

**UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ina V. Gaji

**FENOTIPSKA I GENOTIPSKA
KARAKTERIZACIJA I KLONSKA
POVEZANOST FARINGEALNIH
IZOLATA STREPTOKOKA GRUPE A
REZISTENTNIH NA MAKROLIDE U
SRBIJI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014. godina

**UNIVERSITY OF BELGRADE
MEDICAL FACULTY**

Ina V. Gajic

**PHENOTYPIC AND GENOTYPIC
CHARACTERIZATION AND CLONAL
RELATEDNESS OF PHARYNGEAL
ISOLATES OF GROUP A
STREPTOCOCCI RESISTANT TO
MACROLIDES IN SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Mentor:

Prof. dr Nataša Vučković Opavski

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Komisija:

Prof. dr Lazar Ranin

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Doc. dr Vera Mija

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Prof. dr Marina Milenković

Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Prof. dr Tanja Jovanović

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Prof. dr Branislava Koci

Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet

Zahvaljujem se:

mentoru, prof. dr Nataši Opavski,

*članovima komisije, prof. dr Lazaru Raninu, doc. dr Veri Mijač i prof. dr Marini
Milenković,*

doc. dr Maji Stanojević i doc. dr Ivani Lazarević,

dr Borisu Jegoroviću,

Dušanu Ćurčiću,

mojoj porodici.

REZIME

Uvod: *S. pyogenes* je naj eš i bakterijski uzročnik akutnih tonzilofaringitisa. Iako su penicilinski preparati prva terapijska linija u lečenju streptokoknih faringitisa, u slučaju osetljivosti na penicilin, propisuju se makrolidi. Po etkom 21. veka, uo en je porast rezistencije grupe A streptokoka (GAS) na eritromicin, širom sveta.

Dva glavna mehanizma rezistencije *S. pyogenes* na makrolide su aktivni efluks antibiotika i izmena ciljnog mesta delovanja. Gen *mefA*, kodira proteine efluksne pumpe, koji dovode do umerenog stepena rezistencije na 14- lane i 15- lane makrolide (M fenotip). Drugi mehanizam rezistencije je metilacija ciljnog mesta delovanja makrolida. On se odlikuje ukrštenom rezistencijom na makrolide, linkozamide i streptogramine (MLS fenotip). Inducibilan MLS fenotip (iMLS) naj eš e determiniše *ermA*, a konstitutivan MLS fenotip (cMLS) *ermB* gen.

Naj eš e koriš ena metoda za tipizaciju GAS je *emm* tipizacija. Ova metoda se zasniva na sekvenciranju hipervarijabilnog dela *emm* gena, koji kodira M protein, glavni faktor virulencije GAS. MLST (engl. multilocus sequence typing) je metoda genotipizacije, koja se bazira na umnožavanju i sekvenciranju 7 visoko konzerviranih, tzv. „house-keeping” gena, koji kodiraju enzime od vitalnog zna ajaja. RAPD (engl. random amplified polymorphic DNA) metoda se bazira na nasumi nom umnožavanju fragmenata DNK i elektroforetskom razdvajanju dobijenih produkata.

Cilj ove studije je bio da se proceni u stalost rezistencije grupe A streptokoka na makrolide u Srbiji, da se odrede fenotipovi rezistencije na makrolide, da se odredi distribucija gena koji kodiraju rezistenciju na makrolide i tetracikline, da se utvrdi klonska distribucija i eventualna klonska veza me u sojevima GAS rezistentnih na makrolide (MRGAS), kao i da se proceni osetljivost MRGAS sojeva na druge klase antibakterijskih lekova.

Materijal i metode: Analizirani su podaci o rezistenciji 3893 sojeva izolovanih od pacijenata sa faringitisom, širom Srbije, u periodu od decembra 2007. do decembra 2008. godine. Sedamdeset sedam MRGAS izolata je poslato u Nacionalnu referentnu laboratoriju za streptokok radi daljih ispitivanja. Identifikacija je vršena na osnovu mikroskopskih, kulturnih i biohemijskih osobina. Konzervacija je vršena u Todd

Hewitt bujonu sa 10% sadržajem glicerola na -80°C. Trostruki disk difuzioni test i kombinovani difuziono-dilucioni test su korišteni za određivanje fenotipova rezistencije na makrolide. Geni koji kodiraju rezistenciju na makrolide i tetracikline su detektovani PCR metodom. Klonska veza me u sojevima ispitivana je *emm* tipizacijom, MLST i RAPD metodama.

Rezultati: Uestalost rezistencije sojeva *S. pyogenes* na makrolide, izolovanim u Srbiji tokom 2008. godine, iznosila je 12%. M fenotip rezistencije na makrolide je bio dominantan i detektovan je kod 56 izolata (72,7%). Inducibilan MLS fenotip je bio zastupljen kod 16 izolata (20,8%), a cMLS kod 5 sojeva (6,5%). Uočena je udružnost M fenotipa i *mefA* gena, iMLS fenotipa i *ermA* gena, cMLS fenotipa i *ermB* gen. Dva soja sa iMLS fenotipom su istovremeno imali *mefA* i *ermA* gen makrolidne rezistencije, a kod jednog izolata sa cMLS fenotipom nije detektovan nijedan gen koji kodira rezistenciju na makrolide. Od ispitivanih MRGAS izolata, 20 sojeva (26%) je bilo rezistentno na tetracikline. Kod 16 izolata je dokazan *tetO* gen (80% izolata), dok je kod samo 4 soja identifikovan *tetM* gen (20%). Svi sojevi sa *tetO* genom su imali *ermA* gen, dok su 3 od 4 soja sa *tetM* genom imali *ermB* gen.

Identifikovano je ukupno 5 *emm* tipova: *emm75* (41,6%), *emm12* (35%), *emm77* (20,8%), *emm28* (1,3%) i *emm118* (1,3%). MLST analizom su identifikovana 4 opisana ST i 2 nova: ST36 (36%), ST49 (40,3%), ST52 (1,3%), ST63 (20,8%), STN1 (1,3%) i STN2 (1,3%). STN1 se u odnosu na poznati ST167 razlikovao samo u genu *gtr* (*gtr90*). Novoopisani STN2 se od postojećeg ST49 razlikovao samo u genu *yiqI* (*yiqI96*). Dobijeni RAPD profili su se sastojali od 2 do 9 različitih produkata, veličine od od 150 do 2 000 baznih parova (bp). Identifikovano je ukupno 26 različitih profila, od kojih je najveći broj bio uočena kod samo jednog izolata (54% sojeva), dok je manji procenat RAPD profila bio detektovan kod više različitih uzoraka (46%). Ipak, 2 najrasprostranjenija RAPD obrasca su uočena kod čak 42% uzoraka. Diskriminativni indeks RAPD genotipizacije je bio 84% (CI 75,8-92,2), dok je indeks diverziteta MLST metode bio samo 68% (CI 59,26-76,74). Analizom MRGAS izolata identifikovana su tri dominantna klonalno makrolidne rezistencije: *emm75/mefA/ST49* (40,3%), *emm12/mefA/ST36* (36%) i *emm77/ermA/tetO/ST63* (20,8%).

Svi ispitivani sojevi su bili osetljivi na penicilin, vankomicin, ofloksacin i hloramfenikol. Uestalost rezistencije na klindamicin je bila 27,3%.

Zaključak: Dobijeni rezultati predstavljaju prvu kompletnu fenotipsku i genotipsku analizu sojeva grupe A streptokoka rezistentnih na makrolide u Srbiji. Uestalost rezistencije GAS sojeva na makrolide u Srbiji, tokom 2008. godine je bila slična prosečnoj prevalenciji izolata MRGAS na nivou Evrope. Najzastupljeniji fenotip/genotip rezistencije na makrolide kod *S. pyogenes* je bio M fenotip/*mefA* gen, koga karakteriše umeren stepen rezistencije na makrolide. Uočena je dominacija tri rezistentna klonova makrolidne rezistencije (*emm75/mefA/ST49*, *emm12/mefA/ST36* i *emm77/ermA/tetO/ST63*), koji ukazuju na visok stepen homogenosti MRGAS sojeva izolovanih u Srbiji. Na osnovu prikazanih rezultata, zaključujemo da je propagacija rezistentnih klonova glavni faktor rezistencije izolata *S. pyogenes* na makrolide. Dobijeni rezultati ukazuju na potrebu za aktivnim nadzorom nad streptokoknim infekcijama u Srbiji.

Cljučne reči: *Streptococcus pyogenes*, rezistencija, makrolidi, tetraciklini, geni, MLST, RAPD, klon

Naučna oblast: Molekularna medicina

Užna naučna oblast: Mikrobiologija

ABSTRACT

Introduction: *S. pyogenes* is the most common causative agent of bacterial tonsillopharyngitis. Penicillin is a first choice therapy for infections caused by GAS, since penicillin resistance in streptococci has not yet emerged. Macrolides are preferred for treatment of GAS infections in patients with beta-lactam hypersensitivity. At the beginning of 2000s, significant increase in macrolide resistance has been reported from many countries.

Two main well-described molecular mechanisms are responsible for macrolide resistance among streptococci: target site modification and antibiotic efflux. Target site modification due to methylase activity has been linked to the presence of *erm* gene. This mechanism confers cross-resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin (MLS resistance). It can be constitutive (cMLS), usually mediated by the *ermB* gene or inducible (iMLS), mediated by the *ermA* gene. The other mechanism of resistance, macrolide efflux is encoded by *mefA* gene and confers low-level resistance to 14- and 15-membered macrolides.

The most common tool used to characterize isolates of *S. pyogenes* today is *emm* typing, which is based on sequence at the 5' end of *emm* gene that encode M protein, one of the major virulence factor in GAS. Multilocus sequence typing (MLST) is genotyping scheme based on nucleotide sequences of internal fragments of seven selected housekeeping loci. Randomly amplification of polymorphic DNA (RAPD) analysis is genotyping gel based method, with relatively high discriminatory index.

The aim of this study was to assess prevalence of macrolide resistance group A streptococci (MRGAS) in Serbia, to determine genotypes and phenotypes of macrolide resistance, as well as to evaluate resistance to tetracycline and to determine tetracycline resistance genes. We were also investigated the clonal relatedness of macrolide resistance strains and their susceptibility to other antimicrobial agents.

Material and methods: We evaluated resistance rate of MRGAS in Serbia by analyzing data of 3893 pharyngeal isolates of GAS. A total of 77 MRGAS isolates, originated from patients with pharyngitis, were collected from 7 regional laboratories between December 2007 and 2008. Strains were sent to the National Reference

Laboratory for streptococci for further testing. GAS identification was done using classical bacteriological techniques, while preservation was done at -80°C, using Todd Hewitt Infusion Broth containing 10% glycerol.

Triple disk diffusion test and E test were used to analyze resistance phenotypes. Resistant genes were detected by PCR. The clonal relationships among 77 macrolide resistant GAS isolates were studied using *emm* typing, MLST and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis.

Results: Overall, the prevalence of macrolide resistance among pharyngeal GAS isolates in Serbia in 2008 was 12%. M phenotype was detected in 56 strains (72,7%), while MLS phenotype was less frequent: iMLS phenotype was found in 16 (20,8%) and cMLS phenotype in only 5 isolates (6,5%). The *mefA* gene was found in all strains with M phenotype and in 2 strains with iMLS phenotype which carried also *ermA* gene. The *ermA* was detected in all strains with iMLS, while *ermB* was present in 4 out of 5 cMLS isolates.

Overall frequency of tetracycline resistance GAS (TRGAS) was 26%. In all TRGAS either *tetM* (20%) or *tetO* gene (80%) were detected. Association of *tetO* and *ermA*, as well as *tetM* and *ermB* was observed.

A total of 5 different *emm* types were identified among the 77 tested isolates: *emm75* (41,6%), *emm12* (35%), *emm77* (20,8%), *emm28* (1,3%) i *emm118* (1,3%). MLST analysis revealed the presence of 4 previously described sequence types (STs): ST36, ST49, ST52, ST63, and two new STs (N1 and N2). The most common STs were ST36, ST49 and ST63, accounted for 36%, 40,3% and 20,8% of all sequence types, respectively. Amplification of genomic DNAs with a primer H2 resulted in RAPD patterns consisting of 2 to 9 distinct DNA fragments, generally ranging from approximately 150 to 2,000 bp. A total of 26 distinct RAPD profiles were found among the 77 GAS isolates studied. Most of the patterns were observed in a small number of strains: 12 (46%) were shared and 14 (54%) were unique. However, 2 RAPD profiles that were the most prevalent patterns, accounted for 32 (42%) out of 77 isolates. Three dominant resistant clones were detected among MRGAS isolates in Serbia: *emm75/mefA/ST49*, *emm12/mefA/ST36* i *emm77/ermA/ tetO/ ST63*.

Conclusion: In conclusion, our results show that there is a moderate level of macrolide resistance in Serbia among GAS isolates and that efflux-mediated mechanism

is the most widespread. The dominance of 3 major resistant clones, *emm75/mefA/ST49*, *emm12/mefA/ST36* and *emm77/ermA/tetO/ST63* and the high genetic homogeneity characterize Serbian MRGAS population. These results demonstrate that macrolide resistance in Serbia is due to the spread of few widely disseminated clones.

Key words: *Streptococcus pyogenes*, macrolide resistance, tetracycline resistance, genes, *emm* typing, MLST, RAPD, clone

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Istorijat.....	1
1.2. Klasifikacija bakterija roda <i>Streptococcus</i>	2
1.2.1. Podela streptokoka na osnovu tipa hemolize	2
1.2.2. Podela hemoliti nih streptokoka prema grupno specifi nom antigenu	2
1.2.3. Podela streptokoka prema Šermanu	3
1.3. <i>Streptococcus pyogenes</i> (grupa A streptokoka).....	3
1.4. Faktori virulencije grupe A streptokoka.....	3
1.4.1. Somatski faktori virulencije	3
1.4.2. Ekstracelularni faktori virulencije.....	9
1.5. Patogeneza streptokoknih infekcija.....	11
1.5.1. Adherencija i kolonizacija.....	12
1.5.2. Intracelularna invazija	12
1.6. Infekcije izazvane streptokokom grupe A.....	13
1.6.1. Tonzilofaringitis (<i>Tonsylopharyngitis</i>)	13
1.6.2. Streptokokni impetigo (<i>Impetigo streptococcica</i>).....	14
1.6.3. Erizipel (<i>Erysipelas</i>) i celulitis (<i>Celullitis</i>).....	14
1.6.4. Nekrotiziraju i fascitis (<i>Fasciitis necroticans</i>)	14
1.6.5. Šarlah (<i>Scarlatina</i>)	15
1.6.6. Streptokokni toksi ni šok sindrom (STŠS)	15
1.6.7. Post-streptokokne sekvele	15
1.7. Osetljivost <i>S. pyogenes</i> na antibiotike	17
1.7.1. Makrolidi, linkozamidi i streptogramini (MLS grupa antibiotika)	17
1.7.2. Rezistencija <i>S. pyogenes</i> na antibiotike MLS grupe	18
1.7.3. Tetraciklini	20
1.7.4. Rezistencija <i>S. pyogenes</i> na tetracikline.....	20
1.7.5. Genska osnova rezistencije <i>S. pyogenes</i> na antibiotike MLS grupe i na tetracikline	21
1.8. Tipizacija <i>S. pyogenes</i>	22
1.8.1. M tipizacija.....	23
1.8.2. T tipizacija.....	24
1.8.3. <i>emm</i> tipizacija.....	24
1.8.4. MLST (engl. multilocus sequence typing, MLST)	25
1.8.5. RAPD (engl. randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) tipizacija..	26
1.8.6. PFGE (engl. pulsed-field gel electrophoresis, PFGE).....	26
1.8.7. Fagotipizacija	27
1.9. Vakcina.....	27
1.10. Radna hipoteza	28
2. Ciljevi istraživanja	29
2.1. Odrediti prevalenciju rezistencije faringealnih izolata <i>S. pyogenes</i> u Srbiji na makrolidne antibiotike	29

2.2.	Odrediti fenotipove i genotipove rezistencije faringealnih izolata <i>S. pyogenes</i> na makrolide	29
2.3.	Proceniti uestalost rezistencije faringealnih izolata <i>S. pyogenes</i> na tetracikline i odrediti gene koji determinišu rezistenciju na tetracikline	29
2.4.	Odrediti distribuciju <i>emm</i> tipova faringealnih izolata <i>S. pyogenes</i> rezistentnih na makrolidne antibiotike i ispitati njihovu povezanost sa fenotipovima i genotipovima rezistencije na makrolide	29
2.5.	Odrediti MLST i RAPD profile sojeva <i>S. pyogenes</i> rezistentnih na makrolidne antibiotike i ispitati njihovu klonsku povezanost i klonsku distribuciju	29
2.6.	Ispitati osetljivost sojeva <i>S. pyogenes</i> rezistentnih na makrolidne antibiotike na druge klase antimikrobnih agenasa.....	29
3.	Materijal i metode	30
3.1.	Bakterijski sojevi	30
3.1.1.	Identifikacija i konzervisanje sojeva	30
3.2.	Test osetljivosti na antibiotike	31
3.2.1.	Disk difuzioni metod antibiograma.....	31
3.2.2.	Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije	32
3.3.	Fenotipovi rezistencije na makrolide.....	32
3.4.	Detekcija gena koji kodiraju rezistenciju na makrolide i tetraciklinske.....	34
3.4.1.	Izolacija DNK	34
3.4.2.	Kvantitacija DNK (merenje prinosa DNK).....	35
3.4.3.	Prajmeri korišćeni za umnožavanje gena koji kodiraju rezistenciju <i>S. pyogenes</i> na makrolidne antibiotike i tetracikline.....	35
3.4.4.	Reakcija lančanog umnožavanja gena koji kodiraju rezistenciju <i>S. pyogenes</i> na makrolidne antibiotike i tetracikline.....	36
3.4.5.	Elektroforeza u agaroznom gelu	37
3.4.6.	Vizualizacija PCR produkata	38
3.5.	<i>emm</i> tipizacija sojeva <i>S. pyogenes</i> rezistentnih na makrolidne antibiotike	38
3.5.1.	Umnožavanje <i>emm</i> gena metodom PCR.....	38
3.5.2.	Prečišćavanje PCR produkta	40
3.5.3.	Reakcija cikličnog sekvenciranja	40
3.5.4.	Precipitacija produkta cikličnog sekvenciranja izopropanolom.....	41
3.5.5.	Denaturacija	42
3.5.6.	Kapilarna elektroforeza	42
3.5.7.	Određivanje <i>emm</i> tipa, odnosno <i>emm</i> podtipa MRGAS sojeva.....	42
3.6.	MLST (engl. multilocus sequence typing)	43
3.6.1.	Umnožavanje sedam visoko konzerviranih gena MRGAS sojeva metodom PCR	43
3.6.2.	Prečišćavanje PCR produkta	44
3.6.3.	Reakcija cikličnog sekvenciranja	44
3.6.4.	Precipitacija i denaturacija produkta cikličnog sekvenciranja izopropanolom.....	45
3.6.5.	Kapilarna elektroforeza	45
3.6.6.	Određivanje tipa sekvence	45
3.7.	RAPD tipizacija.....	46
3.7.1.	Nasumično umnožavanje fragmenata DNK.....	46
3.7.2.	Vizualizacija RAPD produkata	46

3.8. Statisti ka obrada rezultata.....	48
4. Rezultati.....	49
4.1. U estalost rezistencije grupe A streptokoka na makrolidne antibiotike u Srbiji....	49
4.2. Fenotipovi i genotipovi rezistencije na makrolide sojeva MRGAS izolovanih u Srbiji	49
4.3. Osetljivost MRGAS sojeva na tetracikline i zastupljenost gena koji kodiraju rezistenciju na tetracikline	54
4.4. Distribucija <i>emm</i> tipova izolata GAS rezistentnih na makrolidne antibiotike	56
4.5. Povezanost <i>emm</i> tipova i genotipova/fenotipova rezistencije na makrolide	58
4.6. Povezanost <i>emm</i> tipova i gena koji kodiraju rezistenciju na makrolide i tetracikline kod sojeva MRGAS rezistentnih na tetracikline	60
4.7. Tipizacija MRGAS sojeva MLST metodom	61
4.8. Tipizacija sojeva RAPD metodom	64
4.9. Pore enje diskriminativne mo i RAPD i MLST metoda tipizacije	67
4.10. Klonska povezanost i klonska distribucija sojeva <i>S. pyogenes</i> rezistentnih na makrolidne antibiotike.....	67
4.11. Osetljivost MRGAS sojeva izolovanih u Srbiji na druge klase antimikrobnih agenasa.....	67
5. Diskusija	68
5.1. U estalost rezistencije grupe A streptokoka na makrolidne antibiotike u Srbiji....	68
5.2. Fenotipovi i genotipovi rezistencije sojeva <i>S. pyogenes</i> na makrolide	72
5.3. Osetljivost MRGAS sojeva na tetracikline i zastupljenost <i>tetO</i> i <i>tetM</i> gena.....	75
5.4. Distribucija <i>emm</i> tipova kod MRGAS sojeva izolovanih u Srbiji.....	77
5.5. Udruženost pojedinih <i>emm</i> tipova i gena rezistencije na makrolide i tetracikline kod MRGAS sojeva izolovanih u Srbiji.....	80
5.6. MLST genotipizacija	81
5.7. RAPD genotipizacija	84
5.8. <i>emm</i> , RAPD i MLST metode genotipizacije sojeva MRGAS izolovanih u Srbiji.	85
5.9. Klonska veza izme u sojeva MRGAS izolovanih u Srbiji	86
5.10. Osetljivost izolata MRGAS na druge antibakterijske agense.....	87
5.11. Nadzor nad streptokoknim infekcijama.....	88
6. Zaklju ci.....	90
7. Reference	91
8. Skra enice	108



Uvod

1. Uvod

Bakterije roda *Streptococcus* pripadaju porodici *Streptococcaceae*. Fakultativno su anaerobne, nepokretne i asporogene. Streptokoke su fermentativne, katalaza negativne Gram pozitivne koke, pre nika od 0,5-1 μ m. Raspore uju se u kra im ili dužim lancima ili u parovima, što je posledica paralelnih deobnih ravni i zakasnelog razdvajanja bakterijskih elija nakon deobe. Za kultivisanje zahtevaju oboga ene hranljive podloge.

1.1. Istorijat

Hipokrat (Hippocrates), "otac medicine", je još u 4. v. p. n. e. opisao klini ke manifestacije streptokoknih infekcija. Aleksandar Gordon (Alexander Gordon) je 1795. godine sugerisao da je etiološki agens puerperalne groznice mikroorganizam sferi nog oblika (Denny, 2000.). Naziv roda *Streptococcus* je prvi upotrebio be ki hirurg Teodor Bilrot (Teodor Billroth) 1877. godine, iskoristivši gr ke re i *streptos* za lanac i *kokhos* za zrno (Denny, 2000). Veruje se da je Fehleisen prvi izolovao streptokok, odnosno koke raspore ene u lancima 1883. godine, premda se u literaturi naj eš e navodi da je prvu izolaciju obavio Luj Paster (Louis Pasteur) iz krvi pacijentkinje sa puerperalnom sepsom. Rozenbah (Rosenbach) je zaslužan za naziv vrste *S. pyogenes*. Streptokoke su ubzo dovedene u vezu sa brojnim infekcijama kao što su faringitis, šarlah, pneumonija, erizipel i impetigo. Po etkom 20. v. Hugo Šotmiler (Hugo Schottmueller) i Braun (J. H. Brown) su izvršili podelu streptokoka na osnovu tipa hemolize, a tridesetih godina 20. v. Rebeka Lensfild (Rebecca Lancefield) je izvršila klasifikaciju β hemoliti kih streptokoka i opisala M protein, na osnovu koga e kasnije biti izvršena serotipizacija *S. pyogenes*.

1.2. Klasifikacija bakterija roda *Streptococcus*

U nekim od najranijih klasifikacija streptokoka, ime bakterijske vrste je sadržalo i ime bolesti koju bakterija izaziva. Takav sistem klasifikacije je unosio brojne zabune, pa je vremenom sistematizacija unapređivana. Danas se najčešće koriste sledeće klasifikacije bakterija roda *Streptococcus*: prema tipu hemolize, podela na osnovu antigenskih osobina i kombinovana podela prema Šermanu (Sherman).

1.2.1. Podela streptokoka na osnovu tipa hemolize

Šotmiler je izvršio prvu klasifikaciju streptokoka (Shottmuller, 1903). On je na osnovu tipa hemolize na krvnom agaru podelio streptokoke u tri kategorije:

1. alfa (α) hemolitične streptokoke, koje nepotpuno razgrađuju hemoglobin do biliverdina i na krvnom agaru stvaraju zelenu zonu hemolize oko kolonija,
2. beta (β) hemolitične streptokoke, koje potpuno razgrađuju hemoglobin do bilirubina, stvaraju i prozračno-žutu zonu hemolize oko kolonija i
3. gama (γ) hemolitične streptokoke ili nehemolitične streptokoke.

1.2.2. Podela hemolitičnih streptokoka prema grupno specifičnom antigenu

Rebeka Lensfield je 1928. godine identifikovala grupno specifičan ugljenohidratni antigen, koji ulazi u sastav elijskog zida beta hemolitičnih streptokoka (Lancefield, 1933). Na osnovu grupe polisaharida C, koji se sastoji iz N-acetilglukozamina vezanog za polimer ramnoze, Lensfieldova je beta hemolitične streptokoke (BHS) podelila na grupe, označene slovima - A, B, C, G i F. Kod grupe D streptokoka, nema polisaharida C, već je lipoteihoinjska kiselina grupno specifični antigen. Do danas je definisano više od 20 grupa beta hemolitičnih streptokoka obeleženih slovima od A do V.

1.2.3. Podela streptokoka prema Šermanu

Šerman je 1937. godine podelio streptokoke na četiri kategorije prema tipu hemolize, grupno specifičnom polisaharidu elijskog zida i fenotipskim karakteristikama na piogene, viridans, laktične i enterokoke (Sherman, 1937). Laktične koke i enterokoke su kasnije izdvojene u zasebne rodove *Lactococcus* i *Enterococcus*.

1.3. *Streptococcus pyogenes* (grupa A streptokoka)

Streptococcus pyogenes je striktno patogeni, β hemolitički streptokok, koji pripada grupi A streptokoka po Lensfieldovoj (engl. group A streptococci, GAS). Za razliku od ostalih β hemolitičkih streptokoka, GAS je osetljiv na bacitracin, pa se ova osobina koristi u diferencijaciji *S. pyogenes* od ostalih BHS.

1.4. Faktori virulencije grupe A streptokoka

Svoj patogeni potencijal *S. pyogenes* ostvaruje posredstvom brojnih faktora virulencije. Oni učestvuju u procesima adhezije i kolonizacije, izbegavanju imunskog odgovora, elijskoj internalizaciji (LaPenta i sar., 1994), invaziji tkiva domaćina i produkciji toksina. Faktori virulencije se dele na somatske i ekstracelularne.

1.4.1. Somatski faktori virulencije

Somatski faktori virulencije su eksprimirani na površini bakterijske elije. Najvažniji su M protein, kapsula, teihoiniske kiseline, fimbrije i drugi adhezivni molekuli.

1.4.1.1. M protein

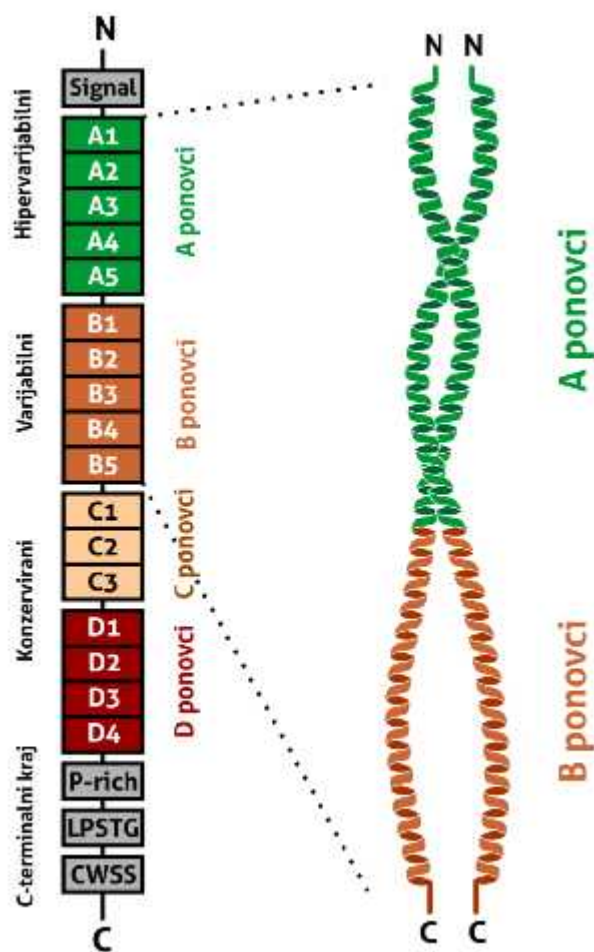
M protein je spoljašnji protein grupe A streptokoka i glavni faktor virulencije. Ime je dobio po mukoidnom izgledu kolonija inkapsuliranih sojeva, koji je Lensfieldova inicijalno dovela u vezu sa M proteinom. Ovaj molekul je uključen u različite stadijume patogeneze streptokoknih bolesti, kao što su adhezija, internalizacija, izbegavanje imunskog odgovora i invazija. Deluje antifagocitno u odsustvu tipski specifičnih opsonizujućih antitela i time inhibira glavni odbrambeni mehanizam domaćina i obezbeđuje preživljavanje. Sprema opsonizaciju, vezivanjem faktora H, faktora sličnog faktoru H, C4b-vezujućeg proteina, fibrinogena i drugih molekula koji preveniraju aktivaciju komplementa alternativnim putem (Bisno i sar., 2003). U mnogim studijama je dokazano da sojevi grupe A streptokoka bez M proteina bivaju uspešno opsonizovani i fagocitovani od strane polimorfonukleara (Bisno i sar., 2003; Peterson i sar., 1979). Utvrđeno je da i M protein može aktivirati koagulaciju i trombozu, a neki tipovi ovog proteina vezuju plazminogen, čime dovode do aktivacije plazmina i povećane fibrinolize, a samim tim i lakšeg širenja bakterija kroz tkiva. M protein reaguje sa leukocitima i monocitima, preko Toll-like receptora, te indukuje oslobađanje proinflammatoryh citokina (IL-1, IL-6) i faktora nekroze tumora (engl. Tumor Necrosis Factor, TNF), čime podstiče zapaljensku reakciju. (Metzgar i Zampolli, 2011). Ima značajnu ulogu i u adherenciji za epitel domaćina. Dokazano je da sojevi GAS sa M proteinom uspešnije adherišu za epitelne ćelije ždrela (Tylewska i sar., 1981). Opisan je i ćelijski receptor, CD46 na keratinocitima, za koji se *S. pyogenes* vezuje pomoću C ponavljajućeg segmenta M proteina (Okada i sar., 1995). Vezivanjem za laminin i fibronektin pokreću se različiti mehanizmi odgovorni za invaziju eukariotskih ćelija preko integrina (Cue i sar., 1998).

M protein se sastoji od dva polipeptidna lanca, građena od ponavljajućih segmenata, koji su podeljeni u regione A, B, C i D. Region D se nalazi na visoko konzerviranom C terminalnom kraju, kojim je M protein vezan za ćelijsku membranu. Region A se nalazi na hipervarijabilnom N terminalnom kraju, koji je slobodan, formira fibrile i odgovoran je za serotipsku specifičnost. Iako su građena i veličina ovog homodimernog proteina različite u sojevima GAS, osnovna građa M proteina je zajednička. Antitela na M protein su protektivna i tipski specifična. Alfa heliks M

proteina umnogome podsećaju na gra u pojedinim proteinima u ljudskom organizmu, kao što je npr. miozin. Antitela specifična za pojedine tipove M proteina se kod predisponiranih osoba sa određenim antigenima klase II HLA kompleksa, ponašaju kao autoantitela, koja unakrsno reaguju sa proteinima srčanog mišića i drugih tkiva, čime se objašnjava patogeneza akutne reumatske groznice.

