

**UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE
KATEDRA ZA MIKROBIOLOGIJU**

JELENA P. AŠANIN

**UPOREDNA PRIMENA KLASIČNIH
METODA I LANČANE REAKCIJE
POLIMERAZE (PCR) U DETEKCIJI
SOJEVA STAFILOKOKA REZISTENTNIH
NA METICILIN**

doktorska disertacija

Beograd, 2015.

**MENTOR: dr Dušan Miši , van. prof. Mikrobiologija sa imunologijom,
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu**

LANOVI KOMISIJE:

**1. dr Dušan Miši , van. prof. Mikrobiologija sa imunologijom,
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu**

**2. dr Jakov Nišavi , van.prof., Mikrobiologija sa imunologijom,
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu**

**3. dr Ivana Ćirkovi , docent, Mikrobiologija i imunologija,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu**

Datum odbrane:

**UPOREDNA PRIMENA KLASIFIKACIJSKIH METODA I LANI ANE REAKCIJE
POLIMERAZE (PCR) U DETEKCIJI SOJEVA STAFILOKOKA
REZISTENTNIH NA METICILIN**

Kratak sadržaj

U ovom ispitivanju koriš eno je 49 izolata stafilokoka poreklom od hospitalizovanih pacijenata i bolni kog okruženja, od bolesnih životinja, iz uzoraka mleka krava sa klinički manifestnim mastitisom, iz sireva i uzoraka hrane za životinje. Za izolaciju stafilokoka koriš ene su standardne mikrobiološke metode, a za identifikaciju stafilokoka do vrste koriš ene su komercijalne metode ID32 STAPH (bioMérieux, Francuska) i BBL Crystal Gram-Positive ID Kit (Becton Dickinson, SAD), a za određeni broj izolata koriš en je Vitek MS (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Francuska). Tako e u ovom ispitivanju koriš ena je i hromogena podloga (chromIDtmMRSA, bioMérieux, Francuska) za brzu detekciju sojeva MRSA od hospitalizovanih ljudi i bolni kog okruženja. Ispitivanje osetljivosti izolovanih vrsta stafilokoka na odabrane antibiotike vršeno je disk difuzionom metodom, a dobijeni rezultati su interpretirani prema preporukama CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) iz 2008. godine za oksacilin i vankomicin i prema preporukama CLSI iz 2014. godine za cefoksitin i druge antibiotike. Za kontrolu kvaliteta izvo enja ove metode koriš en je referentni soj *S. aureus* ATCC 25923. Ispitivanje osetljivosti stafilokoka na oksacilin i cefoksitin vršeno je i mikrodilucionom metodom u bujonu prema preporukama NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards - sada CLSI) iz 2003. godine, a rezultati su interpretirani prema preporukama CLSI iz 2014. godine, s tim što su rezultati ispitivanja osetljivosti koagulaza-negativnih stafilokoka na cefoksitin interpretirani prema preporukama za *S. aureus* i *S. lugdunensis*. Za kontrolu kvaliteta izvo enja ove metode koriš en je referentni soj *S. aureus* ATCC 29213. Za ispitivanje prisustva penicilinvezuju eg proteina 2a (PBP2a ili PBP2’), koriš en je Slidex®MRSA Detection test (bioMérieux, Francuska), a za detekciju *mecA* gena kod izolovanih vrsta stafilokoka koriš ena je metoda PCR (Polymerase Chain Reaction). Za kontrolu kvaliteta izvo enja

ovih reakcija su korišteni referentni sojevi i to meticilin-rezistentan *S. aureus* ATCC 43300 kao pozitivna kontrola, a kao negativna kontrola *S. aureus* ATCC 25923. Identifikovano je deset vrsta stafilokoka od kojih je osam vrsta (*S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. vitulinus*, *S. capitis*, *S. cohnii* ssp.*cohnii*, *S. lentus*, *S. sciuri* i *S. simulans*) pripadalo koagulaza-negativnim stafilokokama (CoNS) i dve vrste (*S. aureus* i *S. pseudintermedius*) koagulaza-pozitivnim stafilokokama (CoPS). Utvrđeno je dominantno prisustvo vrste *S. haemolyticus* kod izolata poreklom od ljudi, bolesnih životinja i iz bolničkog okruženja. Dominantno prisustvo koagulaza-negativnih, oksidaza pozitivnih stafilokoka, a posebno vrste *S. lentus* utvrđeno je kod izolata poreklom iz sireva i iz hrane za životinje. Primenom disk difuzione metode na oksacilin je bilo rezistentno 47 izolata, dok je primenom mikrodilucione metode u bujonu na oksacilin bilo rezistentno svih 49 izolata. Primenom obe metode na cefoksitin je bilo rezistentno 45 izolata. Prisustvo PBP2a detektovano je kod 46 izolata stafilokoka, a prisustvo *mecA* gena kod 43 izolata. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je za ispitivanje rezistencije kod CoNS na meticilin poželjna primena najmanje dve metode uz upotrebu i oksacilina i cefoksitina, jer se tako povećava mogućnost detektovanja rezistentnih sojeva.

Ključne reči: *Staphylococcus* vrste, ljudi, životinje, sirevi, hrana za životinje, rezistencija, meticilin

Naučna oblast: Preventivna veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Mikrobiologija; Rezistencija bakterija

UDK broj: 619:579.62

THE COMPARATIVE USE OF CLASSICAL METHODS AND POLIMERASE CHAIN REACTION (PCR) IN DETECTION OF STAPHYLOCOCCI STRAINS RESISTANT TO METHICILLIN

Abstract

The investigation comprised 49 isolates of staphylococci originating from hospitalized patients and hospital environment, diseased animals, dairy samples from cows with clinically manifested mastitis, cheeses and feed samples. In the isolation of staphylococci the standard microbiological methods were used; whereas for the identification of staphylococci up to the level of species the following commercial methods were used: ID 32 STAPH (bioMérieux, France) and BBL Crystal Gram-Positive ID Kit (Becton Dickinson, USA), and for certain isolates Vitek MS (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) was used. In addition, the chromogenic medium (chromIDtmMRSA, bioMérieux, France) was used for the rapid detection of MRSA strains from the hospitalized patients and hospital environment. In order to test the susceptibility of the isolated staphylococci to the chosen antibiotics, the disk diffusion test was used, and the obtained results interpreted in accordance with CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) recommendations from 2008 for oxacillin and vancomycin, and those for cefoxitin and the remaining antibiotics in accordance with the CLSI recommendations from 2014. The reference strain *S. aureus* ATCC 25923 was used for the testing of the quality of the method used. The susceptibility testing of staphylococci to oxacillin and cefoxitin was done also using the broth microdilution method in accordance with the NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards - now CLSI) recommendations from 2003, and the obtained results interpreted using the CLSI recommendations from 2014; the results obtained for the susceptibility of coagulase-negative staphylococci (CoNS) to cefoxitin were interpreted using the recommendations for *S. aureus* and *S. lugdunensis*.

For the quality control of the method the reference strain *S. aureus* ATCC 29213 was used. The penicillin-binding protein 2a (PBP2a or PBP2') was detected using Slidex®MRSA Detection test (bioMérieux, France); while for *mecA* gene in the isolated staphylococci PCR (Polymerase Chain Reaction) was used. For the quality control of the used reactions the reference strains, namely methicillin-resistant *S. aureus* ATCC 43300 was used as a positive control, and *S. aureus* 25923 as a negative control. Ten species of staphylococci are isolated, eight of them (*S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. vitulinus*, *S. capitis*, *S. cohnii* spp. *cohnii*, *S. lentus*, *S. sciuri* and *S. simulans*) belonging to coagulase-negative staphylococci (CoNS) and two species (*S. aureus* and *S. pseudintermedius*) to coagulase-positive staphylococci (CoPS). The predominant presence of *S. haemolyticus* species was determined in the isolates originating from humans, diseased animals and hospital environment. The predominant presence of coagulase-negative, oxidase-positive staphylococci, especially *S. lentus* species, was ascertained in the isolates originating from cheeses and feed. Resistance to oxacillin was detected in 47 isolates by disk diffusion, whereas the oxacillin broth microdilution method detected 49 resistant isolates. Resistance to cefoxitin was detected in 45 isolates by both methods. The presence of PBP2a was detected in 46 staphylococci isolates, and *mecA* gene presence in 43 isolates. On the basis of the obtained results it can be concluded that, in order to test the CoNS resistance to methicillin, it is indispensable to use at least two methods and both oxacillin and cefoxitin, because in this way the possibility to detect the resistant strains is greatly increased.

Key words: Staphylococci species, humans, animals, cheeses, feed, resistance, methicillin

Scientific field: Preventive veterinary medicine

Narrower scientific field: Microbiology, Bacterial resistance to antibiotics

UDK number: 619:579.62

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	5
2.1. Istorijat i taksonomija	5
2.2. Morfološke, kulturelne i fiziološk osobine stafilokoka	7
2.2.1. Faktori virulencije	9
2.3. Ekologija i epidemiologija	12
2.3.1. Stafilokoke kod ljudi.....	12
2.3.2. Stafilokoke kod životinja	15
2.3.3. Stafilokoke u namirnicama životinjskog porekla	17
2.4. Rezistencija Staphylococcus vrsta na antibiotike	19
2.4.1. Rezistencija stafilokoka na -laktame.....	21
2.4.1.1. Rezistencija stafilokoka na penicilin	22
2.4.1.2. Rezistencija stafilokoka na meticilin.....	22
2.4.1.2.1. Rezistencija na meticilin kod stafilokoka izolovanih od ljudi.....	27
2.4.1.2.2. Rezistencija na meticilin kod stafilokoka izolovanih od životinja	30
2.4.1.2.3. Rezistencija na meticilin kod stafilokoka izolovanih iz namirnica životinjskog porekla	33
2.5. Rezistencija stafilokoka na makrolide, linkozamide i streptogramine	34
2.5.1. Rezistencija stafilokoka na aminoglikozide	35
2.5.2. Rezistencija stafilokoka na hinolone	36
2.5.3. Rezistencija stafilokoka na tetracikline	37
2.5.4. Rezistencija stafilokoka na fenikole	37
2.5.5. Rezistencija stafilokoka na sulfonamide i trimetoprim.....	38
2.5.6. Rezistencija stafilokoka na glikopeptide.....	38
2.6. Metode za ispitivanje osetljivosti Staphylococcus vrsta na antibiotike	39
3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA.....	50
4. MATERIJAL I METODE ISPITIVANJA.....	51

5. REZULTATI ISPITIVANJA	59
5.1. Izolacija i identifikacija Staphylococcus vrsta.....	59
5.1.1. Identifikacija Staphylococcus vrsta izolovanih od ljudi	60
5.1.2. Identifikacija Staphylococcus vrsta izolovanih od životinja.....	61
5.1.3. Identifikacija Staphylococcus vrsta izolovanih iz bolni kog okruženja	62
5.1.4. Identifikacija Staphylococcus vrsta izolovanih iz sireva.....	63
5.1.5. Identifikacija Staphylococcus vrsta izolovanih iz uzoraka hrane za životinje	64
5.2. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolovanih sojeva stafilokoka na antibiotike	65
5.2.1. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike izolovanih Staphylococcus vrsta primenom disk difuzione metode	65
5.2.1.1. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike Staphylococcus vrsta izolovanih od ljudi primenom disk difuzione metode	66
5.2.1.2. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike Staphylococcus vrsta izolovanih od životinja primenom disk difuzione metode	67
5.2.1.3. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike Staphylococcus vrsta izolovanih iz bolni kog okruženja primenom disk difuzione metode	68
5.2.1.4. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike Staphylococcus vrsta izolovanih iz sireva primenom disk difuzione metode	69
5.2.1.5. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike Staphylococcus vrsta izolovanih iz uzoraka hrane za životinje primenom disk difuzione metode	70
5.2.2. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolovanih Staphylococcus vrsta na oksacilin i cefoksitin primenom mikrodilucione metode u bujonu	71
5.2.2.1. Rezultati ispitivanja osetljivosti na oksacilin i cefoksitin Staphylococcus vrsta poreklom od ljudi primenom mikrodilucione metode u bujonu.....	71

5.2.2.2. Rezultati ispitivanja osetljivosti na oksacilin i cefoksitin Staphylococcus vrsta poreklom od životinja primenom mikrodilucione metode u bujonu.....	72
5.2.2.3. Rezultati ispitivanja osetljivosti na oksacilin i cefoksitin Staphylococcus vrsta izolovanih iz bolni kog okruženja primenom mikrodilucione metode u bujonu	72
5.2.2.4. Rezultati ispitivanja osetljivosti na oksacilin i cefoksitin Staphylococcus vrsta izolovanih iz sireva primenom mikrodilucione metode u bujonu.....	73
5.2.2.5. Rezultati ispitivanja osetljivosti na oksacilin i cefoksitin Staphylococcus vrsta izolovanih iz hrane za životinje primenom mikrodilucione metode u bujonu	73
5.3. Rezultati ispitivanja prisustva PBP2a primenom lateks aglutinacionog testa i prisustva mecA gena primenom metode PCR.....	74
6. DISKUSIJA	77
7. ZAKLJU CI.....	84
8. SPISAK LITERATURE.....	85

1. UVOD

Rod *Staphylococcus* sa svojim najpoznatijim predstavnikom, vrstom *Staphylococcus aureus* koja je više od 130 godina poznata ljudskom rodu, pripada bakterijama koje su dugo i detaljno proučavane, ali još uvek predstavljaju veliku nepoznanicu. O stafilokokama se može naći i izuzetno veliki broj publikacija, što ukazuje na njihov nesumnjiv značaj i potrebu da se o njima sazna mnogo više. Sa napredovanjem tehnike i tehnologije i značajnim dostignućima u tim oblastima, pa samim tim i u molekularnoj genetici, povećao se i fond znanja o stafilokokama. Stafilokoke predstavljaju veliku inspiraciju za naučno-istraživački rad, što se može zaključiti iz podataka o detekciji priličnog broja novih vrsta, kao i pronalasku novih i/ili drugih njihovih gena u poslednjih nekoliko godina.

Stafilokoke se nalaze kod ljudi i velikog broja životinjskih vrsta, pa se mogu naći i u namirnicama različitog porekla i u spoljašnjoj sredini. Mogu biti tranzitorni i perzistentni stanovnici ljudskih i životinjskih organizama. Većina *Staphylococcus* vrsta su komensali koji se nalaze u okviru mikrobioma kod ljudi i životinja i ne dovode do bolesti. Međutim, stafilokoke su vrlo značajne, jer su često rezervoar gena rezistencije na antibiotike, kao i gena virulencije, pa iako nužno ne nanose štetu domaćinu, mogu biti izvor gena za druge bakterije.

Nekada se smatralo da su različite vrste stafilokoka specifično adaptirane na određene vrste životinja i ptice. Danas se zna da, iako postoje neke vrste koje su specifično adaptirane na određene vrste domaćina i njihove delove tela, većina stafilokoka ima sposobnost da se prenosi sa jedne vrste životinje na drugu, sa životinja na ptice i obrnuto. Ovo je jedan od razloga zašto je njihov značaj veliki i zašto je saradnja mikrobiologa veterinarske i humane medicine neophodna.

Stafilokoke su vrlo prilagodljive uslovima sredine i sposobne da izazovu veliki spektar različitih infekcija, od benignih infekcija kože do infekcija koje mogu biti fatalne,

kao što je sepsa. Ove infekcije, bilo da su lake ili teške, vrlo često predstavljaju izazov za liječenje, jer su stafilokoke u velikom procentu rezistentne na većinu antibiotika. Praktično ne postoji klasa antibiotika na koju ove bakterije nisu stekle rezistenciju, a to se odigravalo veoma brzo nakon uvođenja antibiotika u upotrebu, možda brže nego kod bilo koje druge vrste bakterija. Ovaj podatak izaziva opravdani strah kod kliničara i naučnika, jer se, uz već smanjene terapijske mogućnosti, gubi nada da će se pronaći novi antibiotici, koji će biti u upotrebi duži period bez pojave rezistentnih sojeva.

Pre nego što je penicilin, prvi predstavnik β -laktamskih antibiotika, uveden u kliničku upotrebu, smrtnost od infekcija izazvanih vrstom *S. aureus* je iznosila preko 80%, dok je danas vrlo mali procenat sojeva *S. aureus* osetljiv na penicilin. Najznačajniji tip rezistencije na antibiotike koju vrste iz ovog roda mogu imati je rezistencija na meticilin, koja predstavlja rezistenciju na sve β -laktamske antibiotike, osim cefalosporina koji imaju aktivnost protiv meticilin-rezistentnog *S. aureus* (ceftarolin i ceftobiprol). Međutim, kod vrste *S. aureus* se u međuvremenu pojavila rezistencija i na ove nove antibiotike. Pojava rezistencije *Staphylococcus* vrsta na vankomicin, koji je predstavnik glikopeptidnih antibiotika, predstavlja veliku opasnost, jer su, pored nekih novih antibiotika, glikopeptidni antibiotici poslednja linija odbrane od stafilokoknih infekcija.

Od svih vrsta staflokoka, najviše je proučavan *S. aureus*, jer poseduje veliki broj faktora virulencije i ispoljava rezistenciju na veliki broj različitih antibiotika sa posebnim osvrtnom na meticilin. To su razlozi zbog kojih u stručnoj i naučnoj literaturi postoji najveći broj podataka o ovoj vrsti. Prisustvo *S. aureus* u različitim uzorcima iz kliničkih materijala govori u prilog uloge ove vrste u etiologiji bolesti. Prisustvo *S. aureus* i ostalih koagulaza-pozitivnih stafilokoka u namirnicama životinjskog porekla je ili dozvoljeno u određenom broju ili se ne proverava, dok je u hrani za životinje prisustvo *S. aureus* nepoželjno.

Druge vrste koagulaza-pozitivnih stafilokoka (CoPS) nemaju veliki značaj u humanoj medicini, iako su zabeleženi slučajevi infekcija ljudi ovim vrstama, ali su značajne za veterinarsku medicinu, zbog različitih infekcija koje mogu izazvati kod životinja, kao i zbog sve veće rezistencije na različite antibiotike, posebno na meticilin.

S druge strane, značaj koagulaza-negativnih stafilokoka (CoNS) u kliničkoj praksi je dugo vremena zapostavljan, iako većina stafilokoka pripada koagulaza-

negativnim vrstama. Smatralo se da CoNS predstavljaju kontaminante u kliničkim materijalima, pa čak i onda kada su ti materijali poticali iz primarno sterilnih regija tela. U namirnicama i hrani za životinje njihovo prisustvo se ne ispituje. Danas je velika pažnja usmerena na njih iz više razloga. Prvi razlog je što veliki broj sojeva CoNS pokazuje rezistenciju na meticilin. Do 80% izolovanih sojeva CoNS iz bolničke sredine je rezistentno na meticilin. Drugi razlog je što CoNS izazivaju veliki broj infekcija kod pacijenata u bolnicama, koje se vrlo teško leče zbog njihove rezistencije na antibiotike. Treći razlog, ali nikako najmanje važan, je što CoNS predstavljaju rezervoar gena rezistencije za različite sojeve meticilin-osetljivih stafilokoka, uključujući i meticilin-osetljive sojeve *S. aureus* (MSSA).

Kod krava CoNS izazivaju supkliničke i kliničke mastitise, koji zbog smanjene proizvodnje mleka, dovode do ekonomskih gubitaka. Utvrđeno je da u namirnicama mogu biti enterotoksine, zbog čega predstavljaju opasnost po zdravlje ljudi.

Podatak koji čini još interesantnijim je da je *mecA* gen, odgovoran za rezistenciju na β -laktamske antibiotike, potekao od koagulaza-negativne vrste *S. fleurettii*, koja pripada *S. sciuri* grupi. Kod sojeva *S. fleurettii* utvrđeno je prisustvo *mecA* homologa, koji ima 99%-100% sličnosti sa *mecA* genom koji se nalazi kod N315 soja meticilin-rezistentnog *S. aureus*.

Osim *mecA* gena, otkriveno je i prisustvo *mecC* gena za koji se smatra da potiče od goveda, što još više komplikuje detekciju rezistencije na meticilin. Promene preporuka koje daju CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) i EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), zahteva mnogo detaljniji pristup stafilokokama, što prelazi okvire rutinske mikrobiološke dijagnostike. Identifikacija stafilokoka do vrste je postala imperativ, da bi se mogli adekvatno tumačiti rezultati antibiograma. S druge strane, stafilokoke su među najčešće izolovanim vrstama u rutinskoj mikrobiološkoj dijagnostici, pa su moguće velike greške, s obzirom da većina mikrobioloških laboratorija nije opremljena aparatima za molekularnu identifikaciju vrsta i njihovih gena.

Danas, sa napretkom medicine i povećanim brojem invazivnih procedura i ugradnjom različitih implantata, sa bolestima koje oslabljuju imunski sistem, kao i sve dužim životnim vekom i neracionalnom upotrebom antibiotika u humanoj medicini,

menjaju se uslovi sredine, pa prilagodljive stafilokoke koje su svuda prisutne, predstavljaju sve ve u opasnost. Infekcije koje stafilokoke izazivaju kod hospitalizovanih pacijenata pove avaju morbiditet, zbog ega se produžava boravak u bolnicama, koji sam po sebi nosi rizik od novih infekcija rezistentnim sojevima i dovodi do pove anja mortaliteta. Pove an morbiditet i produžen boravak u bolnicama zna ajno uti u na troškove le enja.

Upotreba antibiotika u veterinarskoj medicini u razli ite svrhe, tako e pove ava selektivni pritisak i omogu ava porast rezistencije kod stafilokoka koje se nalaze kod životinja i u njihovoj okolini.

Prenaseljenost i sve ve e migracije stanovništva omogu avaju brzo i lako širenje rezistentnih sojeva po celom svetu, pa je rezistencija stafilokoka na antibiotike globalni problem.

Svi navedeni podaci su samo deo saznanja o stafilokokama koja su dobijena na osnovu višedecenijskih istraživanja, ali interesovanje za stafilokoke se ne smanjuje i one privla e pažnju istraživa a širom sveta. Ovo istraživanje predstavlja mali segment saznanja i sprovedeno je sa ciljem da doprinese boljem poznavanju stafilokoka i njihove rezistencije na antibiotike.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Istorijat i taksonomija

Ime roda *Staphylococcus* potječe od grčkih reči *staphyle* što znači grozd, zbog osobine ovih bakterija da formiraju nakupine koje na mikroskopskim preparatima liče na grozdove i *kokkos* što znači zrno ili bobica (Quinn i sar., 2011; Licitra, 2013).

Nemački lekar Robert Koch je 1878. godine prvi primetio koke koje formiraju grozdove u gnoju pacijenta (Karakashevi, 1987; Crossley i sar., 2009). Uočeno je da su različite bolesti, kao na primer apscesi, povezani sa njihovim prisustvom (Crossley i sar., 2009). Koch je 1880. godine uspeo da izvrši kultivaciju stafilokoka u tečnoj hranljivoj podlozi (Karakashevi, 1987). Škotski hirurg Sir Alexander Ogston je 1880. godine na IX Kongresu hirurga u Berlinu prijavio pojavu „mikrokoka“, pronađenih u gnoju iz inficirane hirurške rane (Goldman i Green, 2009). Ogston je koristio jaja za izolaciju ovih bakterija u istoj kulturi (Goldman i Green, 2009), nakon čega ih je inokulisao mišu, kod koga su se razvili apscesi (Crossley i sar., 2009). Iz tih apscesa su izolovane bakterije koje su izgledale isto kao one izolovane iz apscesa kod oveka, pa je tako primenom Kohovih postulata Ogston dokazao uzročnika gnojnih apscesa (Goldman i Green, 2009). Ogston je 1882. godine ove bakterije nazvao *Staphylococcus* (Becker i sar., 2014). Nekoliko godina kasnije, 1884. godine, nemački hirurg Friedrich Julius Rosenbach je uspeo da dobije na podlozi iste kulture dva tipa stafilokoka (Götz i sar., 2006; Crossley i sar., 2009; Goldman i Green, 2009), nakon čega je izvršio diferencijaciju *Staphylococcus* vrsta na osnovu pigmenta koji stvaraju kolonije (Karakashevi, 1987; Crossley i sar., 2009). Zaključeno je da vrlo patogena vrsta luči zlatnožuti pigment (Crossley i sar., 2009), na osnovu čega je vrstu nazvao *Staphylococcus pyogenes aureus* (Becker i sar., 2014), a manje patogeni soj formira bele kolonije (Crossley i sar., 2009), koji je nazvao *Staphylococcus pyogenes albus* (Becker i sar., 2014). Ipak, danas neki autori smatraju da je *Staphylococcus pyogenes albus* koji je poticao iz gnoja verovatno bio manje

pigmentisan ili nepigmentisan izolat *S. aureus*, jer je i sam Rosenbach kasnije dokazao njegovu patogenost eksperimentima na životinjama (Becker i sar., 2014). Passet je 1885. godine dodao još jednu vrstu, *Staphylococcus pyogenes citreus* (Hill, 1981). Zopf je 1885. godine svrstao stafilokoke u rod *Micrococcus*, da bi Flügge 1886. godine izdvojio rod *Staphylococcus* iz roda *Micrococcus* (Götz i sar., 2006). Ameri ki patolog William H. Welch je 1891. godine opisao *Staphylococcus epidermidis albus* kao stalno prisutnu bakteriju koja naseljava ljudsku kožu, koja se može na i i u asepti nim ranama (Becker i sar., 2014). Privremenu podelu stafilokoka na dva roda su izvršili Winslow i Winslow 1908. godine i to na *Aurococcus* (*Aurococcus aureus*) i *Albococcus* (*Albococcus epidermidis*, što predstavlja prvi validan taksonomski opis *S. epidermidis*) (Hill, 1981; Becker i sar., 2014). Od podele na dva roda, problem je predstavljalo razlikovanje ova dva patogena stafilokoka, koje se baziralo na produkciji pigmenata, što nije bilo potpuno zadovoljavaju e (Becker i sar., 2014). Evans je 1916. godine izvršio podelu stafilokoka na dve vrste: *S. aureus* i *S. epidermidis*. Godine 1940. R. W. Fairbrother je uveo produkciju koagulaze kao osnovni princip za razlikovanje vrsta stafilokoka. Me utim, umesto da upotrebi naziv *S. epidermidis*, Fairbrother je predložio naziv *S. saprophyticus*, da bi napravio razliku izme u nepatogenih koagulaza-negativnih stafilokoka i koagulaza-pozitivnih stafilokoka, koje je nazvao *S. pyogenes* (Becker i sar., 2014). Shaw i saradnici su 1951. godine naziv *S. saprophyticus* koristili u širem smislu, ali soj koji su prvi opisali ovi autori predstavlja tip soja *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*. Stafilokoke i mikrokoke su se razlikovale na osnovu sposobnosti da vrše fermentaciju glukoze pod anaerobnim uslovima. S obzirom da *S. saprophyticus* pod anaerobnim uslovima sporo vrši fermentaciju glukoze, pogrešno je klasifikovan kao *Micrococcus*, podgrupa 3, sve do nove klasifikacije 1974. godine, što je zabeleženo u Berdžejevom priru niku determinativne bakteriologije (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*) (Becker i sar., 2014). Do po etka sedamdesetih godina XX veka, jedine tri opisane vrste u rodu *Staphylococcus* su bile *S. aureus*, *S. epidermidis* i *S. saprophyticus* (Hill, 1981). Tokom sedamdesetih godina je opisano 10 novih vrsta, uklju uju i *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. sciuri* i *S. intermedius*, da bi do danas bilo validno opisano 47 vrsta i 23 podvrste (Becker i sar., 2014) zahvaljuju i metodama molekularne genetike i izmenama u taksonomiji.

Taksonomska šema za familiju *Staphylococcaceae* je prvi put predložena za drugo izdanje Berdžejevog priručnika determinativne bakteriologije. Osim roda *Staphylococcus*, familiju *Staphylococcaceae* sačinjavaju rodovi *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Nosocomiicoccus* i *Salinicoccus*. Familija *Staphylococcaceae* pripada redu *Bacillales* koji se nalazi u klasi *Bacilli*, koja je deo odeljka *Firmicutes*. U odeljku *Firmicutes* se nalaze gram-pozitivne bakterije koje imaju nizak sadržaj G+C u DNK.

Bez obzira na filogenetske analize i klasifikacije, pojednostavljena, ali korisna i prihvaćena podela *Staphylococcus* vrsta je izvršena prema njihovoj sposobnosti da koagulišu plazmu kuni a na: koagulaza-pozitivne CoPS (*S. aureus* ssp.*aureus*, *S. aureus* ssp. *anaerobius*, *S. simiae*; *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini*, *S. lutrae*, *S. schleiferi* ssp.*coagulans*), koagulaza-varijabilne (*S. hyicus* i *S. agnetis*) i koagulaza-negativne CoNS (*S. epidermidis*, *S. capitis* ssp. *capitis*, *S. capitis* ssp.*urealyticus*, *S. caprae*, *S. saccharolyticus*; *S. haemolyticus*, *S. devriesei*, *S. hominis* ssp.*hominis*, *S. hominis* ssp.*novobiosepticus*, *S. jettensis*, *S. petrasii* ssp.*croceilyticus*, *S. petrasii* ssp.*petrasii*; *S. lugdunensis*; *S. warneri*, *S. pasteurii*; *S. muscae*, *S. microti*, *S. rostri*; *S. chromogenes*, *S. felis*; *S. saprophyticus* ssp.*saprophyticus*, *S. saprophyticus* ssp.*bovis*, *S. equorum* ssp.*equorum*, *S. equorum* ssp.*bovis*, *S. gallinarum*, *S. succinus* ssp.*succinus*, *S. succinus* ssp.*casei*, *S. xylosus*; *S. sciuri* ssp.*sciuri*, *S. sciuri* ssp.*carnaticus*, *S. sciuri* ssp.*rodentium*, *S. fleurettii*, *S. lentus*, *S. stepanovicii*, *S. vitulinus*; *S. simulans*, *S. carnosus* ssp.*carnosus*, *S. carnosus* ssp.*utilis*, *S. condimenti*, *S. piscifermentas*; *S. auricularis*; *S. cohnii* ssp.*cohnii*, *S. cohnii* ssp.*urealyticus*, *S. nepalensis*; *S. schleiferi* ssp.*schleiferi*; *S. pettenkoferi*, *S. massiliensis*; *S. arlettae*, *S. kloosii*) (Becker i sar., 2014).

2.2. Morfološke, kulturelne i fiziološke osobine stafilokoka

Članovi roda *Staphylococcus* su gram-pozitivne koke, veličine izme u 0,5 i 1,5 μm u dijametru. Stafilokoke se dele u dve vertikalne ravni i ćelije mogu ostati povezane u skupine koje su nejednake i podsećaju na grozd. Stafilokoke se takođe mogu videti kao pojedinačne ćelije, u parovima, tetradama i kratkim lancima. Stafilokoke su nepokretne, ne stvaraju spore i, iako imaju gene za stvaranje kapsule, najčešće je nemaju.

Većina vrsta su aerobi i fakultativni anaerobi, osim anaerobnih vrsta *S. saccharolyticus* i *S. aureus* ssp. *anaerobius*. Aerobna respiracija se odvija zahvaljujući prisustvu a i b tipa citohrom oksidaze, a transfer elektrona u membrani se dešava posredstvom menahinona. Do sada je c tip citohrom oksidaze otkriven samo kod *S. lentus*, *S. sciuri*, *S. vitulinus*, *S. fleurettii* i *S. stepanovicii*, kod kojih je hem kovalentno vezan za rezidue cisteina, pa je ovih pet vrsta oksidaza pozitivno. Ostale vrste su oksidaza negativne i sve su katalaza pozitivne, osim anaerobnih *S. saccharolyticus* i *S. aureus* ssp. *anaerobius* (Goldman i Green, 2009). Lu enje katalaze kod stafilokoka ima ulogu u inaktivaciji toksinog vodonik-peroksida i slobodnih radikala koji se stvaraju pod uticajem mijeloperoksidaznog sistema u fagocitnim ćelijama nakon ingestije bakterija (Koneman i sar., 2006).

