogenes* infections have been reported. First and most important step in biofilm production is adherence to biotic and abiotic surfaces. After successful adherence, bacteria aggregate and get quorum signal for biofilm formation, sessile cells secreted exopolysaccharide matrix that protect bacteria as shield from surroundings effects. The nature of biofilm structure and the physiological attributes of biofilm organisms confer an inherent resistance to antimicrobial agents. Although no strain of GAS that is resistant to penicillin *in vitro* has been identified in clinical laboratories using current susceptibility methods, treatment failure rates of up to one-third have been observed in clinical practice. Ogava et al. proposed that biofilm formation or internalization into epithelial cells enable *Streptococcus pyogenes* to establish pharyngeal carriage in patients with pharyngitis. However, little is known about

whether the ability to form biofilm is a characteristic of all group A streptococcal strains and is there relationship between biofilm formation and clinical source of isolates. Literature data indicated that biofilm-forming isolates entered epithelial cells with significantly lower efficiency than biofilm-negative strains.

According to literature data, our hypothesis was that subinhibitory concentration will change adherence of noninvasive (NI group), low (LI group)- and highly (HI group) invasive isolates to polystyrene microtiter plates and laminin, changing also biofilm production. Our goals were to determine is there difference between groups in adherence, hydrophobicity, SpeB and biofilm production. Also, we wanted to determine how antibiotics (penicillin, ceftriaxone, rifampicin, erythromycin and clindamycin) affect on adherence, hydrophobicity, SpeB and biofilm production, and possible difference between groups after antibiotic treatment.

To determine adherence, hydrophobicity, SpeB and biofilm production, we tested our isolates with contemporary methods.

GAS is low adherent bacteria to abiotic surfaces, and is not correlated with medical indwelling prosthesis infection. So, we didn't find differences between groups in adherence to polystyrene microtiter plate, as we expected. To determine influence of GAS capsule on adherence, we treated isolates with hyaluronidase, and measure adherence again. However, after capsule removal, NI and HI isolates adhere significantly better than LI group. Although there is no data in literature that could explain weaker adherence of LI group, our presumption was that isolates from patients with pharyngeal carriage (NI group) and invasive isolates (HI group) posses more adhesins or adhesins with higher affinity for cell receptors, that allow isolates to strongly adhere on epithelial cells during carriage or move into deeper tissues in invasive infections. When tested

adherence to laminin, HI group was the best adherent group, and LI group the worst adherent group. Streptococcal pyrogenic exotoxin B, SpeB, is an extracellular cysteine protease capable of cleaving both host and bacterial proteins and contributing to tissue damage and dissemination and also, to adherence to laminin. In our experiment, we didn't find differences between groups in SpeB production.

All tested *S. pyogenes* isolates were weak biofilm producers. There was no difference in biofilm production among all GAS strains after 12 hours of incubation. After 24 hours, low invasive strains produced biofilm significantly better than other two groups, while after 48 hours LI and NI isolates produced considerably more biofilm than HI group. Still, after 24 and 48 hours, highly invasive strains were the worst biofilm producers. These results are in concordance with no correlation of GAS and biofilm associated infection of medical indwelling devices.

After antibiotic treatment, there were differences in biofilm formation between groups. After rifampicin, ceftriaxone and clindamycin treatment, LI group better adhere than NI group. After ceftriaxone and erythromycin treatment HI group better adhere than NI group. After penicillin treatment NI group better adhere than LI group. When we were analyzing influence of all five antibiotics on adherence of untreated isolate, we have found that clindamycin and erythromycin increases adherence, and other antibiotics decrease adherence. Penicillin and erythromycin decrease adherence to laminin, penicillin more than erythromycin. There was also, differences between groups, because LI group less adhere to laminin than other two groups.

There was no difference between groups in hydrophobicity after treatment with penicillin and erythromycin in both concentration and also after $\frac{1}{4}$ MIC of ceftriaxone. Clindamycin and rifampicin in both concentrations reduce hydrophobicity of LI group in relation to NI group.

Higher subinhibitory concentration of ceftriaxone reduces hydrophobicity of NI group in relation to LI group.

All antibiotics reduce equally SpeB production in all groups.

After rifampicin treatment, LI group better produce biofilm than other two groups. After penicillin treatment, NI group better produce biofilm than LI group. After erythromycin treatment HI group better produce biofilm than other two groups. These results are important, because isolates of LI group in vitro on polystyrene surface, better produce biofilm in relation to other two groups and, also in relation to untreated isolates.

Key words: *Streptococcus pyogenes*, adherence, hydrophobicity, biofilm, subinhibitory concentration of antibiotics

Title: Influence of subinhibitory concentration of antibiotics to biofilm production and adherence to matrix proteins of invasive and noninvasive isolates of group A beta-hemolytic *Streptococcus*

science field: microbiology- bacteriology

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1 Aktuelnost teme	1
1.2.Medicinski značaj beta hemolitičkog streptokoka grupe A	1
1.2.1. Faktori virulencije.....	2
1.3. Adherencija-najznačajniji korak u nastanku biofilma	3
1.3.1. Ahezini streptokoka grupe A	4
1.3.1.1. Proteini koji vezuju fibronektin	5
1.3.1.2.Neučvršćeni adhezini	6
1.3.1.3. Proteini koji vezuju kolagen, plazminogen i CD44 protein.....	8
1.4. Biofilm- definicija, građa i nastanak.....	8
1.4.1.Značaj biofilm u patogenezi humanih infekcija.....	11
1.4.2. <i>Streptococcus pyogenes</i> i biofilm	11
1.4.2.1.Streptokokno kliconoštvo	12
1.4.3. Značaj i mehanizmi prodora GAS u ćelije.....	13
1.5. Ekologija biofilma	15
1.5.1. Zaštita bakterija u biofilmu.....	15
1.5.2.Rast i razmnožavanje bakterija u biofilmu	16
1.5.3. Izmjena fenotipskih osobina bakterija u biofilmu	16
1.5.4. Detekcija kvoruma- minimalne potrebne koncentracije bakterija	17
1.5.5. Miješane kulture u biofilmu.....	18
1.6. Uloga biofilma u otpornosti bakterija na antimikrobne lijekove	18
1.6.1. Značaj ekstracelularnih polimera matriksa u penetraciji antimikrobnih lijekova.....	19
1.6.2. Rezistentni fenotip u biofilmu	19
1.6.3.Usporeni rast bakterija u biofilmu	20
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	22
3. MATERIJAL I METODE	24
3.1. Bakterijski izolati.....	24
3.2. Ispitivanje adherencije	25
3.2.1. Ispitivanje adherencije za neobloženu mikrotitarsku ploču.....	25
3.2.2. Oblaganje ploča za mikrotitraciju sa lamininom	26

3.2.3. Ispitivanje adherencije za laminin	26
3.3. Ispitivanje hidrofobnosti	26
3.3.1. Ispitivanje hidrofobnosti bakterija preko adherencije za heksadekan i ksilen.....	26
3.4. Ispitivanje prisustva streptokoknog pirogenog egzotoksina B	27
3.4.1. Ispitivanje prisustva SpeB kod netretiranih sojeva.....	27
3.5. Ispitivanje produkcije biofilma	28
3.5.1. Ispitivanje produkcije biofilma u atmosferskim uslovima.....	28
3.5.2. Ispitivanje produkcije biofilma u uslovima sa 5% CO2	29
3.6. Ispitivanje uticaja subinhibitornih koncentracija antibiotika na adherenciju, hidrofobnost, produkciju SpeB i formiranje biofilma.....	29
3.6.1. Ispitivanje uticaja subinhibitornih koncentracija antibiotika na adherenciju za neobloženu mikrotitarsku ploču.....	29
3.6.2. Ispitivanje uticaja subinhibitornih koncentracija antibiotika na adherenciju za laminin	30
3.6.3. Uticaj subinhibitornih koncentracija antibiotika na hidrofobnost	30
3.6.4. Ispitivanje uticaja subinhibitornih koncentracija na sposobnost formiranja biofilma	31
3.7. Ispitivanje suprainhibitornih koncentracija antibiotika na produkciju biofilma.....	31
3.8. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika	32
3.9. Određivanje vrijednosti minimalne koncentracije za eradikaciju biofilma	33
3.10. Statistička analiza.....	33
4. REZULTATI.....	34
4.1. Ispitivanje adherencije, hidrofobnosti, produkcije SpeB i biofilma kod netretiranih izolata.....	34
4.1.1. Ispitivanje sposobnosti adherencije za neobloženu ploču za mikrotitraciju.....	34
4.1.2. Adherencija za laminin	35
4.1.3. Ispitivanje hidrofobnosti	36
4.1.4. Produkcija cistein proteaze, SpeB.....	37
4.1.5. Sposobnost formiranja biofilma u atmosferskim uslovima	37
4.1.6. Povezanost produkcije SpeB, adherencije za laminin i sposobnosti formiranja biofilma	38
4.2. Uticaj ugljen dioksida na sposobnost formiranja biofilma	38

4.3. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika.....	40
4.4. Uticaj subinhibitornih koncentracija antibiotika na adherenciju za neobloženu mikrotitarsku ploču	41
4.4.1. Uticaj rifampicina na adherenciju za neobloženu mikrotitarsku ploču	41
4.4.2. Uticaj penicilina na adherenciju za neobloženu mikrotitarsku ploču	42
4.4.3. Uticaj ceftriaksona na adherenciju za mikrotitarsku ploču.....	43
4.4.4. Uticaj klindamicina na adherenciju za neobloženu mikrotitarsku ploču	45
4.4.5. Uticaj eritromicina na adherenciju za mikrotitarsku ploču.....	46
4.4.6. Poređenje uticaja $\frac{1}{2}$ MIK svih antibiotika na adherenciju za mikrotitarsku ploču.....	47
4.4.7. Poređenje uticaja $\frac{1}{4}$ MIK svih antibiotika na adherenciju za mikrotitarsku ploču	48
4.4.8. Uticaj subinhibitornih koncentracija penicilina i eritromicina na adherenciju za mikrotitarsku ploču obloženu lamininom	49
4.5. Uticaj antibiotika na hidrofobnost	50
4.5.1. Uticaj rifampicina na hidrofobnost	50
4.5.2. Uticaj penicilina na hidrofobnost.....	51
4.5.3. Uticaj ceftriaksona na hidrofobnost.....	52
4.5.4. Uticaj klindamicina na hidrofobnost.....	54
4.5.5. Uticaj eritromicina na hidrofobnost	55
4.5.6. Poređenje uticaja $\frac{1}{2}$ MIK svih antibiotika na hidrofobnost	56
4.5.7. Poređenje uticaja $\frac{1}{4}$ MIK svih antibiotika na hidrofobnost	57
4.6. Uticaj subinhibitornih koncentracija na produkciju cistein proteaze SpeB	58
4.6.1. Uticaj rifampicina na produkciju SpeB.....	58
4.6.2. Uticaj penicilina na produkciju cistein proteaze SpeB	59
4.6.3. Uticaj ceftriaksona na produkciju cistein proteaze SpeB	61
4.6.4. Uticaj klindamicina na produkciju cistein proteaze SpeB	62
4.6.5. Uticaj eritromicina na produkciju cistein proteaze SpeB	63
4.6.6. Poređenje uticaja $\frac{1}{2}$ MIK svih antibiotika na produkciju cistein proteaze SpeB... ..	64
4.6.7. Poređenje uticaja $\frac{1}{4}$ MIK svih antibiotika na produkciju cistein proteaze SpeB... ..	65
4.7. Uticaj subinhibitornih koncentracija antibiotika na produkciju biofilma	66
4.7.1. Uticaj subinhibitornih koncentracija rifampicina na produkciju biofilma.....	65
4.7.1.1. Uticaj $\frac{1}{2}$ MIK rifampicina na produkciju biofilma.....	66

4.7.1.2. Uticaj $\frac{1}{4}$ MIK rifampicina na produkciju biofilma.....	68
4.7.2. Uticaj subinhibitorne koncentracije penicilina na produkciju biofilma.....	69
4.7.2.1. Uticaj $\frac{1}{2}$ MIK penicilina na produkciju biofilma.....	69
4.7.2.2. Uticaj $\frac{1}{4}$ MIK penicilina na produkciju biofilma.....	71
4.7.3. Uticaj ceftriaksona na produkciju biofilma.....	72
4.7.3.1. Uticaj $\frac{1}{2}$ MIK ceftriaksona na produkciju biofilma.....	72
4.7.3.2. Uticaj $\frac{1}{4}$ MIK ceftriaksona na produkciju biofilma.....	74
4.7.4. Uticaj subinhibitornih koncentracija klindamicina na produkciju biofilma	75
4.7.4.1. Uticaj $\frac{1}{2}$ MIK klindamicina na produkciju biofilma	75
4.7.4.2. Uticaj $\frac{1}{4}$ MIK klindamicina na produkciju biofilma	76
4.7.5. Uticaj subinhibitornih koncentracija eritromicina na produkciju biofilma.....	78
4.7.5.1. Uticaj $\frac{1}{2}$ MIK eritromicina na produkciju biofilma.....	78
4.7.5.2. Uticaj $\frac{1}{4}$ MIK eritromicina na produkciju biofilma.....	79
4.7.6. Međusobno poređenje uticaja $\frac{1}{2}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma.....	81
4.7.6.1. Međusobno poređenje uticaja $\frac{1}{2}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 12 sati.....	81
4.7.6.2. Međusobno poređenje uticaja $\frac{1}{2}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 24 sata	81
4.7.6.3. Međusobno poređenje uticaja $\frac{1}{2}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 48 sati.....	82
4.7.7. Međusobno poređenje uticaja $\frac{1}{4}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma.....	83
4.7.7.1. Međusobno poređenje uticaja $\frac{1}{4}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 12 sati.....	83
4.7.7.2. Međusobno poređenje uticaja $\frac{1}{4}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 24 sata	84
4.7.7.3. Međusobno poređenje uticaja $\frac{1}{4}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 48 sati.....	85
4.8. Uticaj suprainhibitornih koncentracija antibiotika na produkciju biofilma.....	86
4.8.1. Uticaj suprainhibitornih koncentracija rifampicina	86
4.8.2. Uticaj suprainhibitornih koncentracija penicilina.....	88
4.8.3. Uticaj suprainhibitornih koncentracija ceftriaksona	89

4.8.4. Uticaj suprainhibitornih koncentracija klindamicina.....	90
4.8.5. Uticaj suprainhibitornih koncentracija eritromicina	91
4.8.6. Poređenje uticaja MIK pet antibiotika na produkciju biofilma	91
4.8.7. Poređenje uticaja 2xMIK pet antibiotika na produkciju biofilma	92
4.8.8. Poređenje uticaja 4xMIK pet antibiotika na produkciju biofilma	93
4.9. Određivanje minimalne koncentracije za eradikaciju biofilma	94
5. DISKUSIJA	95
6. ZAKLJUČCI.....	111
7. SKRAĆENICE	113
8. LITERATURA	114
9. BIOGRAFIJA	123
10.DODACI.....	124

1. Uvod

1.1. Aktualnost teme

Infekcije izazvane bakterijama koje proizvode biofilm su jedan od najaktuelnijih problema u bakteriologiji. Svakodnevno se otkrivaju novi podaci koji doprinose efikasnijem liječenju ovih infekcija. Ono što se sa sigurnošću zna jeste da je biofilm način odbrane bakterija od djelovanja antibiotika i imunskog sistema domaćina. Terapija infekcija izazvanih biofilmom je uglavnom neuspješna, jer su za eradikaciju biofilma potrebne visoke koncentracije antibiotika koje bi bile izuzetno toksične po domaćina. Zbog toga je većina infekcija izazvanih bakterijama koje proizvode biofilm uglavnom hroničnog karaktera ili zahtijevaju hirurško liječenje ili odstranjivanje implanta na kojem se biofilm formirao. Zbog ovako neodgovarajuće i neuspješne terapije, bilo bi veoma značajno otkriti faktore i uslove sredine koji dovode do nastanka biofilma ili ga čak i indukuju.

1.2. Medicinski značaj beta hemolitičkog streptokoka grupe A

U rodu *Streptococcus* nalazi se veliki broj vrsta koje su klasifikovane prema hemolitičkim, metaboličkim, antigenskim, kao i patogenim osobinama ovih bakterija. *Streptococcus pyogenes* je beta hemolitički streptokok grupe A po Lancefield-ovoj, prema kojoj se beta hemolitičke streptokoke na osnovu imunoloških razlika u ugljenohidratnom C antigenu ćelijskog zida, odnosno lipoteihoinskoj kiselini, dijele na veći broj grupa - A, B, C, D, F, G itd.

S. pyogenes je jedan od najučestalijih humanih patogena i izaziva širok spektar oboljenja, koje se na osnovu patogenetskih mehanizama nastanka mogu podijeliti na piogene infekcije, toksemične infekcije i poststreptokokne sekvele. U piogene infekcije spadaju faringitis i brojne infekcije kože i mekih tkiva, ali i rjeđe infekcije kao što su artritis, osteomijelitis, otitis media i druge. Toksemične infekcije su šarlah i streptokokni toksični šok sindrom, dok su poststreptokokne sekvele reumastka groznica i glomerulonefritis. Učestalost ovih oboljenja se već decenijama ne smanjuje. Posebno je zabrinjavajući porast incidence teških oblika streptokoknih bolesti - nekrotizirajućeg fasciitisa, celulitisa, streptokoknog toksičnog šok sindroma, sa izmijenjenom epidemiološkom slikom u odnosu na raniji period (1). Intenzivna istraživanja vezana za građu, genetsku osnovu i funkciju brojnih struktura na površini streptokoka, kao i njihovih produkata, imaju za cilj rasvjetljavanje patogenih mehanizama nastanka streptokoknih bolesti.

1.2.2. Faktori virulencije

Ovako širok spektar oboljenja GAS može da zahvali mnogobrojnim faktorima virulencije. Streptokokni faktori virulencije se mogu podijeliti na faktore koji mu omogućavaju:

- adherenciju i kolonizaciju
- invaziju u ćeliju i prodor u duboka tkiva
- odbranu od imunskog sistema domaćina i
- destrukciju tkiva (Tabela 1).

Tabela 1. Faktori virulencije *Streptococcus pyogenes*-a

Adherencija za epitelne ćelije	Lipoteihoinjska kiselina (LTA) Fibronektin vezujući proteini M protein Kapsula
Internalizacija	M protein Protein F1 i drugi fibronektin vezujući proteini
Invazija	Kapsula M protein
Antifagocitna svojstva	M protein i M-like proteini Kapsula C5a peptidaza Površni proteini - imobilizacija imunoglobulina
Širenje kroz tkiva	Hijaluronan liaza Streptokinaza Cistein proteaza (SpeB) Nukleaze (DNaze A, B, C i D) Plazminogen vezujući proteini
Destrukcija tkiva i sistemska toksičnost	Streptolizin O Streptolizin S Egzotoksini sa aktivnošću superantigena - SpeA, SpeC, SpeF, SSA, SMEZ

Preuzeto iz Bisno AL, Brito MO, Collins CM. Molecular basis of group A streptococcal virulence. (17).

Sposobnost formiranja biofilma kao dodatnog faktora virulencije je još uvijek nedovoljno ispitana tema za GAS, iako je biofilm kao značajan faktor virulencije potvrđen kod mnogobrojnih bakterija. Početni i najvažniji korak u formiranju biofilma je adherencija za supstrat, bilo da su u pitanju ćelije ili vještački materijali.

1.3. Adherencija - najznačajniji korak u nastanku biofilma

Da bi došlo do formiranja biofilma, najznačajniji korak je adherencija za podlogu. Najveći značaj adherencije je u pripajanju za ćelije domaćina, agregaciji blisko postavljenih bakterija, stvaranju signala za prelazak u kolektivni način života, pri kojem bakterije dobijaju zaštitni matriksni omotač. Matriksni omotač je odgovoran za većinu odbrambenih mehanizama kojima bakterije u biofilmu izbjegavaju eradikaciju sa mjesta infekcije i ne postoji kod slobodnoživećih (planktonskih) oblika bakterija. Faktori koji utiču na adherenciju su raznovrsni i mogu poticati od podloge na kojoj se biofilm stvara, početnog sloja koji oblaže supstrat, hidrodinamičkih osobina vodene sredine (ako se biofilm u njoj stvara), te karakteristika sredine i samih bakterija [2].

Podloga sa svojim fizičkim i fizičko-hemijskim osobinama može značajno doprinijeti prevazilaženju početnih odbojnih sila između bakterije i supstrata. Što je podloga hrapavija, adherencija za podlogu je bolja [2]. Druga bitna osobina podloge je hidrofobnost. Dokazano je da se bakterije bolje vezuju za nepolarne hidrofobne površine (teflon i plastika), nego za hidrofilne materijale (staklo i metal).

Polimerni sloj koji oblaže podlogu utiče na hemijske veze pomoću kojih će se ostvariti početna adherencija bakterija. U usnoj šupljini čovjeka taj sloj je proteinske građe i omogućava oralnim bakterijama da se vežu za zube. U drugim dijelovima tijela ovaj sloj može nastati od krvi, suza, urina, pljuvačke i respiratornih sekreta, ali bez obzira na sastav znatno utiče na hidrodinamičke interakcije između bakterija i podloge.

Hidrodinamičke osobine vodene sredine utiču na kompaktnost i strukturu biofilma. Biofilm nastao u sredini sa laminarnim tokom je grupisan i sastavljen od okruglih ćelijskih agregata odvojenih intersticijalnim kanalčićima. Biofilm nastao u sredini sa turbulentnim tokom je građen od izduženih agregata koji su mjestimično uvećani [3]. Ovo pokazuje da se biofilm može ponovo restrukturirati i prilagoditi novonastalim uslovima. Takođe, očekivalo se da se biofilm u turbulentnim uslovima neće uopšte stvarati ili da će to biti u manjoj mjeri.

Ukoliko je sredina u kojoj se stvara biofilm bogata hranljivim materijama, to će više bakterija adherirati [4]. GAS sojevi koji ne proizvode biofilm prelaze u produkte, ako se podlozi doda glukoza [5].

Osobine same bakterijske ćelije (hidrofobnost, fimbrije, flagele i produkcija ekstracelularnih polimera) su među najbitnijim faktorima koji utiču na početno vezivanje. Pokazano je da pokretne bakterije lakše i jače adheriraju za supstrat, jer flagele omogućavaju prevazilaženje početnih odbojnih sila. Nakon njih značajnu ulogu imaju fimbrije i fibrile sa krajnjim hidrofobnim aminokiselinama, koje doprinose prevazilaženju odbojnih elektrostatskih veza između bakterije i supstrata. Uočeno je da fibrile, fimbrije i dijelovi ćelijskog zida Gram pozitivnih bakterija (mikolična kiselina) olakšavaju vezivanje za hidrofobne podloge, dok lipopolisaharid Gram negativnih bakterija i ekstracelularni polimeri omogućavaju vezivanje za hidrofilne podloge.

1.3.1. Adhezini streptokoka grupe A

Streptococcus pyogenes raspolaže sa znatnim brojem adhezina koji mu omogućavaju adherenciju za različite humane ćelije. Često se zaboravlja da je proces adherencije dinamičan i da bakterije ostaju pripojene za ćelije domaćina samo u slučaju da im odgovaraju uslovi sredine (pH, oksidaciono-redukcioni potencijal, nivo kiseonika i sl). U slučaju da im sredina ne odgovara, streptokoke posjeduju enzime pomoću kojih razgrađuju receptore i odvajaju se od ćelije domaćina. Veza između streptokoknih adhezina i receptora se može ostvariti preko lektina, te međusobnim vezivanjem dva molekula proteina ili dva molekula ugljenih hidrata. Hemijske veze između receptora na ćeliji i streptokoknih proteina se ostvaruju pomoću jonskih i vodoničnih veza, pomoću dvovalentnih jona metala ili preko hidrofobnih veza. Većina ovih veza je niskog afiniteta, ali zajedno djelujući postaju izuzetno jake. Van der Waalsove veze su bitne u međusobnom prepoznavanju proteina na receptoru i adhezinu, koji se prepoznaju preko komplementarnosti po principu brave i ključa. Bočni lanci proteina se mogu vezati i preko hidrofobnih veza.

Pretpostavka je da se adherencija GAS odvija u dva koraka [6]. Prvi korak podrazumijeva vezivanje lipoteihinske kiseline (LTA), nakon čega u drugom koraku dolazi do vezivanja M proteina, proteina koji vezuje fibronektin (Sfb1), serumskog faktora zamućenja (SOF) i proteina od 54 kDa koji vezuje fibronektin (FBP54). LTA neutrališe elektrostatske odbojne sile između bakterije i ćelijske površine. Pored toga, ovo početno vezivanje može se ostvariti preko površinskih izdanaka. Početno vezivanje je dinamičan proces i ostvaruje se po sistemu prekidača (on-off efekat). Više različitih sila je uključeno, od hidrofobnih veza, do elektrostatskih ili jonskih veza. Tokom drugog koraka ostvaruju se specifične i ireverzibilne interakcije većeg afiniteta i kompleksnosti koje uključuju multiple adhezine (M protein, proteini koji vezuju fibronektin i laminin i dr.). Sposobnost streptokoka da se vezuju pomoću više različitih proteina dovodi do otežane identifikacije streptokoknih adhezina.

Sa druge strane, ovako mnogobrojne adhezine posjeduje svega nekoliko bakterija. Značaj za bakteriju se ogleda u njenoj sposobnosti da se vezuje za mnogobrojne i različite ćelije u našem organizmu, kao i za vještačke materijale. To je jedan od razloga zbog čega je GAS jedan od najučestalijih i najraširenijih humanih patogena. Značaj adherencije se ogleda u tome što je ona početni korak u nastanku infekcije. Samo bakterije koje imaju moćne i raznovrsne adhezine mogu prevazići mnogobrojne mehanizme imunskog sistema i kolonizovati dijelove našeg organizma.

1.3.1.1. Proteini koji vezuju fibronektin

Lipoteihonska kiselina je površinska molekula u sastavu ćelijskog zida koja prominira izvan bakterijske ćelije i vezuje se za fibronektin i epitelne ćelije. Iako se pretpostavlja da se 60% početne adherencije za epitelne ćelije ostvaruje preko lipoteihonske kiseline, značajnu ulogu u adherenciji imaju i površinski proteini.

M protein je prvi prepoznati adhezin GAS [7]. M protein se sastoji od dva uvijena lanca u alfa heličnoj konfiguraciji, usidrenih u ćelijsku membranu, koji prolaze kroz ćelijski zid i pojavljuju se na površini ćelije. Svaki lanac se sastoji od 4 ponavljajuća bloka (A-D), koji se razlikuju u veličini i aminokiselinskim sekvencama. Karboksilni kraj molekule je konstantan, građen od C i D dijela i nalazu se u sastavu ćelijske membrane i zida bakterija. Amino kraj je sastavljen od varijabilnog B i hipervarijabilnog A dijela. Varijabilni dio je građen od ponavljajućeg segmenta od 11 aminokiselina, pri čemu broj ponavljanja zavisi od serotipa. Hipervarijabilni dio čini segment A i predstavlja osnovu za *emm* gensku tipizaciju GAS. M protein u cjelosti djeluje kao antifagocitni faktor, adhezin i ima snažan proinflamatorni efekat. Hipervarijabilni A segment M proteina vezuje IgA, IgM, faktor H [8] i C4 vezujući protein (C4BP) [9]. Varijabilni B segment vezuje fibrinogen, serumski albumin i IgG. Konstantni C segment vezuje faktor H, serumski albumin i membranski kofaktorski protein CD46 [10, 11]. Proinflamatorni efekat se ostvaruje vezivanjem C segmenta za IgG i fibrinogen, koji onda omogućavaju vezivanje za receptor F α II na neutrofilima i produkciju i sekreciju proteina koji vezuje heparin i dovodi do povećane vaskularne propustljivosti [12]. Vezivanjem za CD46 na keratinocitima M protein ostvaruje početni korak u adheziji i nastanku kožnih infekcija. Antifagocitno dejstvo M proteina se ostvaruje vezivanjem za fibrinogen i faktore H i HL-1, regulatornu komponentnu komplekta, kojima ometa alternativni put komplekta i protein koji vezuje C4b komponentu komplekta (C4BP), kojim ometa klasični put komplekta [13].

Streptococcus pyogenes ima 11 proteina koji vezuju fibronektin i koji različitim afinitetom vezuju imobilizovani i solubilni fibronektin [14]. Ekspresija ovih proteina zavisi od faktora sredine u kojoj

se streptokok nalazi. Protein 54 koji vezuje fibronektin (FBP54) se nalazi na površini GAS kao neučvršćeni protein i vezuje se za imobilisani fibronektin, koji potom djeluje sa integrinima u ekstracelularnom matriksu i vezuje GAS za bukalne epitelne ćelije [15]. Protein Fba je površinski adhezin za fibronektin koji vezuje faktor H i FHL-1 protein i blokira opsonizaciju [16].

Protein F/SfbI (streptokokni protein 1 koji vezuje fibronektin) ima dva domena kojima vezuje fibronektin. Protein F se sintetiše u prisustvu superoksida u sredini u kojoj se nalazi GAS. Omogućava vezivanje za epitelne ćelije dermisa i Langerhansove ćelije. SfbI se pojačano eksprimira pri povećanom pritisku kiseonika, tj. na površini ćelija, omogućavajući time povećanu adheziju bakterija. U dubljim tkivima, gdje je smanjen parcijalni pritisak kiseonika, smanjena je i ekspresija SfbI, čime se povećava diseminacija bakterija u dublja tkiva. Smanjena ekspresija SfbI može nastati i katalitičkim cijepanjem SpeB, cistein proteaze, ili drugih bakterijskih površinskih proteaza na mjestu infekcije. Za razliku od SfbI, protein M se pojačano eksprimira u dubljim tkivima pri povećanom parcijalnom pritisku karbon dioksida, sprečavajući fagocitozu i doprinoseći diseminaciji GAS u duboka tkiva [17].

Protein F2 kodira *prtF2* gen, i otkriven je kod većine sojeva GAS koji ne posjeduju SfbI. Vezuje fibronektin visokim afinitetom, te predstavlja glavni protein za njegovo vezivanje kod SfbI negativnih sojeva [18]. Ima dva vezna domena i homologan je Fn- vezujućim proteinima grupe C streptokoka. Njegova aktivnost zavisi od koncentracije atmosferskog kiseonika.

Serumski faktor zamućenja (SOF/SfbII) je po svojoj funkciji apolipoproteinaza koja hidrolizuje apolipoproteine u serumu. SOF se preko kratke sekvence aminokiselina LPXTG i sortaza vezuje za ćelijski zid streptokoka i ima ulogu u vezivanju za fibronektin [19].

Značajni su još i protein koji vezuju fibronektin (mase 29 kDa), protein koji vezuje vitronektin i kolagen. Ovi proteini vezujući se za svoje receptore (fibronektin, vitronektin i fibrinogen), koji se pripajaju za integrine i omogućavaju ulazak GAS u ćelije.

1.3.1.2. Neučvršćeni adhezini

Neučvršćeni adhezini su vezani za bakterijsku površinu na još uvijek nepoznat način, najvjerojatnije preko hidrofobnih veza. Značaj neučvršćenih proteina je u njihovoj sposobnosti da se odvoje od ćelijskog zida, udalje od bakterijske ćelije, detektuju stanje u sredini u kojoj se GAS nalazi i tu informaciju prenesu nazad bakteriji [20]. Slikovito prikazano, oni su izviđači koji idu u izvidnicu prije konačnog boja između bakterije i imunskog sistema. Zasad je poznato 5

streptokoknih neučvršćenih adhezina koji su po svojoj funkciji i glikolitički enzimi: gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH), alfa enolaza, fosfoglicerat kinaza, fosfoglicerat mutaza i triozafosfat izomeraza. GAPDH, poznata i pod nazivima SDH i Plr, se može vezati za nekoliko proteina matriksa (plazmin, plazminogen, fibronektin i fibrinogen), proteine skeleta ćelije domaćina aktin i miozin, djelujući kao značajan faktor u kolonizaciji streptokoka. Vezivanjem za plazminogen, GAPDH ga pretvara u plazmin, koji razlaže proteine ekstracelularnog matriksa i omogućava invaziju i diseminaciju kroz epitel. Alfa enolaza je, takođe, sposobna da vezuje plazminogen i plazmin, a njena uloga u glikolitičkom putu je da konvertuje fosfoglicerat u fosfoenolpiruvat. Uočeno je da glavnu ulogu u vezivanju plazminogena/plazmina ima upravo enolaza, a ne GAPDH, jer je enolaza isturenija na površini GAS i vezuje plazmin većim afinitetom. Antitijela na streptokoknu enolazu mogu reagovati sa humanom enolazom i dovesti do autoimunske bolesti nakon streptokokne infekcije. Ovih 5 enzima glikolitičkog puta učestvuju kao kompleks u stvaranju ATP. Ekstracelularno stvoreni ATP u organizmu domaćina se vezuje za P2X receptore na površini epitelnih ćelija i ćelija imunskog sistema, indukujući time apoptozu. Na taj način GAS postiže uspostavljanje kontrole ponašanja ćelija domaćina i olakšava dalju progresiju infekcije [20]. Najznačajniji neučvršćeni protein je SpeB, streptokokni pirogeni egzotoksin B, koji je po svojoj funkciji cistein proteaza. SpeB je prvo identifikovan kao sekretorni toksin, ali može biti vezan za površinu ćelije i kao takav ima ulogu u adheziji za laminin, protein ekstracelularnog matriksa. Sintetiše se u ranoj stacionarnoj fazi i njegovu produkciju suprimiraju glukoza i drugi nutrijenti u podlozi. SpeB se sintetiše kao složeni protein koji se sastoji od signalnog peptida, propeptida i zrelog proteina, tj. enzima. Nakon cijepanja signalnog peptida, propeptid održava enzim u neaktivnom stanju do napuštanja bakterijske citoplazme [21]. Prolazak kroz ćeliju mu omogućavaju proteini RopA i M protein, a pretpostavlja se da SpeB jedne bakterije učestvuje u cijepanju SpeB propeptida na drugoj bakteriji [21]. SpeB se vezuje za fibronektin i vitronektin, omogućavajući diseminaciju bakterije u tkiva [17]. Aktivira metaloproteaze uključene u remodeliranje i degradaciju ekstracelularnog matriksa [21]. Učestvuje u sistemu koagulacije, razlažući fibrinogen. Djeluje na prekursor IL-1 β i oslobađa aktivni proinflamatorni citokin. Djeluje i na H -kininogen i oslobađa proinflamatorni i vazoaaktivni protein bradikinin. SpeB djeluje i na same streptokokne proteine M1, C5a peptidazu, SclB na površini bakterijske ćelije. Streptolizin O postaje citolitički aktivan nakon što na njega djeluje i obradi ga SpeB. SpeB se vezuje za integrine u ekstracelularnom matriksu (ECM), tiroglobulin, mucin i fetuin, humane proteine. Razlaže imunoglobuline svih 5 klasa. Značajna je i njegova funkcija superantigena koja se javlja nezavisno od navedene katalitičke funkcije.

1.3.1.3. Adhezini koji vezuju plazminogen, kolagen i CD44 protein

Proteini koji vezuju plazmin/plazminogen su veoma bitni kao faktori invazivnosti kod kožnih GAS infekcija. Najvažniji proteini su streptokinaza, PAM- protein sličan M proteinu, enolaza i GADPH. U zdravom organizmu plazmin aktiviraju urokinaza i tkivni aktivatori. Streptokoke su sposobne da iskoriste tkivne aktivatore (urokinazu) ili sekretuju streptokinazu koja prevodi plazminogen u aktivni plazmin. Plazmin vezan za površinu GAS aktivira metaloproteaze i kolagenaze koje razgrađuju ekstracelularni matriks i dovode do diseminacije bakterije u tkiva [20]. PAM je specijalizovani multifunkcionalni M protein koji djeluje sinergistički sa streptokinazom [22]. PAM vezuje plazminogen, a streptokinaza ga prevodi u plazmin. Kod površinskih kožnih infekcija, PAM i streptokinaza usporavaju nastanak ožiljka i odlažu zarastanje rane, olakšavajući GAS lakši prelazak na novog domaćina.

Kolagenu slični proteini su SclA i SclB proteini, koji imaju funkcionalne osobine humanog kolagena, vezuju se za integrin $\alpha 2\beta 1$ i aktiviraju intracelularni signalni put, koji dovodi do ulaska GAS u ćeliju [23].

Streptokokna kapsula je građena od hijaluronske kiseline, koja se sastoji od naizmjenično vezanih N-acetilglukoamina i glukuronske kiseline. Produkciju kapsule kodira *has* operon sastavljen od tri gena: *hasA* kodira hijaluronat sintazu, *hasB* kodira UDP-glukoza dehidrogenazu i *hasC* kodira UDP glukoza pirofosforilazu. Ne proizvode svi GAS sojevi istu količinu kapsule, što im daje različitu otpornost na fagocitozu i intracelularnu invaziju. Sojevi sa najizraženijom kapsulom su mukoidnog izgleda na krvnom agaru i najčešće se izoluju iz osoba oboljelih od invazivnih infekcija [17]. U epidemiološkoj studiji [24] samo 3% sojeva izolovanih iz GAS faringitisa je proizvelo kapsulu, dok je istu osobinu pokazalo 21% sojeva iz invazivnih infekcija i čak 42% sojeva izolovanih iz osoba oboljelih od reumatske groznice. Kapsula omogućava vezivanje za Hep-2 ćelijsku kulturu i za keratinocyte. Kapsula se vezuje za CD44 protein na humanim epitelnim ćelijama, indukujući reorganizaciju citoskeleta i kidanje intercelularnih veza, pri čemu bakterija penetrira epitel, ali i dalje ostaje ekstracelularno smještena, dovodeći do daljeg širenja kroz međućelijski matriks [25].

1.4. Biofilm- definicija, građa i nastanak

Od samog početka mikrobiologije duboko je ukorijenjeno uvjerenje da bakterije preživljavaju kao planktonski ili slobodnoživeći mikroorganizmi kako u spoljašnjoj sredini, tako i na mjestu infekcije.

Većina eksperimentalnog rada u bakteriologiji je izvedena upravo sa bakterijama koje su rasle na ovakav način u tečnim podlogama *in vitro*. Planktonske bakterije imaju hidrofilnu površinu i ne posjeduju glikokaliks u vidu zaštitnog sloja, te su zbog toga osjetljivije na antibiotike i imunski sistem domaćina. Kada rastu u kulturi pokazuju eksponencijalnu krivu rasta zavisno od količine dostupnih hranljivih materija. Takođe, planktonski oblik bakterija pokazuje brz odgovor na faktore sredine, kao i ekspresiju gena koja je potpuno drugačija u odnosu na sesilan rast bakterija u biofilmu. Međutim, bilo u domaćinu, bilo u spoljašnjoj sredini, bakterije se veoma rijetko nalaze u uslovima kakvi su *in vitro*, te kao odgovor na nepovoljne uslove i stres u sredini sa nedovoljnom količinom hranjivih materija, prelaze u odbrambeni, sesilni način rasta, tj. formiraju biofilm. Danas se zna da je većina bakterija u prirodi organizovana u vidu biofilma [26], a uloga biofilma u humanim infekcijama je počela da se ispituje tek prije nekoliko decenija, sa razvojem konfokalnog mikroskopa. Utvrđeno je da je 65% humanih infekcija povezano sa nastankom biofilma [27].

Biofilm je sesilna zajednica mikroorganizama, ireverzibilno vezanih za supstrat i međusobno okružena matriksom od sopstvenih polisaharidnih polimera, koja se fenotipski razlikuje od planktonskih sojeva od kojih je potekla. Ove fenotipske razlike se odnose na izmijenjenu brzinu razmnožavanja i različitu transkripciju gena u odnosu na planktonske sojeve [26]. Biofilm se može formirati na živim i neživim površinama i mogu ga formirati samo jedna ili više različitih vrsta bakterija. U biofilmu bakterije pokazuju “kolektivno” ponašanje, tokom kojeg formiraju biološki sistem sa visokim stepenom organizacije i grade koordinisanu i funkcionalnu zajednicu. Zavisno od vrste mikroorganizama, fizičkih faktora sredine i količine dostupne hrane, postoje tri različita strukturalna tipa biofilma: heterogeni mozaični tip, porozni tip ispresijecan vodenim kanalima i gusti, konfluentni tip. Za sva tri tipa je zajedničko da sadrže mikroorganizme, ekstracelularne polisaharidne polimere (EPS) i dijelove sa manjom gustinom koji služe kao transportni kanali. U sredinama sa nedovoljnom količinom hranjivih materija stvara se heterogeni mozaični tip, pri čemu se na supstratu stvara tanak i gust bakterijski sloj, od kojeg u okolinu polaze mikrokolonije u vidu stubića dugačkih i do 100 mikrometara. Porozni tip, u obliku gljive, je građen od većih mikrokolonija, koje su povezane sa supstratom preko tanjih traka ekstracelularnih polimera. Između mikrokolonija i veznih traka se provlače vodeni kanali koji dopremaju materije i nutrijente iz okoline do pojedinačnih bakterija. Ovaj tip se javlja u prirodi, najčešće je polimikroban i sadrži, ne samo različite vrste bakterija, nego i protozoe, gljive i diatomeje. Treći, gusti, konfluentni tip se nalazi na dentalnom plaku. Građen je od različitih bakterijskih vrsta koje međusobno kooperiraju i razmjenjuju hranjive materije. Iako se čini da u ovom tipu postoje ograničenja rasta zbog nutrijenata, ovakav tip biofilma može da dostigne najveću gustinu i debljinu.

Formiranje biofilma se odvija u nekoliko faza. Prvo se stvara mladi biofilm koji vremenom sazrijeva, postaje stabilan i dobija nove karakteristike. Jedna od značajnih osobina zrelog biofilma je odvajanje njegovih dijelova i rasipanje bakterija u okolinu, tj. u druge dijelove ljudskog tijela, omogućivši time širenje postojeće i nastanak sistemskih infekcija. Najvažniji dio biofilma je matriks, koji se najvećim dijelom sastoji od vode (95-99%), EPS (2%) i mikroorganizama (2-5%). EPS je visoko hidrirani biopolimer sličan gelu, koji imobilizira bakterije u sastavu trodimenzionalne strukture, odgovoran je za adheziju i stabilizaciju matriksa i za dostupnost hranljivih materija svim dijelovima biofilma. Biofilm može djelovati poput filtera i koncentrisati čestice sredine u kojoj se nalazi, te zbog toga može biti različitog sastava zavisno od površine na kojoj se formirao (fibrin, eritrociti, trombociti, DNK, RNK, lipidi, proteini, enzimi). Fibrin u biofilmu na srčanim zaliscima stvara pokrovni sloj koja štiti bakterije od leukocita i dovodi do nastanka infektivnog endokarditisa [28]. Urinarni kateteri često sadrže biofilm građen od bakterija koje proizvode ureazu i razlažu ureu do amonijaka, pri čemu se povećava pH sredine i stvaraju precipitati kalcijum i magnezijum fosfata koji zatvaraju kateter [29].

Površine na kojima se može naći biofilm su metal, plastika, kamen, čestice zemlje, medicinski implantati i tkiva [27]. Prva faza u nastanku biofilma je oblaganje površine organskim materijama. Na obloženu površinu se reverzibilno vezuju prvo planktonski sojevi koji uspiju da prevaziđu odbojne sile između supstrata i bakterija. U drugoj fazi sojevi stvaraju ireverzibilne veze sa supstratom pomoću adhezina (pili, fimbrije, flagele, površinski proteini). U trećoj fazi bakterije se umnožavaju i stvaraju mikrokolonije uronjene u polimerni matriks. Polimerni matriks je produkt samih bakterija i čini 50-90% mase biofilm [30]. Kroz matriks prolaze mnogobrojni vodeni kanali koji povezuju i hidriraju cjelokupni kompleks biofilma, te prenose hranjive materije i kiseonik do svih dijelova. Različite bakterije formiraju različit matriks koji se sa vremenom povećava. Matriksni polimeri mogu vezati jone metala, dvovalentne katjone (kalcijum ili magnezijum) i makromolekule (lipide, DNK, proteine) koji pojačavaju međusobnu povezanost komponentni matriksa [30]. Pojačana produkcija ekstracelularnih polimera se javlja u uslovima povećane koncentracije ugljenika i smanjene koncentracije fosfata, azota i kalijuma, te tokom faze usporenog bakterijskog rasta i razmnožavanja unutar biofilma [31]. U četvrtoj fazi se količina i masa biofilma maksimalno povećavaju i biofilm dobija izgled pečurke. U petoj fazi dolazi do otkidanja i odvajanja pojedinih dijelova mikrokolonija i kolonizacije novih, udaljenih površina i supstrata. Odvajanje dijelova biofilma nastaje zbog aktivne promjene strukture biofilma tokom vremena, te bakterije mogu opet postati pokretne i preći iz jedne mikrokolonije na drugu, zbog čega dolazi do slabljenja veza između mikrokolonija i do disperzije biofilma [32].

1.4.1. Značaj biofilma u patogenezi humanih infekcija

Slično ljudima, i mikroorganizmi imaju tendenciju udruživanja u nepovoljnim uslovima za život. Kolektivni način života omogućava im preživljavanje u uslovima u kojima bi većina planktonskih oblika bila eradikovana. Mehanizmi koji omogućavaju nastanak bakterijskih infekcija su sljedeći:

- prisustvo vještačkih implanta na kojima se formira biofilm
- odvajanje dijelova biofilma dovodi do prodora u cirkulaciju i širenja bakterija u druge dijelove organizma
- produkcija endotoksina u biofilmu u čijem sastavu se nalaze i Gram negativne bakterije
- otpornost na odbrambene mehanizme imunskog sistema domaćina
- stvaranje niše u kojima se mogu razmnožavati rezistentni oblici nastali razmjenom genetskog materijala među mnogobrojnom bakterijskom populacijom
- otpornost na antimikrobne lijekove.

Svi ovi mehanizmi pojedinačni ili udruženi dovode do hroniciteta infekcija povezanih sa biofilm produkujućim bakterijama ili do nastanka akutnih infekcija rezistentnih na terapiju koja se sa manjim ili većim uspjehom primijenjivala.

1.4.2. *Streptococcus pyogenes* i biofilm

Ranije se smatralo da veoma mali broj bakterija može formirati biofilm, a danas je dokazano da većina bakterija produkuje biofilm, među ostalima i *Streptococcus pyogenes*. Prvo je mikroskopski uočeno da GAS formira mikrokolonije u lezijama pacijenata sa kožnim infekcijama [33], da bi kasnije bilo potvrđeno stvaranje biofilma na kožnim infekcijama laboratorijskih životinja [34]. Danas se smatra da produkcija biofilma omogućava *in vitro* osjetljivim sojevima rezistenciju na antibiotike i dovodi do terapijskog neuspjeha. Čak je uočeno da su bolji produktori neinvazivni sojevi različitih vrsta streptokoka u odnosu na invazivne sojeve [35, 36], kao i da su GAS sojevi osjetljivi na eritromicin bolji produktori u odnosu na eritromicin rezistentne sojeve [37]. Ovo potvrđuje činjenicu da je biofilm zaštitni mehanizam, koji omogućava bakterijama da prežive dejstvo antibiotika i imunskog sistema domaćina, tako što olakšava horizontalni prenos gena i stvaranje virulentnih klonova.