Iako se za tipizaciju *S. pyogenes* koriste brojne procedure i različiti markeri, klasifikacija grupe A streptokoka na osnovu razlika u gra i hipervarijabilnog segmenta M proteina je ostala i dalje dominantna metoda. Prethodna tehnika klasifikacije serotipizacije, koja se bazirala na reakciji precipitacije sa specifičnim antitelima, je u potpunosti zamenjena novom metodom – sekvenciranjem *emm* gena koji kodira sintezu M proteina.

GAS poseduje i grupu proteina, koji su strukturno slični M proteinu i nazivaju se proteini slični M proteinu (engl. M like proteins). Oni predstavljaju faktore virulencije, koji takođe imaju antifagocitnu ulogu. Njihova uloga u patogenezi infekcija se zasniva na sposobnosti da reaguju sa brojnim molekulima, kao što su plazminogen, albumin i fibrinogen (Frithzisar., 1989; Gomi i sar., 1990). Kodirani su genima koji pripadaju *emm* superfamliji: *enn*, *mrp*, *fcrA*, *arp*, *protH* i drugim.



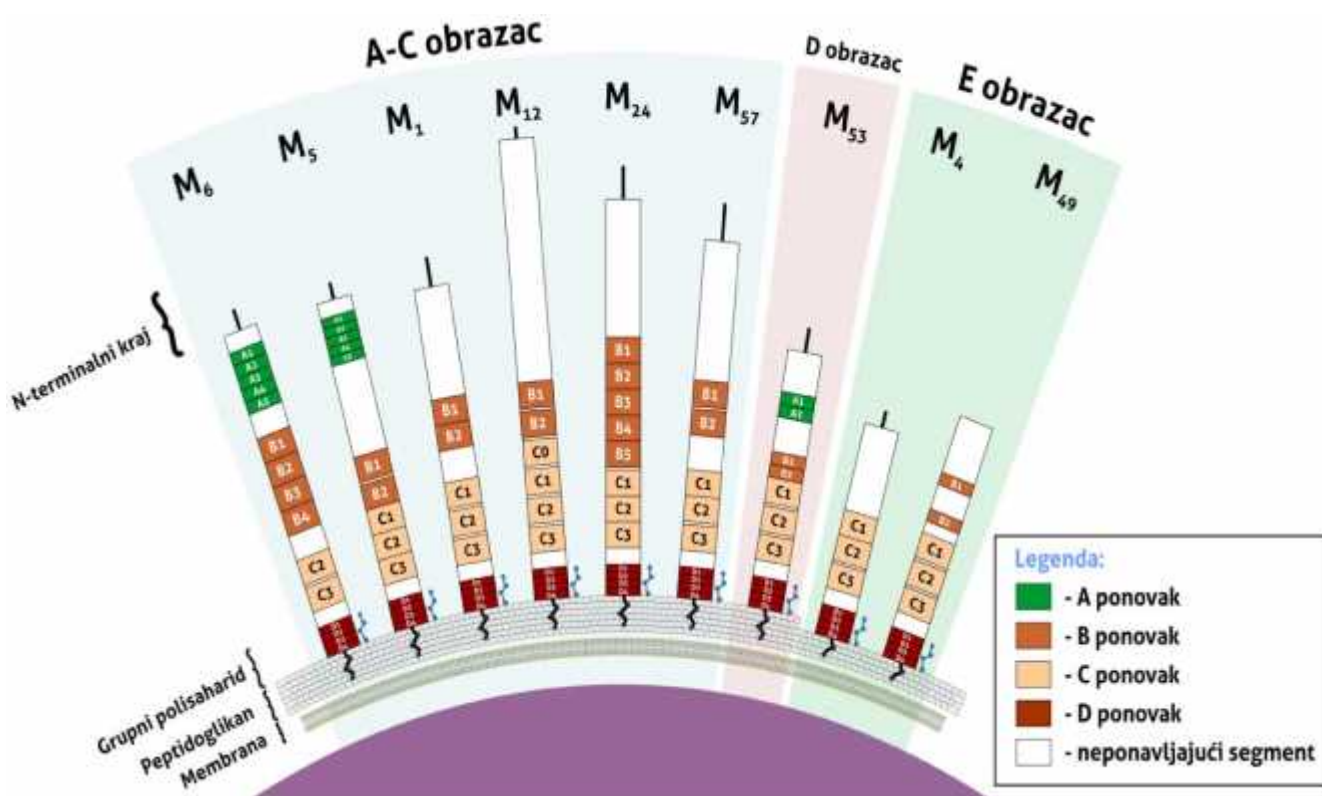
Slika 1: Struktura M proteina

(preuzeto i modifikovano iz Fischetti, 2006)

emm gen pripada superfamiliji *emm* gena, u ijem klasteru se nalazi više od 20 razli itih gena (*fcrA*, *mrp*, *emmL*, *sir*, *arp*, *enn*, *sph* i drugi). Oni kodiraju površinske proteine sa antifagocitnim dejstvom, odnosno M protein i proteine sli ne M proteinu, kao i imunoglobulin vezuju e proteine (IgG i IgA vezuju e proteine). Postoji visok stepen homologije izme u gena unutar *emm* superfamilije, kao i njihovih produkata.

Postoje etiri glavne subfamilije *emm* gena (SF1, SF2, SF3 i SF4). Me usobno se razlikuju po redosledu nukleotida na 3' kraju, koji kodira konzervirani peptidoglikan-vezuju i deo, odnosno karboksilni kraj M proteina. Na osnovu rasporeda gena *emm* subfamilije u hromozomu, identifikovano je pet glavnih *emm* profila, obeleženih slovima A, B, C, D, E. Navedeni hromozomski obrasci se me usobno razlikuju po broju i kombinacijama pojedinih *emm* subfamilija.

emm obrasci A-C su naj eš e uzro nici faringitisa, dok je obrazac D obi no udružen sa impetigom (Dicuonzo i sar., 2001). Dakle, *emm* obrazac bi mogao da služi kao genotipski marker tkivnog afiniteta sojeva *S. pyogenes*. Svaki soj GAS ima 1, 2 ili 3 razli ita *emm* gena. Ukoliko soj ima tri *emm* gena, centralni *emm* lokus odre uje pripadnost M/*emm* tipu.



Slika 2: Obrasci M proteina: A, B, C, D i E
(preuzeto i modifikovano iz Smeesters i sar., 2010)

1.4.1.2. Fibronektin vezuju i proteini

Fibronektin je glikoprotein koji se nalazi u pojedinim telesnim te nostima i u ekstracelularnom matriksu. Prisutan je i na epitelnim elijama i ima ulogu receptora za vezivanje bakterija. Adhezioni molekuli streptokoka, koji imaju sposobnost visoko

specifi nog ireverzibilnog vezivanja za fibronektin zovu se fibronektin vezuju i proteini (Speziale i sar., 1984). Preko njihovog C terminalnog ponavljaju eg regiona streptokok adheriše za fibronektin. Kod grupe A streptokoka ulogu fibronektin vezuju ih proteina ima: familija M proteina; lipoteihoinjska kiselina, koja je glavni nosilac hidrofobnosti streptokoka; protein prtF1 ili SfbI (engl. streptococcal fibronectin binding protein I, SfbI) (Talay i sar., 1992); protein prtF2; fibronektin vezuju i protein 54 (engl. fibronectin binding protein 54, FBP54) i serumski faktor zamuenja (engl. serum opacity factor, SOF). SOF ili SfbII protein se vezuje za fibronektin, fibrinogen i apolipoprotein AI (apoAI). Ovaj protein delimi no razgra uje lipoproteine i indukuje njihovu agregaciju, što dovodi do zamuenja seruma sisara, po emu je i dobio naziv. Dokazano je da SfbI i SOF protein imaju zna ajnu ulogu i u intracelularnoj invaziji (Talay i sar., 2000).

1.4.1.3. Kapsula

Kapsula grupe A streptokoka je gra ena od hijaluronske kiseline, odnosno polimera N-acetilglukozamina i glukuronske kiseline. Produkciju kapsule kodira operon koji se sastoji od *hasA*, *hasB* i *hasC* gena (Crater i Van de Rijn, 1995). Mukoidan izgled kolonija GAS poti e od voluminozne kapsule (Lancefield i Todd, 1928; Wilson, 1959). Sposobnost stvaranja kapsule se razlikuje me u sojevima, ali je ustanovljeno da inkapsulirani sojevi poseduju ve i patogeni potencijal (Stollerman i Dale, 2008). Hijaluronska kiselina kapsule grupe A streptokoka je strukturno veoma sli na hijaluronatu koji ulazi u sastav vezivnog, epitelijalnog i nervnog tkiva oveka. Iako je kapsula *S. pyogenes* slabo imunonogena, zbog sli nosti sa humanom hijaluronskom kiselinom, ona ima antifagocitno dejstvo i ulogu u adherenciji i invaziji (Cywes i Wessels, 2001). Jedan od opisanih receptora za hijaluronsku kiselinu je glikoproteinski receptor CD44, koji se nalazi na površini keratinocita (Schrager i sar., 1998). Kapsula *S. pyogenes* je, za razliku od ve ine drugih polisaharidnih kapsula, antigenski homogena, odnosno nema antigenskih varijabilnosti.

1.4.1.4. C5a peptidaza

C5a peptidaza je proteolitički enzim, odnosno endopeptidaza, koja se nalazi u elijskom zidu streptokoka grupe A. Ona inhibira hemotaksu polimorfonukleara (PMNL) na mjesto infekcije, inaktivacijom C5a komponente komplementa (Cleary i sar., 1992).

1.4.2. Ekstracelularni faktori virulencije

Najznačajniji ekstracelularni faktori virulencije streptokoka grupe A su streptokokni hemolizini - streptolizin S (SLS) i streptolizin O (SLO), kao i streptokokni pirogeni egzotoksini (Spe). Cistein proteaza (SpeB), kolagenaza, streptokinaza, DNaza, lipaza i hijaluronidaza predstavljaju ekstracelularne streptokokne enzime.

1.4.2.1. Streptolizin O i streptolizin S

Streptolizini su citotoksini koji citolitičnu aktivnost ostvaruju formiranjem transmembranskih pora na različitim eukariotskim elijama, poput eritrocita, leukocita, trombocita, ali i na nekim subcelularnim membranskim strukturama, kao što su lizozomi i mitohondrije (Bisno i sar., 2003). Stvorene pore olakšavaju ulazak drugih bakterijskih toksina u eukariotsku eliju (Madden i sar., 2001). Retki su sojevi *S. pyogenes* koji ne proizvode ove toksine.

Streptolizin O (SLO) je kiseonik labilan, što znači da svoju funkciju ostvaruje vezivanjem za kolesterol, samo u anaerobnim uvjetima, dok se u aerobnim uvjetima reverzibilno inaktivira. Gen *slo*, koji pripada hromozomskoj DNK, kodira ovaj citotoksin. SLO je veoma imunogen, pa se anti streptolizin O antitela koriste u serološkoj dijagnostici post-streptokoknih sekvela.

Streptolizin S (SLS) je slabo imunogen, termolabilan i kiseonik stabilan. Kodira ga *sagA* gen. SLS je odgovoran za pojavu beta hemolize oko kolonija *S. pyogenes*, na krvnom agaru, inkubiranom u aerobnim uvjetima.

1.4.2.2. Streptokokni pirogeni egzotoksini/superantigeni

S. pyogenes proizvodi 11 različitih, strukturno sličnih streptokoknih pirogenih egzotoksina (Spe): SpeA, SpeC, SpeF ili mitogeni faktor, SpeG, SpeH, SpeJ, SpeK, SpeL, streptokokni superantigen (SSA), streptokokni mitogeni egzoprotein Z (SMEZ) i SMEZ2. (Proft i sar., 1999). Postoje četiri alelske varijante SpeA toksina, označene brojevima od 1 do 4 (Nelson i sar., 1991). Spe su poznati i kao streptokokni superantigeni (SA), a nekad su se nazivali i eritrogeni toksini. Spe ne moraju biti obrađeni od strane antigen-prezentujućih stanica (APC) i prezentovani limfocitima u okviru molekula druge klase glavnog kompleksa histokompatibilnosti (engl. major histocompatibility complex, MHC II). Za razliku od uobičajenih antigena, oni se bez prethodne obrade vezuju za varijabilni beta lanac ($V\beta$) T ćelijskog receptora (TCR) i za MHC molekul II klase, koji su eksprimirani na profesionalnim APC, kao što su B limfociti, monociti i dendriti stanice (Kotb, 1995). Premašavanjem T limfocita i APC, Spe mitogeni pokreću signalne puteve, koji dovode do nespecifične, masivne, poliklonske T ćelijske proliferacije, pri čemu aktiviraju čak do 20% klonova T limfocita. Jedan Spe može aktivirati sve T limfocite koji u TCR eksprimiraju V lanac određene familije. Posledično, dolazi do prekomerne sekrecije proinflamatornih citokina (IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6) (Bisno i sar., 2003).

Bakteriofagi su nosioci gena za SpeA, SpeC i SpeH, ali i većine drugih Spe, pa ih sintetiziraju samo lizogeni sojevi GAS. Za razliku od njih, geni koji kodiraju SpeF, SpeG i SpeJ nalaze se na hromozomskim genima.

Spe su odgovorni za patogenezu i manifestacije pojedinih teških streptokoknih bolesti kao što su šarlah, streptokokni toksični šok sindrom (STŠS) i reumatska groznica, pre svega indukcijom snažnog imunskog odgovora. Prekomerna sekrecija proinflamatornih citokina ima značajniju ulogu u razvoju stanja šoka i multiorganske disfunkcije, nego T ćelijska proliferacija (Cunningham, 2000). Razlike u klinici kojih slični pomenutih bolesti, objašnjavaju se individualnim razlikama u odgovoru organizma na superantigene.

1.4.2.3. Ostali streptokokni toksini

Streptokinaze su značajni faktori virulencije, koji omogućavaju širenje streptokokne infekcije. Konverzijom plazminogena u plazmin dolazi do razlaganja fibrinskih niti i koaguluma. Neke studije su pokazale da streptokinaza može da aktivira samo humani plazminogen (Sun i sar., 2004). Streptokinaze se koriste u terapiji infarkta miokarda.

Hijaluronidaza razgrađuje ekstracelularni matriks vezivnog tkiva i na taj način doprinosi širenju infekcije, te predstavlja faktor invazivnosti.

DNA-ze A, B, C i D doprinose izbegavanju imunskog odgovora, odnosno izbegavanju destrukcije streptokoka od strane polimorfonuklearnih leukocita. Kodirane su od strane bakteriofaga.

Streptokokni pirogeni egzotoksin B (SpeB) je cistein proteaza koja, iako nije superantigen, doprinosi izbegavanju imunskog odgovora i širenju infekcije (Lukomski i sar., 1999). Ovaj toksin razlaže brojne površinske proteine streptokoka, ali i humane proteine. Razgradnjom fibrinogen vezuju ih proteina, odvaja streptokok od elija, ali i iseca receptor za opsonizujuća antitela, streptokokni IgG vezuju i protein i druge molekule.

1.5. Patogeneza streptokoknih infekcija

Inicijalni korak u patogenezi streptokoknih infekcija je adherencija. Da bi uspostavio kolonizaciju, GAS ima brojne mehanizme kojima izbegava dejstvo mehanizama imunskog odgovora domaćina. Za širenje infekcije odgovorni su faktori invazivnosti, a rekurentne infekcije i kliconoštvo se jednim delom mogu objasniti i internalizacijom bakterije.

1.5.1. Adherencija i kolonizacija

Interakcija između patogena i domaćina počinje vezivanjem površinskih streptokoknih liganada za receptore na površini ćelija. Vrsta adherencija streptokoka, umnožavanje i kolonizacija faringealnih i epidermalnih epitelnih ćelija onemogućava uklanjanje bakterija odbrambenim mehanizmima domaćina, kao što su spiranje pljuvkom ili ekfolijacija (Cunningham, 2000). Adhezini se dele na polisaharidne (kapsula, lipoteihoijska kiselina) i proteinske (fimbrijalni i nefimbrijalni). Dosada je opisano najmanje 17 različitih streptokoknih adhezina (Bisno, 2003), od kojih su najbolje proučeni M protein, LTA, protein F/SfBI, FBP29 (Courtney, i sar., 1992), gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, galaktoza vezuju i protein, vitronektin vezuju i protein (Valentin-Weigand i sar., 1988), kolagen vezuju i protein (engl. streptococcal collagen-like surface protein, Scl) (Visai i sar., 1995), SOF (Kreikmeyer i sar., 1995), FBP54 (Courtney i sar., 1994) i kapsula. Oni se vezuju za različite ekstracelularne molekule, ali i za integralne površinske ćelijske receptore: fibronektin, fibrinogen, kolagen, vitronektin, CD44, CD46. M protein je prvi opisan adhezioni molekul (Ellen i Gibbons, 1972). On prvenstveno ima ulogu u adherenciji za keratinocite, vezivanjem za molekul CD46. Svega nekoliko godina kasnije, opisan je još jedan adhezin, lipoteihoijska kiselina, koja je značajna u adherenciji za bukalnu sluznicu i najvećim delom je odgovorna za adherenciju streptokoka (Beachey i Ofek, 1976).

1.5.2. Intracelularna invazija

Poslednjih godina brojni autori potvrđuju da streptokok grupe A pored adherencije za epitelne ćelije ima sposobnost i intracelularne invazije (LaPenta i sar., 1994). Utvrđeno je da stepen invazije zavisi od ekspresije M proteina i SfBI proteina, zbog čega se oni smatraju i invazivima. Visok stepen internalizacije uočeno je kod serotipa M1 (Dombek i sar., 1999), koji se često povezuje sa invazivnim infekcijama. Tokom intracelularne invazije GAS dolazi do reorganiziranja ćelijskog citoskeleta. Internalizacija delimično objašnjava terapijske neuspehe streptokoknih faringitisa, ali i dugotrajnu perzistenciju bakterija u gušima pacijenata, odnosno kliconoštvo.

1.6. Infekcije izazvane streptokokom grupe A

GAS se smatra humanim patogenom (Stevens, 2000). Rezervoar je bolesnik ili kliconoša. Ova bakterija se najčešće prenosi kapljicnim putem, a moguće je i direktni prenos, neposrednim kontaktom sa inficiranom ranom ili promenom na koži.

S. pyogenes izaziva širok spektar infekcija. Od neinvazivnih piogenih infekcija, poput tonzilofaringitisa, do životno ugrožavajućih invazivnih gnojnih oboljenja, toksemi nih bolesti i post-streptokoknih sekvela. Ova bakterija najčešće izaziva neinvazivne bolesti respiratornog trakta, kože i mekih tkiva, ali visoko virulentni sojevi mogu dovesti do celulitisa, nekrotizirajućeg fascitisa (NF), sepse i streptokoknog toksičkog šok sindroma (STŠS). Prema rezultatima multicentrične studije, procenjuje se da svake godine, širom sveta, više od 700 miliona ljudi oboli od infekcija izazvanih grupom A streptokoka, a više od 500 000 ljudi umre (Carapetis i sar., 2005). U razvijenim zemljama svake godine samo od faringitisa oboli oko 15% školske dece (Carapetis i sar., 2005).

Streptokokno kliconoštvo je prilično esto, posebno u zimskim mesecima, kod dece. Smatra se da je u zemljama sa umerenom klimom, 5-15% odraslih i čak do 30% dece asimptomatski kolonizovano ovom bakterijom (Kaplan, 1980).

1.6.1. Tonzilofaringitis (*Tonsylopharyngitis*)

S. pyogenes je najčešći bakterijski uzročnik akutnih tonzilofaringitisa (Bisno, 1995). Javlja se obično kod dece školskog uzrasta. GAS izaziva 15-30% akutnih faringitisa (streptokoknih angina) kod dece uzrasta od 5-15 godina i oko 10% kod odraslih pacijenata (Pandey i sar., 2009). Bolest ima sezonski karakter i češće se javlja tokom jesenjih i zimskih meseci (Bisno, 2001; Stollerman, 1975). Tipični faringealni serotipovi su M1, M3, M5, M6, M14, M18, M19 i M24. Ipak, uočena je geografska i vremenska promenljivost distribucije serotipova (Cunningham, 2000). Iako streptokokni faringitis uglavnom spontano prolazi, terapija antibioticima, se preporučuje zbog mogućih komplikacija.

1.6.2. Streptokokni impetigo (*Impetigo streptococcica*)

Impetigo je površna, lokalizovana, visoko kontagiozna, gnojna infekcija kože. Najčešće se javlja u dečijem uzrastu, od 2. do 5. godine života. Ima sezonski karakter, te je zastupljenija u letnjim mesecima i u predelima sa visokom temperaturom i vlagom (Chin, 2000). Kao komplikacija može nastati akutni glomerulonefritis, ukoliko je impetigo izazvan tzv. nefritogenim serotipovima, najčešće M49 (Bisno, 1995).

1.6.3. Erizipel (*Erysipelas*) i celulitis (*Celullitis*)

Erizipel je akutna, lokalizovana infekcija epiderma i derma, sa izraženim limfedemom. Javlja se na licu u 85% slučajeva. Iako je bio relativno čest u 19. veku, danas je retka bolest, najčešće prisutna kod dece i starijih osoba, kod kojih postoji sklonost ponavljanju bolesti (Chin, 2000).

Celulitis je akutno inflamatorno oboljenje derma i hipoderma. Može se komplikovati nekrotizirajućim fasciitom, miozitisom i sepsom, a u nekim okolnostima progredira u rekurentnu infekciju kože i potkožnog tkiva.

1.6.4. Nekrotizirajuć i fascitis (*Fasciitis necroticans*)

Nekrotizirajuć i fascitis (NF) ili streptokokna gangrena je progresivna infekcija dubokih struktura potkožnog tkiva, fascija i masnog tkiva. U 50% slučajeva, infekcija može da zahvati mišino tkivo, kada nastaje streptokokni miozitis (Stevens, 2000). Rizici na subpopulaciji za razvoj NF su pacijenti sa dijabetesom, malignim oboljenjima, gojazne i starije osobe. Bolest se razvija veoma brzo, a sepsa i cirkulatorni šok su komplikacije koje ugrožavaju život pacijenta. Bez adekvatne terapije, stopa smrtnosti od NF iznosi od 20-50%, a kod slučajeva koji se komplikuju miozitisom, čak i 100% (Stevens, 2000).

1.6.5. Šarlah (*Scarlatina*)

Šarlah ili crvenka je toksemi no oboljenje, uzrokovano sojevima *S. pyogenes* koji produkuju Spe. Incidencija šarlaha je u opadanju, ali je u preantibiotskoj eri bila vrlo visoka, sa mortalitetom od oko 20%. Naj eš e nastaje kao komplikacija streptokokne angine, pa se poput nje, obi no javlja kod dece školskog uzrasta, tokom jesenjih i zimskih meseci.

1.6.6. Streptokokni toksi ni šok sindrom (STŠS)

Streptokokni toksi ni šok sindrom (STŠS) je progresivno, toksinom posredovano, multisistemska oboljenje, koje nastaje kao posledica komplikacije streptokokne infekcije, obi no nekrotiziraju eg fascitisa. U patogenezi STŠS su najzna ajniji Spe. Klini ki kriterijumi za dijagnozu STŠS, koje propisuje Centri za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. Centers for Disease Control and Prevention, CDC) su telesna temperatura 38.9°C, raš, hipotenzija i disfunkcija tri ili više organska sistema (CDC, 2014). Više od polovine pacijenata sa STŠS ima smrtni ishod (McCormick i sar., 2001; Davies i sar., 1996). Naj eš i streptokokni tipovi koji uzrokuju STŠS su M1, M3, M12 i M28 (Stevens, 1992; Johnson i sar., 1992). U terapiji se koristi klindamicin, jer je uspešan supresor sinteze toksina i M proteina.

1.6.7. Post-streptokokne sekvele

Post-streptokokne sekvele su imunopatološka stanja, koja nastaju kod 1-3% nele enih ili neadekvatno le enih pacijenata sa streptokoknim infekcijama i geneti kom predispozicijom. Klini ke manifestacije se javljaju 2-4 sedmice posle infekcije. Naj eš e dijagnostikovane post-streptokokne sekvele su akutna rematska groznica i post-streptokokni glomerulonefritis. Pored toga, opisani su i post-streptokokni CNS sindrom (Sidenhajmova horea, PANDAS - engl. pediatric autoimmune neuropsychiatric

disorders associated with streptococcus), post-streptokokni sistemski vaskulitis, post-streptokokne dermatološke manifestacije (Ivory i Folzenlogen, 2009).

1.6.7.1. Akutna reumatska groznica

Akutna reumatska groznica (ARG) je sistemska inflamatorna bolest vezivnog tkiva, uzrokovana autoimunskom reakcijom na antigene BHS. Pretpostavlja se da je u osnovi patogeneze ove bolesti molekularna mimikrija između antigena streptokoka i pojedinih struktura u organizmu čoveka, te elementi humoralnog i ćelijskog imunskog odgovora, pokrenuti od strane GAS, unakrsno reaguju sa antigenima u tkivima i organima, kao što su srce, zglobovi, centralni nervni sistem, koža i potkožno tkivo. ARG se obično razvija 2 - 4 nedelje nakon streptokokne infekcije, i to najčešće nakon streptokoknog faringitisa. Najčešće obolevaju mlade osobe, od 4. do 18. godine života. Bolest je znatno ređa u razvijenim zemljama, zbog pravovremene dijagnostike i adekvatnog lečenja streptokoknih infekcija. Pojedini tipovi GAS, kao što su M5, M14, M18 i M24, često uzrokuju ARG (Markowitz, 1987) i stoga se nazivaju "reumatogeni tipovi".

1.6.7.2. Akutni post-streptokokni glomerulonefritis

Akutni post-streptokokni glomerulonefritis (APSGN) najčešće nastaje 1-4 nedelje nakon preležane streptokokne infekcije. Smatra se da je u osnovi APSGN deponovanje imunskih kompleksa na bazalnoj membrani glomerula, što dovodi do zapaljenske reakcije (Cronin i Lange, 1990). Nefritogeni serotipovi GAS koji izazivaju APSGN nakon streptokokne pioderrije su M47, M49, M55, M2, M60 i M57, a nakon streptokokne upale guše, M1, M2, M4, M3, M25, M49 i M12. Poslednjih decenija uočeno je pad incidencije ove bolesti širom sveta, posebno u razvijenim zemljama (Silva, 1998).

1.7. Osetljivost *S. pyogenes* na antibiotike

Lek izbora za terapiju ve ine infekcija izazvanih streptokokom grupe A je i dalje penicilin. Uvo enje beta laktamskih antibiotika u terapijske protokole, dovelo je do zna ajnog smanjenja prevalencije streptokoknih infekcija, naro ito po etkom osamdesetih godina prošlog veka, u razvijenim zemljama. Rezistencija *S. pyogenes* na penicilin još uvek nije zabeležena *in vitro*. Ipak, le enje penicilinom se pokazalo neuspešnim kod 5-20% osoba kod kojih je potvr en streptokokni faringitis (Gatanaduy i sar., 1985; Huwe i sar., 1980; Brook, 1985). Neuspeh penicilinske terapije se objašnjava nedovoljnom koncentracijom leka u tkivu, intracelularnom lokalizacijom streptokoka, produkcijom beta laktamaza od strane kopatogena i nepridržavanjem režima primene leka od strane pacijenata (Brook, 2007).

1.7.1. Makrolidi, linkozamidi i streptogramini (MLS grupa antibiotika)

Makrolidi, linkozamidi i streptogramini, pripadaju takozvanoj MLS grupi antibiotika. Iako hemijski nisu sli ni, sve tri klase lekova imaju isto vezno mesto i sli an mehanizam delovanja. Reverzibilno se vezuju za 23S ribozomalnu RNK (rRNK) u 50S podjedinici bakterijskog ribozoma, u blizini veznog mesta peptidil-transferaza. Kao posledica vezivanja MLS antibiotika dolazi do inhibicije faze translokacije tokom sinteze proteina, a samim tim i elongacije polipeptidnog lanca. Pored ometanja peptidil transferazne aktivnosti 23S rRNK, MLS antibiotici spre avaju sklapanje 50S podjedinice ribozoma, ime dodatno prekidaju sintezu proteina.

Najpoznatiji i najbolje prou en predstavnik makrolida je eritromicin, prirodni produkt aktinomicete *Saccharopolyspora erythraea*. Koristi se od 1952. godine. Hemijskom modifikacijom eritromicina, dobijeni su brojni derivati, koji su stabilniji, bolje penetriraju u elije i tkiva, bolje se apsorbuju, imaju manje neželjenih efekata i manje reaguju sa drugim lekovima. Prema broju C atoma u makrociklalom prstenu, makrolidi se dele na 12- lane (metimicin), 14- lane (eritromicin i njegovi derivati roksitromicin, klaritromicin i diritromicin), 15- lane (azitromicin) i 16- lane (spiramicin, jozamicin, midekamicin i miokamicin). Od 14- lanih makrolida su,

proizvedeni ketolidi. Oni se svojom keto grupom vezuju za dva vezna mesta na ribozomu, te im je aktivnost znatno veća u odnosu na klasične makrolide, a rezistencija sporije nastaje. Najznačajniji predstavnik ketolida je telitromicin.

Prirodni linkozamid je linkomicin, od koga je izveden klindamicin. Linkomicin se danas retko koristi, zbog svoje toksičnosti, dok je klindamicin i dalje u upotrebi. Najčešće se primenjuje u terapiji STŠS i drugih toksemičnih streptokoknih oboljenja.

Streptogramini predstavljaju mešavinu dva strukturno različita jedinjenja – streptogramina A i streptogramina B, koji deluju sinergistički. Vezivanje streptogramina A za 50S podjedinicu ribozoma dovodi do konformacionih promena ribozoma, koje olakšavaju vezivanje streptogramina B. Tip B streptogramina sprečava elongaciju polipeptidnog lanca, te tako zaustavlja sintezu proteina. Najznačajnija je gotova kombinacija streptogramina B - kvinupristina (30%) i streptogramina A - dalfopristina (70%).

1.7.2. Rezistencija *S. pyogenes* na antibiotike MLS grupe

Pojava rezistencije *S. pyogenes* na eritromicin je uočena još 1970. godine u Japanu. Tada je registrovana smanjena osetljivost na eritromicin kod čak 70% izolata GAS (Maruyama i sar., 1979), što je bila posledica intenzivnog korišćenja ovih antibiotika. Organizovano smanjenje upotrebe makrolida u Japanu je dovelo do izrazitog pada incidencije sojeva GAS rezistentnih na makrolide (engl. macrolide resistant group A streptococci, MRGAS) na 46%, 1981. godine, a potom na svega 3%, 1989. godine (Fujita i sar., 1994). Devedesetih godina prošlog veka sojevi *S. pyogenes* rezistentni na makrolide su se pojavili i u Finskoj i SAD (Seppala i sar., 1992; Martin i Green, 2002). U Finskoj je 1990. godine registrovana rezistencija na eritromicin kod 24% izolata GAS (Seppala i sar., 1992), dok je slična pojava uočena i u ostalim zemljama Evrope početkom 21. veka. Procentualna zastupljenost rezistencije GAS na makrolidne antibiotike u zemljama mediteranskog basena značajno je viša nego u zemljama severne Evrope. U Francuskoj je ona početkom dvehiljaditih godina iznosila 23%, a u Italiji 22% (Montagnani i sar., 2009). U istom periodu, u drugim delovima sveta, uestalost rezistencije *S. pyogenes* na makrolide je bila: 5,2% u SAD-u, 6,8% u

Turskoj, 14% u Južnoafričkoj republici (Green i sar., 2006; Colakoglu i sar., 2006; Liebowitz, 2003). Smatra se da su za pojavu MRGAS zaslužni nekriti na upotreba makrolida, kao i širenje rezistentnih klonova (York i sar., 1999).