Dobro rastu na većini hranljivih podloga. Na agaru sa dodatkom 5% ovčije krvi formiraju glatke kolonije zlatnožute, žute ili bele boje, koje mogu biti hemolitične. Rastu u prisustvu 6,5% NaCl. Rezistentne su na bacitracin, a osetljive na furazolidon.

Ćelijski zid stafilokoka, kao i drugih gram pozitivnih bakterija je u velikom procentu izgrađen od peptidoglikana koji čini 50% suve mase bakterije. Glavni sastavni deo molekula peptidoglikana je konstantni deo glikana za koji su vezane peptidne jedinice. Glikanski i peptidni lanci su međusobno povezani peptidnim vezama. Kod stafilokoka je u ćelijskom zidu prisutna i teihoijska kiselina koja čini do 40% suve mase ćelije. *Staphylococcus aureus* poseduje teihoijsku kiselinu koja uglavnom sadrži ribitol, dok teihoijska kiselina CoNS sadrži glicerol, sa izuzetkom *S. saprophyticus* koji uglavnom ima ribitol u sastavu teihoijske kiseline. Još jedna razlika u građini između *S. aureus* i CoNS se vidi u građini i vrsti peptidnih veza, koje su kod *S. aureus* sačinjene isključivo od glicina, dok je kod CoNS, osim glicina, prisutan i serin. Teihoijska kiselina ima funkciju u specifičnoj adherenciji gram pozitivnih bakterija za površine sluznica. Peptidoglikan i teihoijska kiselina imaju ulogu da obezbede čvrstinu i elastičnost ćelijskom zidu stafilokoka, ali pored toga imaju nekoliko bioloških aktivnosti za koje se smatra da imaju uticaja na virulenciju. Nekoliko drugih proteina, uključujući i adhezine, fibronektin-vezujuće proteine, kolagen-vezujuće proteine i klampinški faktor su kovalentno vezani za strukturu peptidoglikana (Fleer i Verhoef, 1984).

2.2.1. Faktori virulencije

Staphylococcus aureus proizvodi veliki broj enzima i toksina, koji predstavljaju faktore virulencije.

1) Faktori koji su odgovorni za adheziju *S. aureus* za elije doma ina su:

- MSCRAMMS (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) predstavljaju površinske bakterijske proteine koji posreduju u adheziji bakterija za komponente ekstracelularnog matriksa doma ina (Gordon i Lowy, 2008);

- klampin faktor je elijski materijal koji ima sposobnost vezivanja fibrinogena i dovodi do slepljivanja ve eg broja bakterijskih elija i formiranja gomilica, pri emu se molekuli fibrinogena ponašaju kao lepak; detekcija ovog faktora se zove test vezane koagulaze, test koagulaze na staklenoj plo ici ili Cadness Graves test (Koneman i sar., 2006);

- fibronektin-vezuju i protein;

- kolagen;

- proteini koji u estvuju u vezivanju sijaloproteina kostiju.

Ovi faktori su odgovorni za nastanak endokarditisa, osteomijelitisa, septi nog artritisa, infekcija povezanih sa upotrebom imlantata i katetera.

2) Faktori koji omogu avaju perzistenciju bakterija:

- akumulacija biofilma;

- varijanta malih kolonija;

- intracelularna perzistencija.

Ovi faktori su odgovorni za nastanak rekurentnih infekcija, infekcija kod cisti ne fibroze, endokarditisa, osteomijelitisa, septi nog artritisa, infekcija povezanih sa upotrebom imlantata i katetera (Gordon i Lowy, 2008).

3) Faktori koji u estvuju u izbegavanju i uništavanju odbrambenih mehanizama doma ina:

- leukocidini (PVL - Panton -Valentin leukocidin ima dva proteina i -hemolizin ima tri proteina); sa injavaju 6 dvokomponentnih toksina, tako što 3 -hemolizina u kombinaciji sa jednim od 2 PVL proteina (F i S), stvaraju 6 mogu ih kombinacija i sve imaju biološka dejstva (Koneman i sar., 2006);

- kapsularni polisaharidi (npr. 5 i 8);
- protein A;
- CHIPS (chemotaxis inhibitory protein of staphylococci);
- EAP (extracellular adherence protein);
- fenol-solubilni molekuli.

Ovi faktori su odgovorni za nastanak invazivnih infekcija kože i nekrotiziraju ih pneumonija (esto povezane sa PVL), kao i za formiranje apscesa (kapsularni polisaharidi) (Gordon i Lowy, 2008).

4) Faktori koji su uključeni u invaziju i penetraciju u tkiva su:

- proteaze;
- lipaze;
- nukleaze;
- hijaluronat lijaza;
- fosfolipaza C;
- metaloproteaze (elastaze).

Ovi faktori su odgovorni za nastanak destrukcije tkiva i metastatskih infekcija (Gordon i Lowy, 2008).

5) Faktori koji učestvuju u oboljenjima koja su izazvana toksinima i/ili u nastanku sepse:

- enterotoksini A-E, G, H i I-Q su termostabilni molekuli koji su otporni na dejstvo želudačne kiseline i crevnog soka i zadržavaju toksičnost i nakon 30 minuta na temperaturi od 100⁰C; taj mehanizam delovanja enterotoksina je nepoznat, ali je dokazano da indukuju lučenje interleukina-1, da pojačavaju peristaltiku creva i aktiviraju centar za povraćanje direktnom stimulacijom gornjeg dela gastrointestinalnog sistema (Koneman i sar., 2006);

- toksin 1 toksičkog šok sindroma (TSST-1) je mali protein koji je otporan na inaktivaciju toplotom i proteolitičkim enzimima (na primer, tripsinom) (Koneman i sar., 2006);

- ekfolijativni toksini A i B;

- hemolizin je toksin proteinske prirode i sekretuje se u spoljašnju sredinu tokom kasne logaritamske faze rasta; aplikovan supkutano izaziva dermonekrozu, a

intravenska primena dovodi do letalnog efekta kod životinja; neurotoksican je, jer kod kunića i miševa izaziva demijelinizaciju (Koneman i sar., 2006);

- peptidoglikan;
- lipoteihoijska kiselina.

Faktori iz ove grupe su odgovorni za trovanje hranom (enterotoksini), toksični šok sindrom (TSST-1), sindrom oparene kože (SSSS) (eksfolijativni toksini), bulozni impetigo i sepsu (Gordon i Lowy, 2008).

6) Faktori čija je uloga u virulenciji nejasna:

- koagulaza - može postojati u slobodnoj i vezanoj formi; vezuje se za protrombin i aktivira ga, pa tako katalizuje konverziju fibrinogena u fibrin i na ovaj način dolazi do obavijanja bakterijske ćelije fibrinom, što je ćelini otpornom na opsonizaciju i fagocitozu (Koneman i sar., 2006);

- ACME (arginin catabolic mobile element);
- bakteriocini (Gordon i Lowy, 2008).

O faktorima virulencije koagulaza-negativnih stafilokoka se manje zna, osim o sposobnosti *S. epidermidis* da stvara biofilm. U suštini, sojevima CoNS nedostaju faktori odgovorni za invazivnost (Becker i sar., 2014).

Još 1972. godine je uloga sluzi (glikokaliksa ili biofilma) kod CoNS označena kao važan faktor u patogenezi infekcije, posebno kod sojeva *S. epidermidis*. Stvaranje biofilma omogućava bakterijama adherenciju i opstanak na stranim materijalima. Bakterije koje formiraju biofilm su zaštićene od delovanja antibiotika i imunskog sistema. Ostali potencijalni faktori virulencije *S. epidermidis* su ekstracelularni enzimi i toksini: metaloproteaze sa aktivnošću elastaza, cistein proteaze, serin proteaze, lipaze, enzimi koji modifikuju masne kiseline (FAME) i α -toksin (Piette i Verschraegen, 2009).

Koagulaza-negativne stafilokoke proizvode lantibiotike (von Eiff i sar., 2002; Vuong i Otto, 2002). Lantibiotici su bakteriocini, kao na primer epidermin (lučnica *S. epidermidis*), koji deluju protiv drugih gram-pozitivnih bakterija (Becker i sar., 2014).

Utvrđeno je da vrste koje pripadaju *S. sciuri* grupi, iako se često smatraju bezopasnim komensalima, poseduju različite gene virulencije, kao što su geni odgovorni za stvaranje biofilma i TSST-1 (Butaye i sar., 2014).

2.3. Ekologija i epidemiologija

lanovi roda *Staphylococcus* naseljavaju kožu i sluznice ljudi i životinja. Metagenomske analize su potvrdile da stafilokoke imaju sklonost da naseljavaju područja veće vlažnosti, kao što su aksile, glutealna regija, ingvinalna regija, umbilikus, kubitalne jame, poplitealne jame i plantarne regije stopala. Nozdrve su ne samo glavno stanište *S. aureus*, nego su naseljene i koagulaza-negativnim stafilokokama, koje često kolonizuju i konjunktive (Becker i sar., 2014). Stafilokoke koje se nalaze na koži mogu biti lanovi rezidentne ili tranzitorne populacije mikroorganizama. Tranzitorna populacija bakterija se javlja nakon ekspozicije doma i na izvorima iz spoljašnje sredine, kao i nakon kontakta između različitih vrsta doma i na. Tranzitorne bakterije se brzo eliminišu ukoliko su zaštitne barijere doma i na oduvane. Međutim, ova forma kolonizacije predstavlja rezervoar za širenje bakterija, a sa druge strane komplikuje tumačenje nalaza ovih bakterija u kliničkim uzorcima (Švabi -Vlahovi , 2005).

2.3.1. Stafilokoke kod ljudi

Staphylococcus aureus ima sposobnost da kolonizuje ljudsko telo i da ne izazove bolest kod doma i na, dok, sa druge strane, ima sposobnost da izazove teške infekcije. Dokazana je uloga nazofaringealne kolonizacije, koja predstavlja rizik za infekciju doma i na, u širenju osetljivih i multirezistentnih sojeva *S. aureus*. Nazofaringealna kolonizacija predstavlja kompleksnu interakciju između doma i na, patogena i okoline, uključujući i selektivni pritisak antibiotika (Leclercq, 2009).

Staphylococcus aureus je jedan od prvih identifikovanih bakterijskih patogena i kod ljudi izaziva vrlo širok spektar infekcija, uključujući i impetigo, folikulitis, površinske i duboke abscese kože, infekcije rana, sinuzitis, mastitis, osteomijelitis, septični artritis, bronhopneumoniju, empijem pleure, meningitis, sepsu, endokarditis, toksični šok sindrom, sindrom oparene kože i trovanje hranom (Koneman i sar., 2006; Crossley i sar., 2009).

Staphylococcus aureus je širom sveta jedan od najvažnijih uzročnika nozokomijanih infekcija i infekcija stečenih u opštoj populaciji (Chambers i DeLeo,

2009). Iako su bolesti izazvane ovom vrstom posledica delovanja više različitih faktora i zavise od osetljivosti domaćina, heterogenost sojeva *S. aureus* ima važnu ulogu u ovom procesu. Heterogenost sojeva je jednim delom izazvana interakcijom između domaćina, koji pripadaju različitim vrstama sisara (Malachowa i DeLeo, 2010). Veliki broj različitih verovatnih i dokazanih faktora virulencije, gena odgovornih za adaptaciju na domaćina i toksina se nalazi na mobilnim genetičkim elementima ove vrste (Lindsay i Holden, 2004). *Staphylococcus aureus* sadrži mnogo tipova mobilnih genetičkih elemenata, uključujući i plazmide, transpozone, insercione sekvence, bakteriofage, genska ostrva patogenosti i stafilokokne hromozomske kasete. Posebno je interesantno što većina gena koji su locirani na mobilnim genetičkim elementima ostaje pod kontrolom regulatora koji se nalaze u genomskoj DNK (Malachowa i DeLeo, 2010). Mobilni genetički elementi mogu biti specifični za vrstu, zbog čega postoje razlike između mobilnih genetičkih elemenata sojeva *S. aureus* koji imaju afinitet za ljude ili za životinje (Sung i sar., 2008). Uprkos tome, neki sojevi *S. aureus* se prenose sa životinja na ljude i obrnuto (Van Loo i sar., 2007; Van Belkum i sar., 2008). Prelazak stafilokoka sa jedne vrste domaćina na drugu, omogućava sticanje novog genetičkog materijala, koji je često lociran na mobilnim genetičkim elementima (Lowder i sar., 2009). Iako mobilni genetički elementi čine samo 25% genoma stafilokoka (Lindsay i Holden, 2004), oni kodiraju mnoge faktore virulencije i rezistenciju na antibiotike, zbog čega igraju važnu ulogu u adaptaciji bakterija i njihovom preživljavanju (Malachowa i DeLeo, 2010).

Koagulaza-negativne stafilokoke (CoNS) se normalno nalaze na koži i mukoznim membranama i imaju ulogu komensala ili saprofita. Ukoliko dođe do oštećenja kože, zbog traume, injekcionih procedura ili prisustva stranih tela, CoNS prodiru u dublje strukture organizma, nakon čega mogu izazvati infekcije opasne po život. Pripadaju najčešće izolovanim vrstama u kliničkim mikrobiološkim laboratorijama, pa je jedan od glavnih problema koji se javlja kada su u pitanju ove bakterije teškoća u razlikovanju klinički značajnih patogenih sojeva od kontaminanata (Kloos i Bannerman, 1994). Nalaz CoNS u različitim kliničkim materijalima se vrlo često tumači kao kontaminacija, pa čak i kada su izolovane u istoj kulturi i iz primarno sterilnih regija tela. Povećana pažnja usmerena na CoNS je izazvana pojavom sve većeg broja rezistentnih sojeva, kao i povećanom upotrebom medicinskih pomagala, kao što su intravaskularni kateteri,

razliite vrste šantova, vešta ke valvule i razliite vrste proteza (Kloos i Bannerman, 1994). Infekcije izazvane CoNS mogu ugroziti živote pacijenata koji su teško bolesni i/ili imunokompromitovani, kao što su pacijenti u jedinicama intenzivne nege, prevremeno ro ena deca, pacijenti oboleli od karcinoma, pacijenti nakon transplantacija i drugi (Kloos i Bannerman, 1994). Kada su u pitanju nozokomijalne infekcije koje su izazvane upotrebom medicinskih aparata i pomagala, smatra se da su infekcije izazvane CoNS podjednako ili ak i više zastupljene od infekcija koje izaziva *S. aureus* (Huebner i Goldmann, 1999). Koagulaza-negativne stafilokoke su uzro nici infekcija rana, razli itih piogenih lezija, infekcija urogenitalnog sistema, infekcija koje se javljaju nakon postavljanja ventrikuloatrijalnih i peritonealnih šantova, endokarditisa, bakterijemija, septikemija, osteomijelitisa, peritonitisa i dr. (Kloos i Bannerman, 1994).

Staphylococcus haemolyticus je deo mikrobioma kože ljudi. Kod ljudi sa klini ki manifestnim infekcijama, *S. haemolyticus*, je posle *S. epidermidis*, naj eš i uzro nik infekcija koje su izazvane vrstama iz grupe CoNS. Primarno je identifikovan kao uzro nik nozokomijalnih septikemija, endokarditisa prirodnih valvula, peritonitisa, infekcija rana i mekih tkiva, infekcija urinarnog sistema, infekcija kostiju i zglobova i infekcija kod novoro ena i dece (Götz i sar., 2006; Koneman i sar., 2006).

Staphylococcus epidermidis je najviše zastupljena vrsta na koži ljudi. U najve em broju se nalazi na mestima pove ane vlažnosti, kao što su nos, aksile, ingvinalna i perinealna regija i prsti na nogama. Ima veliki patogeni potencijal i kod ljudi dovodi do bakterijemije, endokarditisa prirodnih i vešta kih valvula, osteomijelitisa, septi nog artritisa, peritonitisa zbog dijalize, medijastinitisa, infekcija zbog prisustva pejsmejкера, vaskularnih graftova, cerebrospinalnih šantova i vešta kih zglobova i drugih infekcija (Götz i sar., 2006).

Staphylococcus sciuri, *S. lentus*, *S. vitulinus*, *S. fleurettii* i *S. stepanovicii*, koji je dobio naziv po srpskom mikrobiologu Sr anu Stepanovi u (Hauschild i sar., 2010) su koagulaza-negativne, novobiocin-rezistentne i oksidaza-pozitivne stafilokoke, koje ine *S. sciuri* grupu. Vrste iz ove grupe ine od 0.79% do 4.3% ukupnog broja CoNS izolovanih iz klini kih uzoraka poreklom od ljudi. Iako se retko izoluju od ljudi, za 21.4% izolata *S. sciuri* grupe je utvr eno da su imali zna aja u nastanku infekcija kod ljudi (Stepanovi i sar., 2006). Ove bakterije su uzro nici ozbiljnih infekcija kod ljudi, kao što su

endokarditis, peritonitis, septični šok, infekcije urinarnog sistema, endoftalmitis, inflamatorna bolest male karlice, a najčešće infekcije rana. Životinje, namirnice životinjskog porekla, okolina, kao i bolnička sredina za ljude predstavljaju izvore bakterija iz *S. sciuri* grupe.

Staphylococcus simulans se može naći na koži i u uretri zdravih žena. Izolovan je kao uzročnik septikemija, osteomijelitisa, endokarditisa, septičkog artritisa i infekcija nakon implantacije veštačkih zglobova (Götz i sar., 2006; Koneman i sar., 2006).

Staphylococcus capitis je podeljen u dve podvrste: *S. capitis* ssp. *capitis* i *S. capitis* ssp. *urealyticus*. *Staphylococcus capitis* je deo mikrobioma kože i nalazi se u velikom broju na površini odraslih osoba, ali se u umerenom broju može naći i na drugim delovima glave kod odraslih ljudi, kao što su čelo, lice, obrve i spoljašnji ušni kanal. Ova vrsta je u najvećem broju zastupljena u predelima koji su bogati sebacealnim žlezdama koje su dobro razvijene (Götz i sar., 2006). Uzročnik je infekcija urinarnog sistema, kože, cerebrospinalnog šanta i krvi (John i Harvin, 2007).

Staphylococcus cohnii je podeljen u dve podvrste: *S. cohnii* ssp. *cohnii* i *S. cohnii* ssp. *urealyticum*. Obe podvrste se nalaze u okviru mikrobioma kože i predstavljaju oportunističke patogene (Koneman i sar., 2006). *Staphylococcus cohnii* se povezuje sa infekcijama urinarnog sistema i artritisom (Götz i sar., 2006), kao i sa infekcijama rana i meningitisom (John i Harvin, 2007).

2.3.2. Stafilokoke kod životinja

Staphylococcus aureus kod krava izaziva mastitis i impetigo vimena. Detektovana je produkcija različitih stafilokoknih enterotoksina i toksina-1 toksičnog šok sindroma kod izolata *S. aureus*, bilo da su poticali iz slučajeva supkliničkog, hroničnog ili akutnog mastitisa (Kuroishi i sar., 2003). Proteini koji učestvuju u formiranju biofilma, otkriveni su kod sojeva *S. aureus* izolovanih u slučajevima mastitisa kod krava.

Rezistencija na meticilin je retka kod *S. aureus* sojeva izolovanih u slučajevima mastitisa kod krava. Mastitis koji je uzročnik *S. aureus* se teže leči antibioticima, pa procenat uspešnosti lečenja varira od 15% do 85% (Taponen i Pyörälä, 2009).

Staphylococcus aureus kod ovaca i koza dovodi do mastitisa i dermatitisa, a kod

jagnjadi do pijemije nakon ujeda krpelja, kao i benignog folikulitisa. Kod ovaca *S. aureus* ssp. *anaerobius* izaziva limfadenitis. Kod svinja dovodi do botriomikoze i impetiga mle nih žlezda, a kod konja do botriomikoze semene vrpce i mastitisa. Kod pasa i ma aka izaziva piodermiju, zapaljenje spoljašnjeg uha, endometritis, cistitis, osteomijelitis i infekcije rana. Kod živine izaziva bangavost, kod uraka artritis i septikemiju, a kod piladi omfalitis. Kod mnogih vrsta može izazvati neonatalne septikemije i infekcije rana (Quinn i sar., 2011).

Staphylococcus intermedius se može izolovati iz nozdrva kod konja, dok se kod golubova može izolovati iz gornjih partija respiratornog sistema (Quinn i sar., 2011). Nakon što je 2005. godine (Weese i van Duijkeren, 2010; van Duijkeren, 2011; Bond i Loeffler, 2012) *Staphylococcus pseudintermedius* opisan iz uzoraka poreklom od psa, ma ke, konja i papagaja uz pomoć molekularnih metoda (Bond i Loeffler, 2012), predloženo je da izolati poreklom od pasa, ukoliko nisu dostupne molekularne metode za identifikaciju takvih izolata, budu pripisani ovoj vrsti. Verovatno ve ina izolata koji su ranije označeni kao *S. intermedius*, zapravo pripada vrsti *S. pseudintermedius*, barem kada su u pitanju izolati poreklom od pasa. To bi značilo da su infekcije kod ljudi koji su bili u kontaktu sa psima ili koje su psi kolonizovani ovom vrstom ujeli, verovatno bile izazvane vrstom *S. pseudintermedius*. *Staphylococcus pseudintermedius* je normalan stanovnik kože i mukoza i može biti izolovan iz nosa, usta, ždrela, tela, prepona i anusa zdravih pasa i ma aka. *Staphylococcus pseudintermedius* je glavni uzročnik infekcija kože i ušiju, postoperativnih rana kod pasa i ma aka i drugih tkiva (van Duijkeren, 2011).

Prvi slučaj za koji se smatra da predstavlja izolaciju CoNS poreklom od krave sa mastitisom je zabeležen 1916. godine (Aarestrup, 2006).

Staphylococcus haemolyticus se može izolovati iz mleka krava sa kliničkim i supkliničkim mastitisom (Götz i sar., 2006; Quinn i sar., 2011). Izolovan je od ma aka, pasa, konja, goveda, koza, ovaca i svinja (Becker i sar., 2014).

Staphylococcus epidermidis se može naći i u mleku krava i povremeno može izazvati supklinički ili klinički mastitis. Kod pasa i konja dovodi do infekcija rana (Quinn i sar., 2011). *Staphylococcus epidermidis* je izolovan od ma aka, koza, ovaca, svinja i gorila (Becker i sar., 2014).

Staphylococcus sciuri je široko rasprostranjen u prirodi i izolovan je iz hrane, od životinja sa farmi, glodara, morskih sisara, a povremeno od ljudi i njihovih ljubimaca. Vrsta *S. sciuri* je podeljena na tri podvrste: *S. sciuri* ssp. *sciuri*, *S. sciuri* ssp. *carnaticus* i *S. sciuri* ssp. *rodentium*. *Staphylococcus sciuri* ssp. *sciuri* se nalazi u prirodi i deo je tranzitorne populacije mikroorganizama na koži kod različitih vrsta sisara i ptica. Retko se nalazi kod ljudi. *S. sciuri* ssp. *carnaticus* se uglavnom nalazi kod goveda i može se izolovati iz mesnih proizvoda koji potiču od njih. *Staphylococcus sciuri* ssp. *rodentium* se uglavnom može izolovati od glodara (Koneman i sar., 2006). *Staphylococcus sciuri* se može izolovati od velikog broja različitih životinja kao uzročnik infekcija kože (Quinn i sar., 2011). *Staphylococcus lentus* se nalazi na koži svinja, koza i ovaca kod kojih može izazvati infekcije kože, dok se *S. vitulinus* može izolovati sa kože goveda, ovaca i svinja (Quinn i sar., 2011).

Staphylococcus simulans se može naći i u mleku krava i povremeno može izazvati supklinik ili klinički mastitis (Götz i sar., 2006; Quinn i sar., 2011). Nalazi se na koži pasa, mačaka i golubova (Quinn i sar., 2011).

Staphylococcus capitis se može naći i u mleku krava (Quinn i sar., 2011). *S. capitis* ssp. *capitis* se može naći i kod mačaka, pasa i konja (Becker i sar., 2014).

Staphylococcus cohnii se može naći i u mleku krava (Quinn i sar., 2011). *Staphylococcus cohnii* ssp. *cohnii* se može naći i kod pasa, konja i živine, dok se *S. cohnii* ssp. *urealyticus* može naći i kod različitih vrsta majmuna i konja (Becker i sar., 2014).

2.3.3. Stafilokoke u namirnicama životinjskog porekla

U skladu sa važećim odredbama Komisije (EZ) od 15. novembra 2005. godine sa izmenama i dopunama mikrobioloških kriterijuma za namirnice (EC Regulation No. 2073/2005), kriterijum higijene se odnosi samo na prisustvo i broj CoPS. Prihvata se granica za ove bakterije u namirnicama je 10^5 cfu/g. Odredbe se ne odnose na pojavu drugih *Staphylococcus* vrsta u namirnicama. Hrana je često izvor ovih bakterija i njihovo prisustvo u hrani je rezultat pojave otpornosti zbog neodgovarajućih uslova sredine tokom procesa proizvodnje, skladištenja, kao i velike sposobnosti stafilokoka za adaptaciju (Chajčević-Wierchowska i sar., 2015).

Staphylococcus aureus se može naći u govećem, pilećem, svinjskom i ćurećem mesu, kao i u proizvodima od mesa. Izolovan je iz mleka i mlečnih proizvoda. *Staphylococcus aureus* je jedan od najčešćih uzročnika trovanja hranom, ali se smatra da se trovanja izazvana ovom vrstom javljaju mnogo češće nego što se prijavljuju (Doyle i sar., 2012). Stafilokokno trovanje je posledica delovanja stafilokoknih enterotoksina, a po toku je akutno, traje 24-48 časova, samolimitirajuće je i obično ne dovodi do komplikacija, zbog čega veliki broj ljudi ne traži lekarsku pomoć.

Značaj prisustva CoNS u namirnicama animalnog porekla nije potpuno utvrđen. Poslednjih godina usmerava se pažnja na CoNS i njihov značaj u hrani poreklom od životinja. Koagulaza-negativne stafilokoke se koriste kao starter kulture, pa s obzirom na veliku rezistenciju CoNS na antibiotike, vrlo je značajno izabrati kao starter kulture one sojeve koji su osetljivi na antibiotike (Irlinger, 2008).

Staphylococcus simulans, *S. epidermidis*, *S. lentus*, kao i neke druge vrste se često mogu izolovati iz hrane i povezuju se sa životinjama sa farmi. Ipak, neki autori ukazuju da je prisustvo stafilokoka u hrani koja je spremna za konzumiranje više posledica kontaminacije izazvane ljudskim faktorom, nego što je ta kontaminacija poreklom od životinja. Drugi autori tvrde da se stafilokoke češće nalaze u mlečnim i mesnim proizvodima nego što se nalaze u sirovom mleku i mesu od kojih se proizvode (Chajcka-Wierzchowska i sar., 2015).

Staphylococcus haemolyticus se može naći u mleku i fermentisanoj hrani, dok se *S. epidermidis* može naći u fermentisanim kobasicama (Becker i sar., 2014). Iz sireva su izolovane *S. epidermidis*, *S. lentus* i *S. haemolyticus*. (Perreten i sar., 1998).

Staphylococcus sciuri ssp. *carnaticus* se može izolovati iz mesnih proizvoda koji potiču od goveda (Koneman i sar., 2006). *Staphylococcus lentus* se može naći u mleku i mesu (Becker i sar., 2014), dok je *S. vitulinus* izolovan iz mesnih proizvoda poreklom od jagnjećeg, pilećeg, mlevenog govećeg i telećeg mesa (Koneman i sar., 2006).

Utvrđeno je da neke vrste CoNS, kao na primer *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. sciuri* i *S. lentus* mogu lučiti enterotoksine (Perreten i sar., 1998; Irlinger, 2008).

Mnogi istraživači su primetili dominaciju novobiocin-rezistentnih CoNS u sirevima, posebno u tvrdim sirevima proizvedenim od ovčijeg ili kozijeg mleka, ali takođe i u mekim sirevima i sirnim namazima. Koagulaza-negativne stafilokoke su

halotolerantne i acidotolerantne i mogu u velikom broju biti prisutne naj eš e na po etku zrenja sireva, kada predstavljaju 5-15% od ukupnog broja mikroorganizama (Bockelmann i sar., 1997), koji se nalaze na površini (Irlinger, 2008). U uzorcima nekih sireva (tradicionalnih francuskih sireva, tilzitskog sira, sirnih namaza i dr.) u fazi zrenja naj eš e se mogu na i *S. vitulinus*, *S. lentus*, *S. sciuri* i druge vrste (Irlinger, 2008).

Zbog prisustva razli itih gena rezistencije kod stafilokoka, geneti ke determinante rezistencije se mogu preneti sa životinja na ljude preko namirnica kontaminiranih stafilokokama (Perreten i sar., 1998; Simeoni i sar., 2008).

2.4. Rezistencija *Staphylococcus* vrsta na antibiotike

Rezistencija bakterija na antibiotike je problem koji se mora posmatrati na nekoliko nivoa koji se odnose na zdravlje ljudi, životinja i biljaka, higijenu namirnica i razne nau ne discipline koje se bave životnom sredinom. Pored analize gena rezistencije i mutacija koje dovode do rezistencije, diseminacije rezistencije i analize mobilnih geneti kih elemenata koji omogu avaju širenje gena rezistencije preko granica vrsta i rodova, mnogi drugi aspekti su vrlo zna ajni za rezistenciju bakterija na antibiotike. To su, izme u ostalog, 1) farmakološki aspekti koji se ti u primene antibiotika, 2) metodološki aspekti koji se odnose na pravilno izvo enje ispitivanja osetljivosti na antibiotike, 3) monitoring rezistencije na antibiotike, 4) adekvatno raspolaganje antibioticima, 5) animalni modeli, 6) rezistencija na antibiotike kod bakterija iz specifi nih izvora kao što su divlje životinje, ribe, životinje koje služe za ishranu ljudi, ku ni ljubimci i životna sredina i 7) alternativne strategije za kontrolu bakterijskih infekcija (Butaye i sar., 2014).

Po etkom XXI veka izme u razli itih institucija postignut je konsenzus da je zloupotreba antibiotika glavni faktor odgovoran za nastanak rezistencije na antibiotike. Rezistencija na antibiotike je po ela da predstavlja veliki klini ki problem onoga trenutka kada je desetkovan broj osetljivih bakterija, što je uticalo na pove anje broja rezistentnih bakterija koje su u nekim sredinama postale dominantne. Ovako promenjen mikrobiom, kao posledica zloupotrebe i prekomerne upotrebe antibiotika, predstavlja izvor rezistentnih bakterija u klini kim infekcijama (Levy, 2001).

Kada se posmatra problem rezistencije, značajne su dve komponente fenomena rezistencije na antibiotike, a to su antibiotici i geni rezistencije. Istorijski posmatrano, uvođenje novih antibiotika u praksu je često praćeno razvojem rezistencije bakterija na antibiotike, jer se upotrebom antibiotika vrši selekcija rezistentnih sojeva bakterija. Upotreba antibiotika je ključni razlog zbog koga se javlja rezistencija, pa je selektivni pritisak rezultat kombinacije preterane upotrebe antibiotika u mnogim delovima sveta (na primer, bezrazložno lečenje lakših infekcija ili upotreba antibiotika kao promotora rasta ili u profilaktičke svrhe kod životinja koje se gaje za ishranu ljudi) i pogrešne upotrebe antibiotika zbog neadekvatnog izbora terapije (Schito, 2006). Pojava rezistencije zavisi i od načina primene antibiotika i dužine trajanja terapije, pa se smatra da prolongirana upotreba antibiotika u niskim dozama predstavlja optimalan selektivni pritisak za nastanak rezistencije kod bakterija (Levy, 2001).