Za prvu fazu u procesu adherencije smatra se da su najbitniji M protein i lipoteihoinjska kiselina (LTA), jer su hidrofobni i omogućavaju prevazilaženje početnih odbojnih sila. Kod nekih M serotipova (npr. M1, M12, M28 i M49) koji pokazuju drugačije ponašanje prilikom produkcije biofilma, smatra se da najvažniju ulogu u početnoj adherenciji imaju drugi proteini, zajednički

nazvani MSCRAMM (engl. Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule- površinske mikrobne komponente koje prepoznaju adhezivne molekule matriksa). Postoji znatan broj MSCRAMM proteina koji vezuju fibronektin i kolagen, a geni najznačajnijih su smješteni u FCT regionu, na kojima se nalaze i geni za pile GAS [38]. Svi ovi geni su pod kontrolom specifičnih transkripcionih regulatora i djeluju sinergistički u cilju bolje početne adherencije i stvaranja funkcionalnog biofilma. Pored ovih adhezivnih proteina, uočena je i uloga streptokoknog pirogenog egzotoksina B (SpeB) kao bitnog faktora za nastanak i formiranje zrelog biofilma [39]. Gen *speB* je sa *sdal* genom pod kontrolom istog regulatora CrsR/S, ali tako da ovaj regulator aktivira *speB*, a inaktivira *sdal*. *Sdal* gen kodira streptokoknu DNAzu, koja razlaže DNK razorenih bakterija i ćelija domaćina i omogućava disperziju biofilma i prelazak streptokoka iz biofilm produkujućih sojeva u invazivne. Specifična osobina streptokokne DNAze je njen smještaj na površinu ćelije. Pretpostavka je da SpeB, kao cistein proteaza, razlaže DNAzu na okolnim GAS ćelijama u biofilmu i tako zadržava bakterije u okviru biofilma. Zbog dejstva još uvijek nepoznatih faktora, dolazi do inaktivacije CrsR/S regulona i SpeB, čime se aktivira DNAza i nastaju invazivni sojevi koji doprinose širenju infekcije po organizmu.

1.4.2.1. Streptokokno kliconoštvo

Streptococcus pyogenes je jedan od najznačajnijih humanih patogena. Može da izazove invazivna (nekrotizirajući fasciitis, celulitis, hirurške infekcije rana, sepsa), neinvazivna oboljenja (tonzilofaringitis, impetigo, otitis, erizipel) i bolesti toksemičnog karaktera (šarlah, toksični šok sindrom). Posebnu grupu predstavljaju poststreptokokne nesupurativne sekvele i kliconoštvo nakon streptokokne angine. Streptokokno kliconoštvo je definisano kao izolovanje streptokoka iz nazofarinksa ili orofarinksa asimptomatskih zdravih osoba, koje su ranije liječene od streptokokne angine. Kliconoštvo se ne liječi, osim u slučajevima ponovnog pojavljivanja bolesti ili opasnosti od nastanka reumatske groznice. Hronično faringealno kliconoštvo može trajati od 6 do 12 mjeseci. Tokom zime i proljeća u toplim klimatskim područjima i do 20% djece školskog i predškolskog uzrasta mogu biti kliconoše.

Postoji nekoliko objašnjenja za neuspjeh eradikacije streptokoka terapijskim tretmanom. Ranije se spekulisalo postojanju GAS rezistentnog na peniclin, ali *in vitro* još uvijek nije izolovan nijedan ovakav soj. Neki autori zastupaju mogućnost tolerancije na penicilin [40], koja podrazumijeva da su neophodne veće doze antibiotika koje bi djelovale baktericidno na GAS u organizmu. Eksperimentalnim putem je dokazano da postoje izolati koji su pokazali određenu toleranciju prema penicilinu, ali još uvijek nije nađen direktan dokaz između kliconoštva i GAS tolerancije. Drugi autori pretpostavljaju da normalna faringealna flora može interferirati sa GAS kolonizacijom [41],

te da izostanak normalne flore omogućava perzistenciju streptokoka u grlu. Takođe, normalna flora može sekretovati beta laktamaze, koje inaktiviraju penicilin i dovode do neuspjeha terapije.

Najvjerojatnija objašnjenja streptokoknog kliconoštva su internalizacija u ćeliju i stvaranje biofilma u kriptama tonzila. Iako je streptokok bio knjiški primjer ekstracelularne bakterije i kao takav se izučavao, prije desetak godina je uočena pojava internalizacije streptokoka u ćelije. Unutar ćelije streptokok je zaštićen od dejstva antibiotika i imunskog sistema. Penicilin slabo prodire u ćelije, i zbog toga se u terapiji kliconoštva koriste makrolidi i linkozamidi, antibiotici koji mogu prodrijeti u ćeliju i eradikovati GAS.

Najnovija objašnjenja kliconoštva se zasnivaju na stvaranju biofilma među epitelnim ćelijama tonzila osoba koje su imale učestale tonzilofaringitise, kao i kod osoba koje su imale adenoidnu hipertrofiju bez učestalih tonzilofaringitisa [42]. Agregacija planktonskih sojeva u okviru biofilma bi mogla objasniti neuspjeh antibiotskog tretmana, jer su bakterije u biofilmu fenotipski i genotipski potpuno različite od planktonskih sojeva koje ispituje *in vitro*. Takođe, biofilm fizički onemogućava prodor antibiotika do bakterija. Utvrđeno je da penicilin čak i u koncentracijama znatno višim od onih koje se mogu bezbjedno postići u organizmu, ne može da prođe u biofilm i da dovede do njegove eradicacije [36]. Sve ovo upućuje na činjenicu da bi biofilm mogao imati ključnu ulogu u objašnjenju neuspjeha penicilinskog tretmana streptokokne angine i pojave hroničnog kliconoštva. U prirodi je biofilm građen od više različitih vrsta koje jedne drugima nadoknađuju faktore neophodne za preživljavanje i uzajamno koriste produkte metabolizma drugih vrsta, olakšavajući međusobno preživljavanje u inače teško održivim uslovima sredine. Bilo bi zanimljivo ispitati da li u slučaju kliconoštva, biofilm sadrži čistu kulturu GAS ili se u biofilmu nalaze i druge bakterije, npr. oralne streptokoke ili drugi rodovi oralnih bakterija koje koegzistencijom dovode do zajedničkog opstanka u našem organizmu.

1.4.3. Značaj i mehanizmi prodora GAS u ćelije

Adherencija predstavlja prvi korak ka stvaranju biofilma, internalizaciji u ćeliju i invaziji u duboka tkiva. Još uvijek nije potpuno rasvijetljena uloga internalizacije u patogenezi GAS infekcija. Neki autori tvrde da adherencija i internalizacija bakterije u ćeliju domaćina onemogućava njeno širenje i nastanak diseminovanih infekcija [43]. Drugi autori tvrde da ulaskom u ćelije, GAS izbjegava imunski odgovor domaćina i dejstvo antibiotika koji ne prodiru u ćeliju, olakšavajući tako perzistenciju i kliconoštvo [44]. Ove tvrdnje potvrđuje činjenica da su neinvazivni sojevi

fagocitovani efikasnije u odnosu na invazivne sojeve. Utvrđeno je da GAS može preživjeti unutar ćelije i do 7 dana, te da nakon internalizacije preživjele bakterije mogu izaći izvan ćelije i nastaviti sa razmnožavanjem u ekstracelularnom prostoru [45]. Tokom boravka u ćeliji, GAS može nakon početnog razmnožavanja, dovesti do apoptoze epitelnih ćelija, a njihove ostatke iskoristiti u svom metabolizmu nakon izlaska iz ćelije [25]. Takođe, internalizacija može nastati i kao dio uspješnog urođenog odgovora domaćina na prisustvo patogena, što je dokazano činjenicom da su sojevi sa tankom kapsulom efikasnije fagocitovani i da su u eksperimentalnim ispitivanjima sa životinjama pokazali slabu virulentnost [46]. Trenutna pretpostavka je da su sve ove teorije tačne, te da internalizacija predstavlja različite mehanizme zavisno od virulentnosti bakterija i mjesta ulaska u domaćina (grlo ili koža).

Invazija podrazumijeva prolazak kroz epitelne ili endotelne ćelije putem transcitoze, paracelularne translokacije ili direktnim oštećenjem ćelija. Dosad su izučena tri mehanizma prodora GAS u ćeliju vezivanjem za fibronektin. Prvi način internalizacije se ostvaruje pomoću mehanizma „rajsfešlusa“ („zipper“ mehanizma). Drugi način se odvija preko stvaranja velikih invaginacija u ćelijskoj membrani, tzv. kaveozoma. Treći način se odvija klasičnim putem preko nabiranja membrane (mehanizam okidača). Mehanizam „rajsfešlusa“ podrazumijeva početno vezivanje streptokoknih proteina SfbI/F1 za RGD aminokiselinsku sekvencu fibronektina, koji onda služi kao premosnica do $\alpha 5\beta 1$ integrina u ekstracelularnom matriksu. Nakupljanje ~~šć~~ integrina na ograničenom dijelu citoplazme dovodi do okidanja ovog mehanizma kojim se bakterije unose u citoplazmu. Vezivanjem integrina za ćeliju dovodi do signalne transdukcije preko specijalnih struktura nazvanih fokalni adhezini i fokalni kompleksi, koji sadrže nakupine integrina i brojne signalne i strukturne komponente čija je uloga u povezivanju sa komponentama u ćeliji ili citoskeletu [47, 48]. Nakon nakupljanja integrina na ulaznom mjestu u ćeliji dolazi do aktivacije dva različita signalna puta-FAK i Src kinaza, te aktivacije Rac1 i Cdc42 puta [49]. Ova dva puta dovode do rearanžmana aktina i ulaska bakterije u ćeliju preko zipper mehanizma. Najnoviji uočeni mehanizam je kod SfbI pozitivnih sojeva koji se vezuju za $\beta 1$ integrin preko fibronektina [50]. Nakupljanje ovog integrina dovodi do stvaranja velikog broja manjih invaginacija nazvanih kaveole, koje se udružuju u veliku invaginaciju- kaveozom. U ovoj invaginaciji se, osim kaveolina 1, ne nalazi nijedan drugi proteinski marker endocitoznog puta. Takođe, ne dolazi ni do spajanja kaveozoma sa lizozomom. Treći način ulaska preko fibronektina je pomoću M- proteina, pri čemu se nakon nakupljanja integrina na površini ćelije aktivira kinaza vezana za integrine matriksa (ILK). Tad dolazi do rearanžmana aktinskih niti u mikrovilima, koji se skupljaju oko GAS i stvaraju pseudopodama slične organele kojima obuhvata bakterije i unesu je u ćeliju. U ovoj vezikuli se nalaze proteinski markeri klasičnog endocitoznog puta, što kasnije dovodi do spajanja lizozoma sa ovom vezikulom.

Drugi mehanizmi internalizacije streptokoka se odvijaju pomoću laminina i hijaluronske kapsule. Laminin, kao i fibronektin, također, omogućava internalizaciju streptokoka u ćelije domaćina. Najznačajniji površinski protein GAS koji se vezuje za laminin je SpeB. Noviji podaci govore da su sojevi izolovani iz pacijenata sa invazivnim infekcijama bolji produktori SpeB u odnosu na sojeve iz površinskih kožnih infekcija ili faringitisa [51]. Pretpostavka je da SpeB vezivanjem za laminin podstiče diseminaciju, jer se laminin vezuje za integrine $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ i $\alpha 6\beta 1$ i dovodi do internalizacije te kasnije diseminacije bakterija u ćelije domaćina.

Hijaluronska kapsula vezivanjem za CD44 na keratinocitima omogućava paracelularnu translokaciju GAS, tokom koje dolazi do cijepanja intercelularnih veza i širenja bakterije u međucelijski prostor [50]. Kapsula, također, onemogućava fagocitozu GAS, pomažući i na taj način diseminaciju bakterija.

1.5. Ekologija biofilma

Bakterije u biofilmu imaju nekoliko osobina po kojima se razlikuju od planktonskih sojeva. Biofilm im pruža zaštitu od spoljašnje sredine. U biofilmu su rast i razmnožavanje bakterija i ekspresija fenotipskih karakteristika drugačiji u odnosu na planktonske sojeve. Zbog međusobne povezanosti i upućenosti jednih na druge biofilm je idealno mjesto za prenos genetskog materijala, uspostavljanje različitih međudnosa i poseban vid komunikacije koji se naziva detekcija kvoruma.

1.5.1. Zaštita bakterija u biofilmu

U biofilmu su bakterije zaštićene od imunskog sistema domaćina (leukociti, antitijela, aktivacija komplementa i baktericidnost seruma) i od dejstva antibiotika. Sam upalni proces, također, doprinosi stvaranju biofilma, jer raspadni produkti okolnih ćelija, leukocita i bakterija se uvlače u biofilm i iskorištavaju kao gradivni elementi. Matriks biofilma je, uglavnom, građen od vode, pri čemu su vodene molekule čvrsto vezane za EPS i sprečavaju brzo isušivanje biofilma. EPS i drugi adhezini čvrsto vezuju biofilm za supstrat, onemogućavajući time odstranjivanje biofilma sa podloge, čak i u uslovima turbulencije i u prisustvu odbrambenih mehanizama domaćina. Matriks štiti bakterije od UV zračenja, promjena pH sredine i oksidativnog i osmotskog šoka [52]

1.5.2. Rast i razmnožavanje bakterija u biofilmu

Rast i razmnožavanje bakterija su usporeni u biofilmu zbog ograničene količine hranjivih materija. Biofilm može biti izgrađen od jedne ili više vrsta bakterija. Vodeni kanali koji se prostiru kroz biofilm služe za raznošenje nutrijenata do svih njegovih dijelova. Takođe, i produkti metabolizma se ovim istim kanalima izbacuju iz biofilma, sprečavajući njihovo štetno dejstvo. U biofilmu građenom od velikog broja gusto zbijenih vrsta, npr. dentalni plak, postoji snažna i bliska kooperacija svih vrsta. Ove vrste ne samo da dijele nutrijente, nego i razgradni produkti jedne vrste služe kao izvor hrane drugim vrstama. Time se onemogućava nastanak toksičnih produkata i maksimalno iskorištavaju sve dostupne supstance. Po ovom principu anaerobne bakterije se nalaze u donjim dijelovima biofilma bez kiseonika, koji su iskoristile aerobne bakterije u gornjim slojevima ili se anaerobi nalaze blizu aeroba, koji brzo iskoriste kiseonik i stvaraju lokalnu anoksičnu sredinu pogodnu za razmnožavanje anaeroba.

1.5.3. Izmjena fenotipskih osobina bakterija u biofilmu

Unutar biofilma su uslovi sredine potpuno različiti u odnosu na sredinu u kojoj se razmnožavaju planktonski sojevi. Bakterije u biofilmu se veoma brzo prilagođavaju ovim uslovima sredine. Prilagođavanje je posljedica ekspresije različitih gena kojima se stiču nove osobine neophodne za preživljavanje. Vraćanjem u prvobitne uslove bakterije pokazuju isti fenotip, kao i planktonski sojevi od kojih su potekli.

Fenotipske osobine mogu biti posljedica i genetskih mutacija ili, češće, sticanja novih gena preko plazmida procesom konjugacije. Unutar biofilma bakterije su blisko postavljene jedna uz drugu, što olakšava konjugaciju. Dokazano je da sojevi koji posjeduju konjugativne plazmide formiraju češće biofilm u odnosu na sojeve bez plazmida, jer se pretpostavlja da su F pili odlični adhezini [53]. Sojevi bez plazmida mogu u istim uslovima stvoriti samo mikrokolonije bez daljeg razvoja u kompletan biofilm [53]. Kod bakterija u biofilmu je dokazana znatno češća razmjena plazmida u odnosu na miješane tečne kulture istih mikroorganizama. Na plazmidima se nalaze geni koji kodiraju rezistenciju na beta laktamske antibiotike, eritromicin, aminoglikozide, tetracikline, glikopeptide, trimetoprim i sulfonamide, čime bi se moglo djelomično objasniti rezistencija bakterija u biofilmu na navedene antibiotike.

1.5.4. Detekcija kvoruma- minimalne potrebne koncentracije bakterija

Sposobnost intercelularne komunikacije u biofilmu je od presudnog značaja. U biofilmu je otkriven poseban vid komunikacije koji se zove detekcija kvoruma ili minimalne potrebne koncentracije bakterija, a uspostavlja se tek kad se u neposrednoj blizini postigne dovoljna gustina, tj. dovoljan broj bakterija. Gram negativne bakterije sintetiziraju i luče molekule iz porodice acil-homoserin-laktona (AHL) koje imaju autoindukujuće ulogu. Bakterije kontinuirano luče malu količinu autoindukujućih molekula, koje ne postižu dovoljnu koncentraciju, tj. kvorum ukoliko bakterije nisu grupisane u biofilmu. U slučaju dovoljne gustine populacije, tj. biofilma, bakterije sintetiziraju signalnu molekulu u dovoljnoj koncentraciji da bi se mogla vezati za protein koji aktivira transkripciju odgovarajućeg gena. Protein aktivator transkripcije na karboksilnom kraju ima sekvencu od 19 aminokiselina koja mu omogućava vezivanje za promotor na DNK. Suprotni, N-kraj molekule aktivatora može da onemogući vezivanje aktivatora za promotora, ali u prisustvu autoindukujuće molekule amino dio se blokira i aktivator se uspješno vezuje za promotorsku sekvencu na DNK [54].

Gram pozitivne bakterije ne koriste AHL sistem za detekciju kvoruma. One sintetiziraju oligopeptide koji pomoću ABC transporterskih proteina difunduju kroz citoplazmatsku membranu [53]. Oligopeptidi se najčešće sintetiziraju kao neaktivni prekursori, pa se nakon obrade vezuju za dvokomponentni signalni transdukujući sistem (TCSTS). Ovaj sistem se sastoji od dvije molekule. Prva molekula detektuje oligopeptid svojim periplazmatskim N- krajem i nakon vezivanja oligopeptida dolazi do autofosforilacije histidinske rezidue na karboksilnom kraju molekule; zbog ove osobine često se još naziva i senzor kinaza. Autofosforilisana senzor kinaza je sposobna da reaguje sa drugom molekulom TCSTS, koja se zove regulator odgovora. Aktivirani regulator nastaje fosforilacijom aspartatne rezidue na njegovom amino kraju i nakon toga postaje sposoban da se veže za DNK.

Pravi značaj detekcije „kvoruma“ još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, ali se pretpostavlja da ima ulogu u razgradnji složenih materija, produkciji faktora virulencije i transferu DNK. Bakterije ne mogu unijeti složene materije, nego luče egzozime koji u spoljašnjoj sredini razlažu složene materije na proste. U slučaju kompleksnih materija, neophodno je da postoji dovoljan broj bakterija, tj. „kvorum“, jer će se tek tad sintetisati dovoljno enzima neophodnih za razlaganje tako kompleksne supstance. Transfer DNK iz jedne u drugu ćeliju je moguć samo u slučaju da se u neposrednoj blizini nalazi dovoljan broj, tj. „kvorum“ bakterija. Faktori virulencije su veoma bitni za nastanak infekcije i treba ih sintetisati i sekretovati u spoljašnju sredinu u dovoljnoj količini da bi oštetile tkivo ili prevazišle imunski odgovor domaćina. U slučaju da nema dovoljnog broja

bakterija, tj. „kvoruma“, količina faktora virulencije će biti nedovoljna i neće nastati infekcija. Ako su bakterije sposobne da detektuju kvorum, tj. da odrede da je postignuta dovoljna gustina i broj bakterija, tad je smisljeno sintetisati i sekretovati faktore virulencije, jer su tad sigurne da će nadvladati odbranu domaćina i dovesti do nastanka infekcije.

1.5.5. Miješane kulture u biofilmu

Kliničke infekcije u organizmu su jedino stanje u kojem je prisutna samo jedna vrsta bakterija u biofilmu. U prirodi i u organizmu čovjeka u biofilmu se mogu naći ne samo različite vrste bakterija, nego i različiti mikroorganizmi: virusi, gljive, protozoe i alge. Najbolji primjer su dentalni plak i biofilm u crijevima. Mikroorganizmi u miješanim kulturama su vezani međusobno i za supstrat, pomoću adhezije i agregacije. Ove miješane kulture omogućavaju maksimalno iskorištavanje hranjivih materija, omogućavaju preživljavanje anaerobnih bakterija u aerobnim uslovima sredine, kao i zaštitu od antibiotika na koje su inače osjetljive. Takođe, kolektivnim načinom ponašanja, bakterije koje pojedinačno nisu patogene, zajedničkim faktorima virulencije i inaktivacijom antibiotika postaju patogene i dovode do nastanka bolesti. U miješanim kulturama bakterije jedne vrste štite osjetljive bakterije druge vrste produkcijom enzima koji inaktiviraju antibiotike (npr. produkcija beta laktamaza koje inaktiviraju beta laktamske antibiotike).

1.6. Uloga biofilma u otpornosti bakterija na antimikrobne lijekove

Formiranje biofilma donosi bakterijama koje se nalaze u njegovoj strukturi povećanje otpornosti na antibiotike. Do promjene osjetljivosti bakterija koje su u biofilmu dolazi usljed dejstva većeg broja faktora:

- kompaktna struktura biofilma
- sposobnost polimera matriksa da uspore ili onemoguće penetraciju supstance u biofilm vezujući ih za sebe
- usporen rast, razmnožavanje i metabolizam bakterija i
- različit fenotip bakterija u biofilmu u odnosu na planktonske sojeve, zbog eksprimiranja različitih zaštitnih faktora

Prema dostupnim podacima bakterije u biofilmu su 10- 1000 puta otpornije na iste antimikrobne supstance u odnosu na planktonske sojeve [55-58].

1.6.1. Značaj ekstracelularnih polimera matriksa u penetraciji antimikrobnih lijekova

Uočeno je da hemijski reaktivne molekule i molekule koje posjeduju pozitivno naelektrisanje, te molekule koje su supstrat za određene enzime (npr. beta laktamaze) slabo prodiru u biofilm. Bakterije u biofilmu su fizički zaštićene ekstracelularnim polimerima koje proizvode da bi formirale matriks. Ovi polimeri fizički značajno smanjuju prodor antibiotika u unutrašnjost biofilma [59]. Stepenn penetracije u biofilm zavisi od vrste antibiotika i nije direktno povezan sa osjetljivošću planktonskih bakterija na antibiotik [60]. Antibiotik u biofilmu ne penetrira uniformno i ravnomjerno kroz sve dijelove, nego prodire kroz šupljine između mikrokolonija i to u različitim omjerima i koncentracijama. Ekstracelularni polimeri matriksa sa svojim hidrofobnim krajevima vezuju antibiotike i ometaju njihov prodor u sve dijelove biofilma. Izuzetno rezistentni sojevi bakterija iz biofilma, nakon odstranjenja polimera matriksa, postaju osjetljivi na antibiotike gotovo u istom procentu kao i planktonski [61]. Ovaj bioelektrični efekat bi se mogao prevazići izmjenom naelektrisanja bakterija u biofilmu, što je i urađeno eksperimentalnim putem [62]. Rezultati dobijeni tim eksperimentom su pokazali da su koncentracije antibiotika potrebne za eradikaciju biofilma značajno smanjene, ali su i takve koncentracije, ipak, značajno više u odnosu na koncentracije kod planktonskih sojeva.

Smanjen prodor u biofilm ne može potpuno objasniti smanjenje osjetljivosti na antibiotike, nego je samo jedan od faktora koji tome doprinose. Takođe, i gustina bakterija u biofilmu je znatno veća (10^7 do 10^8 /ml) nego gustina planktonskih sojeva na mjestu infekcije, pa bi se i efekat inokuluma mogao svrstati u faktore koji doprinose rezistenciji biofilma na antimikrobne lijekove i biocide.

1.6.2. Rezistentni fenotip u biofilmu

Postojanje rezistentnog fenotipa bakterija u biofilmu je još jedan od mogućih faktora koji doprinose otpornosti na lijekove. Ovaj fenotip može preovladati kao jedini fenotip u biofilmu ili se može javiti na površini biofilma ili u dijelovima mikrokolonija kao posljedica prisustva antimikrobnih lijekova. Eksperimenti sa *S. aureus* i *E. coli* ukazuju da ove bakterije značajno smanjuju osjetljivost na antibiotike neposredno nakon vezivanja za supstrat i početka formiranja biofilma [63]. Pretpostavlja se da ovaj novonastali fenotip bakterija stiče sposobnost da izbacuje antibiotik iz svoje sredine, zbog prisustva supstanci sličnih homoserin laktonu. Ove supstance utiču na detekciju neophodne granične gustine bakterijskih ćelija i na sposobnost bakterija da osjete da se nalaze unutar ograničene površine.

Značajna osobina rezistentnog fenotipa je postojanje efluks pumpi za izbacivanje antibiotika. Geni koji kodiraju ove pumpe se mogu naći na hromozomu i na plazmidima. Mutacije ovih gena dovode do pojačane ekspresije ovih pumpi i njihove aktivnosti. Dokazano je da prelazak bakterija iz planktonskog u fenotip biofilma, sam po sebi ne indukuje aktivnost ovih pumpi [64]. Glavni induktor njihove aktivnosti je izlaganje biofilma antibioticima, koji su ujedno i supstrat na koji one djeluju [65]. Nakon izlaganja subletalnim dozama antibiotika i biocida uočena je najveća ekspresija efluks pumpi kod bakterija u dubini biofilma, koje imaju najusporeniji metabolizam i razmnožavanje. Liječenje infekcija antibioticima koji djeluju kao supstrat za efluks pumpe može dovesti do klonalne ekspanzije konstitutivnih mutanta, pri čemu je nebitno da li su ti antibiotici induktori efluks pumpi.

Uočeno je da bakterije u biofilmu imaju drugačiju gensku ekspresiju i produkciju proteina u odnosu na planktonske sojeve iste vrste. Postoji pretpostavka da su te nepovezane osobine pod istom regulatornom kontrolom i da su vezane samo za produkciju biofilma. Eksperiment sa *P. putida* je dokazao da su sojevi sa smanjenom ekspresijom efluks pumpi, postali nesposobni i za adherenciju za supstrat, početni korak u formiranju biofilma [66].

1.6.3. Usporeni rast bakterija u biofilmu

Poznata je činjenica da su bakterije sa usporenim metabolizmom, rastom i razmnožavanjem relativno otpornije na dejstvo antibiotika u odnosu na brzodijeleće pripadnike iste vrste. Eksperimentalnim putem je izmjereno da sojevi unutar biofilma imaju manju metaboličku aktivnost, naročito bakterije u centru mikrokolonija [66]. Utvrđeno je da na samom početku stvaranja biofilma, tokom adherencije, sojevi u biofilmu imaju isti stepen aktivnosti kao i planktonski oblici. Nakon primarne kolonizacije i tokom početnog stvaranja mikrokolonija, aktivnost postepeno opada, da bi se prilikom stvaranja većih mikrokolonija i sa uvećanjem mase biofilma značajno smanjila, pogotovo kod bakterija u samom centru mikrokolonija. Smanjenje metaboličke aktivnosti se objašnjava postepenim opadanjem gradijenta koncentracije kiseonika i hranljivih materija od površine prema dubini biofilma. Tretiranjem biofilma antibioticima koji djeluju na nivou razmnožavanja bakterija, ubijaju se sojevi na površini biofilma, dok sojevi u dubini preživljavaju i postaju novi izvor infekcije. Zbog toga antibiotici koji nemaju baktericidni efekat na nivou diobe ćelije djeluju bolje protiv bakterija u biofilmu, pri čemu ni to dejstvo nije podjednako efikasno kao protiv planktonskih bakterija iste vrste [67]. U uslovima smanjene koncentracije kiseonika, bakterije manje preuzimaju aminoglikozide, te bi i to bio jedan od razloga manje

osjetljivosti bakterija u biofilmu [68]. Pretpostavlja se da je usporeni rast i metabolizam jedan od najznačajnijih faktora koji doprinose rezistenciji, ali da bakterije u biofilmu pokazuju i druge osobine, kao što su efluks pumpe i ekspresija regulona kao odgovor na stres. Najviše izučavan regulon je *rpoS* regulon kod *E.coli* koji kodira produkciju sigma faktora kao odgovor na stresne uslove smanjene koncentracije nutrijenata i kiseonika. Izolati *E. coli* koji su imali *rpoS* regulon su stvarali gušći biofilm sa većim brojem vijabilnih bakterija u odnosu na izolate bez *rpoS* regulona [69]. U ovom slučaju bi stvaranje biofilma bio odgovor bakterija na nepovoljne uslove okoline.

2. Hipoteza i ciljevi

Na osnovu dostupne literature postavili smo radnu hipotezu koja glasi:

Subinhibitorne koncentracije antibiotika dovode do izmjene u vezivanju neinvazivnih izolata, slabo invazivnih izolata i jako invazivnih izolata za polistirensku površinu i za laminin, što dovodi do promjene u njihovoj sposobnosti formiranja biofilma.

Na osnovu radne hipoteze postavili smo i ciljeve istraživanja:

1. formirati tri grupe izolata beta hemolitičkog streptokoka grupe A na osnovu kliničkog statusa osoba od kojih je izolovan:
 - i) neinvazivni izolati, izolovani od faringealnih kliconoša,
 - ii) slabo invazivni izolati, izolovani od pacijenata sa tonzilofaringitisom,
 - iii) jako invazivni izolati, izolovani od pacijenata sa invazivnim infekcijama.
2. ispitati da li između grupa postoji razlika u vezivanju za polistirensku površinu i za laminin (polistirensku površinu obloženu lamininom).
3. odrediti da li između grupa postoji razlika u hidrofobnosti
4. ispitati da li između grupa postoji razlika u produkciji SpeB.
5. testirati postoji li razlika u produkciji biofilma između tri grupe ispitivanih izolata.
6. utvrditi povezanost produkcije cistein proteaze SpeB sa produkcijom biofilma i vezivanjem za laminin.
7. utvrditi da li nakon tretmana sa subinhibitornim koncentracijama antibiotika postoji razlika između grupa u adherenciji za neobloženu ploču za mikrotitraciju i za laminin
8. analizirati da li subinhibitorne koncentracije antibiotika dovode do promjene u adherenciji za polistirensku površinu i laminin kod tri grupe ispitivanih izolata,
9. utvrditi da li nakon tretmana sa subinhibitornim koncentracijama antibiotika postoji razlika između grupa u hidrofobnosti
10. ispitati kako subinhibitorne koncentracije antibiotika utiču na hidrofobnost ispitivanih bakterija
11. utvrditi da li nakon uticaja subinhibitornih koncentracija antibiotika postoji razlika između ispitivanih grupa izolata u produkciji cistein proteaze SpeB

12. ispitati kako subinhibitorne koncentracije antibiotika utiču na produkciju cistein proteaze SpeB kod testiranih bakterija
13. utvrditi da li nakon uticaja subinhibitornih koncentracija antibiotika postoji razlika između ispitivanih grupa izolata u produkciji biofilma
14. testirati kako subinhibitorne koncentracije antibiotika utiču na produkciju biofilma kod biofilm produktora β - hemolitičkog streptokoka grupe A
15. utvrditi da li subinhibitorne koncentracije antibiotika dovode do indukcije stvaranja biofilma kod biofilm neprodukujućih izolata,
16. ispitati da li suprainhibitorne koncentracije stvaraju razliku između grupa u odnosu na produkciju biofilma, te kako utiču na produkciju biofilma u odnosu na netretirane izolate
17. utvrditi vrijednosti minimalne koncentracije za eradikaciju biofilma za sve ispitivane izolate.

3. Materijal i metode

3.1. Bakterijski izolati

U eksperimentalnom dijelu rada su korišćeno je 172 izolata *Streptococcus pyogenes* koji su na osnovu kliničkog statusa osobe od koje su izolovani podijeljeni u tri grupe:

1. neizvazivni izolati od kliconoša (SK grupa- 100 izolata),
2. slabo invazivni izolati uzročnici tonzilofaringitisa (ST grupa- 50 izolata) i
3. jako invazivni izolati izolovani iz krvi osoba sa invazivnim infekcijama (SI grupa- 22 izolata).

Neinvazivni izolati iz kliconoša su bili iz kolekcije sojeva Medicinskog fakulteta u Beogradu i prikupljeni su tokom 2011 i 2012. godine. Slabo invazivni izolati β - hemolitičkog streptokoka grupe A su se skupljali u mikrobiološkoj laboratoriji Instituta za javno zdravlje Republike Srpske u periodu od marta do juna 2012. godine. Jako invazivni izolati su bili iz kolekcije sojeva Medicinskog fakulteta u Beogradu i skupljani su tokom perioda od 22 godine.

Ispitivani sojevi su kultivisani na pločama krvnog agara (Columbia agar uz dodatak 5% goveđe krvi - CKA). Identifikovani su na osnovu analize morfoloških, kulturelnih i biohemijskih osobina (Tabela 2), a krajnja pripadnost određenoj serograpi je ispitana testom lateks aglutinacije na pločici (Slidex Strepto-kit, bio-Meriux, France).

Po identifikaciji, sojevi su kultivisani u Todd-Hewitt bujonu (THB), a prekonoćna kultura konzervirana dodavanjem glicerola (10% konačna koncentracija) i zamrzavanjem na -70°C . Kulture su, po potrebi, odmrzavane i presijavane na CKA i inkubirane 24 sata na 37°C . Od izraslih kolonija su pravljene suspenzije u fiziološkom rastvoru ili Todd-Hewitt bujonu, koje su korišćene tokom daljih eksperimenata.

Tabela 2. Testovi koji su korišćeni za identifikaciju BHS

Testovi
Preparat obojen po Gramu - Gram pozitivne koke u lancima
Kulturelne osobine - sitne kolonije sa zonom beta hemolize
Bacitracinski test
Test sa trimetoprim – sulfometoksazolom
Test lateks aglutinacije (Slidex Strepto - kit, bio Mereux)

3.2. Ispitivanje adherencije

Ispitivanje adherencije za neobloženu mikrotitarsku ploču i mikrotitarsku ploču obloženu lamininom je rađeno u plastičnim pločama za mikrotitraciju (Kartell, Italija) u atmosferskim uslovima. Takođe, ispitan je uticaj subinhibitornih koncentracija antibiotika penicilina, ceftriaksona, eritromicina, klindamicina i rifampicina na adherenciju za neobloženu mikrotitarsku ploču, kao i uticaj subinhibitornih koncentracija penicilina i eritromicina na adherenciju za laminin.

3.2.1. Ispitivanje adherencije za neobloženu mikrotitarsku ploču

Ispitivanje adherencije je rađeno po metodi Stepanović i sar [70], sa modifikacijom u gustini ispitivanog inokuluma. Iz prekonocne kulture sa CKA pikirane su 1-2 kolonije ispitivanog izolata i inokulisane u 2 ml Todd-Hewitt bujona sa dodatkom 1% ekstrakta kvasca (THY) i inkubirane tokom 16-18 časova na 37°C. Iz prekonocne suspenzije je pipetirano 20 µl kulture i inokulisano u 2 ml sterilnog THY. Iz tako pripremljenog razrjeđenja otpipetirano je 100 µl u plastičnu ploču za mikrotitraciju (Kartel, Italija). Za svaki soj su rađene po 3 probe. Zatim su izolati inkubirani 30 minuta na 37°C i nakon toga je sadržaj ploče za mikrotitraciju odstranjen pipetiranjem, a svaka rupica tri puta isprana puferom. Adherisane bakterije su fiksirane sušenjem na vazduhu. Poslije sušenja u svaku rupicu je pipetirano po 100 µl boje kristal violet iz seta za bojenje po Gramu (Bio-Merieux, France). Bojenje je trajalo 15 minuta, nakon čega su ploče tri puta isprane puferom i osušene na vazduhu. Da bi se resuspendovala boja, u svaku rupicu je dodato po 100 µl 30% sirćetne kiseline (Zorka, Šabac). Ekstinkcija je očitana na automatizovanom ICN Flow Titrek Multiscan Plus čitaču na λ od 570 nm.

Na svakoj ploči za mikrotitraciju su korišćene po 3 negativne probe, tj. u 3 rupice je inokulisan sterilan THY bujon, na osnovu kojih je određena granična (cutt-off) vrijednost ekstinkcije- OD_c, koja se izračunavala kao srednja vrijednost tri negativne probe uvećana za tri standardne devijacije. Izolati su označeni kao neadherentni, ako je $OD \leq OD_c$, i kao adherentni ako je $OD_c < OD$.

Kao pozitivna proba je korišćen soj *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990.

3.2.2. Oblaganje ploča za mikrotitraciju sa lamininom

Laminin (Sigma-Aldrich, SAD) u koncentraciji 0,5 mg/ml je razrijeđen u Henksovom slanom rastvoru (Sigma-Aldrich, SAD) do koncentracije 5 µg/ml. Prema uputstvima proizvođača u svaku rupicu mikrotitarske ploče je otpipetirano po 75µl razblaženog laminina i inkubirano tokom 2 sata na 37°C. Nakon toga ploče su isprane tri puta sa sterilnim Henkovim slanim rastvorom i korišćene u eksperimentu.

3.2.3. Ispitivanje adherencije za laminin

U mikrotitarskim pločama obloženim lamininom je vršeno ispitivanje adherencije kao u 3.2.1, s tim da je u svaku rupicu umjesto 100 µl otpipetirano po 75 µl ispitivane bujonske kulture.

3.3. Ispitivanje hidrofobnosti

Bakterijskim sojevima je bila ispitana hidrofobnost prema metodi Rosenberg i sar. [71], određivanjem procenta bakterija adherisanih za heksadekan i ksilen. Nakon toga je ispitan uticaj subinhibitornih koncentracija antibiotika na hidrofobnost bakterija pomoću ksilena.

3.3.1. Ispitivanje hidrofobnosti bakterija preko adherencije za heksadekan i ksilen

Prekonoćna THY kultura se centrifugira na 18 000 rpm tokom 20 minuta, bujon se odlije, a talog se dva puta pažljivo ispere sa PUM puferom. Ispran talog se resuspenduje u PUM puferu tako da je ekstinkcija suspenzije na λ od 540 nm iznosila 0,4 (A0). U ependorf epruvete se odlije po 1 ml ove suspenzije, doda 200 µl heksadekana i inkubira na 37 °C tokom 10 minuta. Ependorf epruveta se nakon inkubacije vorteksuje tokom 2 minute i ostavi na sobnoj temperaturi tokom 10 minuta da bi se razdvojila vodena faza od heksadekana. Pažljivo se otpipetira i izdvojene vodene faze, prebaci u rupicu u mikrotitarskoj ploči i ekstinkcija (A1) mjeri na automatizovanom ICN Flow Titrek Multiscan Plus čitaču na λ od 540 nm.

Iako smo koristili predloženi PUM pufer ispitivani izolati nisu uopšte vezivali heksadekan. Zbog toga smo odlučili da ispitamo uticaj kapsule u ometanju vezivanja bakterija za heksadekan [72]. Bakterije smo prethodno tretirali hijaluronidazom (Sigma-Aldrich) u koncentraciji od 5 jedinica po

mililitru bujonske kulture. Hijaluronidaza (0,08 mg) je rastvorena u 0,8 ml diluensa (20 mM natrijum fosfatni pufer, 77 mM natrijum hlorid i 0,01% goveđi albumin, pH 7), koji istovremeno ima i ulogu u stabilizaciji enzima (stok A). Stok A je razblažen u odnosu 1:10 (300 µl stoka A u 2700 µl diluensa) i dobijen je stok B. Iz stoka B je po 14 mikrolitara prebačeno u 1 ml tretirane bakterijske suspenzije u fosfatnom puferu (pH 6). Iz epruvete sa prekonocnom kulturom je uzeto 1,5 ml i centrifugirano na 18 000 rpm tokom 20 minuta; zatim je talog pažljivo ispran dva puta sa fosfatnim puferom pH 6,8 i resuspendovan u 1 ml istog pufera. U ovako pripremljenu bakterijsku suspenziju je dodato 14 µl hijaluronidaze i inkubirano tokom 45 minuta na 37°C. Dalji postupak mjerenja adhezije za heksadekan je isti kao što je prethodno opisano.

S obzirom da su ispitivani izolati i nakon odstranjenja kapsule hijaluronidazom veoma slabo vezivali heksadekan, prema uputstvima autora [73], isti eksperiment smo ponovili dodavanjem ksilena, koji takođe pripada grupi hidrokarbona. Eksperiment se izvodio na isti način kao sa heksadekanom, s tim što se umjesto heksadekana dodavao ksilen i umjesto PUM pufera fosfatni pufer (0,2 M).

Rezultati testa su određeni pomoću formule $[(A0-A1)/A0] \times 100$ i izraženi u procentima vezanog ksilena. Hidrofobnost je u istom odnosu kao procenat vezanih izolata. Što je veći procenat vezanog ksilena, veća je i hidrofobnost.

3.4. Ispitivanje prisustva streptokoknog pirogenog egzotoksina B

Za dokazivanje prisustva SpeB se koristi test na azokazeinskom agaru (Kolumbija agaru sa 1,5% obranog mlijeka (Biolife, Italija)) prema metodi Hynes i Tagg [74].

3.4.1. Ispitivanje prisustva streptokoknog pirogenog egzotoksina B kod netretiranih sojeva

Uvodnom ezom se kolonija GAS sa CKA zasije u azokazeinski agar i inkubira tokom 24 sata na 37°C. Nakon inkubacije se vrijednost SpeB mjeri semikvantitativno preko vrijednosti prečnika zone prosvijetljenja agara oko naraslih kolonija.

3.5. Ispitivanje produkcije biofilma

Ispitivanje sposobnosti bakterija da formiraju biofilm je rađeno u plastičnim pločama za mikrotitraciju (Kartell, Italija) u atmosferskim uslovima i uslovima inkubacije sa 5% CO₂. Takođe, ispitan je uticaj subinhibitornih i suprainhibitornih koncentracija antibiotika penicilina, ceftriaksona, eritromicina, klindamicina i rifampicina na produkciju biofilma u atmosferskim uslovima.

3.5.1. Ispitivanje produkcije biofilma u atmosferskim uslovima

Ispitivanje produkcije biofilma je rađeno po metodi Stepanović i sar [70], sa modifikacijom u koncentraciji ispitivanog inokuluma. Iz prekončne kulture sa CKA pikirane su 2-3 kolonije ispitivanog izolata i inokulisane u 5 ml THY i inkubirano tokom 16-18 časova na 37°C. Iz prekončne suspenzije je pipetirano 20 μ l kulture i inokulisano u 2 ml sterilnog THY. Iz tako pripremljenog razrjeđenja otpipetirano je 100 μ l u plastičnu ploču za mikrotitraciju (Kartel, Italija). Za svaki soj su rađene po 3 probe. Zatim su izolati inkubirani 12, 24 i 48 sati na 37°C. Izolatima koji su inkubirani 48 časova je nakon inkubacije od 24 časa dodano 50 μ l THY bujona. Nakon inkubacije je sadržaj ploče odstranjen pipetiranjem, a svaka rupica tri puta isprana puferom. Adherisane bakterije su fiksirane sušenjem na vazduhu. Poslije sušenja u svaku rupicu je pipetirano po 100 μ l boje kristal violet iz seta za bojenje po Gramu (Bio-Merieux, France). Bojenje je trajalo 15 minuta, nakon čega su ploče tri puta isprane puferom i osušene na vazduhu. Da bi se resuspendovala boja, u svaku rupicu je dodato po 100 μ l 30% sirćetne kiseline (Zorka, Šabac). Ekstinkcija je očitana na automatizovanom ICN Flow Titrek Multiscan Plus čitaču na λ od 570 nm.

Na svakoj ploči za mikrotitraciju su korišćene po 3 negativne probe, tj. u 3 rupice je inokulisan sterilan THY bujon. Na osnovu toga je određena granična (cutt-off) vrijednost ekstinkcije- OD_c, koja se izračunavala kao srednja vrijednost tri negativne probe uvećana za tri standardne devijacije. Izolati su označeni kao neproduktori biofilma, te slabi, umjereni i jaki produktori na osnovu formule:

OD < OD_c neproduktori

OD_c < OD < 2xOD_c- slabi produktori

2xOD_c < OD < 4xOD_c- umjereni produktori

4xOD_c < OD- jaki produktori.

Kao pozitivna proba je korišćen soj *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990.

3.5.2. Ispitivanje produkcije biofilma u uslovima sa 5% CO₂

Ispitivanje produkcije biofilma je izvedeno na isti način kao u poglavlju 3.5.1. sa tim izuzetkom da su sojevi inkubirani u termostatu sa prisustvom 5% CO₂.

3.6. Ispitivanje uticaja subinhibitornih koncentracija antibiotika na adherenciju, hidrofobnost, produkciju SpeB i formiranje biofilma

3.6.1. Ispitivanje uticaja subinhibitornih koncentracija antibiotika na adherenciju izolata za neobloženu mikrotitarsku ploču

Nakon utvrđivanja vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za svaki soj i svaki korišćeni antibiotik (penicilin, ceftriakson, eritromicin, klindamicin i rifampicin), određene su vrijednosti ½ MIK i ¼ MIK sa kojima su izolati tretirani.

Sa CKA je pikirana 1-2 kolonije i inokulisane u 1,9 ml THY sa dodatkom 100 µl odgovarajuće koncentracije antibiotika iz niza epruveta sa predrazblaženjem da bi se postigla krajnja koncentracija od ½ MIK, odnosno ¼ MIK antibiotika u 2 ml bujona. Zatim su inkubirane tokom 16-18 časova na 37°C. Iz prekonocne suspenzije je pipetirano 20 µl kulture i inokulisano u 1,9 ml THY u koji je dodato 100 µl odgovarajuće koncentracije antibiotika iz niza epruveta sa predrazblaženjem da bi se postigla krajnja koncentracija od ½ MIK, odnosno ¼ MIK antibiotika u 2 ml bujona. Iz tako pripremljenog razrjeđenja otpipetirano je 100 µl u plastičnu ploču za mikrotitraciju. Za svaki izolat su rađene po 3 probe. Zatim su izolati inkubirani 30 minuta na 37°C i nakon toga je sadržaj ploče odstranjen pipetiranjem, a svaka rupica tri puta isprana puferom. Adherisane bakterije su fiksirane sušenjem na vazduhu. Poslije sušenja u svaku rupicu je pipetirano po 100 µl boje kristal violet iz seta za bojenje po Gramu (Bio-Merieux, France). Bojenje je trajalo 15 minuta, nakon čega su ploče tri puta isprane puferom i osušene na vazduhu. Da bi se resuspendovala boja, u svaku rupicu je dodato po 100 µl 30% sirćetne kiseline (Zorka, Šabac). Ekstinkcija je očitana na automatizovanom ICN Flow Titrek Multiscan Plus čitaču na λ od 570 nm.

Antibiotici penicilin (penicillin G potassium salt, Applichem GmbH, Njemačka), eritromicin (erythromycin base, Biochemica, Applichem GmbH, Njemačka), klindamicin (Clindamycin hydrochloride, Biochemica, Applichem GmbH, Njemačka) i rifampicin (rifampicin, Applichem GmbH, Njemačka) su pripremani na sljedeći način:

Stok A: 10 mg antibiotika je rastvoreno u 5 ml diluensa do ukupne koncentracije 2 mg/ml i podijeljen u ependorf epruvete od po 100 μ l i zamrznut na -20°C . Zatim su pravljena predrazblaženja u epruvetama, tako da je u prvu epruvetu sa 9,9 ml THY bujona dodato 100 μ l stoka A do konačnog razblaženja od 20 $\mu\text{g/ml}$. Zatim je u nizu epruveta sa po 5 ml sterilnog THY bujona prebacivanjem po 5 ml prethodnog razblaženja dobijen niz epruveta sa dvostrukim razblaženjem antibiotika u koncentracijama od 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,6, 0,3, 0,15, 0,07 i 0,03 $\mu\text{g/ml}$. Ako je MIK antibiotika za ispitivani soj iznosio 0,003 $\mu\text{g/ml}$, tad bi se $\frac{1}{2}$ MIK (0,0015 $\mu\text{g/ml}$) dobilo pipetiranjem 100 μ l iz epruvete sa koncentracijom od 0,3 $\mu\text{g/ml}$.