Kod Gram pozitivnih bakterija, pa i streptokoka, postoje dva glavna mehanizma rezistencije na makrolide. Prvi je izmena ciljnog mesta vezivanja makrolida, odnosno enzimaska metilacija adenina u 23S rRNK. Ovaj mehanizam rezistencije se manifestuje tzv. MLS fenotipom, odnosno ukrštenom rezistencijom na sve antibiotike koji pripadaju MLS grupi. Drugi je aktivno izbacivanje antibiotika iz ćelije – mehanizam efluksa.

MLS rezistencija može biti inducibilna (iMLS) i konstitutivna (cMLS). Kod inducibilne rezistencije bakterija proizvodi neaktivnu mRNK, koja kodira metilazu samo u prisustvu induktora - pojedinih makrolidnih antibiotika. U zavisnosti od toga koji su antibiotici induktori i koliki je nivo rezistencije na pojedine od njih, razlikuje se više iMLS subfenotipova (A, B i C). Oni se mogu razlikovati pomoću trostrukog disk difuzionog testa. Za razliku od M i cMLS fenotipa rezistencije na makrolide, koji pokazuju uniformni model rezistencije, sojevi GAS sa iMLS fenotipom pokazuju heterogenu rezistenciju na MLS antibiotike. iMLS-A sojevi su visoko rezistentni na 14-, 15- i 16- lane makrolide; iMLS-B sojevi su vrlo rezistentni na 14- i 15- lane, a osetljivi su na 16- lane makrolide bez indukcije. iMLS-C sojevi imaju niže nivoe rezistencije, odnosno osetljivi su na 14- i 15- i 16- lane makrolide pre indukcije i rezistentni su na iste antibiotike posle indukcije. Kod cMLS fenotipa rezistencije na makrolide, bakterija proizvodi aktivnu metilazu, koja se neprekidno eksprimira. To je fenotip visokog nivoa rezistencije na sve MLS antibiotike.

Iako se rezistencija na ketolide teže stiče, streptokok je poslednjih godina razvio rezistenciju i na ove antibiotike, mehanizmom dimetilacije 23s rRNK, odnosno izmenom oba vezna mesta za ketolide (Hansen i sar., 1999).

Kod drugog mehanizma rezistencije GAS sintetizuje transmembranski protein, koji formira tzv. “efluksnu pumpu”. Ona aktivnim transportom, uz utrošak energije, “ispumpava” antibiotik izvan bakterijske ćelije. Ovaj mehanizam rezistencije se odlikuje niskim ili srednjim stepenom rezistencije samo na 14- i 15- lane makrolide i predstavlja tzv. M fenotip rezistencije na makrolide. Nema rezistencije na 16- lane makrolide, klindamicin i streptogramin, čak ni posle indukcije.

Znatno re e, uzrok rezistencije kod streptokoka mogu biti mutacije gena u 23S rRNK i promene ribozomalnih proteina L4 i L22. (Malbruny i sar., 2002).

1.7.3. Tetraciklini

Tetraciklini su bakteriostatski antibiotici, sa širokim spektrom delovanja, koji se u velikoj meri koriste u humanoj, ali i veterinarskoj medicini. Prirodni tetraciklini su tetraciklin, hlortetraciklin, a polusintetski doksiciklin i minociklin. Poslednjih godina je iz tetraciklina izvedena nova grupa lekova – gliciklini, koji deluju i na sojeve bakterija koje su rezistentne na tetracikline.

Ovi antibiotici se vezuju za 16S rRNK 30S subjediniice ribozoma i onemogu avaju vezivanje aminoacil-tRNK za ribozom, odnosno ugradnju novih aminokiselina u polipeptidni lanac (Schnappinger i Hillen, 1996). Time spre avaju sintezu proteina u bakterijskoj eliji.

1.7.4. Rezistencija *S. pyogenes* na tetracikline

Tetraciklini se ne koriste za le enje streptokoknih infekcija, ali se, zbog este kombinovane rezistencije GAS na makrolide i tetrackline, prati osetljivost sojeva *S. pyogenes* i na ove antibiotike. Izu avanje sojeva GAS rezistentnih na tetracikline (engl. tetracycline resistant GAS, TRGAS) ima pre svega, epidemiološki zna aj.

Rezistencija *S. pyogenes* na tetracikline nastaje na dva na ina: putem efluksa antibiotika i izmenom ribozoma, odnosno ciljnog mesta delovanja tetraciklina. Opisani su brojni efluks proteini, ozna eni slovima (tetK, tetL), koji, u energetski zavisnom procesu, izbacuju antibiotik iz elije. Kod drugog mehanizma rezistencije na tetracikline, bakterija stvara proteine koji vrše tzv. “zaštitu“ ribozoma (engl. ribosomal protection proteins, RPPs). Konformacijskom promenom veznog mesta na ribozomu tetO proteinom, izostaje vezivanje tetraciklina ili dolazi do odvajanja prethodno ve vezanog tetraciklina za ribozome tetM proteinom..

Kod bakterija koje razvijaju rezistenciju izmenom ribozoma, nastaje viši nivo rezistencije na veći broj različitih tetraciklina, u odnosu na one sa mehanizmom efluksa.

1.7.5. Genska osnova rezistencije *S. pyogenes* na antibiotike MLS grupe i na tetracikline

Rezistencija *S. pyogenes* na makrolidne antibiotike je kodirana genima *mefA*, *ermA* i *ermB*. Protein aktivnog efluksa makrolida (*mefA*) kodira *mefA* gen.

erm geni kodiraju proteine (rRNA metilaza) koji dovode do izmena ribozoma. Ima ih više, a razlikuju se po regulaciji ekspresije fenotipa rezistencije na makrolide. CMLS i iMLS-A fenotip su obično determinisani *ermB* genom, a iMLS-B i iMLS-C fenotipovi obično *ermA* genom. Moguće je, takođe, da neki sojevi MLS fenotipa pored *erm* gena imaju i efluks pumpu, kodiranu *mefA* genom. Geni koji determinišu rezistenciju na makrolide se najčešće prenose putem plazmida (Horaud i sar., 1985).

Geni koji determinišu proteine koji učestvuju u protekciji ribozoma od dejstva tetraciklina su *tetM* i *tetO*, dok efluksnu pumpu kodiraju *tetK* i *tetL*.

Geni koji kodiraju rezistencije na makrolide i tetracikline se kod streptokoka najčešće nalaze na konjugativnim i nekonjugativnim transpozonomima. Oni su obično smešteni na hromozomu, iako se mogu naći i na plazmidima. Transpozoni, pored *erm* gena, često sadrže i gene koji kodiraju rezistenciju na druge antibiotike, obično tetracikline. Tako se *ermB* gen udružen sa *tetM* genom obično prenosi konjugativnim transferom, između bakterija istih ili različitih vrsta. Mobilni genski elementi odgovorni za transfer ovih gena kod grupe A streptokoka su Tn6002 i Tn3872 (Clewell i sar., 1995; Rice, 1998). Navedeni transpozoni nastaju insercijom DNK koja sadrži *ermB* gen u konjugativne transpozone Tn916 familije. Sojevi koji imaju *ermB* i *tetM* gen su često rezistentni na tetraciklin, ali mogu biti i osetljivi (Amezaga i sar., 2002; Corso i sar., 1998; Marimo i sar., 2006; McDougal i sar., 1998; Porat i sar., 2000; Vilhelmsson i sar., 2000), što se objašnjava neekspresiranim *tetM* genom (engl. silent). *tetO* gen može biti udružen sa *mefA* genom, što se najčešće dešava nakon insercije transpozona sličnom Tn1207.1 u bakteriofag ϕ 46.1 (Banks i sar., 2002; Giavanetti i sar., 2005). Ovaj vid horizontalnog transfera se obavlja transdukcijom.

1.8. Tipizacija *S. pyogenes*

Tipizacija bakterija je metoda kojom se vrši karakterizacija sojeva unutar jedne bakterijske vrste. Tipizacijom bakterija se mogu odrediti izvor infekcije i putevi prenošenja uzročnika, što ima nesumnjiv epidemiološki značaj. Da bi metoda tipizacije bila uspešna, identifikovani tipovi bakterija bi trebalo da budu stabilni, tehnika bi trebalo da ima dovoljnu moć diskriminacije, da bude jednostavna, reproducibilna, a metod standardizovan velikim brojem ponovljenih testiranja. Klasične metode tipizacije koje se baziraju na fenotipskim osobinama (detekcija fenotipova), biohemijskim osobinama (detekcija biotipova), profilima rezistencije (detekcija rezistotipova) i drugim, sve više se zamenjuju metodama molekularne biologije, odnosno metodama genotipizacije.

Tipizacija *S. pyogenes* se vrši radi praćenja uestalosti tipova rezistentnih na antibakterijske agense, tipova koji izazivaju invazivne bolesti ili su povezani sa post-streptokoknim sekvelama. Rezultati studija koje se bave praćenjem distribucije i promena u ustalosti pojedinih tipova u populaciji su od velikog značaja u kreiranju različitih protokola, mera prevencije i istraživanjima vezanim za pravljenje vakcine.

Tipizacija streptokoka grupe A se radi još od 1928. godine, kada je Rebeka Lensfield opisala i uvela tzv. M tipizaciju, koja je bazirana na varijabilnim antigenskim karakteristikama termostabilnog, površnog M proteina. Danas se kao klasične, odnosno konvencionalne metode tipizacije najčešće primenjuju: tipizacija M proteina, koja je dugogodišnji “zlatni standard”, zatim tipizacija T proteina i OF tipizacija.

Ponovna pojava reumatske groznice i teških infekcija izazvanih streptokokom grupe A (NF, STŠS), početkom osamdesetih i tokom devedesetih godina prošlog veka, odlikovala se visokim procentom izolata *S. pyogenes* koji nisu pripadali nijednom opisanom M tipu. Zbog visoke cene antiseruma, ograničene dostupnosti i teškoća u interpretaciji M tipizacije, ukazala se potreba za uvođenjem novih metoda tipizacije GAS. U novije vreme su, pored klasičnih, dostupne i metode molekularne biologije, odnosno genotipizacije. Danas je “zlatni standard” u tipizaciji streptokoka grupe A tzv. *emm* tipizacija, koja je zapravo “molekularni ekvivalent” M tipizacije. Pored ove metode, postoje i mnoge druge koje se baziraju na metodama molekularne biologije, kao što su MLST (engl. multilocus sequence typing, MLST), PFGE (engl. pulsed-field

gel electrophoresis, PFGE), RAPD (engl. randomly amplified of polymorphic DNA, RAPD), MLEE (engl. multilocus enzyme electrophoresis, MLEE), vir tipizacija, fagotipizacija i druge (Borek i sar., 2012).

1.8.1. M tipizacija

Tipizacija grupe A streptokoka na osnovu razlika u gra i hipervarijabilnog segmenta M proteina vrši se još od tridesetih godina prošlog veka (Lancefield, 1933). Do danas su opisana 93 M serotipa (Facklam i sar., 2002). Broj serotipova je realno manji, s obzirom da je došlo do preklapanja nekih tipova ili se ispostavilo da su na ni kod drugih grupa beta hemoliti nih streptokoka.

M tipizacija se bazira na reakciji imunoprecipitacije bakterijskog ekstrakta i specifi nih antitela na odre ni tip M proteina. Ova reakcija je inicijalno ra ena u epruvetama, ali je zbog velikog utroška seruma, kasnije modifikovana u tzv. kapilarnu imunoprecipitaciju (Swift, 1943). Antitela specifi na na odre ni M tip se dobijaju imunizacijom kuni a streptokoknom vakcinom. Dobijeni serum se najpre obra uje u cilju eliminisanja antitela specifi nih za druge streptokokne antigene i deponuje u svojevrsne kontejnere. M protein se može ekstrahovati tretiranjem kulture streptokoka kipu om hlorovodoni nom kiselinom (Cunningham, 2000). Reakcija imuniprecipitacije se odvija u naro itoj kapilari, tako što se ona prvo uranja u serum, a zatim u ekstrakt ispitivanog izolata i posle inkubacije se o itava rezultat reakcije. Postupak se ponavlja sa razli itim serumima, dok se ne uo i precipitaciona linija. Kako je procedura pripreme seruma veoma komplikovana, ova tehnika se primenjuje u svega nekoliko referentnih laboratorija u svetu. Zbog ograni ene dostupnosti, visoke cene seruma i relativno visokog procenta sojeva koji se ne mogu tipizirati ovom metodom, u novije vreme se za tipizaciju *S. pyogenes* sve više primenjuju metode molekularne biologije.

Iako je opisano preko 90 razli itih M serotipova GAS, nisu svi jednako zastupljeni u populaciji. Procentualna zastupljenost pojedinih M tipova je razli ita u pojedinim regionima sveta. Tako e je utvr eno da se pojedini M tipovi streptokoka izoluju eš e kod nekih oboljenja. Naj eš i M tipovi koji su uzrokovali faringitise u razvijenim zemljama sveta u prvoj dekadi dvehiljaditih godina su bili M12, M1, M4,

M28 i M3, dok su M53 i M81 naj eš i izaziva i infekcija kože (Cunningham, 2000). Invazivne infekcije obi no uzrokuju M1 i M3, koji se povezuju sa višim procentom mortaliteta (Veasy sar., 2004). Ipak, pojedini autori ukazuju da su odre eni serotipovi, koji esto uzrokuju invazivne infekcije, kao što je tip M1, visoko udruženi i sa faringealnim kliconoštvom (Rogers i sar., 2007), što ukazuje na pretpostavku da težina bolesti ne zavisi samo od serotipa, ve i od virulencije soja i faktora vezanih za doma ina.

1.8.2. T tipizacija

Fred Grifit (Fred Griffith) je na osnovu aglutinacije T antigena sa tipski specifi nim antitelima izvršio tipizaciju *S. pyogenes*. U testu aglutinacije koristio je ekstrakte streptokoka dobijene iz uzoraka pacijenata obolelih od razli itih infekcija (Griffith, 1934). Grifitov test je bio jednostavniji od inicijalnog, koji je opisala Lensfildova, pa se nekada više koristio. Danas je identifikovano oko 30 razli itih T tipova, pri emu jedan GAS soj može imati više razli itih T tipova. Na osnovu T profila se može predvideti M tip.

1.8.3. emm tipizacija

Varijabilni segment *emm* gena se smatra sekvencom sa najvišim stepenom polimorfizma kod *S. pyogenes*. U postupku *emm* tipizacije se umnožava 5' sekvenca ovog gena, koja kodira hipervarijabilni deo M proteina. Potom se vrši sekvenciranje umnoženog 5' segmenta, a dobijena sekvenca se poredi sa sekvencama koje su dostupne u CDC bazi. Sli nost sekvenci od 92%, ukazuje na odre eni *emm* tip, odnosno podtip. Ova baza se stalno uve ava, a do sada je identifikovano oko 150 *emm* tipova i preko 800 podtipova GAS, što govori o diverzitetu sojeva u okviru ove bakterijske vrste (web strana <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/assigning.htm>). *emm* tipovi i podtipovi se obeležavaju arapskim brojevima. Ukoliko soj ima *emm* tip i podtip, nakon broja *emm* tipa i ta ke, nadovezuje se broj *emm* podtipa. Geografska distribucija *emm* tipova nije

uniformna. U razvijenim zemljama sveta dominiraju tipovi *emm12*, *emm1*, *emm28* i *emm3* (Steer, 2009). Procentualna zastupljenost pojedinih *emm* tipova varira i u funkciji vremena. Naj eš i faringealni *emm* tipovi u razvijenim zemljama su *emm12* i *emm1*, naj eš i kožni *emm1*, *emm3* i *emm28*, a invazivni *emm1* i *emm3* (Steer, 2009; Luca-Harari i sar., 2009).

emm sekvenciranje je danas naj eš i metod koji se koristi u tipizaciji GAS (Facklami sar., 2002). M, T i OF tipovi me usobno koreliraju, a pojedine kombinacije su udružene sa odre enim infekcijama.

1.8.4. MLST (engl. multilocus sequence typing, MLST)

MLST je metoda genotipizacije, koja se bazira na umnožavanju i sekvenciranju sedam visoko konzerviranih, tzv. *house-keeping* gena, koji se nalaze u svakom bakterijskom hromozomu i kodiraju sintezu enzima od vitalnog zna aja za bakterijsku eliju (Butte, 2001). Dobijene sekvence se porede sa referentnim sekvencama iz internet baze MLST (<http://spyogenes.mlst.net>), pa se na osnovu dobijenih alelnih profila (engl. *sequence type*, ST) može razmatrati klonska veza me u sojevima. Bakterijski klonovi su sojevi koji imaju zajedni kog pretka i imaju iste alele u svakom *house-keeping* lokusu, odnosno imaju isti ST. MLST baza sadrži podatke o preko 1000 razli itih sojeva izolovanih od pacijenata sa blagim infekcijama, poput faringitisa, do sojeva izolovanih od pacijenata sa invazivnim infekcijama. Tako e, sadrži i podatke o sojevima rezistentnim na makrolide. Osnovna prednost MLST metode u odnosu na molekularne metode koje se zasnivaju na razdvajanju fragmenata DNK u gelu, sastoji se u tome što se rezultati MLST, dobijeni u razli itim laboratorijama, mogu lako upore ivati, koriš enjem elektronskih podataka i MLST baze, bez potrebe za pore enjem slika gelova.

MLST metoda ima veliki zna aj u dugotrajnom evolutivnom pra enju sojeva, jer se promene unutar sedam visoko konzerviranih gena akumuliraju veoma sporo.

Rezultati MLST, ali i drugih metoda genotipizacija, se mogu prikazati grafi ki, koriš enjem dendrograma, pri emu se na vertikalnoj osi prikazuju izolati, a na horizontalnoj genska udaljenost izme u sojeva.

1.8.5. RAPD (engl. randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) tipizacija

RAPD tipizacija se zasniva na upotrebi jednog prajmera, koji je nespecifičan i komplementaran sa ponavljajućim sekvencama grupe A streptokoka, što omogućava amplifikaciju više različitih produkata PCR metodom. U RAPD tipizaciji se koriste prajmeri koji imaju visoku diskriminativnu moć i koji pokazuju reproducibilnost u umnožavanju segmenata DNK. U reakciji lančanog umnožavanja prajmer se nasumično veže za komplementarne segmente DNK. Shodno tome, kod različitih sojeva, dolazi do umnožavanja različitog broja fragmenata, različitih veličine. Nakon elektroforetskog razdvajanja dobijaju se određeni RAPD profili, koji se međusobno mogu porediti. RAPD tipizacija je ekonomična i veoma diskriminativna. Sa druge strane, poređenje rezultata dobijenih u različitim laboratorijama je problematično, jer je metoda vrlo osetljiva na temperaturne i druge promene uslova amplifikacije, što izmeću ostalog utiče i na reproducibilnost (Seppala i sar., 1994; Bert i sar., 1996; Nandi i sar., 2006).

1.8.6. PFGE (engl. pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)

PFGE je metoda kojom se DNK fragmenti razdvajaju gel-elektroforezom u pulsirajućem, odnosno promenljivom električnom polju. Nekoliko parova suprotno pozicioniranih elektroda obezbeđuju izmene električnog polja. Ovakva elektroforeza omogućava razdvajanje velikih molekula veličine i do 10 miliona bp (MB). Zbog stalnih promena smera električnog polja, DNK menja orijentaciju, okreće se u gelu, pa je na ovaj način moguće razdvojiti čak i pojedinačne hromosome.

Najpre se bakterijski sojevi ukalupljuju u agarozni gel, a potom inkubiraju sa restrikcionim enzimom u cilju digestije i dobijanja fragmenata različitih dužina (20-800 kb). Restrikcioni enzimi koji se najčešće koriste u digestiji sojeva *S. pyogenes* su *SmaI* i *SfiI* (Martin i Single, 1993), pri čemu broj dobijenih produkata varira od 15 do 20, a veličina fragmenata od 5 do 500kb. Enzim *SmaI* se može koristiti i u PFGE tipizaciji *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Borrelia burgdorferi* itd. U zavisnosti od mesta i broja restrikcionih lokusa, u kojima enzim vrši isecanje (restrikcionih mesta), dobija se različit broj fragmenta, različitih dužina. Potom se radi

elektroforeza u električnom polju sa promenljivim smerom struje. Nakon bojenja i vizualizacije proizvoda, pomoću u kompjuterskog softvera ili golim okom se identifikuju PFGE profili. Dakle, na osnovu genskih razlika unutar bakterijske vrste, odnosno genskih polimorfizama, PFGE metodom se vrši identifikacija genotipova. Genske varijacije koje se registruju ovom metodom akumuliraju se u relativno kratkom vremenskom periodu, te je PFGE vrlo pogodan za kratkoročne epidemijske studije.

1.8.7. Fagotipizacija

Lizogena konverzija je jedan od načina kojim GAS može steći i faktore virulencije. Identifikacijom broja i vrste bakteriofaga koji su inkorporirani u bakterijski genom, moguće je izvršiti tipizaciju *S. pyogenes*. Sekvenciranje kompletnog genoma GAS je pokazalo da je oko 90% genoma relativno konzervirano i slično međusojevima, a da su sekvence profaga značajan izvor genskih različitosti (Fischetti, 2007).

1.9. Vakcina

Aktuelna istraživanja iz oblasti vakcinologije, koja se bave zaštitom od infekcija izazvanih streptokokom grupe A, odnose se pre svega na ispitivanje M proteina i njegovih tipova. Brojni istraživači smatraju da bi korišćenje konzerviranog segmenta M proteina u kreiranju vakcine bilo korisno, jer je njegova struktura ista kod svih bakterija ove vrste (Fischetti, 2000), pa bi takva vakcina štitila od infekcija izazvanih svim serotipovima GAS. Vakcina koja bi sadržala konzervirani deo M proteina brzo bi stimulisala masovnu produkciju specifičnih antitela, koja bi potencijalno mogla dovesti do ukrštene reakcije sa pojedinim tkivima domaćina. Stoga se, zbog bezbednosnog aspekta vakcine, novija istraživanja sve više baziraju na ispitivanju pojedinih epitopa M proteina, koji su tipski specifični i za koje nije karakterističan fenomen molekularne mimikrije (Dale, 2000). Da bi se postigla imunost na različite serotipove *S. pyogenes*, neophodno je da vakcina bude napravljena od varijabilnih segmenata M proteina različitih serotipova, odnosno da bude polivalentna. Kako se distribucija serotipova

menja i sastav vakcine bi trebalo da se prilagođava aktuelnoj epidemiološkoj situaciji na određenoj teritoriji, u određenom vremenu.

Pored M proteina i drugi streptokokni antigeni su potencijalni kandidati za kreiranje vakcine protiv streptokoka: C5a peptidaza (Chen i Cleary, 1990; Olive i sar., 2007), SpeA, SpeC, SpeB (Kapur i sar., 1994), SfbI (Schulze i sar., 2003) i drugi. Trenutno na tržištu nema dostupnih vakcina protiv infekcija izazvanih ovim patogenom, iako bi upotreba vakcine protiv GAS dovela ne samo do smanjenja incidencije streptokoknih invazivnih i neinvazivnih bolesti i kliconoštva, već i do smanjenja potrebe za antibioticima i redukcije rezistencije.

1.10. Radna hipoteza

Postoji klonska povezanost sojeva streptokoka grupe A izolovanih u Srbiji, koji pripadaju istim *emm* tipovima i rezistentni su na makrolidne antibiotike.

2.

Ciljevi istraživanja

2. Ciljevi istraživanja

- 2.1. Odrediti prevalenciju rezistencije faringealnih izolata *S. pyogenes* u Srbiji na makrolidne antibiotike**
- 2.2. Odrediti fenotipove i genotipove rezistencije faringealnih izolata *S. pyogenes* na makrolide**
- 2.3. Proceniti uestalost rezistencije faringealnih izolata *S. pyogenes* na tetracikline i odrediti gene koji determinišu rezistenciju na tetracikline**
- 2.4. Odrediti distribuciju *emm* tipova faringealnih izolata *S. pyogenes* rezistentnih na makrolidne antibiotike i ispitati njihovu povezanost sa fenotipovima i genotipovima rezistencije na makrolide**
- 2.5. Odrediti MLST i RAPD profile sojeva *S. pyogenes* rezistentnih na makrolidne antibiotike i ispitati njihovu klonsku povezanost i klonsku distribuciju**
- 2.6. Ispitati osetljivost sojeva *S. pyogenes* rezistentnih na makrolidne antibiotike na druge klase antimikrobnih agenasa**

3.

Materijal i metode

3. Materijal i metode

3.1. Bakterijski sojevi

Republika Srbija (RS) je zemlja sa oko 7 miliona stanovnika, od kojih, prema gruboj proceni, 2 miliona živi u Beogradu, 3 miliona u centralnoj Srbiji i 2 miliona u Vojvodini. Iz 13 regionalnih mikrobioloških laboratorija, koje obrađuju materijal sa preko 80% teritorije RS, su dobijeni podaci o ukupnom broju sojeva grupe A streptokoka izolovanih iz guše pacijenata obolelih od akutnog tonzilofaringitisa i podaci o broju sojeva GAS rezistentnih na makrolide, tokom 2008. godine (period decembar 2007. god. – decembar 2008. god.). Sedam laboratorija (tri sa područja grada Beograda i četiri regionalne laboratorije iz Vojvodine i centralne Srbije) dostavilo je 77 MRGAS izolata Nacionalnoj referentnoj laboratoriji (NRL) za streptokok, Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu. MRGAS izolati su dostavljeni referentnoj laboratoriji u transportnom medijumu (Copan, Italija), gde su dalje obrađivani.

3.1.1. Identifikacija i konzervisanje sojeva

Identifikacija sojeva u regionalnim laboratorijama i potvrda identifikacije u NRL za streptokok je izvršena na osnovu morfoloških karakteristika bakterija (Gram pozitivne koke, raspoređene u lancima), kulturelnih osobina (prisustvo beta hemolize na krvnom agaru), osetljivosti na bacitracin, 0,04U, (BioRad, SAD), pozitivnog PYR testa (Rosco, Danska) i reakcije lateks aglutinacije sa grupno specifičnim antiserumom (Slidex Strepto Kit, bioMerieux, Francuska).

GAS izolati su subkultivisani na Kolumbija (Columbia) krvnom agaru (KKA) sa 5% ovčije krvi i inkubirani 18-24h, na temperaturi od 36°C, u aerobnim uslovima. Sveža bakterijska kultura je subkultivisana u Todd Hevit (Todd Hewitt) bujonu (Biomedics, Španija) i inkubirana 20-24h u prethodno opisanim temperaturnim i atmosferskim uslovima. Dobijena bakterijska suspenzija je konzervirana sa 50%

glicerolom (finalna koncentracija 10%) u plasti nim mikro-epruветama zapremine 1,5ml na temperaturi od -80°C.

3.2. Test osetljivosti na antibiotike

Osetljivost sojeva na antibakterijske agense je ispitivana disk difuzionim metodom antibiograma i kombinovanim difuziono-dilucionim metodom, koriš enjem E test traka (bioMerieux, Francuska).

3.2.1. Disk difuzioni metod antibiograma

Disk difuzioni metod antibiograma izveden je na osnovu preporuka CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) (CLSI, 2011). Koriš eni su diskovi penicilina (10IU), eritromicina (15µg), klindamicina (2µg), tetraciklina (30µg), vankomicina (30µg) i ofloksacina (5µg) (BioRad,SAD).

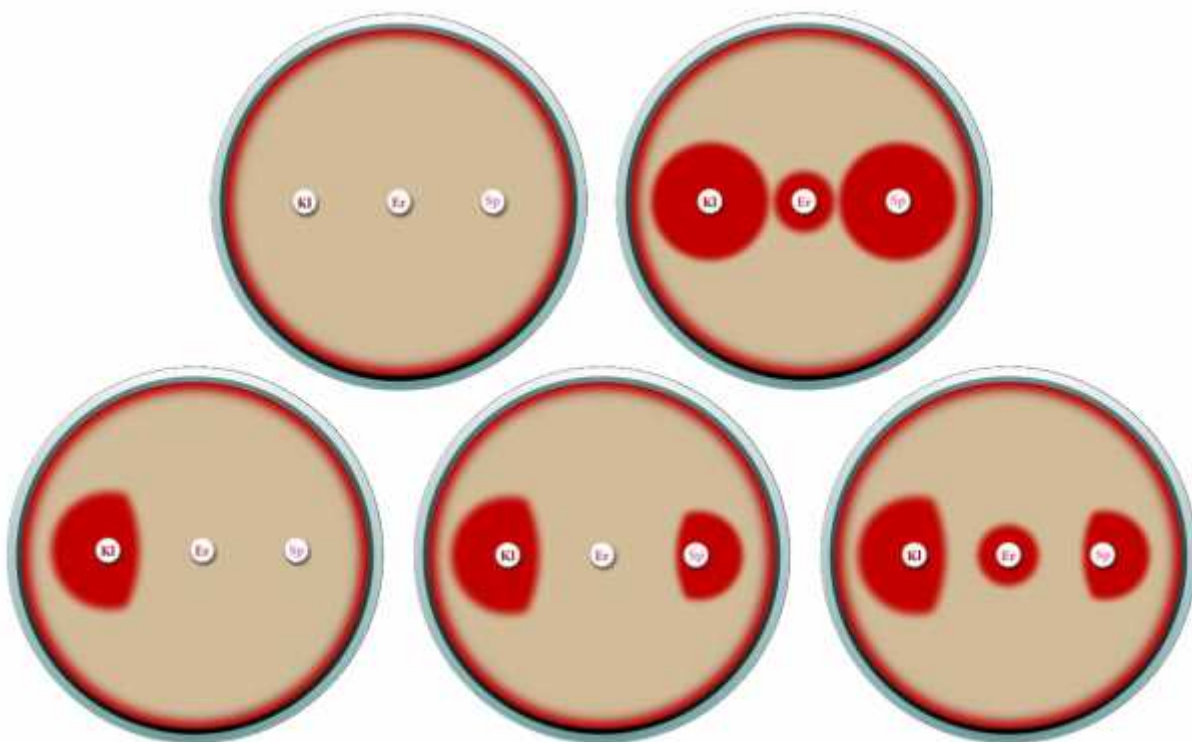
Pojedina ne kolonije GAS, sveže bakterijske kulture na KKA, suspendovane su u fiziološki rastvor (FR). Gustina inokuluma je bila ekvivalentna turbiditetu od 0,5 McFarland (McF). Tako pripremljen inokulum je, pomo u sterilnog brisa, zasejavan na Miler Hinton (Mueller Hinton) krvni agar (MHKA) sa 5% ov ije krvi (bioMerieux, France). Nakon aplikacije diskova impregniranih antibiotikom, izvršena je inkubacija u trajanju od 20-24 sata, na temperaturi od 36°C, u aerobnim uslovima. Pre nici zona inhibicije rasta su o itavani u milimetrima, a kategorije osetljivosti su interpretirane prema preporukama CLSI standarda. Rezistentni i intermedijarno osetljivi sojevi su tretirani kao izolati sa smanjenom osetljivoš u na antibiotike. *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 je koriš en kao kontrolni soj.

3.2.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za eritromicin i klindamicin su određivane kombinovanim difuziono-dilucionim metodom antibiograma, korišćenjem E test traka (bioMérieux, Francuska). Od sveže prekonone kulture je pravljena bakterijska suspenzija turbiditeta 0,5 McF, koja je zasejavana na MHKA sa 5% ovije krvi (bioMérieux, France). Nakon inkubacije u trajanju od 20-24 sata na 36°C u aerobnim uslovima, određivana je minimalna inhibitorna koncentracija antibiotika. Rezultati su interpretirani prema preporukama CLSI (CLSI, 2011).