U SAD je tokom 1998. godine proizvedeno oko 23.000.000 kilograma antibiotika, od čega je oko polovina isporučena medicinskim ustanovama za lečenje infekcija kod hospitalizovanih pacijenata i pacijenata na kućnom lečenju. Od ostale polovine, oko 80% je upotrebljeno kod životinja prema različitim indikacijama. Preostala količina je primenjena na druge organizme, kao što su na primer, ptice, biljke i drveće. Početkom devedesetih godina XX veka, oko 23.000 kilograma antibiotika je upotrebljeno u poljoprivredi pod oznakom pesticidi, jer su u SAD pesticidi uključivali i antibiotike, na primer tetraciklin i streptomycin (Levy, 2001). Agencija za zaštitu životne sredine u SAD je krajem XX veka prijavila da se, u to vreme, oko 136.000 kilograma antibiotika na godišnjem nivou koristilo za prskanje voćnjaka u južnim delovima SAD, što je uobičajena praksa u mnogim delovima Centralne i Južne Amerike. Ovaj način primene je doveo do odličnih uslova za selekciju rezistencije na antibiotike i omogućio širenje antibiotika uz pomoć kiše i vetra na mnogo šire geografske regione (Levy, 2001).

Geni rezistencije koji se nalaze na mobilnim elementima, kao što su plazmidi i transpozoni, mogu da se šire u okolini između bakterija iste vrste, odnosno istog roda ili između različitih rodova bakterija.

Hrana predstavlja još jedan način za unos bakterija rezistentnih na antibiotike. U nekim ranijim studijama je ustanovljeno da su vegetarijanci nosioci multirezistentnih bakterija u većem procentu, nego ljudi koji u svojoj ishrani koriste meso. Objašnjenje za

ovu pojavu je da sirovo meso može biti kontaminirano multirezistentnim bakterijama, ali se najčešće radi o termofilnim bakterijama. S druge strane, namirnice mogu sadržati rezidue antibiotika (Levy, 2001).

Rezistencija predstavlja globalni fenomen i globalni problem, jer su migracije stanovništva velike, tako da porast broja putovanja unutar državnih granica i van njih omogućava brzo širenje bakterija koje su rezistentne na antibiotike.

Uvođenje antibiotika je pred bakterijske patogene, kao što je *S. aureus*, postavilo nove izazove, pa se prilagodljivi sojevi odlikuju sledećim osobinama: imaju sposobnost da steknu gene rezistencije i da izgrade regulatorne mehanizme koji mogu da podignu nivo rezistencije kao odgovor na povećane koncentracije antibiotika. Patogene bakterije moraju biti sposobne da se šire u populaciji, da osnuju ekološke rezervoare, da kolonizuju domaćina i da kod njega izazovu bolest (Oliveira i sar., 2002).

2.4.1. Rezistencija stafilokoka na β -laktame

Antibiotici iz klase β -laktama koji se mogu koristiti u lečenju infekcija izazvanih stafilokokama su svrstani u nekoliko različitih grupa: penicilini (penicilini osetljivi na dejstvo penicilinaze, penicilini otporni na dejstvo penicilinaze i penicilini u kombinaciji sa inhibitorima β -laktamaza), cefemi (cefalosporini (uključujući i nove cefalosporine sa aktivnošću protiv MRSA - ceftarolin i ceftobiprol) i cefamicini) i karbapenemi.

Normalno *S. aureus* ima 5 vrsta penicilin-vezujućih proteina, odnosno PBP (Penicillin-Binding Protein) koji su označeni sa 1, 2, 3, 3 i 4, od kojih su 1, 2 i 3 esencijalni i imaju visok afinitet za β -laktamske antibiotike. Penicilin-vezujući proteini imaju sledeće funkcije: PBP1 bi primarno mogla biti transpeptidaza za peptidoglikan; PBP2 je transpeptidaza koja funkcioniše kod ćelija koje ne rastu; PBP3 je transpeptidaza povezana sa septiranjem i PBP4 je DD-karboksipeptidaza i transpeptidaza uključena u sekundarno ukrštanje peptidoglikana. Rezistencija na meticilin povezana sa hiperprodukcijom PBP4 je relativno retka, iako je prijavljena i kod laboratorijskih sojeva i kod kliničkih izolata, a u slučaju kliničkih izolata stafilokoke su ostale osetljive na cefoksitin koji se vezuje za PBP4. Umerena rezistencija koja je specifična za cefaleksin i

cefaklor je povezana sa smanjenim vezivanjem antibiotika za PBP3 (Georgopapadakou, 1993).

2.4.1.1. Rezistencija stafilokoka na penicilin

Do uvo enja penicilina u klini ku upotrebu, stopa mortaliteta pacijenata inficiranih vrstom *S. aureus* je bila oko 80% (Deurenberg i sar., 2007).

Kada je, po etkom etrdesetih godina XX veka, penicilin G uveden u klini ku upotrebu, više od 85% sojeva stafilokoka je bilo osetljivo na doze penicilina manje od 0.1 mg/L. Tokom slede e 3 godine pojavili su se sojevi stafilokoka rezistentni na penicilin. Do 1948. godine, oko 50% bolni kih sojeva je bilo rezistentno na penicilin, da bi se taj procenat do 1957. godine popeo na 80% (Schito, 2006).

U veterinarsku medicinu penicilin je uveden kasnih etrdesetih godina XX veka, a prvi slu ajevi pojave sojeva *S. aureus* rezistentnih na penicilin su otkriveni tokom pedesetih godina u zemljama u kojima upotreba penicilina nije bila ograni ena i poticali su od krava sa mastitisom (Aarestrup, 2006).

Gen odgovoran za rezistenciju na penicilin (*blaZ* gen) se može nalaziti na transpozonima, insercionim sekvencama ili plazmidima (Olsen i sar., 2006) i kodira sintezu penicilinaze, -laktamaze koja inaktivira -laktamske antibiotike hidrolizom -laktamskog prstena. Danas, više od 90% sojeva stafilokoka produkuje -laktamazu (Schito, 2006).

2.4.1.2. Rezistencija stafilokoka na meticilin

Meticilin, prvi polusintetski penicilin otporan na penicilinazu, je po eo da se upotrebljava u Evropi 1959./1960. godine, zbog pojave sojeva *S. aureus* koji su bili rezistentni na penicilin (Oliveira i sar., 2002). Vrlo brzo nakon uvo enja meticilina u upotrebu 1961. godine, u Ujedinjenom Kraljevstvu, su se pojavili prvi sojevi stafilokoka rezistentni na meticilin (Hryniewicz, 1999). Istorijski posmatrano, rezistencija stafilokoka na peniciline otporne na penicilinazu se ozna va kao rezistencija na meticilin ili rezistencija na oksacilin. Sojevi MRSA su oni sojevi *S. aureus* kod kojih je eksprimiran *mecA* gen ili neki drugi mehanizam koji dovodi do rezistencije na meticilin, kao što su

promene u afinitetu penicilin-vezuju ih proteina za oksacilin (modifikovani sojevi *S. aureus*). Kod ve ine izolata stafilokoka, rezistencija na oksacilin je posredovana *mecA* genom, koji kodira PBP2a (PBP2'). Izolati kod kojih se utvrdi prisustvo *mecA* gena ili PBP2a se prijavljuju kao rezistentni na oksacilin. Tako e, izolati kod kojih se utvrdi rezistencija na oksacilin ili cefoksitin odre ivanjem minimalnih inhibitornih koncentracija, kao i oni kod kojih se utvrdi rezistencija na cefoksitin primenom disk difuzione metode, se ozna avaju kao rezistentni na oksacilin. Mehanizmi rezistencije na oksacilin koji nisu posledica prisustva *mecA* gena su retki i uklju uju novi *mecA* homolog, *mecC* (CLSI, 2014).

Rezistencija na meticilin posredovana *mecA* genom je posledica sticanja nove DNK na hromozomu, iji rezultat je stvaranje novog penicilin-vezuju eg proteina, ozna enog kao PBP2a (78 kDa) (Oliveira i sar., 2002) sa niskim afinitetom za meticilin. Penicilin-vezuju i protein 2a je transpeptidaza peptidoglikana i u saradnji sa transpeptidazom PBP2 vrste *S. aureus* može da katalizuje sintezu elijskog zida u prisustvu laktama što omogu ava preživljavanje i rast bakterija (Kim i sar., 2012). Antibiotici iz grupe laktama se normalno vezuju za penicilin-vezuju e proteine u elijskom zidu i dovode do prekida sinteze peptidoglikana i smrti bakterijske elije. Pošto ne mogu da se vežu za PBP2a, sinteza peptidoglikana i elijskog zida se nastavljaju (Deurenberg i sar., 2007). Zbog toga što predstavlja zamenu za sve ostale penicilin-vezuju e proteine, kao i zbog svog niskog afiniteta za -laktamske antibiotike, PBP2a dovodi do rezistencije na -laktamske antibiotike (peniciline; peniciline u kombinaciji sa inhibitorima -laktamaza; cefeme, sa izuzetkom cefalosporina koji imaju aktivnost protiv sojeva MRSA i karbapeneme). Gen koji kodira sintezu PBP2a je *mecA* gen (2,1 kb), deo mobilnog geneti kog elementa, stafilokokne hromozomske kasete *mec* (*SCCmec*) (Oliveira i sar., 2002; Schito, 2006), veli ine od 32 kb do više od 60 kb, koja se inkorporira u hromozom *S. aureus* na specifi no mesto (*attBSCC*) koje se nalazi na sekvenci integracionog mesta (Leclercq, 2009; Hiramatsu i sar., 2013).

Stafilokokne hromozomske kasete (SCCs) su relativno veliki fragmenti DNK, koji se uvek ubacuju u *orfX* gen na hromozomu *S. aureus* i mogu nositi determinante za rezistenciju na antibiotike i/ili virulenciju. Mnoge stafilokokne hromozomske kasete prenose *mecA* gen, pa se SCCs mogu podeliti u stafilokokne hromozomske kasete *mec*

(SCC*mec*) i stafilokokne hromozomske kasete koje nemaju *mec* gen (non SCC*mec*) (Malachowa, DeLeo, 2010).

Prvi element SCC*mec* je otkriven kod pre-MRSA soja N315 1999. godine. Pre-MRSA predstavlja soj *S. aureus* koji je osetljiv na meticilin, ali poseduje *mecA* gen, kome je potisnuta ekspresija zbog prisustva intaktnog *mecI* gena. Element SCC*mec* sadrži kompleks *mec* gena (*mecA* gen i njegove regulatore), kompleks *ccr* gena koji kodira rekombinaze (Ito i sar., 2004) *ccrAB* i *ccrC* i povezuju i region J (joining, ranije junkyard). Rekombinaze su odgovorne za integraciju i eksciziju SCC*mec* koje se dešavaju na specifičnom mestu (*attB*SCC) (Leclercq, 2009) u hromozomu *S. aureus* na 3' kraju *orfX* (Malachowa, DeLeo, 2010).

Geni koji kontrolišu ekspresiju *mecA* gena su *mecR1* koji kodira protein MecR1 (prenosilac signala) i *mecI* koji kodira protein MecI (represor) (IWG-SCC, 2009). Oba proteina se odvojeno prepisuju. U odsustvu laktamskih antibiotika, MecI sprema transkripciju *mecA* gena i *mecR1-mecI*. U prisustvu laktamskog antibiotika, MecR1 se autokatalitički cepa i domen metalo-proteaze na citoplazmatskom delu MecR1 se aktivira. Metalo-proteaza cepa vezu između u MecI i operatorskog regiona *mecA*, što omogućava transkripciju *mecA* gena i, kao rezultat toga, produkciju PBP2a. Neke insercione sekvence se mogu umetnuti i izazvati delecije u *mecI* i *mecR1*, što dovodi do aktivacije *mecA* gena (Deurenberg i sar., 2007).

Elementi SCC*mec* su veoma različiti u strukturnoj organizaciji i sadržaju gena i klasifikovani su u tipove i podtipove. Podtipovi SCC*mec* se definišu prema prisustvu specifičnih sekvenci koje se nalaze u J regionima, uključujući i karakteristične gene, pseudogene ili nekodirajuće regione u J regionima, izuzev mobilnih genetičkih elemenata; i mobilne genetičke elemente, kao što su insercione sekvence, plazmidi i transpozoni, od kojih većina nosi determinante odgovorne za rezistenciju i neke druge osobine. Postoje tri J regiona koji nisu esencijalne komponente kasete (IWG-SCC, 2009).

Stafilokokna hromozomska kasete je osnovni mobilni genetički element koji služi kao sredstvo za razmenu gena između različitih vrsta stafilokoka, pa se može naći i kod CoNS (Ito i sar., 2004). Do danas je otkriveno 11 tipova SCC*mec* (Hiramatsu i sar., 2013).

Do pre nekoliko godina smatralo se da je *mecA* gen meticilin-rezistentnih stafilokoka, potekao od evolutivnog pretka *mecA* homologa (*pbpD* gena) koji imaju svi

sojevi vrste *S. sciuri* (Antignac i Tomasz, 2009). Kod *S. sciuri mecA* homolog obavlja normalne fiziološke funkcije, koje nisu povezane sa rezistencijom na meticilin. Sojevi *S. sciuri* koji su rezistentni na oksacilin imaju i *mecA* homolog i „pravi” *mecA* gen (*mecA* gen koji poseduju meticilin-rezistentne stafilokoke). Ipak, neki *S. sciuri* sojevi pokazuju prirodnu rezistenciju na oksacilin, koja je posredovana visokim stepenom transkripcije *mecA* homologa *S. sciuri* (Couto i sar., 2003; Stepanovi i sar., 2006; Antignac i Tomasz, 2009). Sekvenciranjem PCR produkata *mecA* homologa sojeva *S. sciuri*, *S. vitulinus* i *S. fleurettii* detektovana je nukleotidna sekvenca, koja sa *mecA* genom soja MRSA N315 ima sličnosti 86%, 94% i 99%-100%, pa se danas smatra da je *mecA* gen potekao od *S. fleurettii* (Tsubakishita i sar., 2010).

Rezistencija na meticilin može biti homogena i heterogena. Opisane su 4 klase MRSA na osnovu ekspresije rezistencije na meticilin. Prva klasa je ekstremno heterogena, gde samo 1 soj u 10^8 - 10^9 pokazuje rezistenciju, a klasa IV je homogeno rezistentna i u njoj sve sojevi pokazuju rezistenciju (Hartman i Tomasz, 1986). Većina sojeva kod heterorezistentnih sojeva se čine osetljivim na niske, terapijske koncentracije leka. Zbog toga se smatra da su heterogeni sojevi sastavljeni od 2 bakterijske populacije: relativno osetljivih sojeva i visoko rezistentnih sojeva. Manji broj sojeva je homogeno rezistentan i tada su sojevi jednake u ekspresiji rezistencije, pa mogu da rastu u prisustvu visokih koncentracija leka, što znači da su homogeno rezistentni sojevi sastavljeni samo od jedne populacije sojeva, kada su sve sojevi visoko rezistentne na meticilin (Chambers, 1988).

U 2011. godini je objavljeno da je detektovano prisustvo novog gena kod sojeva MRSA. U pitanju su bili sojevi MRSA poreklom od goveda i ljudi koji su nosili do tada nepoznat element *SCCmec*, koji nije mogao biti detektovan molekularnim testovima koji se koriste za identifikaciju sojeva MRSA. Novi gen je nazvan *mecA_{LGA251}*, a sojevi koji su nosili ovaj gen bili su rezistentni na penicilin, cefoksitin i oksacilin, a osetljivi na druge antibiotike. Sojevi MRSA LGA251 su bili negativni na prisustvo PBP2a primenom lateks aglutinacionog testa i kod njih nije detektovan *mecA* gen i prisustvo regiona *SCCmec* (*SCCmec-orfX*) primenom metode PCR. Poređenje PBP2a koji kodira *mecA_{LGA251}* sa PBP2a koje kodiraju ostali *mecA* homologi je ukazalo da je PBP2a koji kodira *mecA_{LGA251}* druga vrsta u odnosu ostale. Gen *mecA_{LGA251}* je deo kompleksa *mecI-mecR1-mecA-blaZ* koji ima drugačiju orijentaciju elementa *SCCmec*. Otkriven je novog

mecA homologa je ukazalo na činjenicu da je fenotipsko testiranje osjetljivosti stafilokoka na oksacilin i cefoksitin od suštinskog značaja za detekciju sojeva MRSA. Ukoliko bi se koristile samo lateks aglutinacija za utvrđivanje prisustva PBP2a i/ili metoda PCR za detekciju *mecA* gena, sojevi LGA251 ne bi mogli biti detektovani (García-Álvarez i sar., 2011). Novi *mecA*_{LGA251} gen je preimenovan u *mecC* gen (Ito i sar., 2012).

Sojevi koji poseduju *mecC* gen imaju zoonotski potencijal. Kod ljudi izazivaju infekcije kože i mekih tkiva, ali mogu izazvati i druge infekcije, kao što su infekcije kostiju, nozokomijalne pneumonije i bakterijemije. Kod životinja je utvrđeno prisustvo sojeva *S. aureus* koji poseduju *mecC* i to kod krava sa mastitisom, kod koza, (Petersen i sar., 2012) kod mačke sa hroničnim konjunktivitisom (Medhus i sar., 2013) i kod zečeva. Gen *mecC* je otkriven kod *S. stepanovicii* i kod *S. sciuri*, pa je moguće i da *mecC* potiče od koagulaza-negativnih stafilokoka (Paterson i sar., 2014). Izolati *S. aureus* koji poseduju *mecC* gen su ranije bili identifikovani kao *S. aureus* granino rezistentan na oksacilin (BORSA) ili modifikovani *S. aureus* (MODSA) (Petersen i sar., 2012).

Prisustvo *mecA* gena je prvo otkriveno kod soja MRSA N315, da bi kasnije bilo detektovano prisustvo *mecA* gena koji se nalazi na elementu SCC*mec* i kod sojeva *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* i *S. fleurettii*. Kod ovih vrsta je utvrđeno prisustvo *mecA* gena čija sekvenca ima preko 98% sličnosti sa sojem MRSA N315, koji predstavlja prototip. Prvi *mecA* homologi koji su različiti od prototipa su otkriveni kod sve tri podvrste *S. sciuri*. Ovi homologe se međusobno malo razlikuju, a njihovi *mecA* geni imaju nukleotidnu sekvencu koja ima oko 80% sličnosti sa sojem MRSA N315. Druga grupa *mecA* homologa koja ima 90% sličnosti sa nukleotidnom sekvencom MRSA N315 je identifikovana kod vrste *S. vitulinus*. Treća grupa *mecA* homologa se nalazi na hromozomu i plazmidima *Macrococcus caseolyticus* i *mecA* gen koji se nalazi kod ovog homologa ima nukleotidnu sekvencu koja ima 62% sličnosti sa sekvencom *mecA* MRSA N315. Ovaj *mecA* homolog je nazvan *mecB*. Četvrti *mecA* homolog je identifikovan kod soja *S. aureus* LGA251, koji ima sličnost sa sekvencom soja MRSA N315 69%. Kao što je već utvrđeno, ovaj homolog je nazvan *mecC*. Geni *mecA* koji imaju sličnost sekvence preko 95% sa MRSA N315 se označavaju kao *mecA* geni, što znači da su članovi grupe alotipova koju predstavlja MRSA N315. Homolog *mecA*

gena *S. sciuri* se označava kao *mecA1*, a homolog *mecA* gena *S. vitulinus* se označava kao *mecA2* (Ito i sar., 2012).

2.4.1.2.1. Rezistencija na meticilin kod stafilokoka izolovanih od ljudi

Oko 50% ljudi u opštoj populaciji je kolonizovano vrstom *S. aureus*, ali je, prema podacima koje je dao CDC (Centers for Disease Control and Prevention, SAD), samo 1,5% populacije kolonizovano sojevima MRSA (Doyle i sar.2012). Zdravi ljudi mogu stalno ili povremeno biti kolonizovani sojevima MRSA, a kolonizacija predstavlja najveći i rizik za nastanak infekcije. Infekcije izazvane sojevima MRSA mogu biti različitog intenziteta, od blagih do ozbiljnih i fatalnih. Danas se MRSA smatra glavnim uzrokom nosokomialnih infekcija u mnogim zemljama Evrope, sa velikom razlikom u prevalenciji. Kontrolne mere koje se sprovode u sprečavanju širenja sojeva MRSA se veoma razlikuju od zemlje do zemlje (EFSA, 2009).

Sojevi MRSA nastali u bolnicama (HA-MRSA, hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ili healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) su se pojavili tokom šezdesetih godina XX veka u nekim bolničkim ustanovama, ali su se raširili van bolnica u kojima su nastali tokom osamdesetih i devedesetih godina XX veka. Kolonizovani pacijenti i bolničko osoblje su glavni rezervoar ovih sojeva MRSA, ali i bolnička sredina takođe može biti kontaminirana. Pacijenti u bolnicama su u posebnom riziku od infekcija sojevima MRSA, naročito ako su imunokompromitovani ili ako imaju oštećenja kože (operacije, rane, opekotine, kateteri itd.), ako su bili pod terapijom antibioticima i ako su kolonizovani sojevima MRSA. U zemljama koje endemski imaju HA-MRSA, ovi sojevi se u velikom broju slučajeva mogu naći i van bolnice kod pacijenata otpuštenih iz bolnice, kao i kod pacijenata na vanbolničkom, odnosno ambulantnom lečenju, kod bolničkog osoblja, kao i kod njihovih ljubimaca. Oni mogu postati rezervoar infekcije, pa u nekim regionima, značajan procenat pacijenata ulazi u bolnice već inficiran sojevima HA-MRSA, kojima su se mogli zaraziti u opštoj populaciji (EFSA, 2009).

Sojevi HA-MRSA su vrlo esto rezistentni na ve inu antibiotika, osim na vankomicin. Od novijih lekova sojevi HA-MRSA su osetljivi na linezolid, daptomicin i tigeciklin, ali postoje ograni enja u njihovoj upotrebi (EFSA, 2009).

Klonovi MRSA nastali van bolni kih ustanova su se pojavili u opštoj populaciji (CA-MRSA, community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ili community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), brzo su se proširili unutar zajednice i izazivaju infekcije kod pacijenata koji nisu bili hospitalizovani ili nisu bili podvrgnuti invazivnim procedurama (operacijama, dijalizi, nošenju katetera ili perkutanih medicinskih ure aja) (Leclercq, 2009). Prisustvo CA-MRSA je prvi put zabeleženo na zapadu Australije tokom 1993. godine kod Aboridžina koji su živeli u udaljenoj zajednici i nisu imali nikakve poznate faktore rizika za kolonizaciju i nikakav prethodni kontakt sa zdravstvenim sistemom (Deurenberg i sar., 2007; Boucher i Corey, 2008). Sojevi CA-MRSA su uzro nici infekcija koje imaju specifi nu klini ku sliku. Izazivaju infekcije kože i mekih tkiva, kao na primer ireve, kod prethodno zdravih osoba i kod mladih ljudi. Poseduju gene za Panton Valentin leukocidin (PVL) i imaju kratak SCC*mec* element (tip IV ili V). Sojevi CA-MRSA u bolnice ulaze kroz odeljenja urgentne medicine. Ovi sojevi su odgovorni za zna ajan broj fatalnih infekcija u pedijatriji. Rezervoar CA-MRSA predstavljaju zdravi ljudi koji su bili izloženi MRSA sojevima, kod kojih se sojevi CA-MRSA nalaze u nosu. Klonovi CA-MRSA koji poti u iz SAD nisu rasprostranjeni širom Evrope. U Evropi postoje evropski klonovi CA-MRSA, a incidencija infekcija izazvanih ovim sojevima je niska (EFSA, 2009). U SAD sojevi CA-MRSA su u ve em procentu uzro nici infekcija u opštoj populaciji od sojeva meticilin-osetljivog *S. aureus*. Ve ina infekcija u SAD je izazvana klonom CA-MRSA koji se ozna ava kao USA300 (ST8 - sekvenca tipa 8). Ovaj klon je u bolnicama zamenio HA-MRSA sojeve, što predstavlja opasnost, jer je populacija hospitalizovanih pacijenata ve oslabljena, pacijenti su starije životne dobi, pa infekcije kod njih mogu biti mnogo teže. Tropizam koji CA-MRSA ima za kožu olakšava diseminaciju sojeva. U Evropi je zastupljen klon CA-MRSA ST80 i njegova prevalencija je razli ita u razli itim zemljama. Klon ST80 u odnosu na USA300 ima manji potencijal za diseminaciju (Leclercq, 2009).

Identifikovani su brojni faktori rizika za kolonizaciju sojevima CA-MRSA. To su: gastrointestinalna oboljenja; intravensko uzimanje droge; direktan kontakt sa osobama

koje imaju kožne infekcije izazvane sojevima CA-MRSA; kontakt sa kontaminiranim objektima, kao što su zajednički sapuni i peškiri u sportskim objektima i zatvorima; kao i blizak kontakt između vojnih regruta. Tako se smatra da skorašnja upotreba lekova koji ne pripadaju antibioticima, predstavlja faktor rizika za kolonizaciju sojevima CA-MRSA (Deurenberg i sar., 2007).

Suprotno sojevima HA-MRSA, sojevi CA-MRSA su retko multirezistentni, pa su osetljivi na klindamicin, tetracikline, fluorohinolone i sulfametoksazol/trimetoprim (EFSA, 2009).

U nekim evropskim zemljama (Holandiji, Finskoj, Norveškoj, Švedskoj i Danskoj) infekcije izazvane sojevima MRSA kod ljudi su sporadične, što je rezultat niskog selektivnog pritiska antibiotika i striktno strategije „pronađi i uništi“. Efikasnije procedure dezinfekcije i vodiči za higijenu ruku su delimično doprineli smanjenju širenja sojeva MRSA u bolničkoj sredini. Danska je, nakon uvođenja navedenih mera, prevalenciju sojeva MRSA smanjila sa 30% na manje od 1% (Deurenberg i sar., 2007).

Tokom sedamdesetih godina XX veka je postalo jasno da je rezistencija na meticilin kod CoNS mnogo rasprostranjenija, nego kod *S. aureus*. Tokom sedamdesetih i početkom osamdesetih godina XX veka, multirezistencija kod CoNS je prvo prijavljivana u slučajevima infekcija koje su bile povezane sa različitim implantatima, a posebno sa endokarditisom većih ventila. U grupi izolata *S. epidermidis* koji su bili uzročnici infekcija povezanih sa upotrebom implantata, 56% izolata je bilo rezistentno na meticilin, a 70% na cefoksitin (John i Harvin, 2007).

Staphylococcus epidermidis i *S. haemolyticus* su važni uzročnici infekcija koje su povezane sa upotrebom različitih materijala (katetera, braunila, implantata i dr) u medicini, a uz to su i rezistentne na veliki broj antibiotika. Smatra se da su CoNS na prvom mestu kao uzročnici infekcija krvi. Rezistencija na antibiotike je uobičajena kod *S. epidermidis*, a kod *S. haemolyticus* je još veća i kod obe vrste je prijavljena rezistencija na glikopeptidne antibiotike, koja je obično udružena sa rezistencijom na meticilin (Leclercq, 2009).

Nekoliko zapažanja podržava hipotezu da se transfer gena rezistencije na meticilin odigrava između koagulaza-negativnih stafilokoka i *S. aureus*. Prvo, jedna studija je pokazala da je na tri kontinenta kod ljudi iz nosa izolovan veliki broj

meticilin-rezistentnih koagulaza-negativnih stafilokoka (11-31%). Druga studija je pokazala da se kod odre enog broja ljudi u nosu uz meticilin-osetljiv *S. aureus* nalaze i meticilin-rezistentne CoNS, što ukazuje da prilike za transfer *mecA* gena nisu tako retke. Molekularne studije su dokazale transfer *mec* kasete izme u razli itih vrsta stafilokoka, pa je tako SCC*mec* tip IV koji je široko rasprostranjen me u sojevima MRSA, naj eš i tip kod *S. epidermidis*. Nukleotidna sekvenca SCC*mec* je kod obe vrste bila identi na. Kod sojeva *S. epidermidis* postoji ve i diverzitet SCC*mec* nego kod sojeva *S. aureus*, što zna i da sojevi *S. epidermidis* predstavljaju rezervoar razli itih SCC*mec* tipova koji bi se mogli preneti na *S. aureus* i druge vrste stafilokoka (Leclercq, 2009).

Površine i oprema u zdravstvenim ustanovama mogu biti kontaminirane sojevima MRSA duži period. Klon CA-MRSA USA 300 inokulisan na razli ite materijale (peškire, posteljinu, keramiku, drvo, vinil i plastiku) je preživio duži period i mogao se preneti do 8 nedelja. Transmisija se smanjivala kada su u pitanju bile porozne površine. Sojevi HA-MRSA imali su manji stepen transmisije sa materijala (Doyle i sar.,2012).

2.4.1.2.2. Rezistencija na meticilin kod stafilokoka izolovanih od životinja

Izolacija soja MRSA od životinja je prvi put zabeležana 1972. godine iz mleka krave sa mastitisom (Kluytmans, 2010). Soj MRSA povezan sa ljudima prvi put je opisan kod ku nih ljubimaca u Nigeriji 1972. godine (Doyle i sar., 2012). Od tada, sojevi MRSA su izolovani od razli itih vrsta životinja, uklju uju i pse, ma ke, konje, ovce, svinje, mle ne krave, telad i živinu (Kluytmans, 2010).

U Evropi, zna ajna kategorija MRSA su sojevi MRSA povezani sa životinjama koje se gaje za ishranu ljudi (LA-MRSA, livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). LA-MRSA ST398 ili CC398 (ST398, multilokus sekvenca tipa 398 ili clonal complex 398) je prvi put opisan kod svinja u Holandiji 2003.godine (Doyle i sar., 2012). Kod ljudi se CC398 retko nalazi, osim kod ljudi zaposlenih na farmama svinja. Klonalni kompleks 398 dominira kod svinja, ali se može na i i kod teladi i živine, zbog ega je MRSA proglašen zoonotskim patogenom (Kluytmans, 2010). Rezervoar LA-MRSA su nozdrve i druga vlažna mesta na telu životinja, kao i kontaminirana mesta za smeštaj životinja i okolina. Klon CC398 MRSA je povezan sa asimptomatskom

kolonizacijom kod životinja koje se drže u uslovima intenzivnog uzgoja, a namenjene su za ishranu ljudi. Obrazac rezistencije MRSA CC398, pokazuje u 100% slučajeva rezistenciju na tetracikline, zatim u visokom procentu rezistenciju na trimetoprim (ali ne i na sulfametoksazol/trimetoprim), makrolide, linkozamide, aminoglikozide, kao i na fluorohinolone (EFSA, 2009).

U Evropskoj Uniji (EU) samo mali procenat od ukupnog broja zabeleženih slučajeva infekcija čiji je uzročnik MRSA je izazvan sojevima MRSA povezanim sa životinjama koje se gaje za ishranu ljudi. Ipak, ovaj broj se razlikuje između država članica EU, pa u nekim zemljama sa niskom prevalencijom infekcija kod ljudi čiji je uzročnik MRSA, klon CC398 najviše doprinosi ukupnom broju infekcija, dok je u zemljama sa visokom prevalencijom infekcija izazvanih sojevima MRSA kod ljudi, klon CC398 od manjeg značaja za javno zdravlje. Iako retko, klon CC398 se dovodi u vezu sa dubokim infekcijama kože i mekih tkiva, pneumonijama i septikemijama kod ljudi. Tamo gde je prevalencija klona CC398 visoka kod životinja koje se gaje za ishranu ljudi, ljudi u kontaktu sa živim životinjama (posebno farmeri i veterinari, kao i njihove porodice) su u većem riziku od kolonizacije i infekcije, nego opšta populacija (EFSA, 2009).