Pencilin i klindamicin su rastvoreni u sterilnoj destilovanoj vodi, eritromicin je rastvoren u 95% etanolu, a rifampicin u metanolu.

Ceftriakson (Jugomedija, Srbija) je pripremljen tako da je ampula (u kojoj je 1000 mg antibiotika) rastvorena u 3,5 ml lidokaina tako da je dobijena koncentracija od 285,7 mg/ml. Stok A je dobijen kad je 35 μ l ove koncentracije rastvoreno u 5 ml destilovane vode. Dalji postupak je isti kao za ostale antibiotike.

3.6.2. Ispitivanje uticaja subinhibitornih koncentracija antibiotika na adherenciju izolata za laminin

U mikrotitarskim pločama obloženim lamininom rađeno je ispitivanje uticaja subinhibitornih koncentracija penicilina i eritromicina u vrijednosti od $\frac{1}{2}$ MIK za ispitivani soj kao u 3.2.4. s tim da se umjesto 100 μ l uvijek dodavalo po 75 μ l bujonske kulture, fosfatnog pufera, kristal violeta i sirćetne kiseline.

3.6.3. Uticaj subinhibitornih koncentracija antibiotika na hidrofobnost

S obzirom da su sojevi netretirani hijaluronidazom uspješno vezivali ksilen, uticaj subinhibitornih koncentracija antibiotika na hidrofobnost je ispitana dodavanjem 200 μ l ksilena.

Iz prekončne kulture sa CKA pikirane su 1-2 kolonije ispitivanog izolata i inokulisane u 1,9 ml THY u koji je dodato 100 μ l odgovarajuće koncentracije antibiotika iz niza epruveta sa predrazblaženjem da bi se postigla krajnja koncentracija od $\frac{1}{2}$ MIK, odnosno $\frac{1}{4}$ MIK antibiotika u 2 ml bujona. Iz prekončne THY kulture sa antibiotikom bakterije centrifugirane na 18 000 rpm

tokom 20 minuta. Bujon se odlije, a talog se dva puta pažljivo ispere sa fosfatnim puferom. Ispran talog se resuspenduje u fosfatnom puferu tako da je ekstinkcija suspenzije na λ od 540 nm iznosila 0,4. U ependorf epruvete se odlije po 1 ml ove suspenzije, doda 200 μ l heksadekana i preinkubira na 37 °C tokom 10 minuta. Nakon preinkubacije se ependorf epruveta vorteksuje tokom 2 minute i ostavi na sobnoj temperaturi tokom 10 minuta da se razdvoje vodena faza od heksadekana. Pažljivo se otpipetira 100 μ l izdvojene vodene faze, prebaci u rupicu u mikrotitarskoj ploči ekstinkcija mjeri na automatizovanom ICN Flow Titrek Multiscan Plus čitaču na λ od 540 nm. Rezultati testa se prikazuju preko prethodno opisane formule u 3.3.1.

3.6.4. Ispitivanje uticaja subinhibitornih koncentracija na sposobnost formiranja biofilma

Jedna kolonija prekonocne kulture je inokulisana u 1,9 ml THY sa dodatkom 100 μ l odgovarajuće koncentracije antibiotika iz niza epruveta sa predrazblaženjem da bi se postigla krajnja koncentracija od $\frac{1}{2}$ MIK, odnosno $\frac{1}{4}$ MIK antibiotika u 2 ml bujona. Zatim su inkubirane tokom 16-18 časova na 37°C. Iz prekonocne suspenzije je pipetirano 20 μ l kulture i inokulisano u 1,9 ml THY u koji je dodato 100 μ l odgovarajuće koncentracije antibiotika iz niza epruveta sa predrazblaženjem da bi se postigla krajnja koncentracija od $\frac{1}{2}$ MIK, odnosno $\frac{1}{4}$ MIK antibiotika u 2 ml bujona. Iz tako pripremljenog razrjeđenja otpipetirano je 100 μ l u ploču za mikrotitraciju. Za svaki izolat su rađene po 3 probe. Zatim su izolati inkubirani 12, 24 i 48 sati na 37°C. Izolatima koji su inkubirani 48 časova je nakon inkubacije od 24 časa dodano THY bujona sa odgovarajućom koncentracijom antibiotika. Nakon toga je sadržaj ploče odstranjen pipetiranjem, a svaka rupica tri puta isprana puferom. Adherisane bakterije su fiksirane sušenjem na vazduhu. Poslije sušenja u svaku rupicu je pipetirano po 100 μ l boje kristal violet iz seta za bojenje po Gramu (Bio-Merieux, France). Bojenje je trajalo 15 minuta, nakon čega su ploče tri puta isprane puferom i osušene na vazduhu. Da bi se resuspendovala boja, u svaku rupicu je dodato po 100 μ l 30% sirćetne kiseline (Zorka, Šabac). Ekstinkcija je očitana na automatizovanom ICN Flow Titrek Multiscan Plus čitaču na λ od 570 nm. Rezultati su tumačeni na prethodno opisan način kao i za produkciju biofilma u 3.5.1.

3.7. Ispitivanje uticaja suprainhibitornih koncentracija antibiotika na produkciju biofilma

Uticaj suprainhibitornih koncentracija je ispitivan prema metodi Presterl i sar. [75] tako da su sojevi prvo isprodukovali biofilm na mikrotitarskoj ploči tokom 24 sata. Nakon aspiracije sadržaja i

ispiranja puferom, u rupice je dodano po 100 μ l antibiotika iz predrazblaženja u epruvetama, tako da je isti izolat tretiran sa vrijednošću antibiotika u vrijednosti MIK, 2xMIK i 4xMIK i inkubiran naredna 24 sata na 37°C u atmosferskim uslovima. Nakon inkubacije je sadržaj iz rupica aspiriran, ispran tri puta sa fosfatnim puferom i osušen na vazduhu. Poslije sušenja u svaku rupicu je pipetirano po 100 μ l boje kristal violet iz seta za bojenje po Gramu (Bio-Meriex, France). Bojenje je trajalo 15 minuta, nakon čega su ploče tri puta isprane puferom i osušene na vazduhu. Da bi se resuspendovala boja, u svaku rupicu je dodato po 100 μ l 30% sirćetne kiseline (Zorka, Šabac). Ekstinkcija je očitana na automatizovanom ICN Flow Titrek Multiscan Plus čitaču na λ od 570 nm. Netretirani (kontrolni) sojevi su inkubirani 24 časa na 37°C u pločama za mikrotitraciju i ispitana im je sposobnost produkcije biofilma.

Uticaj suprainhibitornih vrijednosti antibiotika na produkciju biofilma je mjereno na osnovu indeksa produkcije biofilma koji je izražen formulom $A_{\text{tretirani}} / A_{\text{netretirani}}$, gdje A predstavlja vrijednost ekstinkcije netretiranih izolata, odnosno izolata tretiranih antibiotikom. Vrijednosti indeksa manje od 1 ukazivale su da je došlo do smanjenja produkcije biofilma, a vrijednosti veće od 1 da je podstaknuta produkcija biofilma.

Predrazblaženja antibiotika za ovaj eksperiment su dobijena tako da je po 10 μ l antibiotika iz stoka A (isti stok korišten u 3.2.3) prebačeno u prvu epruvetu sa 9,99 ml THY bujona da bi se dobila koncentracija od 2 μ g/ml. Daljim prebacivanjem ovog razblaženja u niz epruveta sa po 5 ml sterilnog THY bujona se dobiju konačne koncentracije od 1 μ g/ml do 0,007 μ g/ml.

3.8. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika

Vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije su određene bujon mikrodilucionom metodom prema uputstvima EUCAST [76]. Sve rupice u jednom redu ploče za mikrotitraciju su sadržale po 100 μ l odgovarajućeg dvostrukog razblaženja antibiotika u THY bujonu. U svaku rupicu je dodano po 100 μ l bakterijske suspenzije gustine 10^6 cfu/ml, da bi se u mikrotitracionoj ploči postigla krajnja gustina od 5×10^5 cfu/ml. Ploče su inkubirane tokom 18-24 sata na 37°C, nakon čega je očitavana vrijednost MIK.

Kontrolni soj. U ispitivanje osjetljivosti na antibiotike je uključen kontrolni soj *Staphylococcus aureus* ATCC 25293.

3.9. Određivanje vrijednosti minimalne koncentracije za eradikaciju biofilma

Izolovanim biofilm produkujućim sojevima će biti ispitana vrijednost minimalne koncentracije za eradikaciju biofilma (MBEC) prema uputstvima proizvođača (Innovotech inc. Kanada) [77]. Ispitivani sojevi se dvaput subkultiviraju na CKA da bi se dobila čista kultura koja se suspenduje u fiziološkom rastvoru do gustine od 1 McFarlanda. Ova suspenzija se razređuje u odnosu 1:30 sa hranjivim bujonom, te se 250 µl ovog razrijeđenja dodaje u MBEC-HTP esej i inkubira na treskalici do stvaranja biofilma.

Zatim se u mikrotitar ploči naprave dvostruka razrijeđenja ispitivanog antibiotika i u nju se uklopi gornji dio MBEC-HTP eseja sa stvorenim biofilmom i inkubira u termostatu 24 sata na 37 °C. Nakon inkubacije gornji dio MBEC-HTP eseja se uroni u novu mikrotitar ploču sa sterilnim fiziološkim rastvorom. Ova mikrotitar ploča se stavi u ultrazvučno vodeno kupatilo 5 minuta i tretira ultrazvukom. Gornji dio MBEC-HTP eseja se odbaci, jer su bakterije iz biofilma na šiljcima gornjeg dijela MBEC-HTP eseja zbog dejstva ultrazvuka prešle u rupice mikrotitarske ploče. Ova mikrotitarska ploča je inkubirana 24 sata na 37°C, nakon čega je očitavana vrijednost MBEC na osnovu zamućenosti bujona.

3.10. Statistička analiza

Za obradu podataka je korišćen sistem SPSS 20. Analiza varijanse je korišćena u statičkoj obradi testova da se utvrdi razlika između grupa u datim pojedinačnim uslovima sredine (koncentracija antibiotika ili vrijeme inkubacije) u ispitivanju adherencije, hidrofobnosti, produkcije SpeB i biofilma. Dinamička analiza podataka na nivou cijelog eksperimenta (kad su uključene obe koncentracije i sva tri vremena inkubacije) je vršena pomoću generalnog linearnog modela- model ponovljenih mjerenja. Studentov t test je korišćen kad su poređeni rezultati unutar jedne grupe, i to prije i nakon uticaja ispitivanog faktora. Pirsonov koeficijent linearne korelacije je korišćen prilikom utvrđivanja povezanosti produkcije SpeB, adherencije za laminin i formiranja biofilma. Svi rezultati su smatrani statistički značajnim ako je $p < 0,05$ i visoko statistički značajnim ako je $p < 0,01$.

4. Rezultati

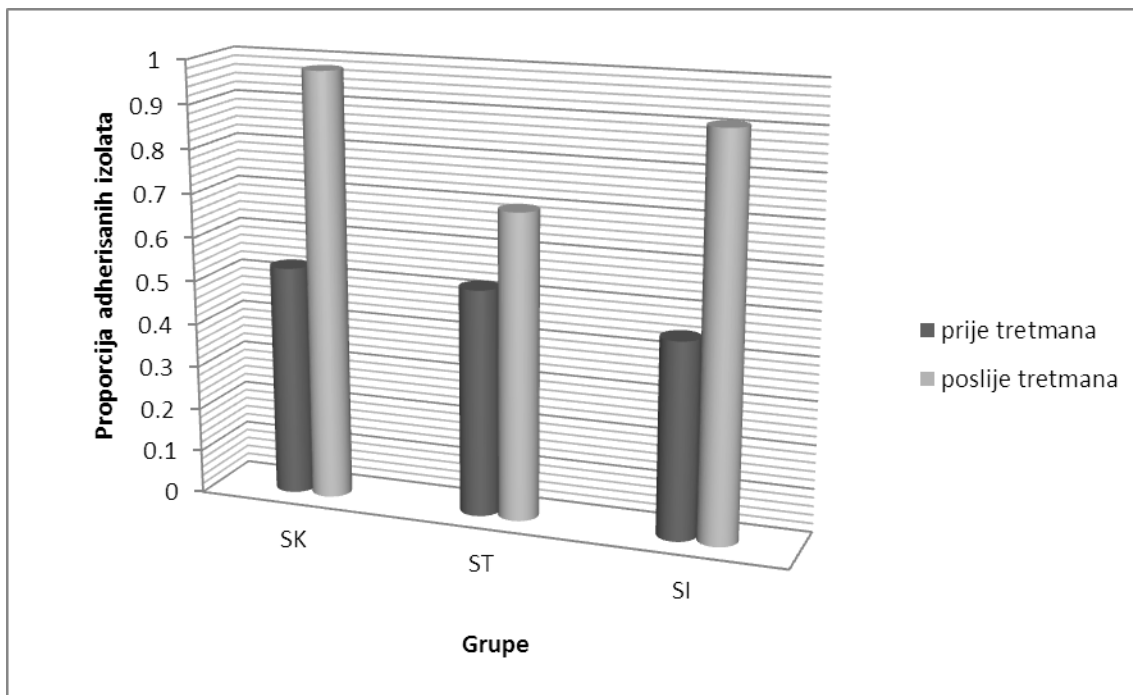
4.1. Ispitivanje adherencije, hidrofobnosti, produkcije SpeB i biofilma kod netretiranih izolata

4.1.1. Ispitivanje sposobnosti adherencije za neobloženu ploču za mikrotitraciju

U našem istraživanju smo kao početna testiranja ispitali adherenciju GAS izolata da bi utvrdili postojanje eventualne razlike između grupa. Adherenciju za neobloženu mikrotitarsku ploču je ostvarila proporcija od 0,53 izolata SK grupe, 0,52 izolata iz ST grupe i 0,45 izolata iz SI grupe. Nije uočena statistički značajna razlika između grupa ($F=0,203$, $p=0,816$).

Da bi otklonili eventualno ometanje kapsule u vezivanju adhezina za mikrotitarsku ploču, izolate smo tretirali hijaluronidazom, te opet ispitali adherenciju. Nakon otklanjanja kapsule za mikrotitarsku ploču je adherisala proporcija od 0,98 izolata iz SK grupe, 0,70 izolata iz ST grupe i 0,91 izolata iz SI grupe. Nakon tretmana hijaluronidazom uočena je statistički visoko značajna razlika između grupa ($F=15,523$, $p \leq 0,001$), zbog značajno slabije adherencije ST grupe u odnosu na druge dvije grupe ($p \leq 0,001$; $p=0,017$).

Kada se posmatra razlika u adherenciji između grupa prije i poslije tretmana hijaluronidazom, uočava se statistički visoko značajna razlika ($F=44,214$, $p \leq 0,001$), u korist tretiranih izolata. Ova statistički značajna razlika u adherenciji je posljedica značajno bolje adherencije grupa SK i SI nakon tretmana hijaluronidazom ($t=-8,350$, $p \leq 0,001$; $t=-1,843$, $p=0,071$; $t=-3,587$, $p=0,002$), što je prikazano na Grafikonu 1.



Grafikon 1. Razlika u aderenciji za neobloženu mikrotitarsku ploču prije i nakon tretmana hijaluronidazom kod tri ispitivane grupe izolata

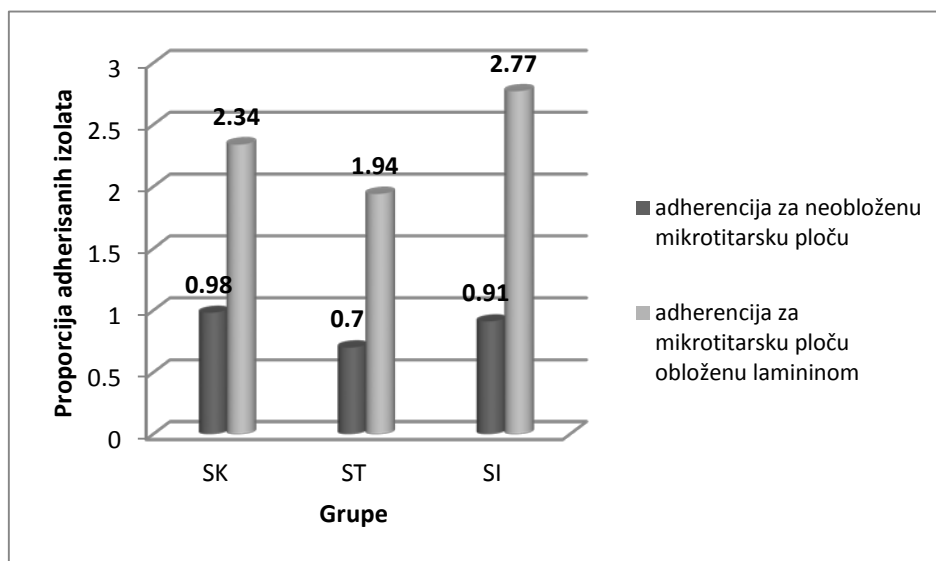
4.1.2. Adherencija za laminin

Nakon adherencije za neobloženu ploču za mikrotitraciju, ispitali smo sposobnost adherencije za mikrotitarsku ploču obloženu lamininom. Da bi ispitali postojanje eventualne razlike između ispitivanih grupa u prisustvu površinskih proteina koji vezuju laminin, izolate smo prethodno tretirali hijaluronidazom u cilju otklanjanja kapsule. Za laminin je adherisala proporcija od 2,24 izolata iz SK grupe, 1,94 izolata iz ST grupe i 2,77 izolata iz SI grupe. Uočena je statistički visoko značajna razlika između grupa ($F=12,914$, $p \leq 0,001$), koja je posljedica bolje adherencije SI grupe u odnosu na druge dvije grupe ($p=0,019$; $p \leq 0,001$), te bolje adherencije SK grupe u odnosu na ST grupu ($p=0,002$).

Ako se posmatra razlika u adherenciji između grupa prije i poslije tretmana hijaluronidazom, uočava se statistički visoko značajna razlika ($F=5,090$, $p=0,001$), koja potiče od slabije adherencije izolata iz ST grupe u odnosu na izolate od kliconoša ($p=0,001$), što je prikazano na Grafikonu 2.

Kada se analizira razlika između grupa tretiranih hijaluronidazom u adherenciji za neobloženu i lamininom obloženu mikrotitarsku ploču, uočava se statistički visoko značajna razlika ($F=6,952$, $p \leq 0,001$). Ova razlika je posljedica značajno bolje adherencije sve tri ispitivane grupe nakon oblaganja mikrotitarske ploče lamininom (u prosjeku 1,39 puta bolja adherencija), pri čemu se adherencija najviše poboljšala kod izolata grupe SI (skoro dvostruko), tj. 1,86 puta ($t=15,603$,

$p \leq 0,001$), manje poboljšanje adherencije je uočeno u grupi SK, tj 1,36 puta ($t=19,730$, $p \leq 0,001$), a najmanje u grupi ST 1,24 puta ($t=13,355$, $p \leq 0,001$), kao što je prikazano u grafikonu 2.



Grafikon 2. Razlike između grupa tretiranih hijaluronidazom u adherenciji za neobloženu mikrotitarsku ploču i ploču obloženu lamininom

4.1.3. Ispitivanje hidrofobnosti

Ispitivanje hidrofobnosti bakterija smo u prvom koraku ispitali pomoću heksadekana, pri čemu izolati nisu vezivali heksadekan. Prema preporukama drugih autora, izolate smo tretirali hijaluronidazom u cilju otklanjanja kapsule, koja fizički prekriva hidrofobne površinske adhezine. I pored toga su izolati sve tri grupe slabo vezivali heksadekan i nije uočena statistički značajna razlika između grupa (Tabela 3). Nakon toga smo prema preporukama drugih autora ispitali hidrofobnost pomoću ksilena (Tabela 3). Izolati su odlično vezivali ksilen, a nakon eksperimenta je uočena statistički značajna razlika između grupa, koja je posljedica veće hidrofobnosti SK grupe u odnosu na druge dvije grupe ($p < 0,001$; $p = 0,041$), kao i veće hidrofobnosti SI grupe u odnosu na ST grupu ($p = 0,044$).

Tabela 3. Hidrofobnost izolata iskazana procentom adherencije za heksadekan i ksilen

Grupa	Prosječan procenat vezivanja heksadekana (%)	Prosječan procenat vezivanja ksilena (%)
SK	10,810000	48,490000**
ST	9,020000	22,780000
SI	11,681818	36,090909*
ukupno	10,401163	39,430233
Vrijednost stat. testa	F=0,504	F=25,006
Vrijednost stat. značajnosti	p=0,605	p<0,001

*- uočena razlika između grupa je statistički značajna

**.- uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna

4.1.4. Produkcija cistein proteaze SpeB

Sposobnost produkcije cistein proteaze SpeB smo mjerili u milimetrima prečnika zone prosvjetljenja oko kolonija ispitivanih izolata na azokazeinskom agaru. SK grupa je imala prosječnu produkciju od 11,70 mm, ST grupa od 10,22 mm, a SI grupa od 11,09 mm. Nije nađena statistički značajna razlika u produkciji SpeB između grupa ($F=1,385$, $p>0,05$).

4.1.5. Sposobnost formiranja biofilma u atmosferskim uslovima

Da bismo ispitali eventualnu razliku između grupa u produkciju biofilma, izolate smo inkubirali u mikrotitarskoj ploči i nakon inkubacije od 12, 24 i 48 sati ispitali sposobnost produkcije biofilma, kao što je prikazano u Tabeli 4.

Tabela 4. Proporcija biofilm produkujućih izolata u atmosferskim uslovima

Grupa	12h inkubacija	24h inkubacija	48h inkubacija
SK	0,29	0,17	0,36*
ST	0,32	0,42**	0,34*
SI	0,14	0,09	0,05
Vrijednost stat. testa	$F=1,349$	$F=7,785$	$F=4,396$
Vrijednoststat.značajn	$p=0,262$	$p=0,01$	$p=0,014$

*- uočena razlika između grupa je statistički značajna

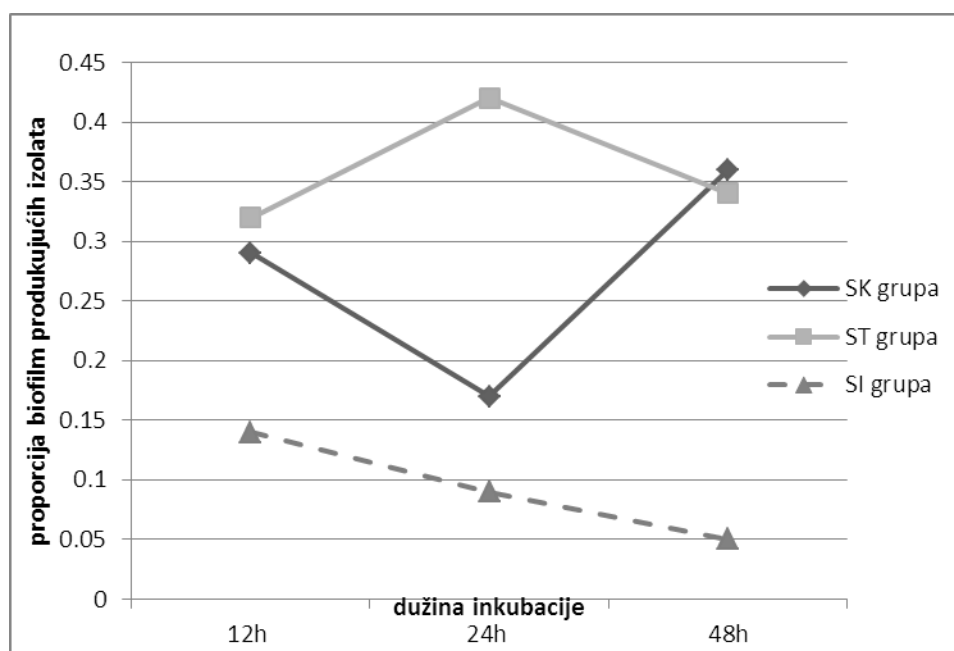
** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna

Nakon 12- časovne inkubacije nije nađena statistički značajna razlika između grupa.

Nakon 24-časovne inkubacije uočena je statistički visoko značajna razlika, jer je grupa ST bolje produkovala biofilm u odnosu druge dvije grupe ($p=0,002$; $p=0,006$).

Nakon 48-časovne inkubacije nađena je statistički značajna razlika, zbog veće produkcije biofilma izolata iz grupa SK i ST u odnosu na grupu SI ($p=0,012$; $p=0,038$).

Kada analiziramo promene u produkciji biofilma u atmosferskim uslovima tokom zadatog perioda trajanja eksperimenta (od 12 do 48 sati) grupe se značajno različito ponašaju ($F=2,551$; $p=0,040$). Grupe SK i ST kreću od slične proporcije pa jedna pada, a druga raste i na kraju se vraćaju na sličan nivo u odnosu na početnu produkciju ($p=0,262$). Dotle grupa SI konstantno veoma slabo formira biofilm u odnosu na SK ($p=0,026$) i ST ($p=0,001$) grupe, što dovodi do razlike prikazane na Grafikonu 3.



Grafikon 3. Dinamička analiza produkcije biofilma tri grupe tokom zadatog vremena trajanja eksperimenta

4.1.6. Povezanost produkcije SpeB, adherencije za laminin i sposobnosti formiranja biofilma

Ispitivanjem povezanosti produkcije SpeB, adherencije za laminin i sposobnosti formiranja biofilma pomoću Pirsonovog koeficijenta nije nađena povezanost između nijednog od ova tri parametra, ni na nivou cijelog eksperimenta, niti među grupama, tj. u svim testovima je $p > 0,05$.

4.2. Uticaj ugljen dioksida na sposobnost formiranja biofilma

Da bismo ispitali eventualnu razliku u produkciji biofilma između grupa u uslovima koji odgovaraju dubokim tkivima, izolate smo inkubirali u uslovima sa 5% CO₂ tokom 12, 24 i 48 sati. Rezultati su prikazani u Tabeli 5.

Tabela 5. Proporcija biofilm produkujućih izolata nakon inkubacije sa 5% CO₂

Grupa	12h inkubacija	24h inkubacija	48h inkubacija
SK	0,43	0,40*	0,40
ST	0,30	0,36	0,24
SI	0,73**	0,09	0,41
Vrijednost stat. testa	F=5,986	F=3,919	F=2,040
Vrijednoststat.značajn	p=0,003	p=0,022	p=0,133

*- uočena razlika između grupa je statistički značajna

** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna

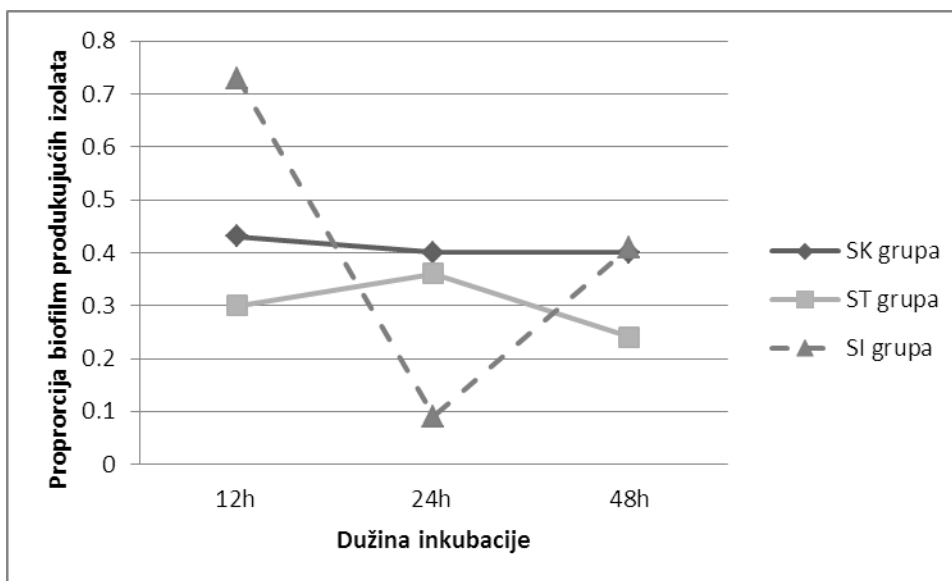
Nakon 12-časovne inkubacije nađena je statistički značajna razlika između grupa, koja je zasnovana na boljoj produkciji biofilma izolata SI grupe u odnosu na druge dvije grupe ($p=0,029$; $p=0,002$).

Nakon 24-časovne inkubacije uočena je statistički značajna razlika između grupa, jer je došlo do naglog rasipanja biofilma kod izolata SI grupe, koja je značajno slabije produkovala biofilm u odnosu na SK grupu ($p=0,018$).

Nakon 48-časovne inkubacije nije uočena je statistički značajna razlika između eksperimentalnih grupa.

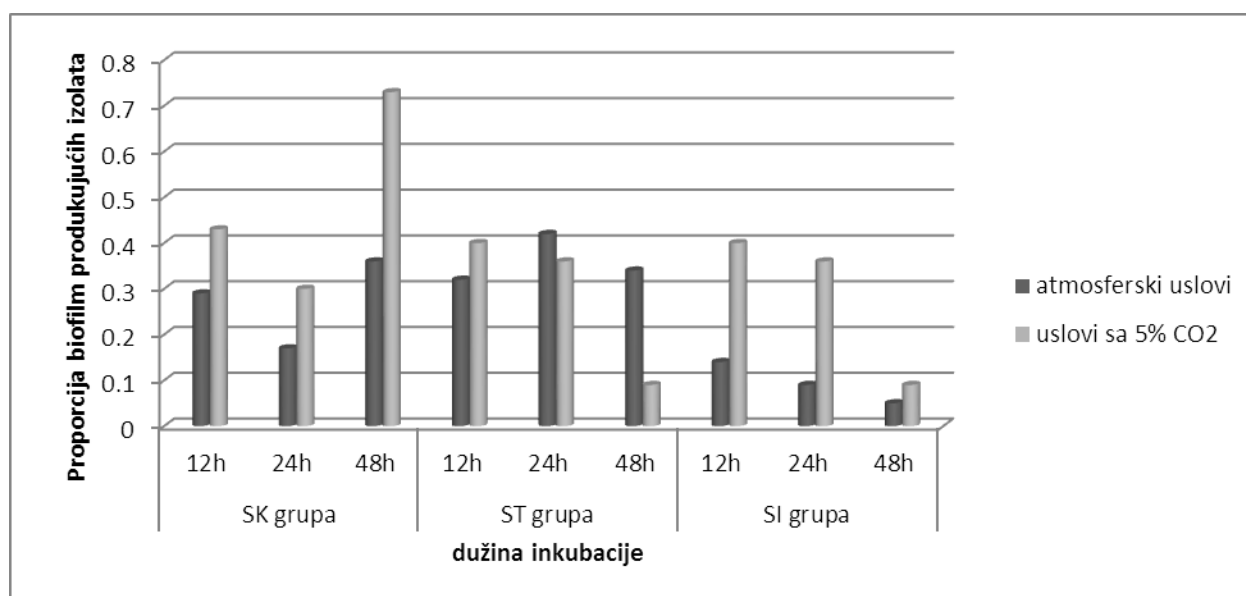
Svi biofilm produkujući izolati su bili slabi produktori biofilma.

Kada analiziramo promjene u produkciji biofilma nakon uticaja izmijenjenih atmosferskih uslova tokom zadatog perioda trajanja eksperimenta (od 12 do 48 sati) grupe se ponašaju različito ($F=5,404$, $p<0,001$). Grupe SK i ST pokazuju relativno stalan nivo produkcije biofilma, dok SI grupa ima pad u produkciji biofilma u prvih 24 sata, da bi u drugih 24 sata došlo do porasta produkcije (Grafikon 4).



Grafikon 4. Dinamička analiza produkcije biofilma nakon inkubacije izolata u uslovima sa 5% CO₂

Kad analiziramo razlike na nivou cijelog eksperimenta, tj. uticaj ugljen dioksida na produkciju biofilma u odnosu na atmosferske uslove, uočava se visoko statistički značajna razlika između grupa tokom 12 sati ($F=14,828$ $p<0,01$), 24 sata ($F=130,92$ $p<0,01$) i 48 sati ($F=140,11$ $p<0,01$) pri čemu je razlika uvijek u korist izolata inkubiranih u uslovima sa 5%CO₂. Osim na nivou eksperimenta, uočene su razlike i između grupa ($F=6,344$, $p=0,002$; $F=5,034$, $p=0,008$ i $F=6,137$ $p=0,003$ respektivno), tokom sva tri vremena inkubacije (Grafikon 5).



Grafikon 5. Razlike u produkciji biofilma unutar svake grupe tokom inkubacije od 12, 24 i 48 sati u atmosferskim uslovima i u uslovima sa 5% CO₂

Kad analiziramo uticaj ugljen dioksida na produkciju biofilma unutar svake grupe uočavamo da nakon inkubacije od 12 sati izolati grupa SK i SI statistički značajno bolje produkuju biofilm u uslovima sa 5% CO₂ ($t=-4,028$, $p=0,043$; $t=-4,695$, $p<0,001$) u odnosu na atmosferske uslove, dok u grupi ST nije uočena razlika ($t=0,207$, $p=0,837$). Nakon inkubacije od 24 sata bolja produkcija je uočena samo kod izolata grupe SK ($t=3,830$, $p<0,001$). Nakon 48-časovne inkubacije sa CO₂ samo izolati grupe SI bolje produkuju biofilm u odnosu na inkubaciju u atmosferskim uslovima ($t=-2,935$, $p=0,008$).

4.3. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika

Vrijednosti MIK za ispitivane grupe su prikazani Tabelom 6.

Tabela 6. Vrijednosti MIK za ispitivane izolate

Antibiotik	Grupa	vrijednost MIK ($\mu\text{g/ml}$)	
		minimum	maksimum
rifampicin	SK	0,007	0,250
	ST	0,015	0,250
	SI	0,015	0,120
penicilin	SK	0,007	0,06
	ST	0,007	0,06
	SI	0,015	0,06
ceftriakson	SK	0,02	0,12
	ST	0,02	0,25
	SI	0,03	0,12
klindamicin	SK	0,015	0,250
	ST	0,015	0,250
	SI	0,015	1
eritromicin	SK	0,007	0,250
	ST	0,015	0,250
	SI	0,015	0,120

4.4. Uticaj subinhibitornih koncentracija antibiotika na adherenciju za neobloženu mikrotitarsku ploču

4.4.1. Uticaj rifampicina na adherenciju izolata za neobloženu mikrotitarsku ploču

Da bismo utvrdili uticaj subinhibitornih koncentracija rifampicina na adherenciju, izolate smo inkubirali tokom 24h u bujonu sa $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK rifampicina i nakon toga ispitali njihovu sposobnost adherencije za neobloženu mikrotitarsku ploču (tabela 7).

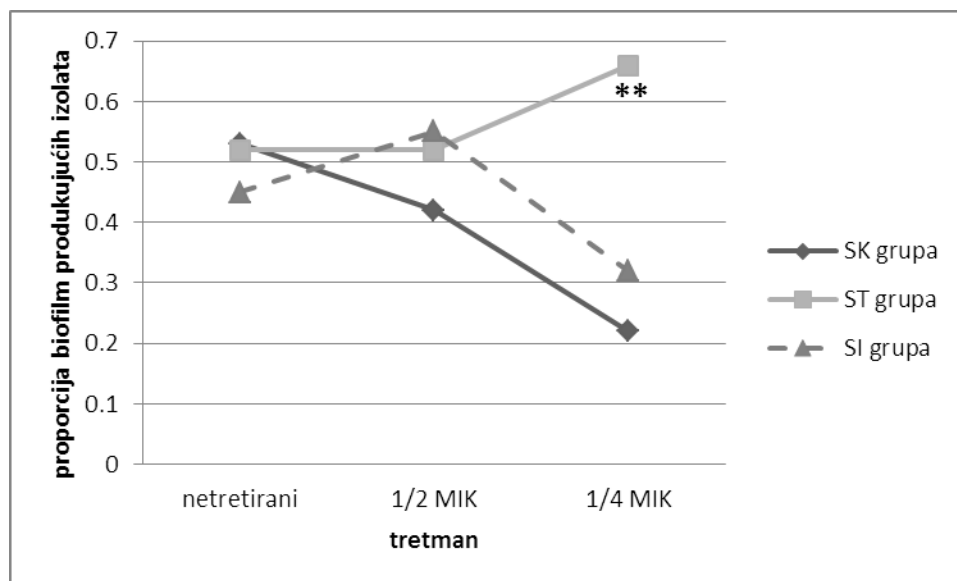
Tabela 7. Proporcija adherisanih izolata nakon inkubacije sa rifampicinom

Grupa	Rifampicin $\frac{1}{2}$ MIK	Rifampicin $\frac{1}{4}$ MIK
SK	0,42	0,22
ST	0,52	0,66**
SI	0,55	0,32
Vrijednost stat. testa	F=0,991	F=16,563
Vrijednost stat. značajnosti	p=0,373	p \leq 0,001

** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna

Nakon inkubacije sa $\frac{1}{2}$ MIK rifampicina nije uočena statistički značajna razlika između grupa. Nakon inkubacije sa $\frac{1}{4}$ MIK rifampicina uočena je statistički visoko značajna razlika između grupa, jer je grupa ST značajno bolje adherisala u odnosu na druge dvije grupe (p \leq 0,001; p=0,009).

Ako se posmatra razlika u adherenciji između grupa prije i poslije tretmana, uočava se statistički visoko značajna razlika između grupa ($F=4,760$, $p=0,001$), koja potiče od bolje adherencije izolata iz ST grupe u odnosu na izolate SK grupe ($p=0,003$), što je prikazano u Grafikonu 6.



** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna

Grafikon 6. Razlika u adherenciji kod ispitivanih grupa prije i poslije tretmana sa rifampicinom

Ako analiziramo uticaj rifampicina na adherenciju izolata unutar svake grupe pojedinačno, uočavaju se statistički značajne razlike samo u grupi SK, koja su slabije adherisali nakon inkubacije sa $\frac{1}{4}$ MIK ($t=-4,578$, $p\leq 0,001$). Samo kod izolata grupe SK je uočena bolje adherencija nakon inkubacije sa $\frac{1}{2}$ MIK u odnosu na $\frac{1}{4}$ MIK ($t=4,450$, $p\leq 0,001$).

4.4.2. Uticaj penicilina na adherenciju izolata za neobloženu mikrotitarsku ploču

Da bismo utvrdili uticaj subinhibitornih koncentracija penicilina na adherenciju, izolate smo inkubirali tokom 24h u bujonu sa $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK penicilina i nakon toga ispitali njihovu sposobnost adherencije za neobloženu mikrotitarsku ploču (Tabela 8).

Tabela 8. Proporcija adherisanih izolata nakon inkubacije sa penicilinom

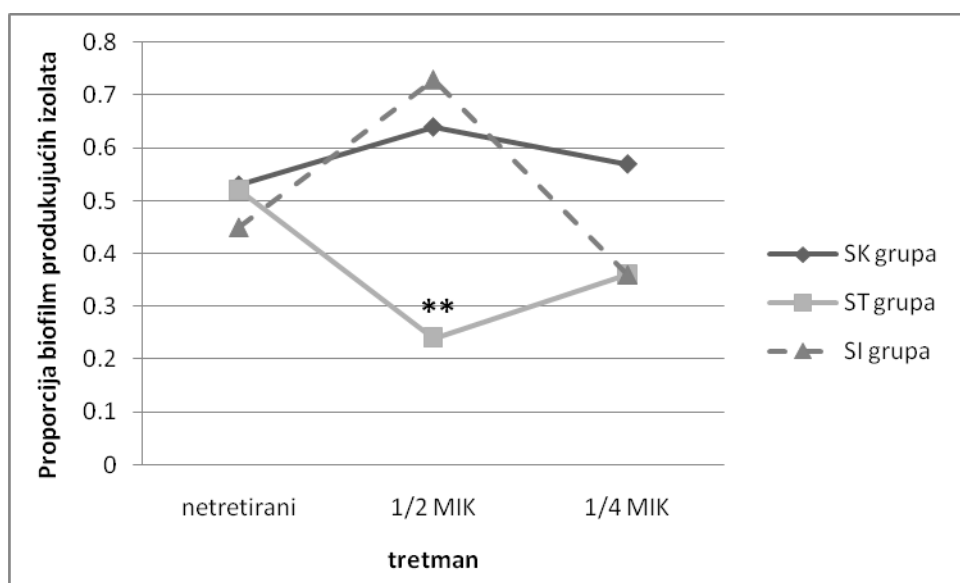
Grupa	Penicilin $\frac{1}{2}$ MIK	Penicilin $\frac{1}{4}$ MIK
SK	0,64	0,57
ST	0,24**	0,36*
SI	0,73	0,36
Vrijednost stat. testa	F=14,499	F=3,754
Vrijednost stat. značajnosti	$p\leq 0,001$	$p=0,025$

* - uočena razlika između grupa je statistički značajna

** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna

Nakon inkubacije sa penicilinom je uočena statistički značajna razlika između grupa, zbog značajno slabije adherencije grupe ST u odnosu na druge dvije grupe ($p \leq 0,001$; $p \leq 0,001$) nakon inkubacije sa $\frac{1}{2}$ MIK, odnosno zbog slabije adherencije ST grupe u odnosu na SK ($p=0,045$) grupu nakon inkubacije sa $\frac{1}{4}$ MIK.

Ako se posmatra razlika u adherenciji između grupa prije i poslije tretmana, uočava se statistički visoko značajna razlika ($F=5,090$, $p=0,001$), koja potiče od slabije adherencije izolata iz ST grupe u odnosu na izolate SK grupe ($p=0,001$), što je prikazano u Grafikonu 7.



**** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna**

Grafikon 7. Razlika u adherenciji između ispitivanih grupa u atmosferskim uslovima (netretirani izolati), te nakon inkubacije sa $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK penicilina

Ako analiziramo uticaj penicilina na adherenciju izolata unutar svake grupe uočavaju se statistički značajne razlike samo kod grupe ST, koji su slabije adherisali nakon inkubacije sa $\frac{1}{2}$ MIK ($t=3,456$, $p=0,001$) i sa $\frac{1}{4}$ MIK ($t=-2,221$, $p=0,031$). Samo kod izolata grupe SK je uočena bolje adherencija nakon inkubacije sa $\frac{1}{2}$ MIK u odnosu na $\frac{1}{4}$ MIK ($t=3,464$, $p=0,002$).

4.4.3. Uticaj ceftriaksona na adherenciju izolata za mikrotitarsku ploču

Da bismo utvrdili uticaj subinhibitornih koncentracija ceftriaksona na adherenciju, izolate smo inkubirali tokom 24h u bujonu sa $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK ceftriaksona i nakon toga ispitali njihovu sposobnost adherencije za neobloženu mikrotitarsku ploču (Tabela 9).

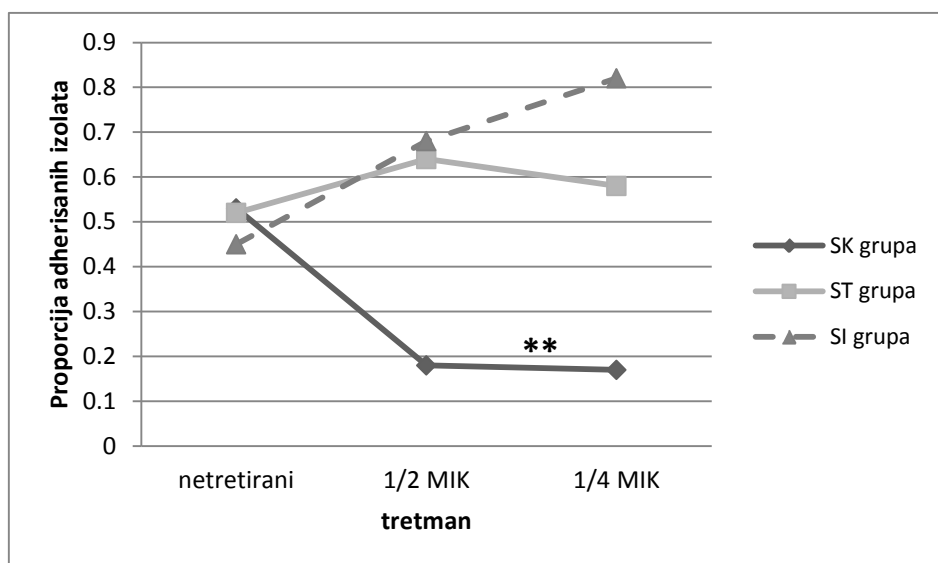
Tabela 9. Proporcija adherisanih izolata nakon inkubacije sa ceftriaksonom

Grupa	Ceftriakson ½ MIK	Ceftriakson ¼ MIK
SK	0,18**	0,17**
ST	0,64	0,58
SI	0,68	0,82
Vrijednost stat. testa	F=25,534	F=30,365
Vrijednost stat. značajnosti	p≤ 0,001	p≤ 0,001

**** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna**

Kod izolata tretiranih sa ½ i ¼ MIK ceftriaksona je uočena statistički visoko značajna razlika između grupa, koja potiče od značajno slabije adherencije grupe SK u odnosu na druge dvije grupe (p≤0,001; p≤ 0,001).

Ako se posmatra razlika u adherenciji između grupa prije i poslije tretmana, uočava se statistički visoko značajna razlika (F=9,979, p≤0,001), koja potiče od slabije adherencije izolata iz SK grupe u odnosu na druge dvije grupe (p≤ 0,001; p≤ 0,001), što se vidi na Grafikonu 8.



**** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna**

Grafikon 8. Razlika u adherenciji između ispitivanih grupa u atmosferskim uslovima (netretirani izolati), te nakon inkubacije sa ½ i ¼ MIK ceftriaksona

Ako analiziramo uticaj ceftriaksona na adherenciju izolata unutar svake grupe pojedinačno uočavaju se statistički značajne razlike unutar SK i SI grupa. Grupa SK je slabije adherisala nakon inkubacije sa ½ MIK (t=-5,745, p≤0,001) i sa ¼ MIK (t=-5,591, p≤0,001). Za razliku od nje, izolati SI grupe su statistički značajno bolje adherisali nakon inkubacije sa ¼ MIK (t=2,592, p=0,017). Ni u jednoj grupi nije uočena statistički značajna razlika kad je poređen uticaj ½ MIK na adherenciju.

4.4.4. Uticaj klindamicina na adherenciju izolata za neobloženu mikrotitarsku ploču

Da bismo utvrdili uticaj subinhibitornih koncentracija klindamicina na adherenciju, izolate smo inkubirali tokom 24h u bujonu sa $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK klindamicina i nakon toga ispitali njihovu sposobnost adherencije za neobloženu mikrotitarsku ploču (Tabela 10).