3.3. Fenotipovi rezistencije na makrolide

Fenotipovi rezistencije na makrolide su određeni korišćenjem modifikovanog trostrukog disk difuzionog testa (Seppala i sar., 1993; Giovanetti, 1999). Na MHKA je zasejana bakterijska suspenzija turbiditeta 0,5 McF, a zatim su naneti diskovi antibiotika: centralno disk eritromicina (15µg), a na rastojanjima od 15 do 20mm sa jedne strane disk klindamicina (2µg), a sa druge strane disk spiramicina (100µg) (bioRad, SAD). Ploče su inkubirane 20-24 sata na 36°C u aerobnim uslovima, nakon čega je određen fenotip rezistencije na makrolide (slika 3).



Slika 3: Fenotipovi rezistencije *S. pyogenes* na makrolidne antibiotike; (levo) klindamicin – Kl, (u sredini) eritromicin – Er, (desno) spiramicin – Sp; fenotipovi sa leva na desno, odozgo na dole: cMLS, M, iMLS-A, iMLS-B, iMLS-C

Rezultati su očitavani na osnovu prenika i izgleda zone inhibicije rasta oko antibiotika. Kod sojeva sa M fenotipom, koji su rezistentni na 14- i 15- lane makrolide, prenika zone inhibicije rasta oko eritromicina je do 15mm, dok su zone inhibicije rasta oko klindamicina i spiramicina široke. Kod cMLS fenotipa rezistencije na makrolide nema zona inhibicije rasta ni oko jednog diska. IMLS fenotip se karakteriše rezistencijom na eritromicin i smanjenom osetljivošću na klindamicin u prisustvu induktora (makrolida). Postoje tri subfenotipa iMLS rezistencije na makrolidne antibiotike. Na MHKA se iMLS-A subfenotip karakteriše odsustvom zona inhibicije rasta oko diskova eritromicina i spiramicina i zaravnjenom zonom oko diska klindamicina. iMLS-B subfenotip se, takođe, odlikuje odsustvom zone inhibicije rasta oko diska eritromicina, ali se može uočiti „D“ zone oko diskova klindamicina i spiramicina. Za razliku od prethodna dva subtipa, iMLS-C se karakteriše postojanjem

zone pre nika do 15mm oko diska eritromicina i „D“ zonom inhibicije rasta oko diskova spiramicina i klindamicina (slika 3).

3.4. Detekcija gena koji kodiraju rezistenciju na makrolide i tetracikline

Svi sojevi su testirani na prisustvo gena koji kodiraju rezistenciju na makrolidne antibiotike i tetracikline. Geni koji determinišu rezistenciju na ove antibiotike su detektovani reakcijom lan anog umnožavanja (engl. polymerase chain reaction, PCR), a dobijeni produkti su vizualizovani metodom horizontalne elektroforeze u agaroznom gelu i UV transiluminatorom. Koriš en je sistem za fotodokumentaciju.

3.4.1. Izolacija DNK

Ekstrakcija bakterijske DNK je obavljena termi kom metodom. Puna eza sveže prekono ne bakterijske kulture je suspendovana u 200µl puferovanog fiziološkog rastvora (engl. phosphate-buffered saline, PBS) u sterilnim plasti nima epruvetama, zapremine 1,5 ml (Eppendorf, Nema ka). Nakon homogenizacije suspenzije u vorteks aparatu (Vortex genius 3, Ika, Nema ka), dodato je još 800µl PBS. Posle centrifugiranja u trajanju od 2 min. na 20000 x g, supernatant je odba en. Sediment je suspendovan u 200µl sterilne destilovane vode i homogenozovan. Epruvete su potom zagrevane u pe nici na 95-100°C, 10min, nakon ega su hla ene na ledu i centrifugirane na 16000 x g, 15min, na 4°C. Supernatant, koji sadrži izolovanu DNK je prebacivan u novu sterilnu plasti nu mikroepruvetu, zapremine 1,5ml. Izolovana DNK je bila odmah upotrebljena ili je uvana u frižideru na temperaturi +4°C u periodu do 7 dana ili u zamrziva u na -20°C u dužem vremenskom periodu.

3.4.2. Kvantitacija DNK (merenje prinosa DNK)

DNK kvantitacija je obavljena korišćenjem spektrofotometra (Biophotometer 8,5 Light Center Height, Eppendorf, Nemačka). Koncentracija izolovane DNK je izražavana na osnovu absorpcije svetlosti određene talasne dužine (260nm) prema Lambert Beer zakonu.

3.4.3. Prajmeri korišćeni za umnožavanje gena koji kodiraju rezistenciju

S. pyogenes na makrolidne antibiotike i tetracikline

Geni koji determinišu rezistenciju na makrolide (*mefA*, *ermA* i *ermB*) su detektovani PCR metodom, korišćenjem prajmera, čije su sekvence prethodno publikovane (Sutcliffe i sar., 1996; Brandt, 2001; Weber, 2001). Geni koji kodiraju rezistenciju na tetracikline, *tetO* i *tetM*, su takođe identifikovani metodom PCR, prema prethodno objavljenom protokolu (Pećrez-Trallero, 2007).

Temperature topljenja (engl. melting temperature, T_M) prajmera su određene korišćenjem PerlPrimer programa, na osnovu dužine sekvenci i procentualne zastupljenosti različitih nukleotida. U zavisnosti od T_M Fw i Rev prajmera, dizajnirana je temperatura vezivanja prajmera (engl. annealing temperature, T_A), koja je korišćena u protokolima za PCR ($T_A \sim T_M - 5^\circ\text{C}$). Eventualna međusobna komplementarnost prajmera proverena je korišćenjem web servera OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Prajmeri (Invitrogen, SAD), su rastvoreni u koncentraciji od 100 μM i čuvani na $T = -20^\circ\text{C}$. Koncentracije radnih rastvora su bile 20 μM i oni su čuvani na $T = -20^\circ\text{C}$.

Tabela 1: Prajmeri koji su koriš eni za umnožavanje gena koji kodiraju rezistenciju na makrolide i tetracikline metodom PCR

Prajmer	Sekvenca 5 3	Produkt (bp)	Referenca
<i>mefA</i> Fw	CTA TGACAG CCT CAA TGC G	1400	Brandt, 2001.
<i>mefA</i> Rev	ACC GAT TCT ATCAGC AAA G		
<i>ermA</i> Fw	GCA TGA CAT AAA CCT TCA	208	Weber, 2001.
<i>ermA</i> Rev	AGG TTA TAA TGA AAC AGA		
<i>ermB</i> Fw	CGA GTG AAA AAG TAC TCA ACC	617	Weber, 2001.
<i>ermB</i> Rev	GGC GTG TTT CAT TGC TTG ATG		
<i>tetO</i> Fw	GCG GAA CAT TGC ATT TGA CGG	538	Pe´rez, 2007.
<i>tetO</i> Rev	CTC TAT GGA CAA CCC GAC AGA AG		
<i>tetM</i> Fw	AGT TTT AGC TCA TGT TGA TG	1862	Pe´rez, 2007.
<i>tetM</i> Rev	TCC GAC TAT TTG GAC GAC GG		

3.4.4. Reakcija lan anog umnožavanja gena koji kodiraju rezistenciju *S. pyogenes* na makrolidne antibiotike i tetracikline

Za PCR su koriš ene sterilne plasti ne mikroeprovete, zapremine 0,2ml (Eppendorf, Nema ka). Reakcione smeše zapremine 25µl su inili 12µl Taq PCR MasterMix (Qiagen, Nema ka), po 2µl 20µM rastvora odgovaraju ih prajmera (Invitrogen, SAD), 4µl dejonizovane vode (Qiagen, Nema ka) i 5µl bakterijske DNK. U reakcionoj smeši negativne kontrole, umesto bakterijske DNK, koriš ena je destilovana voda. Pozitivnu kontrolu je predstavljao uzorak, kod koga je prethodno, metodom PCR, dokazano prisustvo gena.

Mikroeprovete sa reakcionim smešama su stavljane u termoblok aparata (Mastercycler Gradient, Eppendorf), a uslovi pod kojima su se odvijale reakcije lan anog umnožavanja predstavljene su u tabeli 2.

Tabela 2: Uslovi izvođenja PCR za umnožavanje gena koji kodiraju rezistencije *S. pyogenes* na makrolidne antibiotike i tetracikline

	T (°C)	Vreme (min.)
1. Inicijalna denaturacija	95	5
2. Denaturacija	95	1
3. Vezivanje prajmera	50	1
4. Ekstenzija	72	1,5
5. Finalna ekstenzija	72	10
Broj ciklusa (od 2-4)	30	

3.4.5. Elektroforeza u agaroznom gelu

Elektroforetsko razdvajanje PCR produkata, na osnovu veličine produkta i naelektrisanja, obavljeno je u 1,5% agaroznom gelu. Smeša TAE pufera (40mM TRIS, 20mM sirćetne kiseline, 1mM EDTA, pH=7,6) i agaroze je više puta kuvana do tačke ključanja radi homogenizacije, do postizanja bezbojnosti. U tekućinu agarozu je sipan 0,01% etidijum bromid, interkalirajuća boja, radi vizualizacije produkta. Smeša je zatim razlivena u kalup za gel, u koji je prethodno uvršćen plastični ešalj, koji služi za formiranje bunara. Nakon stezanja gela, ešalj je izvađen, a ceo sistem je unesen u kadicu za elektroforezu u koju je sipan TAE pufer do granične linije. Bunari su punjeni mešavinom 8 μ l PCR produkta i 2 μ l pufera za punjenje koncentracije 5X (engl. loading buffer), odnosno rastvora bromfenol plavog (Fermentas, SAD). Pored ispitivanih PCR produkata na gel je nanošen i DNK standard (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas, SAD), odnosno smeša DNK fragmenata poznatih veličina (engl. ladder) u zapremini od 5 μ l. Elektroforeza je obavljena pri naponu struje od 100V u trajanju od 60min.

3.4.6. Vizualizacija PCR produkata

Vizualizacija je obavljena prosvetljavanjem gelova korišćenjem UV transiluminatora (Kodak Gel logic 200 imaging system, SAD). Pojava trake odgovarajućeg broja baznih parova ukazivala je na postojanje datog gena u ispitivanom uzorku, a izostanak trake na njegovo odsustvo. Sistem za fotodokumentaciju (Kodak, 1D 3.6, SAD) je korišćen za slikanje gelova i skladištenje dobijenih fotografija.

3.5. *emm* tipizacija sojeva *S. pyogenes* rezistentnih na makrolidne antibiotike

emm tipizacija predstavlja metodu genotipizacije, kojom se određuje *emm* tip odnosno podtip ispitivanog soja, porećenjem sekvenci nukleotida u delu ispitivanog *emm* gena i poznatih sekvenci *emm* gena iz baze sekvenci. Sekvenciranje *emm* gena, odnosno određivanje redosleda nukleotida u ispitivanom delu gena je obavljeno metodom završetka lanca (Sanger i sar., 1977). Metoda obuhvata umnožavanje *emm* gena metodom PCR, prečišćavanje dobijenog PCR produkta, reakciju cikličnog sekvenciranja, precipitaciju produkta cikličnog sekvenciranja i kapilarnu elektroforezu. Dobijena *emm* sekvenca je porećena sa CDC bazom sekvenci (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/assigning.htm>), kao i sa BLAST (engl. Basic Local Alignment Search Tool) bazom sekvenci (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.5.1. Umnožavanje *emm* gena metodom PCR

emm gen je umnožen reakcijom lančanog umnožavanja po protokolu Podbielskog i saradnika (Podbielski i sar., 1991), korišćenjem prajmera (Invitrogen, SAD) prikazanih u tabeli 3.

Tabela 3: Prajmeri koji su korišćeni za amplifikaciju *emm* gena MRGAS sojeva

Prajmer	Sekvenca 5' 3'	Produkt (bp)	Referenca
<i>emm</i> Fw	ATA AGG AGC ATA AAA ATG GCT	1200	Podbielski, 1991.
<i>emm</i> Rev	AGC TTA GTT TTC TTC TTT GCG		

N-terminalni hipervarijabilni region *emm* gena je amplifikovan metodom PCR u reakcionoj smeši zapremine 25 μ l. U sterilnim, plastičnim mikroeprijetama, zapremine 0,2ml (Eppendorf, Nemačka) pravljena je reakciona smeša, koju su činili 12 μ l Taq PCR MasterMix (Qiagen, Nemačka), po 2 μ l rastvora prajmera *emm* Fw i *emm* Rev, koncentracije 20 μ M (Invitrogen, SAD), 4 μ l dejonizovane vode (Qiagen, Nemačka) i 5 μ l bakterijske DNK. Mikroepriete sa reakcionim smešama su stavljane u termoblok aparata (Mastercycler Gradient, Eppendorf), pod uslovima opisanim u tabeli 4.

Tabela 4: Uslovi izvođenja PCR metode za umnožavanje *emm* gena MRGAS sojeva

	T (°C)	Vreme
1. Inicijalna denaturacija	94	5 sek.
2. Denaturacija	94	1 min.
3. Vezivanje prajmera	50	1 min.
4. Ekstenzija	72	1 min.
5. Finalna ekstenzija	72	10 min.
Broj ciklusa (od 2-4)	30	

Vizualizacija PCR produkata je vršena elektroforetskim razdvajanjem u 1,5% agaroznom gelu i prosvetljavanjem na UV transiluminatoru, kako je opisano u poglavljima 3.4.5. i 3.4.6.

3.5.2. Pre iš avanje PCR produkta

Dobijeni amplikon je pre iš en komercijalnim setom (QIAquick PCR purification kit), prema preporuci proizvo a a (Qiagen, Nema ka). U plasti ne mikroeprovete, zapremine 1,5ml je sipano 250 μ l PB pufera (pufer 1), nakon ega je dodato 50 μ l PCR produkta (preporu eni odnos zapremine pufera i uzorka je 5:1). Sadržaj je zatim prebacivan pipetom u spin kolone i centrifugiran 1 min na 17900 x g. Filtrat iz kolekcione epruvete je odstranjivan, a kolona je vra ana u istu epruvetu. Zatim je dodavano 750 μ l PE pufera (pufer 2) i sadržaj je opet centrifugiran 1min na 17900 x g. Dobijeni filtrat je odstranjen, a kolona vra ena u istu epruvetu. Nakon centrifugiranja u trajanju od 1min, pri brzini od 18000 x g, kolona je stavljena u istu plasti nu mikroeprovetu zapremine 1,5ml. Tokom prethodnih postupaka, DNK je adherisala za silika gel membranu u prisustvu visokih koncentracija soli, uz istovremeno filtriranje drugih sastojaka PCR produkta. U poslednjoj fazi purifikacije, finalna elucija je postignuta dodavanjem 30 μ l EB pufera (pufer 3) u centar membrane. Kolone su ostavljane 1 min na sobnoj T, a nakon centrifugiranja u trajanju od 1min, kolone su bacane, a pre iš eni PCR produkt iz plasti nih epruvata je uvan u frižideru na +4°C, do 7 dana, ili na -20°C u dužem vremenskom periodu.

3.5.3. Reakcija cikli nog sekvenciranja

U reakciji cikli nog sekvenciranja (engl. cycle sequencing) amplifikovan i pre iš en PCR produkt predstavlja matricu za sintezu jednostrukih DNK lanaca, razli itih dužina, komplementarnih matrici. U odnosu na PCR metodu, u reakciji cikli nog sekvenciranja se pored deoksiribonukleotida dodaju i dideoksiribonukleotidi, nakon ije ugradnje prestaje dalja elongacija lanca. etiri razli ita dideoksiribonukleotida su obeležena sa etiri razli ite fluorescentne boje. Produkt reakcije ine proizvodi razli itih dužina, koji su komplementarni matrici. Reakciona smeša zapremine 15 μ l se sastojala od 1 μ l komercijalne smeše Big Dye Terminator v3.1 CycleSequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, Applied Biosystems, SAD), 1 μ l 20 μ M *emm* Fw prajmera ATA AGG AGC ATA AAA ATG GCT, 3 μ l pufera (Applied

Biosystems, SAD), 9µl dejonizovane vode i 1µl pre iš enog PCR produkta. Plasti ne mikroepruvete zapremine 0,2ml (Eppendorf, Nema ka), u kojima su bile reakcione smeše, postavljane su u termoblok aparata (Mastercycler Gradient, Eppendorf) pod uslovima opisanim u tabeli 5.

Tabela 5: Uslovi izvo enja reakcije cikli nog sekvenciranja amplifikovanog i pre iš enog *emm* gena

	T (°C)	Vreme
1. Inicijalna denaturacija	96	1min.
2. Denaturacija	96	10sek.
3. Vezivanje prajmera	50	5sek.
4. Ekstenzija	60	4min.
Broj ciklusa (od 2-4)	40	

Dobijeni produkti su uvani na $T=+4^{\circ}\text{C}$ ili na $T=-20^{\circ}\text{C}$ do faze pre iš avanja.

3.5.4. Precipitacija produkta cikli nog sekvenciranja izopropanolom

Zamrznuti produkti cikli nog sekvenciranja su, neposredno pred precipitaciju, odmrzavani na sobnoj temperaturi ($T=+25^{\circ}\text{C}$). U uzorke je dodavano 80µl 75% izopropanola. Nakon kratkog vorteksiranja uzorci su ostavljeni 15min. na sobnoj temperaturi u mraku. Posle centrifugiranja u trajanju od 45min na 500 x g, mikroepruvete su okretane naopa ke i postavljane na papirnatu vatu u cilju odstranjivanja supernatanta. Zatim su uzorci centrifugirani još 2min., na 300 x g u istom položaju i inkubirani u mraku 15-30min. Precipitirani produkti su denaturisani odmah ili su uvani na $T=-20^{\circ}\text{C}$ do slede e faze.

3.5.5. Denaturacija

Nakon precipitacije, u uzorke cikličnog sekvenciranja je dodato 20 μ l formamida. U termobloku je vršena denaturacija na temperaturi od 94°C, u trajanju od 2min. Uzorci su prebacivani u plastične stripove (Eppendorf, Nemačka), koji su stavljeni u automatizovani sekvenator (310 Genetic Analyser, Applied Biosystems) u kome se vrši kapilarna elektroforeza.

3.5.6. Kapilarna elektroforeza

Prethodno pripremljeni produkti reakcije cikličnog sekvenciranja u procesu elektroforeze prolaze kroz kapilaru automatizovanog sekvenatora (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer; Applied Biosystems). Na kraju svakog umnoženog fragmenta nalazi se dideoksinukleotid (DDN), koji je obeležen fluorescentnom bojom. Pri izlaganju snopu laserskih zraka, obeleženi DDN, biva eksitiran, a kamera aparata detektuje svetlost određene talasne dužine. Dobijeni rezultati se obrađuju softverski (Sequences Analysis 5.1), nakon čega se konstruiše elektroferogram, odnosno skup sinusoidnih krivi, različitih boja, čiji vrhovi odgovaraju nukleotidima na odgovarajućim mestima. Vrhovi kriva su obeleženi slovima odgovarajućih nukleotida (A, T, G, C), a njihov redosled odgovara ispitivanoj sekvenci. Sekvence su obrađivane i analizirane BioEdit 7.0.1 i MEGA 5.0 softverima.

3.5.7. Određivanje *emm* tipa, odnosno *emm* podtipa MRGAS sojeva

Dobijene sekvence *emm* gena su upoređivane sa sekvencama CDC baze (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm>), kao i sa sekvencama BLAST baze (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). *emm* tip odnosno podtip je određen na osnovu visokog stepena homologije (92%) između sekvence ispitivanih sojeva i sekvenci iz baze podataka. Analizom ~90bp koji kodiraju 30 rezidua određeni su *emm* tip, a analizom ukupno ~150bp, koji kodiraju 50 rezidua, određeni su *emm* tip i podtip.

3.6. MLST (engl. multilocus sequence typing)

3.6.1. Umnožavanje sedam visoko konzerviranih gena MRGAS sojeva metodom PCR

Tipizacija sojeva metodom MLST je izvršena prema metodologiji koju su opisali Enright i saradnici (Enright i sar., 2001). Prajmeri korišteni u reakciji lančanog umnožavanja su prikazani u tabeli 7. PCR metodom je amplifikovano 7 visoko konzerviranih (engl. *house-keeping*) gena koji kodiraju: glukokinazu (*gki*), transporter glutamina (*gtr*), glutamat racemazu (*murI*), DNK reparacioni protein (*mutS*), transketolazu (*recP*), ksantin fosforibozil transferazu (*xpt*) i acetil CoA acil-transferazu (*yqiL*) (tabela 7). PCR metoda je izvođena u sterilnim, plastičnim mikroepiuvetama, zapremine 0,2ml (Eppendorf, Nemačka). Reakciona smeša zapremine 25μl, se sastojala od 12μl Taq PCR MasterMix (Qiagen, Nemačka), po 2μl 20μM rastvora Fw i Rev prajmera (Invitrogen, SAD), 4μl dejonizovane vode (Qiagen, Nemačka) i 5μl bakterijske DNK, pod uslovima opisanim u tabeli 6.

Tabela 6: Uslovi izvođenja PCR metoda za umnožavanje 7 „house-keeping“ gena

	T (°C)	Vreme (min.)	Referenca
1. Inicijalna denaturacija	95	5	Enright i sar, 2001.
2. Denaturacija	95	1	
3. Vezivanje prajmera	55	1	
4. Ekstenzija	72	1	
5. Finalna ekstenzija	72	10	
Broj ciklusa (od 2-4)	28		

Tabela 7: Prajmeri koji su korišteni za umnožavanje gena u MLST metodi

Prajmer	Sekvenca 5' 3'	Produkt (bp)
<i>gki</i> Fw	GGC ATTG GAA TGG GAT CAC C	498
<i>gki</i> Rev	TCT CCT GCT GCT GAC AC	
<i>gtr</i> Fw	GAG GTT GTG GTG ATT ATT GG	450
<i>gtr</i> Rev	GCA AAG CCC ATT TCA TGA GTC	
<i>murl</i> Fw	TGC TGA CTC AAA ATG TTA AAA TGA TTG	438
<i>murl</i> Rev	GAT GAT AAT TCA CCG TTA ATG TCA AAA TAG	
<i>mutS</i> Fw	GAA GAG TCA TCT AGT TTA GAA TAC GAT	405
<i>mutS</i> Rev	AGA GAG TTG TCA CTT GCG CGT TTG ATT GCT	
<i>recP</i> Fw	GCA AAT TCT GGA CAC CCA GG	459
<i>recP</i> Rev	CTT TCA CAA GGA TAT GTT GCC	
<i>xpt</i> Fw	TTA CTT GAA GAA CGC ATC TTA	450
<i>xpt</i> Rev	ATG AGG TCA CTT CAA TGC CC	
<i>yiqL</i> Fw	TGC AAC AGT ATG GAC TGA CCA GAG AAC AAG ATG C	434
<i>yiqL</i> Rev	CAA GGT CTC GTG AAA CCG CTA AAG CCT GAG	

(Enright i sar, 2001.)

3.6.2. Preišavanje PCR produkta

PCR produkti su preišavani komercijalnim setom za purifikaciju (QIAquick PCR purification kit, Qiagen, Nemačka), prema preporuci proizvođača, kako je opisano u poglavlju 3.5.2.

3.6.3. Reakcija cikličnog sekvenciranja

Reakcija cikličnog sekvenciranja (engl. cycle sequencing) je vršena prema prethodno objavljenom protokolu (Enright i sar., 2001), sa prajmerima koji su korišteni i u PCR metodi.

3.6.4. Precipitacija i denaturacija produkta cikli nog sekvenciranja izopropanolom

U produkte cikli nog sekvenciranja je dodavano 80 μ l 75% izopropanola nakon ega su obavljane procedure opisane u poglavlju 3.5.4. i denaturacija po metodi opisanoj u poglavlju 3.5.5.

3.6.5. Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza je postupak u kome se prethodno prpremljeni produkti reakcije cikli nog sekvenciranja razvrstavaju prema veli ini u kapilari automatizovanog sekvenatora i ekscitiraju laserskim snopom. Detalji postupka su opisani u poglavlju 3.5.6. Rezultat celog procesa predstavlja redosled nukleotida u umnoženoj sekvenci.

3.6.6. Odre ivanje tipa sekvence

Dobijene sekvence sedam „*house keeping*“ gena streptokoka grupe A su upore ivane sa referentnim sekvencama baze na internet sajtu <http://spyogenes.mlst.net/misc>, pri emu je svaka od 7 sekvenci, pore anih prema abecednom redu (*gki*, *gtr*, *murl*, *mutS*, *recP*, *xpt*, *yiql*), dobila svoj alelni broj. Dakle, svaki izolat je definisan kombinacijom 7 brojeva, koji odre uju njegov alelni profil, odnosno sequence type (ST). Izolati sa identitnim alelnim profilom pripadaju istom ST. Evolutivna srodnost sojeva je analizirana pore enjem alelnih profila.

3.7. RAPD tipizacija

3.7.1. Nasumi no umnožavanje fragmenata DNK

Nasumi nim vezivanjem jednog prajmera, za DNK matricu ispitivanih sojeva, umnožavane su genske sekvence, metodom PCR. U našem istraživanju je korišten prajmer H2 (5' CCT CCC GCC ACC 3'), koji je u brojnim studijama opisan kao najdiskriminativniji među ispitivanim u RAPD tipizaciji sojeva GAS (Seppala, i sar., 1994; Bert i sar., 1996). Umnožavanje fragmenata je vršeno u reakcionoj smeši zapremine 50 μ l, prema modifikovanom protokolu Sepale i saradnika (Seppala i sar., 1994), opisanom u tabeli 8.

Tabela 8: Uslovi izvođenja PCR metode za umnožavanje fragmenata DNK *S. pyogenes* (RAPD tipizacija)

	T (°C)	Vreme (min.)	Referenca
1. Inicijalna denaturacija	94	0,5	Seppala i sar., 1994.
2. Denaturacija	94	0,5	
3. Vezivanje prajmera	38	1	
4. Ekstenzija	72	1	
5. Finalna ekstenzija	72	10	
Broj ciklusa (od 2-4)	40		

3.7.2. Vizualizacija RAPD produkata

Elektroforetsko razdvajanje RAPD produkata je vršeno na osnovu veličine produkata i naelektrisanja u 2% agaroznom gelu. Smeša TAE pufera i agaroze je više puta kuvana do postizanja tačke ključanja, radi homogenizacije. Nakon dodavanja 0,01% etidijum bromida, smeša je razlivana u prethodno pripremljen kalup. Nakon

stezanja gela, sistem u koji su specijalnim ešljevim napravljeni bunar i i, je stavljan u kadicu za elektroforezu i punjen na slede i na in: 20µl PCR produkta i 4µl pufera za punjenje (loading buffer, Fermentas, SAD) konc. 10X. U najmanje jedan bunar i je unošen DNK standard (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas, SAD). Elektroforeza je obavljena pri naponu struje od 75V u trajanju od 120min.

Vizualizacija produkata je vršena koriš enjem UV transiluminatora. Svi sojevi MRGAS su svrstani u odre ene RAPD profile na osnovu pore enja broja i veli ine umnoženih produkata (Seppala i sar., 1994; Rogers, 2007). Vizualizovani RAPD profili su ozna eni slovima od A do Z i oni predstavljaju razli ite klonove izolata grupe A streptokoka. Identit an RAPD profil sojeva je ukazivao na zajedni ko klonsko poreklo izolata. Ukupni broj razli itih profila i broj sojeva unutar istog profila ukazivao je na heterogenost, odnosno homogenost (klonsku vezu) ispitivanih MRGAS. Kako je diskriminativna mo RAPD tipizacije ve a od MLST i *emm* tipizacije, u okviru naj eš ih ST i *emm* tipova, izvršeno je RAPD profilisanje sojeva MRGAS. Analiziran je broj i sli nost razli itih RAPD profila unutar jednog *emm* tipa. RAPD profili koji su postojali kod samo jednog soja, ozna eni su kao jedinstveni, a oni koji su uo eni kod najmanje 2 izolata, svrstani su u ponavljaju e. Analizirana je i klonska povezanost sojeva u okviru istih fenotipova rezistencije na makrolide, ali i klonska veza sojeva izolovanih kod pacijenata iz istih regiona u zemlji.

Analiza klastera je izvršena konstruisanjem grafi kog dijagrama u vidu stabla, dendrograma, pomo u programa Restdist i Neighbour iz Phylip paketa, pri emu je koriš en metod prose ne udaljenosti izme u grupa (engl. unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA).

3.8. Statisti ka obrada rezultata

U statisti koj obradi rezultata koriš ene su metode deskriptivne statistike, pri emu su izra unavane u estalosti fenotipova i genotipova. Za procenu zna ajnosti rezlike koriš en je χ^2 test ($P < 0,05$ -statisti ki zna ajna razlika). Indeks diverziteta pojedinih fenotipova i *emm* tipova je izra unat koriš enjem Simpsonovog indeksa (engl. *Symptoms Diversity Index*) (Hunter, 1988). Diskriminativna mo RAPD metode u odnosu na MLST je procenjena koriš enjem istog indeksa diverziteta.

4.

Rezultati

4. Rezultati

4.1. Uestalost rezistencije grupe A streptokoka na makrolidne antibiotike u Srbiji

U jednogodišnjem periodu, od decembra 2007. god. do decembra 2008. god. u 13 regionalnih laboratorija u Srbiji, iz brisa guše pacijenata obolelih od tonzilofaringitisa, izolovano je i identifikovano ukupno 3893 soja *S. pyogenes*, od ega je 484 bilo rezistentno na makrolide. To zna i da je u estalost rezistencije faringealnih izolata *S. pyogenes* na makrolide u Srbiji u 2008. godini iznosila 12%. Na podru ju grada Beograda procentualna zastupljenost rezistencije GAS na makrolide je bila 15%, dok je u Vojvodini bila samo 7%. U ostalim regionima, prevalencija rezistencije *S. pyogenes* na makrolide je odgovarala prose noj zastupljenosti rezistencije u Srbiji. Nije uo ena statisti ki zna ajna razlika u procentualnoj zastupljenosti rezistencije ($p>0,05$) u razli itim delovima zemlje.

4.2. Fenotipovi i genotipovi rezistencije na makrolide sojeva *S. pyogenes* izolovanih u Srbiji

Dominantan fenotip rezistencije na makrolide je bio M fenotip, koji je identifikovan kod 56 sojeva (72,7%), dok je ukrštena rezistencija na MLS antibiotike bila zastupljena kod samo 21 izolata (27,3%) (slika 4). Me u sojevima sa MLS fenotipom, iMLS rezistenciju je imalo 16 sojeva (20,8%), dok je 5 (6,5%) izolata posedovalo cMLS fenotip rezistencije na makrolide (tabela 9; grafik 1). Subfenotip iMLS-A je bio uo en kod 10 od 16 iMLS izolata, iMLS-B kod 6 od 16, dok subfenotip iMLS C nije bio detektovan me u ispitivanim sojevima.