Klinička stanja do kojih MRSA može dovesti kod životinja obuhvataju infekcije kože, postoperativne infekcije, infekcije rana, respiratorne infekcije i, retko, septikemije (EFSA, 2009).

Prema podacima iz literature, iz mleka krava se retko izoluje MRSA. Međutim, poslednjih godina se sporadično izoluju sojevi MRSA i ostale stafilokoke od goveda, koje imaju sličnosti sa izolatima poreklom od ljudi, što daje obrazloženje za monitoring nad pojavom MRSA kod goveda (Pinto Ferreira i sar., 2012).

Postoji razlika u prevalenciji sojeva MRSA dobijena na osnovu rezultata studija koje su sprovedene u SAD i u Evropi. U SAD je zabeležena mala prevalencija rezistencije na meticilin u mleku krava, dok je u Evropi zabeležen porast prevalencije sojeva MRSA. Razlike u prevalenciji detektovane u studijama koje su sprovedene u SAD i Evropi bi mogle da budu posledica drugačijih poljoprivrednih sistema. U Evropi je gajenje domaćih životinja tradicionalno, jer su u pitanju uglavnom porodične farme, na kojima u isto vreme ima više vrsta domaćih životinja, što olakšava prenos genetičkog materijala između različitih vrsta bakterija poreklom od različitih vrsta životinja, dok su u

SAD ve a stada i gajenje je više industrijalizovano. Promet goveda je ve i u SAD nego u Evropi, gde se krave tradicionalno duže gaje. S druge strane, u nekim zemljama u Evropi postoji nacionalni nadzor nad životinjama, što može objasniti ve u prevalenciju u Evropi (Pinto Ferreira i sar., 2012).

Ve i broj *mecA* pozitivnih izolata, kao i ve i broj razli itih vrsta stafilokoka je prona en na farmama koje imaju veliku potrošnju antibiotika. U jednom istraživanju koje je sprovedeno na svinjama na razli itim farmama, me u izolovanim vrstama iz noseva svinja najve i broj izolata je pripadao vrsti *S. aureus*, zatim vrstama *S. cohnii*, *S. haemolyticus* i *S. epidermidis*. Tako e je zapaženo prisustvo istih vrsta geneti ki srodnih stafilokoka u brisevima noseva i uzorcima prašine sa farmi. Izolacija razli itih vrsta stafilokoka iz noseva svinja ukazuje da se kolonizacija meticilin-rezistentnim stafilokokama odigrava u nosu, što može stvoriti uslove za potencijalni horizontalni transfer gena (Tulinski i sar., 2012).

Psi i ma ke predstavljaju potencijalni izvor za širenje gena rezistencije, zbog prekomerne upotrebe antibiotika kod ovih životinja i njihovog bliskog kontakta sa ljudima. Broj pasa i ma aka se zna ajno pove ao u modernom društvu, pa se smatra da ih u zemljama EU ima preko 70 miliona. Promenile su se i navike ljudi u odnosu na ove životinje, koje su sve eš e u ku ama, a manje u dvorištima, pa su ljudi u mnogo bližem kontaktu sa životinjama. Meticilin-rezistentne stafilokoke su izolovane i od zdravih i od bolesnih pasa i ma aka (Guardabassi i sar., 2004).

Psi i ma ke su esto izvori i prenosioci rekurentne kolonizacije i rekurentnih infekcija na ljude sa kojima su u kontaktu. Sojevi MRSA izolovani od pasa i ma aka uglavnom imaju geneti ke karakteristike sojeva poreklom od ljudi. Ponekad se od pasa i ma aka izoluje klon LA-MRSA CC398, koji se prenosi od ljudi, obi no veterinara. Kod pasa i ma aka koji žive na farmama svinja je tako e detektovano prisustvo sojeva MRSA (Crombé i sar., 2013).

Zabeleženo je više slu ajeva prenošenja sojeva MRSA izme u ljudi i pasa (van Duijkereen i sar., 2004b; Rutland i sar., 2009) i ljudi i ma aka (Weese i sar., 2006).

Staphylococcus (pseud)intermedius se ranije smatrao osetljivim na -laktamske antibiotike, ali se rezistencija na meticilin kod ove vrste sve eš e prijavljuje. *Staphylococcus pseudintermedius* rezistentan na meticilin je izolovan od zdravih i

bolesnih pasa i ma aka i od ljudi. Smatra se da ova vrsta ima manji potencijal da kolonizuje ljude nego *S. aureus* (Weese i Duijkeren, 2010). U Danskoj su od pasa izolovane meticilin-rezistentne CoNS i to *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* i *S. sciuri*. Kod ve ine pomenutih vrsta je utvr ena multirezistencija (Bagcigil i sar., 2007).

2.4.1.2.3. Rezistencija na meticilin kod stafilokoka izolovanih iz namirnica životinjskog porekla

Le enje životinja antibioticima ili upotreba antibiotika kao dodataka ishrani dovodi do selekcije bakterija otpornih na antibiotike, što favorizuje transfer gena rezistencije izme u razli itih vrsta stafilokoka. Takve bakterije mogu kontaminirati mleko ili meso nakon ega se mogu na i u fermentisanim namirnicama koje su napravljene od kontaminiranih sirovih materijala (Perreten i sar., 1998).

Smatra se da najve i rizik za prenošenje sojeva MRSA poreklom od životinja koje se koriste za ishranu ljudi na ljude predstavlja direktan ili indirektan kontakt izme u inficiranih životinja i ljudi ije su profesije vezane za rad sa životinjama, a ne namirnice. Prema tome, kontrolisanje prisustva MRSA u mesu koje potie od životinja kod kojih je prevalencija sojeva MRSA zna ajna može se obavljati na dobrovoljnoj osnovi, pošto e potroša najverovatnije biti izložen sojevima MRSA preko namirnica. Monitoring nad sirovim mlekom i proizvodima od sirovog mleka se tako e obavlja na dobrovoljnoj osnovi (EFSA, 2012).

Sojevi MRSA su otkriveni u sirovom mesu (svinjetini, piletini i govedini) i sirovom mleku u razli itim zemljama. Izolati su naj eš e pripadali sojevima HA- i CA-MRSA što je ukazivalo na ljude kao rezervoar bakterija. Zabeležene su dve epidemije izazvane sojevima MRSA koji su se našli u namirnicama (Doyle i sar., 2012). Tako e je utvr eno prenošenje sojeva MRSA prilikom obrade svinjskog mesa kontaminiranog ovim sojevima na noževe i daske za se enje, što omogu ava dalju kontaminaciju namirnica koje nisu primaran izvor sojeva MRSA (Doyle i sar., 2012).

U jednom istraživanju, u kojem su koriš ene tehnike molekularne tipizacije, je utvr en visok stepen klonalne povezanosti izme u sojeva *S. aureus* koji su poticali iz razli itih uzoraka mesa poreklom iz istog maloprodajnog objekta, što ukazuje na ukrštenu

kontaminaciju u nekom trenutku tokom obrade uzoraka u objektu. U maloprodajnim objektima MRSA se esto može na i u mesu, što nosi rizik od diseminacije sojeva MRSA u populaciji (Kluytmans, 2010).

Smatra se da sojevi MRSA ne nose ve i rizik od sojeva MSSA za trovanje hranom i da klon ST398 retko ima gene za produkciju toksina. Ingestija kontaminirane hrane retko dovodi do razvoja invazivne bolesti. Potencijalni rizik koji nose namirnice kontaminirane sojevima MRSA je kolonizacija tokom obrade ili konzumiranja nedovoljno termi ki obra ene hrane, što zavisi od higijenskih mera, broja MRSA u uzorku i sposobnosti soja da kolonizuje domaćina (Kluytmans, 2010).

Sojevi CoNS izolovani iz sireva, suhomesnatih proizvoda i ribe u Poljskoj su ve inom bili rezistentni na cefoksitin i kod tih sojeva je utvr eno prisustvo *mecA* gena (Chaj cka-Wierzchowska i sar., 2015). Sojevi vrsta iz *S. sciuri* grupe koji su rezistentni na meticilin se esto izoluju iz namirnica životinjskog porekla (Bhargava i Zhang, 2014).

2.5. Rezistencija stafilokoka na makrolide, linkozamide i streptogramine

Makrolidi, linkozamidi i streptogramin B ine grupu antibiotika pod nazivom MLS_B. Eritromicin, kao prvi predstavnik makrolidnih antibiotika je uveden u klini ku praksu 1953. godine. Ve 1957. godine su iz krvi izolovani prvi sojevi *S. aureus* rezistentni na eritromicin (Oliveira i sar., 2002). Antibiotici iz grupe MLS_B deluju na 50S subjedinicu bakterijskog ribozoma, dovode i do inhibicije sinteze proteina. Kako je odre eni broj ljudi alergičan na penicilin, ova grupa antibiotika je pružala alternativno rešenje za le enje infekcija izazvanih stafilokokama. Kod *S. aureus*, postoje dva tipa rezistencije na antibiotike iz grupe MLS_B. Prvi tip rezistencije je rezultat modifikacije ribozoma zbog delovanja 23S rRNK metilaza, koje su primarno posredovane *ermA*, *ermB* i *ermC* genima (koji se nalaze na plazmidima ili hromozomima), koje spre avaju vezivanje antibiotika za ciljno mesto na ribozomu. Drugi tip rezistencije je posredovan *msrA* genom, pa dolazi do aktivnog efluksa antibiotika ATP-zavisnom pumpom i održavanjem smanjene koncentracije leka ispod nivoa koji je potreban da bi došlo do vezivanja za ribosome (Schito, 2006). Metilacija rRNK dovodi do ukrštene rezistencije na makrolide, linkozamide i streptogramin B, koja može biti konstitutivna ili inducibilna

(Weisblum, 1985). Rezistencija visokog stepena na MLS_B antibiotike može biti indukovana subinhibitornim koncentracijama eritromicina (Matsuoka i sar., 2002).

Stafilokoke koje su rezistentne na makrolidne antibiotike, ali su osjetljive na klindamicin, proizvode Erm ribozomalne metilaze koje dovode do pojave inducibilnog MLS_B fenotipa ili kod njih dolazi do ekspresije efluks pumpi. Kada je u pitanju pojava inducibilne MLS_B rezistencije, konstitutivno rezistentni mutanti mogu biti selektovani upotrebom klindamicina. Kada je u pitanju rezistencija posredovana efluks pumpama, rizik od selekcije mutanata koji su rezistentni na klindamicin nije veći i od rizika za selekciju rezistentnih mutanata kod izolata koji su osjetljivi na eritromicin. Kod stafilokoka sa inducibilnom MLS_B rezistencijom su prijavljeni terapijski uspjesi i neuspjesi kod lečenja klindamicinom. Primenom disk difuzione metode inducibilni MLS_B fenotip se može uočiti zaravnjenjem zone inhibicije oko dela diska klindamicina koji je okrenut prema eritromicinu. Ako se primenom ove metode uočiti i pojava zaravnjenja zone klindamicina prema eritromicinu, prijavljuje se rezistencija na klindamicin, ali se izolat može prijaviti i kao osjetljiv na klindamicin, uz izdavanje upozorenja da može doći do pojave rezistencije na klindamicin tokom terapije, pa je primenu klindamicina najbolje izbeći i kada su u pitanju ozbiljne infekcije. Rezistencija na klindamicin povezana sa rezistencijom na eritromicin ukazuje na postojanje konstitutivnog tipa MLS_B rezistentnog fenotipa. Ukrštena rezistencija na streptogramin B prouzrokuje smanjenje baktericidne aktivnosti kombinacije kvinupristin-dalfopristin. Ukoliko se utvrdi da je izolat rezistentan na klindamicin, onda se izdaje upozorenje da je baktericidna aktivnost kombinacije kvinupristin-dalfopristin redukovana (Leclercq i sar., 2013).

2.5.1. Rezistencija stafilokoka na aminoglikozide

Streptomycin, kao prvi predstavnik aminoglikozidnih antibiotika je u kliničku praksu uveden 1948. godine. Već 1957. godine, iz krvi pacijenata su izolovani prvi sojevi *S. aureus* rezistentni na streptomycin (Oliveira i sar., 2002). Aminoglikozidni antibiotici deluju na bakterijsku ćeliju tako što se vezuju za jedno ili više mesta na ribozomu dovodeći do inhibicije sinteze proteina. Rezistencija na aminoglikozide kod stafilokoka je rezultat jednog od sledećih događaja: 1) hromozomske mutacije koja dovodi do promene

u vezivanju aminoglikozida za ribosome, 2) nedovoljno efikasnog transporta aminoglikozida u bakterijsku celiju, što dovodi do ukrštene rezistencije niskog stepena na većinu aminoglikozida i 3) enzimske modifikacije aminoglikozida. U poslednjem slučaju, rezistentni sojevi poseduju aminoglikozid-modifikujuće gene *aac*, *aph* i *ant* koji kodiraju stvaranje aminoglikozidnih acetiltransferaza, fosfotransferaza i adeniltransferaza. Aminoglikozidi koji su prošli acetilaciju, fosforilaciju i adenilaciju se ne vezuju za ribosome, pa tako ne inhibiraju sintezu proteina. Aminoglikozidne antibiotike ne bi trebalo koristiti kao jedine lekove u terapiji stafilokoknih infekcija, već obavezno u kombinaciji sa drugim antibioticima, jer se tako smanjuje mogućnost pojave rezistencije na ovu klasu antibiotika (Schito, 2006).

Rezistencija na gentamicin je najčešće prouzrokovana stvaranjem bifunkcionalnog enzima APH (2')-AAC (6) koji dovodi do gubitka sinergizma svih aminoglikozida (osim streptomicina i arbekacina) sa β -laktamskim i glikopeptidnim antibioticima, bez obzira na vrednosti MIK (Minimalna Inhibitorna Koncentracija). Ako je izolat rezistentan na gentamicin, onda se prijavljuje rezistencija na sve aminoglikozide (Leclercq i sar., 2013).

2.5.2. Rezistencija stafilokoka na hinolone

Iako su u kliničku praksu hinoloni uvedeni tokom osamdesetih godina XX veka za lečenje infekcija izazvanih gram-negativnim bakterijama, njihov spektar aktivnosti je pokrivaio i infekcije izazvane pneumokokama i stafilokokama. Primarno ciljno mesto za delovanje hinolona predstavlja DNK giraza bakterijske celije, bez koje nema replikacije DNK. Rezistencija na hinolone se kod stafilokoka javila vrlo brzo, posebno kod meticilin-rezistentnih sojeva, postepenim hromozomskim mutacijama. Ove mutacije su se pojavile u regionu koji određuje rezistenciju na hinolone na kompleksu enzim-DNK, smanjuju i afinitet hinolona za ciljana mesta (DNK girazu i topoizomerazu IV). Ciprofloksacin se često koristi u lečenju stafilokoknih infekcija, ali se često javljaju relapsi infekcija zbog pojave rezistencije na ove antibiotike (Schito, 2006).

Pojava makar jedne ciljane mutacije u *grlA* genu, dovodi do rezistencije stafilokoka na ofloksacin ili ciprofloksacin. Ukoliko se kod izolata detektuje pojava

rezistencije na ofloksacin ili ciprofloksacin, ali ne na levofloksacin ili moksifloksacin, onda se izdaje upozorenje da postoji rizik od razvoja rezistencije na hinolone tokom terapije hinolonima (Leclercq i sar., 2013).

2.5.3. Rezistencija stafilokoka na tetracikline

Tetraciklini su u kliničku praksu uvedeni 1950. godine, a prvi izolati *S. aureus* iz krvi koji su bili rezistentni na tetracikline su otkriveni 1957. godine (Oliveira i sar., 2002). Rezistencija na tetracikline se primarno zasniva na sticanju mobilnih *tet* i *otr* gena, koji štite ribosome tako što dovode do odvajanja tetraciklina od mesta na ribozomima za koja su vezani i odgovorni su za efluks antibiotika iz ćelije uz pomoć aktivnog transporta (Butaye i sar. 2003; Connell i sar., 2003). Oksitetraciklin, hlortetraciklin i tetraciklin se u veterinarskoj medicini koriste od pedesetih godina XX veka. Kod stafilokoka poreklom od životinja su otkrivena 4 gena odgovorna za rezistenciju na ovu grupu antibiotika. Gen koji se može naći i kod velikog broja različitih vrsta stafilokoka i koji je za njih uobičajen je *tet(K)*, jedan od gena koji kodira energetski-zavisan efluks tetraciklina uz pomoć membranskih proteina koji vrše zamenu protona za kompleks tetraciklin-katjon. Pored njega, po istom principu funkcioniše i *tet(L)* gen, koji je pronađen kod *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. lentus*, *S. sciuri* i *S. xylosus*. Oba gena kodiraju rezistenciju na tetraciklin, ali ne i na minociklin i nalaze se na malom prenosivom plazmidu, koji se povremeno može ugraditi u hromozom. Geni, kao što je *tet(M)*, kodiraju proteine citoplazme koji štite ribosome od delovanja tetraciklina i *in vivo* i *in vitro* i dovode do rezistencije na tetraciklin, doksicilin i minociklin. Gen *tet(M)* je lokalizovan na konjugativnom transpozonu i najčešće se može naći kod *S. intermedius*. Gen *tet(O)* se retko nalazi kod stafilokoka (Aarestrup, 2006).

2.5.4. Rezistencija stafilokoka na fenikole

Jedan od mehanizama rezistencije na hloramfenikol je enzimska inaktivacija hloramfenikola, koju izazivaju hloramfenikol acetiltransferaze, koje prenose acetilne grupe sa acetil-koenzima A na C3 poziciju molekula hloramfenikola, posle čega dolazi

do prenosa jedne acetilne grupe na C1 poziciju i prenosa druge acetilne grupe na C3 poziciju. Ovo dovodi do stvaranja monoacetilisanih ili diacetilisanih derivata hloramfenikola koji nisu u stanju da dovedu do inhibicije sinteze bakterijskih proteina. Kod stafilokoka, rezistencija na hloramfenikol je uglavnom posledica delovanja hloramfenikol acetiltransferaze tipa A, koju kodira *catA* gen koji se nalazi na plazmidu. Postoje 3 *catA* familije, od kojih su 2 otkrivene kod stafilokoka poreklom od životinja. Iako *catA* geni kodiraju rezistenciju na hloramefnikol, nisu geni rezistencije za florfenikol, fluorisani derivat hloramfenikola, koji je registrovan samo za upotrebu u veterini. Do sada su pronađena 2 različita gena koja kodiraju rezistenciju na florfenikol i hloramfenikol i to *fexA* koji se nalazi kod *S. lentus* i *cfr* gen koji se nalazi kod *S. sciuri*, koji kodira i rezistenciju na klindamicin (Aarestrup, 2006).

2.5.5. Rezistencija stafilokoka na sulfonamide i trimetoprim

Rezistencija na sulfonamide kod stafilokoka je rezultat mutacija na genu koji kodira dihidropteroat sintetazu, pa nastaje enzim koji ima nizak afinitet za sulfonamide.

Rezistencija na trimetoprim je posredovana *dfr* genima, koji kodiraju produkciju rezistentne dihidrofolat reduktaze, na koju trimetoprim ne može da deluje (Aarestrup, 2006).

2.5.6. Rezistencija stafilokoka na glikopeptide

Zbog širenja sojeva MRSA, glikopeptidi, najčešće vankomicin, a u poslednje vreme i teikoplanin, su postali glavna potpora za lečenje infekcija izazvanih sojevima MRSA. Vankomicin je u praksu uveden 1958. godine, ali su se prvi potpuno rezistentni sojevi *S. aureus* na vankomicin (VRSA) pojavili 2002. godine. Pre toga su izolovani intermedijarno osetljivi sojevi *S. aureus* (VISA), prvo u Japanu 1996. godine, a zatim i u mnogim drugim zemljama, što je izazvalo zabrinutost širom sveta. Kako je prošlo skoro 40 godina od uvođenja vankomicina i pojave sojeva VISA, a indukcija rezistencije *in vitro* je bila komplikovana, smatralo se da se rezistencija na vankomicin kod stafilokoka ne može razviti u bolnicama. Sojevi VRSA imaju efikasnije mehanizme za diseminaciju od

sojeva VISA. Smatra se da je rezistencija kod sojeva VISA rezultat promena u sintezi peptidoglikana, a da su sojevi VRSA stekli dodatnu rezistenciju konjugacijom plazmida koji su posedovali *vanA* operon poreklom od sojeva *Enterococcus faecalis* rezistentnih na vankomicin. Kod sojeva VRSA, rezistencija je izazvana promenom terminalnog peptida elijskog zida iz D-alanil-D-alanin u D-alanil-D-laktat, spre avaju i vankomicin da dovede do inhibicije sinteze elijskog zida. Sojevi VISA sintetišu ve e koli ine peptidoglikana i D-alanil-D-alanin je više izložen vezivanju vankomicina, koji zbog toga, kao i zbog pove ane gustine elijskog zida, nije sposoban da prodre do citoplazmatske membrane (Schito, 2006).

2.6. Metode za ispitivanje osetljivosti Staphylococcus vrsta na antibiotike

Fenotipska detekcija rezistencije na meticilin kod CoNS je problemati na zbog heterogene ekspresije *mecA* gena (Chambers, 1988; Swenson i Tenover, 2005; Stepanovi i sar. 2006., Join-Lambert i sar., 2007). Svaka od bakterijskih elija u populaciji može nositi geneti ku informaciju za rezistenciju, ali vrlo mali broj bakterija pokazuje fenotipsku rezistenciju. Heterogenost je mnogo eš a kod CoNS sojeva, nego kod sojeva *S. aureus* (Hussain i sar., 2000b; Yamazumi i sar., 2001). Grani ne vrednosti za MIK oksacilina su manje ta ne kada se primene na neke vrste CoNS, kao što je na primer vrsta *S. cohnii* (Hussain i sar., 2000b). Grani na vrednost MIK oksacilina 0,25 µg/ml za osetljivost je najbolji izbor za *S. epidermidis* (Tenover i sar., 1999), koji predstavlja naj eš e izolovanu vrstu od svih CoNS u bolnicama, ali kada su u pitanju druge CoNS sojevi esto pokazuju rezistenciju.

Grupa autora (Tenover i sar., 1999) je u SAD sprovela ispitivanje na 50 izolata CoNS poreklom od ljudi. Izolati su paralelno bili poslani u 11 laboratorija, a vršeno je ispitivanje njihove osetljivosti na oksacilin disk difuzionom metodom, mikrodilucionom metodom u bujonu i oksacilin skrining testom. Metoda PCR je koriš ena za detekciju *mecA* gena. Mikrotitracione plo e su pripremane u 2 laboratorije, a podloga (CAMHB) je poticala od 3 razli ita proizvo a a. Najve i problem su predstavljali lažno pozitivni rezultati, odnosno *mecA* negativni izolati CoNS (osim *S. epidermidis*), koji su bili rezistentni na oksacilin na osnovu rezultata dobijenih primenom mikrodilucione metode u

bujonu. Kod izolata *S. capitis*, kao i kod izolata nekih drugih vrsta koji su bili *mecA* negativni, dobijene su veće vrednosti MIK oksacilina od vrednosti MIK oksacilina dobijenih kod *mecA* negativnih izolata *S. epidermidis* i ti rezultati su bili uporedivi izmeđ u svih 11 laboratorija. Rezultati dobijeni primenom mikrodilucione metode u bujonu i disk difuzione metode su se većinom poklapali, ali su postojala neslaganja u odnosu na neke *mecA* negativne CoNS, izuzev *S. epidermidis*.

Ispitivanje koje je sprovedeno u SAD (Yamazumi i sar., 2001) na 123 izolata CoNS koji su poticali iz bolnica širom SAD je imalo za cilj da uporedi mikrodilucionu metodu u bujonu, MRSA Screen test za lateks aglutinaciju i PCR za utvrđivanje prisustva *mecA* gena. Kod 50 izolata vrednosti MIK oksacilina su se kretale od 0,25 do 4 µg/ml. Primenom PCR metode je kod 95 izolata detektovano prisustvo *mecA* gena. Od svih *mecA* pozitivnih stafilokoka, 30 izolata je primarno bilo negativno na prisustvo PBP2a primenom MRSA Screen testa, kada su rezultati očitavani nakon 3 minuta. Kada je trajanje reakcije aglutinacije produženo na 10 minuta, 26 izolata je bilo pozitivno. Za sve *mecA* pozitivne izolate vrednosti MIK oksacilina su iznosile 0,5 µg/ml primenom referentne mikrodilucione metode u bujonu. MRSA Screen je imao osetljivost od 95,7%, a specifičnost od 92,8%, dok je mikrodiluciona metoda u bujonu za ispitivanje osetljivosti na oksacilin imala osetljivost od 100% i specifičnost od 78,5%.

Test MRSA Screen je brz test (<1 h) i lak za izvođenje. Princip testa se zasniva na prisustvu lateks estica, koje su obložene monoklonskim antitelima usmerenim protiv PBP2a, koje specifično reaguju sa sojevima MRSA, izazivaju i vidljivu aglutinaciju. Upotreba MRSA Screen testa za detekciju PBP2a kod sojeva *S. aureus* je u mnogim istraživanjima evaluirana i utvrđeno je da je za ovu vrstu test vrlo senzitivan i specifičan (Yamazumi i sar., 2001). Opisana je i pouzdanost ovog testa kod različitih vrsta CoNS. Kada je kod ispitivanih izolata CoNS pre primene MRSA Screen testa vršena indukcija rezistencije na oksacilin, MRSA Screen testom je detektovano prisustvo PBP2a kod ispitivanih izolata CoNS. Suprotno ovome, samo 57,6% *mecA* pozitivnih izolata kod kojih prethodno nije izvršena indukcija rezistencije na oksacilin je dalo pozitivnu reakciju aglutinacije (Hussain i sar., 2000a). Takođe, opisana je i modifikacija metode, kada je umesto pune eze uzimana pet puta veća količina inokuluma, čime je povećana senzitivnost metode. Ovo bi se moglo objasniti heterogenom ekspresijom rezistencije,

koja je mnogo češća kod CoNS, nego kod *S. aureus*, pa bi veći inokulum bio potreban za poboljšanje detekcije PBP2a (Yamazumi i sar., 2001). Pri primeni MRSA Screen testa kod CoNS, vreme aglutinacione reakcije je produženo na 10 minuta, jer je nakon čitanja testa posle 3 minuta, kako je dato u uputstvu proizvođača, samo 68% izolata kod kojih je dokazano prisustvo *mecA* gena bilo pozitivno, pri čemu je senzitivnost testa bila 95,7%. Slabo pozitivna reakcija nekih izolata koja se javljala nakon 3 minuta se pojačavala sa produženjem trajanja aglutinacije (Yamazumi i sar., 2001).

U Brazilu je grupa autora (Ferreira i sar., 2003) ispitivala osetljivost na oksacilin kod izolata CoNS različitim metodama (disk difuzionom metodom, primenom agara sa dodatkom oksacilina, dilucionom metodom u agaru i E-testom), kao i prisustvo PBP2a i *mecA* gena. Primenom disk difuzione metode ispitivana je osetljivost na ciprofloksacin, klindamicin, hloramfenikol, tetraciklin, eritromicin, gentamicin, penicilin, vankomicin, sulfametoksazol/trimetoprim i neke druge antibiotike. Ispitana su ukupno 152 izolata CoNS koji su svrstani u 12 vrsta. Od ukupnog broja izolata, 103 su bila pozitivna na prisustvo *mecA* gena. Kod *mecA* pozitivnih izolata je utvrđena multirezistencija na antibiotike, dok su *mecA* negativni izolati bili uglavnom osetljivi na sve ispitivane antibiotike, osim na penicilin. Test MRSA Slidex je bio visoko osetljiv (97,1%) i visoko specifičan (98%), a osetljivost i specifičnost su porasle na 99% i 98%, kada su za MRSA Slidex test korišćene kolonije koje su se nalazile u okolini diska oksacilina i to za jedan izolat *S. epidermidis*. Od 103 *mecA* pozitivna izolata, PBP2a nije detektovan kod 3, a za jedan izolat je MRSA Slidex test dao lažno pozitivan rezultat, pa se test smatra pouzdanim za detekciju prisustva PBP2a, produkta *mecA* gena. Od 4 izolata *S. sciuri*, 3 izolata sa vrednostima MIK oksacilina ≤ 32 $\mu\text{g/ml}$ su bila *mecA* pozitivna, dok je jedan bio *mecA* negativan, PBP2a negativan, ali rezistentan na oksacilin prilikom ispitivanja disk difuzionom metodom i metodama za utvrđivanje vrednosti MIK oksacilina (diluciona metoda u agaru: MIK=0,75 $\mu\text{g/ml}$ i E-test: MIK=1 $\mu\text{g/ml}$). Od 103 *mecA* pozitivna izolata, primenom disk difuzione metode je utvrđena rezistencija na oksacilin kod 97, a od 49 *mecA* negativnih izolata, 4 su bila lažno rezistentna na oksacilin. Autori su zaključili da je disk difuziona metoda sa oksacilinom bila najmanje osetljiva od svih ispitivanih metoda (94,2%), što se slaže sa rezultatima drugih ispitivanja (Louie i sar., 2001).

U Kanadi je sprovedeno ispitivanje na 200 izolata CoNS poreklom iz uzoraka krvi, likvora, urina i drugih primarno sterilnih mesta (Louie i sar., 2001). Izolati su identifikovani pomoću ID32 STAPH sistema i pripadali su sledećim vrstama: *S. epidermidis* (108), *S. haemolyticus* (15), *S. capitis* (10), *S. simulans* (2), *S. cohnii* (1), *S. sciuri* (1) i drugim. Test MRSA Screen je modifikovan, pa je umesto pune eze od 1 µl, uzimana veća količina inokuluma (30-50 kolonija, u zavisnosti od veličine kolonija). Za sve izolate kod kojih je utvrđeno prisustvo *mecA* gena, vrednosti MIK oksacilina su iznosile 1 µg/ml (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. simulans*, *S. cohnii* i *S. sciuri*). Razlike u rezultatima dobijenim primenom PCR metode i mikrodilucione metode u bujonu sa oksacilinom su se javljale primarno kod CoNS, izuzev *S. epidermidis*, a najčešće kod *S. saprophyticus*. Kod jednog izolata *S. epidermidis* i jednog izolata *S. capitis*, koji nisu posedovali *mecA* gen, vrednosti MIK oksacilina su iznosile 4 µg/ml, pa bi se kod ovih izolata mogli otkriti neki drugi mehanizmi rezistencije, kao što su promene drugih penicilin-vezujućih proteina (Suzuki i sar., 1992). Kod *S. epidermidis* i većine drugih CoNS vrsta, MRSA Screen lateks aglutinacioni test je brz i tačno detektovao prisustvo PBP2a, odnosno rezistenciju na oksacilin posredovanu *mecA* genom. Autori su zaključili da za lateks aglutinacioni test nije potrebno indukovati rezistenciju oksacilinom, ako se upotrebi veća količina inokuluma. Disk difuziona metoda je od svih ispitivanih metoda imala najmanju osetljivost od 98%, a specifičnost od 62%, dok je mikrodiluciona metoda u bujonu bila 100% osetljiva i 60% specifična.