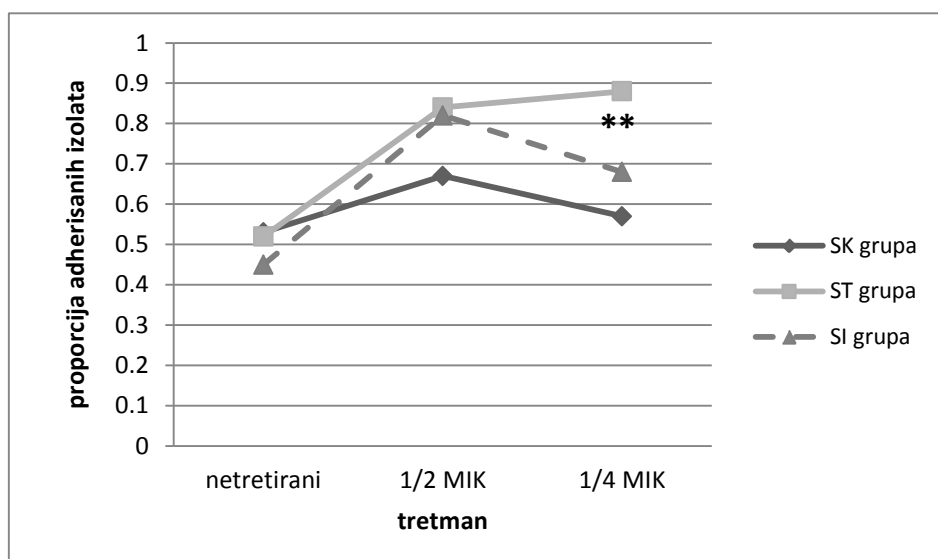
Tabela 10. Proporcija adherisanih izolata nakon inkubacije sa klindamicinom

Grupa	Klindamicin $\frac{1}{2}$ MIK	Klindamicin $\frac{1}{4}$ MIK
SK	0,67	0,57
ST	0,84	0,88**
SI	0,82	0,68
Vrijednost stat. testa	F=2,959	F=7,835
Vrijednost stat. značajnosti	p=0,055	p=0,019

**** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna**

Kod izolata tretiranih sa $\frac{1}{2}$ MIK klindamicina nije uočena statistički značajna razlika između grupa. Kod izolata tretiranih sa $\frac{1}{4}$ MIK klindamicina uočena je statistički značajna razlika između grupa, zbog bolje adherencije ST grupe u odnosu na grupu SK ($p \leq 0,001$).

Ako se posmatra razlika u adherenciji između grupa prije i poslije tretmana, uočava se statistički visoko značajna razlika ($F=2,526$, $p=0,041$), koja potiče od bolje adherencije izolata iz ST grupe u odnosu na SK grupu ($p=0,007$), što se vidi na Grafikonu 9.



**** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna**

Grafikon 9. Razlika u adherenciji između ispitivanih grupa u atmosferskim uslovima (netretirani izolati), te nakon inkubacije sa $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK klindamicina

Ako analiziramo uticaj klindamicina na adherenciju izolata unutar svake grupe pojedinačno uočavaju se statistički značajne razlike u sve tri grupe. Klindamicin u koncentraciji od ½ MIK je poboljšao adherenciju u sve tri grupe ($t=2,148$, $p=0,034$; $t=3,645$, $p=0,001$; $t=2,935$, $p=0,008$), a nakon inkubacije sa ¼ MIK bolje su adherisali samo izolati grupe ST ($t=4,033$, $p \leq 0,001$). Ni u jednoj grupi nije uočena statistički značajna razlika kad je poređen uticaj ¼ MIK na adherenciju.

4.4.5. Uticaj eritromicina na adherenciju izolata za mikrotitarsku ploču

Da bismo utvrdili uticaj subinhibitornih koncentracija eritromicina na adherenciju, izolate smo inkubirali tokom 24h u bujonu sa ½ i ¼ MIK penicilina i nakon toga ispitali njihovu sposobnost adherencije za neobloženu mikrotitarsku ploču (Tabela 11).

Tabela 11. Proporcija adherisanih izolata nakon inkubacije sa eritromicinom

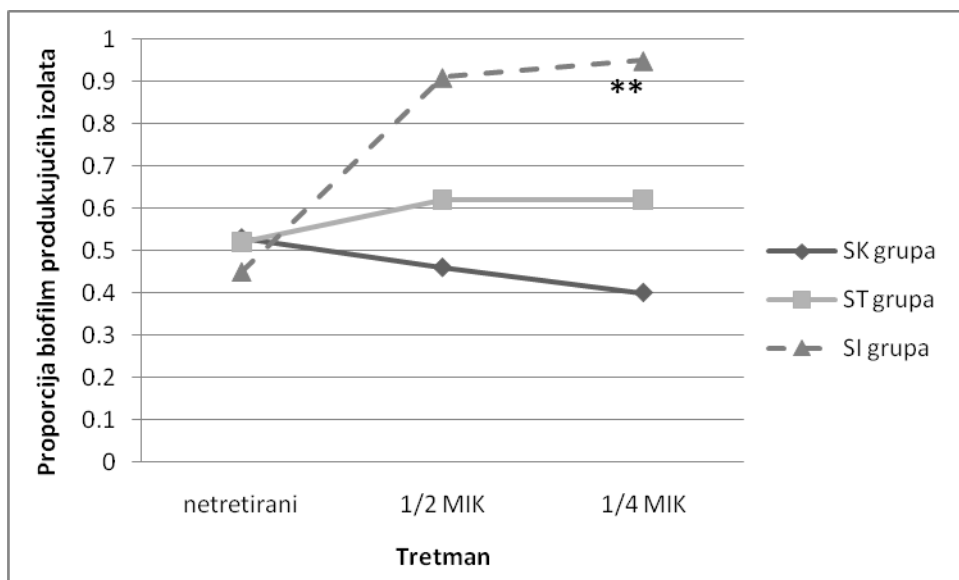
Grupa	Eritromicin ½ MIK	Eritromicin ¼ MIK
SK	0,46	0,40
ST	0,62	0,62*
SI	0,91**	0,95**
Vrijednost stat. testa	F=8,482	F=13,931
Vrijednost stat. značajnosti	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$

*- uočena razlika između grupa je statistički značajna

** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna

Kod izolata tretiranih sa ½ MIK eritromicina je uočena statistički visoko značajna razlika između grupa, zbog značajno bolje adherencije SI grupe u odnosu na SK grupu ($p \leq 0,001$). Kod izolata tretiranih sa ¼ MIK eritromicina uočena je statistički visoko značajna razlika između sve tri grupe, pri čemu je najbolje adherisala SI grupa ($p \leq 0,001$, $p=0,017$), zatim ST grupa ($p=0,021$), a najslabije SK grupa.

Ako se posmatra razlika u adherenciji između grupa prije i poslije tretmana, uočava se statistički visoko značajna razlika ($F=5,246$, $p \leq 0,001$), koja potiče od bolje adherencije izolata iz SI grupe u odnosu na SK grupu ($p \leq 0,001$), što se vidi na Grafikonu 10.



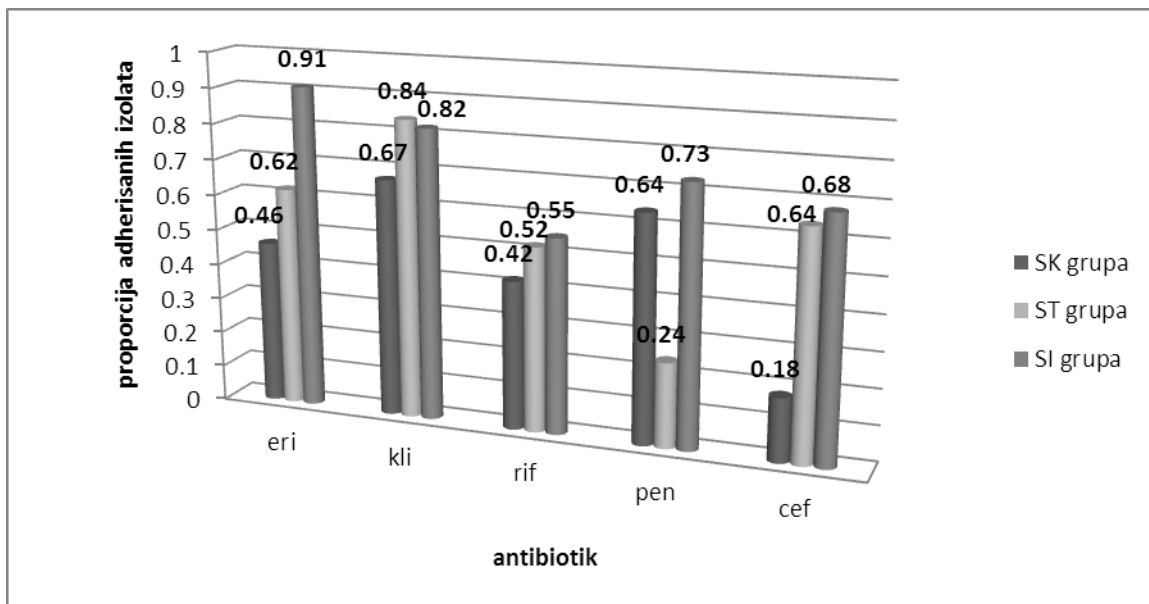
**** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna**

Grafikon 10. Razlika u adherenciji između ispitivanih grupa u atmosferskim uslovima (netretirani izolati), te nakon inkubacije sa $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK eritromicina

Ako analiziramo uticaj eritromicina na adherenciju izolata unutar svake grupe pojedinačno uočavaju se statistički značajne razlike samo kod izolata SI grupe koji su bolje adherisali nakon inkubacije i sa $\frac{1}{2}$ MIK ($t=3,578$, $p=0,002$) i sa $\frac{1}{4}$ MIK ($t=4,583$, $p \leq 0,001$). Ni u jednoj grupi nije uočena statistički značajna razlika kad je poređen uticaj $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK na adherenciju.

4.4.6. Poređenje uticaja $\frac{1}{2}$ MIK svih antibiotika na adherenciju izolata za mikrotitarsku ploču

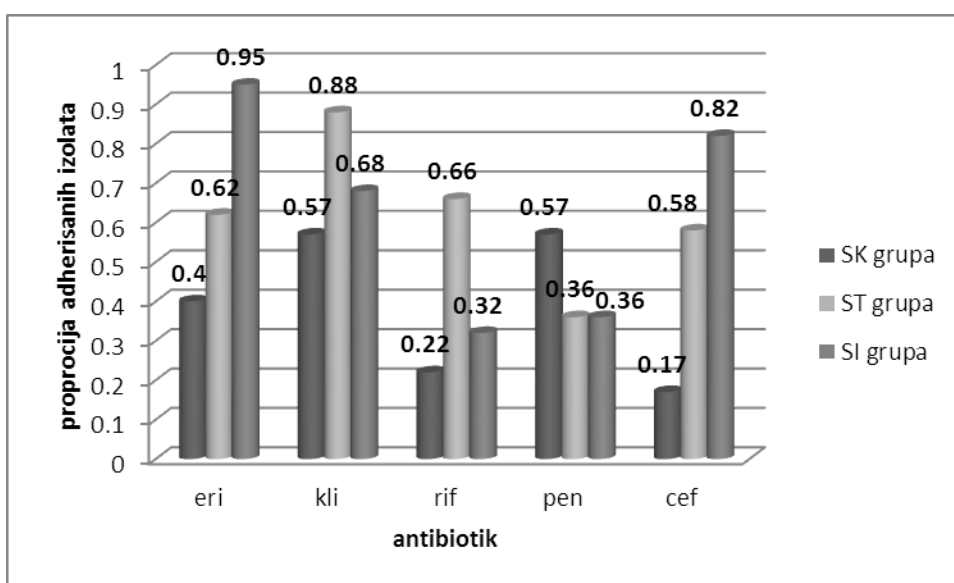
Ako se uporedi uticaj $\frac{1}{2}$ MIK pet antibiotika na adherenciju uočava se statistički visoko značajna razlika kako u cijelom eksperimentu ($F=8,101$, $p<0,001$), tako i između grupa ($F=8,216$, $p<0,001$). Analizirajući uticaj antibiotika na nivou u cijelom eksperimenta uočava se da klindamicin podstiče adherenciju u odnosu na penicilin, rifampicin i ceftriakson ($p=0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$), te da eritromicin podstiče adherenciju u odnosu na ceftriakson ($p=0,048$), što se vidi na Grafikonu 11.



Grafikon 11. Poređenje uticaja $\frac{1}{2}$ MIK svih antibiotika na adherenciju izolata za mikrotitarsku ploču

4.4.7. Poređenje uticaja $\frac{1}{4}$ MIK svih antibiotika na adherenciju izolata za mikrotitarsku ploču

Ako se uporedi uticaj $\frac{1}{4}$ MIK pet antibiotika na adherenciju uočava se statistički visoko značajna razlika kako u cijelom eksperimentu ($F=10,811$, $p<0,001$), tako i između grupa ($F=10,002$, $p<0,001$). Uočava se da klindamicin podstiče adherenciju u odnosu na penicilin, rifampicin i ceftriakson ($p<0,001$, $p<0,001$, $p=0,021$), te da eritromicin podstiče adherenciju u odnosu na rifampicin i penicilin ($p<0,001$, $p=0,006$), što se vidi u Grafikonu 12.



Grafikon 12. Poređenje uticaja $\frac{1}{4}$ MIK svih antibiotika na adherenciju izolata za mikrotitarsku ploču

4.4.8. Uticaj subinhibitornih koncentracija penicilina i eritromicina na adherenciju za mikrotitarsku ploču obloženu lamininom

Da bismo utvrdili uticaj subinhibitornih koncentracija penicilina i eritromicina na adherenciju, izolate smo inkubirali tokom 24h u bujonu sa ½ MIK penicilina i eritromicina i zatim ispitali adherenciju za mikrotitarsku ploču obloženu lamininom (Tabela 12).

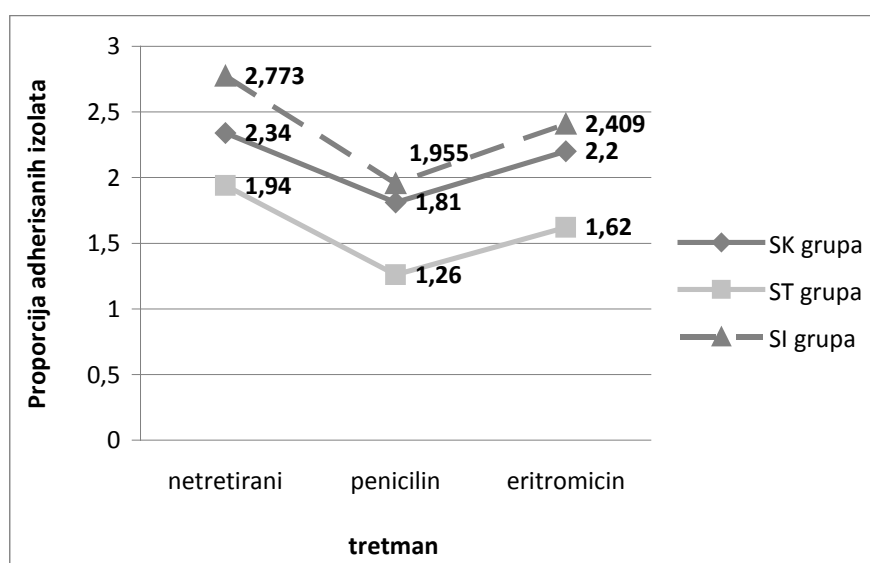
Tabela 12. Proporcija adherisanih izolata nakon inkubacije sa penicilinom i eritromicinom

Grupa	Penicilin	Eritromicin
SK	1,810	2,200
ST	1,260**	1,620**
SI	1,955	2,409
Vrijednost stat. testa	F=13,876	F=12,724
Vrijednost stat. značajnosti	p ≤ 0,001	p ≤ 0,001

** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna

Nakon inkubacije sa oba antibiotika, uočena je statistički visoko značajna razlika, jer su u oba slučaja izolati ST grupe slabije adherisali za laminin u odnosu na druge dvije (p ≤ 0,001, p ≤ 0,001).

Ako se posmatra razlika u adherenciji između grupa prije i poslije tretmana antibioticima, uočava se statistički značajno smanjenje adherencije nakon dejstva antibiotika u cijelom eksperimentu, (F=49,262, p ≤ 0,001). Ovo smanjenje je podjednako u svim grupama (F=1,062, p=0,375). Iako je značajno smanjenje adherencije grupe ST u odnosu na druge dvije grupe (p ≤ 0,001, p ≤ 0,001), ova razlika nije dovoljno velika da dovede do razlike između grupa na nivou eksperimenta, što je prikazano na Grafikonu 13.



Grafikon 13. Razlike u adherenciji za laminin netretiranih izolata, te nakon inkubacije sa ½ MIK penicilina i eritromicina

Ova statistički značajna razlika u adherenciji u čitavom eksperimentu je posljedica značajnog smanjenja adherencije sve tri ispitivane grupe nakon dejstva antibiotika (u prosjeku od 22 do 60% smanjenja). Statistički visoko značajno smanjenje adherencije u sve tri grupe je imao penicilin ($t=6,757$, $p\leq 0,001$, $t=5,542$, $p\leq 0,001$, $t=4,827$, $p\leq 0,001$). Statistički visoko značajan uticaj na smanjenje adherencije u grupama ST i SI je imao eritromicin ($t=3,645$, $p=0,001$, $t=3,464$, $p=0,002$), a kod izolata iz grupe SK je doveo do značajnog smanjenja adherencije ($t=2,320$, $p=0,022$). Penicilin je u odnosu na eritromicin kod sve tri grupe sojeva doveo do statistički visoko značajnog smanjenja adherencije ($t=-4,580$, $p\leq 0,001$, $t=-3,280$, $p=0,002$, $t=-2,887$, $p=0,009$).

4.5. Uticaj antibiotika na hidrofobnost

Da bismo utvrdili uticaj subinhibitornih koncentracija antibiotika na hidrofobnost, izolate smo inkubirali tokom 24h u bujonu sa $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK antibiotika i nakon toga ispitali njihovu sposobnost vezivanja ksilena.

4.5.1. Uticaj rifampicina na hidrofobnost

Da bismo utvrdili uticaj subinhibitornih koncentracija rifampicina na hidrofobnost, izolate smo inkubirali tokom 24h u bujonu sa $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK rifampicina i nakon toga ispitali njihovu sposobnost vezivanja ksilena (Tabela 13).

Tabela 13. Hidrofobnost iskazana procentom vezanog ksilena nakon tretmana sa rifampicinom

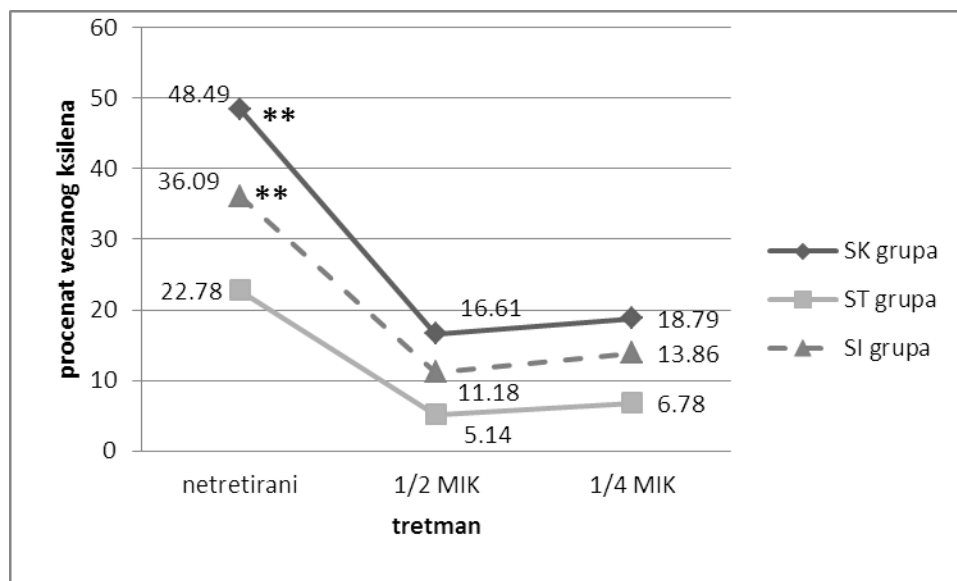
Grupa	Rifampicin $\frac{1}{2}$ MIK	Rifampicin $\frac{1}{4}$ MIK
SK	16,61	18,79
ST	5,14**	6,78**
SI	11,18	13,86
Vrijednost stat. testa	F=10,397	F=11,323
Vrijednost stat. značajnosti	$p<0,001$	$p<0,001$

**** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna**

Kod izolata tretiranih sa $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK eritromicina je uočena statistički visoko značajna razlika između grupa u oba tretmana, zbog značajno slabijeg vezivanja ksliena ST grupe u odnosu na SK grupu ($p\leq 0,001$).

Kada se analiziraju razlike između grupa u hidrofobnosti prije i poslije tretmana sa antibiotikom, uočava se statistički značajna razlika između grupa ($F=4,151$, $p=0,003$), tj. najveću hidrofobnost

imaju ima grupa SK ($p < 0,001$; $p = 0,003$), zatim izolati SI grupe ($p = 0,004$), a najmanju izolati ST grupe, što se vidi u Grafikonu 14.



** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna

Grafikon 14. Razlike između grupa u hidrofobnosti prije i poslije tretmana sa $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK rifampicina

Ako analiziramo uticaj rifampicina na hidrofobnost izolata unutar svake grupe pojedinačno uočavaju se statistički značajne razlike kod sve tri ispitivane grupe. U odnosu na netretirane izolate, sve tri grupe su nakon inkubacije sa $\frac{1}{2}$ MIK rifampicina slabije vezivali ksilen ($t = 11,089$, $p \leq 0,001$; $t = 6,507$, $p \leq 0,001$; $t = 5,151$, $p \leq 0,001$), kao i nakon inkubacije sa $\frac{1}{4}$ MIK ($t = 10,387$, $p \leq 0,001$; $t = 5,155$, $p \leq 0,001$, $t = 4,184$, $p \leq 0,001$). Ni kod jedne grupe nije uočena statistički značajno slabija hidrofobnost nakon inkubacije sa $\frac{1}{2}$ MIK u odnosu na $\frac{1}{4}$ MIK.

4.5.2. Uticaj penicilina na hidrofobnost

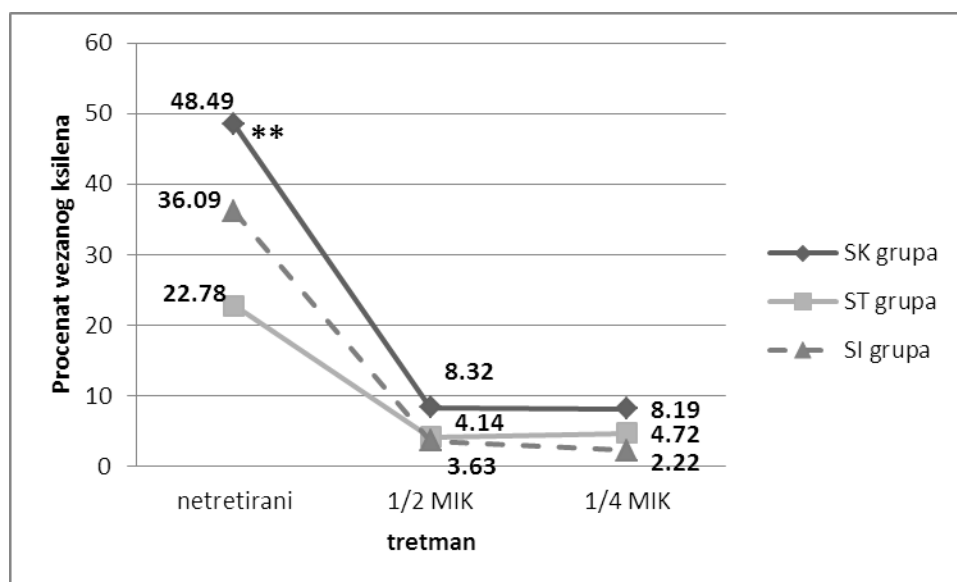
Da bismo utvrdili uticaj subinhibitornih koncentracija penicilina na hidrofobnost, izolate smo inkubirali tokom 24h u bujonu sa $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK penicilina i nakon toga ispitali njihovu sposobnost vezivanja ksilena (Tabela 14).

Tabela 14. Hidrofobnost iskazana procentom vezanog ksilena nakon tretmana sa penicilinom

Grupa	Penicilin $\frac{1}{2}$ MIK	Penicilin $\frac{1}{4}$ MIK
SK	8,32	8,19
ST	4,14	4,72
SI	3,63	2,22
Vrijednost stat. testa	F=1,848	F=2,283
Vrijednost stat. značajnosti	p=0,161	p=0,105

Kod izolata tretiranih sa $\frac{1}{2}$ MIK i sa $\frac{1}{4}$ MIK penicilina nije uočena statistički visoko značajna razlika između grupa u oba tretmana.

Kada se analiziraju razlike između grupa u hidrofobnosti prije i poslije tretmana sa $\frac{1}{2}$, odnosno $\frac{1}{4}$ MIK, uočava se statistički značajna razlika ($F=11,806$, $p<0,001$), koja potiče od veće hidrofobnosti grupe SK u odnosu na druge dvije grupe ($p<0,001$; $p=0,015$), što se vidi u Grafikonu 15.



** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna

Grafikon 15. Razlike između grupa u hidrofobnosti prije i poslije tretmana sa $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK penicilina

Ako analiziramo uticaj rifampicina na hidrofobnost izolata unutar svake grupe pojedinačno, uočavaju se statistički značajne razlike kod sve tri ispitivane grupe. U odnosu na netretirane izolate, sve tri grupe su nakon inkubacije sa $\frac{1}{2}$ MIK slabije vezivali ksilen ($t=15,576$, $p\leq 0,001$; $t=6,445$, $p\leq 0,001$; $t=6,572$, $p\leq 0,001$), kao i nakon inkubacije sa $\frac{1}{4}$ MIK ($t=16,715$, $p\leq 0,001$; $t=5,060$, $p\leq 0,001$, $t=6,447$, $p\leq 0,001$). Niti kod jedne grupe nije uočena statistički značajno slabija hidrofobnost nakon inkubacije sa $\frac{1}{2}$ MIK u odnosu na $\frac{1}{4}$ MIK.

4.5.3. Uticaj ceftriaksona na hidrofobnost

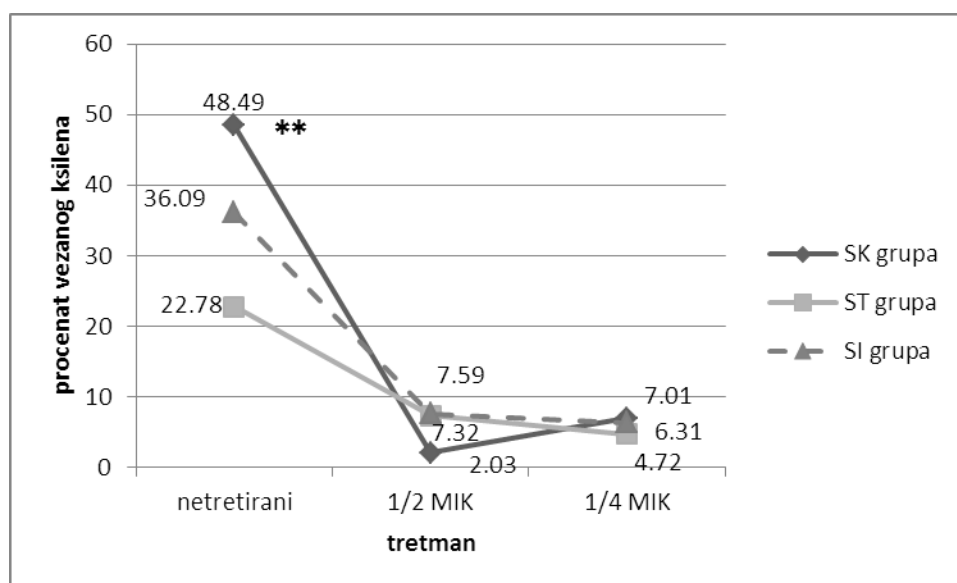
Da bismo utvrdili uticaj subinhibitornih koncentracija ceftriaksona na hidrofobnost, izolate smo inkubirali tokom 24h u bujonu sa $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK ceftriaksona i nakon toga ispitali njihovu sposobnost vezivanja ksilena (Tabela 15).

Tabela 15. Hidrofobnost iskazana procentom vezanog ksilena nakon tretmana sa ceftriaksonom

Grupa	Ceftriakson ½ MIK	Ceftriakson ¼ MIK
SK	2,03*	7,01
ST	7,32	4,72
SI	7,59	6,31
Vrijednost stat. testa	F=4,903	F=0,649
Vrijednost stat. značajnosti	p=0,009	p=0,524

Kod izolata tretiranih sa ½ MIK ceftriaksona je uočena statistički visoko značajna razlika između grupa, zbog značajno zbog manje hidrofobnosti grupe SK u odnosu na grupu ST (p=0,020). Ne uočava se statistički značajna razlika između ispitivanih grupa nakon inkubacije sa ¼ MIK.

Kada se analiziraju razlike između grupa u hidrofobnosti prije i poslije tretmana sa ½, odnosno ¼ MIK, uočava se statistički značajna razlika između grupa (F=19,562, p<0,001), a razlika potiče od veće hidrofobnosti grupe SK u odnosu na grupu ST (p<0,001), što se vidi u Grafikonu 16.



** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna

Grafikon 16. Razlike u hidrofobnosti između grupa prije i nakon tretmana sa ceftriaksonom

Ako analiziramo uticaj ceftriaksona na hidrofobnost izolata unutar svake grupe, uočavaju se statistički značajne razlike u sve tri ispitivane grupe. U odnosu na netretirane izolate, sve tri grupe su nakon inkubacije sa ½ MIK slabije vezivali ksilen (t=20,641, p≤0,001; t=4,232, p≤0,001; t=5,525, p≤0,001), kao i nakon inkubacije sa ¼ MIK (t=16,647, p≤0,001; t=5,794, p≤0,001, t=5,337, p≤0,001). Samo je kod izolata iz SK grupe uočena statistički značajno manja hidrofobnost nakon inkubacije sa ½ MIK u odnosu na ¼ MIK (t=-3,441, p=0,001).

4.5.4. Uticaj klindamicina na hidrofobnost

Da bismo utvrdili uticaj subinhibitornih koncentracija klindamicina na hidrofobnost, izolate smo inkubirali tokom 24h u bujonu sa 1/2 i 1/4 MIK klindamicina i nakon toga ispitali njihovu sposobnost vezivanja ksilena (Tabela 16).

Tabela 16. Hidrofobnost iskazana procentom vezanog ksilena nakon tretmana sa klindamicinom

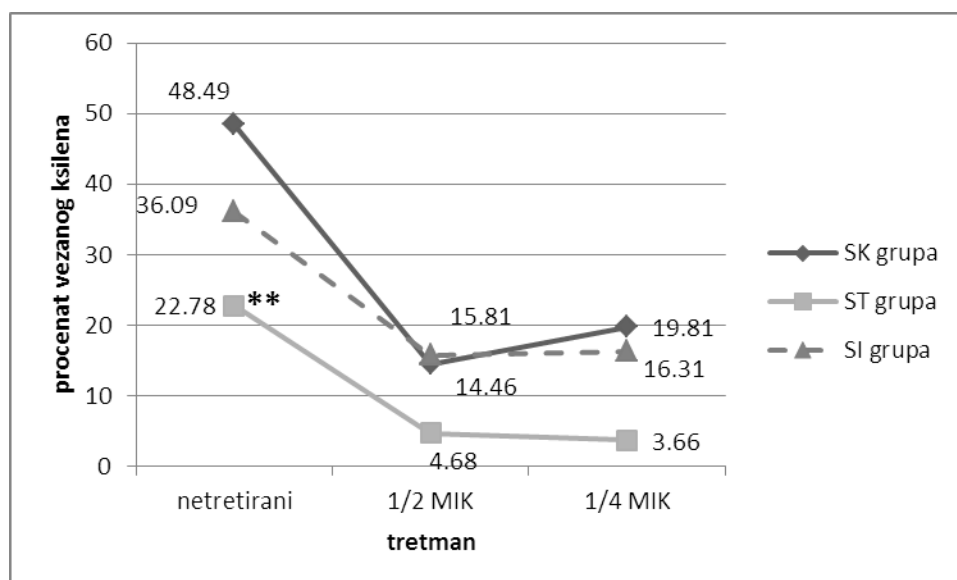
Grupa	Klindamicin 1/2 MIK	Klindamicin 1/4 MIK
SK	14,46	19,81
ST	4,68*	3,66**
SI	15,81	16,31
Vrijednost stat. testa	F=4,759	F=8,481
Vrijednost stat. značajnosti	p=0,010	p<0,001

*- uočena razlika između grupa je statistički značajna

** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna

Kod izolata tretiranih sa 1/2 i 1/4 MIK klindamicina je uočena statistički značajna razlika između grupa, zbog značajno zbog manje hidrofobnosti grupe ST u odnosu na grupu SK (p=0,013; p<0,001) u oba slučaja.

Kada se analiziraju razlike između grupa u hidrofobnosti prije i poslije tretmana sa 1/2, odnosno 1/4 MIK, uočava se statistički značajna razlika između grupa (F=3,985, p=0,004), koja potiče od smanjene hidrofobnosti ST grupe u odnosu na druge dvije grupe (p<0,001, p=0,006), što se vidi na Grafikonu 17.



** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna

Grafikon 17. Razlike u hidrofobnosti između grupa prije i nakon tretmana sa klindamicinom

Ako analiziramo uticaj klindamicina na razlike u hidrofobnosti izolata unutar svake grupe pojedinačno, uočavaju se statistički značajne razlike kod sve tri ispitivane grupe. U odnosu na netretirane izolate, sve tri grupe su nakon inkubacije sa ½ MIK slabije vezivali ksilen ($t=11,382$, $p \leq 0,001$; $t=6,335$, $p \leq 0,001$; $t=3,178$, $p=0,005$), kao i nakon inkubacije sa ¼ MIK ($t=8,511$, $p \leq 0,001$; $t=6,463$, $p \leq 0,001$, $t=2,692$, $p=0,014$). Samo je kod izolata iz grupe SK uočena statistički značajno manja hidrofobnost nakon inkubacije sa ½ MIK u odnosu na ¼ MIK ($t=-3,693$, $p \leq 0,001$).

4.5.5. Uticaj eritromicina na hidrofobnost

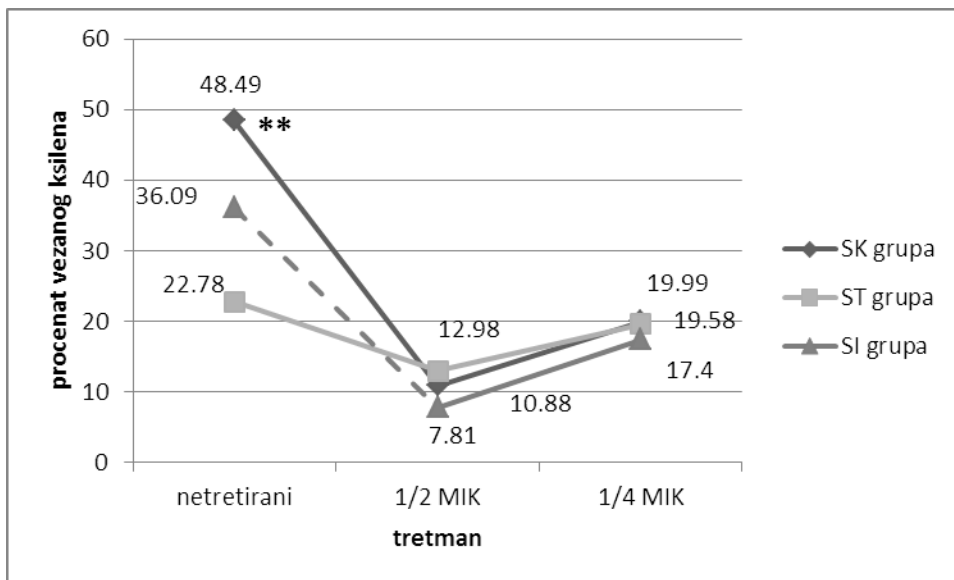
Da bismo utvrdili uticaj subinhibitornih koncentracija eritromicina na hidrofobnost, izolate smo inkubirali tokom 24h u bujonu sa ½ i ¼ MIK eritromicina i nakon toga ispitali njihovu sposobnost vezivanja ksilena (Tabela 17).

Tabela 17. Hidrofobnost iskazana procentom vezanog ksilena nakon tretmana sa eritromicinom

Grupa	Eritromicin ½ MIK	Eritromicin ¼ MIK
SK	10,88	19,99
ST	12,98	19,58
SI	7,81	17,40
Vrijednost stat. testa	F=0,495	F=0,108
Vrijednost stat. značajnosti	p=0,610	p=0,898

Kod izolata tretiranih sa ½ i ¼ MIK eritromicina nije uočena statistički značajna razlika između grupa.

Kada se analiziraju razlike između grupa u hidrofobnosti prije i poslije tretmana sa ½, odnosno ¼ MIK eritromicina, uočava se statistički značajna razlika ($F=13,175$, $p < 0,001$), koja potiče od veće hidrofobnosti grupe SK u odnosu na ST grupu ($p=0,018$), što se vidi na Grafikonu 18.



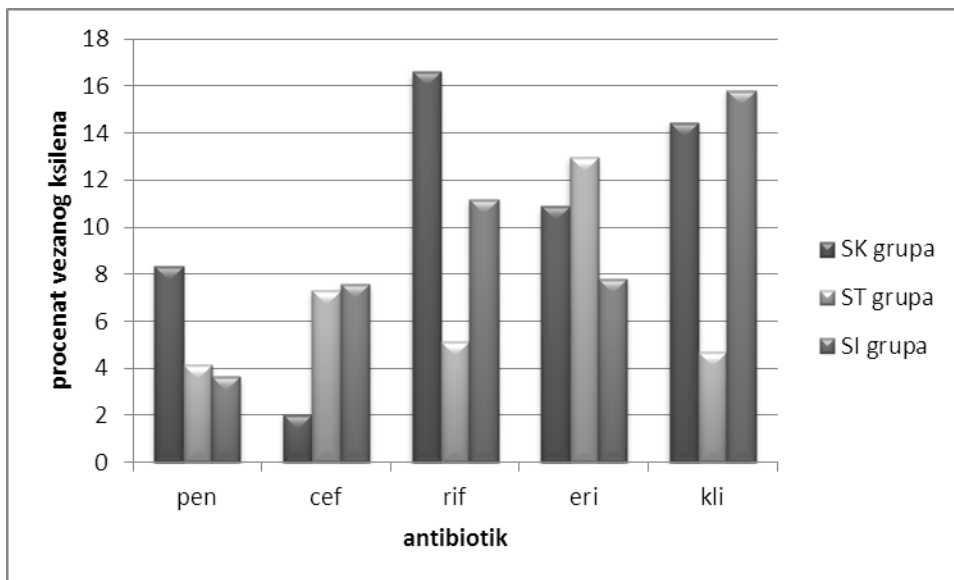
** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna

Grafikon 18. Razlike u hidrofobnosti između grupa prije i nakon tretmana sa eritromicinom

Ako analiziramo uticaj eritromicina na hidrofobnost izolata unutar svake grupe pojedinačno, uočavaju se statistički značajne razlike kod sve tri ispitivane grupe. U odnosu na netretirane izolate, sve tri grupe su nakon inkubacije sa $\frac{1}{2}$ MIK slabije vezivali ksilen ($t=13,739$, $p\leq 0,001$; $t=2,650$, $p=0,011$; $t=4,704$, $p\leq 0,001$). Nakon inkubacije sa $\frac{1}{4}$ MIK manju hidrofobnost su imali izolati iz grupe SK i SI ($t=9,324$, $p\leq 0,001$; $t=4,496$, $p\leq 0,001$). Kod sve tri grupe je uočena statistički značajno slabija hidrofobnost nakon inkubacije sa $\frac{1}{2}$ MIK u odnosu na $\frac{1}{4}$ MIK ($t=-5,749$, $p\leq 0,001$; $t=-3,323$, $p=0,002$; $t=-2,115$, $p=0,047$).

4.5.6. Poređenje uticaja $\frac{1}{2}$ MIK svih antibiotika na hidrofobnost

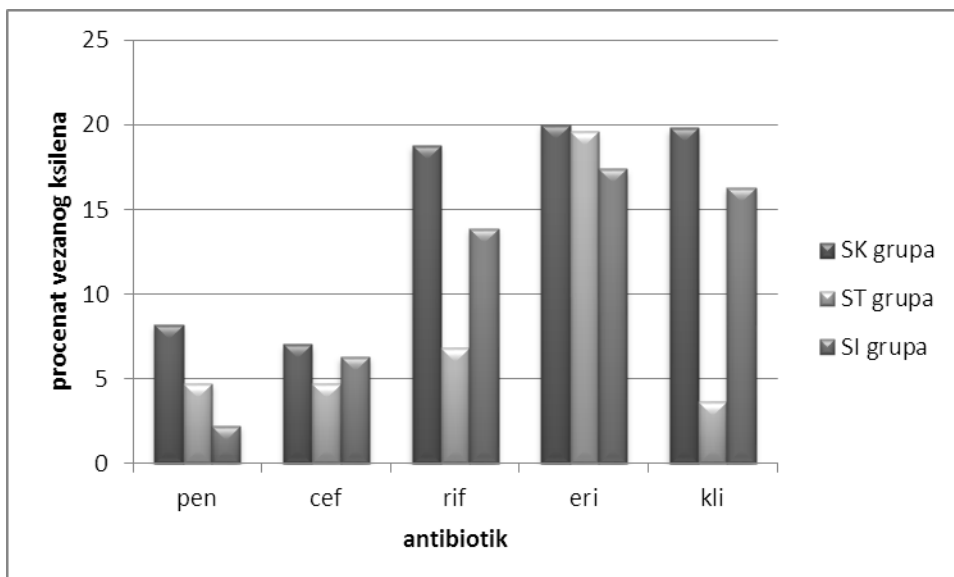
Ako se uporedi uticaj $\frac{1}{2}$ MIK pet antibiotika na hidrofobnost uočava se statistički visoko značajna razlika kako u cijelom eksperimentu ($F=4,281$, $p=0,002$), tako i između grupa ($F=3,942$, $p<0,001$). Analizirajući uticaj antibiotika u cjelosti uočava se da sojevi tretirani klindamicinom imaju veću hidrofobnost u odnosu na sojeve tretirane sa ceftriaksonom ($p=0,033$), kao i sojevi tretirani sa rifampicinom imaju veću hidrofobnost u odnosu na sojeve tretirane sa penicilinom i ceftriaksonom ($p=0,031$, $p=0,004$), što se vidi na Grafikonu 19.



Grafikon 19. Poređenje uticaja $\frac{1}{2}$ MIK svih antibiotika na hidrofobnost

4.5.7. Poređenje uticaja $\frac{1}{4}$ MIK svih antibiotika na hidrofobnost

Ako se uporedi uticaj $\frac{1}{4}$ MIK pet antibiotika na hidrofobnost uočava se statistički visoko značajna razlika kako u cijelom eksperimentu ($F=13,183$, $p<0,001$), tako i između grupa ($F=2,783$, $p=0,005$). Analizirajući uticaj antibiotika u cjelosti uočava se da sojevi tretirani eritromicinom, klindamicinom i rifampicinom imaju veću hidrofobnost u odnosu na sojeve tretirane sa ceftriaksonom ($p\leq 0,001$, $p=0,021$, $p\leq 0,001$) i penicilinom ($p\leq 0,001$, $p=0,008$, $p\leq 0,001$), kao što se vidi na Grafikonu 20.



Grafikon 20. Poređenje uticaja $\frac{1}{4}$ MIK svih antibiotika na hidrofobnost

4.6. Uticaj subinhibitornih koncentracija na produkciju cistein proteaze SpeB

Da bismo utvrdili uticaj subinhibitornih koncentracija antibiotika na produkciju cistein proteaze SpeB, izolate smo zasijali u azokazeinski agar sa dodatkom $\frac{1}{2}$, odnosno $\frac{1}{4}$ MIK antibiotika i nakon inkubacije mjerili produkciju cistein proteaze SpeB, iskazanu u milimetrima prečnika zone prosvjetljenja oko kolonije.

4.6.1. Uticaj rifampicina na produkciju SpeB

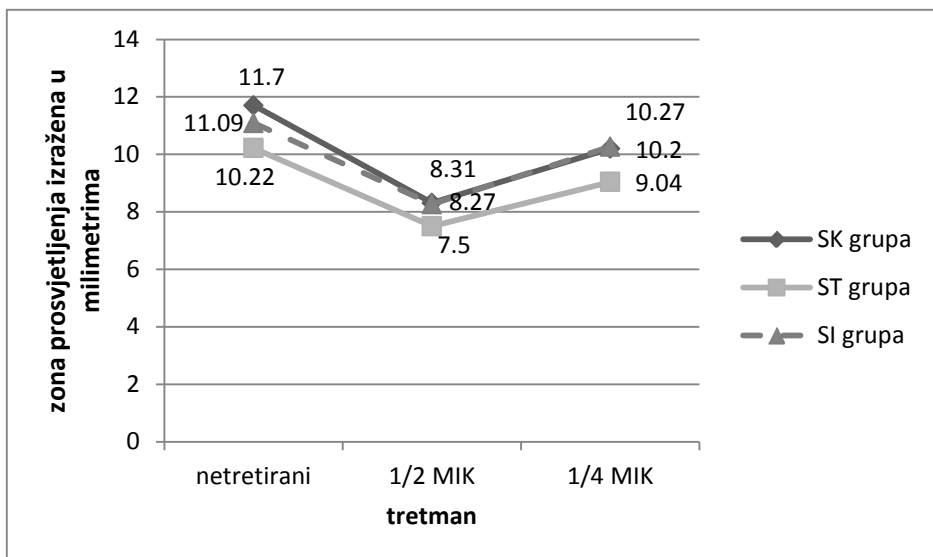
Da bismo utvrdili uticaj subinhibitornih koncentracija antibiotika na produkciju cistein proteaze SpeB mjerili smo prečnik zone prosvjetljenja na azokazeinskom agaru sa dodatkom antibiotika. Rezultati su prikazani u Tabeli 18.

Tabela 18. Produkcija cistein proteaze SpeB iskazana u milimetrima zone prosvjetljenja na agaru

Grupa	Rifampicin $\frac{1}{2}$ MIK	Rifampicin $\frac{1}{4}$ MIK
SK	8,31	10,20
ST	7,50	9,04
SI	8,27	10,27
Vrijednost stat. testa	F=0,673	F=1,149
Vrijednost stat. značajnosti	p=0,512	p=0,319

Kod izolata tretiranih sa $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK rifampicina nije uočena statistički značajna razlika između grupa.

Kada se analiziraju razlike između grupa u produkciji SpeB prije i poslije tretmana sa $\frac{1}{2}$, odnosno $\frac{1}{4}$ MIK rifampicina, nije uočena razlika između grupa, tj. sve tri grupe se slično ponašaju (F=0,985, p=0,416), što se vidi u Grafikonu 21.



Grafikon 21. Razlike u produkciji speB (izražene u milimetrima zone prosvjetljenja na agaru) između netretiranih izolata i izolata inkubiranih sa ½ i ¼ MIK rifampicina

Ako analiziramo uticaj rifampicina na produkciju SpeB kod izolata u svakoj grupi pojedinačno, uočavaju se statistički značajne razlike kod sve tri ispitivane grupe. U odnosu na netretirane izolate, sve tri grupe su nakon inkubacije sa ½ MIK značajno slabije produkovale SpeB ($t=-10,933$, $p\leq 0,001$; $t=-8,045$, $p\leq 0,001$; $t=-4,991$, $p\leq 0,001$), kao i nakon inkubacije sa ¼ MIK ($t=-5,805$, $p\leq 0,001$, $t=-7,012$, $p\leq 0,001$, $t=-2,737$, $p=0,012$). Kod sve tri grupe je uočena statistički značajna razlika kad je poređen uticaj ½ i ¼ MIK ($t=-10,483$, $p\leq 0,001$, $t=-5,981$, $p\leq 0,001$, $t=-3,92$, $p=0,001$), što se vidi na Grafikonu 21.

4.6.2. Uticaj penicilina na produkciju cistein proteaze SpeB

Da bismo utvrdili uticaj subinhibitornih koncentracija penicilina na produkciju cistein proteaze SpeB mjerili smo prečnik zone prosvjetljenja na azokazeinskom agaru sa dodatkom antibiotika. Rezultati su prikazani u Tabeli 19.