Sojevi sa M fenotipom rezistencije na makrolidne antibiotike su se odlikovali umerenim stepenom rezistencije na eritromicin, pri emu je MIK_{50} iznosio $8\mu\text{g/ml}$ i osetljivoš u na klindamicin sa MIK_{50} od $0,047\mu\text{g/ml}$. Izolati sa oba iMLS subfenotipa (iMLS A i iMLS B) su imali visoke MIK za eritromicin, MIK_{50} $256\mu\text{g/ml}$ i istovremeno

su bili osetljivi na klindamicin u odsustvu induktora (MIK₅₀ 0,064μg/ml), dok je posle indukcije vrednost MIK porasla 4 puta (MIK₅₀ 0,25μg/ml). Najviše vrednosti MIK za eritromicin i klindamicin su imali sojevi sa cMLS fenotipom, kod kojih su vrednosti MIK₅₀ za oba antibakterijska agensa iznosila >256μg/ml.

a) M fenotip rezistencije
S. pyogenes na makrolide



b) iMLS-B subfenotip rezistencije
S. pyogenes na makrolide



c) cMLS fenotip rezistencije
S. pyogenes na makrolide



**Slika 4: Fenotipovi rezistencije MRGAS sojeva izolovanih u Srbiji na makrolide
(a-M, b-iMLS-B, c-cMLS)**

Tabela 9: Minimalne inhibitorne koncentracije eritromicina i klindamicina MRGAS sojeva izolovanih u Srbiji u periodu od 2007. do 2008. godine

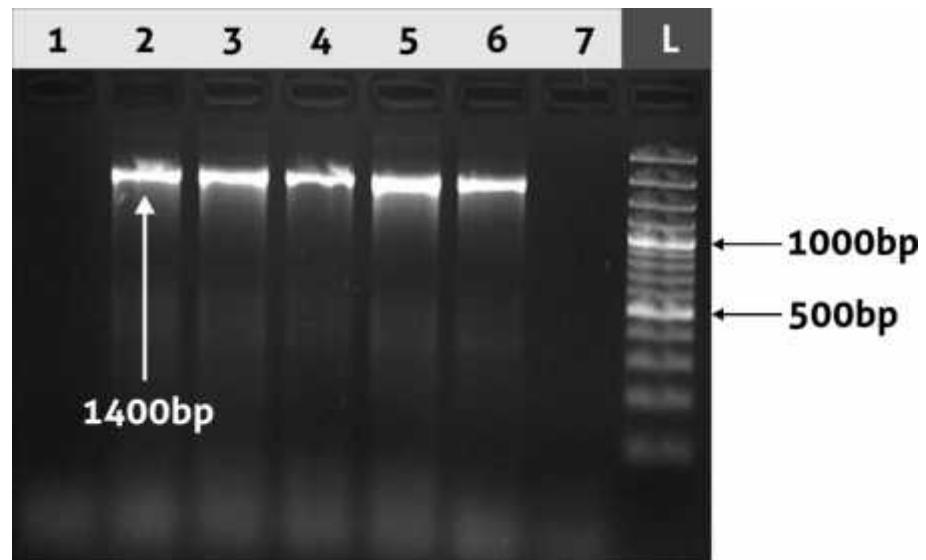
fenotip rezistencije na makrolide	broj izolata	%	antibiotik	MIK ($\mu\text{g/ml}$)		
				50%	90%	rang
M	56	72,7	eritromicin	8	16	2-16
			klindamicin	0,047	0,094	0,032-0,094
iMLS	16	20,8	eritromicin	>256	>256	128->256
			klindamicin	0,25	0,25	0,25
cMLS	5	6,5	eritromicin	>256	>256	>256
			klindamicin	>256	>256	>256

% - procenat izolata

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

Kod svih 56 sojeva sa M fenotipom rezistencije na makrolide je identifikovan *mefA* gen (slika 5). Svih 16 sojeva sa iMLS fenotipom je imalo *ermA* gen, dok je kod 2 izolata pored *ermA* gena, istovremeno bio prisutan i *mefA* gen. etiri soja sa cMLS fenotipom rezistencije na makrolide je posedovalo *ermB* gen (slika 6), dok kod jednog izolata nije identifikovan nijedan od gena koji kodiraju rezistenciju na makrolide (grafik 1).

IMLS fenotip je bio dominantan me u sojevima sa ukrštenom MLS rezistencijom na teritoriji naše zemlje (82,4%), osim na području grada Beograda, gde je uo en jednak broj sojeva sa iMLS i cMLS fenotipom rezistencije na makrolide.



Slika 5: Gel elektroforeza u agaroznom gelu; PCR metoda detekcije *mefA* gena kod MRGAS sojeva izolovanih u Srbiji; *mefA* gen – 1400bp

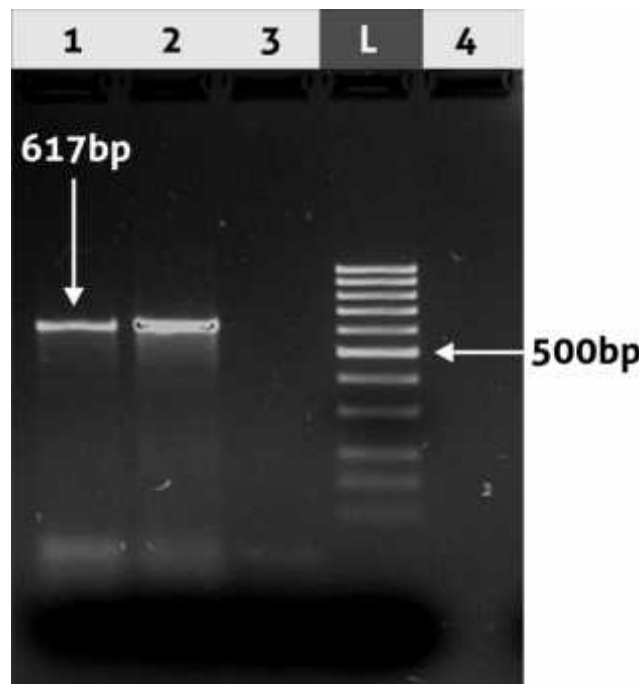
Traka 1 – negativna kontrola

Traka 2 – pozitivna kontrola

Trake 3-6 – pozitivni uzorci

Traka 7 – negativan uzorak

Traka L – DNK standard (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas)



Slika 6: Gel elektroforeza u agaroznom gelu; PCR metoda detekcije *ermB* gena kod MRGAS sojeva izolovanih u Srbiji; *ermB* gen – 617bp

Traka 1 – pozitivna kontrola

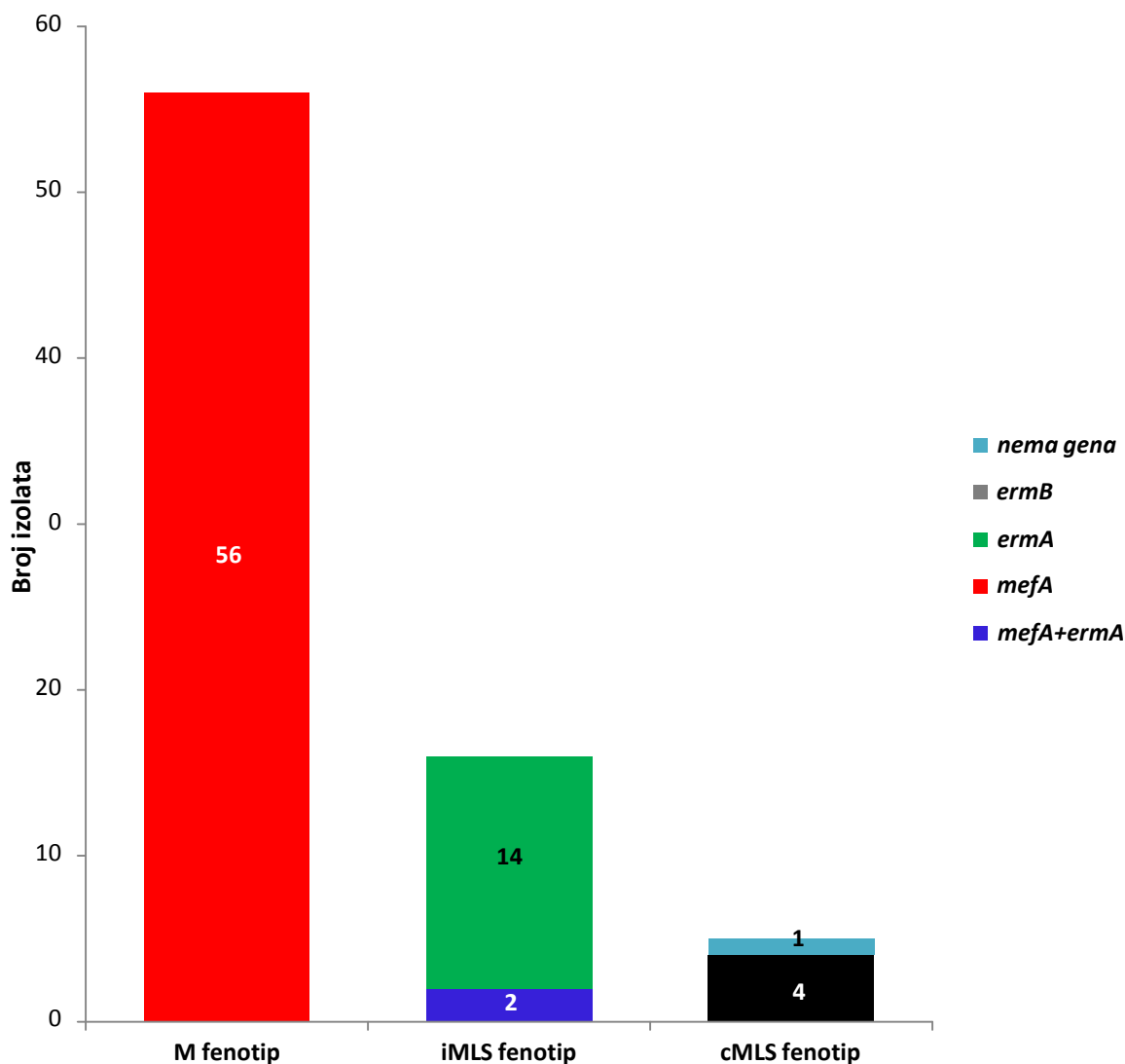
Traka 2 – pozitivan uzorak

Trake 3 – negativan uzorak

Traka L – DNK standard (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas)

Traka 4 – negativna kontrola

Grafik 1: Zastupljenost genotipova i fenotipova rezistencije na makrolide kod sojeva MRGAS izolovanih u Srbiji u periodu od 2007. do 2008. godine

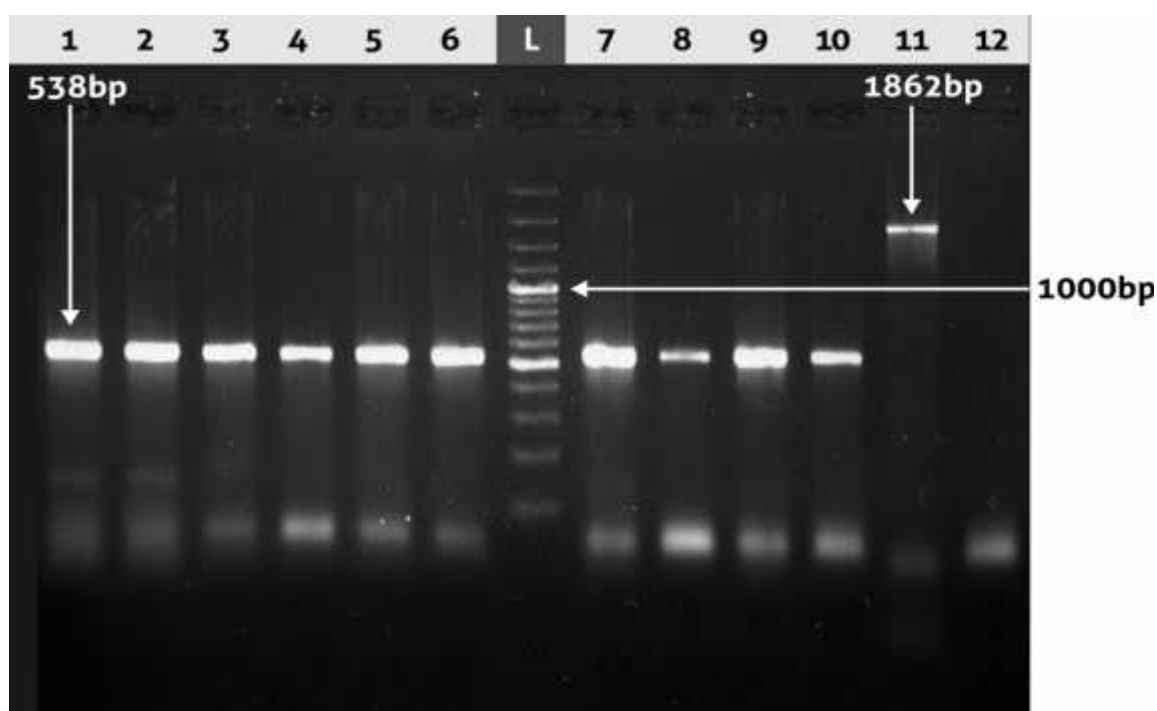


4.3. Osetljivost MRGAS sojeva na tetracikline i zastupljenost gena koji determinišu rezistenciju na tetracikline

Više od dve trećine MRGAS sojeva izolovanih u Srbiji u periodu od decembra 2007. do decembra 2008. godine, odnosno 57 izolata (74%) je bilo osetljivo na tetracikline, dok je 20 sojeva (26%) bilo rezistentno na tetracikline, odnosno imali su udruženu rezistenciju na eritromicin i na tetracikline.

Kod svih sojeva grupe A streptokoka koji su imali smanjenu osetljivost na tetraciklin je identifikovan neki od gena koji kodiraju rezistenciju na ove antibiotike

mehanizmom izmene ciljnog mesta delovanja (*tetO*; *tetM* gen). *tetO* gen (slika 7) je bio dominantan gen koji kodira rezistenciju GAS na tetracikline i identifikovan je kod 16 TRGAS izolata (80%). Svi sojevi sa *tetO* genom su imali iMLS fenotip rezistencije na makrolide i *ermA* gen. *tetM* gen je dokazan kod samo 4 TRGAS soja (20%), koji su svi imali cMLS fenotip. Kod 3 soja sa *tetM* genom je dokazano i prisustvo *ermB* gena, dok kod jednog izolata nije identifikovan nijedan gen koji determiniše rezistenciju na makrolide.



Slika 7: Gel elektroforeza u agaroznom gelu; PCR metoda detekcije gena koji kodiraju rezistenciju na tetracikline (*tetO* i *tetM*) kod MRGAS sojeva izolovanih u Srbiji u periodu od 2007. do 2008. godine

- Traka 1** – pozitivna kontrola za *tetO* gen
- Trake 2-10** – pozitivni uzorci za *tetO* gen
- Traka L** – DNK standard (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas)
- Traka 11** – pozitivna kontrola za *tetM* gen
- Traka 12** – negativna kontrola

4.4. Distribucija *emm* tipova izolata GAS rezistentnih na makrolidne antibiotike

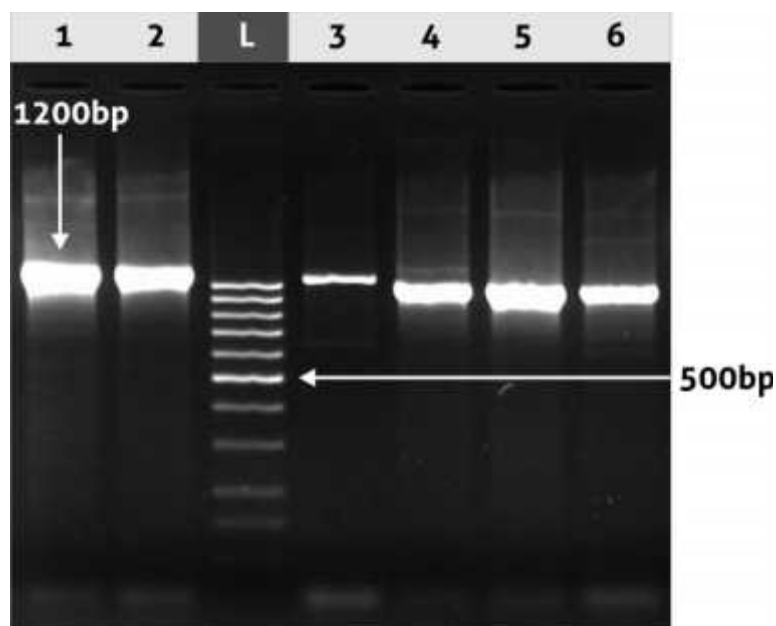
emm genotipizacijom je identifikovano 5 razli itih *emm* tipova: *emm75* (32 izolata, 41,6%), *emm12* (27 izolata, 35%), *emm77* (16 izolata, 20,8%), *emm28* (1 izolat, 1,3%) i *emm118* (1 izolat, 1,3%). Tri naj eš a *emm* tipa, *emm12*, *emm75* i *emm77* su bila identifikovana kod najve eg broja izolata, tj. kod 97% sojeva (grafik 2). U okviru tipa *emm12*, identifikovana su 2 podtipa, odnosno 2 alelne varijante *emm* tipa: *emm12.0* i *emm12.7*, pri emu je *emm12,7* subtip na en kod samo jednog od ukupno 27 sojeva *emm12* tipa (tabela 10).

Tabela 10: Zastupljenost razli itih *emm* tipova i njihovih alelnih varijanti kod MRGAS sojeva izolovanih u Srbiji u periodu od 2007. do 2008. godine

	<i>emm</i> tip	<i>emm</i> podtip	N	%
	12	12,0	26	33,8
		12,7	1	1,3
	28	28,0	1	1,3
	75	75,0	32	41,6
	77	77,0	16	20,8
	118	118,0	1	1,3
Ukupno	5	6	77	100

N - broj izolata

% - procenat izolata



Slika 8: Gel elektroforeza u agaroznom gelu; PCR metoda detekcije *emm* gena kod MRGAS sojeva izolovanih u Srbiji; *emm* gen – 1200bp

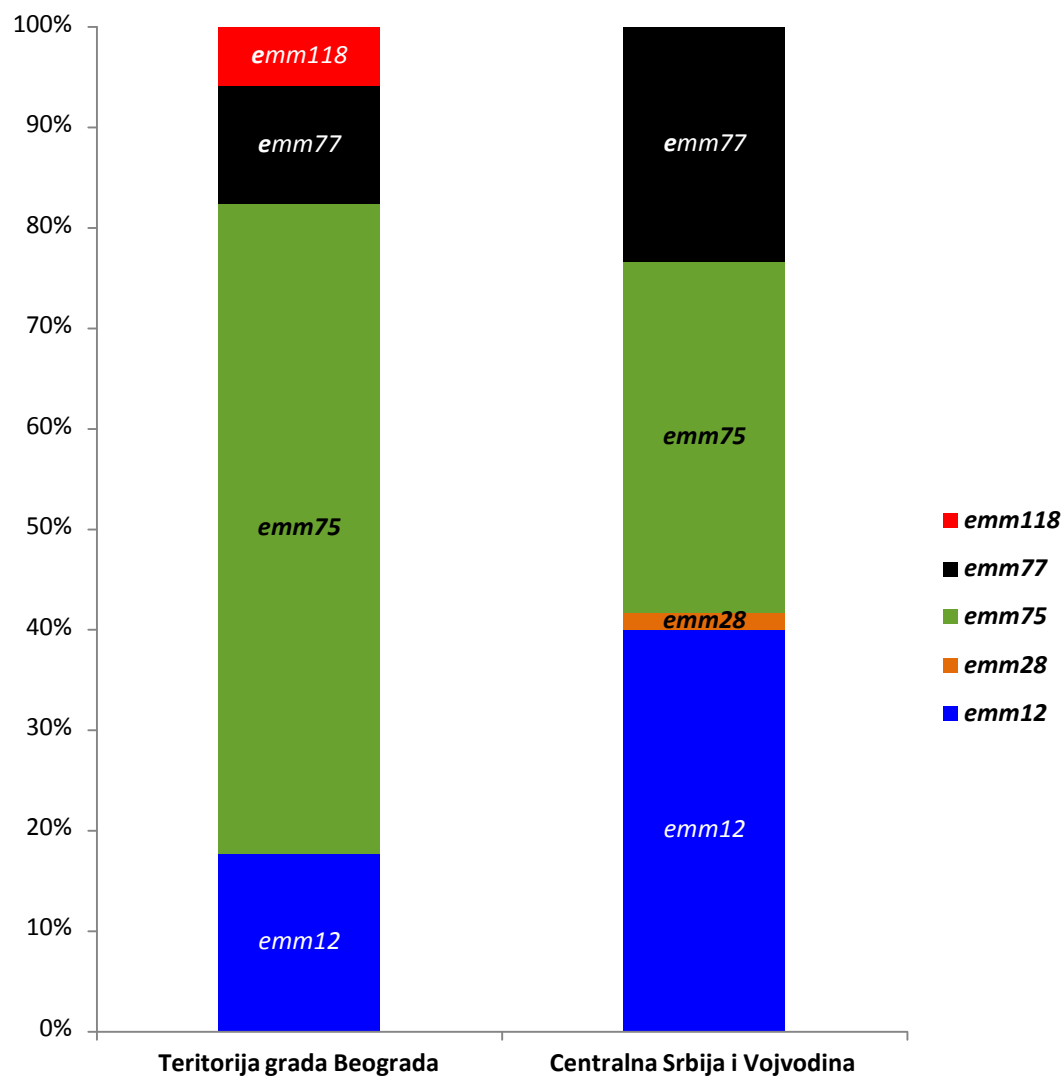
Traka 1 – pozitivna kontrola

Trake 2-6 – pozitivni uzorci

Traka L – DNK standard (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas)

Nisu uo ene statisti ki zna ajne razlike u geografskoj distribuciji *emm* tipova u Beogradu u odnosu na druge oblasti u Srbiji ($p>0,05$). Ipak, za razliku od ostalih delova zemlje, gde je identifikovan manji broj razli itih *emm* tipova (od 1 do 3), na teritoriji grada Beograda su identifikovana etiri razli ita *emm* tipa (*emm118*, *emm12*, *emm75* i *emm77*), me u kojima je dominantan bio *emm75* (64,7%). *emm12* je identifikovan kod 3 od 17 izolata, *emm77* kod 2 od 17, a *emm118* kod samo jednog soja. Kao što je i o ekivano, najve a raznolikost *emm* tipova je uo ena u glavnom gradu. Najzastupljeniji *emm* tip u preostalom delu zemlje je bio *emm12* (35%), koji je bio dominantan u regionu Kraljeva (67,7%). Drugi po zastupljenosti *emm* tip u unutrašnjosti zemlje, *emm75*, je bio dominantan u Leskovcu i okolini (100%), dok je *emm77* bio naj eš i u Šapcu (82,4%). Jedini soj *emm28* je izolovan kod pacijenta iz Kraljeva.

Grafik 2: Geografska distribucija *emm* tipova sojeva MRGAS izolovanih u Srbiji u periodu od 2007. do 2008. godine



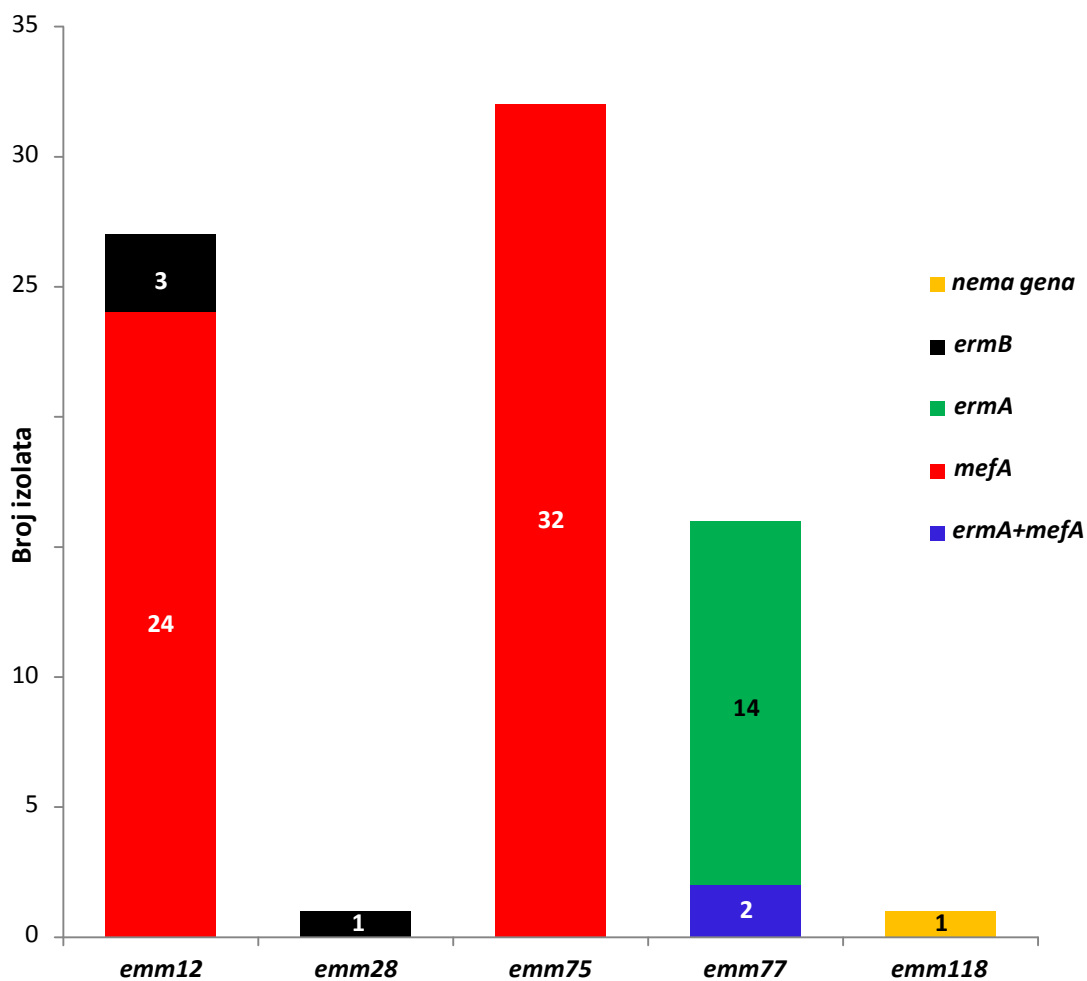
4.5. Povezanost *emm* tipova i genotipova/fenotipova rezistencije na makrolide

Kod tri naj eš a *emm* tipa uo en je visok stepen asocijacije sa fenotipovima i genotipovima rezistencije na makrolide. Svi testirani izolati genotipa *emm75* su posedovali *mefA* gen i pokazivali su M fenotip rezistencije na makrolide. Sojevi sa

genotipom *emm12* su ispoljavali dva fenotipa rezistencije na makrolide (M i cMLS), pri emu je M fenotip bio dominantan (88,9%). Svi sojevi tipa *emm12* sa M fenotipom rezistencije na makrolide su imali *mefA* gen. Svih 16 izolata genotipa *emm77* je imalo *ermA* gen i ispoljavali su iMLS fenotip, ali su 2 od 16 izolata pored *ermA* gena imali i *mefA* gen. Tip *emm28*, je imao cMLS fenotip i posedovao je *ermB* gen.

Jedan izolat genotipa *emm118* nije imao nijedan od tri ispitivana gena koji kodiraju rezistenciju na makrolidne antibiotike.

Grafik 3: Distribucija *emm* tipova i genotipova sojeva MRGAS izolovanih u Srbiji u periodu od 2007. do 2008. godine



4.6. Povezanost *emm* tipova i gena koji kodiraju rezistenciju na makrolide i tetracikline kod sojeva MRGAS rezistentnih na tetracikline

Sojevi sa smanjenom osetljivoš u na tetracikline su imali genotipove *emm77* (16 sojeva; 80%), *emm12* (3 soja; 15%) i *emm118* (1 soj; 5%) (tabela 11).

Dominantan *emm* tip me u izolatima sa smanjenom osetljivoš u na tetracikline je bio *emm77* (tabela 11). Nijedan izolat ovog genotipa nije detektovan kod sojeva osetljivih na tetracikline. Genotip *emm77* je bio povezan sa iMLS fenotipom i istovremenim prisustvom gena *tetO* i *ermA*.

Tabela 11: Distribucija rezistencije na tetracikline kod pojedinih *emm* tipova MRGAS sojeva izolovanih u Srbiji u periodu od 2007. do 2008. godine

<i>emm</i> tip	Osetljivi		Smanjena osetljivost		Ukupno N
	N	%	N	%	
12	24	88,9	3	11,1	27
28	1	100	0	0	1
75	32	100	0	0	32
77	0	0	16	100	16
118	0	0	1	100	1

N - broj izolata

% - procenat izolata

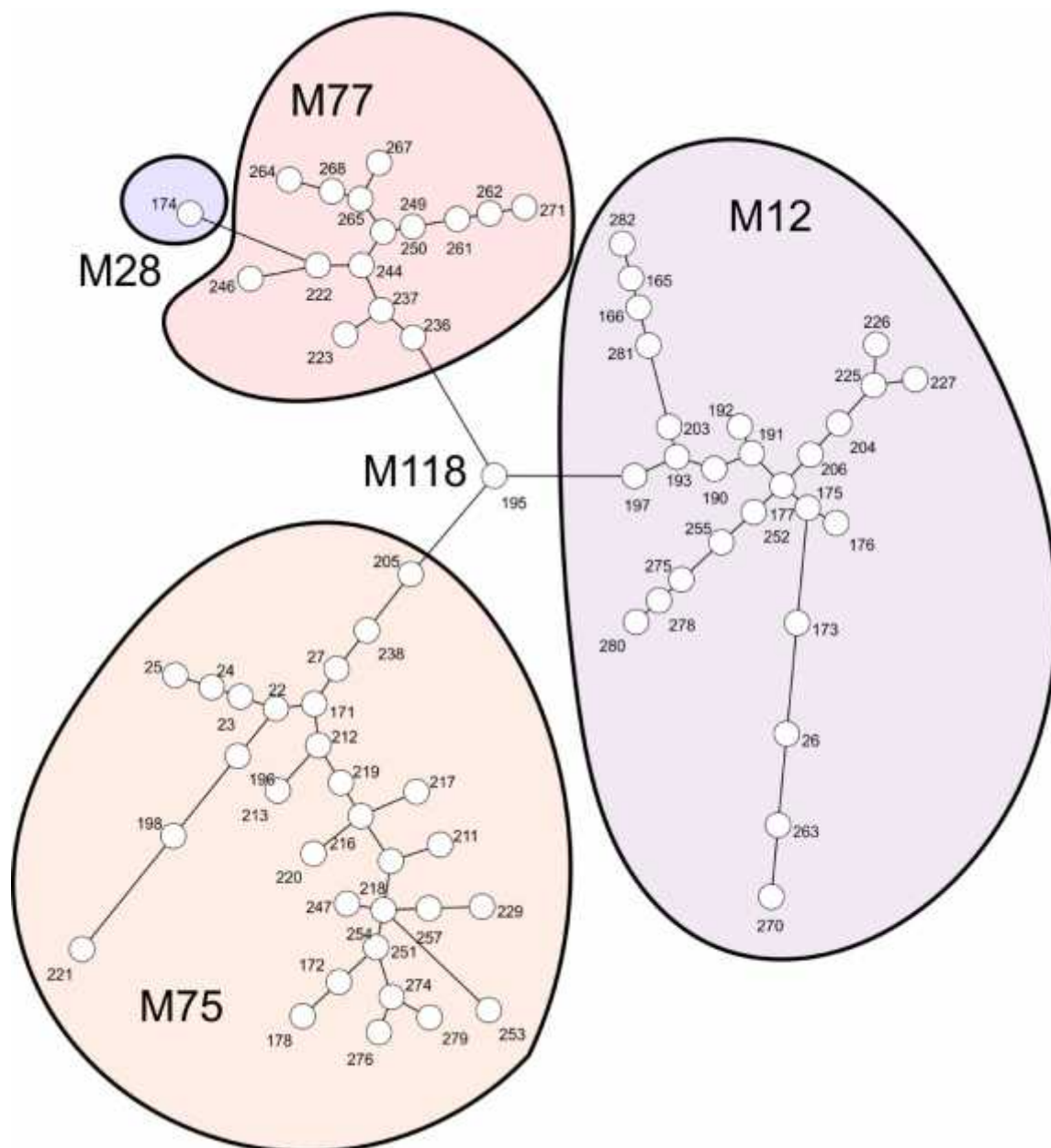
4.7. Tipizacija MRGAS sojeva MLST metodom

MLST metodom genotipizacije su identifikovana četiri do sada opisana tipa sekvenci (ST), kao i dva koja se nisu nalazila u bazi ST. Sedamdeset i pet izolata (97,4%) je pripadalo poznatim ST: ST36 (27 izolata, 36%), ST49 (31 izolat, 40,3%), ST52 (1 izolat, 1,3%), ST63 (16 izolata, 20,8%), dok je ukupno dva (2,6%) izolata imalo nove ST, koji su označeni kao STN1 i STN2. Novi ST su se u odnosu na postojeće ST razlikovali u samo jednom genskom alelu (tabela 12). Identifikovana su 2 nova alela: gena *gtr* (*gtr90*) i gena *yiql* (*yiql96*).