U Argentini je grupa autora (Corso i sar., 2004) ispitivala prisustvo PBP2a kod 100 izolata CoNS iz kliničkih uzoraka poreklom od ljudi. Pri izvođenju lateks aglutinacionog testa po preporukama proizvođača (3 puta zahvaćene kolonije ežom od 1 µl i očitavanje rezultata nakon 3 minuta), samo je 31 izolat od 54 *mecA* pozitivna izolata bio pozitivan na prisustvo PBP2a, dok je svih 46 *mecA* negativnih izolata bilo negativno na prisustvo PBP2a. Lateks aglutinacijom nisu detektovana 23 *mecA* pozitivna izolata, kod kojih su se vrednosti MIK oksacilina kretale od 1 do 128 µg/ml. Kada je vreme trajanja aglutinacije produženo sa 3 minuta na 6 i 15 minuta, osetljivost metode je porasla sa 57% na 76% i 83%. Međutim, 9 *mecA* pozitivnih izolata ni nakon 15 minuta nije bilo pozitivno na prisustvo PBP2a. Zatim je odabrano 5 izolata od ukupno 23, koja su prethodno, kada je metoda izvođena po preporuci proizvođača, bila negativna na

prisustvo PBP2a, pa su uzimani inokulumi na 3 na ina: ezom od 1 μ l kolonije su bile zahva ene 4, 5 i 6 puta, umesto 3 puta, kako preporu uje proizvo a testa. U ispitivanjima u kojima je koli ina inokuluma iznosila 4 zahvata ezom od 1 μ l, 2 od 5 izolata su bila pozitivna na prisustvo PBP2a. Ukupno 4 izolata su bila pozitivna na prisustvo PBP2a, kada je koli ina inokuluma iznosila 5 zahvata ezom od 1 μ l, a kod 6 zahvata ezom od 1 μ l, svih 6 izolata je bilo pozitivno na prisustvo PBP2a. Nakon toga su testirali svih 100 izolata sa koli inama inokuluma koje su iznosile 6 zahvata ezom od 1 μ l i svi *mecA* pozitivni izolati su u roku od 3 minuta bili pozitivni na prisustvo PBP2a. Autori nisu imali lažno pozitivnih rezultata, pa su zakju ili da se kod *mecA* negativnih izolata ne e pojaviti aglutinacija, bez obzira na to da li su koristili ve i inokulum ili su vršili indukciju rezistencije pomo u oksacilina.

U istraživanju sprovedenom u Turskoj (Kaya i sar., 2009) na 160 izolata *S. aureus* iz klini kih uzoraka, iji je cilj bio pore enje razli itih metoda, uklju uju i disk difuzionu metodu i mikrodilucionu metodu u bujonu sa oksacilinom, kao i lateks aglutinaciju za fenotipsku detekciju izolata MRSA i PCR metodu za detekciju *mecA* gena, autori su dobili slede e rezultate: 1) kod 87 izolata je detektovan *mecA* gen; 2) jedan *mecA* pozitivan izolat (MIK oksacilina iznosio je 8 μ g/ml) pokazao je osetljivost na oksacilin primenom disk difuzione metode, dok su 2 *mecA* negativna izolata kategorizovana kao rezistentna na oksacilin; 3) MRSA Screen test nije uspeo da detektuje prisustvo PBP2a kod 2 *mecA* pozitivna izolata (vrednosti MIK oksacilina su iznosile 32 μ g/ml i 256 μ g/ml); MRSA Screen test je bio pozitivan kod 4 *mecA* negativna izolata, koja su bila osetljiva na oksacilin primenom ostalih metoda; 4) primenom mikrodilucione metode u bujonu je ispitano ukupno 115 izolata od kojih je 58 bilo *mecA* pozitivno, a 57 *mecA* negativno. Od 58 *mecA* pozitivnih izolata, kod 57 su vrednosti MIK oksacilina iznosile 4 μ g/ml, a kod jednog je vrednost MIK oksacilina iznosila 2 μ g/ml. Od 57 *mecA* negativnih izolata, kod 56 su vrednosti MIK oksacilina iznosile 2 μ g/ml, a kod jednog 4 μ g/ml. Autori su zaklju ili da je najve u osetljivost imala disk difuziona metoda (98%), a najmanju MRSA Screen test (97,7%), dok je najve u specifi nost imala mikrodiluciona metoda u bujonu (98,2%), a najmanju specifi nost imao je MRSA Screen test (94,5%), ali da su sve navedene metode dale zadovoljavaju e rezultate u detekciji rezistencije na oksacilin.

Rezultati istraživanja u kome je ispitivano 114 izolata MRSA, 21 izolat MSSA i 24 izolata CoNS poreklom od ljudi, identifikovanih API-Staph sistemom, su pokazali da su svi izolati MRSA i MSSA svim korišćenim metodama (ispitivanjem osetljivosti na oksacilin i meticilin primenom disk difuzione metode, ispitivanjem osetljivosti na meticilin primenom E-testa, MRSA Screen testom i PCR metodom za detekciju *mecA* gena) pokazali 100% identične rezultate, dok su rezultati ispitivanja prisustva rezistencije na meticilin kod CoNS bili varijabilni. Od 24 ispitivana izolata, 14 ih je identifikovano kao *S. epidermidis*, 6 kao *S. haemolyticus* i 2 kao *S. lentus*. Ispitivanja primenom disk difuzione metode i E-testa, MRSA Screen testa i PCR metode za detekciju *mecA* gena su kod izolata *S. lentus* dala podudarne rezultate, odnosno oba izolata su bila rezistentna na oksacilin, PBP2a pozitivna i *mecA* pozitivna. Test MRSA Screen je bio pozitivan kod 11 od 16 *mecA* pozitivnih izolata (Udo i sar., 2000).

Grupa autora (Broekema i sar., 2009) je sprovela istraživanje na 1611 kliničkih izolata *S. aureus* poreklom od ljudi. U ispitivanjima su primenili disk difuzionu metodu sa diskovima cefoksitina (30 µg) i oksacilina (1 µg). Cilj im je bio da uporede rezultate ispitivanja osetljivosti izolata *S. aureus* na cefoksitin primenom disk difuzione metode sa rezultatima ispitivanja osetljivosti sojeva *S. aureus* na oksacilin primenom disk difuzione metode. Kod izolata *S. aureus* kod kojih su se dobijeni rezultati ispitivanja osetljivosti na ova 2 antibiotika, međusobno razlikovali, utvrđivano je prisustvo PBP2a metodom lateks aglutinacije. Autori su dobili sledeće rezultate: 1) od 22 izolata rezistentna na oksacilin, a osetljiva na cefoksitin, 21 izolat je primenom lateks aglutinacionog testa bio negativan na prisustvo PBP2a; 2) od 21 izolata koji je primenom lateks aglutinacionog testa bio negativan na prisustvo PBP2a, 18 izolata je bilo pozitivno primenom nitrocefinskog testa (test za utvrđivanje prisustva β-laktamaza); 3) primenom disk difuzione metode sa cefoksitinom je samo jedan izolat kategorizovan kao osetljiv na cefoksitin, a isti izolat je bio rezistentan na oksacilin i pozitivan na prisustvo PBP2a, 4) jedan izolat koji je bio intermedijarno osetljiv na oksacilin, a rezistentan na cefoksitin je bio PBP2a negativan. Autori su zaključili sledeće: 1) od 1611 izolata, 21 je bio rezistentan na oksacilin, ali ta rezistencija nije posredovana *mecA* genom, već je verovatno u pitanju hiperprodukcija β-laktamaza; 2) primenom disk difuzione metode sa diskovima cefoksitina, detektovani su samo izolati MRSA (99.9%), odnosno samo izolati kod kojih je rezistencija na oksacilin

posredovana *mecA* genom; 3) lakše se očitavaju rezultati disk difuzione metode sa cefoksitinom, nego sa oksacilinom, jer se oko diskova oksacilina javljaju nejasne granice zone inhibicije, koje se često pogrešno tumače, što se slaže sa observacijom drugih istraživača (Swenson i Tenover, 2005) i 4) disk difuziona metoda sa cefoksitinom je bolja od disk difuzione metode sa oksacilinom, zbog veće osetljivosti i lakšeg očitavanja rezultata.

U jednoj studiji koja je sprovedena u SAD (Swenson i Tenover, 2005), ispitivana je senzitivnost i specifičnost disk difuzione metode sa oksacilinom i cefoksitinom, mikrodilucione metode u bujonu sa oksacilinom i cefoksitinom i lateks aglutinacionog testa za detekciju prisustva PBP2a, a metoda PCR je korišćena za detekciju *mecA* gena. Zaključeno je da rezultati disk difuzione metode sa oksacilinom variraju u odnosu na kvalitet šarže i proizvođača Mueller-Hinton agara koji se koristi, dok na rezultate dobijene primenom disk difuzione metode sa cefoksitinom poreklo Mueller-Hinton agara nije imalo uticaja. Kada su u pitanju sojevi *S. aureus*, sve metode su u osnovi bile iste, dok su kod CoNS disk difuziona metoda i mikrodiluciona metoda u bujonu sa cefoksitinom imale istu senzitivnost, ali veću u specifičnost. Iako se kod stafilokoka ispitivanih primenom disk difuzione metode sa cefoksitinom javljala lažna rezistencija, nije primenjeno da se to posebno dešava kod neke određene vrste. S druge strane, primenom disk difuzione metode sa cefoksitinom nije detektovana rezistencija kod nekoliko *mecA* pozitivnih izolata *S. simulans*.

U istraživanju grupe autora (Perazzi i sar., 2006) je primenom različitih metoda ispitivana osetljivost na cefoksitin i oksacilin kod 107 izolata CoNS iz kliničkih uzoraka poreklom od ljudi. Najveći broj izolata je pripadao vrsti *S. epidermidis*, a među ostalim vrstama izolovane su i *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. capitis* i *S. cohnii*. Kod 41 izolata je detektovano prisustvo *mecA* gena. Rezistencija na oksacilin primenom disk difuzione metode je otkrivena kod 60 izolata, od čega kod 36 *mecA* pozitivnih izolata, dok je od 66 *mecA* negativnih izolata, 42 bilo osetljivo na oksacilin. Primenom disk difuzione metode, rezistencija na cefoksitin je otkrivena kod 33 izolata, od čega kod 33 *mecA* pozitivna, dok su svi *mecA* negativni izolati bili osetljivi na cefoksitin. Osetljivost disk difuzione metode sa oksacilinom (88%) je bila veća od osetljivosti disk difuzione metode sa cefoksitinom (80%), ali je specifičnost za cefoksitin iznosila 100%, dok je za

oksacilin iznosila 64%. Kada su oba diska koriš ena zajedno, osetljivost je iznosila 90%, a specifi nost 100%.

Dok je izvo enje disk difuzione metode sa cefoksitinom preporu eno za fenotipsko ispitivanje osetljivosti na meticilin kod stafilokoka izolovanih od ljudi (Swenson i Tenover, 2005; Swenson i sar., 2007), u jednoj studiji u kojoj je ispitivano prisustvo i osetljivost stafilokoka izolovanih iz klini kih uzoraka poreklom od pasa, utvr ena je niska osetljivost (45.2%) disk difuzione metode sa cefoksitinom.(Bremis i sar., 2006). Disk difuziona metoda ne mora biti metoda izbora za detekciju meticilin-rezistentnih izolata CoNS koji poti u od životinja koje se gaje za ishranu ljudi, zato što se heterogena rezistencija može održavati u poljoprivrednoj proizvodnji u uslovima u kojima je upotreba antibiotika mala, pa je selektivni pritisak mnogo niži nego u bolni koj sredini. Meticilin-rezistentne CoNS poreklom od životinja koje se gaje za ishranu ljudi predstavljaju važan rezervoar *mecA* gena i imaju potencijal da prenesu gen na osetljive sojeve stafilokoka, uklju uju i i osetljive sojeve *S. aureus* (Hiramatsu i sar., 2001; Hanssen i sar., 2004).

Istraživanje sprovedeno u SAD (Zhang i sar., 2011) na 87 izolata CoNS poreklom od goveda, ovaca, koza, svinja, kokošaka, uraka, pataka, gusaka i konja je imalo za cilj da uporedi razli ite metode ispitivanja osetljivosti stafilokoka na cefoksitin. U grupi od 87 izolata ustanovljeno je prisustvo 9 vrsta stafilokoka i to *S. lentus* (33), *S. sciuri* (30), *S. haemolyticus* (9), kao i po jedan izolat *S. epidermidis*, *S. cohnii* i *S. capitis* i nekih drugih vrsta. Detekcija prisustva *mecA* gena je vršena primenom PCR metode. Mikrodilucionu metodu u bujonu autori su izvodili prema preporukama CLSI, uz manju modifikaciju metode dodaju i 2% NaCl u bujon. Dužina inkubacije je iznosila 24 asa na temperaturi od 35⁰C. Od 87 ispitivanih izolata, *mecA* gen je detektovan kod 31 izolata *S. lentus*, 30 izolata *S. sciuri* i po 8 izolata *S. haemolyticus* i *S. epidermidis* koji su poticali od svih navedenih životinjskih vrsta. Izolati kod kojih nije utvr eno prisustvo *mecA* gena su poticali od goveda, ovaca i kokošaka. Osetljivost disk difuzione metode je iznosila 70.4%, a za *S. lentus* je bila najniža (51.6%). Prilikom ispitivanja osetljivosti stafilokoka na cefoksitin primenom disk difuzione metode, najve i procenat ta nih rezultata dobijen je kod stafilokoka izolovanih od koza i goveda. Primenom iste metode, najniža osetljivost na cefoksitin ustanovljena je kod stafilokoka poreklom od ovaca i svinja. Razlike izme u

životinjskih vrsta, poljoprivredna praksa koja se sprovodi na farmama, kao i različiti režimi davanja antibiotika životinjama su faktori koji mogu da dovedu do varijacija u ekspresiji *mecA* gena kod CoNS (Chambers, 1997), što može da ima uticaja na tačnost rezultata metoda za detekciju fenotipske rezistencije na meticilin. Mikrodiluciona metoda u bujonu je u navedenom ispitivanju pokazala najveću osetljivost (100%) od ispitivanih metoda i nisu uočene varijacije u dobijenim rezultatima bez obzira na vrste stafilokoka ili vrste životinja od kojih su poticali ispitivani izolati. Rezultati su bili slični rezultatima druge studije u kojoj je utvrđena osetljivost (98-99%) mikrodilucione metode u bujonu za cefoksitin kod CoNS iz kliničkih uzoraka poreklom od ljudi, a rezultati ispitivanja osetljivosti na cefoksitin primenom disk difuzione i mikrodilucione metode u bujonu su se poklapali (Swenson i Tenover, 2005). Takođe, ispitivanjem 13 *mecA* pozitivnih izolata stafilokoka poreklom od ljudi, autori (Zhang i sar., 2011) su utvrdili visoku osetljivost koja je bila identična za disk difuzionu i mikrodilucionu metodu u bujonu. Utvrđeno je da mikrodiluciona metoda u bujonu ima veću osetljivost (100%) od disk difuzione metode (70.4%) kada je ispitivana osetljivost na cefoksitin kod izolata CoNS poreklom od životinja.

U Republici Češkoj je sprovedeno ispitivanje (Kolář i sar., 2010) na 198 izolata CoNS poreklom iz uzoraka mleka (sirovog i pasterizovanog), mlečnih proizvoda (sireva i maslaca) i iz briseva površina uzetih u mlekarama. Od metoda su korišćene PCR za detekciju *mecA* gena, disk difuziona metoda za ispitivanje osetljivosti stafilokoka na oksacilin i cefoksitin, mikrodiluciona metoda u bujonu za ispitivanje osetljivosti stafilokoka na oksacilin i lateks aglutinacija za detekciju PBP2a. Prisustvo *mecA* gena je detektovano kod 15 izolata koji su identifikovani kao *S. epidermidis*, kao i kod nekih drugih vrsta. Od 198 izolata, 109 je ispoljilo rezistenciju na oksacilin, a 32 na cefoksitin primenom disk difuzione metode. Nijedan od ispitivanih izolata nije pogrešno kategorizovan kao osetljiv na oksacilin primenom disk difuzione metode (osetljivost 100%), ali je 87 izolata pogrešno kategorizovano kao rezistentno primenom iste metode (specifičnost 50,6%). Disk difuziona metoda sa cefoksitinom se pokazala kao najmanje osetljiva metoda (45,5%), jer je 12 izolata stafilokoka kod kojih je detektovan *mecA* gen bilo pogrešno kategorizovano kao osetljivo na cefoksitin, dok su 22 izolata, koja nisu imala *mecA* gen, bila pogrešno kategorizovana kao rezistentna na cefoksitin. Rezistencija

na oksacilin primenom mikrodilucione metode u bujonu je uo ena kod 50 izolata stafilokoka. Primenom mikrodilucione metode u bujonu vrednosti MIK oksacilina 0,5 µg/ml su dobijene kod izolata *S. epidermidis* (32%). Osetljivost mikrodilucione metode u bujonu sa oksacilinom iznosila je 68,2%, a specifi nost 80,1%, jer je 35 izolata, kod kojih nije utvr eno prisustvo *mecA* gena ispoljilo rezistenciju na oksacilin, a 7 izolata kod kojih je dokazano prisustvo *mecA* gena je ispoljilo osetljivost na oksacilin. Rezultati dobijeni primenom lateks aglutinacione metode za utvr ivanje prisustva PBP2a bili su 100% podudarni sa rezultatima PCR metode. Prisustvo PBP2a kod izolata *S. epidermidis*, kao i prisustvo *mecA* gena utvr eno je kod 15 od 16 izolata, kod kojih je vrednost MIK oksacilina iznosila 0,5 µg/ml. Kod ostalih izolata CoNS sa vrednostima MIK oksacilina 0,5 µg/ml, nije utvr eno prisustvo PBP2a, ali je prisustvo PBP2a detektovano kod 7 ispitivanih izolata CoNS kod kojih su vrednosti MIK oksacilina iznosile 0,125 i 0,25 µg/ml.

Od 2099 izolata CoNS poreklom od svinja (716), krava (340), teladi (300), trupova piladi (72), iz zbirnih uzoraka mleka (100), uzoraka mlevenog mesa (111) i od ljudi (brisevi nosa: 133 veterinara, 148 zaposlenih na farmama svinja i 179 zaposlenih u klanicama), prona eno je 1013 meticilin-rezistentnih CoNS (Huber i sar., 2011). Od 1013 meticilin-rezistentnih izolata CoNS, 414 izolata je podvrgnuto daljem ispitivanju. Najve i procenat izolata je pripadao vrsti *S. sciuri* (32,6%), zatim *S. fleurettii* (25,1%), *S. haemolyticus* (17,4%), *S. epidermidis* (14,5%) i *S. lentus* (9,2%). Od 191 soja meticilin-rezistentnih CoNS poreklom od životinja, najve i broj je pripadao vrsti *S. sciuri* (63,4%), zatim *S. fleurettii* (17,8%), *S. lentus* (15,7%), *S. haemolyticus* (1,6%) i *S. epidermidis* (1%). Od 38 izolata *S. lentus*, 30 je poticalo od piladi. Od 51 izolata *S. sciuri*, 50 je poticalo od teladi, dok je od 52 izolata od svinja, 55,8% identifikovano kao *S. sciuri*, a 44,2% kao *S. fleurettii*. Od 50 meticilin-rezistentnih CoNS poreklom od krava, 72% izolata je identifikovano kao *S. sciuri*, a 22% kao *S. fleurettii*. Od 84 meticilin-rezistentna izolata CoNS poreklom iz uzoraka zbirnog mleka i mlevenog mesa, 76,2% izolata su identifikovani kao *S. fleurettii*, 15,5% kao *S. sciuri*, dok su ostali izolati pripadali vrstama *S. haemolyticus* (3), *S. epidermidis* (2) i *S. cohnii* (1). Od 139 izolata meticilin-rezistentnih CoNS poreklom od ljudi, najve i broj je pripadao vrstama *S. haemolyticus* (47,5%) i *S. epidermidis* (40,3%). Izolati *S. lentus* su izolovani iz noseva 8 zaposlenih u

klanici živine, dok su izolati *S. fleurettii* izolovani iz noseva jednog veterinara, 2 uzgajiva a svinja i 3 zaposlena u klanici. Ostale 2 vrste meticilin-rezistentnih CoNS izolovane od 1 veterinara i jednog zaposlenog u klanici su identifikovane kao *S. cohnii* i *S. sciuri*. Iako su svi izolati nosili *mecA* gen, fenotipska rezistencija na β -laktamske antibiotike (ampicilin, cefoksitin, oksacilin i penicilin) ispitivana disk difuzionom metodom je detektovana kod 63,5% izolata na cefoksitin i 97,8% izolata na oksacilin. Na gentamicin je bilo rezistentno 14,7% izolata, a na eritromicin i tetraciklin 49% izolata. Iako je veina izolata ispoljila rezistenciju na oksacilin (97,7%), samo 84,7% izolata je ispoljilo rezistenciju na penicilin. Kod izolata *S. sciuri*, *S. fleuretti* i *S. lentus*, iako je rezistencija na oksacilin iznosila 100%, na penicilin je bilo rezistentno 97,8% izolata *S. sciuri*, 65,4% *S. fleurettii* i 78,9% *S. lentus*, dok je rezistencija na cefoksitin iznosila 83,7% kod izolata *S. sciuri*, 32,7% kod izolata *S. fleurettii* i 52,6% kod izolata *S. lentus*.

U Holandiji je sprovedeno ispitivanje na 311 izolata stafilokoka poreklom od maaka, pasa, goveda, konja, majmuna, koza, foke i inile (van Duijkeren i sar., 2004a). Za identifikaciju izolata je upotrebljen ID32 STAPH sistem. Od 311 stafilokoka, kod 10 je detektovano prisustvo *mecA* gena. Od 11 multirezistentnih izolata koji su pripadali kolekciji Dijagnosti kog centra za veterinarsku mikrobiologiju, 6 je bilo rezistentno na oksacilin primenom disk difuzione metode na Isosensitest agaru i svih 6 je imalo *mecA* gen. Od ovih 6 izolata, 2 su identifikovana kao *S. aureus* i izolovana su od 2 psa, a 4 kao *S. haemolyticus* koji su izolovani od 2 psa, konja i ma ke. Od ostalih 300 izolata, 200 je pripadalo grupi koagulaza-pozitivnih stafilokoka, a 100 grupi CoNS. Nijedan od izolata koagulaza-pozitivnih stafilokoka nije posedovao *mecA* gen, ali je *mecA* gen detektovan kod 4 izolata CoNS. Od 100 CoNS, 5 izolata je pokazalo fenotipsku rezistenciju na oksacilin, a 4 su bila *mecA* gen pozitivna. Izolati su pripadali vrstama *S. haemolyticus* (3) i *S. lentus* (1) i svi izolati, osim jednog, su izolovani kod klini ki manifestnih infekcija, a poticali su od ma ke, konja, psa i krave.

3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA

Na osnovu podataka iz literature i sopstvenih preliminarnih ispitivanja postavljeni cilj obuhvatao izolaciju, identifikaciju stafilocoka različitog porekla i ispitivanje njihove osetljivosti antibiotike sa posebnim akcentom na meticilin, uporednom primenom klasičnih metoda, komercijalnih testova i molekularne metode PCR.

Radi ostvarenja postavljenog cilja definisani su sledeći zadaci:

1. Izolacija koagulaza-pozitivnih i koagulaza-negativnih vrsta stafilocoka iz kliničkih uzoraka poreklom od bolesnih ljudi i životinja, iz namirnica animalnog porekla (mleka i sireva), uzoraka hrane za životinje i bolničkog okruženja.
2. Identifikacija izolovanih vrsta stafilocoka primenom konvencionalnih metoda mikrobiološke dijagnostike, kao i komercijalnih identifikacionih sistema.
3. Ispitivanje osetljivosti, odnosno rezistencije na odabrani broj antibiotika, uključujući i oksacilin i cefoksitin, kod izolovanih vrsta stafilocoka primenom disk difuzione metode.
4. Ispitivanje osetljivosti, odnosno rezistencije na oksacilin i cefoksitin kod izolovanih vrsta stafilocoka primenom mikrodilucione metode u bujonu.
5. Detekcija sojeva stafilocoka rezistentnih na meticilin primenom hromogenih podloga.
6. Utvrđivanje prisustva PBP2a kodiranog *mecA* genom kod ispitivanih izolata stafilocoka primenom lateks aglutinacionog testa.
7. Utvrđivanje prisustva *mecA* gena kod izolovanih sojeva stafilocoka primenom metode PCR.
8. Analiza dobijenih rezultata.

4. MATERIJAL I METODE ISPITIVANJA

Kao materijal za ispitivanje su korišteni izolati stafilokoka poreklom od hospitalizovanih pacijenata, kao i izolati stafilokoka iz bolničkog okruženja iz Kliničkog centra Srbije, izolati iz uzoraka uzetih od bolesnih životinja koji su dopremani na Katedru za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, izolati iz uzoraka mleka krava sa klinički manifestnim mastitisom, koji su dobijeni iz Laboratorije za bakteriologiju Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije, uzorci hrane za životinje, koji su dopremani u Laboratoriju za mikrobiološko ispitivanje hrane za životinje Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije iz kojih je dalje vršena izolacija stafilokoka, kao i izolati iz uzoraka namirnica animalnog porekla (mleka i mlečnih proizvoda), koji su dobijeni iz Laboratorije za ispitivanje namirnica animalnog porekla Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije.

Preliminarno je ispitano 130 izolata stafilokoka, od čega je 35 poticalo od ljudi, 50 iz uzoraka poreklom od životinja, 25 iz uzoraka hrane za životinje, 15 iz uzoraka namirnica animalnog porekla i 5 izolata poreklom iz bolničkog okruženja. Nakon preliminarnih ispitivanja iz svake navedene grupe izabran je određeni broj izolata za dalju identifikaciju i ispitivanje osetljivosti na antibiotike sa posebnim osvrtom na oksacilin i cefoksitin. Od izolata poreklom od ljudi odabrano je 14, od kojih je 5 poticalo iz nosa, 8 iz aksile i jedan sa promene kože oko nokta. Od izolata poreklom od životinja odabrano je 16, od kojih je 10 poticalo od pasa (5 iz ušiju, 3 iz rana, 1 iz urina i 1 iz nosa), 4 od mačaka (po jedan izolat iz nosa, sa kože, oka i rane) i po jedan iz mleka krave sa mastitisom i jedan iz grla kokoške. Iz bolničkog okruženja su odabrana 4 izolata. Iz namirnica životinjskog porekla je odabrano 8 izolata iz sireva, od čega je 7 poticalo iz belog sira u kriškama i jedan iz feta sira. Od uzoraka hrane za životinje odabrano je 7 izolata, 3 iz uzoraka zamene mleka za hranu za životinje (sve različite proizvoda) i po jedan izolat iz uzorka sojine sa me, suncokretove sa me, sirovog pivarskog trebera i hrane za brojlere.

Izolacija je vršena iz kliničkih materijala poreklom od životinja zasejavanjem uzoraka na krvni agar (Columbia agar sa dodatkom 5% ovčije krvi, bioMérieux, Francuska).

Izolacija stafilokoka iz uzoraka hrane za životinje je primarno vršena na Baird-Parker agaru, kada je iz primarnog razre enja, koje je dobijeno homogenizacijom 10 g uzorka u 90 ml sterilnog fiziološkog rastvora (Priručnik za laboratorijsku dijagnostiku, 1984., Bakteriološka pretraga hrane za stoku, Utvrđivanje broja aerobnih i mezofilnih bakterija) na površinu agara zasejavana količina od 1 ml. Nakon inkubacije od 48-72 sata na temperaturi od 37⁰C, sumnjive crne kolonije su presejavane na krvni agar (Columbia agar sa dodatkom 5% ovčije krvi, bioMérieux, Francuska) da bi se uočio izgled kolonija i ispitala sposobnost stvaranja hemolize.

Od svih izolata stafilokoka pripremani su preparati koji su bojeni po Gramu. Sve gram-pozitivne koke u grozdovima su podvrgnute daljem ispitivanju.

Za primarnu identifikaciju su primenjeni katalaza i oksidaza test. Katalaza test je izvođen tako što je na mikroskopsku pločicu stavljano nekoliko kapi vodonik peroksida u koji je umešana ispitivana kolonija. Stvaranje mehurika ukazivalo je na prisustvo enzima katalaze. Oksidaza test je izvođen nakapavanjem oksidaza reagensa (bioMérieux, Francuska) na filter papir na koji je drvenim štapićem nanošena ispitivana kolonija izolovanog soja. Pojava plavo-ljubičaste boje u roku od 2 minuta označava je pozitivnu reakciju.

Koagulaza test za ispitivanje prisustva slobodne koagulaze je izvođen tako što je 0,5 ml prethodno razređene plazme kunića (Veterinarski zavod Zemun a.d., Srbija) u odnosu 1:5 sa sterilnim fiziološkim rastvorom, sipano u epruvetu u koju je dodata ispitivana kolonija. Test je očitavan nakon inkubacije od 4 sata i 24 sata na temperaturi od 37⁰C. Sve epruvete u kojima je došlo do stvaranja fibrinskog ugruška označene su kao pozitivne.

Nakon izvođenja preliminarnih testova, vršena je identifikacija izolovanih sojeva, primenom komercijalnih testova ID32 STAPH (bioMérieux, Francuska) i BBL Crystal Gram-Positive ID Kit (Becton Dickinson, SAD) prema uputstvima proizvođača. U bazi podataka ID32 STAPH sistema ima 27 vrsta i podvrsta stafilokoka, a u bazi BBL Crystal Gram-Positive ID Kit sistema ima ukupno 28 vrsta i podvrsta. Postoje izvesne razlike u vrstama koje su zastupljene u bazama podataka. Sistem ID32 STAPH ima 3 vrste koje ne postoje u bazi podataka sistema BBL Crystal Gram-Positive ID Kit i to su: *S. arlettae*, *S. chromogenes* i *S. hyicus*. Sistem BBL Crystal Gram-Positive ID Kit ima 4 vrste u svojoj

bazi podataka koje sistem ID32 STAPH nema i to su: *S. felis*, *S. pasteurii*, *S. saccharolyticus* i *S. vitulinus*. Ove podatke bi trebalo imati na umu prilikom identifikacije stafilokoka.

Za određeni broj izolata (jedan izolat poreklom od ljudi i sve izolate iz sireva i hrane za životinje) izvršena je identifikacija i primenom aparata Vitek MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francuska). Aparat predstavlja adaptiranu verziju masenog spektrometra Shimadzu AXIMA, koji je zajedno sa novom bazom podataka (MS-ID) optimizovan za mikrobiološke laboratorije. Vitek MS se zasniva na MALDI-TOF MS tehnologiji, koja se godinama koristi za određivanje osobina proteina, a danas je vrlo korisna za identifikaciju mikroorganizama. Masena spektrometrija ima svojstvo da detektuje odnos mase i naboja analizirane biološke materije, obezbeđujući i spektar u roku od nekoliko minuta. Mali deo kolonije izolovanog mikroorganizma se nanosi sterilnim štapićem na metalnu ploču, preko koje se stavlja 1μl matriksa, koji za manje od 5 minuta isušivanja na sobnoj temperaturi kristališu na ploču. Zatim se ploča unosi u aparat gde laser bombarduje mešavinu bakterija i matriksa, pri čemu dolazi do jonizacije proteina i njihovog razdvajanja u električnom polju. Ovi proteini se usmeravaju u vakuum cev i razdvajaju se prema odnosu mase i naboja. Na ovaj način proteini pristižu u detektor u sekvencama koje su obrnuto proporcionalne njihovoj masi stvaraju i profil proteina (mass spectral fingerprinting). Glavni pikovi pripadaju ribozomalnim i ostalim većinski zastupljenim proteinima, kao što su HSP (heat shock proteini), DNK vezujuć i proteini i RNK šaperoni. Sastav matriksa pomaže da se još više obogati signal osnovnih proteina, kao što su ribozomalni. Nakon toga se dobijeni profil analizira i poredi sa bazom podataka, što omogućava preciznu identifikaciju mikroorganizama. Svaki komercijalni sistem koji funkcioniše primenom MALDI-TOF MS tehnologije koristi različite baze podataka, različite algoritme i različite načine za izveštavanje pouzdanosti dobijene identifikacije. Između identifikacije primenom MALDI-TOF MS i klasičnih metoda postoji visok nivo saglasnosti koji se kreće od 84% do 95%.

Osetljivost izolovanih stafilokoka poreklom od ljudi, životinja i iz okruženja je ispitivana na sledeće antibiotike: oksacilin (OX-1μg), penicilin (P-10U), cefoksitin (FOX-30μg), gentamicin (GM-10μg), eritromicin (E-15μg), klindamicin (CC-2μg), tetraciklin (TE-30μg) i vankomicin (VA-30μg) primenom disk difuzione metode.