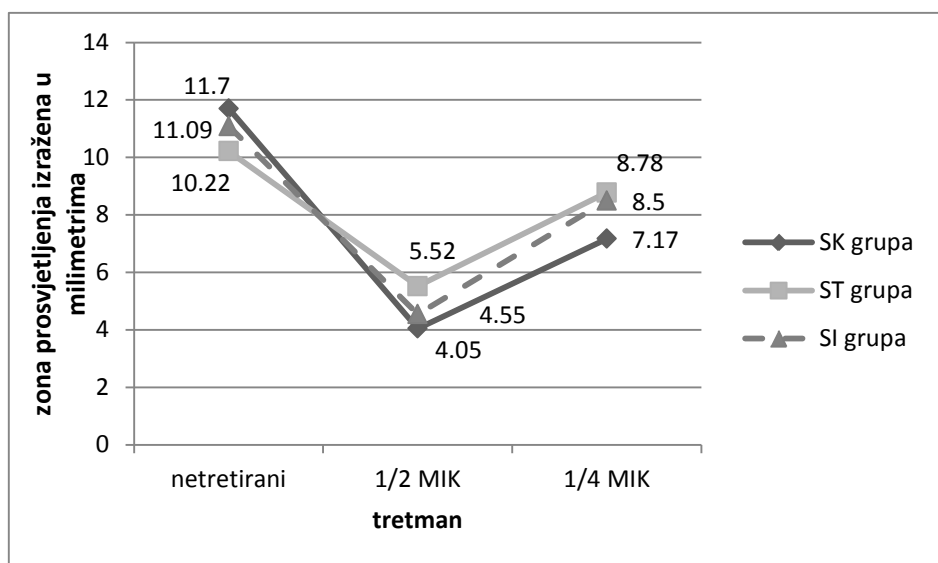
Tabela 19. Produkcija cistein proteaze SpeB iskazana u milimetrima zone prosvjetljenja na agaru

Grupa	Penicilin ½ MIK	Penicilin ¼ MIK
SK	4,05**	7,17
ST	5,52	8,78
SI	4,55	8,50
Vrijednost stat. testa	F=5,451	F=2,877
Vrijednost stat. značajnosti	p=0,005	p=0,059

** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna

Kod izolata tretiranih sa $\frac{1}{2}$ MIK penicilina uočena je statistički značajna razlika između grupa nakon tretmana sa $\frac{1}{2}$ MIK, koja je posljedica slabije produkcije izolata grupe SK u odnosu na grupu ST ($p=0,004$). Nije uočena statistički značajna razlika između grupa nakon tretmana sa $\frac{1}{4}$ MIK.

Kada se analiziraju razlike između grupa u produkciji SpeB prije i poslije tretmana sa $\frac{1}{2}$, odnosno $\frac{1}{4}$ MIK penicilina, uočena je statistički značajna razlika između grupa ($F=7,418$, $p<0,001$), pri čemu se sve tri grupe ponašaju slično. Navedena razlika je dobijena ukupnim sabiranjem razlika između grupa. Rezultati su prikazani na Grafikonu 22.



Grafikon 22. Razlike u produkciji speB (izražene u milimetrima zone prosvjetljenja na agaru) između netretiranih izolata i izolata inkubiranih sa $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK penicilina

Ako analiziramo uticaj penicilina na produkciju SpeB kod izolata u svakoj grupi pojedinačno, uočavaju se statistički značajne razlike kod sve tri ispitivane grupe. U odnosu na netretirane izolate, sve tri grupe su nakon inkubacije sa $\frac{1}{2}$ MIK značajno slabije produkovale SpeB ($t=-18,160$, $p\leq 0,001$; $t=-9,354$, $p\leq 0,001$; $t=-7,921$, $p\leq 0,001$) kao i nakon inkubacije sa $\frac{1}{4}$ MIK ($t=-9,848$, $p\leq 0,001$, $t=-4,523$, $p\leq 0,001$, $t=-4,469$, $p\leq 0,001$).

Kod sve tri grupe je uočena statistički značajna razlika kad je poređen uticaj $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK ($t=-8,367$, $p\leq 0,001$, $t=-6,799$, $p\leq 0,001$, $t=-7,544$, $p\leq 0,001$), što je prikazano na Grafikonu 22.

4.6.3. Uticaj ceftriaksona na produkciju cistein proteaze SpeB

Da bismo utvrdili uticaj subinhibitornih koncentracija ceftriaksona na produkciju cistein proteaze SpeB mjerili smo prečnik zone prosvjetljenja na azokazeinskom agaru sa dodatkom antibiotika. Rezultati su prikazani u Tabeli 20.

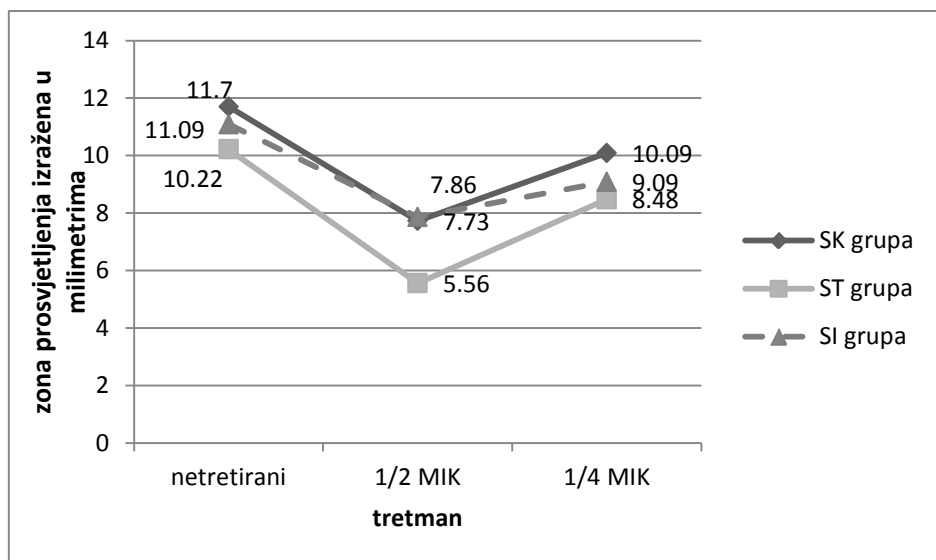
Tabela 20. Produkcija cistein proteaze SpeB iskazana u milimetrima zone prosvjetljenja na agaru

Grupa	Ceftriakson ½ MIK	Ceftriakson ¼ MIK
SK	7,73	10,09
ST	5,56**	8,48
SI	7,86	9,09
Vrijednost stat. testa	F=5,309	F=1,782
Vrijednost stat. značajnosti	p=0,006	p=0,172

** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna

Kod izolata tretiranih sa ½ MIK ceftriaksona uočena je statistički značajna razlika između grupa nakon tretmana sa ½ MIK, koja je posljedica slabije produkcije izolata grupe ST u odnosu na grupu SK (p=0,006). Nije uočena statistički značajna razlika između grupa nakon tretmana sa ¼ MIK.

Kada se analiziraju razlike između grupa u produkciji SpeB prije i poslije tretmana sa ½, odnosno ¼ MIK ceftriaksona, nije uočena statistički značajna razlika između grupa (F=2,202, p=0,068), tj. sve tri grupe se ponašaju slično. Rezultati su prikazani na Grafikonu 23.



Grafikon 23. Razlike u produkciji speB (izražene u milimetrima zone prosvjetljenja na agaru) između netretiranih izolata i izolata inkubiranih sa ½ i ¼ MIK ceftriaksona

Ako analiziramo uticaj ceftriaksona na produkciju SpeB kod izolata u svakoj grupi pojedinačno, uočavaju se statistički značajne razlike kod sve tri ispitivane grupe. U odnosu na netretirane izolate, sve tri grupe su nakon inkubacije sa ½ MIK značajno slabije produkovale SpeB ($t=-15,852$, $p\leq 0,001$; $t=-9,360$, $p\leq 0,001$; $t=-5,666$, $p\leq 0,001$). Nakon inkubacije sa ¼ MIK takođe su sve tri grupe značajno slabije produkovale SpeB ($t=-7,268$, $p\leq 0,001$, $t=-5,949$, $p\leq 0,001$, $t=-5,850$, $p\leq 0,001$). Kod sve tri grupe je uočena statistički značajna razlika kad je poređen uticaj i ¼ MIK ($t=-11,726$, $p\leq 0,001$, $t=-6,581$, $p\leq 0,001$, $t=-2,989$, $p\leq 0,001$), kao što je prikazano u grafikonu 23.

4.6.4. Uticaj klindamicina na produkciju cistein proteaze SpeB

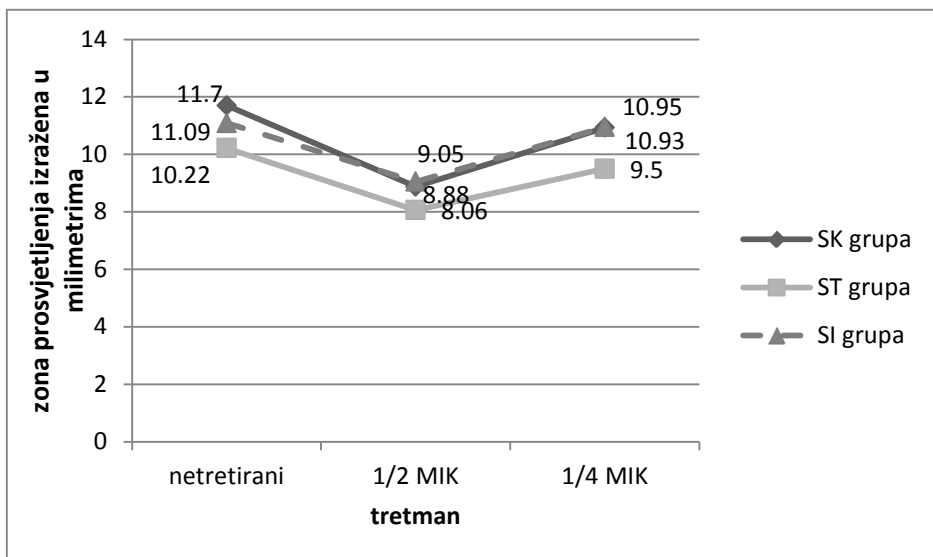
Da bismo utvrdili uticaj subinhibitornih koncentracija klindamicina na produkciju cistein proteaze SpeB mjerili smo prečnik zone prosvjetljenja na azokazeinskom agaru sa dodatkom antibiotika. Rezultati su prikazani u Tabeli 21.

Tabela 21. Produkcija cistein proteaze SpeB iskazana u milimetrima zone prosvjetljenja na agaru

Grupa	Klindamicin ½ MIK	Klindamicin ¼ MIK
SK	8,88	10,93
ST	8,06	9,50
SI	9,05	10,95
Vrijednost stat. testa	F=0,649	F=1,390
Vrijednost stat. značajnosti	p=0,524	p=0,252

Nije nađena statistički značajna razlika u produkciji SpeB između grupa nakon inkubacije sa ½ MIK, niti nakon inkubacije sa ¼ MIK.

Kada se analiziraju razlike između grupa u produkciji SpeB prije i poslije tretmana sa ½, odnosno ¼ MIK klindamicina, nije uočena statistički značajna razlika između grupa ($F=1,757$, $p=0,137$), tj. sve tri grupe se ponašaju slično. Rezultati su prikazani na Grafikonu 24.



Grafikon 24. Razlike u produkciji speB (izražene u milimetrima zone prosvjetljenja na agaru) između netretiranih izolata i izolata inkubiranih sa ½ i ¼ MIK klindamicina

Ako analiziramo uticaj klindamicina na produkciju SpeB kod izolata u svakoj grupi pojedinačno, na hidrofobnost izolata unutar svake grupe pojedinačno, uočavaju se statistički značajne razlike kod sve tri ispitivane grupe. U odnosu na netretirane izolate, sve tri grupe su nakon inkubacije sa ½ MIK značajno slabije produkovale SpeB ($t=-11,544$, $p\leq 0,001$; $t=-6,596$, $p\leq 0,001$; $t=-9,176$, $p\leq 0,001$). Nakon inkubacije sa ¼ MIK grupe SK i ST su značajno slabije produkovale SpeB ($t=-6,220$, $p\leq 0,001$, $t=-3,078$, $p\leq 0,001$, $t=-0,323$, $p=0,750$). Kod sve tri grupe je uočena statistički značajna razlika kad je poređen uticaj ½ i ¼ MIK ($t=-9,264$, $p\leq 0,001$, $t=-6,244$, $p\leq 0,001$, $t=-4,652$, $p\leq 0,001$), što je prikazano Grafikonom 24.

4.6.5. Uticaj eritromicina na produkciju cistein proteaze SpeB

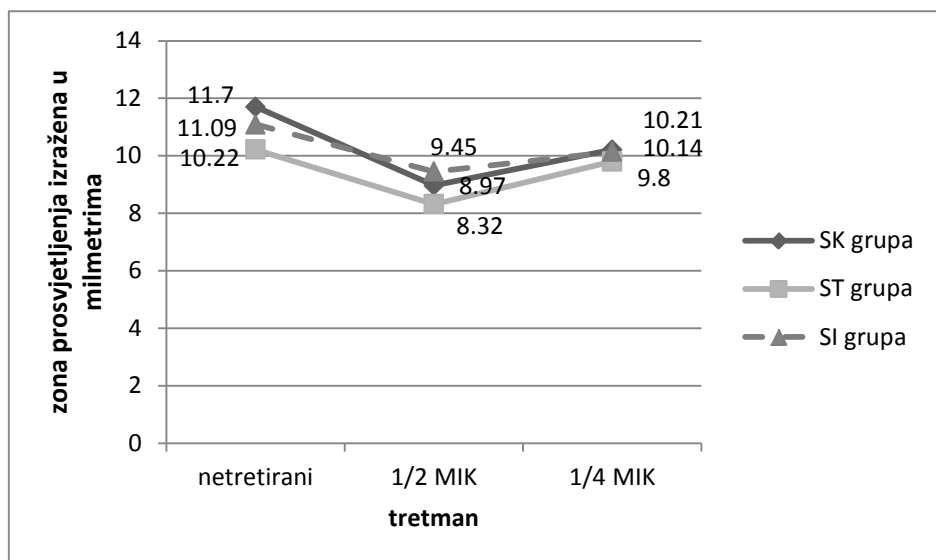
Da bismo utvrdili uticaj subinhibitornih koncentracija eritromicina na produkciju cistein proteaze SpeB mjerili smo prečnik zone prosvjetljenja na azokazeinskom agaru sa dodatkom antibiotika. Rezultati su prikazani u Tabeli 22.

Tabela 22. Produkcija cistein proteaze SpeB iskazana u milimetrima zone prosvjetljenja na agaru

Grupa	Eritromicin ½ MIK	Eritromicin ¼ MIK
SK	8,97	10,21
ST	8,32	9,80
SI	9,45	10,14
Vrijednost stat. testa	F=0,639	F=0,134
Vrijednost stat. značajnosti	p=0,529	p=0,874

Nije nađena statistički značajna razlika između grupa u produkciji SpeB nakon inkubacije sa MIK, niti nakon inkubacije sa $\frac{1}{4}$ MIK.

Kada se analiziraju razlike između grupa u produkciji SpeB prije i poslije tretmana sa $\frac{1}{2}$, odnosno $\frac{1}{4}$ MIK klindamicina, uočena je statistički značajna razlika između grupa ($F=3,103$, $p=0,016$), iako se sve tri grupe ponašaju slično. Razlika nastaje sabiranjem pojedinačnih razlika između grupa. Rezultati su prikazani na Grafikonu 25.



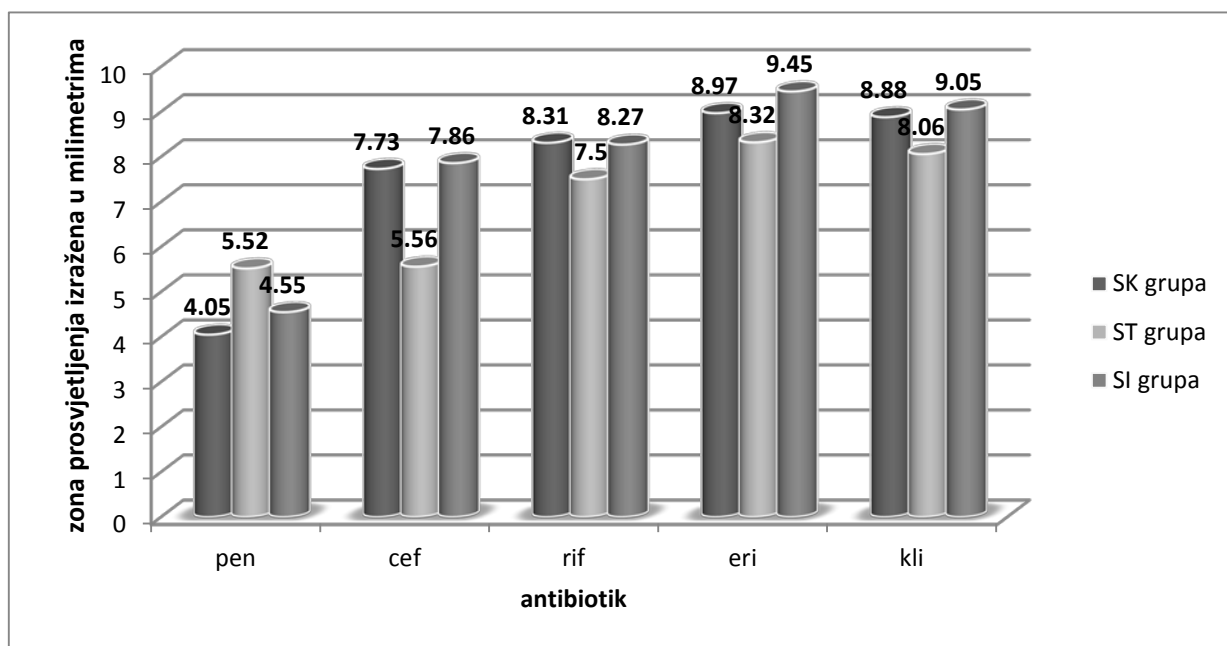
Grafikon 25. Razlike u produkciji speB (izražene u milimetrima zone prosvjetljenja na agaru) između netretiranih izolata i izolata inkubiranih sa $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK eritromicina

Ako analiziramo uticaj eritromicina na produkciju SpeB kod izolata u svakoj grupi pojedinačno, uočavaju se statistički značajne razlike kod sve tri ispitivane grupe. U odnosu na netretirane izolate, sve tri grupe su nakon inkubacije sa $\frac{1}{2}$ MIK značajno slabije produkovale SpeB ($t=-9,264$, $p\leq 0,001$; $t=-7,423$, $p\leq 0,001$; $t=-4,576$, $p\leq 0,001$). Nakon inkubacije sa $\frac{1}{4}$ MIK, takođe, su sve tri grupe značajno slabije produkovale SpeB ($t=-5,723$, $p\leq 0,001$; $t=-2,878$, $p=0,006$; $t=-3,375$, $p=0,003$). Kod sve tri grupe je uočena statistički značajna razlika kad je poreden uticaj $\frac{1}{4}$ MIK ($t=-6,789$, $p\leq 0,001$, $t=-7,099$, $p\leq 0,001$, $t=-3,382$, $p=0,003$). Rezultati su prikazani na Grafikonu 25.

4.6.6. Poređenje uticaja $\frac{1}{2}$ MIK svih antibiotika na produkciju cistein proteaze SpeB

Ako se uporedi uticaj $\frac{1}{2}$ MIK pet antibiotika na produkciju SpeB uočava se statistički visoko značajna razlika kako u cijelom eksperimentu ($F=74,504$, $p<0,001$), tako i između grupa ($F=6,366$,

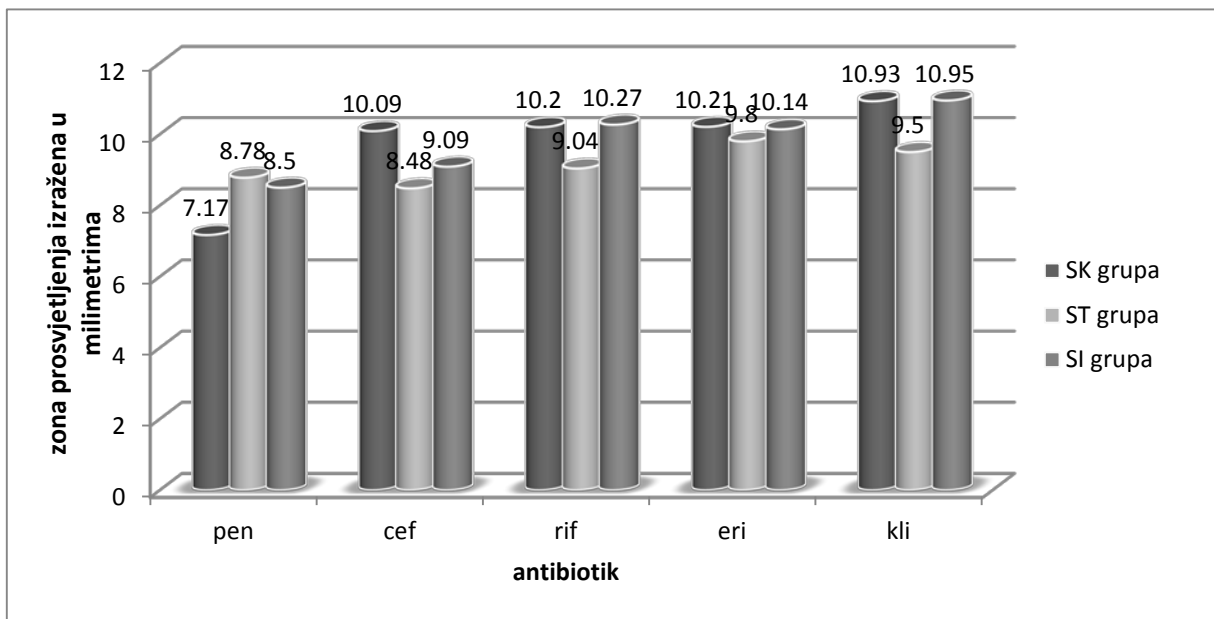
$p < 0,001$). Analizirajući uticaj antibiotika u cjelosti uočava se da izolati tretirani penicilinom manje proizvode SpeB u odnosu na sojeve tretirane sa klindamicinom, ceftriaksonom, eritromicinom i imaju značajno manju produkciju SpeB u odnosu na sojeve tretirane sa klindamicinom, eritromicinom i rifampicinom ($p < 0,001$, $p < 0,001$, $p = 0,004$), kao i da sojevi tretirani rifampicinom imaju manju produkciju u odnosu na tretman sa eritromicinom ($p = 0,004$). Rezultati su prikazani Grafikonom 26.



Grafikon 26. Poređenje uticaja $\frac{1}{2}$ MIK svih antibiotika na produkciju SpeB izraženu u milimetrima zone prosvjetljenja na agaru

4.6.7. Poređenje uticaja $\frac{1}{4}$ MIK svih antibiotika na produkciju cistein proteaze SpeB

Ako se uporedi uticaj $\frac{1}{4}$ MIK pet antibiotika na produkciju SpeB uočava se statistički visoko značajna razlika kako u cijelom eksperimentu ($F = 19,856$, $p < 0,001$), tako i između grupa ($F = 6,428$, $p < 0,001$). Analizirajući uticaj antibiotika u cjelosti uočava se da sojevi tretirani penicilinom manje proizvode SpeB u odnosu na sojeve tretirane sa klindamicinom, eritromicinom i rifampicinom ($p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$). Takođe, sojevi tretirani sa ceftriaksonom imaju značajno manju produkciju SpeB u odnosu na sojeve tretirane sa klindamicinom, eritromicinom i rifampicinom ($p < 0,001$, $p = 0,001$, $p = 0,033$), kao i da sojevi tretirani rifampicinom imaju manju produkciju u odnosu na tretman sa klindamicinom ($p = 0,038$). Rezultati su prikazani na Grafikonu 27.



Grafikon 27. Poređenje uticaja $\frac{1}{4}$ MIK svih antibiotika na produkciju SpeB izraženu u milimetrima zone prosvjetljenja na agaru

4.7. Uticaj subinhibitornih koncentracija antibiotika na produkciju biofilma

Da bi ispitali uticaj subinhibitornih koncentracija antibiotika, izolati su prethodno inkubirani u bujonu sa subinhibitornim koncentracijama antibiotika, a zatim je ispitana je sposobnost produkcije biofilma, opet, u prisustvu subinhibitornih koncentracija antibiotika tokom 12, 24 i 48 sati inkubacije u pločama za mikrotitraciju.

4.7.1. Uticaj subinhibitornih koncentracija rifampicina na produkciju biofilma

4.7.1.1. Uticaj $\frac{1}{2}$ MIK rifampicina na produkciju biofilma

Da bismo ispitali eventualnu razliku u produkciji biofilma između grupa, izolate smo inkubirali u prisustvu $\frac{1}{2}$ MIK rifampicina tokom 12, 24 i 48 sati. Rezultati su prikazani u Tabeli 23.

Tabela 23. Proporcija biofilm produkujućih izolata nakon inkubacije sa ½ MIK rifampicina

Grupa	12h inkubacija	24h inkubacija	48h inkubacija
SK	0,44	0,06	0,29*
ST	0,30	0,46**	0,38**
SI	0,45	0,14	0,00
Vrijednost stat. testa	F=1,510	F=22,078	F=5,833
Vrijednost stat.značajn	p=0,224	p<0,001	p=0,004

*- uočena razlika između grupa je statistički značajna

** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna

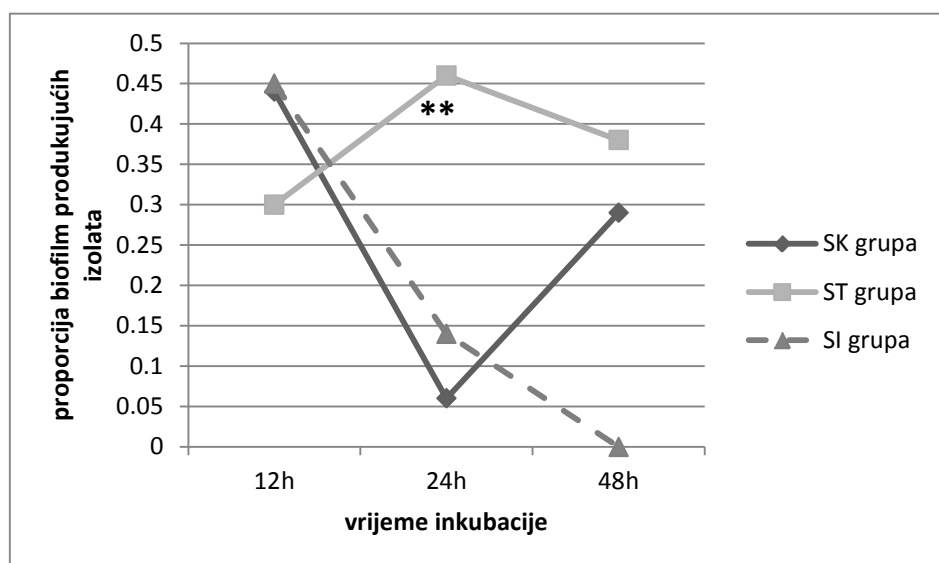
Nakon 12-časovne inkubacije nije nađena statistički značajna razlika između grupa

Nakon 24-časovne inkubacije uočena je statistički značajna razlika između grupa, koja je posljedica statistički značajno bolje produkcije biofilma grupe ST u odnosu na druge dvije grupe (p<0,001, p=0,001).

Nakon 48-časovne inkubacije uočena je statistički značajna razlika između eksperimentalnih grupa, koja potiče od statistički značajno bolje produkcije biofilma grupa SK i ST u odnosu na SI grupu (p=0,016, p=0,003).

Svi biofilm produkujući izolati su bili slabi produktori biofilma.

Kada analiziramo razlike između grupa u produkciji biofilma nakon uticaja ½ MIK rifampicina tokom zadatog perioda trajanja eksperimenta (od 12 do 48 sati) grupe se ponašaju značajno različito (F=7,788 i p<0,001), tj. grupa ST značajno bolje produkuje biofilm tokom vremena u odnosu na druge dvije grupe (p=0,008, p=0,004), što se vidi na Grafikonu 28.



** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna

Grafikon 28. Razlike između grupa u produkciji biofilma nakon inkubacije sa ½ MIK rifampicina tokom zadatog vremena trajanja eksperimenta

Ako analiziramo uticaj rifampicina na produkciju biofilma kod izolata u svakoj grupi pojedinačno, uočavamo da nakon inkubacije od 12 i 24 sata samo izolati grupe SK nakon tretmana statistički značajno bolje produkuju biofilm ($t=-2,183$, $p=0,031$; $t=2,460$, $p=0,016$). Kad analiziramo produkciju biofilma tokom 48 sati ni kod jedne ispitivane grupe sojeva ne uočavamo statistički značajno bolju produkciju biofilma nakon tretmana sa $\frac{1}{2}$ MIK rifampicina.

4.7.1.2. Uticaj $\frac{1}{4}$ MIK rifampicina na produkciju biofilma

Da bismo ispitali eventualnu razliku u produkciji biofilma između grupa, izolate smo inkubirali u prisustvu $\frac{1}{4}$ MIK rifampicina tokom 12, 24 i 48 sati. Rezultati su prikazani u Tabeli 24.

Tabela 24. Proporcija biofilm produkujućih izolata nakon inkubacije sa $\frac{1}{4}$ MIK rifampicina

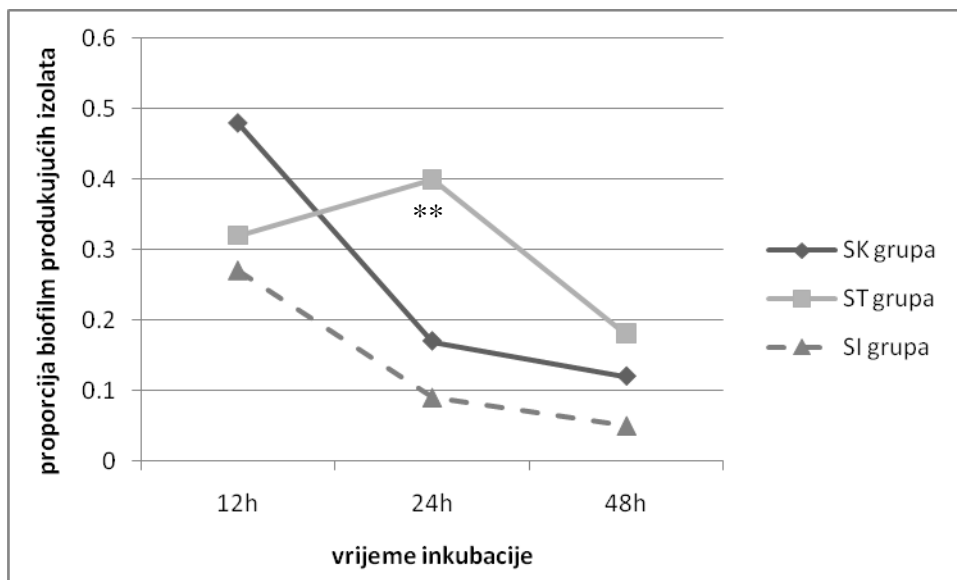
Grupa	12h inkubacija	24h inkubacija	48h inkubacija
SK	0,48	0,17	0,12
ST	0,32	0,40**	0,18
SI	0,27	0,09	0,05
Vrijednost stat. testa	F=2,749	F=6,743	F=1,304
Vrijednost stat.značajn	p=0,067	p=0,002	p=0,274

**** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna**

Nakon 12-časovne i 48-časovne inkubacije nije nađena statistički značajna razlika između grupa. Nakon 24-časovne inkubacije uočena je statistički značajna razlika između grupa, koja je posljedica statistički značajno bolje produkcije biofilma grupe ST u odnosu na druge dvije grupe ($p=0,004$, $p=0,010$).

Svi biofilm produkujući izolati su bili slabi produktori biofilma.

Kada analiziramo razlike između grupa u produkciji biofilma nakon uticaja $\frac{1}{4}$ MIK rifampicina tokom zadatog perioda trajanja eksperimenta (od 12 do 48 sati) grupe se ponašaju značajno različito ($F=3,881$ i $p=0,004$), tj. grupa ST značajno bolje produkuje biofilm tokom vremena u odnosu na SI grupu ($p=0,008$), što se vidi na Grafikonu 29.



**** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna**

Grafikon 29. Razlike između grupa u produkciji biofilma nakon inkubacije sa $\frac{1}{4}$ MIK rifampicina tokom zadatog vremena trajanja eksperimenta

Ako analiziramo uticaj rifampicina na produkciju biofilma kod izolata u svakoj grupi pojedinačno, uočavamo da samo grupa SK nakon tretmana statistički značajno bolje produkuje biofilm nakon 12 ($t=-2,870$, $p=0,005$) i 48 sati ($t=3,967$, $p<0,001$). Kad analiziramo produkciju biofilma tokom 24 sata ni kod jedne ispitivane grupe ne uočavamo statistički značajno bolju produkcija biofilma nakon tretmana sa $\frac{1}{4}$ MIK rifampicina.

Kada je analizirana produkcija biofilma između izolata tretiranih sa $\frac{1}{2}$ MIK i sa $\frac{1}{4}$ MIK rifampicina uočena je statistički značajna razlika kod grupe SK nakon inkubacije od 24 sata ($t=-2,595$, $p=0,011$) i od 48 sati ($t=2,985$, $p=0,004$), te kod izolata grupe ST nakon inkubacije od 48 sati ($t=2,858$, $p=0,006$).

4.7.2. Uticaj subinhibitorne koncentracije penicilina na produkciju biofilma

4.7.2.1. Uticaj $\frac{1}{2}$ MIK penicilina na produkciju biofilma

Da bismo ispitali eventualnu razliku u produkciji biofilma između grupa, izolate smo inkubirali u prisustvu $\frac{1}{2}$ MIK penicilina tokom 12, 24 i 48 sati. Rezultati su prikazani u Tabeli 25.

Tabela 25. Proporcija biofilm produkujućih izolata nakon inkubacije sa ½ MIK penicilina

Grupa	12h inkubacija	24h inkubacija	48h inkubacija
SK	0,55	0,38	0,42
ST	0,30*	0,18*	0,28
SI	0,41	0,45	0,32
Vrijednost stat. testa	F=4,471	F=3,984	F=1,534
Vrijednost stat.značajn	p=0,013	p=0,020	p=0,219

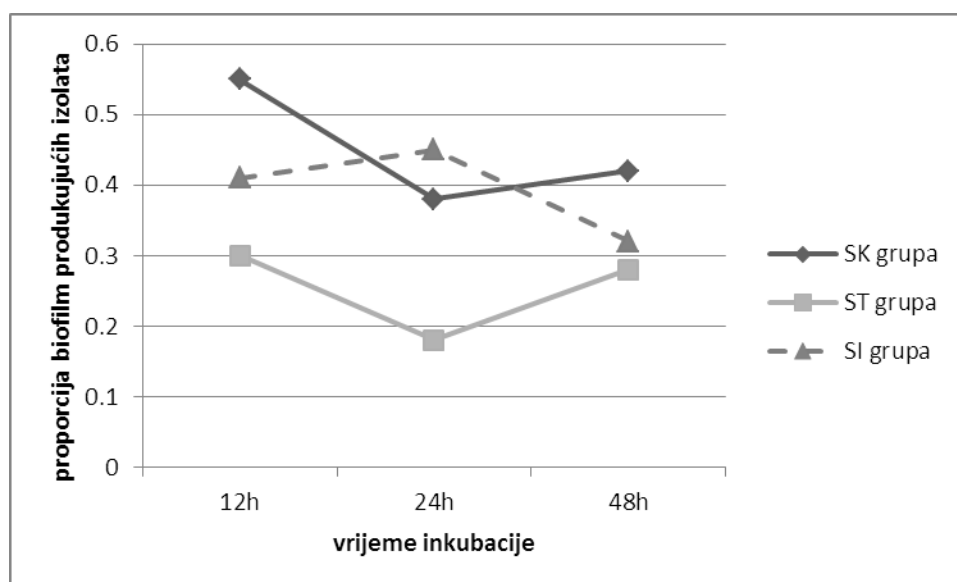
*- uočena razlika između grupa je statistički značajna

Nakon 12-časovne i 24-časovne inkubacije uočena je statistički značajna razlika između grupa, koja je posljedica statistički značajno slabije produkcije biofilma grupe ST u odnosu na grupu SK (p=0,011, p=0,041).

Nakon 48-časovne inkubacije nije nađena statistički značajna razlika između grupa.

Svi biofilm produkujući izolati su bili slabi produktori biofilma.

Kada analiziramo razlike između grupa u produkciji biofilma nakon uticaja ½ MIK penicilina tokom zadanog perioda trajanja eksperimenta (od 12 do 48 sati) grupe sličnom dinamikom produkuju biofilm (F=0,874 i p=0,479). Iako postoji statistički visoko značajna razlika u produkciji biofilma tokom vremena između grupa SK i ST (p=0,001), ta razlika nije dovoljna da bi dovela do statističke značajnosti na nivou čitavog testa, što se vidi na Grafikonu 30.



Grafikon 30. Razlike između grupa u produkciji biofilma nakon inkubacije sa ½ MIK penicilina tokom zadanog vremena trajanja eksperimenta

Ako analiziramo uticaj penicilina na produkciju biofilma tokom 12 sati kod izolata u svakoj grupi pojedinačno, uočavamo samo grupu SK nakon tretmana statistički visoko značajno bolje produkuje biofilm (t=-4,028, p<0,001). Kad analiziramo produkciju biofilma tokom 24 sata kod sve tri grupe

uočava se statistički značajno bolja produkcija biofilma nakon tretmana ($t=-3,660$, $p<0,001$; $t=2,871$, $p=0,006$; $t=-2,935$, $p=0,008$). Kad analiziramo produkciju biofilma tokom 48 sata samo kod grupe SI uočavamo statistički značajna bolju produkcija biofilma ($t=-2,324$, $p=0,030$).

4.7.2.2. Uticaj ¼ MIK penicilina na produkciju biofilma

Da bismo ispitali eventualnu razliku u produkciji biofilma između grupa, izolate smo inkubirali u prisustvu ¼ MIK penicilina tokom 12, 24 i 48 sati. Rezultati su prikazani u Tabeli 26.

Tabela 26. Proporcija biofilm produkujućih izolata nakon inkubacije sa ¼ MIK penicilina

Grupa	12h inkubacija	24h inkubacija	48h inkubacija
SK	0,48*	0,26	0,53**
ST	0,28	0,20	0,16
SI	0,18	0,18	0,23
Vrijednost stat. testa	F=5,209	F=0,512	F=12,334
Vrijednost stat.značajnosti	p=0,006	p=0,600	p<0,001

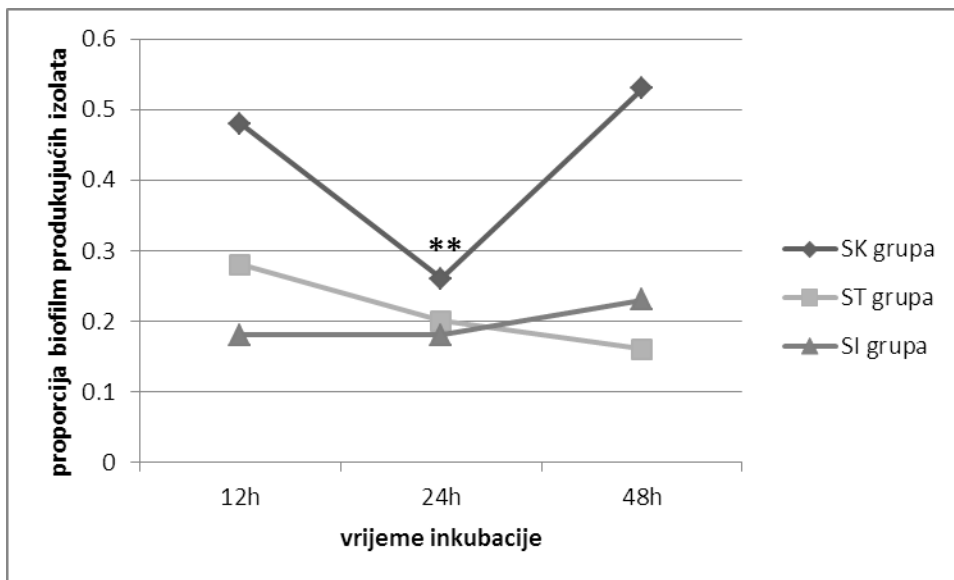
*- uočena razlika između grupa je statistički značajna

** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna

Nakon 12-časovne i 48-časovne inkubacije uočena je statistički visoko značajna razlika između grupa u produkciji biofilma, koja potiče od značajno bolje produkcije grupe SK u odnosu na druge dvije grupe ($p=0,049$, $p=0,026$; $p<0,001$, $p=0,017$). Nakon 24-časovne inkubacije nije nađena statistički značajna razlika između grupa.

Svi biofilm produkujući izolati su bili slabi produktori biofilma.

Kada analiziramo razlike između grupa u produkciji biofilma nakon uticaja ¼ MIK penicilina tokom zadanog perioda trajanja eksperimenta (od 12 do 48 sati) grupe se ponašaju statistički značajno različito ($F=2,945$ i $p=0,020$). Ova razlika potiče od značajno bolje produkcije biofilma tokom vremena izolata grupe SK u odnosu na druge dvije grupe ($p<0,001$, $p=0,007$), kako je prikazano na Grafikonu 31.



** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna

Grafikon 31. Razlike između grupa u produkciji biofilma nakon inkubacije sa $\frac{1}{4}$ MIK penicilina tokom zadatog vremena trajanja eksperimenta

Ako analiziramo uticaj penicilina na produkciju biofilma kod izolata u svakoj grupi pojedinačno, uočavamo da nakon 12 sati samo grupa SK statistički visoko značajno bolje produkuje biofilm nakon tretmana ($t=2,806$, $p=0,006$). Kad analiziramo produkciju biofilma tokom 24 sata samo izolati grupe ST statistički značajno bolje produkuju biofilm nakon tretmana sa $\frac{1}{4}$ MIK ($t=2,674$, $p=0,010$). Kad analiziramo produkciju biofilma tokom 48 sve tri grupe statistički značajno bolje produkuju biofilm nakon tretmana ($t=-2,547$, $p=0,012$; $t=2,272$, $p=0,028$; $t=-2,160$, $p=0,042$).

Tokom zadatog vremena trajanja eksperimenta nije uočena statistički značajna razlika između grupa kada je poređena produkcija biofilma između grupa tretiranih sa $\frac{1}{2}$ i sa $\frac{1}{4}$ MIK penicilina.

4.7.3. Uticaj ceftriaksona na produkciju biofilma

4.7.3.1. Uticaj $\frac{1}{2}$ MIK ceftriaksona na produkciju biofilma

Da bismo ispitali eventualnu razliku u produkciji biofilma između grupa, izolate smo inkubirali u prisustvu $\frac{1}{2}$ MIK ceftriaksona tokom 12, 24 i 48 sati. Rezultati su prikazani u Tabeli 27.

Tabela 27. Proporcija biofilm produkujućih izolata nakon inkubacije sa ½ MIK ceftriaksona

Grupa	12h inkubacija	24h inkubacija	48h inkubacija
SK	0,49**	0,18	0,17
ST	0,24	0,22	0,28
SI	0,23	0,14	0,14
Vrijednost stat. testa	F=6,010	F=0,377	F=1,572
Vrijednost stat.značajn	p=0,003	p=0,687	p=0,211

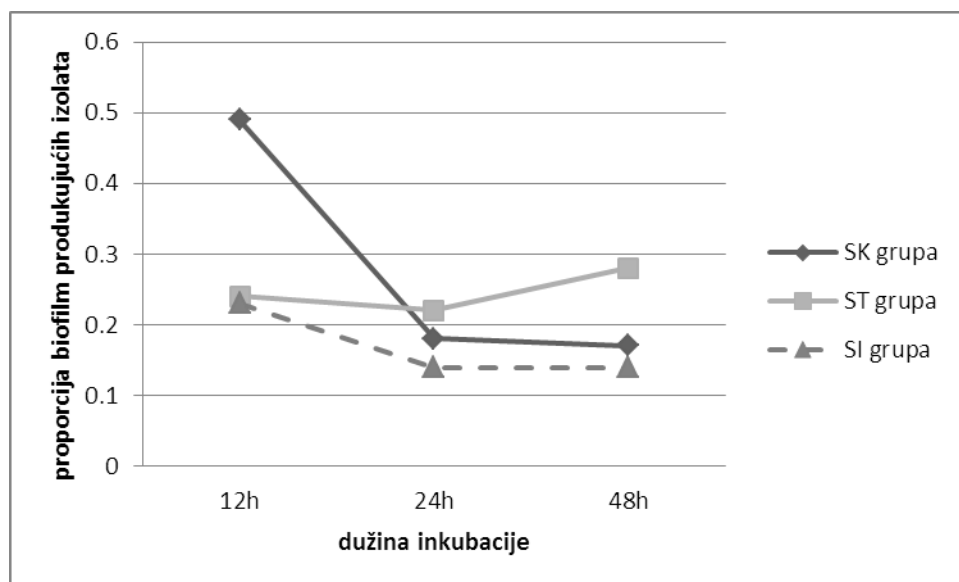
**** - uočena razlika između grupa je statistički visoko značajna**

Nakon 12-časovne inkubacije uočena je statistički značajna razlika između grupa, koja potiče od bolje produkcije biofilma izolata grupe SK u odnosu na grupu ST (p=0,008).

Nakon 24-časovne i 48-časovne inkubacije nije nađena statistički značajna razlika između grupa.

Svi biofilm produkujći izolati su bili slabi produktori biofilma.

Kada analiziramo razlike između grupa u produkciji biofilma nakon uticaja ½ MIK ceftriaksona tokom zadatog perioda trajanja eksperimenta (od 12 do 48 sati) uočena je statistički visoko značajna razlika između grupa (F=4,597 i p=0,001), koja se dobije sabiranjem pojedinačnih razlika između grupa. Između pojedinih grupa ne postoji statistička značajnost, kao što se vidi na Grafikonu 32.



Grafikon 32. Razlike između grupa u produkciji biofilma nakon inkubacije sa ½ MIK ceftriaksona tokom zadatog vremena trajanja eksperimenta

Ako analiziramo uticaj ceftriaksona na produkciju biofilma kod izolata u svakoj grupi pojedinačno, uočavamo da nakon inkubacije od 12 i 48 sati samo grupa SK nakon tretmana statistički značajno bolje produkuje biofilm (t=2,814, p=0,006; t=3,178, p=0,002). Nakon inkubacije od 24 sata, uočeno

je da samo grupa ST statistički značajno bolje produkuje biofilm nakon tretmana ($t=2,333$, $p=0,024$).