Uočen je visok stepen korelacije između ST i *emm* tipova. ST36 je bio dominantan kod sojeva *emm* tipa 12, ST49 kod *emm75*, a ST63 kod *emm77* (slika 9). Novi ST su nađeni kod *emm* tipa 118 (STN1) i *emm75* (STN2).

Ukupan broj alela po jednom *house-keeping* lokusu se kretao od 4 (*gtr*, *murI*, *mutS* i *dxpt*) do 6 (*recP* i *yiql*) (tabela 12). Broj izolata po određenom ST se kretao od 1 (ST52, STN1, STN2) do 31 (ST49). Dakle, tri od šest različitih ST su bila zastupljena samo sa po jednim izolatom: *emm28*/ST52, *emm75*/STN1 i *emm118*/STN2.

Na osnovu MLST tipizacije je izvršena klaster analiza ispitivanih izolata (slika 9), pri čemu su se sojevi sa istim *emm*/M tipom grupisali zajedno. Uočava se postojanje tri dominantna klastera, koji ukazuju na gensku srodnost sojeva unutar njih. Sojevi sa genotipovima *emm28* i *emm118* nisu bili obuhvaćeni ni jednim od pomenuta tri klastera, što ukazuje na relativnu gensku udaljenost od ostalih ispitivanih MRGAS izolata. Ipak, izolat sa tipom *emm12* je genski srodniji izolatima sa genotipom *emm77*, nego sa ostalim ispitivanim MRGAS sojevima.



Slika 9: Klaster analiza MRGAS sojeva izolovanih u Srbiji u periodu od 2007. do 2008. godine metodom MLST; sojevi sa istim *emm* tipom se grupišu u iste klasterne, što ukazuje na gensku srodnost izolata

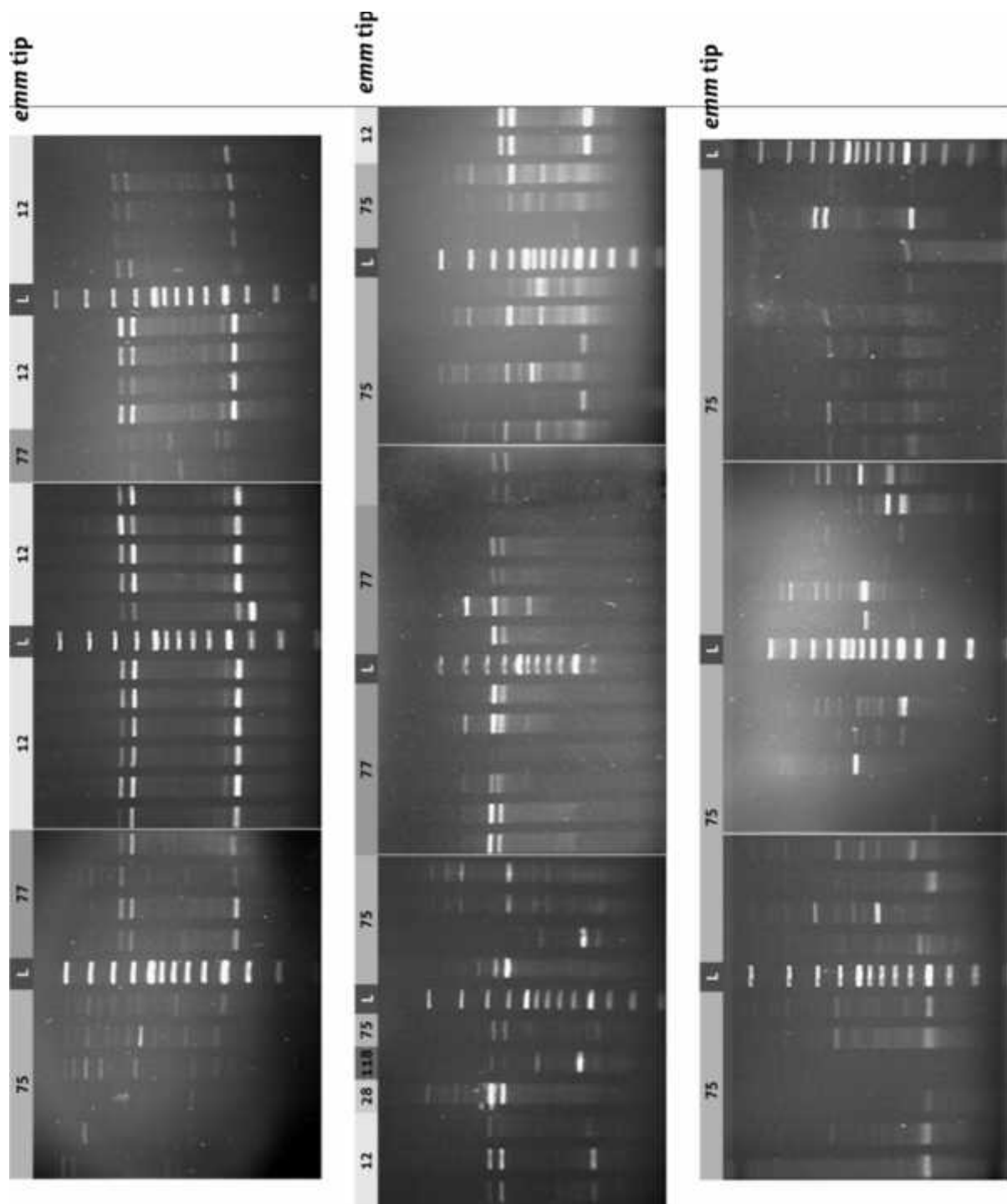
Tabela 12: Genotipizacija MRGAS sojeva izolovanih u Srbiji metodom MLST;
 Alelske varijante sedam “house-keeping“ gena; tip sekvence (engl. ST) - alelni
 profil; STN1 i STN2 - novi tipovi sekvenci

<i>gki</i>	<i>gtr</i>	<i>muri</i>	<i>mutS</i>	<i>recP</i>	<i>xtp</i>	<i>yiql</i>	ST	<i>gki</i>	<i>gtr</i>	<i>muri</i>	<i>mutS</i>	<i>recP</i>	<i>xtp</i>	<i>yiql</i>	ST
13	6	2	3	23	3	11	63	5	2	2	6	6	2	2	36
13	6	2	3	23	3	11	63	5	2	2	6	6	2	2	36
13	6	2	3	23	3	11	63	5	2	2	6	6	2	2	36
13	6	2	3	23	3	11	63	5	2	2	6	6	2	2	36
13	6	2	3	23	3	11	63	11	2	1	3	12	3	7	49
13	6	2	3	23	3	11	63	11	2	1	3	12	3	7	49
13	6	2	3	23	3	11	63	11	6	14	5	9	17	19	52
13	6	2	3	23	3	11	63	11	2	1	3	12	3	7	49
13	6	2	3	23	3	11	63	11	2	1	3	12	3	7	49
13	6	2	3	23	3	11	63	29	0	2	5	48	5	21	N1
13	6	2	3	23	3	11	63	11	2	1	3	12	3	0	N2
13	6	2	3	23	3	11	63	11	2	1	3	12	3	7	49
13	6	2	3	23	3	11	63	11	2	1	3	12	3	7	49
13	6	2	3	23	3	11	63	11	2	1	3	12	3	7	49
13	6	2	3	23	3	11	63	11	2	1	3	12	3	7	49
13	6	2	3	23	3	11	63	11	2	1	3	12	3	7	49
13	6	2	3	23	3	11	63	11	2	1	3	12	3	7	49
13	6	2	3	23	3	11	63	11	2	1	3	12	3	7	49
13	6	2	3	23	3	11	63	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49
5	2	2	6	6	2	2	36	11	2	1	3	12	3	7	49

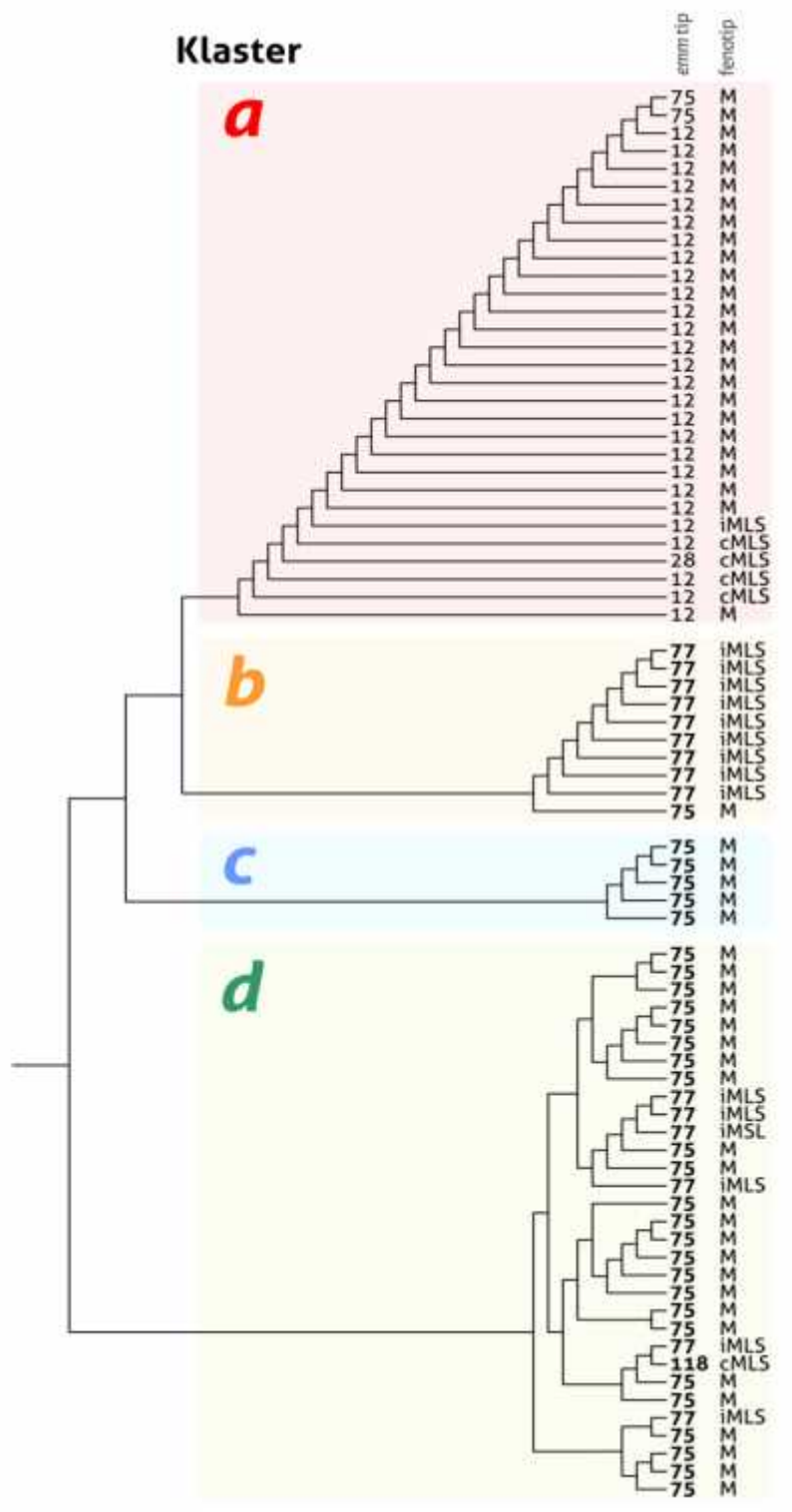
4.8. Tipizacija sojeva RAPD metodom

Dobijeni RAPD profili su se sastojali od 2 do 9 različitih produkata. Amplifikovane RAPD sekvence su bile veličine od 150 do 2 000 baznih parova (bp) (slika 10a). Identifikovano je ukupno 26 različitih profila, koji su obeleženi velikim slovima abecede od A do Z. Više od polovine sojeva je imalo jedinstvene RAPD profile, koji su se međusobno razlikovali (14 jedinstvenih RAPD obrazaca, 54% sojeva). Manji procenat RAPD profila bio je detektovan kod više različitih izolata (12 ponavljajućih RAPD obrazaca, 46%), što ukazuje na određeni stepen polimorfne prirode testiranih uzoraka. Ipak, dva najrasprostranjenija RAPD profila su bila uočena kod čak 42% uzoraka, što ukazuje da skoro polovina sojeva ima poreklo od svega dva klona. Tako je 96% sojeva sa genotipom *emm12* imalo isti RAPD obrazac, a najčešći profil kod sojeva sa genotipom *emm77* je bio zastupljen kod 67% izolata. Unutar tipa *emm75* (N=30) je identifikovano čak 19 RAPD profila, od kojih je 13 bilo jedinstveno, odnosno bili su zastupljeni kod samo jednog soja.

Genetska srodnost među izolatima je predstavljena dendrogramom (slika 10b). Sedamdeset sedam izolata grupe A streptokoka rezistentnih na makrolidne antibiotike su pripadali jednom od 4 različitih klastera, obeleženih malim slovima abecede, od a do d. Broj sojeva unutar klastera se kretao od 5 do 30. Svi sojevi unutar jednog klastera pokazuju određeni stepen genetske srodnosti. Trideset sojeva je bilo grupisano unutar klastera a, što ukazuje da više od trećine MRGAS sojeva pripada jednom klonu. Klonalnost izolata sa genotipom *emm12* je veoma izražena, jer se svi sojevi sa ovim genotipom grupišu zajedno, unutar jednog klastera (a). Soj *S. pyogenes* sa cMLS fenotipom rezistencije na makrolide i genotipom *emm28* se sa još tri soja sa cMLS fenotipom grupisao u klasteru a, koji je relativno homogen u pogledu strukture *emm* tipova. Jedini izolat sa cMLS fenotipom, koji se grupiše odvojeno od ostalih sojeva sa ovim fenotipom, nema gene koji kodiraju rezistenciju na makrolide i grupiše se u klasteru d, koji je relativno heterogen. Nasuprot njemu, klaster c je u potpunosti homogen, jer svi sojevi imaju isti *emm* tip (*emm75*) i isti fenotip rezistencije na makrolide (M). Klaster b takođe predstavlja relativno homogen skup, jer 9 od 10 izolata ima genotip *emm77* i iMLS fenotip rezistencije na makrolide (slika 10a).



Slika 10a: Gel elektroforeza u agaroznom gelu; RAPD tipizacija MRGAS sojeva, izolovanih u periodu od 2007. do 2008. godine u Srbiji; L – ladder (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas)



Slika 10b: Klaster analiza RAPD profila MRGAS sojeva izolovanih u Srbiji; klasteri a, b, c, d su definisani na osnovu prose ne udaljenosti izme u grupa (engl. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA); sojevi unutar klastera su genski visoko srodni

4.9. Poređenje diskriminativne moći i RAPD i MLST metoda tipizacije

Diskriminativni indeks RAPD genotipizacije je 84% (CI 75,8-92,2), dok je Simpsonov indeks diskriminativnosti MLST metode samo 68% (CI 59,26-76,74). Razlika u koeficijentu diskriminacije ukazuje na različitost razdvojnu moć korišćenih metoda genotipizacije.

4.10. Klonska povezanost i klonska distribucija sojeva *S. pyogenes* rezistentnih na makrolidne antibiotike

Analizom MRGAS izolata identifikovana su tri klonova, koja su činila ukupno 97% izolata: *emm75/mefA/ST49* (40,3%), *emm12/mefA/ST36* (36%) i *emm77/ermA/tetO/ST63* (20,8%). Klonovi *emm75/mefA/ST49* i *emm12/mefA/ST36* su bili osetljivi na tetraciklin, dok je klon *emm77/ermA/tetO/ST63* bio rezistentan na ovaj antibiotik. Na teritoriji grada Beograda dominantan klon sojeva MRGAS je bio *emm75/mefA/ST49*, dok je u preostalom delu zemlje najrasprostranjeniji klon bio *emm12/mefA/ST36*.

Među izolatima sa smanjenom osetljivošću na tetracikline, dominirao je klon *emm77/ST63*, sa iMLS fenotipom rezistencije na makrolide i istovremenim prisustvom gena *ermA* i *tetO* (16 sojeva; 80%).

4.11. Osetljivost MRGAS sojeva izolovanih u Srbiji na druge klase antimikrobnih agenasa

Svi ispitivani sojevi su bili osetljivi na penicilin, vankomicin, ofloksacin i hloramfenikol. Uestalost rezistencije na klindamicin je bila 27,3%.

Svi multirezistentni sojevi su imali MLS fenotip rezistencije na makrolide (21 soj; 27%) i svi su bili istovremeno rezistentni na eritromicin, klindamicin i tetraciklin.

5.

Diskusija

5. Diskusija

5.1. Uсталost rezistencije grupe A streptokoka na makrolidne antibiotike u Srbiji

Streptococcus pyogenes izaziva širok spektar oboljenja, me u kojima su piogene i toksemi ne infekcije i post-streptokokne sekvele. Procenjeno je da svake godine oko 700 miliona ljudi oboli od infekcija izazvanih grupom A streptokoka (Carapetis i sar., 2005). *S. pyogenes* uzrokuje 18 miliona slu ajeva teških infekcija godišnje širom sveta, od ega 517 000 ima smrtni ishod (Cho i Caparon, 2008).

Penicilin i drugi beta laktamski antibiotici i dalje predstavljaju prvu liniju izbora u le enju ve ine infekcija izazvanih grupom A streptokoka. Makrolidi se koriste, kao alternativni antibiotici kod pacijenata alergij nih na peniciline (Bisno i sar., 2002), kao i kod neuspeha penicilinske terapije. Još od 1955. godine, kada je prvi put uo ena rezistencija na makrolide, brojne studije su opisivale smanjenu osetljivost razli itih patogena na eritromicin (Lowbury i sar., 1959). Interesantan je primer Japana, u kome je visok procenat sojeva *S. pyogenes* rezistentnih na eritromicin (70%) zabeležen još 1972. godine (Maruyama i sar., 1979). Krajem devedesetih godina 20. veka i po etkom dvehiljaditih godina 21. veka, porast uсталosti rezistencije grupe A streptokoka na makrolide je detektovan i u zemljama Evrope, posebno mediteranske regije (Alos i sar., 2000; Bassetti i sar., 2000; Szczyba, 2004; Gattringer, 2004; Bingen i sar., 2004; Perez-Trallero i sar., 2007; Silva-Costa i sar., 2008; Michos i sar., 2009), ali i na ameri kom kontinentu (De Azavedo i sar., 1999; Green i sar., 2006). Najviše stope rezistencije su zabeležene u zemljama Azije i u Koreji su iznosile i do 78% (Koo i sar., 2002). U skandinavskim zemljama, sa izuzetkom Finske, zabeležene su niske uсталosti rezistencije, koje nisu prelazile 4% (Littauer i sar., 2006).

Poslednjih godina je u pojedinim regionima sveta zabeleženo smanjenje rezistencije *S. pyogenes* na makrolide. Tako je zastupljenost MRGAS u Belgiji 1999. godine iznosila 13,5%, a 2006. godine samo 3,3% (Van Heirstraeten i sar., 2012). U Portugalu je u periodu od 1999. do 2006. godine zabeleženo smanjenje rezistencije *S. pyogenes* sa 20% na 12% (Silva-Costa i sar., 2008). Autori iz Koreje su, tako e, objavili

značajno smanjenje uestalosti rezistencije GAS na makrolide, pri čemu je ona 2002. godine iznosila 44,8%, a 2009. godine 4,6% (Koo i sar., 2004; Koh i sar., 2008; Koh i Kim, 2010). U skorije vreme je najdrastičniji pad rezistencije *S. pyogenes* na makrolide uočen u severoistočnom delu Italije (oblast Pordenone), gde je ograničena upotreba makrolida u periodu od 2000. do 2007. godine dovelo do izrazitog smanjenja uestalosti MRGAS sa 33,3% na čak 0,2% (De Rosa i sar., 2009).

U našem istraživanju smo ustanovili da je uestalost rezistencije faringealnih izolata *S. pyogenes* na makrolide u periodu od decembra 2007. do decembra 2008. godine u Srbiji bila 12%. Ovolika zastupljenost MRGAS se smatra umerenom i odgovara prosečnoj uestalosti rezistencije u Evropi u istom vremenskom periodu - 11,6% (Richter i sar., 2008). Mogli smo da primetimo da su vrlo slični uestalost rezistencije *S. pyogenes* na eritromicin u to vreme prijavili autori iz Češke, u kojoj je 11% sojeva GAS bilo rezistentno na makrolide. U Sloveniji je prevalencija MRGAS izolata iznosila 12,5%, a u Poljskoj 17% (Urbaskova i sar., 2011; Cizman i sar., 2006; Gracia i sar., 2009). Zastupljenost rezistencije na makrolide kod GAS je u istom vremenskom periodu bila slična i u pojedinim azijskim zemljama, pa je u Koreji iznosila 9,8%, a u Japanu 16% (Koh i sar., 2010; Wajima i sar., 2008). Visoka uestalost rezistencije GAS na makrolide (već od 20%) je tokom prve dekade 21. veka zabeležena u mnogim zemljama širom sveta, uključujući i zemlje Mediterana. U Grčkoj je zastupljenost rezistencije, u periodu od 2007. do 2009. godine, iznosila 24%, u Italiji 23%, u Portugalu 21%, u Španiji 32,8%, a u Slovačkoj 34% (Grivea i sar., 2006; Montagnani i sar., 2009; Friaes i sar., 2012; Rubio-Lopez i sar., 2012; Gracia i sar., 2009). Veoma visoku uestalost, od skoro 100%, prijavili su autori iz Kine (Liu i sar., 2009). Sa druge strane, niske uestalosti makrolidne rezistencije su detektovane u Rumuniji 5%, Norveškoj 2,7%, Danskoj 3%, Holandiji 1,4%, Turskoj 6% i Izraelu 1,8% (Luca-Harari i sar., 2008; Littauer, 2006; Dundar i sar., 2010; Luca-Harari i sar., 2008; Buter i sar., 2010; Jasir i sar., 2000).

Podaci o prevalenciji rezistencije streptokoka na makrolide u Srbiji su relativno oskudni. Ipak, rađeno je nekoliko istraživanja, te su Ranin i saradnici utvrdili da je prevalencija rezistencije faringealnih izolata *S. pyogenes*, u periodu od 1991. do 1999. godine u Srbiji bila 2,41% (Ranin i sar., 2004). Pavlović i saradnici su na uzorku od 3188 sojeva grupe A streptokoka, izolovanih iz gušće osoba sa kliničkom slikom akutnog

faringitisa, u periodu od 2006. god. do 2008. godine utvrdili da je rezistencija GAS u Srbiji iznosila 6,8% (Pavlovi i sar., 2010). Sa druge strane, Mija i saradnici su zaklju ili da je u stalnost rezistencije na makrolide kod 145 sojeva GAS izolovanih iz faringsa, sa kožnih promena i iz primarno sterilnih regija, tokom prve dekade 2000-tih godina bila veoma niska i iznosila <1% (Mija i sar., 2010.). U ovom radu su koriš eni podaci o prevalenciji rezistencije *S. pyogenes* na makrolide iz laboratorija sa ve eg dela teritorije Republike Srbije, a u fenotipsku i genotipsku karakterizaciju je uklju ena kolekcija izolata GAS koja je reprezentativna za teritoriju cele zemlje. Naš podatak o rezistenciji faringealnih izolata *S. pyogenes* na makrolide od 12% ukazuje da je u petnaestogodišnjem periodu došlo do porasta rezistencije izolata GAS na ove antibiotike od 2,41% (1991-1999. godine), preko 6,8% (2006-2008. godine), do 12% (2008. godine). Višestruki porast prevalencije MRGAS izolata u Srbiji je zabrinjavaju i podatak s obzirom na injenicu da su makrolidi alternativa beta laktamskim antibioticima, a ponekad i prvi izbor kod osoba alergijih na penicilin (Bisno i sar., 2002).

Zna ajan porast u stalosti rezistencije *S. pyogenes* na makrolide u sli nom vremenskom periodu je i do sada opisivan u mnogim zemljama. Tako je npr. u Španiji u stalost rezistencije *S. pyogenes* višestruko porasla u desetogodišnjem periodu od 1993/1994. godine do 2003/2004. godine, sa 0% na 35,7%. Me utim, u istoj zemlji je posle 2004. godine došlo do zna ajnog smanjenja rezistencije, i tokom 2007/2008. godine je ona snižena na 7,4% (Ardanuy i sar., 2010).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da postoje regionalne razlike u prevalenciji rezistencije GAS na makrolide unutar zemlje: najviša u stalost je detektovana u glavnom gradu (15%), nešto niža u centralnoj Srbiji (14%), dok je najniža zabeležena u Vojvodini (7%).

Postoje dokazi da razlozi porasta rezistencije streptokoka na eritromicin i druge makrolide leže u propagaciji rezistentnih klonova, izazvanoj nekriti nom upotrebom makrolidnih antibiotika, posebno onih sa dugim poluvremenom eliminacije (Goossens i sar., 2005; Malhotra-Kumar i sar., 2007). Rezultati studija sprovedenih u Finskoj i Belgiji, kao i iskustvo nekih zemalja, poput Japana, su pokazali da ograni enje potrošnje makrolida, linkozamida, streptogramina, ali i tetraciklina može dovesti do smanjenja u stalosti rezistencije GAS na MLS antibiotike (Seppala i sar., 1997; Van

Heirstraeten i sar., 2012). Ipak, ima i druga njih iskustava, pa je u Sloveniji, uprkos smanjenju potrošnje makrolida od 21%, došlo do dupliranja rezistencije neinvazivnih izolata *S. pyogenes* na makrolide, što je objašnjeno pre svega fluktuacijama u klonskoj u estalosti MRGAS sojeva (izman i sar., 2006). Istraživa i iz Koreje smanjenje rezistencije *S. pyogenes* na makrolide objašnjavaju prvenstveno promenom distribucije cirkulišu ih *emm* tipova (Koh i Kim, 2010).

O igledno je da su razlozi izmena u u estalosti rezistencije streptokoka na makrolide multifaktorijalni – širenje gena koji kodiraju rezistenciju na makrolide horizontalnim tansferom izme u bakterija i propagacija rezistentnih klonova, preterana upotreba makrolida i povremene varijacije u distribuciji pojedinih *M/emm* tipova.

U Srbiji je do 2010. godine postojala mogu nost kupovine antibiotika bez lekarskog recepta. Dnevno definisana doza makrolida na 1000 stanovnika (DDD/1000 stanovnika) je u našoj zemlji, u periodu od 1998. do 2008. godine porasla sa 1,3 na 5,8 (Mija i sar., 2014). Porast potrošnje ovih antibiotika se pre svega desio zahvaljuju i porastu DDD/1000 stanovnika novijih makrolida, kao što su azitromicin i klaritromicin. Razlozi za njihovo eš e propisivanje i nekriti nu upotrebu su bolje podnošenje i komforniji režim primene (jednom dnevno). Azitromicin pripada antibioticima koji se esto primenjuju u le enju faringitisa, otitisa, sinuzitisa, bronhitisa, pneumonija, ali i infekcija izazvanih mikoplazmama i u le enju hlamidijalnih genitalnih infekcija. Me utim, zbog dugog poluvremena eliminacije, upotreba azitromicina pove ava rizik od nastanka rezistencije bakterija na ovaj antibiotik, a samim tim i na druge makrolide 2,7 puta, što dovodi do selekcije rezistentnih sojeva (Granizo i sar., 2000).

Kako se pojedini geni, koji kodiraju rezistenciju na makrolide i tetracikline, mogu prenositi zajedno putem mobilnih genskih elemenata, upotreba tetraciklina, tako e može uticati na pove anje rezistencije na makrolide (Malhotra-Kumar i sar., 2007).

O igledno je da je incidencija rezistencije streptokoka na eritromicin i druge antibiotike iz ove grupe vrlo dinami na pojava, te bi, svakako trebalo nastaviti sa pra enjem incidencije MRGAS kod nas, kako bi se ustanovilo da li i u Srbiji, kao i u nekim drugim zemljama, dolazi do promene u estalosti rezistencije na makrolide, ime bi se mogao proceniti efekat novouvedenih mera, koje se odnose na kontrolu propisivanja i kupovinu antimikrobnih agenasa.

5.2. Fenotipovi i genotipovi rezistencije sojeva *S. pyogenes* na makrolide

Rezultati ispitivanja osetljivosti GAS na makrolidne antibiotike pokazuju da je u našoj sredini najzastupljeniji bio M fenotip rezistencije na makrolide. Skoro tri četvrtine od ukupnog broja MRGAS je ekspimiralo ovaj tip rezistencije. MLS fenotip, koji se karakteriše višim stepenom rezistencije na makrolide, bio je zastupljen kod preostale četvrtine ispitivanih izolata. Unutar MLS fenotipa je dominirao iMLS fenotip, koji je bio zastupljen kod 20,8% svih MRGAS sojeva, dok je cMLS fenotip rezistencije na makrolide bio prisutan kod samo 6,5%. Sojevi sa M fenotipom su umereno rezistentni na eritromicin i druge 14- i 15- lane makrolide i osetljivi su na 16- lane makrolide, klindamicin i streptogramine. Kod naših MRGAS sojeva sa M fenotipom, vrednost MIK_{50} eritromicina je iznosila $8\mu\text{g/ml}$, dok je vrednost MIK_{50} klindamicina bila u kategoriji osetljivih ($0,047\mu\text{g/ml}$), što odgovara podacima iz literature (Rubio-Lopez i sar., 2012; Leclercq, 2002; Rubio-Lopez i sar., 2012). Svi sojevi sa MLS fenotipom su imali visoke vrednosti MIK eritromicina ($MIK_{50} 256\mu\text{g/ml}$). Vrednosti MIK klindamicina su bile niske kod iMLS fenotipa bez indukcije ($MIK_{50} 0,064\mu\text{g/ml}$), a visoke kod cMLS fenotipa ($MIK_{50} > 256\mu\text{g/ml}$).

U okviru iMLS fenotipa na eni su samo subfenotipovi iMLS-A i iMLS-B, koji se odlikuju visokim stepenom rezistencije na 14- i 15- lane makrolide. Nijedan ispitivani soj nije pripadao subfenotipu iMLS-C, za koji je tipična niska rezistencija na makrolide sa 14- i 15- lanim prstenom. Među izolatima sa iMLS fenotipom nešto je češće bio zastupljen iMLS-A subfenotip (10 od 16 izolata), u odnosu na iMLS-B (6 od 16 izolata).

Dominacija M fenotipa rezistencije na makrolide je već detektovana u Srbiji (Pavlović i sar., 2010), ali i u mnogim zemljama širom sveta, naročito tokom devedesetih godina prošlog veka. Aktivni efluks je bio dominantan mehanizam rezistencije na makrolide u Italiji, gde je 63% svih sojeva MRGAS ekspimiralo ovaj fenotip (Bassetti i sar., 2000). U Nemačkoj je taj procenat bio čak 93,9%, a u Grčkoj 50,9%. (Reinert i sar., 2004; Michos i sar., 2009). Najviši procenat zastupljenosti M fenotipa rezistencije na makrolide je zabeležen u Španiji, u kojoj su rađene brojne studije. U multicentričnoj studiji sprovedenoj 1998. godine u Španiji je registrovana zastupljenost M fenotipa od čak 95,6%, dok je u drugoj studiji iz 2006. i 2007. godine

taj procenat bio nešto manji – 64,5% (Rubio-Lopez i sar., 2012; Alos i sar., 2000; Perez-Trallero i sar., 2010). M fenotip je tako e bio najzastupljeniji fenotip rezistencije na makrolide u Austriji, Indiji, SAD i Meksiku (Eisner i sar., 2006; Capoor i sar., 2006; Green i sar., 2006; Villansenor-Sierra i sar., 2012). Za razliku od navedenih zemalja, u Francuskoj, Norveškoj i Bugarskoj je u prvoj dekadi dvehiljaditih godina zabeležena dominacija MLS fenotipa rezistencije na makrolide (Bingen i sar., 2004; Littauer i sar., 2006; Liu i sar., 2009).