Osetljivost izolovanih stafilokoka poreklom iz namirnica i hrane za životinje je ispitivana na sledeće antibiotike: oksacilin (OX-1 μ g), penicilin (P-10U), cefoksitin (FOX-30 μ g), gentamicin (GM-10 μ g), eritromicin (E-15 μ g), hloramfenikol (C-30 μ g), tetraciklin (TE-30 μ g), ciprofloksacin (CIP-5 μ g), sulfametoksazol/trimetoprim (SXT-23,75/1,25 μ g) i vankomicin (VA-30 μ g) primenom disk difuzione metode.

Osetljivost svih izolovanih stafilokoka je ispitivana na oksacilin i cefoksitin primenom mikrodilucione metode u bujonu prema preporukama NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards (sada CLSI), 2003.), a tumačenje rezultata je vršeno prema preporukama CLSI iz 2008. (za oksacilin i vankomicin primenom disk difuzione metode) i 2014. godine za sve ostale antibiotike. Korišteni su antibiogram diskovi proizvođača Becton Dickinson (SAD), a iste supstance oksacilina i cefoksitina korišćene za mikrodilucionu metodu u bujonu proizvođača Sigma Aldrich, SAD.

Osetljivost na antibiotike izolovanih sojeva stafilokoka primenom disk difuzione metode je ispitivana na Mueller Hinton agaru (bioMérieux, Francuska). Nakon pripreme suspenzije kolonija u sterilnom fiziološkom rastvoru, njihova je gustina iznosila $1,5 \times 10^8$ CFU/ml, što odgovara 0,5 McFarland standardu i nanošenja na ploče koje su potom sušene oko 1 minut na sobnoj temperaturi, rečeno su diskovi antibiotika. Posle inkubacije u trajanju od 18 do 24 sata na temperaturi od 37⁰C, rezultati su određivani merenjem prečišćene zone inhibicije, na osnovu kojih su utvrđivane interpretativne kategorije (S, I, R). Za kontrolu kvaliteta izvođenja ove metode, kao i kvaliteta antibiogram diskova korišćen je referentni soj *S. aureus* ATCC 25923.

Osetljivost na antibiotike izolovanih sojeva stafilokoka primenom mikrodilucione metode u bujonu ispitivana je prema preporukama NCCLS iz 2003. godine u Mueller Hinton II bujonu (Becton Dickinson, SAD). Rastvori antibiotika su pripremani prema preporukama CLSI iz 2008. godine, a za oba antibiotika kao rastvarač je korišćena sterilna destilovana voda. Za ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva stafilokoka na oksacilin, u podlogu je dodavan NaCl (Zorka Šabac, Srbija) u koncentraciji od 2%. Metoda je izvođena u mikrotitracionim pločama sa „U“ dnom (Spektar d.o.o. Beograd, Srbija) u koje je unošena podloga, a zatim i antibiotici u određenim koncentracijama. Raspon koncentracija antibiotika se kretao za cefoksitin od 0,12 do 256 μ g/ml, a za oksacilin od 0,06 do 128 μ g/ml. Ispitivani sojevi su inokulisani u bazeni i e u finalnoj

koncentraciji od 5×10^5 CFU/ml. Inkubacija je vršena na temperaturi od 37°C tokom 16-18 asova, osim za oksacilin, kada je vreme trajanja inkubacije iznosilo 24 asa. Za kontrolu kvaliteta izvo enja ove metode, kao i kvaliteta upotrebljenih antibiotika je koriš en referenti soj *S. aureus* ATCC 29213.

Interpretativne kategorije za o itavanje rezultata dobijenih ispitivanjem osetljivosti na oksacilin odre ivanjem minimalnih inhibitornih koncentracija su: kod *S. aureus* za osetljivost MIK 2 i za rezistenciju MIK 4, dok su kod CoNS (osim *S. lugdunensis*) za osetljivost MIK 0,25 i za rezistenciju MIK 0,5 (CLSI, 2014).

Interpretativne kategorije za o itavanje rezultata dobijenih ispitivanjem osetljivosti koagulaza-negativnih stafilokoka (osim *S. lugdunensis*) na cefoksitin odre ivanjem minimalnih inhibitornih koncentracija nisu ustanovljene, pa su rezultati interpretirani prema kriterijumima za *S. aureus* i *S. lugdunensis* i to za osetljivost MIK 4 i za rezistenciju MIK 8 (CLSI, 2014).

U ovom ispitivanju koriš ena je i hromogena podloga za brzu detekciju sojeva MRSA (chromID[™]MRSA, bioMérieux, Francuska). Brisevi uzeti od pacijenata iz Klini kog centra Srbije su direktno zasejavani na ovu podlogu. Podloga sadrži antibiotik cefoksitin i selektivno inhibira ve inu bakterija koje ne pripadaju rodu *Staphylococcus*, kao i sojeve stafilokoka osetljive na cefoksitin. Nakon zasejavanja ispitivanih sojeva stafilokoka i inkubacije tokom 18-24 asa na temperaturi od 37°C , porast zelenih kolonija na agaru ozna avao je rezistenciju ispitivanih sojeva na meticilin.

Za ispitivanje prisustva penicilin-vezuju eg proteina 2a (PBP2a ili PBP2') koji predstavlja produkt *mecA* gena i ima nizak afinitet za -laktamske antibiotike koriš en je Slidex®MRSA Detection test (bioMérieux, Francuska). Primena ovog testa se izjedna ava sa primenom PCR metode. Test je izvo en prema uputstvu proizvo a a, a naglašeno je da je njegova upotreba preporu ena samo za *S. aureus*. Pre o itavanja rezultata, vreme trajanja aglutinacije iznosi, prema preporuci proizvo a a 3 minuta, ali je u ovom istraživanju izvršena modifikacija i rezultati su o itavani i nakon 15 minuta.

Kao „zlatni standard“ za proveru svih dobijenih rezultata je koriš ena metoda PCR (Polymerase Chain Reaction) za detekciju *mecA* gena.

Za PCR metodu je bilo potrebno prvo izvršiti ekstrakciju bakterijske genomske DNK. Ekstrakcija bakterijske DNK je izvo ena na dva na ina: uz pomo kita za

ekstrakciju genomske DNK bakterija (Metabion, Nemačka) i prema protokolu referentne laboratorije Evropske Unije za antimikrobnu rezistenciju (EU Reference Laboratory-Antimicrobial resistance; Faculty of Veterinary Medicine, Lisbon, Portugal).

Ekstrakcija DNK primenom kita:

1. Centrifugirano je 1,5 ml bakterijskih kultura prethodnog dana zasejanih u bujone na 13000 rpm (12 000 x g) tokom 1 minuta, nakon čega su odlivani bujoni.
2. Vorteksiranjem je resuspendovan čelijski talog u 500 µl TE pufera (10 mM Tris-HCl, 1 ml EDTA, pH 8,0).
3. Po 6 µl lizozima (20 mg/ml) je dodavano u svaki uzorak.
4. Inkubacija je vršena na 37°C tokom 30 minuta do 1 sat.
5. Uzorci su centrifugirani tokom 2 minuta na 13000 rpm, nakon čega je odbacivan supernatant.
6. U uzorke je dodavano 300 µl Cell Lysis Buffer i posle toga talog je resuspendovan. Inkubacija je vršena na 80°C tokom 5 minuta u termobloku.
7. Uzorci su hlađeni (u ependorfici od 1.5 ml) na sobnoj temperaturi, a zatim je u njih dodavano po 3 µl rastvora RNAze A (10 mg/ml), nakon čega su inkubirani na 37°C tokom 15 minuta.
8. U svaki uzorak je dodavano po 100 µl PPT pufera. Zatim su uzorci vorteksirani 20 sekundi, a onda su inkubirani na ledu tokom 5 minuta.
9. Uzorci su centrifugirani tokom 10 minuta na 13000 rpm na sobnoj temperaturi.
10. Supernatanti su zatim prenošeni u nove ependorfice od 1,5 ml, nakon čega je dodavano po 600 µl Column Binding Buffera, pri čemu je važno da se ne skvase ivice ependorfica, a potom su uzorci vorteksirani.
11. Spin ependorfice su stavljane u kolekcione ependorfice, nakon čega je prenošeno po 650 µl svakog uzorka pripremljenog u prethodnom koraku (10) u spin ependorfice.
12. Uzorci su centrifugirani tokom 2 minuta na 13000 rpm, a te nost koja je isticala kroz membranu svake spin ependorfice je ostavljala genomsku DNK vezanu za filter membrane.
13. Svaka spin ependorfica je zatim vađena iz kolekcione ependorfice i te nost koja je prošla kroz membranu je odbacivana, nakon čega je svaka spin ependorfica

- stavljana u istu kolekcionu ependorficu. Ostatak svake mešavine pripremljene u koraku 10 je dodavan u spin ependorfice i centrifugiran na 13000 rpm tokom 2 minuta.
14. Svaka spin ependorfica je va ena iz kolekcione ependorfice i te nost koja je prošla kroz membranu je odbacivana, nakon ega je svaka spin ependorfica vra ana u istu kolekcionu ependorficu. Zatim je dodavano po 750 µl Column Wash Buffera u svaku spun ependorficu, pri emu je vo eno ra una da se ne skvase ivice ependorfica. Uzorci su zatim centrifugirani tokom 2 minuta na 13000 rpm.
 15. Svaka spin ependorfica je va ena iz kolekcione ependorfice i te nost koja je prošla kroz membranu je odbacivana, nakon ega je svaka spin ependorfica vra ana u istu kolekcionu ependorficu. Nakon toga je dodavano 250 µl Column Wash Buffera, pri emu je vo eno ra una da se ne skvase ivice ependorfica i uzorci su centrifugirani tokom 2 minuta na 13 000 rpm.
 16. Svaka spin ependorfica je stavljana u novu ependorficu za mikrocentrifugu od 1,5 ml a kolekcione ependorfice koje sadrže filtrate su odbacivane. Zatim je dodavano po 50-100 µl TE pufera ili destilovane vode u svaki uzorak, nakon ega je svaka spin ependorfica sa TE puferom ili destilovanom vodom (pH 7-8) inkubirana na sobnoj temperaturi (15-25⁰C) tokom 1 minuta i potom je vršeno centrifugiranje na 13 000 rpm tokom 1 minuta.

Ekstrakcija DNK za *Staphylococcus* spp. primenom protokola referentne laboratorije EU: Sojevi su zasejavani na krvni agar i plo e su inkubirane tokom 16-18 asova na temperaturi od 37⁰C. Sipan je po 1ml PBS (Dulbecco's, Sigma Aldrich, USA) (Phosphate buffer saline; pH 7,4) u svaku epruveticu od 1,5 ml za centrifugiranje, a zatim je svaka kultura uzeta ezom od 10 µl suspendovana u PBS i vorteksirana. Centrifugiranje je vršeno tokom 5 minuta na 13200 rpm, a zatim su odbacivani supernatanti. Talog svakog uzorka je resuspendovan u 100 µl TE pufera (100x TE, Serva, Germany) (Tris-EDTA 10:1 (10mM Tris-Hcl; 1mM EDTA; pH 8)). Koriš enjem vrele igle, pravljani su mali otvori na poklopcima epruveta za centrifugiranje. Zatim su prenošene epruvete za centrifugiranje u plutaju i stiropor i kuvane tokom 10 minuta u vodenom kupatilu. Uzorci su potom inkubirani na ledu tokom jednog minuta. U me uvremenu su pripremljene nove

epruvete za centrifugiranje sa 900 µl TE pufera. Dobijene suspenzije su resuspendovane i po 100 µl je prenošeno u nove epruvete, nakon čega su uzorci čuvani na temperaturi od -20°C.

Prajmeri (Invitrogen, SAD) koji su korišćeni za amplifikaciju regiona *mecA* gena veličine 533 bp su imali sledeće sekvence: prajmer 1 (5'-AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3') i prajmer 2 (5'-AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C-3'), svaki u finalnoj koncentraciji od 0,25 µM (Isenberg, 2004). Svaki od dezoksiribonukleozid trifosfata (Thermo Scientific) je upotrebljen u koncentraciji od 200 µM. Ostali upotrebljeni reagensi i njihove finalne koncentracije su: Taq pufer u finalnoj koncentraciji od 50 mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,2 mM Taq DNK polimeraze i voda (nuclease free), (Thermo Scientific). Količina ispitivane DNK je iznosila 10 µl. Uslovi PCR reakcije su bili: inicijalna denaturacija na temperaturi od 94°C tokom 5 minuta, a zatim 40 ciklusa denaturacije na temperaturi od 94°C tokom 30 sekundi, zatim vezivanje prajmera na temperaturi od 55°C tokom 30 sekundi i elongacija na 72°C tokom 1 minuta, za kojom sledi finalna elongacija na 72°C tokom 5 minuta u mašini za PCR (Autorisierter Thermocycler; Eppendorf, Nemačka). Nakon amplifikacije PCR produkata, izvođena je elektroforeza na 1,5% agaroznom gelu sa etidijum bromidom (1% vodeni rastvor, Serva) koncentracije 10mg/ml u 1xTBE (10xTBE; 0,89 M Tris; 0,89 M Boric acid; 0,02 M EDTA; Serva) u kadici za elektroforezu (Blue marine, Serva). Agarozna upotrebljena za pripremanje gela je bila PCR molecular biology grade (Serva). Nakon hlađenja gela i vađenja ešljaka, 10 µl svakog PCR produkta se mešalo sa 2 µl boje za praćenje elektroforeze (Fermentas), dok se 8 µl markera mešalo sa 2 µl boje za praćenje elektroforeze, da bi se nakon toga marker i PCR produkti sa bojom unosili u otvore u agaroznom gelu. Elektroforeza je izvođena na aparatu za elektroforezu (Blue power 500, Serva) pri naponu od 100V tokom 30 minuta. Vizualizacija PCR produkata je izvođena na UV transiluminatoru (Vilber Lourmat, Nemačka). Za očitavanje veličine fragmenata u ovom ispitivanju je korišćen M- X174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9 (Fermentas). Za kontrolu kvaliteta izvođena reakcija su korišćeni referentni sojevi i to kao pozitivna kontrola meticilin-rezistentan *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, a kao negativna kontrola *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, dok je prilikom svake pripreme uzoraka za PCR, korišćena i kontrola smeše za PCR.

5. REZULTATI ISPITIVANJA

5.1. Izolacija i identifikacija Staphylococcus vrsta

Svih 14 izolata stafilokoka poreklom od ljudi je bilo katalaza pozitivno i oksidaza negativno. Svih 14 izolata je bilo koagulaza-negativno.

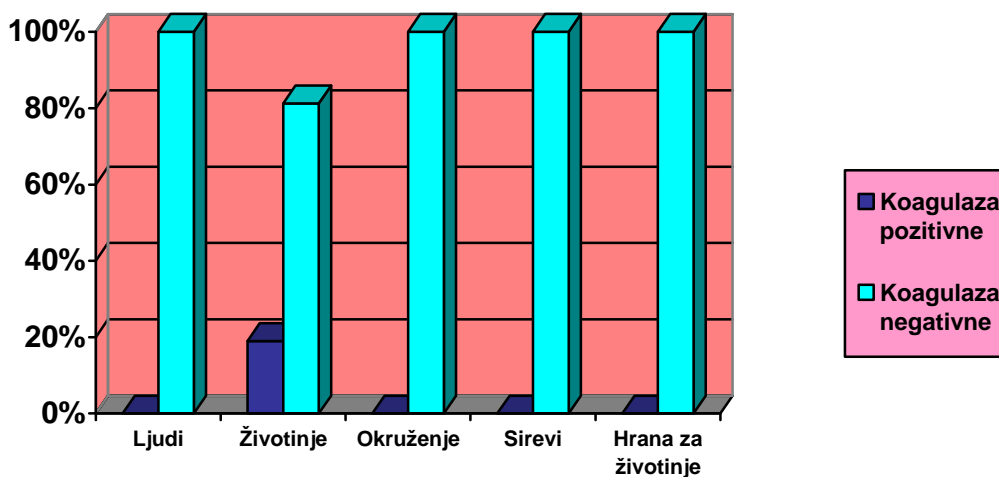
Od 16 izolata poreklom od životinja, svi izolati su bili katalaza pozitivni, dok je jedan bio oksidaza pozitivan, a svi ostali oksidaza negativni. Od 16 izolata, 13 je bilo koagulaza-negativno, dok su 3 izolata bila koagulaza-pozitivna.

Od 4 izolata poreklom iz bolni kog okruženja, sva 4 izolata su bila katalaza pozitivna, oksidaza negativna i koagulaza-negativna.

Od 8 izolata poreklom iz sireva, svi izolati su bili katalaza i oksidaza pozitivni i koagulaza-negativni.

Od 7 izolata poreklom iz uzoraka hrane za životinje, svih 7 izolata je bilo katalaza pozitivno, dok je 6 izolata bilo oksidaza pozitivno, a samo jedan oksidaza negativan. Svih 7 izolata je bilo koagulaza-negativno.

Rezultati koagulaza testa svih ispitivanih stafilokoka su prikazani na grafikonu 1.



Grafikon 1. Prikaz procentualne zastupljenosti koagulaza-pozitivnih i koagulaza-negativnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka poreklom od ljudi, životinja, iz bolni kog okruženja, sireva i hrane za životinje

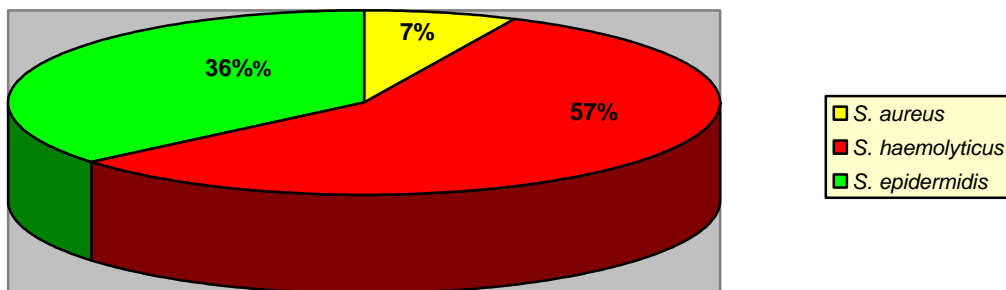
5.1.1. Identifikacija Staphylococcus vrsta izolovanih od ljudi

Izolovane stafilokoke su identifikovane do vrste primenom komercijalnih testova ID32 STAPH i/ili BBL Crystal GP, dok je jedan izolat identifikovan i primenom aparata Vitek MS.

Od 14 izolata poreklom od bolesnih ljudi, 8 izolata je poticalo sa kože aksila, 5 iz noseva i jedan sa promene na koži oko nokta. Primenom sistema BBL Crystal GP, 5 izolata je bilo identifikovano kao *S. epidermidis*. Primenom ID32 STAPH sistema 8 izolata je identifikovano kao *S. haemolyticus*, od kojih je jedan izolat identifikovan i primenom BBL Crystal GP i rezultati oba testa su se poklapali. Jedan izolat, koji je bio koagulaza-negativan je primenom ID32 STAPH sistema identifikovan kao *S. aureus* (87,3%), dok je primenom BBL Crystal GP sistema identifikovan kao *S. haemolyticus*. Zbog neslaganja u rezultatima identifikacije, još dva puta je ponovljena identifikacija primenom BBL Crystal GP sistema i oba puta je izolat identifikovan kao *Enterococcus faecalis*. S obzirom na veliko neslaganje u rezultatima identifikacije, izolat je identifikovan primenom aparata Vitek MS kao *S. aureus* (85,6%).

Vrste *S. epidermidis* i *S. haemolyticus* su bile podjednako zastupljene u nosevima (po 3 izolata od svake vrste). Jedan *S. haemolyticus* je poticao sa promenjene kože oko nokta, dok su svi ostali izolati poticali sa kože aksila.

Najve i broj izolata je pripadao vrsti *S. haemolyticus* (57%), manji broj vrsti *S. epidermidis* (36%), a najmanji vrsti *S. aureus* (7%), što se može videti na grafikonu 2.



Grafikon 2. Prikaz procentualne zastupljenosti izolovanih vrsta stafilokoka kod ljudi

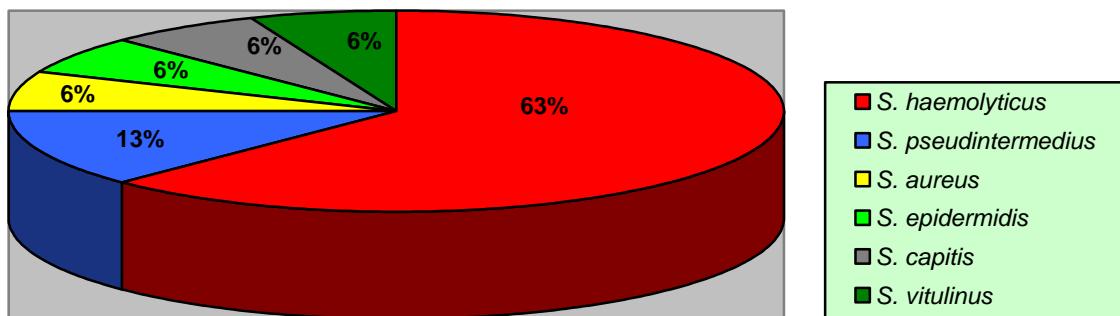
5.1.2. Identifikacija Staphylococcus vrsta izolovanih od životinja

Izolovane stafilokoke su identifikovane do vrste primenom komercijalnih testova ID32 STAPH i BBL Crystal GP.

Od ukupno 16 izolata primenom ID32 STAPH sistema je identifikovano 12 izolata, a 4 izolata identifikovana su primenom BBL Crystal GP sistema. Od ukupnog broja izolata, 10 je identifikovano kao *S. haemolyticus*, a od tog broja 8 izolata je identifikovano primenom ID32 STAPH sistema, dok su 2 identifikovana primenom BBL Crystal GP sistema. Od ostalih 6 izolata, primenom ID32 STAPH sistema 2 izolata su identifikovana kao *S. intermedius* (u daljem tekstu *S. pseudintermedius*), po jedan izolat kao *S. epidermidis* i *S. aureus*, dok su preostala 2 izolata identifikovana primenom BBL Crystal GP sistema kao *S. vitulinus* i *S. capitis*.

Iz uzoraka poreklom od pasa, 6 izolata je identifikovano kao *S. haemolyticus*, 2 kao *S. pseudintermedius* i po jedan izolat kao *S. epidermidis* i *S. capitis*. Sva 4 izolata poreklom od ma aka identifikovana su kao *S. haemolyticus*. Jedan izolat poreklom iz mleka krave sa mastitisom identifikovan je kao *S. aureus* i jedan izolat iz grla kokoške identifikovan je kao *S. vitulinus*.

Najve i broj izolata je pripadao vrsti *S. haemolyticus* (63%), manji broj vrsti *S. pseudintermedius* (13%), a najmanji broj vrstama *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. capitis* i *S. vitulinus* (6%), što se može videti na grafikonu 3.



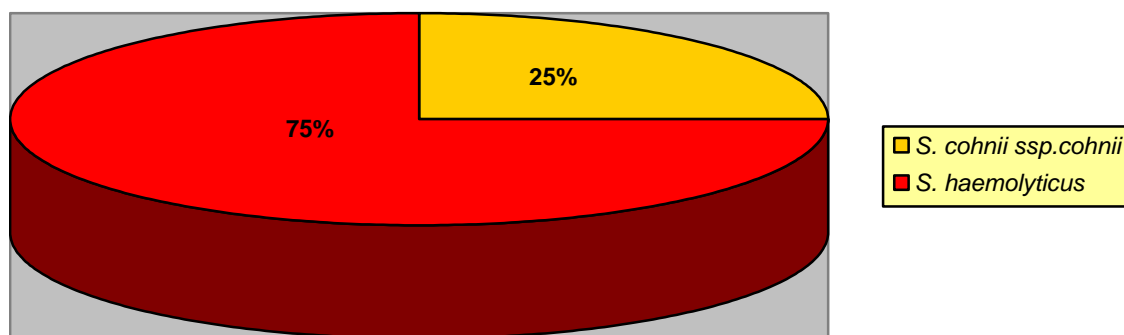
Grafikon 3. Prikaz procentualne zastupljenosti izolovanih vrsta stafilokoka kod životinja

5.1.3. Identifikacija Staphylococcus vrsta izolovanih iz bolni kog okruženja

Izolovane stafilokoke su identifikovane do vrste primenom sistema ID32 STAPH.

Od 4 izolata poreklom iz bolni kog okruženja, 3 su identifikovana kao *S. haemolyticus*, dok je jedan izolat identifikovan kao *S. cohnii ssp.cohnii*.

Najve i broj izolata je pripadao vrsti *S. haemolyticus* (75%), a najmanji vrsti *S. cohnii ssp.cohnii* (25%), što se može videti na grafikonu 4.



Grafikon 4. Prikaz procentualne zastupljenosti izolovanih vrsta stafilokoka u bolni kom okruženju



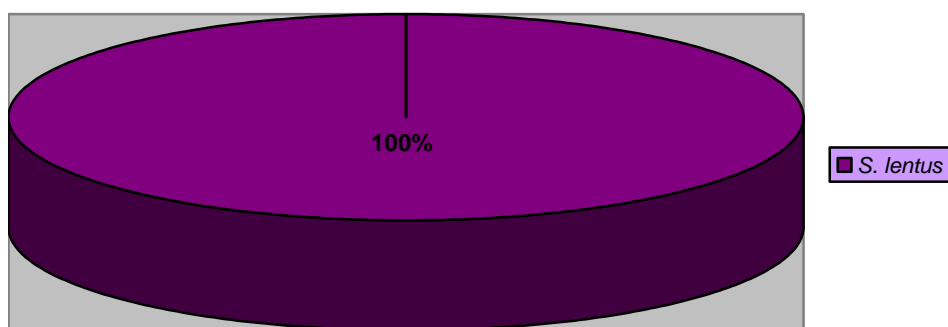
Slika 1. *Staphylococcus haemolyticus*, ID32 STAPH

5.1.4. Identifikacija Staphylococcus vrsta izolovanih iz sireva

Izolovane stafilokoke su identifikovane do vrste primenom sistema ID32 STAPH, BBL Crystal GP i aparata Vitek MS.

Od 8 izolata poreklom iz sireva, primenom sistema ID32 STAPH, 6 izolata je identifikovano kao *S. lentus* (svi sa ta noš u preko 99%), jedan je identifikovan kao *S. sciuri* (98,8%), dok je za jedan izolat dobijeno više mogu nosti (*S. sciuri* 54,8 %, *S. gallinarum* 22,6% i *S. lentus* 22,5%), pa je taj izolat identifikovan primenom sistema BBL Crystal GP kao *S. lentus*. Primenom aparata Vitek MS svi izolati su identifikovani kao *S. lentus*.

Svi izolati su pripadali vrsti *S. lentus* (100%), što se može videti na grafikonu 5.



Grafikon 5. Prikaz procentualne zastupljenosti izolovanih vrsta stafilokoka u sirevima



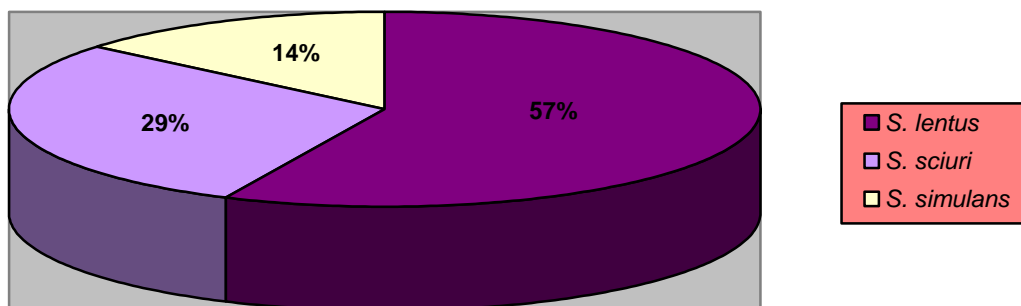
Slika 2. *Staphylococcus lentus*, ID32 STAPH

5.1.5. Identifikacija Staphylococcus vrsta izolovanih iz uzoraka hrane za životinje

Izolovane stafilokoke su identifikovane do vrste primenom sistema ID32 STAPH i aparata Vitek MS.

Od 7 izolata poreklom iz uzoraka hrane za životinje, primenom sistema ID32 STAPH 4 izolata su identifikovana kao *S. lentus*, 2 kao *S. sciuri* i jedan kao *S. simulans*. Ovi izolati su identifikovani i primenom aparata Vitek MS i to 4 kao *S. lentus* i jedan kao *S. simulans*. Ti rezultati su bili identični rezultatima dobijenim primenom sistema ID32 STAPH. Međutim, 2 izolata koja su primenom sistema ID32 STAPH identifikovana kao *S. sciuri*, nisu mogli biti identifikovani primenom aparata Vitek MS.

Najveći broj izolata je pripadao vrsti *S. lentus* (57%), manji broj vrsti *S. sciuri* (29%), a najmanji broj vrsti *S. simulans* (14%), što se može videti na grafikonu 6.



Grafikon 6. Prikaz procentualne zastupljenosti izolovanih vrsta stafilokoka u hrani za životinje



Slika 3. *Staphylococcus sciuri*, ID32 STAPH

5.2. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolovanih sojeva stafilokoka na antibiotike

5.2.1. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike izolovanih Staphylococcus vrsta primenom disk difuzione metode



Slike 4 i 5. Prikaz rezultata ispitivanja osetljivosti stafilokoka na antibiotike dobijenih primenom disk difuzione metode

5.2.1.1. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike Staphylococcus vrsta izolovanih od ljudi primenom disk difuzione metode

Primenom disk difuzione metode, kod svih 14 ispitivanih izolata, utvr ena je rezistencija na penicilin (100%), oksacilin (100%) i cefoksitin (100%). Rezistencija na eritromicin primenom disk difuzione metode je utvr ena kod 9 izolata (64,3%), dok su 2 izolata (14,3%) bila intermedijarno osetljiva na eritromicin. Primenom disk difuzione metode na klindamicin je utvr ena rezistencija kod 4 izolata (28,6%), dok je jedan izolat bio intermedijarno osetljiv (7,1%). Rezistencija na gentamicin je utvr ena kod 8 izolata (57,1%) primenom disk difuzione metode. Kod 3 izolata je utvr ena rezistencija na tetraciklin (21,4%) primenom disk difuzione metode. Rezistencija na vankomicin je utvr ena kod jednog izolata (7,1%) primenom disk difuzione metode.

U tabeli 1 je prikazan ukupan broj izolata stafilokoka rezistentnih na ispitivane antibiotike primenom disk difuzione metode prema vrstama stafilokoka poreklom od ljudi.

Tabela 1. Ukupan broj izolata stafilokoka rezistentnih na antibiotike prikazan prema vrstama

Vrsta	Ukupan broj izolata	P	OX	FOX	E	CC	GM	TE	VA
<i>S. haemolyticus</i>	8	8	8	8	6	2	5	2	1
<i>S. epidermidis</i>	5	5	5	5	2	1	2	1	0
<i>S. aureus</i>	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	14	14	14	14	9	4	8	3	1

* P-penicilin, OX-oksacilin, FOX-cefoksitin, E-eritromicin, CC-klindamicin, GM-gentamicin, TE-tetraciklin, VA-vankomicin

5.2.1.2. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike *Staphylococcus* vrsta izolovanih od životinja primenom disk difuzione metode

Primenom disk difuzione metode svi ispitivani izolati su bili rezistentni na penicilin (100%). Rezistencija na oksacilin i cefoksitin je utvr ena kod 15 izolata (93,75%). Na eritromicin je primenom disk difuzione metode rezistencija utvr ena kod 10 izolata (62,5%). Kod 2 izolata je utvr ena rezistencija na klindamicin (12,5%), dok je jedan izolat bio intermedijarno osetljiv na klindamicin. Na gentamicin je primenom disk difuzione metode utvr ena rezistencija kod 12 izolata (75%), dok je jedan izolat bio intermedijarno osetljiv na gentamicin. Kod 9 izolata je utvr ena rezistencija na tetraciklin (56,25%). Svi ispitivani izolati su bili osetljivi na vankomicin primenom disk difuzione metode.