4.7.3.2. Uticaj ¼ MIK ceftriaksona na produkciju biofilma

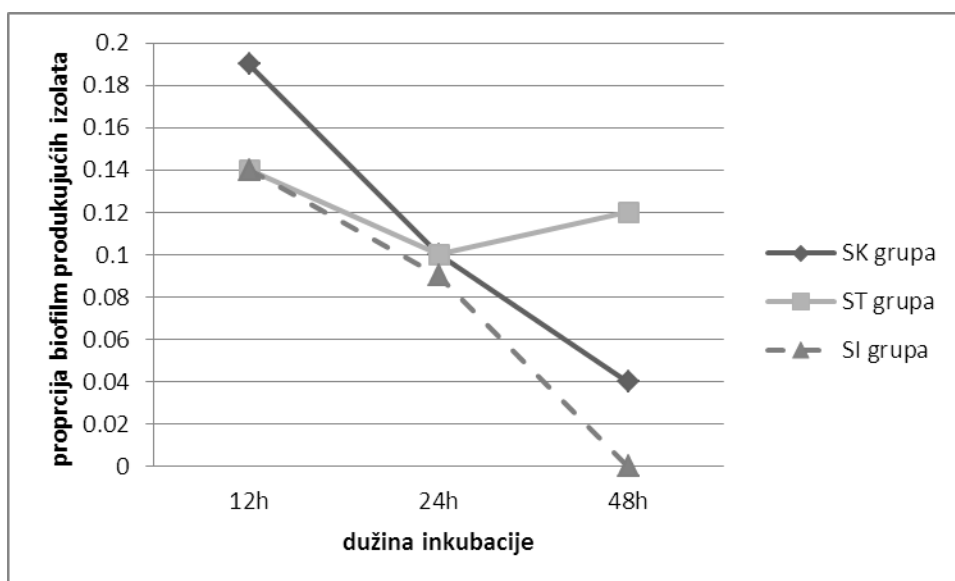
Da bismo ispitali eventualnu razliku u produkciji biofilma između grupa, izolate smo inkubirali u prisustvu ¼ MIK ceftriaksona tokom 12, 24 i 48 sati. Rezultati su prikazani u Tabeli 28.

Tabela 28. Proporcija biofilm produkujućih izolata nakon inkubacije sa ¼ MIK ceftriaksona

Grupa	12h inkubacija	24h inkubacija	48h inkubacija
SK	0,19	0,10	0,04
ST	0,14	0,10	0,12
SI	0,14	0,09	0,00
Vrijednost stat. testa	F=0,386	F=0,009	F=2,767
Vrijednost stat.značajnosti	p=0,681	p=0,991	p=0,066

Nakon inkubacije sa ¼ MIK ceftriaksona nije nađena statistički značajna razlika između grupa u produkciji biofilma tokom sva tri posmatrana vremena. Svi biofilm produkujući izolati su bili slabi produktori biofilma.

Kada analiziramo razlike između grupa u produkciji biofilma nakon uticaja ¼ MIK ceftriaksona tokom zadatog perioda trajanja eksperimenta (od 12 do 48 sati) grupe se ponašaju slično ($F=1,065$ i $p=0,374$), što je prikazano na Grafikonu 33.



Grafikon 33. Razlike između grupa u produkciji biofilma nakon inkubacije sa ¼ MIK ceftriaksona tokom zadatog vremena trajanja eksperimenta

Ako analiziramo uticaj ceftriaksona na produkciju biofilma kod izolata u svakoj grupi pojedinačno, uočavamo da tokom sva tri posmatrana vremena sata grupa ST statistički značajno bolje produkuje biofilm nakon tretmana ($t=2,137$, $p=0,038$; $t=4,106$, $p<0,001$; $t=2,526$, $p=0,015$). Nakon 48-časovne inkubacije i grupa SK značajno bolje produkuje biofilm poslije tretmana sa antibiotikom ($t=6,043$, $p<0,001$).

Tokom sva tri zadata vremena trajanja eksperimenta je uočena statistički visoko značajna bolja produkcija biofilma kod izolata iz grupe SK ($t=5,745$, $p<0,001$; $t=2,031$, $p=0,045$; $t=3,846$, $p<0,001$) kad su sojevi tretirani sa $\frac{1}{2}$ MIK, u odnosu na tretman sa $\frac{1}{4}$ MIK ceftriaksona, kao i kod ST grupe tokom 12- i 48- časovne inkubacije ($t=2,333$, $p=0,024$; $t=2,221$, $p=0,031$)

4.7.4. Uticaj subinhibitornih koncentracija klindamicina na produkciju biofilma

4.7.4.1. Uticaj $\frac{1}{2}$ MIK klindamicina na produkciju biofilma

Da bismo ispitali eventualnu razliku u produkciji biofilma između grupa, izolate smo inkubirali u prisustvu $\frac{1}{2}$ MIK klindamicina tokom 12, 24 i 48 sati. Rezultati su prikazani u Tabeli 29.

Tabela 29. Proporcija biofilm produkujućih izolata nakon inkubacije sa $\frac{1}{2}$ MIK klindamicina

Grupa	12h inkubacija	24h inkubacija	48h inkubacija
SK	0,49	0,67	0,38
ST	0,62	0,68	0,40
SI	0,73	0,59	0,68*
Vrijednost stat. testa	F=2,640	F=0,295	F=3,530
Vrijednost stat.značajn	p=0,074	p=0,745	p=0,031

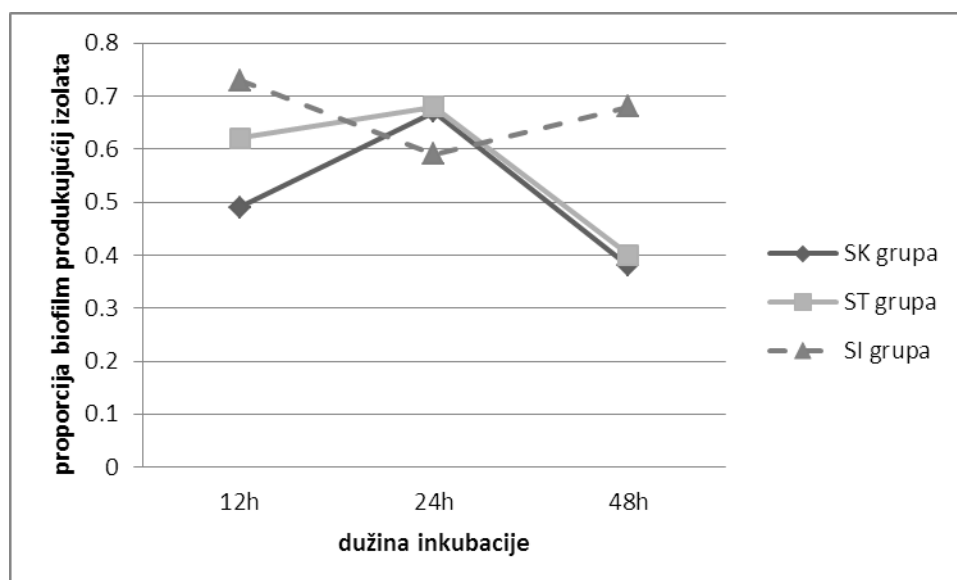
*- uočena razlika između grupa je statistički značajna

Nakon 12-časovne i 24-časovne inkubacije nije nađena statistički značajna razlika između grupa.

Nakon 48-časovne inkubacije uočena je statistički značajna razlika između grupa, koja potiče od bolje produkcije biofilma izolata grupe SI u odnosu na grupu SK ($p=0,028$).

Svi biofilm produkujući izolati su bili slabi produktori biofilma.

Kada analiziramo razlike između grupa u produkciji biofilma nakon uticaja $\frac{1}{2}$ MIK klindamicina tokom zadatog perioda trajanja eksperimenta (od 12 do 48 sati) grupe se ponašaju slično ($F=2,302$ i $p=0,058$), što je prikazano na Grafikonu 34.



Grafikon 34. Razlike između grupa u produkciji biofilma nakon inkubacije sa ¼ MIK ceftriaksona tokom zadatog vremena trajanja eksperimenta

Ako analiziramo uticaj klindamicina na produkciju biofilma kod izolata u svakoj grupi pojedinačno uočavamo da sve tri grupe nakon tretmana sa klindamicinom statistički visoko značajno bolje proizvode biofilm ($t=-2,934$, $p=0,004$; $t=-3,130$, $p=0,003$; $t=-4,161$, $p<0,001$). Kad analiziramo produkciju biofilma tokom 24 sata, opet se uočava da sve tri grupe statistički visoko značajna bolje stvaraju biofilma u odnosu na netretirane sojeve ($t=-8,179$, $p<0,001$; $t=-2,543$, $p=0,014$; $t=-3,924$, $p=0,001$). Nakon 48-časovne inkubacije samo izolati grupe SI bolje proizvode biofilma nakon uticaja antibiotika ($t=-5,137$, $p<0,001$).

4.7.4.2. Uticaj ¼ MIK klindamicina na produkciju biofilma

Da bismo ispitali eventualnu razliku u produkciji biofilma između grupa, izolate smo inkubirali u prisustvu ¼ MIK klindamicina tokom 12, 24 i 48 sati. Rezultati su prikazani u Tabeli 30.

Tabela 30. Proporcija biofilm produkujućih izolata nakon inkubacije sa ¼ MIK klindamicina

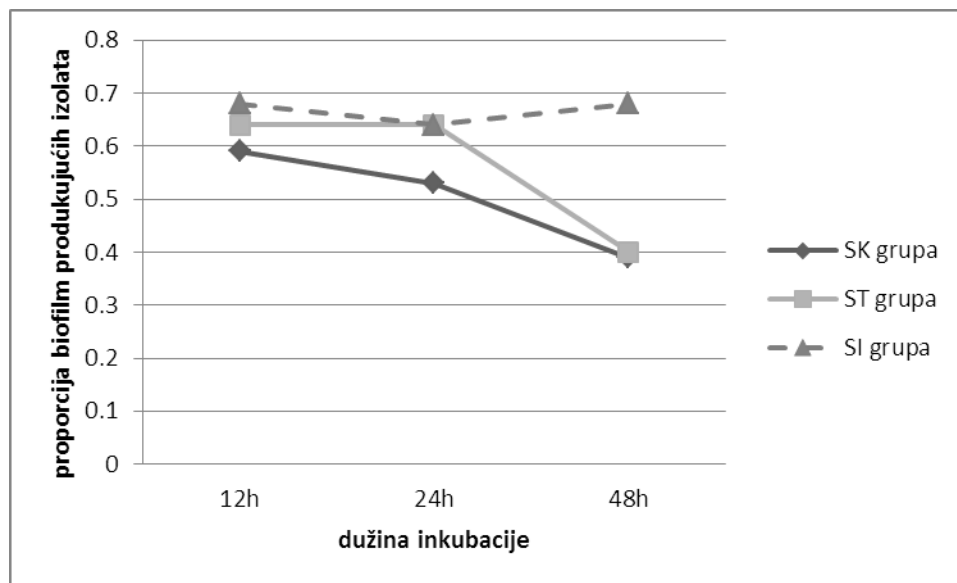
Grupa	12h inkubacija	24h inkubacija	48h inkubacija
SK	0,59	0,53	0,39
ST	0,64	0,64	0,40
SI	0,68	0,64	0,68*
Vrijednost stat. testa	F=0,400	F=1,011	F=3,333
Vrijednost stat.značajnosti	p=0,671	p=0,366	p=0,038

Nakon 12- časovne i 24- časovne inkubacije nije nađena statistički značajna razlika između grupa.

Nakon 48- časovne inkubacije uočena je statistički značajna razlika između grupa, koja potiče od bolje produkcije biofilma izolata grupe SI u odnosu na grupu SK ($p=0,037$).

Svi biofilm produkujući izolati su bili slabi produktori biofilma.

Kada analiziramo razlike između grupa u produkciji biofilma nakon uticaja $\frac{1}{4}$ MIK klindamicina tokom zadatog perioda trajanja eksperimenta (od 12 do 48 sati) grupe se ponašaju slično ($F=0,926$ i $p=0,449$), što je prikazano na Grafikonu 35.



Grafikon 35. Razlike između grupa u produkciji biofilma nakon inkubacije sa $\frac{1}{4}$ MIK klindamicina tokom zadatog vremena trajanja eksperimenta

Ako analiziramo uticaj klindamicina na produkciju biofilma kod izolata u svakoj grupi pojedinačno uočavamo da sve tri grupe statistički značajno bolje produkuju biofilm nakon tretmana kako tokom 12 sati ($t=-4,780$, $p<0,001$; $t=-3,466$, $p=0,001$; $t=-3,813$, $p=0,001$), tako i tokom 24 sata ($t=-5,460$, $p<0,001$; $t=-2,400$, $p=0,020$; $t=-5,020$, $p<0,001$). Nakon 48- časovne inkubacije samo kod izolata grupe SI je uočena značajno bolja produkcija biofilma ($t=-5,137$, $p<0,001$).

Tokom zadatog vremena trajanja eksperimenta (12-48 sati) kada je poređena produkcija biofilma pod uticajem $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK klindamicina, uočena je statistički značajna razlika samo kod grupe SK ($t=2,542$, $p=0,013$) tokom 24-časovne inkubacije.

4.7.5. Uticaj subinhibitornih koncentracija eritromicina na produkciju biofilma

4.7.5.1. Uticaj ½ MIK eritromicina na produkciju biofilma

Da bismo ispitali eventualnu razliku u produkciji biofilma između grupa, izolate smo inkubirali u prisustvu ½ MIK eritromicina tokom 12, 24 i 48 sati. Rezultati su prikazani u Tabeli 31.

Tabela 31. Proporcija biofilm produkujućih izolata nakon inkubacije sa ½ MIK eritromicina

Grupa	12h inkubacija	24h inkubacija	48h inkubacija
SK	0,58	0,47	0,45
ST	0,50	0,50	0,60
SI	0,86*	0,82*	0,73
Vrijednost stat. testa	F=4,414	F=4,620	F=3,578
Vrijednost stat.značajn	p=0,014	p=0,011	p=0,030

*- uočena razlika između grupa je statistički značajna

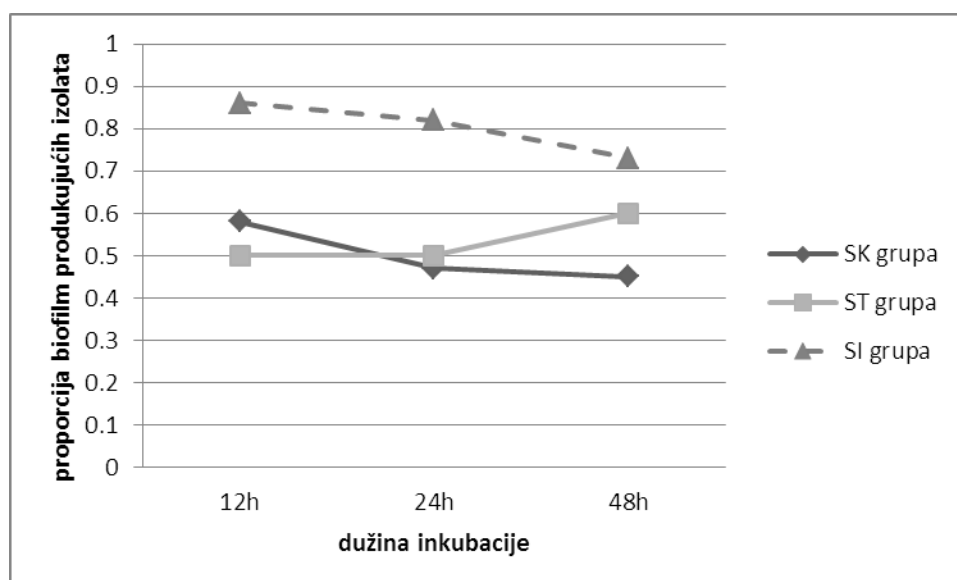
Nakon 12- časovne inkubacije uočena je statistički značajna razlika između grupa, koja potiče od bolje produkcije biofilma izolata grupe SI u odnosu na druge dvije grupe (p=0,041; p=0,011).

Nakon 24- časovne inkubacije je uočena statistički bolja produkcija biofilma grupe SI u odnosu na druge dvije grupe (p=0,009, p=0,036).

Nakon 48-časovne inkubacije sa ½ MIK eritromicina nađena je statistički značajna razlika između grupa, ali su ove razlike male ako se posmatraju grupe zasebno, nego se tek zbirom ovih razlika dobija značajnost na nivou testa.

Svi biofilm produkujući izolati su bili slabi produktori biofilma.

Kada analiziramo razlike između grupa u produkciji biofilma nakon uticaja ½ MIK eritromicina tokom zadatog perioda trajanja eksperimenta (od 12 do 48 sati) grupe se ponašaju slično (F=1,136 i p=0,339). Iako SI grupa statistički visoko značajno produkuje biofilm u odnosu na druge dvije grupe (p<0,001, p=0,002), ova razlika nije dovoljna da bi dovela do razlike na nivou cijelog eksperimenta, zbog poništavanja razlika, jer su suprotnog smjera, kao što je prikazano na Grafikonu 36.



Grafikon 36. Razlike između grupa u produkciji biofilma nakon inkubacije sa $\frac{1}{2}$ MIK eritromicina tokom zadatog vremena trajanja eksperimenta

Ako analiziramo uticaj eritromicina na produkciju biofilma kod izolata u svakoj grupi pojedinačno uočavamo da tokom 12 sati sve tri grupe statistički značajno bolje produkuju biofilm nakon tretmana ($t=-4,139$, $p<0,001$; $t=-2,024$, $p=0,048$; $t=-7,483$, $p<0,001$). Nakon inkubacije od 24 sata, kod grupa SK i SI je uočena statistički značajno bolja produkcija biofilma ($t=-4,662$, $p<0,001$; $t=-7,483$, $p<0,001$). Nakon produkcije biofilma tokom 48 sati kod grupa ST i SI uočava se statistički značajno bolja produkcija biofilma ($t=-2,449$, $p=0,018$; $t=-6,708$, $p<0,001$).

4.7.5.2. Uticaj $\frac{1}{4}$ MIK eritromicina na produkciju biofilma

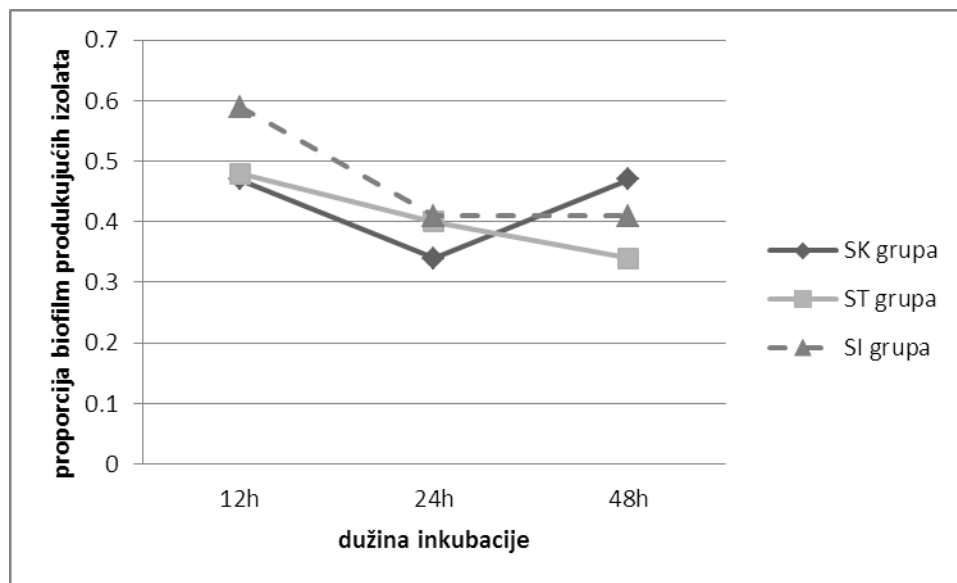
Da bismo ispitali eventualnu razliku u produkciji biofilma između grupa, izolate smo inkubirali u prisustvu $\frac{1}{4}$ MIK eritromicina tokom 12, 24 i 48 sati. Rezultati su prikazani u Tabeli 32.

Tabela 32. Proporcija biofilm produkujućih izolata nakon inkubacije sa $\frac{1}{4}$ MIK eritromicina

Grupa	12h inkubacija	24h inkubacija	48h inkubacija
SK	0,47	0,34	0,47
ST	0,48	0,40	0,34
SI	0,59	0,41	0,41
Vrijednost stat. testa	F=0,531	F=0,353	F=1,161
Vrijednost stat.značajnosti	p=0,589	p=0,703	p=0,310

Nakon inkubacije sa $\frac{1}{4}$ MIK eritromicina nije nađena statistički značajna razlika između grupa u produkciji biofilma tokom nijednog posmatranog vremena. Svi biofilm produkujući izolati su bili slabi produktori biofilma.

Kada analiziramo razlike između grupa u produkciji biofilma nakon uticaja $\frac{1}{4}$ MIK eritromicina tokom zadatog perioda trajanja eksperimenta (od 12 do 48 sati) grupe se ponašaju slično ($F=1,003$ i $p=0,406$), što je prikazano na Grafikonu 37.



Grafikon 37. Razlike između grupa u produkciji biofilma nakon inkubacije sa $\frac{1}{4}$ MIK eritromicina tokom zadatog vremena trajanja eksperimenta

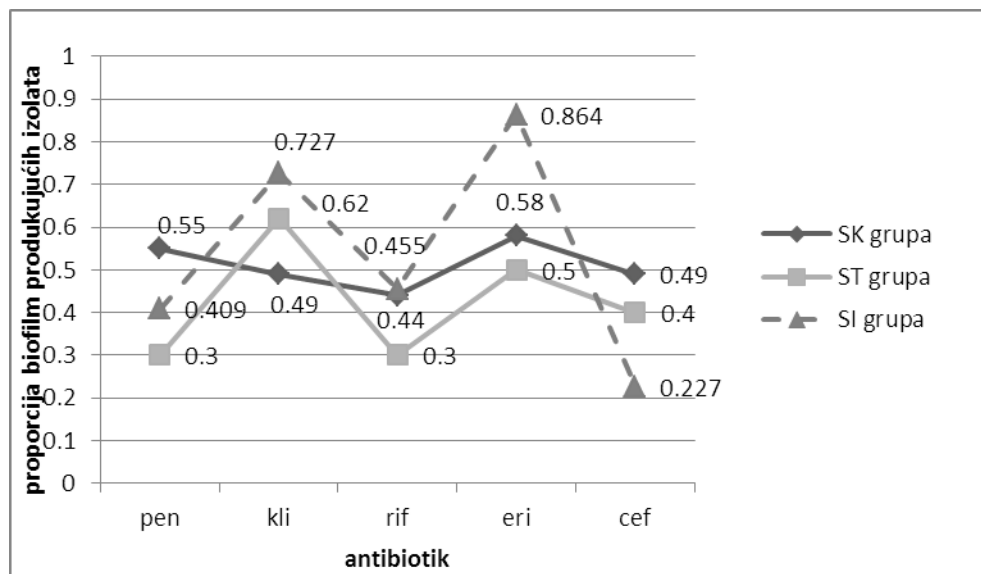
Ako analiziramo uticaj eritromicina na produkciju biofilma kod izolata u svakoj grupi pojedinačno, uočavamo da tretirani izolati grupa SK i SI statistički visoko značajno bolje produkuju biofilm u odnosu na atmosferske uslove (netretirani izolati- tabela 5) tokom 12 sati ($t=-2,514$, $p=0,014$; $t=-4,183$, $p<0,001$) i 24 sata ($t=-2,740$, $p=0,007$; $t=-2,628$, $p=0,016$). Nakon 48 sati samo kod izolata grupe SI uočava se statistički visoko značajno bolja produkcija biofilma nakon tretmana sa $\frac{1}{4}$ MIK eritromicina ($t=-3,464$, $p=0,002$).

Kada je poređen uticaj $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK eritromicina na produkciju biofilma uočeno je da izolati bolje produkuju biofilm nakon $\frac{1}{2}$ MIK i to izolati iz grupe SK nakon 24 sata ($t=2,571$, $p=0,012$), izolati iz grupe ST nakon 48 sati ($t=3,256$, $p<0,001$), a izolati grupe SI tokom sva tri zadata vremena ($t=2,806$, $p=0,011$; $t=3,813$, $p=0,001$; $t=2,682$, $p=0,016$).

4.7.6. Međusobno poređenje uticaja ½ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma

4.7.6.1. Međusobno poređenje uticaja ½ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 12 sati

Uticaj ½ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 12 sati inkubacije kod tri ispitivane grupe izolata je prikazan na Grafikonu 38.

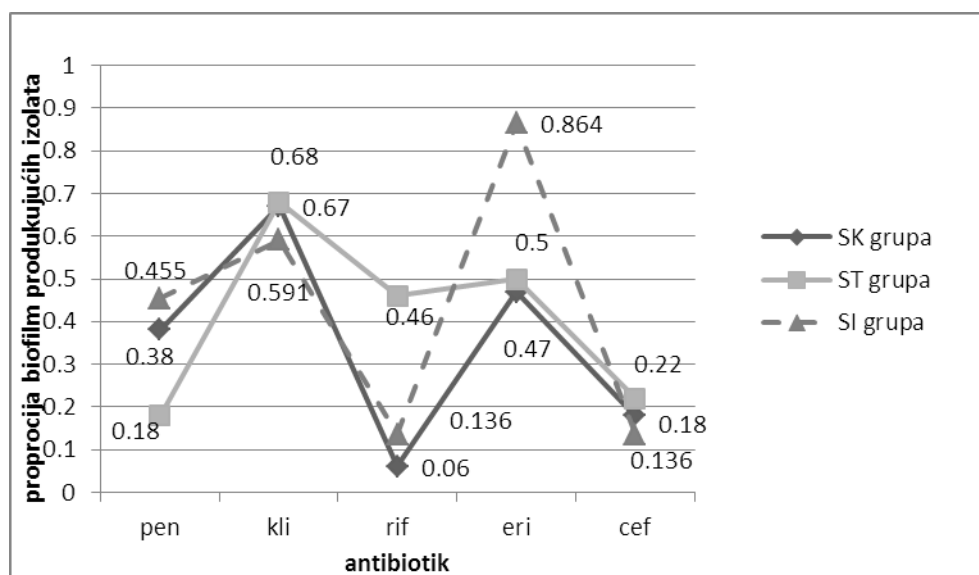


Grafikon 38. Poređenje uticaja ½ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 12 sati

Ako se uporedi uticaj ½ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 12 sati uočava se statistički visoko značajna razlika između u stvaranju biofilma ($F=3,371$, $p=0,001$), koja potiče od slabije produkcije biofilma grupe SK u odnosu na druge dvije grupe ($p=0,010$, $p=0,045$). Analizirajući uticaj antibiotika uočava se da klindamicin podstiče produkciju biofilma u odnosu na penicilin ($p=0,031$), rifampicin ($p=0,004$) i ceftriakson ($p=0,000$), te da eritromicin podstiče produkciju biofilma u odnosu na penicilin ($p=0,002$) i rifampicin ($p<0,001$). Rezultati su prikazani grafikonom 38.

4.7.6.2. Međusobno poređenje uticaja ½ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 24 sata

Uticaj ½ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 24 sata inkubacije kod tri ispitivane grupe izolata je prikazan na Grafikonu 39.



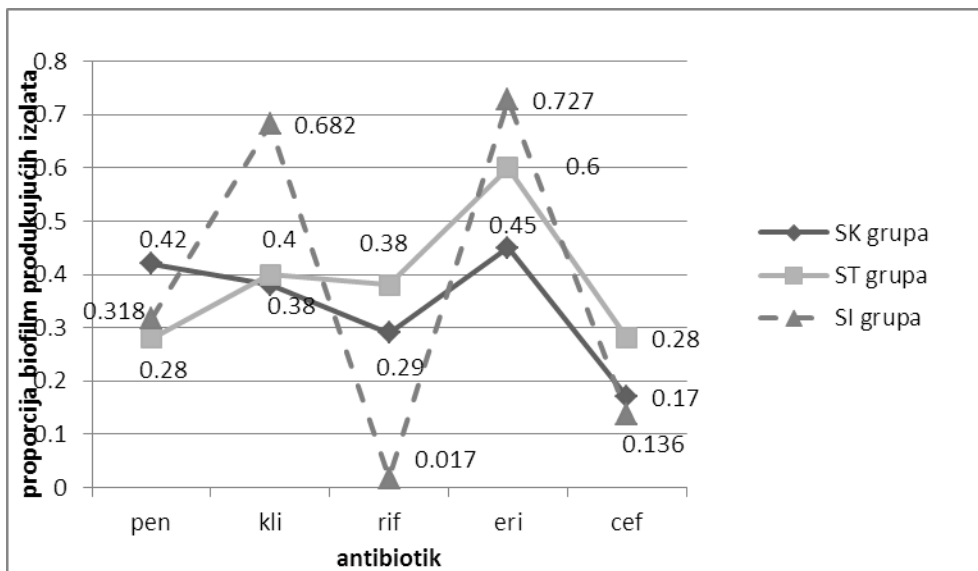
Grafikon 39. Poređenje uticaja $\frac{1}{2}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 24 sata

Ako se uporedi uticaj $\frac{1}{2}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 24 sata uočava se statistički visoko značajna razlika u indukciji stvaranja biofilma između ($F=5,788$, $p<0,001$), pri čemu je razlika dobijena sabiranjem svih pojedinačnih razlika između grupa, a ne zbog značajne razlike u ponašanju jedne grupe prema drugoj.

Analizirajući uticaj antibiotika u cjelosti uočava se da klindamicin i eritromicin podstiču produkciju biofilma u odnosu na penicilin ($p<0,001$ i $p<0,001$), ceftriakson ($p<0,001$ i $p<0,001$) i rifampicin ($p<0,001$, $p<0,001$), te da penicilin, podstiče produkciju biofilma u odnosu na ceftriakson ($p<0,001$).

4.7.6.3. Međusobno poređenje uticaja $\frac{1}{2}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 48 sati

Uticaj $\frac{1}{2}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 48 sati inkubacije kod tri ispitivane grupe izolata je prikazan na Grafikonu 40.



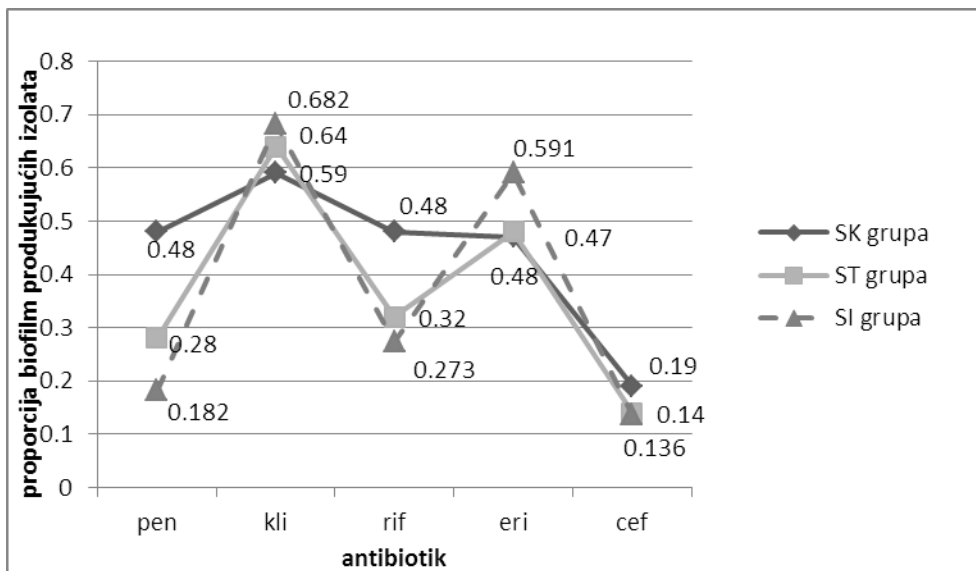
Grafikon 40. Poređenje uticaja $\frac{1}{2}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 48 sati

Ako se uporedi uticaj $\frac{1}{2}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 48 sati uočava se statistički visoko značajna razlika u indukciji stvaranja biofilma ($F=3,881$, $p<0,001$), pri čemu je razlika dobijena sabiranjem svih pojedinačnih razlika između grupa, a ne zbog značajne razlike u ponašanju jedne grupe prema drugoj. Analizirajući uticaj antibiotika u cijelom eksperimentu uočava se da eritromicin podstiče produkciju biofilma u odnosu na penicilin ($p=0,002$), rifampicin ($p<0,001$) i ceftriakson ($p<0,001$), te da klindamicin podstiče produkciju biofilma u odnosu na rifampicin ($p=0,000$) i ceftriakson ($p<0,001$).

4.7.7. Međusobno poređenje uticaja $\frac{1}{4}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma

4.7.7.1. Međusobno poređenje uticaja $\frac{1}{4}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 12 sati

Uticaj $\frac{1}{4}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 12 sati inkubacije kod tri ispitivane grupe izolata je prikazan na Grafikonu 41.

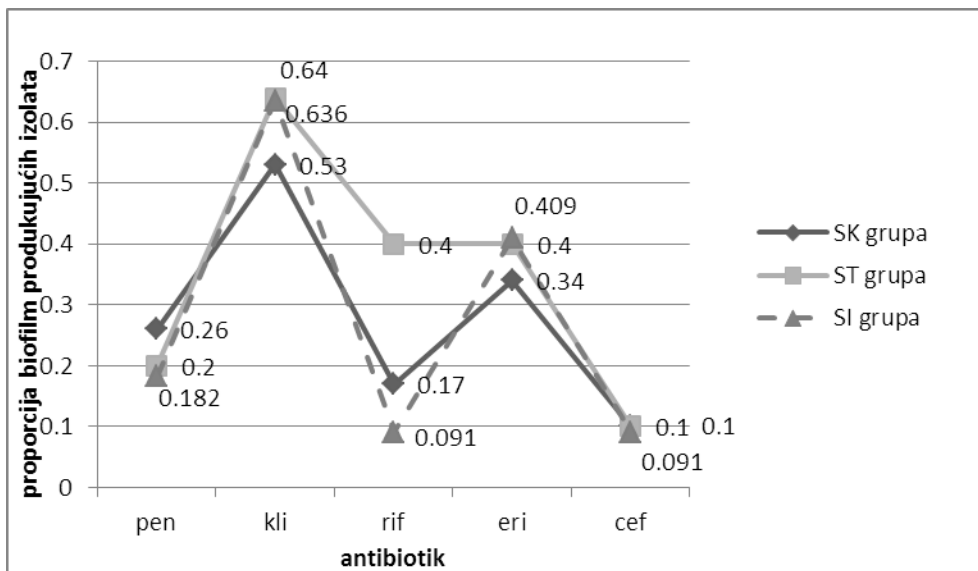


Grafikon 41. Poređenje uticaja $\frac{1}{4}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 12 sati

Ako se uporedi uticaj $\frac{1}{4}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 12 sati ne uočava se statistički značajna razlika između grupa u indukciji stvaranja biofilma ($F=1,860$, $p=0,063$), ali se u cijelom eksperimentu uočava visoka statistička značajnost ($F=19,305$, $p<0,001$) koja potiče od uticaja antibiotika na ispitivane izolate u cijelom eksperimentu. Uočava se da klindamicin podstiče produkciju biofilma u odnosu na penicilin ($p<0,001$), rifampicin ($p<0,001$) i ceftriakson ($p<0,001$), da eritromicin podstiče produkciju biofilma u odnosu na penicilin ($p<0,001$) i ceftriakson ($p=0,024$) te rifampicin podstiče produkciju biofilma u odnosu na ceftriakson ($p=0,003$), kao što je prikazano u grafikonu 41.

4.7.7.2. Međusobno poređenje uticaja $\frac{1}{4}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 24 sata

Uticaj $\frac{1}{4}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 24 časa inkubacije kod tri ispitivane grupe izolata je prikazan na Grafikonu 42.

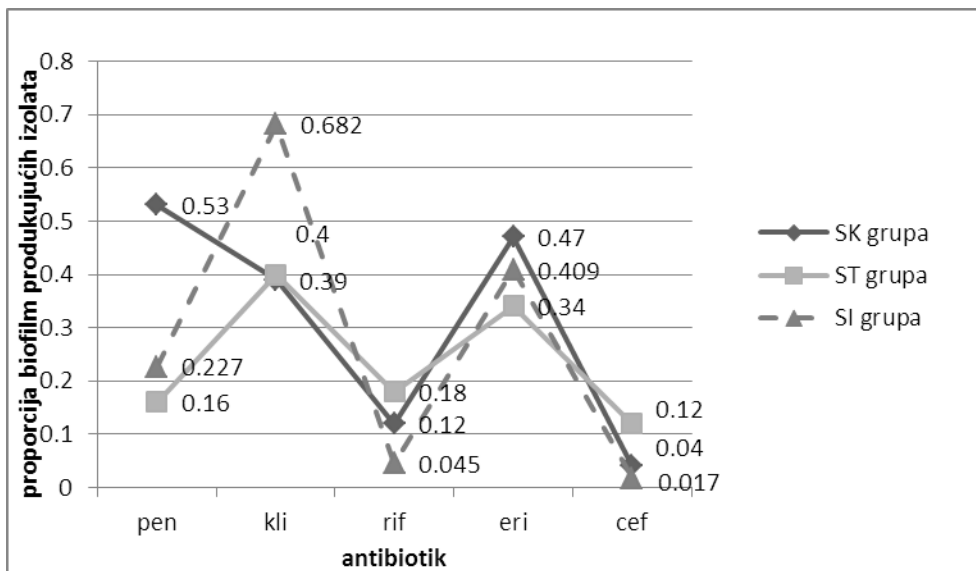


Grafikon 42. Poređenje uticaja $\frac{1}{4}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 24 sata

Ako se uporedi uticaj $\frac{1}{4}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 24 sata ne uočava se statistički značajna razlika između grupa u indukciji stvaranja biofilma ($F=1,538$, $p=0,140$), ali se u cijelom eksperimentu uočava visoka statistička značajnost ($F=24,798$, $p<0,001$) koja potiče od uticaja antibiotika na ispitivane sojeve. Uočava se da klindamicin podstiče produkciju biofilma u odnosu na penicilin ($p<0,001$), rifampicin ($p<0,001$), eritromicin ($p=0,008$) i ceftriakson ($p<0,001$), te da eritromicin podstiče produkciju biofilma u odnosu na ceftriakson ($p<0,001$).

4.7.7.3. Međusobno poređenje uticaja $\frac{1}{4}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 48 sati

Uticaj $\frac{1}{4}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 48 časova inkubacije kod tri ispitivane grupe izolata je prikazan na Grafikonu 43.



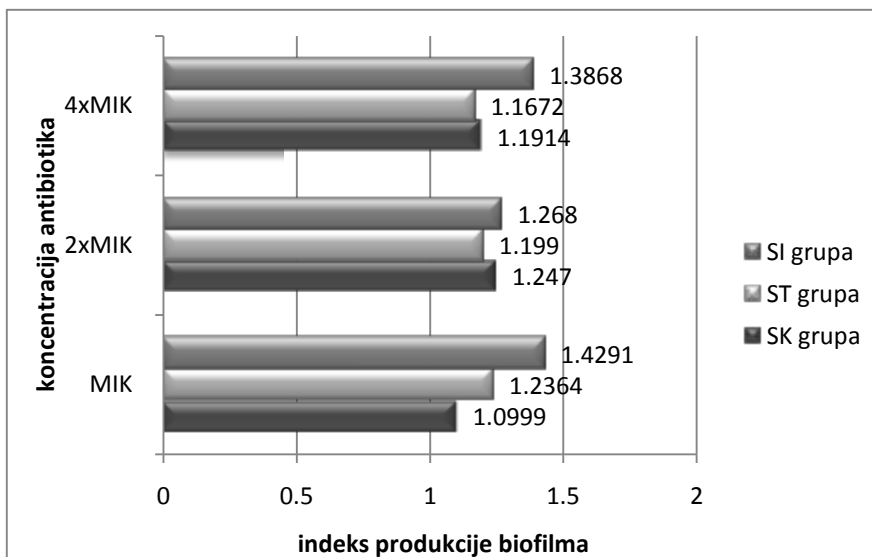
Grafikon 43. Poređenje uticaja $\frac{1}{4}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 48 sati

Ako se uporedi uticaj $\frac{1}{4}$ MIK pet antibiotika na produkciju biofilma tokom 24 sata uočava se statistički visoko značajna razlika kako u cijelom eksperimentu ($F=23,500$, $p<0,001$), tako i između grupa u indukciji stvaranja biofilma ($F=5,022$, $p<0,001$), koja potiču od uticaja antibiotika na ispitivane sojeve. Uočava se da klindamicin podstiče produkciju biofilma u odnosu na penicilin ($p=0,024$), rifampicin ($p<0,001$) i ceftriakson ($p<0,001$), da eritromicin podstiče produkciju biofilma u odnosu na rifampicin ($p<0,001$) i ceftriakson ($p<0,001$), te da i penicilin podstiče produkciju biofilma u odnosu na ceftriakson ($p<0,001$), kao što je prikazano na Grafikonu 43.

4.8. Uticaj suprainhibitornih koncentracija antibiotika na produkciju biofilma

4.8.1. Uticaj suprainhibitornih koncentracija rifampicina

Ispitivani izolati sve tri grupe su inkubirani 24 časa da bi se formirao biofilm, a zatim su tretirani suprainhibitornim koncentracijama rifampicina (MIK, $2x$ MIK i $4x$ MIK) tokom 24 sata. Uticaj suprainhibitornih koncentracija je prikazan na Grafikonu 44.



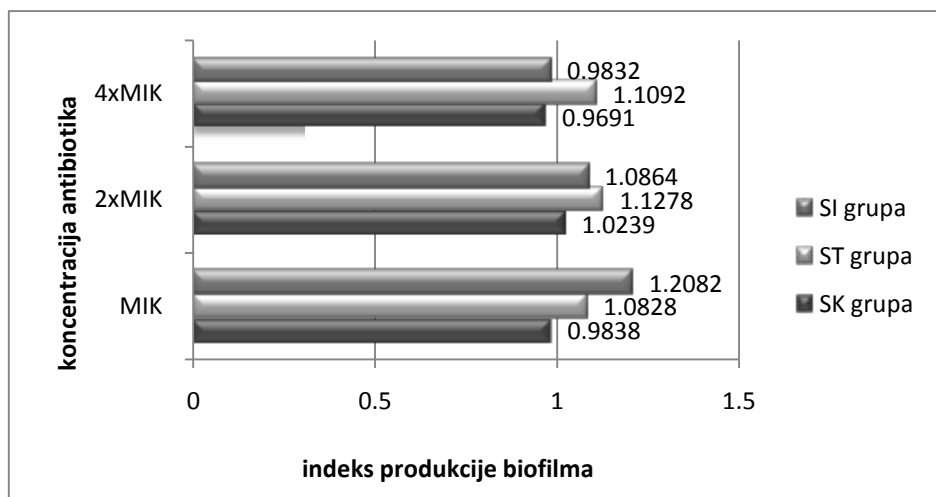
Grafikon 44. Uticaj suprainhibitornih koncentracija rifampicina na produkciju biofilma

Nakon inkubacije sa suprainhibitornim koncentracijama rifampicina nađena je statistički značajna razlika između grupa i to sa MIK i 4xMIK koncentracijama ($F=23,152$, $p<0,001$; $F=7,599$, $p=0,001$). Pod dejstvom MIK rifampicina uočava se statistička značajnost između svih grupa ($p=0,001$, $p<0,001$, $p=0,002$), tako da grupa SI najbolje produkuje biofilm, zatim grupa ST, a grupa SK najslabije. Nakon inkubacije sa 2xMIK rifampicina nije nađena statistička razlika između grupa ($F=1,060$, $p=0,349$). Nakon inkubacije sa 4xMIK rifampicina značajnost je posljedica bolje produkcije grupe SI u odnosu na grupu SK ($p=0,001$) i grupu ST ($p=0,001$).

Kad analiziramo uticaj različitih koncentracija rifampicina na grupe, ne uočava se statistički značajna razlika u cijelom eksperimentu ($F=0,358$, $p=0,700$), iako se grupe različito ponašaju ($F=12,986$, $p<0,001$), jer su razlike suprotnog smjera, pa se međusobno potiru. Analizirajući uticaj suprainhibitornih koncentracija na sve tri grupe, uočava se da grupa SI značajno bolje produkuje biofilm u odnosu na grupe SK ($p<0,001$) i ST ($p=0,002$), dok druge dvije grupe podjednako produkuju biofilm. Ako posmatramo u cjelini uticaj suprainhibitornih koncentracija, sve tri koncentracije podjednako podstiču produkciju biofilma.

4.8.2. Uticaj suprainhibitornih koncentracija penicilina

Ispitivani izolati sve tri grupe su inkubirani 24 časa da bi se formirao biofilm, a zatim su tretirani suprainhibitornim koncentracijama penicilina (MIK, 2xMIK i 4xMIK). Uticaj suprainhibitornih koncentracija je prikazan na Grafikonu 45.



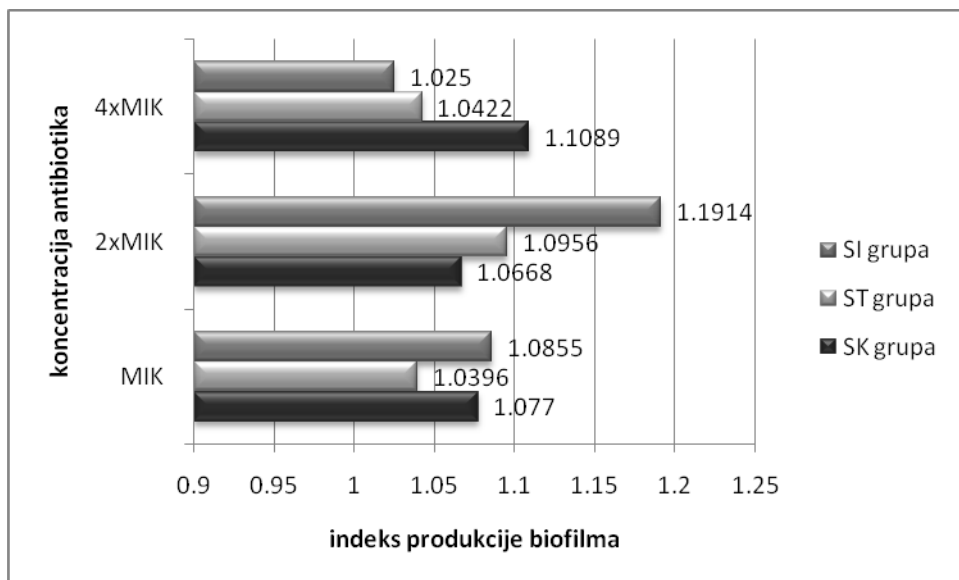
Grafikon 45. Uticaj suprainhibitornih koncentracija penicilina na produkciju biofilma

Nakon inkubacije sa suprainhibitornim koncentracijama penicilina nađena je statistički značajna razlika između grupa u produkciji biofilma u sva tri eksperimenta ($F=18,975$, $p<0,001$; $F=4,279$, $p=0,015$; $F=7,716$, $p=0,001$). Pod dejstvom MIK penicilina uočava se statistička značajnost između svih grupa ($p<0,001$, $p=0,002$, $p=0,010$), tako da SI grupa najbolje produkuje biofilm, zatim ST grupa, a grupa SK najslabije. Nakon inkubacije sa 2xMIK i 4xMIK penicilina značajnost je posljedica slabije produkcije SK grupe u odnosu na ST grupu ($p=0,014$ i $p<0,001$).

Kad analiziramo uticaj različitih koncentracija penicilina na grupe, uočava se statistički značajna razlika u cijelom eksperimentu ($F=7,910$, $p<0,001$) koja je posljedica različitog ponašanja grupa ($F=6,922$, $p<0,001$). Analizirajući uticaj suprainhibitornih koncentracija na sve tri grupe, uočava se da SK grupa značajno slabije produkuje biofilm u odnosu na ST grupu ($p<0,001$) i SI grupu ($p=0,019$). Ako posmatramo u cjelini uticaj suprainhibitornih koncentracija, uočava se da vrijednost od 4xMIK manje podstiče sojeve na produkciju biofilma u odnosu na MIK ($p=0,001$) i 2xMIK ($p=0,006$), dok MIK i 2xMIK podjednako podstiču bakterije na produkciju biofilma.