Ipak, novija istraživanja ukazuju da i u zemljama u kojima je M fenotip bio dominantan, dolazi do izmene u odnosima fenotipova, te je u Evropi uo en porast u estalosti ukrštene rezistencije na MLS antibiotike (Silva-Costa i sar., 2008; Richter i sar., 2008; Perez-Trallero i sar., 2010) i smanjenje zastupljenosti M fenotipa. Trend porasta cMLS fenotipa rezistencije na makrolide je opisan u mnogim evropskim zemljama, pri emu je prose na zastupljenost ovog fenotipa 2002/2003. godine u Evropi iznosila 29,3%, a 2004/2005. godine 45,7% (Richter i sar., 2008). Tako je u Nema koj u estalost cMLS fenotipa porasla na 34,5%, dok je u Francuskoj došlo do pove anja istog fenotipa na 52,6% (Bingen i sar., 2004). Zemlje u kojima me u izolatima MRGAS poslednjih godina dominira cMLS fenotip su Koreja sa zastupljenoš u od 62,5% (Koh i Kim, 2010), Kina sa zastupljenoš u od 98% (Liu i sar., 2009) i Španija sa u estaloš u od 40,4% (Ardanuy i sar., 2010).

U pojedinim zemljama je uo en porast iMLS fenotipa rezistencije na makrolide. Autori iz Belgije su ustanovili da je u desetogodišnjem periodu zastupljenost iMLS fenotipa porasla sa 1,2%, koliko je iznosila 1999. god. na ak 76,6% u 2009. godini (Van Heirstraeten i sar., 2012). U pojedinim zemljama, poput Norveške je iMLS fenotip dominantan ve godinama (Littauer i sar., 2006).

Španski autori sugerišu da postoji veza izme u u estalosti rezistencije GAS na makrolide i fenotipova rezistencije na makrolide. Oni ukazuju da je visoka u estalost MRGAS esto udružena sa MLS fenotipom (Perez-Trallero i sar., 2007; Ardanuy i sar., 2010). Sa druge strane, M fenotip je obi no dominantan u zemljama sa niskom u estaloš u rezistencije *S. pyogenes* na makrolide. Tako je u Rumuniji i SAD, polovinom prve dekade 21. veka, zastupljenost MRGAS bila niska, a M fenotip je bio dominantan (Luca-Harari i sar., 2008; Green i sar., 2006). Ipak, u pojedinim studijama je opisana udruženost visoke zastupljenosti rezistencije *S. pyogenes* na makrolide i

dominacije M fenotipa me u MRGAS izolatima. U Portugalu je, u periodu od 2000. do 2005. godine, zastupljenost rezistencije faringealnih izolata *S. pyogenes* na makrolide bila 21%, ali je M fenotip bio zastupljen kod 55% sojeva (Friaes i sar., 2012). O igledno je da postoje brojne varijacije u dominaciji odre enih fenotipova i genotipova MRGAS izme u pojedinih zemalja.

Bilo bi zna ajno ispitati da li se opisana zamena fenotipova rezistencije na makrolide desila i u Srbiji, odnosno da li možemo o ekivati da je i me u našim izolatima GAS došlo do porasta MLS fenotipa, a samim tim i viših nivoa rezistencije na makrolide.

Dobijene vrednosti MIK za eritromicin u našoj studiji odgovaraju rezultatima koje su objavili drugi autori. Rezultati italijanske studije tako e ukazuju da su vrednosti MIK za eritromicin kod sojeva sa M fenotipom bile od 2 do 16 μ g/ml, a vrednosti MIK za sojeve sa MLS fenotipom, više od 128 μ g/ml (Montanari i sar., 2003). Rezultati dobijeni u našoj studiji su u skladu i sa rezultatima španskih autora, koji beleže sli ne vrednosti MIK za sva tri fenotipa rezistencije na makrolide (Rubio-Lopez i sar., 2012).

Kod svih sojeva sa M fenotipom je dokazano prisustvo *mefA* gena, kod sojeva sa iMLS fenotipom identifikovan je *ermA* gen, a kod 4 od 5 izolata sa cMLS fenotipom rezistencije na makrolide je na en *ermB* gen. Tipi nu udruženost M fenotipa i *mefA* gena, iMLS fenotipa i *ermA* gena i cMLS fenotipa i *ermB* gena, je uo io najve i broj istraživa a (Sauerma n i sar., 2003; Mendes i sar., 2003; Liu i sar., 2009). Za razliku od naših rezultata, pojedini autori su kod jednog broja izolata sa iMLS fenotipom, identifikovali *ermB* gen (Giovanetti i sar., 2009; Brenciani i sar., 2012; Koh i sar., 2008). Me u ispitivanim izolatima u našoj studiji, dva soja sa iMLS fenotipom su, pored *ermA*, posedovala i *mefA* gen. Ovi nalazi odgovaraju literaturnim (Rubio-Lopez i sar., 2012; Malhotra Kumar i sar., 2009) i ukazuju da je mogu e da *ermA* gen u tim slu ajevima zapravo kodira konstitutivnu ukrštenu rezistenciju na MLS antibiotike, što je posledica promene u regulatornom regionu gena (Malhotra Kumar i sar., 2009). U literaturi je opisana i udruženost *ermA* i *ermB* gena (Portillo i sar., 2003), ali u našoj studiji nisu na eni takvi izolati. Kod jednog izolata sa cMLS fenotipom nije identifikovan nijedan od gena koji kodiraju rezistenciju na makrolide, što bi moglo ukazati da je kod ovog soja rezistencija na makrolide nastala kao posledica mutacije gena koji kodiraju ribozomalne proteine L4 ili L22 (Farrell i sar., 2006; Malbruny i sar.,

2002; Nielsen i sar., 2004). Sojeve sa cMLS fenotipom, bez gena koji kodiraju rezistenciju na makrolide, pominju i drugi autori (Portillo i sar., 2003; Rubio-Lopez i sar., 2012).

Može se zaključiti da je kod naših sojeva MRGAS postojao visok stepen tipične korelacije između fenotipova i genotipova rezistencije na makrolide. Naime je povezanost M fenotipa sa *mefA* genom, iMLS fenotipa sa *ermA* genom i cMLS fenotipa sa *ermB* genom. Međutim u našim MRGAS sojevima nismo našli *ermB* gen koji se inducibilno eksprimira, niti *ermA* sa konstitutivnom ekspresijom, koje opisuju pojedini istraživači (Ardanuy i sar., 2010).

5.3. Osetljivost MRGAS sojeva na tetracikline i zastupljenost *tetO* i *tetM* gena

Iako se tetraciklini ne preporučuju u terapiji streptokoknih infekcija, rezistencija GAS na ove antibiotike ima neosporan epidemiološki značaj. Udružena rezistencija na makrolidne antibiotike i tetracikline beleži se još od kraja devedesetih godina (Kataja i sar., 1999).

Međutim u ispitivanim izolatima MRGAS, uočena je relativno visoka učestalost rezistencije na tetracikline (26%). Ipak, udružena rezistencija na eritromicin i tetraciklin je prisutna u znatno većem procentu u Norveškoj, gde su objavljeni podaci o čak 70% MRGAS sojeva rezistentnih na tetracikline (Littauer, 2006). U Španiji je istovremena rezistencija na eritromicin i tetraciklin uočena kod 42,4% sojeva (Ardanuy i sar., 2010). Kako se tetraciklini ne primenjuju u terapiji streptokoknih tonzilofaringitisa, visoke učestalosti rezistencije kod GAS se ne mogu objasniti samo prekomernom upotrebom tetraciklina. Ipak, ovi lekovi se primenjuju u terapiji humanih infekcija izazvanih drugim patogenima, a značajno mesto imaju i u veterini. Takođe, geni koji kodiraju rezistenciju na tetracikline se horizontalnim genskim transferom prenose sa uslovno patogenih bakterija, koje su izložene selektivnom uticaju tetraciklina, na patogene bakterije, kao što je *S. pyogenes* (Bryskier i sar., 2002). Širom sveta je uočena visoka stepen udružene rezistencije na makrolidne antibiotike i tetracikline. U osnovi ove pojave je horizontalni transfer mobilnih genskih elemenata, koji pored gena *tetM* i *tetO*, često poseduju i gene koji determinišu rezistenciju na makrolide (Varaldo i sar., 2009).

Zato se smatra da je rezistencija na tetracikline važan kofaktor u selekciji rezistencije grupe A streptokoka na makrolidne antibiotike (Ayeri sar., 2007; Nielsen i sar., 2004).

Rezultati ispitivanja sojeva MRGAS u Srbiji tokom 2008. godine ukazuju da je rezistencija na tetracikline udružena isključivo sa MLS fenotipom rezistencije na makrolide, pri čemu su dominantni bili sojevi sa inducibilnom ekspresijom. Slične rezultate su objavili i autori iz Finske krajem devedesetih godina, u kojoj je iMLS fenotip kod izolata GAS rezistentnih na makrolide i tetracikline dostizao uestalost od čak 93% (Kataja i sar., 1999). Španski autori, su takođe potvrdili da su svi sojevi GAS koji su bili istovremeno rezistentni na tetracikline i makrolide imali MLS fenotip rezistencije na makrolide, ali je konstitutivna ekspresija *me* u njihovim izolatima bila dominantna (Ardanuy i sar., 2010). Takođe je primećeno da i sojevi MRGAS sa M fenotipom rezistencije na makrolide mogu biti rezistentni na tetraciklin (Kataja i sar., 2002).

U našoj studiji je prisustvo gena koji kodiraju rezistenciju na tetracikline ispitivano samo kod sojeva koji su, prema rezultatima disk difuzionog metoda antibiograma, pokazivali smanjenu osetljivost na tetraciklin, ali ne i kod sojeva koji su bili osetljivi na ovaj antibiotik. Kod TRGAS sojeva smo tražili samo najčešće genske determinante rezistencije *S. pyogenes* na tetracikline, *tetM* i *tetO* gene (Rubio-Lopez i sar., 2012). U okviru ove studije, nismo ispitivali prisustvo gena *tetK* i *tetL*, koji znatno ređe kodiraju rezistenciju *S. pyogenes* na tetracikline.

Najzastupljeniji gen koji kodira rezistenciju na tetracikline kod ispitivanih sojeva je bio *tetO*, čije je prisustvo uočeno kod 80% TRGAS sojeva, dok je gen *tetM* bio prisutan kod samo 20% izolata. Distribucija *tetO* i *tetM* gena je različita u pojedinim delovima sveta u zavisnosti od geografske regije. Tako je u Turskoj, kao i kod nas, dominantan gen rezistencije na tetracikline *tetO* i u manjem procentu *tetM*, *tetK* i *tetL*. (Dundar i sar., 2010). Nasuprot tome, *tetM* je dominantan *me* u MRGAS izolatima rezistentnim na tetracikline u Grčkoj i Španiji (Stathi i sar., 2008; Friaes i sar., 2012; Rubio-Lopez i sar., 2012).

Kod naših sojeva je udružena rezistencija na makrolide i tetracikline najčešće bila kodirana *ermA* i *tetO* genima. Kod svih sojeva sa *tetO* genom (80% TRGAS), uočena je udružena sa *ermA* genom. Svi sojevi sa genotipom *ermA/tetO* su, po pravilu, ekspimirali iMLS fenotip rezistencije na makrolide. Samo je kod četiri izolata sa cMLS

fenotipom rezistencije na makrolide na en *tetM* gen. Kod tri soja je *tetM* bio udružen sa *ermB* genom, dok kod jednog izolata nije identifikovan nijedan gen koji kodira rezistenciju na makrolide.

Sli na su iskustva i španskih autora, koji navode da su svi sojevi *S. pyogenes* sa udruženom rezistencijom na tetracikline i makrolide imali MLS fenotip rezistencije na makrolide. Me utim, kod njihovih izolata je dominirao cMLS fenotip (Rubio-Lopez i sar., 2012). *ermB* i *tetM* geni se esto prenose zajedno preko razli itih transpozona Tn916 familije, što objašnjava visok stepen asocijacije ovih gena (Varaldo i sar., 2009). Ovu vrstu povezanosti smo našli kod 3 ispitivana MRGAS izolata sa cMLS fenotipom, dok kod jednog soja rezistentnog na tetracikline, sa istim fenotipom, nismo našli ni *tetM*, ni *tetO* gen. Udruženi prenos *ermA* i *tetO* gena, kao i *ermB* i *tetM* gena je ve opisan (Brenciani i sar., 2007; Friaes i sar., 2012). U literaturi se, tako e navodi da je zabeležena udruženost M fenotipa rezistencije na makrolide, odnosno *mefA* i *tetO* gena, obi no nakon insercije transpozona sli nog Tn1207.1 u bakteriofag 46.1 (Bacciaglia i sar., 2007; Giovanetti i sar., 2003). Udruženost ovih gena nismo potvrdili me u našim izolatima.

5.4. Distribucija *emm* tipova kod MRGAS sojeva izolovanih u Srbiji

Me u faringealnim izolatima *S. pyogenes*, rezistentnim na makrolide, izolovanim tokom 2008. godine u Srbiji je na eno ukupno pet *emm* tipova. Ubedljivo su dominirala tri *emm* tipa – *emm12*, *emm75* i *emm77*. Oni su na eni kod ak 97% izolata. Najzastupljeniji je bio *emm75*, koji je bio prisutan kod 42% sojeva, potom *emm12*, identifikovan kod 35% izolata, dok je 21% MRGAS pripadalo *emm* tipu 77. Samo po jedan izolat je imao genotip *emm28* i *emm118*.

Samo su sojevi sa genotipom *emm12* imali dva *emm* podtipa (*emm12,0* i *emm12,7*). Ostali sojevi su detektovani u jednoj alelskoj varijanti. U našoj studiji nisu na ene nove alelske varijante *emm* gena, odnosno svi *emm* tipovi i podtpovi su ve bili opisani i nalazili su se u bazi *emm* tipova. Naši rezultati ukazuju da su MRGAS izolati u Srbiji prili no homogeni i da je za nastanak rezistencije streptokoka na makrolide, u zna ajnoj meri, odgovorna propagacija nekoliko *emm* tipova rezistentnih na makrolide.

Brojni istraživači ističu da su sojevi rezistentni na makrolide homogeniji u odnosu na osetljive izolate (Silva-Costa i sar., 2012).

Povezanost *emm* genotipova i rezistencije na antibiotike potvrdili su, do sada, mnogi autori (Alberti i sar., 2003; Zampaloni i sar., 2003; Creti i sar., 2007; Michos i sar., 2009; Nir-Paz i sar., 2006; Rivera i sar., 2006; Koh i sar., 2008). Rezultati brojnih studija ukazuju da je relativno mali broj *emm* tipova odgovoran za rezistenciju GAS na makrolidne antibiotike (Littauer i sar., 2006; Michos i sar., 2009; Nielsen i sar., 2004; Nir-Paz i sar., 2006; Reinert i sar., 2004). Tako je na primer da su u Grčkoj u periodu od 2003. do 2006. godine dominirali *emm12*, *emm77* i *emm4* (Michos i sar., 2009), u sličnom periodu u Španiji su najčešći tipovi bili *emm4*, *emm75*, *emm28*, *emm6*, *emm12* i *emm11* (Rubio-Lopez i sar., 2012), a u Portugalu *emm4* i *emm77* (Silva-Costa i sar., 2012). Međutim, distribucija *emm* tipova rezistentnih na makrolide, se u određenoj geografskoj regiji, vremenom menja (Silva-Costa i sar., 2008; Koh i sar., 2008). Udruženost rezistencije na makrolide i tri dominantna *emm* tipa, identifikovana u Srbiji, veoma je uočena u različitim delovima sveta (Metzgar i Zampolli, 2011). *emm75* je bio najzastupljeniji tip među MRGAS izolatima u Španiji i SAD (Arduany i sar., 2010; Green i sar., 2006), dok su *emm12* i *emm77* bili među dominantnim rezistentnim genotipovima u Nemačkoj, Francuskoj i Grčkoj (Reinert i sar., 2004; D'Humieres i sar., 2012; Michos i sar., 2009). U Portugalu i Izraelu je takođe dominantan genotip bio *emm12* (Silva Costa i sar., 2005; Nir Pazi sar., 2006). Green i saradnici su objavili da genotipovi *emm75* i *emm12* čine više od polovine izolata rezistentnih na makrolidne antibiotike (Green i sar., 2006), što potvrđuju i rezultati našeg istraživanja. Rubio-Lopez i saradnici takođe nalaze da su genotipovi *emm75*, *emm12* i *emm28* među šest najzastupljenijih *emm* tipova kod MRGAS sojeva u Španiji (Rubio-Lopez i sar., 2012). Nasuprot tome, autori iz Koreje su objavili da je 2002. godine 28% MRGAS izolata imalo genotip *emm12*, a 18,4% sojeva *emm75*. Sedam godina kasnije zastupljenost genotipa *emm12* je bila samo 3,4%, a genotip *emm75* nije bio prisutan među MRGAS sojevima izolovanim u Koreji (Kim i Lee, 2004; Koh i Kim, 2010). Opisanu pojavu, korejski autori objašnjavaju gubitkom gena rezistencije na makrolide kod sojeva sa tipom *emm75* i njihovom genskom izmenom (Koh i Kim, 2010). Istraživači iz Španije, Finske i Kanade su identifikovali genotip *emm28*, kao odgovoran za porast uestalosti

rezistencije na makrolide u ovim zemljama (Perez-Trallero i sar., 2004; Bingen i sar., 2004). U našoj kolekciji ispitivanih sojeva, samo jedan izolat je imao genotip *emm28*.

Kako je ovo prvo istraživanje genotipova MRGAS u našoj zemlji, uvid o eventualnim izmenama u distribuciji *emm* tipova u Srbiji će dati tek naredne studije. Jedina studija koja se bavila ispitivanjem distribucije *emm* tipova kod sojeva *S. pyogenes* u našoj zemlji je rađena za sojeve GAS izolovane u periodu od 2001. do 2007. godine, koji su poticali iz različitog kliničkog materijala i u najvećoj meri su bili osetljivi na makrolide (Mijačić i sar., 2010). U našoj studiji je ispitivana distribucija *emm* tipova samo kod MRGAS izolata, a Mijačić i saradnici su ispitivali sojeve koji su imali sve kategorije osetljivosti na makrolide. Jedini izolat koji je bio rezistentan na makrolide, u pomenutoj studiji, je imao genotip *emm75* (Mijačić i sar., 2010).

U našem istraživanju je uočena razlika u distribuciji *emm* tipova u pojedinim delovima zemlje. U Beogradu je detektovan najveći broj *emm* tipova (četiri), pri čemu je najčešći bio *emm75*, zatim *emm12* i *emm77*, dok je *emm118* bio identifikovan kod samo jednog soja. U glavnom gradu je primećena i najveća diverzitet sojeva, što se može objasniti cirkulacijom ljudi i migracijama stanovništva u glavni grad iz drugih delova zemlje. Sa druge strane, u pojedinim gradovima je uočena relativna homogenost izolata, a najveća je primećena u Leskovcu, gde su svi MRGAS sojevi imali genotip *emm75*. I u drugim gradovima je uočena dominacija određenih genotipova, pa je u Kraljevu najčešći tip bio *emm12*, a u Šapcu *emm77*. Dobijeni rezultati su u skladu sa očekivanjima, jer se distribucija *emm* tipova može razlikovati unutar različitih regiona iste zemlje.

S obzirom na veoma mali broj podataka o zastupljenosti *emm* tipova GAS u Srbiji, naši rezultati mogu imati značaj u proceni efikasnosti potencijalnih vakcina protiv infekcija koje izaziva *S. pyogenes*. Svi *emm* tipovi, osim jednog (*emm118*), koji su opisani u našoj studiji, se nalaze u multivalentnoj *emm* vakcini koja je u kliničkoj fazi ispitivanja (McNeil i sar., 2005). Dakle, eventualna pokrivenost vakcinom MRGAS izolata u Srbiji bi bila viša od 98%.

5.5. Udružnost pojedinih *emm* tipova i gena koji kodiraju rezistenciju na makrolide i tetracikline kod MRGAS sojeva izolovanih u Srbiji

Me u ispitivanim izolatima uo ena je jasna povezanost genotipova rezistentnih na makrolide i *emm* tipova. Tako su svi MRGAS sojevi sa genotipom *emm75* i 89% sojeva sa tipom *emm12* imali *mefA* gen rezistencije na makrolide, dok je kod svih sojeva sa genotipom *emm77* na en *ermA* gen. Jedini izolat sa genotipom *emm28* je posedovao *ermB* gen, dok soj sa genotipom *emm118* nije imao nijedan gen koji kodira rezistenciju na makrolide.

Sojevi sa genotipom *emm75/mefA* su ve prepoznati u literaturi kao široko diseminovani klonovi *S. pyogenes*, koji su rezistentni na makrolide. Navedeni genotip je jedan od naj eš ih me u MRGAS izolatima u Španiji i SAD-u (Ardanuy i sar., 2010; Green i sar., 2006).

Isti model povezanosti genotipa *emm77* i *ermA* gena, *emm12* i *mefA* gena, kao i *emm28* i *ermB* gena su uo ilii autori iz Belgije (Van Heirstraeten i sar., 2012). Genotip *emm77* je bio udružen sa *ermA* genom i kod sojeva iz Gr ke, Bugarske i Španije (Grivea i sar., 2006; Detcheva i sar., 2002; Rubio-Lopez i sar., 2012), dok su se u Italiji kod genotipa *emm77* nalazila oba gena makrolidne rezistencije - *ermA* i *ermB* gen (Zampaloni i sar., 2003). Nasuprot našim rezultatima, u Japanu je po etkom dvehiljaditih godina uo ena udružnost genotipa *emm12* i *ermB* gena (Murase i sar., 2000). Silva-Costa i saradnici su, tako e, objavili da je u Portugalu došlo do promene genotipa kod sojeva sa tipom *emm12*. Naime, po etkom dvehiljaditih godina ovaj genotip je bio udružen sa *mefA* genom, a u periodu od 2004. do 2006. godine, izolati genotipa *emm12* su imali isklju ivo *ermB* gen (Silva-Costa i sar., 2008). Naš jedini izolat tipa *emm28* je imao cMLS fenotip i *ermB* gen. Da ova pojava nije retka, pokazuju podaci iz Koreje, gde su tokom 2009. godine svi sojevi sa cMLS fenotipom imali genotip *emm28* (Koh i Kim, 2010). Ista povezanost genotipa *emm28* sa *ermB* genom je na ena i u Francuskoj (Bingen i sar., 2004) i Španiji (Perez-Trallero i sar., 2004).

Me u našim sojevima MRGAS, koji su bili istovremeno rezistentni i na tetracikline, na ena su tri *emm* tipa: *emm77*, *emm12* i *emm118*, od kojih je *emm77* bio ubedljivo dominantan. Preko 80% sojeva je imalo ovaj *emm* tip. Za njega je bilo karakteristi no da je udružen sa iMLS fenotipom i da poseduje *ermA* i *tetO* gene. Izolati

genotipa *emm77/ermA/tetO* su već prepoznati u Nemačkoj, Poljskoj i Italiji (Reinert i sar., 2004; Szczyzpa i sar., 2004; Palmieri i sar., 2006).

Kod 20 TRGAS sojeva, *tetM* gen je bio manje zastupljen u odnosu na *tetO* i detektovan je kod sojeva sa *ermB* genom, cMLS fenotipom i genotipom *emm12*. Montes i saradnici su u ovoj ili drugoj asocijaciji *tet* gena i genotipova. Oni su među ispitivanim izolatima rezistentnim na tetracikline našli značajan broj sojeva sa tipom *emm77*, koji su imali *tetM* gen (Montes i sar., 2006). Dominacija genotipa *emm77* među TRGAS sojevima je zabeležena i u Španiji. Ipak, svi njihovi sojevi korezistentni na eritromicin i tetraciklin su imali *tetM* gen (100%), a samo 36,8% TRGAS sojeva je imalo istovremeno prisutan *tetM* i *tetO* (Rubio-Lopez i sar., 2012). Ovakvi rezultati samo potvrđuju činjenicu da sojevi rezistentni na antibiotike imaju različite *emm* tipove shodno geografskoj lokaciji, ali i periodu izolacije (Creti i sar., 2007; Grivea i sar., 2006). Takođe, u pojedinim regionima nije ustanovljena bilo kakva povezanost *emm* tipova i tetraciklinske rezistencije (Ayer i sar., 2005).

Više od dve trećine TRGAS sojeva je pripadalo sojevima sa genotipom *emm77/ermA/tetO*. Na osnovu dobijenih rezultata, zaključili smo da je rezistencija TRGAS sojeva na tetracikline, izolovanih u Srbiji tokom 2008. godine, posledica monoklonske diseminacije *tetO* gena.

5.6. MLST genotipizacija

MLST metoda genotipizacije, za razliku od *emm* tipizacije i većine drugih metoda, detektuje genske promene koje se akumuliraju u relativno dugom vremenskom periodu (McGregor i sar., 2004). Suprotno RAPD i PFGE metodama genotipizacije, koje detektuju promene na nivou cele DNK, metoda MLST identifikuje samo alelske varijacije sedam visoko konzerviranih gena. Rezultati MLST tipizacije se lako mogu porediti među laboratorijama, jer se alelski profili, odnosno tipovi sekvenci obeležavaju brojem, koji je lako porediv. Sa druge strane, poređenje rezultata metoda tipizacije koje se baziraju na profilima dobijenim elektroforetskim razdvajanjem u različitim laboratorijama nije moguće obaviti.

Trenutno su opisana 672 različita ST grupe A streptokoka (<http://spyogenes.mlst.net/sql/sthtml.asp>). Interaktivna MLST baza omogućava unošenje novih tipova sekvenci, koje se sastoje od još neprepoznate kombinacije alela. Nakon provjere i potvrde postoje li sekvencama, svaki novouneseni alelni profil dobija svoj ST broj.

Među MRGAS sojevima izolovanim u Srbiji identifikovano je svega šest ST, od kojih su 4 tipa sekvenci već opisane i uvrštene u MLST bazu, dok su dva ST nova, do sada neopisana. Bez obzira na činjenicu da MLST metoda ima veću razdvajnu moć od *emm* tipizacije, među našim MRGAS izolatima smo našli relativno mali broj ST, svega šest, dok smo *emm* tipizacijom prepoznali pet *emm* tipova. Dobijeni rezultati se mogu objasniti činjenicom da MLST metoda identifikuje starije evolutivne promene i to na nivou visoko konzerviranih gena (McGregor i sar., 2004), te u ispitivanoj populaciji sojeva nije uočeno veliki diverzitet.

Tri najčešća ST (ST36, ST49 i ST63) su nađena kod 93% od 77 sojeva MRGAS u Srbiji. Većina autora je kod MRGAS izolata opisala relativno mali broj ST. Tako su poljski autori kod 98 izolata *S. pyogenes* rezistentnih na makrolide opisali svega 10 ST i 8 *emm* tipova (Szczypa i sar., 2004). Nasuprot našim rezultatima, D' Humieres i saradnici su kod samo 19 francuskih MRGAS izolata našli čak 7 različitih ST (D' Humieres i sar., 2012).

Među ispitivanim izolatima smo našli visok stepen korelacije između ST i *emm* tipova. Svi naši sojevi genotipa *emm12* su pripadali ST36, genotip *emm77* je bio udružen isključivo sa ST63, a većina izolata tipa *emm75* je imala ST49. Jedan soj genotipa *emm75*, koji je pripadao novoopisanom ST, označenom STN2 se od ST49 razlikovao u samo jednom genskom alelu. MRGAS izolati, koje su ispitali Silva-Costa i saradnici, su takođe, uočili vezu pojedinih ST i *emm* tipova: *emm12* i ST36; *emm77* i ST63 (Silva-Costa i sar., 2012). Ipak, postoje studije u kojima je dokazano da različiti *emm* tipovi mogu imati isti ST (McGregor i sar., 2004). U istraživanju koje je obuhvatilo 220 izolata GAS iz različitih delova sveta, uočeno je npr. da su sojevi sa *emm* tipom 19, 29 i 30 imali ST65, a da su sojevi sa *emm* tipom 70, 80, 93, 98, 108 i 121 imali ST10.

Uočeno je visok stepen korelacije između ST i gena koji kodiraju rezistenciju na antibiotike. Većina sojeva sa ST36 i ST49 je imala *mefA* gen, a svi izolati sa ST63 *ermA*

gen. Jedan od sojeva sa novim ST (STN2) koji smo identifikovali nije imao nijedan gen rezistencije, a drugi izolat sa STN1 je imao *mefA*.

Na osnovu dobijenih rezultata, mogli smo da sumiramo da je u našoj studiji naj eš i klon me u MRGAS izolatima bio *emm75/mefA/ST49*, koji je bio zastupljen kod 39% izolata. Ovaj klon se navodi kao najzastupljeniji me u sojevima sa M fenotipom rezistencije na makrolide i u SAD (Green i sar., 2006) i kao jedan od naj eš ih u Španiji (Ardanuy i sar., 2010). Klon *emm12/mefA/ST36* je u Srbiji po u estalosti bio na drugom mestu, a široko je rasprostranjen i u drugim evropskim zemljama, kao što su Nema ka i Poljska (Reinert i sar., 2004; Szczyzpa i sar., 2004). Tre i po zastupljenosti u Srbiji, klon *emm77/ermA/tetO/ST63*, tako e je opisan i široko diseminovan na evropskom kontinentu, u Nema koj, Poljskoj, ali i Španiji, Italiji i Norveškoj (Reinert i sar., 2004; Szczyzpa i sar., 2004; Montes i sar., 2006; Palmieri i sar., 2006).

Me u MRGAS sojevima izolovanim u Srbiji, klon *emm28/ermB/ST52* je identifikovan kod samo jednog pacijenta. Ovaj klon, me utim, nije nepoznat. Njega su španski i nema ki autori prethodno ve identifikovali i utvrdili njegovu vezu sa sojevima rezistentnim na makrolidne antibiotike (Perez-Trallero i sar., 2007). U nekoliko razli itih studija sprovedenih tokom prve polovine 2000 – ih godina u Španiji, Portugalu, Belgiji i Francuskoj je potvr ena veza izme u porasta u estalosti ukupne prevalencije rezistencije na makrolide i to konstitutivnog MLS fenotipa i propagacije ovog rezistentnog klona (Bingen i sar., 2004). Na osnovu prethodno navedenih rezultata, može se o ekivati porast u estalosti, odnosno širenje ovog klona i u našoj zemlji.

U Srbiji su identifikovana i dva nova ST (STN1, STN2), koji su bili udruženi sa genotipovima *emm75* i *emm118*. Novoopisani ST (STN1 i STN2) su se razlikovali od postoje ih tipova sekvenci u samo jednom genskom alelu. STN1 je u odnosu na postoje i ST167 imao drugi alel gena *gtr* (*gtr 90*), dok je STN2 u odnosu na ve opisani ST49 imao druga iji alel gena *yiql* (*yiql 96*).

MLST metodom genotipizacije je potvr ena relativna homogenost izolata unutar identifikovanih *emm* tipova.

5.7. RAPD genotipizacija

RAPD genotipizacijom je identifikovano ukupno 26 različitih profila, označenih slovima od A do Z. Svaki profil ima jedinstvenu kombinaciju broja i veličine umnoženih produkata.