U tabeli 2 je prikazan ukupan broj izolata stafilokoka rezistentnih na ispitivane antibiotike primenom disk difuzione metode prema vrstama stafilokoka poreklom od životinja.

Tabela 2. Ukupan broj izolata stafilokoka rezistentnih na antibiotike prikazan prema vrstama

Vrsta	Ukupan broj izolata	P	OX	FOX	E	CC	GM	TE	VA
<i>S. haemolyticus</i>	10	10	10	10	7	0	8	6	0
<i>S. pseudintermedius</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	0
<i>S. aureus</i>	1	1	1	1	0	0	1	0	0
<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1	1	0	1	1	0
<i>S. capitis</i>	1	1	1	1	0	0	0	0	0
<i>S. vitulinus</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	16	16	15	15	10	2	12	9	0

* P-penicilin, OX-oksacilin, FOX-cefoksitin, E-eritromicin, CC-klindamicin, GM-gentamicin, TE-tetraciklin, VA-vankomicin

5.2.1.3. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike *Staphylococcus* vrsta izolovanih iz bolni kog okruženja primenom disk difuzione metode

Primenom disk difuzione metode, kod sva 4 izolata je utvr ena rezistencija na penicilin (100%), oksacilin (100%) i cefoksitin (100%). Kod 2 izolata je primenom disk difuzione metode utvr ena rezistencija na eritromicin (50%), dok je jedan izolat bio intermedijarno osetljiv na eritromicin (25%). Na gentamicin su primenom disk difuzione metode bila rezistentna 3 izolata (75%), dok je rezistencija na tetraciklin utvr ena kod jednog izolata (25%). Svi ispitivani izolati su bili osetljivi na klindamicin i vankomicin.

U tabeli 3 je prikazan ukupan broj izolata stafilokoka rezistentnih na ispitivane antibiotike primenom disk difuzione metode prema vrstama stafilokoka poreklom iz bolni kog okruženja.

Tabela 3. Ukupan broj izolata stafilokoka rezistentnih na antibiotike prikazan prema vrstama

Vrsta	Ukupan broj izolata	P	OX	FOX	E	CC	GM	TE	VA
<i>S. haemolyticus</i>	3	3	3	3	2	0	3	0	0
<i>S. cohnii ssp. cohnii</i>	1	1	1	1	0	0	0	1	0
	4	4	4	4	2	0	3	1	0

* P-penicilin, OX-oksacilin, FOX-cefoksitin, E-eritromicin, CC-klindamicin, GM-gentamicin, TE-tetraciklin, VA-vankomicin

5.2.1.4. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike *Staphylococcus* vrsta izolovanih iz sireva primenom disk difuzione metode

Svih 8 izolata *S. lentus* su bili rezistentni na penicilin (100%), oksacilin (100%), cefoksitin (100%) i eritromicin (100%) primenom disk difuzione metode. Na ostale ispitivane antibiotike izolati *S. lentus* su primenom disk difuzione metode bili osetljivi.

U tabeli 4 je prikazan ukupan broj izolata stafilokoka rezistentnih na ispitivane antibiotike primenom disk difuzione metode prema vrstama stafilokoka poreklom iz sira.

Tabela 4. Ukupan broj izolata stafilokoka rezistentnih na antibiotike prikazan prema vrstama

Vrsta	Ukupan broj izolata	P	OX	FOX	E	GM	TE	C	CIP	SXT	VA
<i>S. lentus</i>	8	8	8	8	8	0	0	0	0	0	0

* P-penicilin, OX-oksacilin, FOX-cefoksitin, E-eritromicin, GM-gentamicin, TE-tetraciklin, C-hloramfenikol, CIP-ciprofloksacin, SXT-sulfametoksazol/trimetoprim, VA-vankomicin

5.2.1.5. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike Staphylococcus vrsta izolovanih iz uzoraka hrane za životinje primenom disk difuzione metode

Primenom disk difuzione metode, od 7 izolata poreklom iz hrane za životinje, 4 izolata su bila rezistentna na penicilin (57,1%), cefoksitin (57,1%) i eritromicin (57,1%), na oksacilin bilo rezistentno 6 izolata (85,7%), dok su na ostale ispitivane antibiotike ovi izolati bili osetljivi. Jedan izolat je bio osetljiv na sve ispitivane antibiotike primenom disk difuzione metode.

U tabeli 5 je prikazan ukupan broj izolata stafilokoka rezistentnih na ispitivane antibiotike primenom disk difuzione metode prema vrstama stafilokoka poreklom iz hrane za životinje.

Tabela 5. Ukupan broj izolata stafilokoka rezistentnih na antibiotike prikazan prema vrstama

Vrsta	Ukupan broj izolata	P	OX	FOX	E	GM	TE	C	CIP	SXT	VA
S. lentus	4	4	4	4	4	0	0	0	0	0	0
S. sciuri	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
S. simulans	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	4	6	4	4	0	0	0	0	0	0

* P-penicilin, OX-oksacilin, FOX-cefoksitin, E-eritromicin, GM-gentamicin, TE-tetraciklin, C-hloramfenikol, CIP-ciprofloksacin, SXT-sulfametoksazol/trimetoprim, VA-vankomicin

5.2.2. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolovanih *Staphylococcus* vrsta na oksacilin i cefoksitin primenom mikrodilucione metode u bujonu



Slike 6. i 7. Izgled mikrotitracionih plo a prilikom o itavanja rezultata ispitivanja osetljivosti stafilokoka na cefoksitin i oksacilin dobijenih primenom mikrodilucione metode u bujonu

5.2.2.1. Rezultati ispitivanja osetljivosti na oksacilin i cefoksitin *Staphylococcus* vrsta poreklom od ljudi primenom mikrodilucione metode u bujonu

Primenom mikrodilucione metode u bujonu kod 8 izolata *S. haemolyticus* vrednosti MIK oksacilina su se kretale od 64 $\mu\text{g/ml}$ do preko 128 $\mu\text{g/ml}$, pri emu su 2 izolata imala vrednost MIK 64 $\mu\text{g/ml}$ i 128 $\mu\text{g/ml}$, dok je ostalih 6 izolata imalo vrednosti MIK oksacilina ve e od 128 $\mu\text{g/ml}$. Kod 5 izolata *S. epidermidis*, vrednosti MIK oksacilina su se kretale od 4 $\mu\text{g/ml}$ do preko 128 $\mu\text{g/ml}$, pri emu su 2 izolata imala vrednost MIK 8 $\mu\text{g/ml}$, dok su ostala 3 imala vrednosti MIK 4 $\mu\text{g/ml}$, 64 $\mu\text{g/ml}$ i preko 128 $\mu\text{g/ml}$. Vrednost MIK oksacilina kod jedinog izolata *S. aureus* je iznosila 8 $\mu\text{g/ml}$.

Primenom mikrodilucione metode u bujonu kod 8 izolata *S. haemolyticus* vrednosti MIK cefoksitina su se kretale od 16 $\mu\text{g/ml}$ do preko 256 $\mu\text{g/ml}$, pri emu su 3 izolata imala vrednost MIK cefoksitina 16 $\mu\text{g/ml}$, 32 $\mu\text{g/ml}$ i 256 $\mu\text{g/ml}$, dok je ostalih 5 izolata imalo vrednost MIK cefoksitina preko 256 $\mu\text{g/ml}$. Kod 5 izolata *S. epidermidis*, vrednosti MIK cefoksitina su se kretale od 16 $\mu\text{g/ml}$ do 256 $\mu\text{g/ml}$, pri emu su vrednosti MIK cefoksitina za 3 izolata iznosile 16 $\mu\text{g/ml}$, dok su ostala 2 imala vrednosti MIK cefoksitina 32 $\mu\text{g/ml}$ i 256 $\mu\text{g/ml}$. Vrednost MIK cefoksitina kod izolata *S. aureus* je iznosila 32 $\mu\text{g/ml}$.

5.2.2.2. Rezultati ispitivanja osetljivosti na oksacilin i cefoksitin Staphylococcus vrsta poreklom od životinja primenom mikrodilucione metode u bujonu

Primenom mikrodilucione metode u bujonu kod 10 izolata *S. haemolyticus* vrednosti MIK oksacilina su se kretale od 64 µg/ml do 128 µg/ml, pri čemu su 2 izolata imala vrednost MIK oksacilina 64 µg/ml, a kod ostalih 8 izolata vrednost MIK oksacilina je iznosila 128 µg/ml. Kod 2 izolata *S. pseudintermedius* vrednost MIK oksacilina je bila ista za oba izolata i iznosila je preko 128 µg/ml. Vrednost MIK oksacilina kod izolata *S. epidermidis* je iznosila 8 µg/ml. Kod izolata *S. aureus* vrednost MIK oksacilina je iznosila 32 µg/ml. Vrednost MIK oksacilina kod izolata *S. capitis* je iznosila 32 µg/ml primenom mikrodilucione metode u bujonu. Kod izolata *S. vitulinus* vrednost MIK oksacilina je iznosila 0,5 µg/ml.

Primenom mikrodilucione metode u bujonu kod 10 izolata *S. haemolyticus* vrednosti MIK cefoksitina su se kretale od 8 µg/ml do preko od 256 µg/ml, pri čemu su 4 izolata imala vrednost MIK cefoksitina 64 µg/ml, po 2 izolata su imala vrednost MIK cefoksitina 32 µg/ml, dok su ostala 2 imala vrednost MIK cefoksitina 8 µg/ml i 16 µg/ml. Kod 2 izolata *S. pseudintermedius* vrednosti MIK cefoksitina su iznosile 16 µg/ml i 32 µg/ml. Vrednost MIK cefoksitina kod izolata *S. epidermidis* je iznosila 64 µg/ml. Kod izolata *S. aureus* vrednost MIK cefoksitina je iznosila 64 µg/ml. Vrednost MIK cefoksitina kod izolata *S. capitis* je iznosila 32 µg/ml primenom mikrodilucione metode u bujonu. Kod izolata *S. vitulinus* vrednost MIK cefoksitina je iznosila 1 µg/ml.

5.2.2.3. Rezultati ispitivanja osetljivosti na oksacilin i cefoksitin Staphylococcus vrsta izolovanih iz bolni kog okruženja primenom mikrodilucione metode u bujonu

Primenom mikrodilucione metode u bujonu vrednosti MIK oksacilina za sva 3 izolata *S. haemolyticus* bile su veće od 128 µg/ml. Za izolat *S. cohnii* ssp. *cohnii* vrednost MIK oksacilina je bila veća od 128 µg/ml. Vrednosti MIK cefoksitina kod 2 izolata *S. haemolyticus* su bile veće od 256 µg/ml, dok je kod jednog izolata vrednost MIK iznosila 256 µg/ml. Primenom mikrodilucione metode u bujonu kod *S. cohnii* ssp. *cohnii* vrednost MIK cefoksitina iznosila je 64 µg/ml.

5.2.2.4. Rezultati ispitivanja osetljivosti na oksacilin i cefoksitin Staphylococcus vrsta izolovanih iz sireva primenom mikrodilucione metode u bujonu

Primenom mikrodilucione metode u bujonu kod 8 izolata *S. lentus* vrednosti MIK oksacilina kretale su se od 32 µg/ml do 128 µg/ml, od čega je za jedan izolat vrednost MIK oksacilina bila 32 µg/ml, za 4 izolata 64 µg/ml i za 3 128 µg/ml.

Kod izolata *S. lentus* vrednosti MIK cefoksitina su se kretale od 16 µg/ml do 32 µg/ml, od čega je kod 5 izolata vrednost MIK cefoksitina iznosila 16 µg/ml, dok je kod 3 izolata iznosila 32 µg/ml primenom mikrodilucione metode u bujonu.

5.2.2.5. Rezultati ispitivanja osetljivosti na oksacilin i cefoksitin Staphylococcus vrsta izolovanih iz hrane za životinje primenom mikrodilucione metode u bujonu

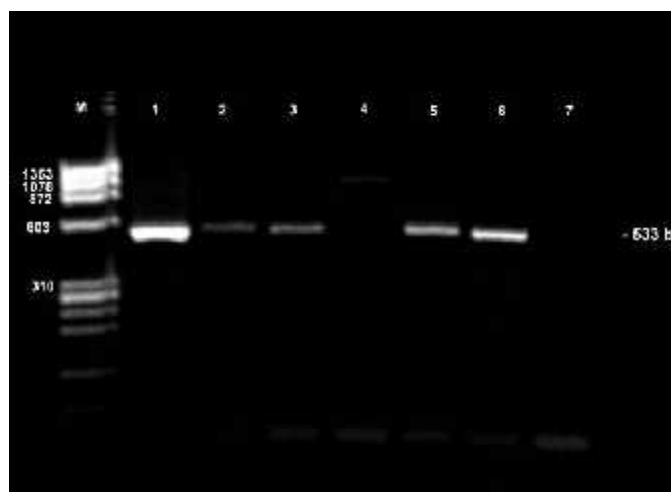
Primenom mikrodilucione metode u bujonu vrednosti MIK oksacilina kod 4 izolata *S. lentus* kretale su se od 4 µg/ml do 64 µg/ml, od čega su za 2 izolata vrednosti MIK bile 4 µg/ml, a za 2 izolata 64 µg/ml. Kod 2 izolata *S. sciuri* vrednosti MIK oksacilina su iznosile 0,5 µg/ml i 1 µg/ml. Primenom mikrodilucione metode u bujonu kod izolata *S. simulans* vrednost MIK oksacilina je iznosila 0,5 µg/ml.

Primenom mikrodilucione metode u bujonu za sva 4 izolata *S. lentus* vrednost MIK cefoksitina je iznosila 16 µg/ml. Kod oba izolata *S. sciuri* vrednost MIK cefoksitina je iznosila 2 µg/ml. Primenom mikrodilucione metode u bujonu kod izolata *S. simulans* vrednost MIK cefoksitina je iznosila 4 µg/ml.

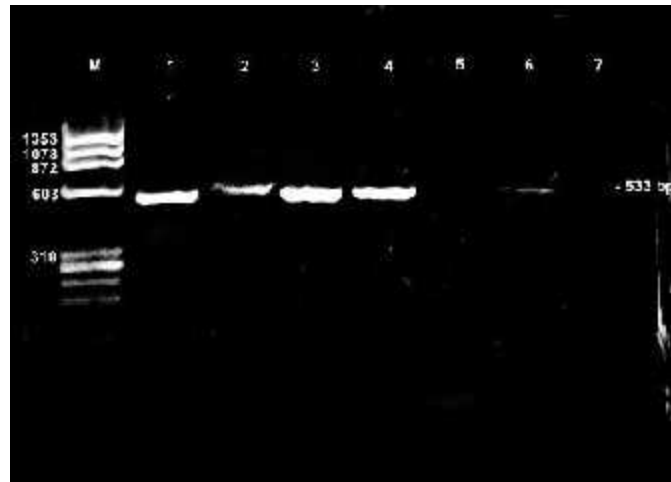
5.3. Rezultati ispitivanja prisustva PBP2a primenom lateks aglutinacionog testa i prisustva *mecA* gena primenom metode PCR



Slike 8. i 9. Prikaz pozitivne reakcije lateks aglutinacije na prisustvo PBP2a kod izolovanih stafilokoka



Slika 10. Elektroforeza u agaroznom gelu amplifikovanog fragmenta *mecA* gena veli ine 533-bp: M- X174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9; 1-3 *mecA* pozitivni izolati *S. haemolyticus*;4- *mecA* negativan izolat; 5- *mecA* pozitivan izolat *S. capitis*; 6- pozitivna kontrola MRSA ATCC 43300; 7- negativna kontrola *S. aureus* ATCC 25923



Slika 11. Elektroforeza u agaroznom gelu amplifikovanog fragmenta *mecA* gena veli ine 533-bp: M- X174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9.Od 1-4 *mecA* pozitivni izolati *S. lentus* iz sireva (1-3) i hrane za životinje (4); 5- *mecA* negativan izolat; 6- pozitivna kontrola MRSA ATCC 43300; 7- negativna kontrola *S. aureus* ATCC 25923

Svih 8 izolata *S. haemolyticus* poreklom od ljudi je primenom lateks aglutinacionog testa bilo pozitivno na prisustvo PBP2a i kod 6 izolata *S. haemolyticus* je utvr eno prisustvo *mecA* gena primenom metode PCR, dok kod 2 izolata nije detektovan *mecA* gen. Kod svih 5 izolata *S. epidermidis* poreklom od ljudi primenom lateks aglutinacionog testa dobijena je pozitivna reakcija aglutinacije na prisustvo PBP2a i kod svih je detektovano prisustvo *mecA* gena primenom metode PCR. Kod jedinog izolata *S. aureus* poreklom od ljudi, primenom lateks aglutinacionog testa dobijena je pozitivna reakcija aglutinacije na prisustvo PBP2a, a primenom metode PCR utvr eno je prisustvo *mecA* gena.

Kod svih 10 izolata *S. haemolyticus* poreklom od životinja primenom lateks aglutinacionog testa dobijene su pozitivne reakcije aglutinacije na prisustvo PBP2a, a primenom metode PCR kod svih 10 izolata detektovano je prisustvo *mecA* gena. Kod oba izolata *S. pseudintermedius* reakcija aglutinacije je bila pozitivna na prisustvo PBP2a i oba izolata su bila pozitivna na prisustvo *mecA* gena primenom metode PCR. Kod jedinog izolata *S. epidermidis* poreklom od životinja, reakcija aglutinacije je bila pozitivna na prisustvo PBP2a, a utvr eno je i prisustvo *mecA* gena primenom metode PCR. Izolat *S. aureus* je bio pozitivan na prisustvo PBP2a primenom lateks aglutinacionog testa i pozitivan na prisustvo *mecA* gena primenom metode PCR.

Primenom lateks aglutinacionog testa kod izolata *S. capitis* je dobijena pozitivna reakcija aglutinacije na prisustvo PBP2a i primenom metode PCR je utvr eno prisustvo *mecA* gena. Kod izolata *S. vitulinus* nije dobijena pozitivna reakcija aglutinacije na prisustvo PBP2a, nije utvr eno ni prisustvo *mecA* gena primenom metode PCR.

Od izolata poreklom iz bolni kog okruženja, sva 3 izolata *S. haemolyticus* su bila pozitivna na prisustvo PBP2a primenom lateks aglutinacionog testa, dok je prisustvo *mecA* gena utvr eno samo kod jednog izolata primenom metode PCR. Kod izolata *S. cohnii ssp.cohnii* reakcija aglutinacije je bila negativna na prisustvo PBP2a, dok je primenom metode PCR utvr eno prisustvo *mecA* gena.

Svih 8 izolata *S. lentus* poreklom iz sireva je dalo pozitivnu reakciju aglutinacije primenom lateks aglutinacionog testa i svi su primenom metode PCR bili pozitivni na prisustvo *mecA* gena.

Kod sva 4 izolata *S. lentus* poreklom iz hrane za životinje, reakcija aglutinacije na prisustvo PBP2a je bila pozitivna i svi izolati su bili pozitivni na prisustvo *mecA* gena primenom metode PCR. Reakcija lateks aglutinacije na prisustvo PBP2a je kod oba izolata *S. sciuri* poreklom iz hrane za životinje bila pozitivna i primenom metode PCR je detektovano prisustvo *mecA* gena kod oba izolata. Kod jedinog izolata *S. simulans* poreklom iz hrane za životinje primenom lateks aglutinacionog testa nije dobijena pozitivna reakcija aglutinacije na prisustvo PBP2a, a nije utvr eno ni prisustvo *mecA* gena primenom metode PCR.

6. DISKUSIJA

Sa dijagnosti kog i klini kog stanovišta od suštinskog značaja je napraviti jasnu razliku između vrsta CoNS i CoPS. Kada su u pitanju klinički izolati od ljudi, *S. aureus* je dominantan predstavnik CoPS, dok se kod životinja ovaj dio ispitivanja komplikuje, jer postoji veliki broj vrsta koje su koagulaza-pozitivne. U nekim namirnicama se utvrđuje prisustvo CoPS kao grupe, pa se dalja identifikacija i ne izvodi. Identifikacija do nivoa vrste koagulaza-negativnih stafilokoka za koje se utvrdi da su uzročnici infekcija bi trebala da bude uobičajena. Međutim, u praksi to nije uvijek moguće, jer većina mikrobioloških laboratorija koje se bave rutinskom dijagnostikom nije adekvatno opremljena da bi mogla da se izvede identifikacija stafilokoka do vrste. Tokom poslednjih godina, zahvaljujući i metodama molekularne genetike, identifikovan je veliki broj novih vrsta stafilokoka (2001-2014: 12 novih vrsta) (Becker i sar., 2014), što još više komplikuje njihovu identifikaciju. Komercijalni sistemi za identifikaciju, kao što su ID32 STAPH (bioMérieux, Francuska) i BBL Crystal Gram-Positive ID Kit (Becton Dickinson, SAD), u svojim bazama podataka nemaju informacije o svim vrstama stafilokoka, što onemogućava identifikaciju određenog broja vrsta ili dovodi do pogrešne identifikacije. S druge strane, većina komercijalnih sistema ima baze podataka zasnovane na zastupljenosti određenih vrsta stafilokoka kod ljudi, što predstavlja problem u identifikaciji nekih sojeva koji ne potiču od ljudi.

Još jedan razlog koji nameće neophodnost adekvatne identifikacije vrsta su vrednosti unutar interpretativnih kategorija (dijametar zone inhibicije i/ili minimalne inhibitorne koncentracije) za pojedine antibiotike, koje su različite za određene vrste stafilokoka. Do 2005. godine, CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) je u svojim standardima razlikovao kod ispitivanja osetljivosti stafilokoka na oksacilin i cefoksitin, dve grupe stafilokoka, *S. aureus* i CoNS, da bi se 2005. godine uz *S. aureus* našao i *S. lugdunensis* (CLSI, 2005). Evropski komitet za ispitivanje osetljivosti mikroorganizama na antimikrobne lekove (EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) je 2013. godine u grupu koja je imala dva člana *S. aureus* i *S. lugdunensis* dodao i *S. saprophyticus*, nasuprot ostalim CoNS kada je u

pitanju testiranje osetljivosti stafilokoka na cefoksitin (EUCAST, 2013). EUCAST je 2014. godine dodao još jednu grupu u kojoj se nalazi *S. pseudintermedius* (EUCAST, 2014). Vrednosti dijametra zone inhibicije se značajno razlikuju između u navedenih grupa, što ukazuje na neophodnost tačne identifikacije, da ne bi došlo do pojave grešaka u interpretaciji rezultata ispitivanja osetljivosti na antibiotike.

Kombinovanje različitih metoda molekularne genetike, kao i primena MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry) zamenjuju identifikaciju stafilokoka na osnovu biohemijskih karakteristika i primenu komercijalnih i automatizovanih sistema (Becker i sar., 2014).

Jedini izolat *S. aureus* poreklom od ljudi je bilo teško identifikovati. Izolat je bio koagulaza-negativan, a primenom ID32 STAPH sistema identifikovan je kao *S. aureus* (87,3%), dok je primenom BBL Crystal GP sistema identifikovan kao *S. haemolyticus*. Zbog razlika u rezultatima identifikacije, još dva puta je ponovljena identifikacija primenom BBL Crystal GP sistema i oba puta je izolat identifikovan kao *Enterococcus faecalis*. S obzirom na veliko neslaganje u dobijenim rezultatima, izolat je identifikovan primenom aparata Vitek MS kao *S. aureus* (85,6%). Jedan izolat poreklom iz namirnica primenom ID32 STAPH je identifikovan kao *S. sciuri*, dok je primenom aparata Vitek MS ovaj izolat identifikovan kao *S. lentus*. S druge strane, primenom aparata Vitek MS nisu identifikovana 2 izolata, koja su primenom ID32 STAPH identifikovana kao *S. sciuri*. Identifikacija primenom aparata Vitek MS je zavisna od baze koja se koristi, jer se u nekim bazama ne nalaze sve vrste stafilokoka. Ipak, smatra se da primena aparata Vitek MS u mikrobiologiji omogućava pouzdaniju identifikaciju stafilokoka od fenotipskih metoda (Carbonnelle i sar., 2012; Becker i sar., 2014).

Meticilin-rezistentne CoNS izazivaju ozbiljne infekcije kod životinja i predstavljaju terapijski izazov. U jednom istraživanju (Kern i Perreten, 2013), od životinja (pasa, mačaka i konja) su izolovane CoNS koje su u najvećem broju identifikovane kao *S. haemolyticus* i *S. epidermidis*, a značajne su i kao uzročnici nozokomijalnih infekcija kod ljudi. Meticilin-rezistentne CoNS izolovane od životinja su vrlo heterogena grupa, za razliku od meticilin-rezistentnih sojeva *S. pseudintermedius* koji se šire kao specifični klonovi. I meticilin-rezistentni sojevi CoNS i meticilin-rezistentni sojevi *S. pseudintermedius* poseduju specifične gene rezistencije i rezistentni su na

iste klase antibiotika (fluorohinolone, makrolide, linkozamide i aminoglikozide), što ukazuje na njihovu selekciju estom primenom antibiotika kod životinja, jer se ove klase antibiotika, a posebno -laktami i fluorohinoloni, naj eš e upotrebljavaju u veterinarskoj praksi. Upotreba antibiotika na empirijskoj osnovi je vrlo verovatno doprinela selekciji meticilin-rezistentnih CoNS, koje nisu u svim slu ajevima prouzrokovale i infekcija, što ukazuje na veliki zna aj postavljanja korektne dijagnoze i antibiograma. Multirezistencija kod CoNS predstavlja problem za le enje infekcija kod životinja. Geneti ki udaljeni sojevi izolovani od životinja sa klini ki manifestnim infekcijama, ukazuju na postojanje mnogo razli itih rezervoara koji nisu povezani sa bolnicama. Rezervoari mogu biti same životinje, vlasnici životinja i ljudi koji rade sa životinjama, koji mogu biti kolonizovani sojevima meticilin-rezistentnih CoNS koje se dalje mogu preneti na životinje. Prisustvo klonova koji su sli ni onima koji izazivaju infekcije kod ljudi, naglašava važnost nadzora nad bakterijskim infekcijama i ukazuje na potrebu za uvo enjem programa za kontrolu infekcija, kao i na pažljivu upotrebu antibiotika u veterini (Kern i Perreten, 2013).

U ovom ispitivanju jedan izolat identifikovan kao *S. haemolyticus* poreklom od ljudi je primenom disk difuzione metode bio rezistentan na vankomicin. Dobijeni rezultati su interpretirani prema preporukama CLSI iz 2008. godine. Osetljivost stafilokoka na vankomicin se prema novim preporukama (CLSI, 2014) ne ispituje primenom disk difuzione metode, jer se ovom metodom ne mogu razlikovati sojevi CoNS koji su osetljivi, intermedijarno osetljivi i rezistentni na vankomicin, jer svi mogu dati sli ne zone inhibicije oko diska vankomicina.

Zabeležen je transfer rezistencije na meticilin izme u *S. haemolyticus* i *S. aureus*, kada je *S. haemolyticus* ozna en kao verovatan donor SCC*mec* elementa, što je dovelo do izbijanja epidemije u jedinici intenzivne nege na odeljenju neonatologije u jednoj bolnici u Švedskoj (Berglund i Soderquist, 2008).

Fenotipska detekcija rezistencije na meticilin (oksacilin) kod CoNS predstavlja problem, jer se kod CoNS javlja heterogena ekspresija *mecA* gena (Chambers, 1988; Swenson i Tenover, 2005 ; Stepanovi i sar., 2006 ; Join-Lambert i sar., 2007). Heterogenost je mnogo eš a kod sojeva CoNS nego kod sojeva *S. aureus*. Dodatak NaCl u hranjive podloge i inkubacija na temperaturi od 30⁰C ili izlaganje -laktamskim antibioticima, dovodi do poja ane ekspresije rezistencije stafilokoka na meticilin. Sojevi

koji ispoljavaju heterogenu rezistenciju na meticilin pri inkubaciji na temperaturi od 37⁰C, mogu ispoljavati homogenu rezistenciju na meticilin pri inkubaciji na temperaturi od 30⁰C ili sa dodatkom NaCl u hranljivu podlogu. Pojava ekspresije rezistencije na meticilin može biti suprimirana pri pH vrednostima podloge od 5,2 ili pri inkubaciji na temperaturi od 43⁰C. Sojevi kod kojih je rezistencija na meticilin homogeno ekspimirana mogu biti potpuno osetljivi na β -laktamske antibiotike pod ovim uslovima. Ekspresija rezistencije na meticilin koja se menja u odnosu na pH vrednost podloge, koncentraciju NaCl u podlozi ili temperaturu inkubacije je fenotipska. Sojevi kod kojih se rezistencija homogeno ekspimirana, pri vrednosti podloge pH 5,2 mogu biti osetljivi na meticilin, ali kada se pH podloge podigne na 7,0, rezistencija na meticilin se homogeno ekspimirana. Niska temperatura inkubacije i prisustvo NaCl u podlozi pojačavaju ekspresiju rezistencije delovanjem na osetljivu supopulaciju elija, ali ne i na rezistentnu. Ovi uslovi štite osetljive elije, koje onda mogu da rastu u onim koncentracijama antibiotika koje bi inače bile letalne za njih. Pojava ekspresije rezistencije na antibiotike koja je rezultat pasaže kroz podloge koje sadrže antibiotike se razlikuje od ostalih uslova. Pasaža kroz podloge sa antibioticima eliminiše osetljivu supopulaciju i selektuje homogenu, visoko rezistentnu supopulaciju. Homogeno ekspimirana rezistencija postoji i bez prisustva antibiotika, ali je nestabilna. Sa ponovljenom supkultivacijom u podlogama bez antibiotika, sojevi se vraćaju u heterorezistentnu formu. Različiti uslovi imaju malo uticaja na rezistenciju homogeno rezistentnih sojeva (Chambers, 1988).

Prilikom ispitivanja osetljivosti na oksacilin kod CoNS, osim kod *S. epidermidis*, vrlo često se javljaju problemi zbog neslaganja rezultata dobijenih primenom disk difuzione metode i mikrodilucione metode u bujonu. Interpretativne kategorije za oksacilin imaju uske granice kada su u pitanju CoNS, osim *S. epidermidis*, jer sojevi čije vrednosti MIK oksacilina iznose od 0,5 do 2 μ g/ml ne moraju imati *mecA* gen, pa je preporuka da se takvi izolati, kada su u pitanju ozbiljne infekcije, testiraju na prisustvo PBP2a ili na prisustvo *mecA* gena ili na cefoksitin primenom disk difuzione metode. (CLSI, 2014). To se u ovom istraživanju može videti kod izolata *S. simulans* poreklom iz hrane za životinje i izolata *S. vitulinus* poreklom od životinja, koji su bili *mecA* negativni. Dobijene vrednosti MIK oksacilina kod ovih izolata iznosile su 0,5 i 1 μ g/ml. Prema preporukama CLSI iz 2014. godina, izolati *S. aureus* i CoNS se više ne testiraju na

oksacilin primenom disk difuzione metode, zato što se taj test ne smatra pouzdanim, ve samo primenom mikrodilucione metode u bujonu. Smatra se da je disk difuziona metoda sa cefoksitinom bolja od disk difuzione metode sa oksacilinom za detekciju rezistencije koja je posredovana prisustvom *mecA* gena. Rezultati ispitivanja osetljivosti svih izolovanih vrsta na oksacilin primenom disk difuzione metode u ovom istraživanju su interpretirani prema preporukama CLSI iz 2008. godine. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *S. pseudintermedius* na oksacilin primenom obe metode su interpretirani prema vrednostima datim za CoNS (CLSI 2008. i 2014.), kao i rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *S. pseudintermedius* na cefoksitin primenom disk difuzione metode. Rezultati ispitivanja osetljivosti CoNS i *S. pseudintermedius* na cefoksitin primenom mikrodilucione metode u bujonu su interpretirani prema vrednostima datim za *S. aureus* i *S. lugdunensis* prema preporukama CLSI iz 2014. godine.