4.8.3. Uticaj suprainhibitornih koncentracija ceftriaksona

Ispitivani izolati sve tri grupe su inkubirani 24 časa da bi se formirao biofilm, a zatim su tretirani suprainhibitornim koncentracijama ceftriaksona (MIK, 2xMIK i 4xMIK) tokom 24 sata. Uticaj suprainhibitornih koncentracija je prikazan na Grafikonu 46.



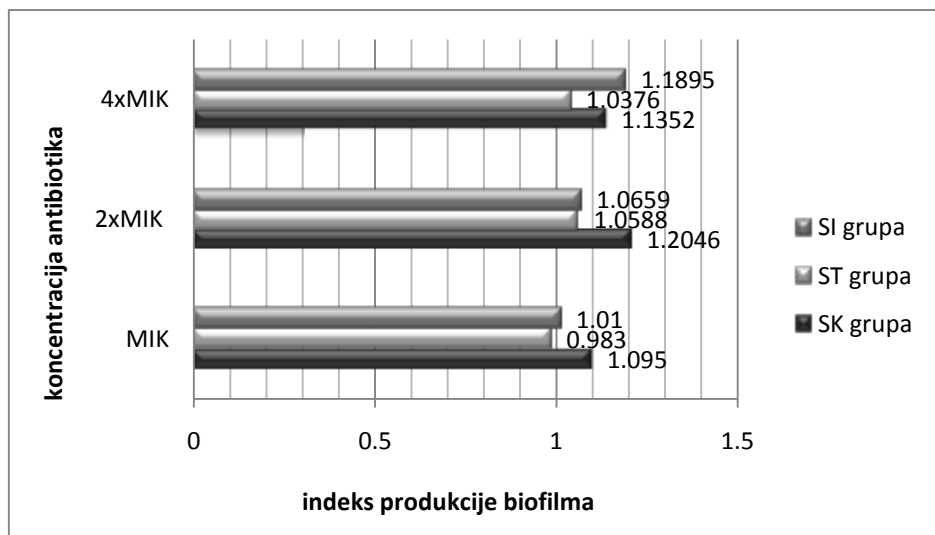
Grafikon 46. Uticaj suprainhibitornih koncentracija ceftriaksona na produkciju biofilma

Nakon inkubacije sa suprainhibitornim koncentracijama ceftriaksona nađena je statistički značajna razlika između grupa u produkciji biofilma nakon inkubacije sa 2xMIK i 4xMIK koncentracijama ($F=5,946$, $p=0,003$; $F=9,895$, $p=0,022$). Nakon inkubacije sa MIK ceftriaksona nije nađena statistička razlika između grupa ($F=1,108$, $p=0,333$). Pod dejstvom 2xMIK ceftriaksona statistička značajnost je posljedica bolje produkcije grupe SI u odnosu na grupe SK ($p=0,002$) i ST ($p=0,048$). Nakon inkubacije sa 4xMIK pojedinačna razlika između grupa je nedovoljno velika da bi bila značajna, ali zbirom tih razlika postiže se statistička značajnost na nivou eksperimenta.

Kad analiziramo uticaj različitih koncentracija ceftriaksona na grupe, uočava se statistički značajna razlika u cijelom eksperimentu ($F=7,749$, $p<0,001$) koja je posljedica različitog ponašanja grupa ($F=7,333$, $p<0,001$), ali same razlike u produkciji biofilma između grupa nema. Grupe ST i SI pokazuju prvo porast, pa smanjenje produkcije, a grupa SK stalan porast sa povećanjem koncentracija. Ako posmatramo u cjelini uticaj subinhibitornih koncentracija, uočava se da vrijednost od 2xMIK više podstiče sojeve na produkciju biofilma u odnosu na MIK ($p=0,002$) i 4xMIK ($p<0,001$).

4.8.4. Uticaj suprainhibitornih koncentracija klindamicina

Ispitivani izolati sve tri grupe su inkubirani 24 časa da bi se formirao biofilm, a zatim su tretirani suprainhibitornim koncentracijama klindamicina tokom 24 sata (MIK, 2xMIK i 4xMIK). Uticaj suprainhibitornih koncentracija je prikazan na Grafikonu 47.



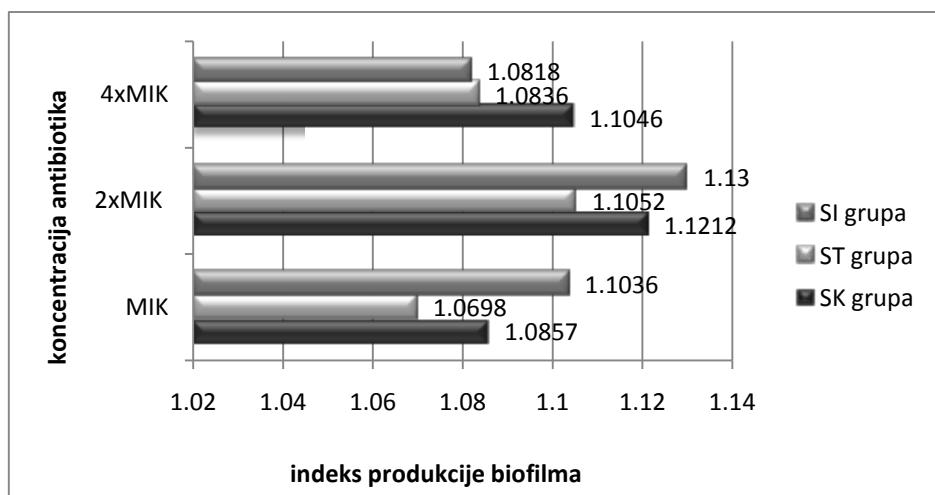
Grafikon 47. Uticaj suprainhibitornih koncentracija klindamicina na produkciju biofilma

Nakon inkubacije sa suprainhibitornim koncentracijama klindamicina nađena je statistički značajna razlika između grupa u produkciji biofilma nakon inkubacije sa MIK, 2xMIK i 4xMIK koncentracijama ($F=7,160$, $p=0,001$; $F=11,457$, $p<0,001$; $F=5,406$, $p=0,005$). Pod dejstvom MIK klindamicina statistička značajnost je posljedica slabije produkcije grupe ST u odnosu na grupu SK ($p=0,001$). Nakon inkubacije sa 2xMIK statistička značajnost je posljedica slabije produkcije biofilma grupe ST ($p<0,001$) i grupe SI ($p=0,008$) u odnosu na grupu SK. Nakon inkubacije sa 4xMIK statistička značajnost je posljedica slabije produkcije biofilma grupe ST u odnosu na grupu SK ($p=0,021$) i grupu SI ($p=0,014$).

Kad analiziramo uticaj različitih koncentracija klindamicina na grupe, uočava se statistički značajna razlika u cijelom eksperimentu ($F=13,066$, $p<0,001$) koja je posljedica različitog ponašanja grupa ($F=4,040$, $p=0,003$), odnosno bolje produkcije biofilma grupe SK u odnosu na grupu ST ($p<0,001$). Ako posmatramo u cjelini uticaj subinhibitornih koncentracija, uočava se da vrijednost od MIK slabije podstiče sojeve na produkciju biofilma u odnosu na 2xMIK ($p<0,001$) i 4xMIK ($p<0,001$).

4.8.5. Uticaj suprainhibitornih koncentracija eritromicina

Ispitivani izolati sve tri grupe su inkubirani 24 časa da bi se formirao biofilm, a zatim su tretirani suprainhibitornim koncentracijama eritromicina (MIK, 2xMIK i 4xMIK). Uticaj suprainhibitornih koncentracija je prikazan na Grafikonu 48.



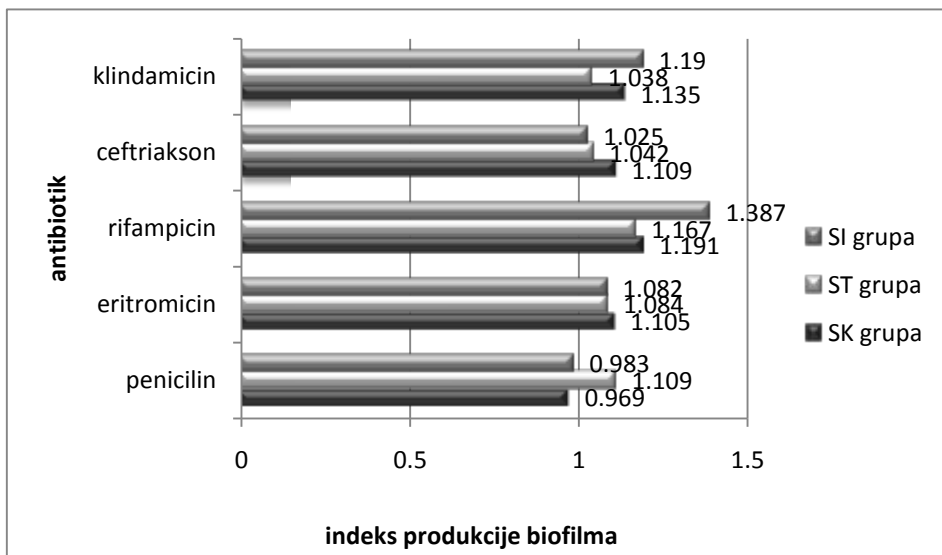
Grafikon 48. Uticaj suprainhibitornih koncentracija eritromicina na produkciju biofilma

Nakon inkubacije sa suprainhibitornim koncentracijama eritromicina nije nađena statistički značajna razlika između grupa u produkciji biofilma u sva tri eksperimenta ($F=0,545$, $p=0,581$; $F=0,312$, $p=0,732$; $F=0,826$, $p=0,440$).

Kad analiziramo uticaj različitih koncentracija eritromicina na grupe, uočava se statistički značajna razlika u cijelom eksperimentu ($F=4,252$, $p=0,015$) koja je posljedica uticaja koncentracija antibiotika, a sve tri grupe se ponašaju slično ($F=0,465$, $p=0,760$). Ako posmatramo u cjelini uticaj subinhibitornih koncentracija, uočava se da vrijednost od 2xMIK više podstiče sojeve na produkciju biofilma u odnosu na MIK ($p=0,027$) i 4xMIK ($p=0,036$), dok MIK i 4xMIK djeluju podjednako.

4.8.6. Poređenje uticaja MIK pet antibiotika na produkciju biofilma

Rezultati koji pokazuju uticaj MIK svih antibiotika na ispitivane grupe su prikazani na Grafikonu 49.

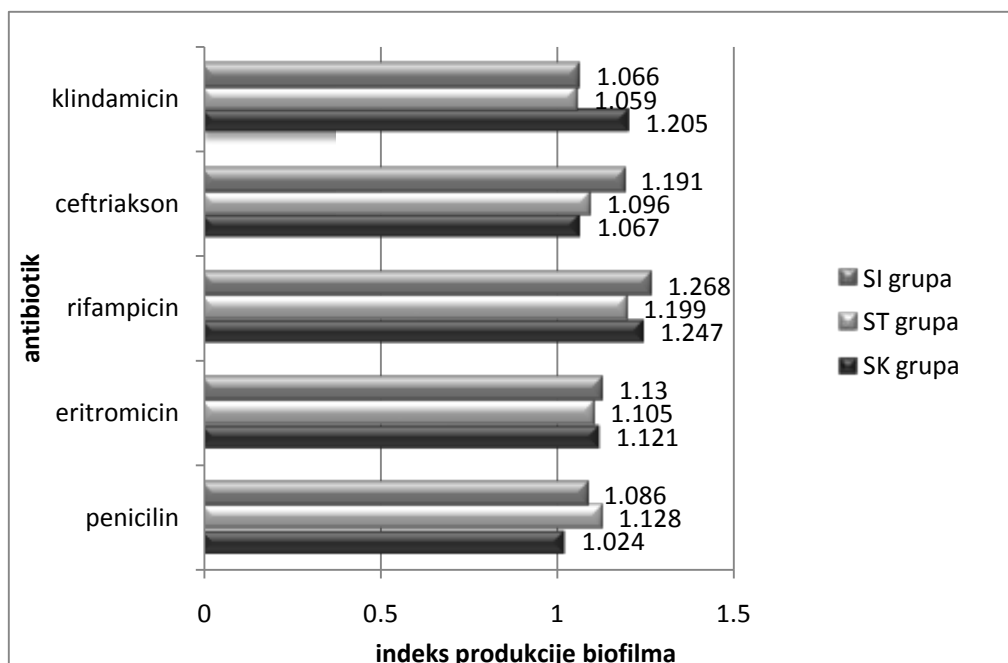


Grafikon 49. Poređenje uticaja MIK svih antibiotika na produkciju biofilma

Ako se uporedi uticaj MIK pet antibiotika na produkciju biofilma u cijelom se eksperimentu uočava visoka statistička značajnost ($F=29, 480, p<0,001$), kao i značajna razlika u ponašanju grupa ($F=11,637, p<0,001$). Uočava se da rifampicin podstiče produkciju biofilma u odnosu na penicilin ($p<0,001$), eritromicin ($p<0,001$), ceftriakson ($p<0,001$) i klindamicin ($p<0,001$). Takođe, ako analiziramo ponašanje grupa pod uticajem MIK svih antibiotika, vidimo da grupa SI značajno više u prosjeku produkuje biofilm u odnosu na druge dvije grupe ($p<0,001, p<0,001$).

4.8.7. Poređenje uticaja 2xMIK pet antibiotika na produkciju biofilma

Rezultati koji pokazuju uticaj 2xMIK svih antibiotika na ispitivane grupe su prikazani na Grafikonu 50.

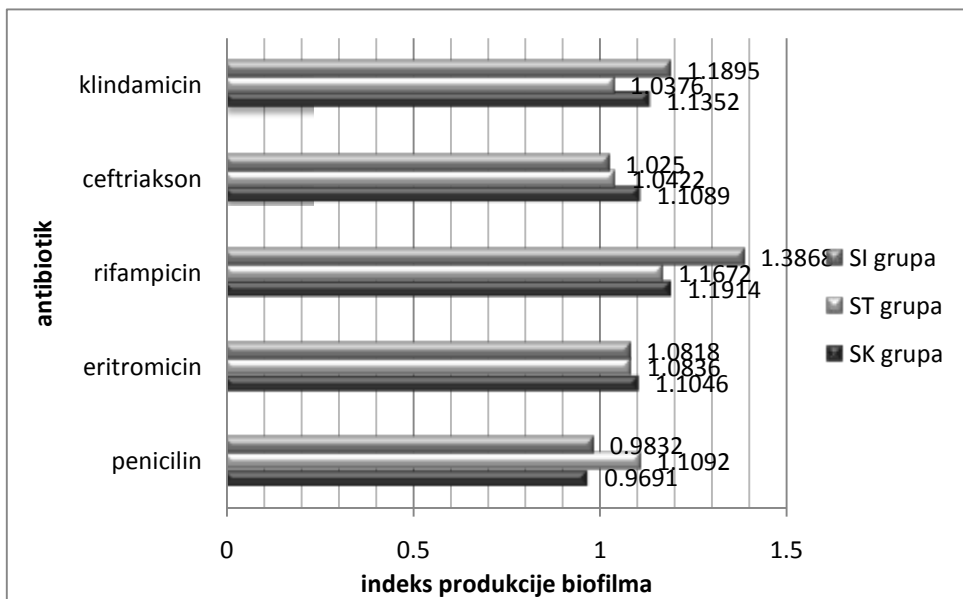


Grafikon 50. Poređenje uticaja 2xMIK svih antibiotika na produkciju biofilma

Ako se uporedi uticaj 2xMIK pet antibiotika na produkciju biofilma u cijelom se eksperimentu uočava visoka statistička značajnost ($F=12,929$, $p<0,001$), kao i značajna razlika u ponašanju grupa ($F=5,656$, $p<0,001$). Uočava se da rifampicin podstiče produkciju biofilma u odnosu na penicilin ($p<0,001$), eritromicin ($p<0,001$), ceftriakson ($<0,001$) i klindamicin ($p<0,001$). Takođe, ako analiziramo ponašanje grupa pod uticajem MIK svih antibiotika, sve tri grupe se ponašaju slično.

4.8.8. Poređenje uticaja 4xMIK pet antibiotika na produkciju biofilma

Rezultati koji pokazuju uticaj 4xMIK svih antibiotika na ispitivane grupe su prikazani na Grafikonu 51.



Grafikon 51. Poređenje uticaja 4xMIK svih antibiotika na produkciju biofilma

Ako se uporedi uticaj 4xMIK pet antibiotika na produkciju biofilma u cijelom se eksperimentu uočava visoka statistička značajnost ($F=25,137$, $p<0,001$), kao i značajna razlika u ponašanju grupa ($F=7,075$, $p<0,001$). Uočava se da rifampicin podstiče produkciju biofilma u odnosu na penicilin ($p<0,001$), eritromicin ($p<0,001$), ceftriakson ($p<0,001$) i klindamicin ($p<0,001$), te da eritromicin i klindamicin bolje podstiču produkciju biofilma u odnosu na penicilin ($p=0,018$, $p=0,005$). Takođe, ako analiziramo ponašanje grupa pod uticajem MIK svih antibiotika, grupe se slično ponašaju.

4.9. Određivanje minimalne koncentracije za eradikaciju biofilma

Jedan od ciljeva je bio da odredimo vrijednost minimalne koncentracije za eradikaciju biofilma. Vođeni uputstvima proizvođača ispitali smo po nekoliko izolata iz svake grupe na svih 5 antibiotika. Nastao je problem u reproducibilnosti testa, što je kao posljedicu imalo problem u standardizaciji testa i njegovom prilagođavanju za ostale izolate. Nažalost, nismo bili u mogućnosti da izvedemo standardizovano testiranje tako da nismo dobili podatke o vrijednosti minimalne koncentracije za eradikaciju biofilma kod testiranih izolata *Streptococcus pyogenes*.

5. Diskusija

Infekcije izazvane bakterijama koje proizvode biofilm su jedan od najaktuelnijih problema u bakteriologiji. *Streptococcus pyogenes* ima sposobnost formiranja biofilma *in vivo* i *in vitro*. Još uvijek nije dokazano da je biofilm značajan faktor virulencije u patogenezi streptokoknih infekcija. GAS raspolaže mnogobrojnim faktorima virulencije, od kojih su najbrojniji adhezini. Adherencija može biti specifična, ostvarena preko specifičnih hemijskih veza između bakterijskih adhezina sa receptorima na površini naših ćelija ili nespecifična, ostvarena preko slabih nekovalentnih sila (van der Waalove, elektrostatske i hidrofobne). GAS je bakterija koja spada u grupu bakterija slabo adherentnih za vještačke materijale, tako da ne dovodi do nastanka infekcija vezanih za različite implante i proteze. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa tim i pokazuju da ne postoji razlika u adherenciji za neobloženu mikrotitarsku ploču između tri ispitivane grupe izolata. Da bismo ispitali uticaj kapsule na vezivanje za neobloženu mikrotitarsku ploču, izolate smo tretirali hijaluronidazom i potom ispitali adherenciju. Ovim eksperimentom je utvrđeno da je grupa ST značajno slabije adherisala u odnosu na druge dvije grupe. Nije uočena razlika u adherenciji za neobloženu mikrotitarsku ploču između grupa SK i SI. Na osnovu ovog rezultata bi se moglo zaključiti da izolati od kliconoša (SK grupa) i invazivni izolati (SI grupa) raspolažu većim brojem površinskih adhezina ili imaju adhezine većeg afiniteta, koji su prekriveni kapsularnim polisaharidima. U prilog ovome govori i naš rezultat da su izolati iz ove dvije grupe značajno bolje adherisali za mikrotitarsku ploču nakon što im je odstranjena kapsula.

Bilo je zanimljivo ispitati da li će sve tri grupe isto adherisati za mikrotitarsku ploču obloženu lamininom. Sojeve smo prije toga tretirali hijaluronidazom, da bi otklonili uticaj kapsule na adherenciju. Utvrđeno je da su za laminin najbolje adherisali invazivni izolati (SI grupa), zatim izolati od kliconoša (SK grupa), a najslabije izazivači tonzilofaringitisa (ST grupa). Sve uočene razlike su bile statistički visoko značajne. Ovi rezultati su bili očekivani i govore u prilog naše pretpostavka da najbolju adherenciju ostvaruju invazivni sojevi i sojevi od kliconoša, jer raspolažu sa više površinskih adhezina ili sa adhezinima većeg afiniteta, prethodno zaklonjenih kapsulom. Takođe, dokazano je da je jedan od najvažnijih adhezina za laminin cistein proteaza SpeB, koji se u najvećoj mjeri nalazi na površini invazivnih sojeva i koji je jedan od faktora koji omogućava prelaz iz slabo u jako invazivne sojeve [78]. Time bi se objasnilo najbolje vezivanje za laminin invazivnih izolata (SI grupa).

Kad smo poredili sposobnost adherencije izolata za neobloženu i obloženu mikrotitarsku ploču, uočeno je u prosjeku gotovo jedan i po put bolja adherencija za laminin, pri čemu su gotovo

dvostruko bolje adherisali invazivni izolati (SI grupa), a ostale dvije grupe slabije od prosjeka. Ovim smo potvrdili da izolati koji dovode do kliconoštva i invazivnih bolesti imaju veći repertoar i ostvaruju bolje specifične hemijske veze sa receptorima, koje im omogućavaju da bolje adherišu, pri čemu mogu ostati na površini naših ćelija ili prodrijeti u dublja tkiva.

Adherencija bakterija je još uvijek nedovoljno ispitan proces za koji se zna da ovisi od nespecifičnih hidrofobnih veza, te od specifičnih veza koje se ostvaruju u međusobnoj interakciji proteina, te interakciji proteina sa ugljenim hidratima. Hidrofobne veze spadaju u slabe nekovalentne veze i dovode do grupisanja nepolarnih, hidrofobnih molekula u vodenoj sredini, smanjujući dodirnu površinu molekula vode i hidrofobnih supstanci. Ispitivanje hidrofobnosti je izvedeno pomoću heksadekana i ksilena. Prvo je izvedeno ispitivanje pomoću heksadekana, ali sojevi nisu vezivali heksadekan. Prema dostupnoj literaturi, kapsula je ometala vezivanje heksadekana [79], pa su sojevi tek nakon tretmana hijaluronidazom počeli da vezuju heksadekan. Prema uputstvima autora, koji je ovu metodu prvi uveo [71] koristili smo PUM pufer, koji sadrži kalijum, fosfate, magnezijum i ureu, i molarnosti 0,15 M, jer tek u takvim uslovima hidrofobne veze imaju veći značaj od elektrostatskih. Međutim, ni u navedenim uslovima vezivanje za heksadekan nije bilo zadovoljavajuće. Da bi uopšte ispitali sposobnost vezivanja hidrokarbona, a prema iskustvima drugih autora [80], uveden je ksilen. Heksadekan je zasićeni alkan, koji je slabo reaktivan, a ksilen je nezasićeni aromatični alken koji je reaktivniji od heksadekana. Ova razlika u građi, kao i razlike u polarizaciji molekula su razlog slabijeg vezivanja heksadekana. Prema procentu vezanog ksilena, najveću hidrofobnost su pokazali izolati iz grupe SK, zatim grupa SI, a najmanju hidrofobnost su imali sojevi iz grupe ST. S obzirom da hidrofobnost doprinosi adherenciji, ali nema presudan značaj, ovi rezultati hidrofobnosti se poklapaju sa adherencijom za neobloženu i obloženu mikrotitarsku ploču nakon tretmana hijaluronidazom, kad su najlošije adherisali izolati iz grupe ST. Dokazano je da površinski proteini najviše doprinose hidrofobnosti streptokoka eksperimentom u kojem su sojevi bili izloženi dejstvu tripsina, nakon kojeg su potpuno izgubili sposobnost vezivanja heksadekana [81]. Proteolitičko razlaganje M proteina kod različitih serotipova, takođe, smanjuje hidrofobnost bakterija, te bi bilo zanimljivo u okviru budućih ispitivanja uraditi M tipizaciju ispitivanih izolata da bi se utvrdilo prisustvo i tipovi M proteina na našim izolatima i time, eventualno, dodatno objasnila dobijena razlika [79]. Takođe je dokazano da hidrofobnost zavisi i od lipoteihonske kiseline [82], koja skupa sa M proteinom formira hidrofobni kompleks na površini streptokoka, pa bi bilo zanimljivo kod naših izolata ispitati količinu ovog glikolipida u sastavu ćelijskog zida. Eksperiment rađen sa grupom B streptokoka [73] je pokazao da su izolati sa većom količinom sijalinske kiseline, tj. boljom produkcijom kapsule slabije vezivali heksadekan, pa bi možda i količina produkovane kapsule bila odgovorna za razlike u hidrofobnosti

ispitivanih sojeva. Kapsularni kiseli polisaharidi su hidrofilni [83], a kapsula prekriva površinske hidrofobne proteine i ometa fizički vezivanje hidrokarbona. Na osnovu ovog bi se moglo očekivati da invazivni izolati pokažu najmanju hidrofobnost, jer oni najbolje produkuju kapsulu *in vivo*. Međutim naši rezultati su pokazali da su izolati od kliconoša imale najveću hidrofobnost, pa tek onda invazivni izolati, što se može objasniti činjenicom da su sojevi *in vitro* značajno smanjili stepen produkcije kapsule.

Objavljeni literaturni podaci objašnjavaju da se efikasnije vezivanje za laminin invazivne grupe izolata u odnosu na ostale grupe objašnjava boljom produkcijom SpeB [34]. Zbog toga smo ispitali produkciju SpeB pomoću zasijavanja sojeva u azokazeinski agar, koji sadrži obrano mlijeko u prahu, koje je supstrat za cistein proteazu, tj. SpeB. Našim eksperimentom nije utvrđena razlika u produkciji SpeB između ispitivanih grupa, niti u atmosferskim uslovima kod izolata koji nisu tretirani, niti nakon uklanjanja kapsule. Pretpostavljamo da s obzirom da je naš eksperiment bio izveden u vještačkoj hranjivoj podlozi, a ne u *in vivo* uslovima, te u odsustvu indukcije imunskog sistema domaćina, izolati nisu pokazali različitu sposobnost produkcije i ekspresije ovog proteina. Takođe, bilo je značajno utvrditi da li postoji povezanost produkcije SpeB, vezivanja za laminin i produkcije biofilma u atmosferskim uslovima. Na osnovu dostupne literature i poznavanja patogeneze streptokoknih infekcija, naša pretpostavka je bila da invazivni sojevi, koji bolje vezuju laminin zbog veće produkcije SpeB, budu slabiji produktori biofilma. Prodorom u duboka tkiva invazivni sojevi izbjegavaju imunski sistem, zbog čega im produkcija biofilma nije neophodna u preživljavanju. Međutim, našim ispitivanjem nismo dokazali povezanost između ove tri stavke, iako smo dokazali da postoji razlika između sojeva u produkciji biofilma i vezivanju za laminin, tj. grupa SI je slabije produkovala biofilm, a bolje adherisala za laminin u odnosu na druge dve grupe. Moguće objašnjenje našeg neuspjeha u dokazivanju povezanosti bi bilo u izvođenju eksperimenta produkcije SpeB na vještačkoj podlozi, umjesto *in vivo*, pa pretpostavljamo da bi se izvođenjem testa *in vivo* dokazala povezanost ove tri osobine GAS.

GAS ne spada u bakterije koje su efikasni produktori biofilma na vještačkim materijalima, bar kad su ispitivanja rađena na polistirenskoj ploči za mikrotitraciju. S obzirom da se produkcija biofilma odvija tokom dužeg vremenskog perioda, naša namjera je bila da utvrdimo da li postoji razlika između ispitivanih grupa izolata u sposobnosti formiranja biofilma u određenom vremenu inkubacije (12, 24 i 48 sati) i da li se sve tri grupe isto ponašaju tokom zadatog perioda inkubacije. Nakon inkubacije od 12 sati nije utvrđena razlika između grupa, što bi se objasnilo činjenicom da se u tom vremenskom periodu streptokok nalazi u eksponencijalnoj fazi rasta, a značajnija produkcija

biofilma se može očekivati tek kad bakterije postignu odgovarajuću gustinu populacije i kad dođe do iscrpljivanja podloge, tj. kad pređu u stacionarnu fazu. Razlike su uočene nakon 24 i 48 časova. U oba slučaja su invazivni izolati (SI grupa) najslabije produkovali biofilm. Ne samo naše pretpostavke, nego i literaturni podaci ukazuju da invazivnim izolatima produkcija biofilma nije značajan faktor virulencije [36, 37]. Nakon 24-časovne inkubacije grupa ST je imala znatno bolju produkciju u odnosu na druge dvije ispitivane grupe. Nakon 48-časovne inkubacije grupa ST i grupa SK su značajno bolje isprodukovale biofilm u odnosu na grupu SI. Oba rezultata su očekivana, jer su to bakterije kojima bi produkcija biofilma na površini tonzila omogućila bolje preživljavanje i zaštitu od antibiotika i imunskog sistema. Sve ispitivane grupe su slabi i nestabilni produktori biofilma, jer nijedna grupa nije pokazala stabilnu i dobru produkciju biofilma tokom vremena. Ovo potvrđuje činjenicu da GAS nije značajan uzročnik infekcija vezanih za biofilm i različite vještačke implantate. Naše istraživanje pokazuje da streptokok grupe A ima sposobnost adhezije za vještačke materijale, kao i sposobnost produkcije biofilma, ali nema sposobnost održavanja produkovanog biofilma tokom vremena. Jednostavnije rečeno, GAS može adherirati i produkovati biofilm, ali se stvoreni biofilm vrlo brzo rasipa i ne omogućava planktonskim sojevima zaštitu kakavu imaju sojevi grupisani u biofilmu. Ovaj zaključak potvrđuje i naš eksperiment u kojem smo pokušali da odredimo vrijednost minimalne koncentracije za eradikaciju biofilma (MBEC), ali nismo uspjeli da ostvarimo reproducibilnost testa i da ga tako standardizujemo. To je, pretpostavljamo, i razlog zašto u dostupnoj literaturi nema podataka o vrijednosti MBEC za *S. pyogenes*. Dokazano je da streptokok ima sposobnost invazije tkiva i prodora u međucelijski prostor, kao i produkcije biofilma u intersticijumu [84, 78]. Zbog toga bi bilo veoma značajno ispitati sposobnost produkcije biofilma u mikrotitarskoj ploči obloženoj intersticijalnim proteinima (laminin, fibronektin, kolagen i dr). U takvim uslovima bi trebalo ispitati da li postoji razlika između grupa u produkciji biofilma i da li se ta razlika između grupa održava tokom vremena, odnosno produžene inkubacije. U literaturi postoji svega jedan rad koji je ispitivao produkciju biofilma na intersticijalnim proteinima [86], u kojem je, takođe, dokazano da je streptokok nestabilan produktor biofilma. U navedenom eksperimentu su korišćeni različiti M serotipovi GAS, koji nisu bili grupisani na osnovu virulentnosti, tako da ne postoje podaci za upoređivanje naših rezultata.

Imajući u vidu da su u atmosferskim uslovima invazivni izolati slabije produkovali biofilm u odnosu na druge dvije grupe (SK i ST), odlučili smo se da ispitamo sposobnost formiranja biofilma u uslovima koji odgovaraju uslovima u dubokim tkivima, tj. u atmosferi sa 5% CO₂. Već nakon 12 sati grupa SI je isprodukovala biofilm znatno bolje u odnosu na druge dvije grupe, ali kao nestabilni produktori nisu uspjeli zadržati takvu produkciju tokom dužeg perioda. Nakon 24 sata zbog naglog

rasipanja biofilma u grupi SI, došlo je do statistički značajne razlike u produkciji u korist druge dvije grupe, da bi nakon 48 časova, kad je grupa SI opet povećala formiranje biofilma, sve tri grupe imale istu sposobnost produkcije biofilma. Ovim rezultatom je opet potvrđena činjenica da su naši izolati pokazali nestabilnost i slabu produkciju biofilma tokom vremena, čak i u uslovima koji odgovaraju dubokim tkivima, u kojima bi invazivni izolati trebali najbolje formirati biofilm. Na osnovu ovih rezultata i rezultata u atmosferskim uslovima, možemo zaključiti da produkcija biofilma na vještačkim materijalima tokom vremena nije stabilna osobina GAS, te bi za detaljno utvrđivanje ovog faktora virulencije bilo neophodno da se eksperimenti izvode *in vivo*. U ispitivanjima drugih bakterija uočeno je da povećanje koncentracije CO₂ dovodi do bolje produkcije biofilma [87, 88]. U odnosu na netretirane izolate koji su inkubirani u atmosferskim uslovima, došlo je do značajnog porasta produkcije biofilma kod grupa SK i SI već nakon 12 sati. Nakon 24 sata ova razlika je bila značajna samo kod grupe SK, a nakon 48 sati samo kod grupe SI. Ovo bi moglo da se objasni činjenicom da izolati od zdravih kliconoša i invazivni izolati zbog opstanka u našem organizmu prodiru u tkiva i u ćelije u kojima je povećana koncentracija CO₂, i da je do bolje produkcije biofilma došlo nakon inkubacije u uslovima sličnim unutrašnjosti ćelija i međućelijskom prostoru.

U terapiji streptokoknih infekcija najčešće se koriste beta laktamski antibiotici, te makrolidi i linkozamidi. Streptokokno kliconoštvo se ne liječi, jedino u slučajevima u kojim postoji opasnost od poststreptokoknih sekvela. U takvim slučajevima kliconoštvo se eradikuje eritromicinom, klindamicinom i rifampicinom. U terapiji bakterijskih infekcija veoma je bitno pravilno i pravovremeno dozirati antibiotike. Pravilno doziranje podrazumijeva da se u organizmu postignu doze koje imaju bakteriostatsko ili baktericidno dejstvo. Pravovremeno doziranje podrazumijeva unos antibiotika u odgovarajućim intervalima, tako da se u organizmu održava koncentracija koja odgovara vrijednostima MIK-a ili nešto višim. U našem radu smo testirali kako subinhibitorne koncentracije utiču na adherenciju, hidrofobnost, produkciju SpeB i sposobnost formiranja biofilma invazivnih i neinvazivnih izolata *S. pyogenes*, da bi se utvrdilo da li ove tri grupe izolata, eventualno, reaguju na različit način, te zbog toga dovode do različitih kliničkih stanja i oboljenja.

Nakon inkubacije sa subinhibitornim koncentracijama antibiotika između grupa pojavile su se razlike u odnosu na adherenciju za neobloženu mikrotitarsku ploču. Nakon dejstva rifampicina, ceftriaksona i klindamicina, ST grupa je bolje adherisala u odnosu na SK grupu, a eritromicin i ceftriakson su doveli do bolje adherencije SI grupe u odnosu na SK grupu. Zanimljivo je ukazati na činjenicu da su netretirani izolati ST grupe, najslabije adherisali za neobloženu mikrotitarsku ploču, da bi nakon dejstva antibiotika koji djeluju različitim mehanizmima na bakterije, ovi izolati

pokazali bolju adherenciju u međusobnom poređenju grupa. Takođe, i izolati SI grupe su pokazali bolju adherenciju u odnosu na SK grupu nakon dejstva eritromicina i cefalosporina, ukazujući da su izolati od kliconoša najslabije adherisali u međusobnom poređenju grupa. Jedino su SK izolati bolje adherisali nakon uticaja penicilina, i to u odnosu na ST grupu.

U odnosu na netretirane sojeve, tj. adherenciju u atmosferskim uslovima, klindamicin je u koncentraciji od $\frac{1}{2}$ MIK podstakao bolju adherenciju kod sve tri grupe, a u koncentraciji od $\frac{1}{4}$ MIK poboljšao je adherenciju samo u grupi ST, što je dovelo do razlike između grupa. Iako djeluje istim mehanizmom kao i klindamicin, eritromicin je u obe koncentracije pojačao adherenciju samo invazivnih izolata (SI grupa). Za razliku od ova dva induktivna antibiotika, ostali antibiotici su oslabili adherenciju, i to penicilin u ST grupi, a ceftriakson i rifampicin u SK grupi. Ako se posmatra uticaj svih pet antibiotika na ispitivane izolate, eritromicin i klindamicin su indukovali bolju adherenciju bakterija u odnosu na druge antibiotike.

Ovi rezultati se poklapaju sa terapijskim pristupima, jer se penicilini koriste u liječenju faringitisa, a rifampicin u slučajevima kad se kliconoštvo mora eradikovati. Ceftriakson je, takođe, smanjio adherenciju grupe SK, ali se taj antibiotik u praksi ne koristi za terapiju streptokoknih infekcija. Treba obratiti pažnju na činjenicu da su eritromicin i klindamicin pojačali adherenciju kod ispitivanih izolata, eritromicin čak samo u grupi invazivnih izolata.

U dostupnoj literaturi se navodi da su makrolidi i linkozamidi doveli do smanjene adherencije u eksperimentima sa Gram negativnim bakterijama (*E. coli*, *N. meningitidis*), kao i sa Gram pozitivnim (*S. aureus*) [89, 90, 91]. Ovi antibiotici su svojim dejstvom smanjili sintezu površinskih proteina koji imaju značajnu ulogu u adherenciji za specifične receptore na našim ćelijama. Za razliku od njih *S. pyogenes* je pojačao adherenciju za anti-protein M antitijela nakon tretmana sa klindamicinom, što se objašnjava strukturnim izmjenama, odnosno pojavom novih proteina koji su dotad bili sakriveni ispod površinskih adhezina. Dejstvom antibiotika, površinski proteini su prestali da se sintetišu ili se sintetišu u manjoj količini, omogućavajući time otkrivanje novih adhezina, sa još većim afinitetom [92]. Iako rifampicin djeluje na sintezu RNK i sprečava indirektno sintezu proteina, on je doveo do smanjenja adherencije. Subinhibitorne koncentracije rifampicina su i u eksperimentima drugih autora smanjile adherenciju, najvjerovatnije indirektno preko smanjenja ćelijske hidrofobnosti [93] povećavajući tako odbojne sile između bakterija i naših ćelija. Penicilin i cefalosporini su, i prema iskustvima drugih autora oslabili adherenciju, najvjerovatnije djelujući na ugradnju površinskih proteina u ćelijski zid bakterija [94]. Neki autori smatraju da M protein više nema primarnu ulogu u adherenciji, nego lipoteihonska kiselina. Beta laktami smanjuju adherenciju tako što dovode do pojačanog oslobađanja lipoteihonske kiseline iz ćelijskog zida [95]. Značajno je naglasiti da je u našem ispitivanju utvrđeno da klindamicin i eritromicin podstiču u subinhibitornim

koncentracijama adherenciju pogotovo kod invazivnih izolata, jer se upravo klindamicin pokazao kao najbolji lijek u terapiji invazivnih infekcija. Zbog toga je u terapiji invazivnih bolesti veoma bitno pravovremeno davanje ovih antibiotika, da se ne bi stvorili uslovi za subdoziranje u kojima se pojačava adherencija bakterija i tako pogoršava tok bolesti.

Dostupni literaturni podaci najveći dijelom se odnose na adherenciju GAS za fibronektin ili fibrinogen, a veoma malo dostupnih radova prikazuje rezultate vezivanja streptokoka za laminin, vjerovatno zbog cijene ovog glikoproteina [86]. U našem ispitivanju penicilin i eritromicin su smanjili adherenciju izolata za laminin, pri čemu je penicilin više oslabio adherenciju u odnosu na eritromicin. Najveći uticaj oba antibiotika su postigla na izolate iz grupe ST, koji su najslabije adherisali za laminin, ako posmatramo sve tri grupe. Ako se poredi adherencija za laminin netretiranih sojeva i sojeva tretiranih antibiotikom, u svakoj grupi se uočava izrazito smanjenje adherencije nakon dejstva antibiotika, pri čemu je penicilin podjednako smanjio adherenciju kod sve tri grupe, dok je eritromicin najviše djelovao na grupe ST i SI. Površinski proteini streptokoka su veoma brojni i još uvijek nije poznat niti njihov ukupan broj, niti njihova uloga. Veoma je dobro ispitano vezivanje streptokoka za fibronektin i fibrinogen, te su poznati i većina proteina koja se za njih vezuje. Laminin je, takođe, protein intercelularnog matriksa i bilo je veoma zanimljivo ispitati sposobnost vezivanja streptokoka, kao i uticaj antibiotika na adherenciju. Trenutno znamo da je adherencija streptokoka za laminin posredovana SpeB, Shr proteinom i polipeptidima iz grupe Ag I/II. Penicilin svojim dejstvom sprečava ugradnju ovih proteina u ćelijski zid, dok eritromicin smanjuje njihovu produkciju na ribozomima. S obzirom da je penicilin više oslabio adherenciju u odnosu na eritromicin, očigledno je da i manja produkcija ili čak i produkcija aberantnih proteina manje uticala na adherenciju u odnosu na neugrađivanje ovih proteina u ćelijski zid. Na osnovu toga se može zaključiti da je afinitet ovih proteina za laminin veoma visok, te da je dovoljna mala količina ovih specifičnih proteina da bi se streptokok uspješno vezao za intercelularni matriks. Moguće objašnjenje je da se usljed dejstva eritromicina pojavljuje defekt u površinskom sloju laminin vezujućih proteina, te da onda na površinu "isplivavaju" iz dubljih slojeva ćelijskog zida adhezini koji su do tada bili sakriveni [96]. Većina autora smatra da je SpeB najznačajniji protein za vezivanje laminina i da se on najviše eksprimira na površini invazivnih sojeva [97], što se poklapa sa našim rezultatima adherencije. Prema tim podacima bilo je logično očekivati, da opet grupa invazivnih izolata bude najviše pogođena dejstvom antibiotika. Međutim, u našem eksperimentu je grupa ST najslabije adherisala nakon dejstva antibiotika. Već je napomenuto da uz SpeB i drugi proteini učestvuju u adherenciji za laminin. Naša je pretpostavka da su antibiotici više djelovali na te druge površinske adhezine u odnosu na SpeB. Takođe, u našem radu nismo dokazali da su invazivni izolati imali bolju ekspresiju SpeB, te uz pretpostavku da grupe SI i SK raspolažu boljim

adhezinima (bilo da je u pitanju veći broj adhezina ili njihov veći afinitet), naš rezultat da su antibiotici najviše smanjili adherenciju izolata grupe ST je logičan i očekivan.

Uz adherenciju, u prvim koracima formiranja biofilma veoma je bitna hidrofobnost površinskih proteina. Ako posmatramo razlike u hidrofobnosti između tretiranih grupa na nivou cijelog eksperimenta, zapaža se da su izolati SK grupe nakon tretmana svih 5 antibiotika pokazali veću hidrofobnost u odnosu na ST grupu, a nakon dejstva rifampicina i penicilina su imali veću hidrofobnost i u odnosu na SI grupu. Izolati SI grupe su imali veću hidrofobnost u odnosu na ST grupu nakon dejstva rifampicina i klindamicina. Za sada nema objavljenih podataka o razlikama u hidrofobnosti između GAS izolata različite invazivnosti, tako da ne možemo da uporedimo naše rezultate sa rezultatima drugih autora. Isti problem postoji i ako posmatramo razloge zbog kojih antibiotici dovode do razlika između grupa po pitanju hidrofobnosti. Značajno je napomenuti da antibiotici koji se najčešće koriste u terapiji streptokoknih infekcija, penicilin i eritromicin, smanjuju podjednako hidrofobnost u svim grupama. Odgovor na pitanje zašto klindamicin i rifampicin smanjuju hidrofobnost samo u ST grupi, u ovom trenutku nije moguće dati. Smatramo da bi pomoć u tumačenju ovog zapažanja išla u pravcu tipizacije GAS sojeva.

Svi testirani antibiotici su smanjili hidrofobnost ispitivanih izolata. Penicilin i rifampicin u koncentraciji od $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK, te eritromicin u koncentraciji od $\frac{1}{2}$ MIK podjednako su smanjili hidrofobnost kod svih grupa u odnosu na netretirane izolate. Klindamicin i ceftriakson u koncentraciji od $\frac{1}{2}$ MIK su značajno smanjili hidrofobnost u grupi SK. Ramadan i sar. [98] su, takođe, dokazali smanjenje hidrofobnosti nakon dejstva azitromicina i eritromicina na GAS, dok Bechetrit i sar. [94] nisu uočili smanjenje hidrofobnosti nakon dejstva penicilina. Smanjenje hidrofobnosti nije uočeno najvjerovatnije, jer su bakterije bile podvrgnute dejstvu MIK penicilina tokom jednog časa, što je vjerovatno kratak period da bi penicilin ostvario svoje dejstvo u subinhibitornim koncentracijama. Za razliku od GAS, uočeno je smanjenje hidrofobnosti pod uticajem penicilina kod *Streptococcus agalactiae* i *S. sobrinus* [99, 100]. Beta laktamski antibiotici su smanjivali hidrofobnost i kod izolata *S. aureus* i *P. aeruginosa* iz ortopedskih pomagala i proteza, za koje je produkcija biofilma najvažniji faktor virulencije [101].

Ako posmatramo promjenu hidrofobnosti u odnosu na mehanizam dejstva antibiotika na bakterije, beta laktamski antibiotici su u obe koncentracije ($\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK) značajno smanjili hidrofobnost u odnosu na ostala tri antibiotika. Poznato je da su pili, lipoteihoinjska kiselina, protein M i drugi

proteini odgovorni za hidrofobnost streptokoka. Beta laktami djelujući na sortaze, enzime koji ih ugrađuju u ćelijski zid, značajnije smanjuju hidrofobnost nego antibiotici koji djeluju na ribosome i metabolizam bakterijske ćelije. Slično objašnjenje je dato i za uticaj antibiotika na adherenciju, a poznato je da je hidrofobnost bakterija jedan od značajnijih osobina koje utiču u krajnjem ishodu i na adherenciju.

Produkcija SpeB, cistein proteaze, je veoma kompleksna i dobro proučena [102, 103]. U odnosu na netretirane izolate, produkcija SpeB se značajno smanjila nakon uticaja svih antibiotika. Razlika postoji i između koncentracija istog antibiotika, tj. veća subinhibitorna koncentracija ($\frac{1}{2}$ MIK) je značajno smanjivala produkciju u odnosu na manju subinhibitornu koncentraciju ($\frac{1}{4}$ MIK). Razlike su uočene i između grupa kod veće koncentracije penicilina i ceftriaksona (statička analiza). Penicilin je značajnije djelovao na neinvazivnu grupu izolata od kliconoša, a ceftriakson na slabo invazivnu grupu izolata od pacijenata sa tonzilofaringitisom. Ostale koncentracije i ostali antibiotici su imali podjednako dejstvo na sve tri ispitivane grupe. Na nivou cijelog eksperimenta (dinamička analiza) nisu uočene razlike između grupa, tj. sve tri grupe su se slično ponašale.

Ako poredimo uticaj $\frac{1}{2}$ MIK svih antibiotika u odnosu na mehanizam dejstva, opet beta laktamski antibiotici značajnije smanjuju produkciju SpeB u odnosu na ostale antibiotike. Ovo se, takođe, može objasniti uticajem ovih antibiotika na enzime koji ugrađuju SpeB u ćelijski zid, slično kao kod hidrofobnosti i adherencije. Zanimljivo je uočiti da rifampicin značajno smanjuje produkciju SpeB u odnosu na eritromicin i klindamicin. Iako rifampicin djeluje na nivou nukleinskih kiselina, tj. sprečavajući inicijaciju translacije, a time indirektno na sintezu proteina, poznato je da osjetljive bakterije reaguju na veoma niske koncentracije antibiotika, te da su i same RNK unutar ćelije različito osjetljive na ovaj antibiotik [92]. U dostupnoj literaturi nema podataka o uticaju subinhibitornih koncentracija antibiotika na produkciju SpeB.