S druge strane, kod 2 izolata *S. sciuri* je primenom disk difuzione metode i primenom mikrodilucione metode u bujonu sa oksacilinom otkrivena rezistencija na oksacilin (MIK oksacilina 0,5 i 1 µg/ml). Oba izolata su bila osetljiva na cefoksitin primenom disk difuzione metode i mikrodilucione metode u bujonu, a oba su bila pozitivna na prisustvo PBP2a i kod oba je detektovan *mecA* gen primenom metode PCR. Oba izolata *S. sciuri* su bila osetljiva na penicilin primenom disk difuzione metode. Ovi rezultati se slažu sa podacima iz drugog istraživanja (Huber i sar., 2011), u kome su autori zaklju ili da se primenom disk difuzione metode sa cefoksitinom kod izolata *S. sciuri* iz razli itih uzoraka poreklom od ljudi, životinja i iz namirnica (mesa i mleka) kod kojih je rezistencija na oksacilin iznosila 100%, može detektovati samo 83,7% *mecA* pozitivnih sojeva. Isti autori su zaklju ili da je kod *mecA* pozitivnih izolata *S. sciuri*, 97,8% izolata bilo rezistentno na penicilin. Pošto se smatra da je prevalencija penicilin-osetljivih sojeva stafilokoka niska, preporuka je da se za sojeve koji imaju vrednosti MIK 0,12 µg/ml ili zonu inhibicije 29mm, koristi test za indukciju -laktamaza (nitrocefinski test), pre nego što se soj prijavi kao osetljiv na penicilin (CLSI, 2014). Kod retkih izolata stafilokoka koje imaju gen za produkciju -laktamaza, ovaj test može biti negativan, pa se za ozbiljne infekcije preporu uje metoda PCR za detekciju *blaZ* gena (CLSI, 2014). Prema preporukama koje je dao EUCAST (2015), kada su u pitanju CoNS,

ne preporu uje se testiranje na penicilin, jer se smatra da trenutno dostupne metode ne mogu pouzdano da detektuju produkciju penicilinaza kod njih.

Prilikom primene lateks aglutinacionog testa za detekciju prisustva PBP2a, u ovom ispitivanju je produženo vreme trajanja aglutinacije i rezultati su očitavani i posle 15 minuta, umesto posle 3 minuta, a slični podaci postoje i u literaturi (Yamazumi i sar., 2001; Corso i sar., 2004). Na taj način je eliminisana mogućnost dobijanja lažno negativnih rezultata.

Kod 2 izolata *S. haemolyticus* poreklom od ljudi i 2 izolata *S. haemolyticus* poreklom iz bolničkog okruženja je utvrđena rezistencija na oksacilin i cefoksitin primenom obe metode i primenom lateks aglutinacionog testa na prisustvo PBP2a dobijeni su pozitivni rezultati. Primenom metode PCR, nije detektovano prisustvo *mecA* gena ni kod jednog od ovih izolata. Kod drugih izolata *S. haemolyticus* se dobijeni rezultati slažu, pa je ovo neobičan nalaz. Jedno od objašnjenja bi moglo biti gubitak *mecA* gena, jer je izolat dugo vremena pre izvođenja metode PCR, bio čuvan u frižideru. U literaturi su zabeleženi slučajevi da se kod sojeva *S. aureus* izgubio *mecA* gen nakon skladištenja, ali su uslovi čuvanja bili drugačiji nego u ovom slučaju (van Griethuysen i sar., 2005). Drugo objašnjenje bi moglo biti postojanje nekog drugog alela *mecA* gena (Monecke i sar., 2012). Pod pretpostavkom da *mecA* gen dugo postoji kod stafilokoka koje nisu *S. aureus* ili MRSA, može se očekivati da se mogu detektovati različiti aleli jednog gena i da neki od njih imaju i druge fiziološke uloge, osim uloge u rezistenciji na antibiotike. Uz to je verovatno da postoji više alela nego što se trenutno zna, što ima praktični značaj za izradu različitih testova koji služe za detekciju ili potvrdu *mecA* gena, odnosno PBP2a kao markera za rezistenciju na meticilin u rutinskoj kliničkoj dijagnostici. Aleli koji dovode do rezistencije možda ne bi mogli biti detektovani zbog polimorfizma koji utiče na mesta vezivanja za prajmere ili na epitope antitela. Moguće prisustvo *mecA* alela i odgovarajućih PBP2a varijanti koji nisu povezani sa rezistencijom može dati lažno pozitivne rezultate primenom dijagnostičkih testova. Prema tome, prisustvo različitih *mecA* alela, posebno kod CoNS, se mora imati na umu kada se dizajniraju dijagnostički testovi za detekciju *mecA* gena ili PBP2a (Monecke i sar., 2012).

Kod jedinog izolata *S. cohnii* iz bolničkog okruženja je detektovana rezistencija na oksacilin i cefoksitin primenom obe metode. Izolat je posedovao *mecA* gen što je

detektovano primenom metode PCR, dok je primenom lateks aglutinacionog testa ovaj izolat bio negativan na prisustvo PBP2a. Isti rezultat su dobili i drugi autori (Nowak i sar., 2006). U istraživanju koje je sprovedeno u Poljskoj, ispitivani su sojevi CoNS izolovani iz bolni ke sredine (Nowak i sar., 2006). Najve i broj izolata u ovom istraživanju je pripadao vrsti *S. cohnii*. Kod 6 izolata *S. cohnii* je detektovana rezistencija na oksacilin i cefoksitin primenom disk difuzione metode sa oksacilinom i cefoksitinom i agara sa oksacilinom, a prisustvo *mecA* gena je utvr eno primenom metode PCR. Lateks aglutinacioni test na prisustvo PBP2a je bio negativan kod svih 6 izolata, iako je izvršena indukcija rezistencije.

Kada su u pitanju CoNS, detekcija rezistencije na osnovu primene samo jednog antibiotika ili jedne metode je nepouzdana. este promene preporuka za testiranje osetljivosti stafilokoka na antibiotike govore u prilog tome da se o mehanizmima rezistencije još uvek mnogo toga ne zna. S druge strane, upotreba metoda kao što su lateks aglutinacija za detekciju prisustva PBP2a ili metoda PCR za detekciju *mecA* gena, ne mogu zameniti fenotipsku detekciju rezistencije, jer u tom slu aju ne bi bilo mogu e detektovati prisustvo *mecC* gena (García-Álvarez i sar., 2011). Zbog navedenih razloga vrlo je zna ajno izvršiti što precizniju fenotipsku detekciju rezistencije, koju je mogu e izvesti u ve ini mikrobioloških laboratorija koje se bave rutinskom dijagnostikom. Adekvatna detekcija osetljivosti i rezistencije ima za cilj da omogu i pravilno le enje pacijenata i da obezbedi što manju upotrebu antibiotika koji se koriste kao poslednja terapijska mogu nost. Klini ke interpretativne kategorije koje je definisao EUCAST nemaju za cilj da detektuju sve mehanizme rezistencije koji bi se mogli javiti kod bakterija, ve su razvijene da bi predvidele klini ki ishod koji bi nastao delovanjem antibiotika (Leclercq, 2013).

Dokazano je da se horizontalni transfer gena rezistencije odigrava u hrani i može biti olakšan sastavom hrane u kojoj se transfer odvija (Resch i sar., 2008), pa lanac ishrane može imati klju nu ulogu u prenošenju gena rezistencije na antibiotike izme u okoline i ljudi, što može predstavljati opasnost po ljudsko zdravlje, posebno ako je u pitanju hrana spremna za konzumiranje (Chaj cka-Wierzchowska i sar., 2015).

7. ZAKLJU CI

1. Utvr eno je dominantno prisustvo vrste *Staphylococcus haemolyticus* kod izolovanih sojeva poreklom od ljudi, bolesnih životinja i iz bolni kog okruženja.
2. Dominantno prisustvo koagulaza-negativnih stafilokoka, a posebno vrste *Staphylococcus lentus* utvr eno je kod sojeva izolovanih iz sireva i iz hrane za životinje.
3. Primenom metode PCR utvr eno je prisustvo *mecA* gena kod ukupno 43 soja (87,75%) i oni su kategorizovani kao meticilin rezistentne stafilokoke.
4. Svi sojevi stafilokoka izolovani iz sireva kod kojih je bila detektovana rezistencija na oksacilin i cefoksitin, pripadali su kategoriji meticilin rezistentnih stafilokoka.
5. Kod 95,35% sojeva koji su bili pozitivni na prisustvo *mecA* gena, prethodno je bila utvr ena rezistencija na oksacilin i cefoksitin, kako u disk difuzionoj metodi, tako i u mikrodilucionoj metodi u bujonu.
6. Kod 4 soja *Staphylococcus haemolyticus* (8,2% od ukupnog broja sojeva) poreklom od ljudi i iz bolni kog okruženja, detektovana je rezistencija na oksacilin i cefoksitin, kao i prisustvo PBP2a, ali su ovi sojevi bili negativni na prisustvo *mecA* gena.
7. Kod 2 soja koagulaza-negativnih stafilokoka poreklom od životinja i iz hrane za životinje, kod kojih je detektovana rezistencija na oksacilin i osetljivost na cefoksitin, nije detektovan *mecA* gen.
8. Kod svih izolata koji su pripadali vrstama *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lentus* i *Staphylococcus capitis* svi dobijeni rezultati svim koriš enim metodama se podudaraju.

8. SPISAK LITERATURE

1. Aarestrup F.M., 2006. Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin, ASM Press
2. Antignac A., Tomasz A., 2009. Reconstruction of the Phenotypes of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Replacement of the Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* with a Plasmid-Borne Copy of *Staphylococcus sciuri pbpD* Gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 435-441
3. Bagcigil F.A., Moodley A., Baptiste K.E., Jensen V.F., Guardabassi L., 2007. Occurrence, species distribution, antimicrobial resistance and clonality of methicillin- and erythromycin-resistant staphylococci in the nasal cavity of domestic animals. *Vet. Microbiol.* 121: 307-315
4. Becker K., Heilmann C., Peters G., 2014. Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 27(4): 870-926
5. Berglund C., Soderquist B., 2008. The origin of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate at a neonatal ward in Sweden - possible horizontal transfer of a staphylococcal cassette chromosome *mec* between methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 14(11): 1048-1056
6. Bhargava K., Zhang Y., 2014. Characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCoNS) in retail meat. *Food Microbiol.* 42: 56-60
7. Bockelmann W., Krusch U., Engel G., Klijn N., Smit G., Heller K.J., 1997. The microflora of Tilsit cheese. Part 1. Variability of the smear flora. *Food/Nahrung.* 41(4): 208-212.
8. Bond R., Loeffler A., 2012. What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. *J. Small Anim. Pract.* 53: 147-154
9. Boucher H.W., Corey G.R., 2008. Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 46(S5): 344-349

10. Bremis D.A., Jones R.D., Hiatt L.E., Ofori E.D., Rohrbach B.W., Frank L.A., Kania S.A., 2006. Comparison of tests to detect oxacillin resistance in *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi* and *Staphylococcus aureus* isolates from canine hosts. *J. Clin. Microbiol.* 44: 3374-3376
11. Broekema N.M, Van T.T., Monson T.A., Marshall S.A., Warshauer D.M., 2009. Comparison of Cefoxitin and Oxacillin Disk Diffusion Methods for Detection of *mecA*-Mediated Resistance in *Staphylococcus aureus* in a Large-Scale Study. *J. Clin. Microbiol.* 47: 217-219
12. Butaye P., Cloeckaert A., Schwarz S., 2003. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 22(3): 205-210
13. Butaye P., van Duijkeren E., Prescott J.F., Schwarz S., 2014. Antimicrobial resistance in bacteria from animals and environment. *Vet. Microbiol.* 171: 269-272
14. Carbonnelle E., Greub G., Vila J., 2012. MALDI-TOF in microbiology. In: Cornaglia G., Courcol R., Herrmann J.L, Kahlmeter G., Peigue-Lafeuille H., Vila J. (Eds). *European Manual of Clinical Microbiology*, first edition. ESCMID, SFM
15. Chaj cka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Nalepa B., Sierpi ska M., Łaniewska-Trokenheim L., 2015. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin - Phenotypic and genotypic antibiotic resistance. *Food Microbiol.* 46: 222-226
16. Chambers H.F. 1988. Methicillin-Resistant Staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 173-186
17. Chambers H.F., 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 781-791
18. Chambers H.F., DeLeo F.R., 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 629-641
19. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA

20. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement. M100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
21. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
22. Connell S.R., Tracz D.M., Nierhaus K.H., Taylor D.E., 2003. Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(12): 3675–3681
23. Corso A., Soloaga R., Faccione D., Gagetti P., Corbella S., Iglesias M., Galas M., 2004. Improvement of a latex agglutination test for the evaluation of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 50: 223-225
24. Couto I., Wu S.W., Tomasz A., de Lencastre H., 2003. Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of the *mecA* homologue native to *S. sciuri*. *J. Bacteriol.* 185: 645-653
25. Crombé F., Argudín M.A., Vanderhaeghen W., Hermans K., Haesebrouck F., Butaye P., 2013. Transmission dynamics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Front. Microbiol.* 4: 57
26. Crossley, Kimberly K. Jefferson, Gordon Archer, Vance G. Fowler, Jr., 2009. Staphylococci in Human Disease, 2nd edition. Blackwell Publishing
27. Deurenberg R. H, Vink C, Kalenic S., Friedrich A.W., Bruggeman C.A. and Stobberingh E.E. 2007. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 222–235
28. Doyle M.E., Hartmann F.A., Lee Wong A.C., 2012. Methicillin-resistant staphylococci: implications for our food supply? *Anim Health Res Rev.* 13(2): 157-180
29. EFSA, Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission, 2009. Assessment of the Public Health significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. *The EFSA Journal.* 993: 1-73

30. EFSA. Scientific report of EFSA, 2012. Technical specifications on the harmonised monitoring and reporting of antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food-producing animals and food. *The EFSA Journal*. 10(10): 2897
31. EUCAST, 2013. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1, 2013. <http://www.eucast.org>.
32. EUCAST, 2014. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014. <http://www.eucast.org>
33. Ferreira R.B.R. Iorio N.L.P., Malvar K.L., Nunes A.P.F., Fonseca L.S., Bastos C.C.R., Santos K.R.N., 2003. Coagulase-Negative Staphylococci: Comparison of Phenotypic and Genotypic Oxacillin Susceptibility Tests and Evaluation of the Agar Screening Test by Using Different Concentrations of Oxacillin. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3609–3614
34. Fleer A., Verhoef J., 1984. New aspects of staphylococcal infections: emergence of coagulase-negative staphylococci as pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek*. 50: 729-744
35. García-Álvarez L., Holden T.G.M., Lindsay H., Webb C.R., Brown D.F.J., Curran M.D., Walpole E., Brooks K., Pickard D.J., Teale C., Parkhill J., Bentley S.D., Edwards G.F., Girvan E.K., Kearns A.M., Pichon B., Hill R.L.R., Larsen A.R., Skov R.L., Peacock S.J., Maskell D.J., Holmes M.A., 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study, *The Lancet Infect Dis*. 11: 595-603
36. Georgopapadakou N.H., 1993. Penicillin-Binding and Bacterial Resistance to - Lactams - Minireview. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 2045-2053
37. Goldman E., Green. L.H., 2009. Practical handbook of microbiology, second edition. Taylor & Francis Group
38. Gordon R.J., Lowy F.D., 2008. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin. Infect. Dis.* 46(S5): 350-359

39. Götz F., Bannerman T., Schleifer K.H., 2006. The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (eds.): The Prokaryotes, third edition. Springer, Berlin. 4: 5-75
40. Guardabassi L., Schwarz S., Lloyd D.H., 2004. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 54: 321-332
41. Hanssen A.M., Kjeldsen G., Sollid J.U., 2004. Local variants of Staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci*: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 285-296
42. Hartman B.J., Tomasz A., 1986. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26: 85-92
43. Hauschild T., Stepanovi S., Zakrzewska-Czerwi ska J., 2010. *Staphylococcus stepanovicii* sp.nov., a novel novobiocin-resistant oxidase-positive staphylococcal species isolated from wild small mammals. *Syst Appl Microbiol.* 33(4): 183-187
44. Hill, L. R. 1981. Taxonomy of the staphylococci. In: MacDonald A. and Smith G. (ed.): The staphylococci. Aberdeen University Press, Ltd., Aberdeen. 33- 62
45. Hiramatsu K., Cui L., Kuroda M., Ito T., 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 9: 486-493
46. Hiramatsu K., Ito T., Tsubakishita S., Sasaki T., Takeuchi F., Morimoto Y., Katayama Y., Matsuo M., Kuwahara-Arai K., Hishinuma T., Baba T., 2013. Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Chemother.* 45(2): 117-136
47. Hryniewicz W., 1999. Epidemiology of MRSA. *Infection* 27(S2): 13-16
48. Huber H., Ziegler D., Pflüger V., Vogel G., Zweifel C., Stephan R., 2011. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, mincead meat, and contact persons. *BMC Vet. Res.* 7: 6
49. Huebner J., Goldmann D.A., 1999. Coagulase-negative staphylococci: Role as Pathogen. *Annu. Rev. Med.* 50: 223-236

50. Hussain Z., Stoakes L., Garrow S., Longo S., Fitzgerald V., Lannigan R. 2000 a. Rapid detection of *mecA*-positive and *mecA*-negative coagulase-negative staphylococci by an anti-penicillin binding protein 2a slide latex agglutination test. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2051–2054
51. Hussain Z., Stoakes L., Massey V., Diagre D., Fitzgerald V., El Sayed S., Lannigan R., 2000 b. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 38: 752-754
52. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC), 2009. Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for Reporting Novel SCC*mec* Elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(12): 4961-4967
53. Irlinger F., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase-negative staphylococci. *Food Microbiol.* 126: 302-310
54. Isenberg H.D., 2004. Detection of Methicillin Resistance in Staphylococci by PCR. In: Clinical Microbiology Procedures Handbook, Vol. 2. ASM Press, Washington DC, USA
55. Ito T., Ma X.X., Takeuchi F., Okuma K., Yuzawa H., Hiramatsu K., 2004. Novel Type V Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Driven by a Novel Cassette Chromosome Recombinase, *ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(7): 2637-2651
56. Ito T., Hiramatsu K., Tomasz A., de Lencastre H., Perreten V., Holden M.T.G., Coleman D.C., Goering R., Giffard P.M., Skov R.L., Zhang K., Westh H., O'Brien F., Tenover F.C., Oliveira D.C., Boyle-Vavra B., Laurent F., Kearns A.M., Kreiswirth B., Soo Ko K., Grundmann H., Sollid J.E., John J.F.Jr., Daum R., Soderquist B., Buistx G. on behalf of the International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC), 2012. Guidelines for Reporting Novel *mecA* Gene Homologues. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(10): 4997-4999
57. John J.F., Harvin A.M., 2007. History and evolution of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci: Susceptibility profiles of new anti-staphylococcal agents. *Ther. Clin. Risk Manag.*, 3(6): 1143–1152

58. Join-Lambert O.F., Clauser S., Guillet C., Jais J.P., Abachin E., Quesnes G., Carbonnelle E., Le Monnier A., Zahar J.R., Kayal S., Berche P., Ferroni A. 2007. Comparison of cefoxitin and moxalactam 30 µg disk diffusion methods for detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 59: 763-766
59. Karakaševi B., 1987. Mikrobiologija i parazitologija. Medicinska knjiga Beograd-Zagreb
60. Kaya E.G., Karakoç E., Ya ci S., Yücel M., 2009. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 3(12): 925-929
61. Kern A., Perreten V., 2013. Clinical and molecular features of methicillin-resistant, coagulase-negative staphylococci of pets and horses. *J. Antimicrob. Chemother.* 68(6): 1256-1266
62. Kim C., Milheiriço C., Gardete S., Holmes M.A., Holden M.T.G., de Lencastre H., Tomasz A., 2012. Properties of a Novel PBP2a Protein Homolog from *Staphylococcus aureus* Strain LGA251 and its Contribution to the -Lactam-resistant Phenotype. *J. Biol. Chem.* 287(44): 36854-36863
63. Kloos W.E., Bannerman T.L., 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 117-140
64. Kluytmans J.A.J.W., 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency? *Clin. Microbiol. Infect.* 16: 11–15
65. Kolá M., Bardo J., Hanulík V., Sauer P., Babák V., Schlegelová J., 2010. Resistance to Methicillin in Coagulase-negative Staphylococci and Its Detection *Acta Vet. Brno.* 79: 261-267
66. Koneman E.W., Winn W.C., Allen S.D., Procop G.W., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Woods G.L., 2006. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, sixth edition. Lippincott Williams & Wilkins

67. Kuroishi T., Komine K., Kai K., Itagaki M., Kobayashi J., Ohta M., Kamata S., Kumagai K., 2003. Concentration and specific antibody to staphylococcal enterotoxin-C and toxic shock syndrome toxin-1 in bovine mammary gland secretion, and inflammatory response to the intramammary inoculation of these toxins. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 899-906
68. Leclercq R., 2009. Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci and enterococci. *Clin. Microbiol. Infect.* 15: 224-231
69. Leclercq R., Canton R., Brown D.F.J., Giske C.G., Heisig P., MacGowan A.P., Mouton J.W., Nordmann P., Rodloff A.C., Rossolini G.M., Soussy C.-J., Steinbakk M., Winstanley T.G., Kahlmeter G., 2013. EUCAST rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Infect.* 19(2): 141-160
70. Levy S.B., 2001. Antibiotic Resistance: Consequences of Inaction. *Clin. Infect. Dis.* 33(S3): 124-129
71. Licitra G., 2013. Etymologia: *Staphylococcus*. *Emerg. Infect. Dis.* 19(9): 1553
72. Lindsay J., Holden M., 2004. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends Microbiol.* 12: 378-385
73. Louie L., Majury A., Goodfellow J., Louie M., Simor A.E., 2001. Evaluation of a Latex Agglutination (MRSA-Screen) for Detection of Oxacillin Resistance in Coagulase-Negative Staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 39: 4149-4151
74. Lowder B.V., Guinane C. M., Ben Zakour N.L., Weinert L.A., Conway-Morris A., Cartwright R.A., Simpson A.J., Rambaut A., Nübel U., Fitzgerald J.R., 2009. Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 19545-19550
75. Malachowa N., DeLeo F.R., 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci.* 67: 3057-3071
76. Matsuoka M., Inoue M., Nakajima Y., Endo Y., 2002. New *erm* gene in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 211-215

77. Medhus A., Schau Slette-meås J., Marstein L., Larssen K.W., Sunde M., 2013. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with the novel *mecC* gene variant isolated from a cat suffering from chronic conjunctivitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 68: 968-969
78. Monecke S., Müller E., Schwarz S., Hotzel H., Ehricht R., 2012. Rapid Microarray-Based Identification of Different *mecA* Allels in Staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(11): 5547-5554
79. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards 2003. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Sixth Edition. M7-A6. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
80. Nowak T., Balcerczak E., Mirowski M., Szewczyk E.M., 2006. Detection of Methicillin Resistance in Hospital Environmental Strains of Coagulase-negative Staphylococci. *Polish J. Microbiol.* 55(4): 339-343
81. Oliveira D.C., Tomasz A., de Lencastre Herminia, 2002. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect. Dis.* 2: 180-189
82. Olsen J.E., Christensen H., Aarestrup F.M., 2006. Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 57: 450-460
83. Paterson G.K., Harrison E.M., Holmes M.A., 2014. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.*, 22(1): 42-47
84. Perazzi B., Fermepin M.R., Malimovka A., García S.D., Orgambide M., Vay C-A., de Torres R., Famiglietti A.M.R., 2006. Accuracy of Cefoxitin Disk Testing for Characterization of Oxacillin Resistance Mediated by Penicillin-Binding Protein 2a in Coagulase-Negative Staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 44: 3634-3639
85. Perreten V., Giampa N., Schuler-Schmid U., Teuber M., 1998. Antibiotic resistance genes in coagulase-negative staphylococci isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.* 21: 113-120

86. Petersen A., Stegger M., Heltberg O., Christensen J., Zeuthen A., Knudsen L.K., Urth T., Sorum M., Schouls L., Larsen J., Skov R., Larsen A.R., 2012. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. *Clin. Microbiol. Infect.* 19: E16-E22
87. Piette A., Verschraegen, 2009. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet. Microbiol.* 134: 45-54
88. Pinto Ferreira J., Correa M.T., Lyman R., Anderson K.L., 2012. A review of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in dairy cattle. *The Bovine Practitioner.* 46(1): 1-9
89. Quinn P.J., Markey B.K., Leonard F.C., FitzPatrick E.S., Fanning S., Hartigan P.J., 2011. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, second edition. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, UK
90. Resch M., Nagel V., Hertel C., 2008. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 127: 99-104
91. Rutland B.E., Weese J.S., Bolin C., Au J., Malani A.N., 2009. Human-to-dog Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* 15(8): 1328-1330
92. Schito G.C. 2006. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 12 (S1): 3-8
93. Simeoni D., Rizzotti L., Cocconcelli P., Gazzola S., Dellaglio F., Torriani S., 2008. Antibiotic resistance genes and identification of staphylococci collected from the production chain of swine meat commodities. *Food Microbiol.* 25: 196-201
94. Stepanovi S., Hauschild T., Daki I., Al-Doori Z., Švabic-Vlahovi M., Ranin L., Morrison D., 2006. Evaluation of phenotypic and molecular methods for detection of oxacillin resistance in members of the *Staphylococcus sciuri* group. *J. Clin. Microbiol.* 44: 934-937

95. Sung J.M-L., Lloyd D.H, Lindsay J.A., 2008. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiol.* 154: 1949-1959
96. Suzuki E., Hiramatsu K., Yokota T., 1992. Survey of methicillin-resistant clinical strains of coagulase-negative staphylococci for *mecA* gene distribution. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 429-434
97. Swenson J.M., Tenover F.C., 2005. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus spp.* *J. Clin. Microbiol.* 43: 3818-3823
98. Swenson J.M., Skov R., Patel J.B. 2007. The cefoxitin disk test - What a clinical microbiologist needs to know. *Clin. Microbiol. Newslett.* 29: 33-40
99. Švabi -Vlahovi M., 2005. Medicinska bakteriologija, Savremena administracija, a.d., Beograd
100. Taponen S., Pyörälä S., 2009. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis – Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet. Microbiol.* 134: 29-36
101. Tenover F.C., Jones R.N., Swenson J.M., Zimmer B., McAllister S., Jorgensen J.H. 1999. Methods for improved detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci: results of multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* 37: 4051-4058
102. Tsubakishita S., Kuwahara-Arai K., Sasaki T., Hiramatsu K., 2010. Origin and Molecular Evolution of the Determinant of Methicillin Resistance in Staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 4352-4359
103. Tulinski P., Fluit A.C., Wagenaar J.A., Mevius D., van de Vijver L., Duim B., 2012. Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci on Pig Farms as a Reservoir of Heterogeneous Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Elements. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(2): 299-304
104. Udo E.E., Mokadas E.M., Al-Haddad A., Mathew B., Jacob L.E., Sanyal S.C., 2000. Rapid detection of methicillin resistance in staphylococci using slide latex agglutination kit. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 15: 19-24

105. van Belkum A., Melles D.C., Peeters J.K., van Leeuwen W.B., van Duijkeren E., Huijsdens X.W., Spalburg E., de Neeling A.J., Verbrugh H.A., Dutch Working Party on Surveillance and Research of MRSA-SOM, 2008. Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 479-483
106. van Duijkeren E., Box A.T.A., Heck M.E.O.C., Wannet W.J.B., Fluit A.C., 2004a. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. *Vet. Microbiol.* 103: 91-97
107. van Duijkeren E., Wolfhagen M.J.H.M., Box T.A., Heck M.E.O.C., Wannet W.J.B., Fluit A.C., 2004b. Human-to-Dog Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* 10(12): 2235-2237
108. van Duijkeren E., Catry B., Greko C., Moreno M.A., Pomba C.M., Pyörälä S., Ružauskas M., Sanders P., Threlfall J.E., Torren-Edo J., Törneke K. [Scientific Advisory Group on Antimicrobials (SAGAM)], 2011. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Antimicrob. Chemother.* 66(12): 2705-2714
109. van Griethuysen A., van Loo I., van Belkum A., Vandenbroucke-Grauls C., Wannet W., van Keulen P., Kluytmans J., 2005. Loss of the *mecA* Gene during Storage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *J. Clin. Microbiol.* 43(3): 1361-1365
110. van Loo I., Huijsdens X., Tiemersma E., de Neeling A., van de Sande-Bruinsma N., Beaujean D., Voss A., Kluytmans J., 2007. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 1834-1839
111. von Eiff C., Peters G., Heilmann C., 2002. Pathogenesis of infection due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect. Dis.* 2: 677-685
112. Vuong C., Otto M., 2002. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect.* 4: 481-489

113. Weese J.S., Dick H., Willey B.M., McGeer A., Kreiswirth B.N., Innis B., Low D.E., 2006. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. *Vet. Microbiol.* 115: 148-155
114. Weese J.S., van Duijkeren E., 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* 140(3-4): 418-29
115. Weisblum B., 1985. Inducible resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin type B antibiotics-the resistance phenotype, its biological diversity, and structural elements that regulate expression- A Review. *J. Antimicrob. Chemother.* 16: 63-90
116. Yamazumi T., Furuta I., Diekema D.J., Pfaller M.A., Jones R.N., 2001. Comparison of the Vitek Gram-Positive Susceptibility 106 Card, the MRSA-Screen Latex Agglutination Test, and *mecA* Analysis for Detecting Oxacillin Resistance in a Geographically Diverse Collection of Clinical Isolates of Coagulase-Negative Staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3633–3636
117. Zhang Y., Wang X., LeJeune J., Zervos M., Bhargava K., 2011. Comparison of phenotypic methods in predicting methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci (CoNS) from animals. *Res. Vet. Sci.* 90: 23-25

27.09. 1975. .

, 2006. .

2007. .

-

2007

,

,

01.04.2008. 31.12.2010. .

2011. -

12

(

)

,

2007/2008. .

9.70.

15

10

20.

,

.

,

.

.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а

Јелена П. Ашанин

број уписа 12/24

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Упоредна примена класичних метода и ланчане реакције полимеразе (PCR) у детекцији сојева стафилокока резистентних на метицилин“

- 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 користила интелектуалну својину других лица.

У Београду, _____ 2015. год.

Потпис докторанда



Јелена П. Ашанин

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора

ЈЕЛЕНА П. АШАНИН

Број уписа 12/24

Студијски програм - Докторске студије

Наслов рада „Упоредна примена класичних метода и ланчане реакције
полимеразе (PCR) у детекцији сојева стафилокока резистентних на
метицилин“

Ментор Др Душан Мишић, ванредни професор

Потписана Јелена П. Ашанин

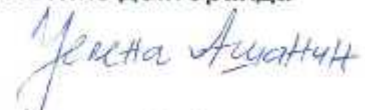
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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.

У Београду, _____ 2015.

Потпис докторанда



Јелена П. Ашанин

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Упоредна примена класичних метода и ланчане реакције полимеразе (PCR) у детекцији сојева стафилокока резистентних на метицилин“

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).

У Београду, _____ 2015

Потпис докторанда


Јелена П. Ашанин