Dinamičkom analizom utvrđene su razlike između grupa tokom cijelog vremena trajanja eksperimenta. Uočeno je da nakon inkubacije sa rifampicinom, ST grupa bolje produkuje biofilm, i to u odnosu na druge dvije grupe nakon $\frac{1}{2}$ MIK, a nakon $\frac{1}{4}$ MIK u odnosu na SI grupu. Nakon inkubacije sa obe koncentracije ($\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK) penicilina, SK grupa je značajno bolje produkovala biofilm u odnosu na ST grupu. Takođe, uočeno je da SI grupa bolje produkuje biofilm u odnosu na druge dvije grupe nakon inkubacije sa $\frac{1}{2}$ MIK eritromicina. Nakon inkubacija sa $\frac{1}{4}$ MIK eritromicina, te obe koncentracije ceftriaksona i klindamicina nisu uočene razlike između grupa u sposobnosti formiranja biofilma. Ove rezultate smatramo veoma značajnim, jer smo dokazali da *in vitro* i na vještačkoj podlozi za koju GAS nema značajne adhezine, izolati od kliconoša (SK grupa) pokazuju stalno bolju produkciju biofilma, kako u odnosu na druge grupe, tako i u odnosu na

netretirane izolate. Ovi rezultati direktno ukazuju i skreću pozornost na značaj pravovremenog uzimanja antibiotika tokom streptokoknog tonzilofaringitisa. Prema našim rezultatima, smanjivanje koncentracije penicilina ispod vrijednosti MIK stvara uslove u kojima će izolati početi da stvaraju biofilm, zaštiti se od dejstva antibiotika i dovesti do terapijskog neuspjeha, odnosno nastanka kliconoštva.

Ako uporedimo rezultate dinamičke analize za adherenciju, hidrofobnost i produkciju biofilma, uočava se da nakon inkubacije sa penicilinom SK grupa bolje adheriše, ima veću hidrofobnost i bolju produkciju biofilma u odnosu na ST grupu. Naša pretpostavka je da subinhibitorne koncentracije penicilina stvaraju induktivne uslove za produkciju biofilma, pri čemu pretpostavljamo da se stvaranje biofilma ne odvija na površini epitelnih ćelija, nego u intersticijalnom prostoru. Takođe, eritromicin pored toga što podstiče produkciju biofilma invazivnih izolata SI grupe, dovodi i do bolje adherencije ove grupe u odnosu na ST i SK grupe. Ista korelacija je nađena kod ST grupe, kad je testiran rifampicin, koji je omogućio ovoj grupi i bolju adherenciju i bolje formiranje biofilma.

Statička analiza pokazuje slične rezultate dinamičkoj analizi, ali s obzirom da se te razlike ukazuju u odnosu na svaku koncentraciju antibiotika i za svako vrijeme inkubacije pojedinačno, skreću pažnju sa cjelokupne slike. Statička i dinamička analiza zajedno ukazuju na nesposobnost GAS da održi intaktan biofilm tokom dužeg vremena i daje odgovor zbog čega ova bakterija, iako raspolaže moćnim adhezinima i sposobna je da produkuje biofilm, ipak ne izaziva hronične infekcije, niti infekcije nastale kao posljedica formiranja biofilma na vještačkim implantima.

U okviru statičke analize treba obratiti pažnju na naš rezultat da je grupa invazivnih izolata nakon 48 sati inkubacije sa subinhibitornom koncentracijom od $\frac{1}{2}$ MIK penicilina i klindamicina, takođe, bolje produkovala biofilm u odnosu na iste uslove bez uticaja antibiotika. Neuspjeh penicilina u tretmanu invazivnih streptokoknih infekcija se objašnjava najčešće prodorom bakterija u intercelularni prostor u koji penicilin ne može prodrijeti ili prodire u nedovoljnim koncentracijama. Mi smo dokazali da dugotrajna inkubacije sa subinhibitornom koncentracijom penicilina indukuje invazivne izolate na produkciju biofilma, te bi i produkcija biofilma mogla biti jedno od obrazloženja penicilinskog neuspjeha. Takođe, invazivni izolati su najbolje produkovali biofilm i nakon dugotrajne inkubacije sa klindamicinom, te bi se ovim moglo objasniti i terapijski neuspjeh klindamicina kod invazivnih infekcija. Uočili smo i razliku između koncentracija u indukciji stvaranja biofilma kod SK grupe, pa je čak bolja indukcija ostvarena nakon inkubacije sa manjom subinhibitornom koncentracijom u odnosu na veću, što je značajno, jer se u slučajevima kad je to

neophodno kliconoštvo eradikuje klindamicinom. Ovaj rezultata skreće pozornost da to da je klindamicin odličan induktor biofilma i u veoma malim koncentracijama i navodi na važnost pravovremene aplikacije lijeka.

Osim samih razlika između grupa nakon tretmana sa antibioticima, bilo je značajno utvrditi da li ispitivane koncentracije dovode i do indukcije stvaranja biofilma. Utvrđeno je da rifampicin, eritromicin i ceftriakson podstiču produkciju biofilma. Ako posmatramo uticaj $\frac{1}{2}$ MIK rifampicina u odnosu na netretirane izolate, nakon 12 i 24 sata samo grupa SK pokazuje značajno bolju produkciju, a nakon 48 sati nema razlike između tretiranih i netretiranih grupa. Manja subinhibitorna koncentracija rifampicina je podstakla grupu SK na bolju produkciju biofilma u odnosu na netretirane izolate i to nakon inkubacije od 12 i 48 sati. U oba slučaja smo dobili značajan podatak da subinhibitorna koncentracija rifampicina podstiče izolate od kliconoša da bolje produkuju biofilm. S obzirom da se rifampicin jedino i koristi u slučajevima kad je neophodno eradikovati kliconoštvo, ovaj podatak može doprinijeti rasvjetljavanju neuspjeha u terapiji takvih stanja.

Ako poredimo produkciju biofilma u prisustvu $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ MIK eritromicina u odnosu na netretirane izolate, iste rezultate dobijamo za grupe SI i SK. Eritromicin u obe koncentracija pojačava produkciju biofilma u grupi SI nakon sva tri vremena inkubacije, a u grupi SK nakon 12 i 24 sata. Na grupu ST je djelovala samo veća koncentracija nakon 12 i 48 sati. Ako se porede veća i manja subinhibitorna koncentracija, uočeno je da $\frac{1}{2}$ MIK pospješuje produkciju biofilma u grupi SI tokom sva tri vremena inkubacije, u grupi SK nakon 24 sata, a u grupi ST nakon 48 sati. Ovaj podatak možemo objasniti činjenicom da $\frac{1}{2}$ MIK usporava razmnožavanje naših izolata više nego $\frac{1}{4}$ MIK i upravo ta usporena brzina razmnožavanja stvara uslove u kojima sojevi pokazuju najbolju produkciju biofilma. U našem eksperimentu se pokazalo da je eritromicin antibiotik koji najjače indukuje GAS na produkciju biofilma, te da je ta indukcija stabilna tokom vremena pogotovo za izolate od kliconoša i invazivne izolate. Ovaj podatak dobija veliku značajnost, jer se eritromicin primjenjuje kod sva tri stanja, tj. bolesti (eradikacija kliconoštva, tonzilofaringitis i invazivne bolesti) koje smo mi ispitivali u našem radu.

Ako poredimo produkciju biofilma u prisustvu $\frac{1}{2}$ MIK ceftriaksona u odnosu na netretirane izolate, produkcija biofilma je poboljšana u grupi SK nakon 12 i 48 sati inkubacije, u grupi ST nakon 24 sata. Grupa ST je bolje produkovala biofilm nakon sva tri vremena u odnosu na netretirane izolate, a grupa SK samo nakon 48-časovne inkubacije sa $\frac{1}{4}$ MIK ceftriaksona.

Svi izolati nakon inkubacije sa subinibitornim koncentracijama antibiotika su i dalje bili slabi produktori biofilma, tj. subinhibitorne koncentracije ne dovode do pojačane produkcije biofilma, nego samo indukuju neprodukujuće izolate da pređu u produktore biofilma.

Cilj našeg rada je bio da se utvrdi kako će se različite grupe GAS izolovane iz pacijenata sa različitim kliničkim stanjima ponašati po pitanju produkcije biofilma, ako ih izložimo subinibitornim koncentracijama antibiotika koji se koriste u terapijama tih stanja. Značajne rezultate smo dobili kod pencilina, rifampicina i eritromicina. Razlozi zbog kojih se ove grupe izolata tako ponašaju još uvijek nisu poznati i izučeni. Lembke i sar. su pokušali da sistematizuju produkciju biofilma GAS prema M serotipovima, pri čemu su mjerili adherenciju i produkciju biofilma i za neobloženu mikrotitarsku ploču i za ploču obloženu proteinima matriksa [86]. Rezultati nisu bili konzistentni, što dalje samo govori o nestabilnosti produkcije biofilma kao osobine *S. pyogenes*. Drugi način sistematizacije je vršen preko nove vrste tipizacije. Sojevi su tipizirani preko FTC regiona koji sadrži gene za kodiranje fibronektin vezujućih proteina 1 i 2 (*prtF1 i 2*), proteine udružene sa pilima (*cpa, ftcA i B*), te regulatore RofA/Nra (*rofA, nra*). Ovi proteini i geni imaju veoma bitnu ulogu u vezivanju proteina matriksa i globalnoj regulaciji faktora virulencije. Dosad je poznato 9 FTC tipova i nađena je povezanost određenih FTC tipova sa produkcijom biofilma u zavisnosti od podloge u kojoj je vršen eksperiment [38]. Imajući to u vidu, bilo bi interesantno uraditi FTC tipizaciju naših izolata, a onda dobijene rezultate analizirati u funkciji različitog intenziteta stvaranja biofilma izolata tretiranih subinibitornim koncentracijama antibiotika.

Ako analiziramo uticaj $\frac{1}{2}$ MIK antibiotika na sve ispitivane izolate tokom 12 sati inkubacije, uočava se da klindamicin pojačava formiranje biofilma u odnosu na penicilin, ceftriakson i rifampicin, a eritromicin u odnosu na penicilin i rifampicin. Ako analiziramo uticaj $\frac{1}{2}$ MIK antibiotika tokom 24 sata inkubacije, uočava se da klindamicin i eritromicin pospješuju produkciju biofilma u odnosu na penicilin, ceftriakson i rifampicin, a takođe i penicilin u odnosu na ceftriakson. Ako analiziramo uticaj $\frac{1}{2}$ MIK antibiotika tokom 48 sati inkubacije, uočava se da klindamicin pojačava formiranje biofilma u odnosu na ceftriakson i rifampicin, a eritromicin u odnosu na penicilin, ceftriakson i rifampicin.

Ako analiziramo uticaj $\frac{1}{4}$ MIK antibiotika tokom 12 sati inkubacije, uočava se da klindamicin pojačava formiranje biofilma u odnosu na penicilin, ceftriakson i rifampicin, a eritromicin u odnosu na penicilin i ceftriakson, te rifampicin u odnosu na ceftriakson. Ako analiziramo uticaj $\frac{1}{4}$ MIK antibiotika tokom 24 sata inkubacije, uočava se da klindamicin pospješuje produkciju biofilma u

odnosu na preostala 4 antibiotika, a eritromicin u odnosu na ceftriakson. Ako analiziramo uticaj ¼ MIK antibiotika tokom 48 sati inkubacije, uočava se da klindamicin pojačava formiranje biofilma u odnosu na penicilin, ceftriakson i rifampicin, a eritromicin u odnosu na ceftriakson i rifampicin, te penicilin u odnosu na ceftriakson.

Na osnovu ovih podataka možemo zaključiti da eritromicin i klindamicin podstiču produkciju biofilma na sve testirane izolate, bez obzira kojoj ispitivanoj grupi pripadale. Ako pogledamo rezultate adherencije, uočava se da ova dva antibiotika podstiču i adherenciju, pa se ova dva rezultata mogu dovesti u direktnu povezanost, što se slaže sa rezultatima drugih autora [38]. Takođe, ako posmatramo antibiotike prema mehanizmu djelovanja, uočava se da oni koji djeluju na sintezu ćelijskog zida (penicilin i ceftriakson) slabije podstiču produkciju biofilma, nego antibiotici koji djeluju inhibitorno na proces sinteze proteina na ribozomima. Za *S. pyogenes* još uvijek nije utvrđen molekularni mehanizam na koji subinhibitorne koncentracije podstiču produkciju biofilma, ali su poznati mehanizmi za druge bakterije. Za *S. epidermidis* je poznato da je pojačana produkcija biofilma odgovor ćelije na uslove stresa i da se ostvaruje na više načina. Najdetaljnije je zasad rasvijetljen mehanizam prekomjerne produkcije egzopolisaharida poli-N-acetilglukoamina koji se eksprimira u subdoziranim uslovima pojačanom ekspresijom *ica* gena [104]. Drugi mehanizmi podrazumijevaju pojačanu produkciju ekstracelularne DNK koja je najznačajniji adhezin u matriksu, te daje gradivne nukleotide koji omogućavaju lakše umnožavanje bakterija u biofilmu [105]. Treća teorija je da pojačana produkcija biofilma nastaje zbog prekomjerne ekspresije površinskih adhezina ili lipoteihoiinske kiseline [106-108]. Naši rezultati po kojima antibiotici koji inhibiraju sintezu ćelijskog zida slabije podstiču produkciju biofilma nego antibiotici koji inhibiraju sintezu proteina, upućuju na mogućnost da je pojačana produkcija biofilma kod *S. pyogenes* posljedica pojačane ekspresije površinskih adhezina i teihoiinske kiseline. Sa tim su u saglasnosti naši rezultati koji pokazuju da su produkcija biofilma i adherencija za neobloženu ploču znatno jači nakon tretmana GAS izolata hijaluronidazom. Pretpostavljamo da su se uklanjanjem kapsule, površinski proteini i teihoiinska kiselina bolje ekspimirali i omogućili pojačanu adherenciju i produkciju biofilma u odnosu na netretirane izolate. U prilog našoj pretpostavci govori i mehanizam pojačane produkcije biofilma *S. aureus* koji se ostvaruje pojačanom ekspresijom i produkcijom fibronektin vezujućih proteina FnBP [109].

Baldassari i sar. [37] su ispitivali uticaj subinhibitornih koncentracija penicilina, eritromicina i klindamicina na produkciju biofilma kod eritromicin osjetljivih i rezistentnih sojeva GAS i utvrdili da je samo penicilin podsticao produkciju kod osjetljivih sojeva. U radu sa *S. intermediusom* Ahmed i sar. su dokazali da ampicilin, tetraciklin i ciprofloksacin, takođe, podstiču produkciju biofilma [110]. Kod *S. intermedius* su dokazali da je pojačana produkcija biofilma posljedica

dejstva na *luxS* gen koji kodira sintezu istoimenog enzima, odgovornog za sintezu autoinduktora furanosil borat diestera koji ima ulogu signala u kvorum sistemu. S obzirom na ovaki oskudne literaturne podatke teško je čvrsto zauzeti stav o mehanizmu kojim subinhibitorne koncentracije antibiotika utiču na sposobnost GAS da produkuje biofilm. Smatramo da bi u budućnosti trebalo vršiti ispitivanje na molekularnom nivou koja bi sagledavala promjene unutar genoma *S. pyogenes* i eventualno doprinijela rasvjetljavanju ovog kompleksnog i neodvoljno ispitanog procesa.

Nakon što smo ispitali uticaj subinhibitornih koncentracija na sposobnost formiranja biofilma planktonskih oblika bakterija, testirali smo kako suprainhibitorne koncentracije utiču na sesilne bakterije u sastavu biofilma. Koristili smo koncentracije u vrijednosti MIK, 2xMIK i 4xMIK, koje se u organizmu mogu realno ostvariti tokom antibiotske terapije i za koje znamo da mogu djelovati baktericidno na planktonske oblike bakterija. Bilo je realno očekivati da će ove suprainhibitorne koncentracije djelovati bakteriostatski ili baktericidno na izolate. Međutim, ispitivani izolati ne samo da su preživljavali ove uslove, nego su čak i pospješili produkciju biofilma.

Ako posmatramo prosječan uticaj sve tri koncentracije rifampicina na nivou cijelog eksperimenta, dinamička analiza je pokazala da invazivni izolati SI grupe najbolje formiraju biofilm. Statička analiza je također pokazala da je rifampicin u koncentracijama od MIK i 4xMIK najviše podstakao invazivne izolate da produkuju biofilm u poređenju sa izolatima SK i ST grupe. Sve tri koncentracije rifampicina (MIK, 2xMIK i 4xMIK) su podjednako indukovale produkciju biofilma.

Ako posmatramo prosječan uticaj sve tri koncentracije penicilina na nivou cijelog eksperimenta, dinamička analiza je pokazala da izolati SK grupe najslabije formiraju biofilm. Penicilin je sa MIK koncentracijom najviše podstakao invazivne izolate, zatim grupu ST, te grupu SK. Pod uticajem 2xMIK i 4xMIK opet je grupa ST bolje produkovala biofilm u odnosu na grupu SK. U ovom slučaju je uočeno da MIK i 2xMIK bolje podstiču produkciju biofilma u odnosu na 4xMIK, što je bilo i očekivano.

Ceftriakson je sa vrijednostima od 2xMIK i 4xMIK doveo do razlike između grupa u odnosu na produkciju biofilma, pri čemu su indukovane grupe SK i ST. Ako posmatramo u cijelom eksperimentu uticaj ceftriaksona, sve tri grupe podjednako stvaraju biofilm, dok je u odnosu na koncentracije 2xMIK pokazao najbolju indukciju formiranja biofilma.

Ako posmatramo prosječan uticaj sve tri koncentracije klindamicina na nivou cijelog eksperimenta, dinamička analiza je pokazala da izolati SK grupe bolje formiraju biofilm u odnosu na ST grupu.

Slični rezultati su dobijeni i statičkom analizom razlike između grupa, gdje je klindamicin u sve tri koncentracije indukovao SK grupu da bolje formira biofilm u odnosu na ST grupu. Veće vrijednosti 2xMIK i 4xMIK podstakle bolju produkciju biofilma u odnosu na MIK klindamicina. Eritromicin nije doveo do razlike između grupa ni u jednoj od ispitivanih koncentracija, pa se sve tri grupe i u cijelom eksperimentu ponašaju slično. Od ispitivanih koncentracija samo je 2xMIK indukovala bolju produkciju u odnosu na MIK i 4xMIK.

Ako uporedimo uticaj iste koncentracije svih antibiotika na produkciju biofilma, kod sve tri koncentracije je rifampicin značajno bolje podstakao produkciju biofilma. Ostali antibiotici su u sve tri koncentracije imali isti uticaj.

Svi izolati nakon inkubacije sa suprainibitornim koncentracijama antibiotika su i dalje bili slabi produktori biofilma, tj. i suprainhibitorne koncentracije, kao i subinhibitorne, ne dovode do pojačane produkcije biofilma, nego samo indukuju neprodukujuće izolate da pređu u produktore biofilma.

Značajno je primijetiti da su suprainhibitorne koncentracije penicilina najviše podstakle grupu ST, a klindamicin grupu SK, tj. upravo one izolate koje i tretiramo upravo ovim antibioticima. Ovim bi se moglo objasniti pojava kliconoštva nakon terapije penicilinom, te neuspjeh u eradikaciji kliconoštva klindamicinom. Prodor antibiotika u sam biofilm je oslabljen i ometan od više mehanizama, tako da u sam biofilm dospiju vrlo male količine antibiotika, koje na kraju induktivno djeluju, umjesto da eradikuju biofilm. Podatak da rifampicin u svim ispitivanim suprainhibitornim koncentracijama najbolje podstiče biofilm se najvjerojatnije može objasniti mehanizmom njegovog dejstva, tj. uticajem na nukleinske kiseline. Blokirajući inicijaciju transkripcije, u početku ne ometa ni započetu sintezu proteina i ulogu enzima, niti oštećuje ćelijski zid. Na ovaj način je metabolizam bakterija najmanje oštećen, te su one sposobne da isprodukuju biofilm u prva 24 sata.

U radu smo koristili po dvije subinhibitorne i suprainhibitorne koncentracije antibiotika, jer smo htjeli da uočimo da li uvijek veće koncentracije antibiotika imati i veći uticaj, odnosno više inhibirati adherenciju i produkciju biofilma. Ovakve očekivane rezultate smo dobili samo kad smo koristili mikrotitarsku ploču obloženu lamininom, a u slučaju neobložene mikrotitarske ploče rezultati su bili izuzetno varijabilni, u nekim slučajevima čak i neočekivani. Ove činjenice ukazuju da u adherenciji i produkciji biofilma učestvuje veliki broj adhezina i mehanizama koji su još uvijek nedovoljno rasvjetljeni. Takođe, naša preporuka bi bila da se ispitivanja biofilma kad se testira GAS obavezno koriste mikrotitarske ploče obložene intersticijalnim proteinima, jer *in vivo* GAS formira biofilm između epitelnih ćelija, a ne na vještačkim materijalima. S obzirom da nema objavljenih

podataka o mehanizmu na koji antibiotici indukuju formiranje biofilma, zasad nam preostaje da nagađamo šta se tačno dešava prilikom streptokoknih infekcija u kojima su bakterije organizovane u biofilm. Ono što znamo iz radova o drugim bakterijama jeste da su ti mehanizmi višestruki, kompleksni i da su isprepletani uticaji većeg broja faktora.

6. Zaključci

U našem radu smo potvrdili radnu hipotezu i dokazali da različiti antibiotici dovode do izmjene u adherenciji streptokoka grupe A, što dovodi do pojačanog formiranja biofilma.

Na osnovu izvedenog eksperimenta izveli smo sljedeće zaključke:

1. nije utvrđena razlika između ispitivanih grupa izolata u adherenciji za neobloženu mikrotitarsku ploču
2. uočeno je da su jako invazivni izolati najbolje adherisali za laminin, a najslabija adherencija je uočena kod slabo invazivnih izolata uzročnika tonzilofaringitisa
3. najveću hidrofobnost su pokazali neinvazivni izolati od kliconoša, a najmanju slabo invazivni izolati uzročnici tonzilofaringitisa.
4. nije nađena razlika između grupa u odnosu na produkciju cistein proteaze SpeB,
5. u odnosu na sposobnost formiranja biofilma u atmosferskim uslovima utvrđeno je da nakon inkubacije od 12 časova nema razlike između grupa, te da se razlike pojavljuju nakon 24 i 48 časova, kad slabo invazivni i neinvazivni izolati bolje formiraju biofilm u odnosu na jako invazivne isolate.
6. nije nađena povezanost između produkcije cistein proteaze SpeB, produkcije biofilma i vezivanja za laminin kod ispitivanih izolata
7. utvrđeno je da nakon inkubacije sa subinhibitornim koncentracijama antibiotika postoje razlike u adherenciji, pri čemu su jako i slabo invazivni izolati bolje adherisali za neobloženu mikrotitarsku ploču u odnosu na neinvazivne isolate
8. eritromicin, klindamicin i rifampicin su poboljšali adherenciju, a penicilin i ceftriakson su oslabili adherenciju za neobloženu mikrotitarsku ploču
9. eritromicin i penicilin smanjili sposobnost adheriranja za laminin kod sve tri grupe izolata, pri čemu su neinvazivni i jako invazivni izolati bolje adherisali za laminin u odnosu na slabo invazivne isolate.
10. svi ispitivani antibiotici su smanjili hidrofobnost ispitivanih bakterija, pri čemu su neinvazivni izolati zadržali veću hidrofobnost u odnosu na slabo i jako invazivne isolate.
11. svi ispitivani antibiotici su smanjili sposobnost produkcije SpeB kod sve tri grupe izolata, pri čemu nije uočena razlika između grupa-
12. subinhibitorne koncentracije su dovele do razlike između grupa u odnosu na produkciju biofilma; nakon inkubacije sa penicilinom neinvazivna grupa izolata je bolje produkovala biofilm u odnosu na slabo invazivnu grupu izolata, nakon uticaja eritromicina jako

- invazivna grupa izolata je bolje produkovala biofilm u odnosu na druge dvije grupe, kao i slabo invazivna grupa u odnosu na druge dvije grupe nakon uticaja rifampicina
13. subinhibitorne koncentracije svih ispitivanih antibiotika nisu pojačale intenzitet produkcije biofilma kod biofilm produktora GAS
 14. subinhibitorne koncentracije svih ispitivanih antibiotika su indukovale biofilm neprodukujuće izolate na produkciju biofilma
 15. nakon uticaja suprainhibitornih koncentracija penicilina neinvazivna grupa je slabije produkovala biofilm u odnosu na druge dvije grupe, a nakon dejstva klindamicina je neinvazivna grupa bolje produkovala biofilm u odnosu na slabo invazivnu grupu
 16. suprainhibitorne koncentracije su indukovale biofilm neprodukujuće izolate na produkciju biofilma
 17. nije utvrđena vrijednost minimalne koncentracije za eradikaciju biofilma zbog slabe adherencije ispitivanih izolata za vještačke materijale i nemogućnosti standardizacije testa.

7. Skraćenice

AHL- acil homoserin lakton

CKA- Columbia krvni agar

ECM- ekstracelularni matriks

EPS- ekstracelularni polisaharidni polimeri

Fn- fibronektin

GAPDH- gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

GAS- streptokok grupe A

IL- interleukin

ILK- kinaza vezana za integrine matriksa

LTA- lipoteihoinjska kiselina

MBEC- minimalna koncentracija za eradikaciju biofilma

MIK- minimalna inhibitorna koncentracija

MSCRAMM (engl. Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule)- površinske mikrobne komponente koje prepoznaju adhezivne molekule matriksa

PAM- protein sličan M proteinu

SI grupa- izolati *Streptococcus pyogenes* izolovani od pacijenata sa invazivnim oboljenjima

SK grupa –izolati *Streptococcus pyogenes* izolovani od kliconoša

SOF- serumski faktor zamućenja

SpeB- streptokokni pirogeni egzotoksin B (cistein proteaza)

ST grupa – izolati *Streptococcus pyogenes* izolovani od pacijenata sa tonzilofaringitisom

TCSTS- dvokomponentni signalni transdukujući sistem

THB- Todd-Hewitt bujon

THY- Todd-Hewitt bujon sa dodatkom 1% kvašćevog ekstrakta

8. Literatura:

1. Stevens D. Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis and new concepts in treatment. *Emerg Infect Dis* 1995;1:69-78.
2. Donlan RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002;8(9):881-890
3. Ivanović M, Vučetić M. Mikrobni biofilmovi- I deo; Ekološki i genetski aspekti. *Serbian Dental J* 2006;53:35-41.
4. Cowan MM, Warren TM, Fletcher M. Mixed species colonization of solid surfaces in laboratory biofilms. *Biofouling* 1991;3:23–34.
5. Thenmozhi R, Balaji K, Kumar R, Rao TS, Pandian SK. Characterization of biofilms in different clinical M serotypes of *Streptococcus pyogenes*. *J Basic Microbiol.* 2011;51(2):196-204.
6. Hasty DL, Ofek I, Courtney HS and Doyle RJ. Multiple adhesins of streptococci. *Infect Immun* 1992;60:2147-2152.
7. Ellen RP, Gibbons RJ. M protein-associated adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial surfaces: prerequisite for virulence. *Infect Immun* 1972;5:826–830
8. McArthur JD and Walker MJ. Domains of group A streptococcal M protein that confer resistance to phagocytosis, opsonization and protection: implications for vaccine development. *Mol Microbiol* 2006;59:1-4.
9. Andre I, Persson J, Blom AM, Nilsson H, Drakenberg T, Lindahl G. and Linse S. Streptococcal M protein: structural studies of the hypervariable region, free and bound to human C4BP. *Biochemistry* 2006;45:4559-4568.
10. Giannakis E, Jokiranta TS, Ormsby RJ, Duthy TG, Male DA, Christiansen D, Fischetti VA, Bagley C, Loveland BE. and Gordon DL. Identification of the streptococcal M protein binding site on membrane cofactor protein (CD46). *J Immunol* 2002;168:4585-4592
11. McNamara C, Zinkernagel AS, Macheboeuf P, Cunningham MW, Nizet V. and Ghosh P. Coiled-coil irregularities and instabilities in group A *Streptococcus* M1 are required for virulence. *Science* 2008;319:1405-1408.
12. Kahn F, Morgelin M, Shannon O, Norrby-Teglund A, Herwald H, Olin AI and Bjorck L. Antibodies against a surface protein of *Streptococcus pyogenes* promote a pathological inflammatory response. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000149.
13. Jarva H, Jokiranta TS, Wurzner R and Meri S. Complement resistance mechanisms of streptococci. *Mol Immunol* 2003;40:95–107
14. Kreikemeyer B, Talay SR and Chhatwal GS. Characterization of a novel fibronectin-binding surface protein in group A streptococci. *Mol Microbiol* 1995;17:137-145

15. Courtney HS, Li Y, Dale JB and Hasty DL. Cloning, sequencing, and expression of a fibronectin/fibrinogen-binding protein from group A streptococci. *Infect Immun* 1994;62:3937-3946
16. Terao Y, Kawabata S, Kunitomo E, Murakami J, Nakagawa I. and Hamada S. Fba, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, promotes bacterial entry into epithelial cells, and the *fba* gene is positively transcribed under the Mga regulator. *Mol Microbiol* 2001;42:75–86. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02579.x.
17. Bisno LA, Brito MO and Collins CM. Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infect Dis* 2003;3:191–200.
18. Jaffe J, Natanson-Yaron S, Caparon MG and Hanski E. Protein F2, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, possesses two binding domains. *Mol Microbiol* 1996;21:373–384. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.6331356.x.
19. Courtney HS, Hasty DL, Li Y, Chiang HC, Thacker JL and Dale JB. Serum opacity factor is a major fibronectin-binding protein and a virulence determinant of M type 2 *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 1999;32:89–98. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01328.x.
20. Nobbs AH, Lamont RJ and Jenkinson F. Streptococcus Adherence and Colonization. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009;73(3):407-450.
21. Collin M. *Streptococcus pyogenes* secreted enzymes. Lund 2001.
22. Cunningham MW. Pathogenesis of Group A Streptococcal Infection. *Clin Microbiol Rev* 2000;13(3):470-511.
23. Rasmussen M, Eden A, and Bjorck L. SclA, a novel collagen-like surface protein of *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* 2000;68:6370-6377.
24. Johnson DR, Stevens DL, Kaplan EL. Epidemiologic analysis of group A streptococcal serotypes associated with severe systemic infections, rheumatic fever, or uncomplicated pharyngitis. *J Infect Dis* 1992;166:374–382
25. Stollerman GH, Dale JB. The importance of the Group A Streptococcus Capsule in the Pathogenesis of Human Infections: A Historical Perspective. *Clin Infect Dis* 2008;46(7):1038-1045.
26. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167–193.
27. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:318–322.
28. Durack DT. Experimental bacterial endocarditis. IV Structure and evolution of very early lesions. *J Pathol* 1975;115:81–89.

29. Tunney MM, Jones DS, Gorman SP. Biofilm and biofilm-related encrustations of urinary tract devices. In: Doyle RJ, editor. *Methods in enzymology*, vol. 310. *Biofilms*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 558–566.
30. Donlan RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002;8(9):881-90
31. Sutherland IW. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 2001;147:3–9.
32. Tolker-Nielsen T, Brinch UC, Ragas PC, Andersen JB, Jacobsen CS, Molin S. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *J Bacteriol* 2000;182:6482–6489.
33. Akiyama H, Morizane S, Yamasaki O, Oono T and Iwatsuki K. Assessment of *Streptococcus pyogenes* microcolony formation in infected skin by confocal laser scanning microscopy. *J Dermatol Sci* 2003;32(3):193-199
34. Neely MM, Pfeiffer JD and M. Caparon. Streptococcus-Zebrafish Model of Bacterial Pathogenesis *Infect Immun* 2002;70(7):3904.
35. Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:470–511.
36. García-Castillo M, Morosini MI, Valverde A, Almaraz F, Baquero F, Cantón R, del Campo R. Differences in biofilm development and antibiotic susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis samples and blood cultures. *J Antimicrob Chemother* 2007;59(2):301-304.
37. Baldassarri L, Creti R, Recchia S, Imperi M, Facinelli B, Giovanetti E, Pataracchia M, Alfarone G, and Orefici G. Therapeutic failures of antibiotics used to treat macrolide-susceptible *Streptococcus pyogenes* infections may be due to biofilm formation. *J Clin Microbiol* 2006;44:2721–2727.
38. Koller T, Manetti AGO, Kreikemeyer B, Lembke C, Margarit I, Grandi G and Podbielski A. Typing of the pilus-protein-encoding FCT region and biofilm formation as novel parameters in epidemiological investigations of *Streptococcus pyogenes* isolates from various infection sites. *J Med Microbiol* 2010;59:442-452.
39. Doern CD, Roberts AL, Hong W, Nelson J, Lukomski S, Swords WE and Reid SD. Biofilm formation by group A *Streptococcus*: a role for the streptococcal regulator of virulence (Srv) and streptococcal cysteine protease (SpeB). *Microbiology* 2009;155:46-52.
40. Stevens DL, Yan S, Bryant AE. Penicillin-binding protein expression at different growth stages determines penicillin efficacy in vitro and in vivo: an explanation for the inoculum effect. *J Infect Dis* 1993;167(6):1401
41. Tanz RR, Shulman ST: Chronic pharyngeal carriage of group A streptococci. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26(2):175-176.

42. Roberts AL, Connolly KL, Kierse DJ, Evans AK, Poehling KA, Peters PR and Reid SD. Detection of group A *Streptococcus* in tonsils from pediatric patients reveals high rate of asymptomatic streptococcal carriage. *BMC pediatrics* 2012;12:3.
43. Schrager HM, Rheinwald JG and Wessels MR. Hyaluronic acid capsule and the role of streptococcal entry into keratinocytes in invasive skin infection. *J Clin Invest* 1996;98:1954–1958.
44. Sela S, Neeman R, Keller N and Barzilai A. Relationship between asymptomatic carriage of *Streptococcus pyogenes* and the ability of the strains to adhere to and be internalised by cultured epithelial cells. *J Med Microbiol* 2000;49:499–502.
45. Osterlund A and Engstrand L. Intracellular penetration and survival of *Streptococcus pyogenes* in respiratory epithelial cells in vitro. *Acta Otolaryngol* 1995;115:685–688.
46. Husmann LK, Yung DL, Hollingshead SK and Scott JR. Role of putative virulence factors of *Streptococcus pyogenes* in mouse models of long-term throat colonization and pneumonia. *Infect Immun* 1997;65:1422–1430.
47. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999;285:1028–1032.
48. Schoenwaelder SM, Burridge K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:274–286.
49. Ozeri V, Rosenshine I, Ben-Ze'Ev A et al. De novo formation of focal complex-like structures in host cells by invading *Streptococci*. *Mol Microbiol* 2001;41:561–573.
50. Nitsche-Schmitz DP, Rohde M, Chhatwal GS. Invasion mechanisms of Gram-positive pathogenic cocci. *Thromb Haemost* 2007;98:488-496.
51. Bessen DE, Lizano S. Tissue tropism in group A streptococcal infections. *Future Microbiol* 2010;5(4):623-638.
52. Flemming HC. Biofilms as particular forms of microbial life. In: *Biofouling and Biocorrosion in Industrial water Systems* (Eds: Flemming HC, Geesey GG), Springer, Heidelberg, 1991:5-11.
53. Ghigo JM. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 2001;412:442–445.
54. Fuqua WC, Winans SC and Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 1994;176(2):269-275.
55. Donlan RM. Biofilm formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clin Infect Dis* 2001;33:1387-1392.
56. Sepandj F, Ceri H, Gibb A, Read R, Olson M. Minimum inhibitory concentration (MIC) versus minimum biofilm eliminating concentration (MBEC) in evaluation of antibiotic sensitivity of gram-negative bacilli causing peritonitis. *Perit Dial Int* 2004;24(1):65-67.

57. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG and Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res.* 2002;66(2):86–92.
58. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999;37:1771–1776.
59. Suci PA, Mittelman MW, Yu FP and Geesey GG. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2125–2133.
60. Vransky JD, Stewart PS and Suci PS. Comparison of recalcitrance to ciprofloxacin and levofloxacin exhibited by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms displaying rapid transport characteristics. *Antimicrob. Agents Chemother* 1994;41:1352–1358.
61. Campanac C, Pineau L, Payard A, Baziard-Mouysset G and Roques C. Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1469–1474.
62. Stoodley P, deBeer D and Lappin-Scott HM. Influence of electric fields and pH on biofilm structure as related to the bioelectric effect. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1876–1879.
63. Das JR, Bhakoo MJ, Jones MV and Gilbert P. Changes in the biocide susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* cells associated with rapid attachment to plastic surfaces. *J Appl Microbiol* 1998;84:852-858.
64. Maira-Litran T, Allison DG and Gilbert P. An evolution of potential role of multiple antibiotic resistance operon (*mar*) and multi-drug efflux pump *acrAB* in the resistance of *E.coli* biofilms towards ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:789-795.
65. Maira-Litran T, Allison DG and Gilbert P. Expression of multiple resistance operon (*mar*) during growth of *Escherichia coli* as biofilm. *J Appl Microbiol* 2000;88:243-247.
66. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature* 2003;2:114-122.
67. Ashby MJ, Neale JE and Critchley IA. Effect of antibiotics on non-growing planktonic cells and biofilms of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemotherapy* 1994;33:443–452 .
68. Tresse O, Jouenne T, Junter GA. The role of oxygen limitation in the resistance of agar-entrapped, sessile-like *Escherichia coli* to aminoglycoside and b-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1995;36:521–526.
69. Adams JL and McLean RCJ. Impact of *rpoS* deletion on *Escherichia coli* biofilms. *Appl. Environ Microbiol.* 1999;65:4285–4287.
70. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 2000; 40(2):175-179.

71. Rosenberg M, Gutnick E and Rosenberg M. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell- surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett* 1980;9:29-33.
72. Courtney HS, Offek I, Penfound T, Nizet V, Pence M, Kreikemeyer B et al. Relationship between Expression of the Family of M proteins and Lipoteichoic Acid to Hydrophobicity and Biofilm Formation in *Streptococcus pyogenes*. *PloS ONE* 2009;4(1):e4166. doi:10.1371/journal.pone.0004166.
73. Nagao PE and Benchetritt LC. Virulent and Avirulent Strains of Group B Streptococci from Rio de Janeiro, Brazil. Relationship between Differences in Surface Hydrophobicity, Sialic Acid Content and Macrophage Interaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94(4):497-498.
74. Hynes WL and Tagg JR. A simple plate assay for detection of group A streptococcus proteinase. *J Microbiol Methods*. 1985;4:25–31.
75. Presterl E, Grisold AJ, Reichmann S, Hirschl AM, Georgopoulos A and Graninger W. Viridans streptococci in endocarditis and neutropenic sepsis: biofilm formation and effects of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:45–50.
76. European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0 January 2012.
77. http://www.innovotech.ca/documents/MBECP_GInstructions_Rev2.pdf
78. Roberts AL, Connolly KL, Doern CD, Holder RC and Reid SD. Loss of the Group A *Streptococcus* Regulator Srv Decreases Biofilm Formation *In Vivo* in an Otitis Media Model of Infection. *Infect Immun* 2010;78(11):4800-4808.
79. Offek I, Whitnack E and Beachey E. Hydrophobic interaction of Group A streptococci with hexadecane droplets. *J Bacteriol* 1983;154(1):139-145.
80. Kupfer D and Zusman DR. Changes in cell surface hydrophobicity of *Myxococcus xanthus* are correlated with sporulation-related events in the developmental program. *J Bacteriol* 1984, 159(2):776.
81. Courtney HS, Offek I, Penfound T, Nizet V, Pence M, Kreikemeyer B et al. Relationship between Expression of the Family of M proteins and Lipoteichoic Acid to Hydrophobicity and Biofilm Formation in *Streptococcus pyogenes*. *PloS ONE* 2009;4(1):e4166. doi:10.1371/journal.pone.0004166.
82. Miorner H, Johansson G, Kronvall G Lipoteichoic acid is the major cell wall component responsible for surface hydrophobicity of group A streptococci. *Infect Immun* 1983;39:336-343.
83. Reiffsteck F, Wee S. and Wilkinson BJ. Hydrophobicity-hydrophilicity in staphylococci. *J Med Microbiol* 1987;24:65-73.
84. Molinari G and GS Chhatwal. Invasion and Survival of *Streptococcus pyogenes* in Eukaryotic Cells Correlates with the Source of the Clinical Isolates. *JID* 1998;177:1600-1606.

85. Roberts AL, Connolly KL, Kierse DJ, Evans AK, Poehling KA, Peters PR and Reid SD. Detection of group A Streptococcus in tonsils from pediatric patients reveals high rate of asymptomatic streptococcal carriage. *BMC pediatrics* 2012;12:3.
86. Lembke C, Podbielski A, Hidalgo-Grass C, Jonas L, Hanski E, Kreikemeyer B. Characterization of biofilm formation by clinically relevant serotypes of group A streptococci. *Applied & Environmental Microbiology* 2006;72:2864–2875.
87. Uršič V, Tomič V and Košnik T. Effect of Different Incubation Atmospheres on the Production of Biofilm in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Grown in Nutrient-Limited Medium. *Curr Microbiol* 2008;57:386–390.
88. Ahn S-J, Ahn S-J, Wen TZ, Brady L.J. and RE Byrne. Characteristics of Biofilm Formation by *Streptococcus mutans* in the Presence of Saliva. *Infect Immun* 2008;76(9):4259-4268.
89. Kristiansen BE, Rustad L, Spanne O and B. Bjorvatn. Effect of subminimal inhibitory concentrations of antimicrobial agents on the piliation and adherence of *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1983;24:731-734.
90. Proctor RA. The staphylococcal fibronectin receptor: evidence for its importance in invasive infections. *Rev Infect Dis.* 1987;9:335-340.
91. Forestier C, Darfeuille-Michaud A and B. Joly. Effect of antibiotics on adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Eur J Clin Microbiol.* 1984;3:427-432.
92. Schifferli DM and Beachy EM. Bacterial Adhesion: Modulation by Antibiotics Which Perturb Protein Synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32(11):1603-1608.
93. Schifferli DM and Beachy EM. Bacterial Adhesion: Modulation by Antibiotics with Primary Targets Other Than Protein Synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32(11):1609-1613.
94. Garcia LB, Benchetrit LC, Barrucand L. Penicillin post-antibiotic effects on the biology of group A streptococci. *J Antimicrob Chemother* 1995;36(3):475-82.
95. Tylewska S, Hjerten S and Wadstrom T. Effect of Subinhibitory Concentrations of Antibiotics on the Adhesion of *Streptococcus pyogenes* to Pharyngeal Epithelial Cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1981;20(5):563-566.
96. Beachey EH, Eisenstein BI and I. Ofek. Prevention of the adhesion of bacteria to mucosal surfaces: influence of antimicrobial agents. In H.-U. Eickenberg, H. Hahn, and W. Opferkuch (ed.), *The influence of antibiotics on the host-parasite relationship.* Springer-Verlag KG, Berlin. 1982, p. 171-181
97. Svensson MD, Scaramuzzino DA, Sjobring U, Olsen A, Frank C, Bessen DE. Role for a secreted cysteine proteinase in the establishment of host tissue tropism by group A streptococci. *Mol Microbiol* 2000;38:242–253.

98. Ramadan MA, Tawfik AF, Shibl AM and Gemmell CM. Post-antibiotic effect of azithromycin and erythromycin on streptococcal susceptibility to phagocytosis. *J Med Microbiol* 1995;42:362-366.
99. Araujo A, de Oliveira M, de Mattos M and Benchetrit LC. Cell surface hydrophobicity and adherence of a strain of group B streptococci during the post-antibiotic effect of penicillin. *Rev Inst Med trop S. Paolo* 2008;50(4).
100. Wu Q, Wang Q, Taylor KG and Doyle RJ. Subinhibitory Concentrations of Antibiotics Affect Cell Surface Properties of *Streptococcus sobrinus*. *J Bacteriol* 1995;177(5):1399-1401.
101. Kustos T, Kustos I, Kilar F, Rappai G. and Kocsis B. Effect of Antibiotics on Cell Surface Hydrophobicity of Bacteria Causing Orthopedic Wound Infections. *Chemotherapy* 2003;49:237–242.
102. Nelson DC, Garbe J and Collin M. Cysteine proteinase SpeB from *Streptococcus pyogenes* – a potent modifier of immunologically important host and bacterial proteins. *Biol Chem* 2011;392:1077-1088.
103. Hytönen J, Haataja S, Gerlach D, Podbielski A, Finne J. The SpeB virulence factor of *Streptococcus pyogenes*, a multifunctional secreted and cell surface molecule with streptadhesin, laminin-binding and cysteine protease activity. *Mol Microbiol* 2001;39(2):512-519.
104. Rachid S, Ohlsen K, Witte W, et al. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(12):3357-3363.
105. Kaplan JB, Izano E, Gopal P, Karwacki MT, Kim S, Bose JL et al. Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *mBio* 2012;3(4):e00198-12 .
106. Qin Z, Ou Y, Yang L, Zhu Y, Tolker-Nielsen T, Molin S, Qu D.. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* 2007;153(Pt 7):2083-2092.
107. Hussain M, Herrmann M, von Eiff C, Perdreau-Remington F. and Peters G. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun* 1997;65(2):519-524.
108. Sadvskaya I, Vinogradov E, Li J, Jabbouri S. Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus epidermidis* RP62A, a reference biofilm- positive strain. *Carbohydr Res* 2004;339(8):1467-1473.
109. O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Humphreys H, Robinson DA, Loughman A et al. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin- binding proteins, FnBPA and FnBPB. *J Bacteriol* 2008; 190(11):3835-3850.

110. Ahmed NA, Petersen FC, Scheie AA. AI-2/LuxS is involved in increased biofilm formation by *Streptococcus intermedius* in the presence of antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(10):4258-4263

9. Biografija

Aleksandra Šmitran je rođena u Banjaluci 23. jula 1977. godine, gdje je završila osnovnu školu i gimnaziju. Medicinski fakultet Univerziteta u Banjaluci je studirala od 1996. do 2002. godine, kad je 6. septembra diplomirala. Magistarske studije iz kliničke i eksperimentalne bakteriologije na Medicinskom fakultetu u Beogradu je upisala 2003. godine, a završila 25. decembra 2006. godine, kad je odbranila magistarski rad „Učestalost kolonizacije i osjetljivost na antibiotike *Streptococcus agalactiae* izolovanog u trećem trimestru trudnoće“ pod mentorstvom prof. dr Lazara Ranina i komentorstvom doc. dr Miroslava Petkovića. Od 2002. godine je zaposlena kao asistent na katedri za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Banjaluci. Objavila je 10 naučnih radova i učestvovala na nekoliko mikrobioloških kongresa.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Александра Шмитран

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај субинхибиторних концентрација антибиотика на формирање биофилма и везивање за компоненте матрикса инвазивних и неинвазивних изолата бета хемолитичког стрептокока групе А"

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 6. септембар 2013. год

Aleksandra Šmitran

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Александра Шмитран

Број уписа _____

Студијски програм микробиологија

Утицај субинхибиторних концентрација антибиотика на формирање биофилма и везивање за
Наслов рада компоненте матрикса инвазивних и неинвазивних изолата бета хемолитичког стрептокока групе А

Ментор проф. др Лазар Ранин

Потписани АЛЕКСАНДРА ШМИТРАН

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 6. септембра 2013 године

Александра Шмитран

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај субинхибиторних концентрација антибиотика на формирање биофилма и везивање за компоненте матрикса инвазивних и неинвазивних изолата бета хемолитичког стрептокока групе А"

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 6. септембра 2013. године

Александар Шимић