U našoj studiji su genetski srodni sojevi MRGAS grupisani zajedno prema sličnosti RAPD profila. Analizom dobijenih RAPD obrazaca u našoj studiji, utvrđeno je da se ispitani sojevi MRGAS, na osnovu genske sličnosti raspoređuju u više različitih klastera, odnosno grupa. Dobijeni RAPD klasteri su se međusobno razlikovali prema broju različitih *emm* tipova, odnosno prema *emm* diverzitetu.

Distribucija RAPD profila kod naših MRGAS izolata nije bila uniformna među *emm* tipovima. Tako su, npr. kod 27 izolata genotipa *emm12* naša dva RAPD profila; kod 16 sojeva tipa *emm77* tri RAPD profila, a od sojeva *emm* tipa 75, 32 je pokazivalo 19 RAPD profila. Samo tri različita RAPD profila su naša kod skoro polovine ispitivanih sojeva (42%) što ukazuje na visok stepen genske srodnosti. Profili koji su se javljali kod većeg broja izolata su nazvani ponavljajućim i jedan od najčešćih takvih RAPD profila je bio dominantan kod sojeva sa genotipom *emm12* (96%), dok je drugi ponavljajući profil bio zastupljen kod većine izolata sa genotipom *emm77* (67%). Ovakva distribucija RAPD profila među našim MRGAS izolatima ukazuje na relativnu homogenost izolata unutar datih *emm* tipova, odnosno zajedničko gensko poreklo. Naši rezultati pokazuju da su sojevi sa genotipom *emm12* i *emm77* činili izrazito homogen skup izolata. Najveća raznolikost je naša kod sojeva sa tipom *emm75*, gde je postojalo čak 19 različitih RAPD profila. To je ujedno i *emm* tip koji je bio najčešće zastupljen na teritoriji grada Beograda. Ovakvi rezultati su očekivani jer u Beogradu živi skoro trećina stanovništva naše zemlje, a cirkulacija ljudi je intenzivnija nego u ruralnim sredinama.

Grupisanje u genske linije, odnosno u klastere, je izvršeno na osnovu sličnosti, odnosno razlika u RAPD profilima (broj i veličina umnoženih produkata na elektroforetskom gelu). Svih 77 ispitivanih MRGAS sojeva, je na osnovu genske srodnosti, podeljeno u samo četiri genske linije, što ukazuje na njihovu srodnost, odnosno zajedničko poreklo, naročito u okviru pojedinih *emm* tipova.

etiri od pet izolata sa cMLS fenotipom, koji su imali *ermB* gen, je pokazalo visok stepen genske srodnosti. Jedan od izolata sa konstitutivnim MLS fenotipom, koji nije imao *ermB* gen, je bio klonski povezan sa sojevima sa genotipom *emm75/mefA*. Više od polovine sojeva sa iMLS fenotipom su imali zajedni ko gensko poreklo. Najve u heterogenost su pokazali sojevi sa M fenotipom, posebno oni sa tipom *emm75*. Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaklju iti da je genska srodnost sojeva izraženija izme u sojeva sa istim *emm* tipom, nego izme u sojeva sa istim fenotipom rezistencije na makrolide.

RAPD metoda se pokazala kao vrlo diskriminativna, jednostavna, finansijski i vremenski ekonomi na. Ipak, osetljivost na suptilne promene PCR uslova (npr. promena PCR aparata), mogu dovesti do odre enih promena u broju i veli ini amplifikovanih RAPD profila. Zbog toga, brojni autori isti u da je metoda nedovoljno reproducibilna, što se može prevazi i ukoliko se svi uzorci amplifikuju zajedno, pod istim uslovima i vizualizuju u istom gelu.

5.8. *emm*, RAPD i MLST metode genotipizacije izolata *S. pyogenes*

emm tipizacija je naj eš e koriš ena metoda za tipizaciju sojeva *S. pyogenes*. Ona je relativno brza i reproducibilna metoda, koja omogu uje pore enje sojeva koji su tipizirani u razli itim laboratorijama. Brojni autori potvr uju zna aj i kvalitet ove metode (Luca-Harari i sar., 2008). Ipak, za analizu genske srodnosti sojeva *S. pyogenes* i identifikaciju cirkulišu ih klonova, neophodno je *emm* tipizaciju dopuniti sa MLST, RAPD ili nekom drugom diskriminativnom metodom genotipizacije (Carrico i sar., 2006). Mnogi istraživa i su uo ili povezanost *emm* tipova i rezistencije na makrolide (Alberti i sar., 2003; Zampaloni i sar., 2003; Creti i sar., 2007; Michos i sar., 2009; Nir-Paz i sar., 2006; Rivera i sar., 2006; Koh i sar., 2008), ali je karakterizacija MRGAS izolata u ve ini studija izvršena samo *emm* tipizacijom. U našoj studiji su koriš ene metode RAPD i MLST, kao komplementarne *emm* tipizaciji, u cilju identifikovanja srodnih genskih linija.

S obzirom da je indeks diverziteta RAPD metode bio veći u odnosu na indeks diverziteta MLST, možemo zaključiti da je RAPD metoda diskriminativnija od MLST, odnosno da je moguća razlika u razlikovanju sojeva, čak i unutar istih ST.

MLST genotipizacija je, iako manje razdvojne moći od RAPD metode, veoma reproducibilna metoda, koja se često koristi u ispitivanju distribucije klonova i klonske povezanosti *S. pyogenes*, jer su rezultati dobijeni ovom metodom lako poredivi. MLST tipizacija omogućava pouzdano predviđanje *emm* tipova, što su dokazali i drugi istraživači (Carrico i sar., 2006). RAPD metodom genotipizacije smo mogli da razlikujemo sojeve unutar određenog *emm* tipa, ali ne i da ga predvidimo.

Naša iskustva potvrđuju da je RAPD metoda relativno jednostavna za izvođenje, jer se zasniva samo na reakciji amplifikacije. Za razliku od nje, MLST i *emm* metode genotipizacije se zasnivaju na reakciji sekvenciranja, pa je za izvođenje ovih metoda neophodna bolja opremljenost laboratorije i visoko obučeni kadar. Ipak, iako je RAPD metoda jednostavna i finansijski povoljnija, pokazalo se da ponavljane reakcije RAPD tipizacije nisu dovoljno reproducibilne. Takođe, poređenje elektroforetskih gelova, odnosno dobijenih RAPD profila nije moguće ukoliko su rezultati dobijeni u različitim laboratorijama ili se rade u više navrata u istoj laboratoriji, što predstavlja veliki nedostatak. Slične ocene RAPD metode izneli su i drugi autori (Seppala i sar., 1994; Bert i sar., 1996; Nandi i sar., 2006). Uprkos navedenim manjkavostima, korišćenje RAPD metode se ipak preporučuje u zemljama u razvoju, u kojima metode tipizacije koje se baziraju na reakciji sekvenciranja često nisu dostupne.

5.9. Klonska veza između sojeva *S. pyogenes* rezistentnih na makrolidne antibiotike izolovanih u Srbiji

U našoj studiji su identifikovana tri diseminovana klona *S. pyogenes* rezistentna na makrolide: *emm75/mefA/ST49*, *emm12/mefA/ST36* i *emm77/ermA/tetO/ST63*. Mnogi autori ističu da rezistentni klonovi *S. pyogenes* pripadaju relativno malom broju genskih linija, koje su veoma stabilne i široko diseminovane (Portillo i sar., 2003; Grivea i sar., 2006; Malhotra-Kumar i sar., 2005; Perez-Trallero i sar., 2004; Perez-Trallero i sar., 2007; Reinert i sar., 2004; Szczypa i sar., 2004). Weiss i saradnici su objavili da je

po etkom 21. veka u Kvebeku (Kanada) ustanovljeno da 65% MRGAS sojeva pripada jednom klonu. U Španiji su, tako e, identifikovali tri klona rezistentna na makrolide (Rubio-Lopez i sar., 2012). I u našoj studiji rezultati pokazuju da je rezistencija *S. pyogenes* na makrolide u Srbiji u najve o j meri posledica diseminacije rezistentnih klonova.

Promene u estalosti MRGAS izolata, fenotipova i genotipova rezistencije na makrolide su obi no pra ene promenama u klonskom sastavu populacije *S. pyogenes* na odre enoj teritoriji (Silva-Costa i sar., 2008; Silva-Costa i sar., 2012). Budu a istraživanja bi mogla da utvrde da li i kako se menja klonski sastav MRGAS izolata u Srbiji.

5.10. Osetljivost izolata MRGAS na druge antibakterijske agense

Analizom 77 izolata *S. pyogenes* rezistentnih na makrolidne antibiotike, utvr eno je da su svi u potpunosti bili osetljivi na penicilin. Još uvek nije zabeležena *in vitro* rezistencija grupe A streptokoka na penicilin, pa on ostaje lek izbora za terapiju ve ine infekcija izazvanih ovim patogenom.

U estalost rezistencije MRGAS izolata na klindamicin je bila 27,3%, što je znatno više nego u Španiji, gde je ona iznosila 6,5% (Rubi-Lopez i sar., 2012). Ipak, u Francuskoj i Norveškoj, gde je MLS fenotip rezistencije na makrolide dominantan, u estalost rezistencije na klindamicin je znatno ve a (Bingen i sar., 2004; Littauer i sar., 2006).

Svi sojevi su bili osetljivi na vankomicin, što je bio o ekivan rezultat, ali i na druge antibiotike kao što su hloramfenikol i ofloksacin. Rezultati studije španskih autora, koja je tako e obuhvatila MRGAS izolate ukazuju da je 10,1% sojeva imalo udruženu rezistenciju na makrolide i ciprofloksacin (Ardanuy i sar., 2010). Pet od osam sojeva rezistentnih na fluorohinolone je imalo genotip *emm6*/ST382, što ukazuje na klonsko poreklo ovih sojeva, dok su ostali verovatno stekli rezistenciju mutacijom nakon terapije fluorohinolonima. Klonska propagacija sojeva GAS rezistentnih na fluorohinolone je ve opisana (Malhotra-Kumar i sar., 2005). Potpuna osetljivost MRGAS sojeva izolovanih u Srbiji na fluorohinolone je od velikog zna aja, s obzirom

na injenicu da se novije generacije ovih antibiotika mogu upotrebljavati u terapiji infekcija izazvanih MRGAS sojevima, kod pacijenata alergičnih na penicilin.

Rezistencija *S. pyogenes* na hloramfenikol je izuzetno retka (Szcyba i sar., 2006) i rezultati većine studija koje ispituju osetljivost faringealnih izolata *S. pyogenes* na ove antibiotike navode podatke da je osetljivost na hloramfenikol 100% (Liu i sar., 2009). Ipak, osamdesetih godina prošlog veka, rezistencija grupe A streptokoka je bila zastupljena u Japanu kod 57,9% izolata (Nakae i sar., 1977).

5.11. Nadzor nad streptokoknim infekcijama

Naše istraživanje predstavlja prvu kompletnu fenotipsku i genotipsku analizu sojeva grupe A streptokoka rezistentnih na makrolide u Srbiji. Dobijeni rezultati predstavljaju epidemiološku bazu podataka, na osnovu kojih bi se dalje mogle pratiti promene uestalosti rezistencije GAS na makrolide, kao i eventualne promene u klonskoj strukturi MRGAS sojeva u Srbiji.

Epidemiološki nadzor nad infekcijama izazvanim streptokokom grupe A sprovodi se kontinuirano u razvijenim zemljama. Nadzor obuhvata prvenje nekoliko epidemioloških markera GAS i bolesti koje oni izazivaju kao što su: prvenje incidencije i prevalencije obolevanja, rezistencije invazivnih i neinvazivnih izolata, prvenje cirkulacije rezistentnih klonova, detekciju mehanizama rezistencije na antibiotike, određivanje distribucije gena koji determinišu rezistenciju na antibakterijske agense. Po etkom dvehiljaditih godina, objavljeno je više publikacija o porastu rezistencije *S. pyogenes* na makrolide u pojedinim regionima sveta, a poslednjih godina rezultati mnogih studija ukazuju na porast incidencije invazivnih oboljenja izazvanih grupom A streptokoka.

Iako u Srbiji ne postoji kontinuirano prvenje streptokoknih infekcija, naši rezultati ukazuju da su u estalost rezistencije *S. pyogenes* na makrolide i distribucija *emm* tipova sojeva rezistentnih na ove antibiotike slični onima koji postoje u pojedinim mediteranskim zemljama. Ipak, za unapređivanje mera prevencije, dijagnostičkih procedura i terapijskih opcija neophodno je uspostavljanje nacionalne mreže laboratorija i uvođenje aktivnog nadzora nad streptokoknim infekcijama. Rezultati

budu ih istraživanja bi mogli da ukažu na promene u incidenciji rezistencije na makrolide me u izolatima *S. pyogenes*, eventualne izmene u u estalosti pojedinih fenotipova rezistencije na makrolide, izmene u distribuciji *emm* tipova kod MRGAS sojeva i dalji trend u klonskoj propagaciji MRGAS izolata u Srbiji.



Zaključci

6. Zaključci

Na osnovu dobijenih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Prevalencija rezistencije faringealnih izolata *S. pyogenes* na makrolide izolovanih u periodu od decembra 2007. do decembra 2008. godine u Srbiji je iznosila 12%
- Dominantan fenotip rezistencije na makrolide je bio M fenotip (72,7%). CMLS fenotip je bio zastupljen kod 6,5%, a iMLS fenotip kod 20,8% MRGAS izolata. Potvrđena je udruženost *mefA* gena i M fenotipa; *ermA* gena i iMLS fenotipa, kao i *ermB* gena i cMLS fenotipa
- Rezistencija na tetracikline je bila zastupljena kod 26% MRGAS izolata u Srbiji. Dominantan gen koji kodira rezistenciju na tetracikline je bio *tetO*, koji je bio prisutan kod 80% sojeva, dok je *tetM* bio zastupljen kod samo 20% izolata
- *emm* genotipizacijom je me u MRGAS izolatima identifikovano pet *emm* tipova: *emm75* (41,6%), *emm12* (35%), *emm77* (20,8%), *emm118* (1,3%) i *emm28* (1,3%). Najčešća tri *emm* tipa: *emm12*, *emm75* i *emm77* su nađena kod 97% sojeva.
- Utvrđeno je da postoji visok stepen asocijacije između genotipa *emm75* i *mefA* gena, kao i udruženost genotipa *emm77* i *ermA* gena
- MLST tipizacijom je identifikovano 6 ST: ST49, ST36, ST63, ST52 i dva nova STN1 i STN2. Tri ST – ST49, ST36 i ST63 su nađena kod 97% sojeva
- RAPD tipizacijom je identifikovano 26 profila, pri čemu su sojevi sa genotipom *emm75* imali najveći broj profila, odnosno bili su najheterogeniji, dok su izolati sa *emm12* i *emm77* genotipom bili vrlo homogeni
- Identifikovana su tri visoko rasprostranjena klonalno rezistentna na makrolide u Srbiji (*emm75/mefA/ST49*, *emm12/mefA/ST36* i *emm77/ermA/tetO/ST63*), čime je dokazano postojanje klonske veze između sojevima grupe A streptokoka rezistentnim na makrolidne antibiotike
- MRGAS sojevi su u potpunosti bili osetljivi na penicilin, vankomicin, ofloksacin i hloramfenikol



Reference

7. Reference

1. Alberti S, García-Rey C, Domínguez MA, Aguilar L, Cercenado E, Gobernado M, García-Perea A,⁶ and Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens Survey of *emm* gene sequences from pharyngeal *Streptococcus pyogenes* isolates collected in Spain and their relationship with erythromycin susceptibility. 2003; 41:2385-2390.
2. Alos JJ, Aracil B, Oteo J, i sar. High prevalence of erythromycin-resistant, clindamycin/miocomycin-susceptible (M phenotype) *Streptococcus pyogenes*: results of a Spanish multicentre study in 1998. J Antimicrob Chemother. 2000; 45:605–609.
3. Amezaga MR, Carter PE, Cash P, and McKenzie H. Molecular epidemiology of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates from blood and noninvasive sites. J. Clin. Microbiol. 2002; 40:3313–3318.
4. Anthony BF. 2000. Streptococcal pyoderma, p. 144-151. In Stevens DL. and Kaplan EL. (ed.), Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis. Oxford University Press, New York.
5. Ardanuy C, Domenech A, Rolo D, calatayud L, Tubau F, Ayats J. i sar. Molecular characterisation of macrolide-and multidrug-resistant *Streptococcus pyogenes* isolated from adult patients in Barcelona, Spain (1993-2008). J Antimicrob Chemother. 2010; 65:634–643.
6. Ayer V, Tewodros W, Manoharan A, Skariah S, Luo F, Bessen DE. Tetracycline resistance in group A streptococci: emergence on a global scale and influence on multiple-drug resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 2007; 51:1865–1868.
7. Bacciaglia A, Brenciani A, Varaldo PE i sar. *SmaI* typeability and tetracycline susceptibility and resistance in *Streptococcus pyogenes* isolates with efflux-mediated erythromycin resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51:3042-3043.
8. Banks DJ, Beres SB, and Musser JM. The fundamental contribution of phages to GAS evolution, genome diversification and strain emergence. Trends Microbiol. 2002; 10:515–521.
9. Barry AL, Fuchs PC, Brown SD. Macrolide resistance among *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolates from out-patients in the USA. J Antimicrob Chemother. 1997; 40(1):139-40.
10. Beachey EH and Ofek I. Epithelial cell binding of group A streptococci by lipoteichoic acid on fimbriae denuded of M protein. J. Exp. Med. 1976; 143:759–771.
11. Bert F, Picard B, Branger C, Lambert-Zechovsky. Analysis of genetic relationships among strains of groups A, C and G streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. J. Med. Microbiol. 1996; 45: 278-284.

12. Bingen E, Bidet P, Mihaila-Amrouche L i sar. Emergence of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates in French children. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:3559-3562.
13. Bisno AL, Brito MO and Collins CM. Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3:191-200.
14. Bisno AL. 1995. *Streptococcus pyogenes*, p. 1786–1799. In Mandell GL, Bennett G, and Dolin R. (ed.), *Principles and practice of infectious diseases*, vol. 2. Churchill Livingstone, New York, N.Y.
15. Borek AL, Obsza ska K, Hryniewicz W, Sitkiewicz I. Typing of *Streptococcus pyogenes* strains using the phage profiling method. *Virulence.* 2012; 3(6):534-538.
16. Brandt CM, Honscha M, Truong ND, Holland R, Hovener B, Bryskier A, Lütticken R, and Reinert RR. Macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* isolates from throat infections in the region of Aachen, Germany. *Microb Drug Resist.* 2001; 7:165-170.
17. Brenciani A, Bacciaglia A, Vecchi M, Vitali LA, Varaldo PE and Giovanetti E. Genetic elements carrying *ermB* in *Streptococcus pyogenes* and association with *tetM* tetracycline resistance gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51:1209-16.
18. Brook I. Overcoming penicillin failures in the treatment of Group A streptococcal pharyngo-tonsillitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2007; 71(10):1501-1508.
19. Brook I. Role of beta-lactamase-producing bacteria in the failure of penicillin to eradicate group A streptococci. *Pediatr Infect Dis.* 1985; 4:491-5.
20. Buter CC, Mouton JW, Klaassen CH, Handgraaf CM, Sunnen S, Melchers WJ i sar. Prevalence and molecular mechanism of macrolide resistance in β -hemolytic streptococci in the Netherlands. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 35:590-592.
21. Butte AJ i saradnici. Further defining housekeeping, or "maintenance," genes focus on 'a compendium of gene expression in normal human tissues'. *Physiol Genomics.* 2001; 7 (2): 95–96.
22. Capoor MR, Nair D, Deb M, Batra K, Aggarwa P. Resistance to erythromycin and rising penicillin MIC in *Streptococcus pyogenes* in India. *Jpn J Infect Dis.* 2006; 59:334-336.
23. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis.* 2005; 5(11):685-94.
24. Carrico JA i sar. Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* *J Clin Microbiol.* 2006; 44:2524-2532.

25. Chen CC and Cleary PP. Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes*. The Journal of biological chemistry. 1990; 265:3161-3167
26. Chin J. 2000. Streptococcal diseases caused by group A (beta-hemolytic) streptococci, p. 470-476. In J. Chin (ed.), Control of Communicable Diseases Manual, 17 ed.
27. Cizman M, Beovic B, Seme K, Paragi M, Strumbelj I, Muller-Premru M i sar. Macrolide resistance rates in respiratory pathogens in Slovenia following reduced macrolide use. Int J Antimicrob Agents. 2006; 28:537-542.
28. Cleary P, Prabu U, Dale J, Wexler D, and Handley J. Streptococcal C5a peptidase is a highly specific endopeptidase. Infect Immun. 1992; 60:5219-5223.
29. Clewell DB, Flannagan SE, and Jaworski DD. Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn 916 -Tn 1545 family of conjugative transposons. Trends Microbiol. 1995; 3:229-236.
30. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-first informational supplement. CLSI document M100-S21. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne PA: CLSI; 2011.
31. Colakoglu S, Alacam R, Hascelik G. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* in Ankara, Turkey. Scand J Infect Dis. 2006; 38(6-7):456-9.
32. Corso A, Severina EP, Petruk VF, Mauriz YR, and Tomasz A. Molecular characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates causing respiratory disease in the United States. Microb. Drug Resist. 1998; 4:325-337.
33. Courtney HS, Li Y, Dale JB, and Hasty DL. Cloning, sequencing and expression of a fibronectin/fibrinogen-binding protein from group A streptococci. Infect Immun. 1994; 62:3937-3946.
34. Courtney HA, Hasty DL, Dale JB and Poirer TP. A 29-kilodalton fibronectin binding protein of group A streptococci. Curr Microbiol. 1992; 25:245-250.
35. Creti R, Imperi M, Baldassarri L i sar. *emm* types, virulence factors and antibiotic resistance of invasive *Streptococcus pyogenes* isolates from Italy: what has changed in 11 years? J Clin Microbiol. 2007; 45:2249-2256.
36. Cronin WJ, and Lange K. Immunologic evidence for the in situ deposition of a cytoplasmic streptococcal antigen (endostreptosin) on the glomerular basement membrane in rats. Clin. Nephrol. 1990; 34:143.

37. Cue D, Dombek PE, Lam H and Cleary PP. *Streptococcus pyogenes* serotype M1 encodes multiple pathways for entry into human epithelial cells. *Infection and Immunity*. 1998; 66(10):4593–4601.
38. Cywes C, Wessels MR. Group A *Streptococcus* tissue invasion by CD44-mediated cell signalling. *Nature*. 2001; 414:648-52.
39. Dale JB. Multivalent Group A Streptococcal Vaccines. 2000;(20):390-401.
40. Davies HD, McGeer A, Schwartz B, Green K, Cann D, Simor AE, Low DE, and Ontario Streptococcal Study Group. 1996. Invasive group A streptococcal infections in Ontario, Canada. *N. Engl. J. Med.* 335:547–554.
41. De Aavedo JC, Yeung RH, Bast DJ i sar. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in clinical isolates of group A streptococci from Ontario, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43:2144-2146.
42. De Rosa R, Avolio M, Stano P, Luisa M, Camporese A. Disappearance of *Streptococcus pyogenes* macrolides resistance in an area of northeastern Italy: a possible link with rational long-acting macrolide consumption. *Infezioni in medicina.* 2009; 2(17):82-87.
43. Denny FW. Jr. 2000. History of hemolytic streptococci and associated diseases, p. 1-18. In D. L. Stevens and E. L. Kaplan (ed.), *Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis*. Oxford University Press, New York.
44. D’Humières C, Cohen R, Levy C, Bidet P, Thollot F, Wollner A, Bingen E. Decline in macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates from French children. *International Journal of Medical Microbiology.* 2012; 7-8(302):300–303.
45. Dicuonzo G, Gherardi G, Lorino G, Angeletti S, DeCesaris M, Fiscarelli E, Bessen DE, and Beall B. Group A streptococcal genotypes from pediatric throat isolates in Rome, Italy. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:1687–1690.
46. Dicuonzo G, Fiscarelli E, Gherardi G, Lorino G, Battistoni F, Landi S, et al. Erythromycin-resistant pharyngeal isolates of *Streptococcus pyogenes* recovered in Italy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:3987-90.
47. Dombek P, Cue D, Sedgewick J, Lam H, Ruschkowski B, Finlay B, and Cleary P. High frequency intracellular invasion of epithelial cells by serotype M1 group A streptococci: M1 mediated invasion and cytoskeletal rearrangements. *Mol Microbiol* 1999; 31:859–870.
48. Dundar D, Sayan M. and Tamer GS. Macrolide and tetracycline resistance and *emm* type distribution of *Streptococcus pyogenes* isolates recovered from Turkish patients. *Microb Drug Resist.* 2010; 16:279-84.

49. Eisner A, Leitner E, Feier G, Kessler HH, Marth E. Prevalence of emm types and antibiotic resistance of group A streptococci in Austria. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006; 55:347-350.
50. Ellen RP, and Gibbons RJ. M protein-associated adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial surfaces: prerequisite for virulence. *Infect Immun*. 1972; 5:826–830.
51. Enright M, Spratt B, Kalia A, Cross J, Bessen D. Multilocus sequence typing of streptococcus pyogenes and the relationships between emm type and clone. *Infect Immun*. 2001; 69: 2416-2427.
52. Facklam RF, Martin DR, Lovgren M, Johnson DR, Efstratiou A, Thompson TA, Gowan S, Kriz P, Tyrrell GJ, Kaplan E, and Beall B. Extension of the Lancefield classification for group A streptococci by addition of 22 new M protein gene sequence types from clinical isolates: *emm103* to *emm124*. *Clin Infect Dis*. 2002; 34:28–38.
53. Farrell DJ, Shackcloth J, Barbadora KA, Green MD. *Streptococcus pyogenes* isolates with high level macrolide resistance and reduced susceptibility to telithromycin associated with 23S rRNA mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50:817–828.
54. Fischetti VA. Protection Against Group A Streptococcal Infection. 2000; (19):371-389.
55. Fischetti VA. Surface proteins on Gram-positive bacteria. In V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferreti, D. A. Portnoy, and J. I. Rood, editors, *Gram positive pathogens*, 12-25 (ASM, 2006), 2nd edition.
56. Fox MD, Schwartz RA. Erythema nodosum. *Am Fam Physician*. 1992; 46:818–822.
57. Friaes A, Pinto FR, Silva-Costa C, Ramirez M, Melo-Cristino J. Group A streptococci clones associated with invasive and pharyngitis in Portugal present differences in emm types, superantigen gene content and antimicrobial resistance. *BMC Microbiology*. 2012; 12:280.
58. Fujita K, Muroso K, Yoshikawa M, Murai T. Decline of erythromycin resistance of group A streptococci in Japan. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13:1075-1078.
59. Gastanaduy AS, Kaplan EL, Huwe BB, McKay C, Wannamaker LW. Failure of penicillin to eradicate group A streptococci during an outbreak of pharyngitis. *Lancet*. 1980; 2:498-502.
60. Gatanaduy AS, Kaplan Kim KS, Kaplan EL. Association of penicillin tolerance with failure to eradicate group A streptococci from patients with pharyngitis. *J Pediatr*. 1985; 107:681-4.

61. Gattringer R, Sauermann R, Lagler H, Stich K, Buxbaum A, Graninger W, Georgopoulos A. Antimicrobial susceptibility and macrolide resistance genes in *Streptococcus pyogenes* collected in Austria and Hungary. *Int. J Antimicrob Agents*. 2004; 24:290–293.
62. Giovanetti E, Brenciani A, Lupidi R i sar. Presence of the tetO gene in erythromycin- and tetracycline-resistant strains of *Streptococcus pyogenes* and linkage with either the mefA or the ermA gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47:2844–2849.
63. Giovanetti E, Brenciani A, Vecchi M, Manzin A, and Varaldo PE. Prophage association of mef (A) elements encoding efflux-mediated erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes*. *J. Antimicrob. Chemother*. 2005; 55:445–451.
64. Giovanetti E, Montanari MP, Mingoia M. et al. Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in Italy and heterogeneity of inducibly resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43:1935–40.
65. Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet*. 2005; 365:579–587.
66. Granizio JJ, Aguilar L, Casal J i sar. *Streptococcus pyogenes* resistance to erythromycin in relation to macrolide consumption in Spain (1986-1997). *J Antimicrob Chemother*. 2000; 46:959–964.
67. Green MD, Beall B, Marcon MJ, Allen CH, Bradley JS, Dashefsky B, Gilsdorf JR, Schutze GE, Smith C, Walter EB, Martin JM, Edwards KM, Barbadora KA, Wald ER. Multicentre surveillance of the prevalence and molecular epidemiology of macrolide resistance among pharyngeal isolates of group A streptococci in the USA. *J. Antimicrob. Chemother*. 2006; 57:1240–1243.
68. Griffith F. The serological classification of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Hygiene*. 1934; 34:542-584.
69. Grivea IN, Al-Lahham A, Katopodis GD, Syrogiannopoulos GA, Reinert RR. resistance to erythromycin and telithromycin in *Streptococcus pyogenes* isolates obtained between 1999 and 2002 from greek children with tonsillopharyngitis: phenotypic and genotypic analysis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50:256–261.
70. Hansen LH, Mauvais P, Douthwaite S. The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA. *Mol Microbiol*. 1999; 31:623-31.
71. Horaud T, Le Bouguenec C, Pepper K. Molecular genetics of resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin B (MLS) in streptococci. *J Antimicrob Chemother*. 1985;16:Suppl A:111–35.

72. Hunter PR. and Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26:2465–2466.
73. Ivory D, Folzenlogen D. Post Streptococcal Syndromes, A Rheumatologist Perspective. *The Internet Journal of Rheumatology.* 2009; 6:2.
74. Jasir A, Tanna A, Noorani A, *et al.*: High rate of tetracycline resistance in *Streptococcus pyogenes* in Iran: an epidemiological study. *J Clin Microbiol* 2000; 38:2103-2107.
75. Johnson DR, Stevens DL, Kaplan EL. Epidemiologic analysis of group A streptococcal serotypes associated with severe systemic infections, rheumatic fever, or uncomplicated pharyngitis. *J Infect Dis.* 1992; 166:374-82.
76. Johnson D, Kaplan E, VanGheem A, Facklam R, Beall B. Characterization of group A streptococci (*Streptococcus pyogenes*): correlation of M protein and *emm*-gene type with T protein agglutination pattern and serum opacity factor. *J Med Microbiol.* 2006; 55:157-164.
77. Kakourou T, Drosatou P, Psychou F, Aroni K, Nicolaidou P. Erythema nodosum in children: a prospective study. *J Am Acad Dermatol.* 2001; 44:17–21.
78. Kapur V, Maffei JT, Greer RS, Li LL, Adams GJ and Musser JM. Vaccination with streptococcal extracellular cysteine protease (interleukin-1 beta convertase) protects mice against challenge with heterologous group A streptococci. *Microbial pathogenesis.* 1994; 16:443-450.
79. Kaplan EL. The group A streptococcal upper respiratory tract carrier state: an enigma. *The Journal of pediatrics.* 1980; 97:337-345.
80. Kataja J, Huovinen P, Efstratiou A *i sar.* Clonal relationships among isolates of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* of different geographical origin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002; 21:589–595.
81. Kataja J, Huovinen P, Skurnik M *i sar.* Erythromycin resistance genes in group A streptococci in Finland. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43:48–52.
82. Kotb M. Bacterial pyrogenic exotoxins as superantigens. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8:411–426.
83. Koh EH, Kim S, Lee NY. Decrease of erythromycin resistance in group A streptococci by change of *emm* distribution. *Jpn J Infect Dis.* 2008; 61:261–263.
84. Koh EH, Kim S. Decline in erythromycin resistance in group A streptococci from acute pharyngitis due to changes in the *emm* genotypes rather than restriction of antibiotic use. *Korean J Lab.* 2010; 30:485–490.

85. Koo HK, Baek SC, Ma SH, Lee HJ, Cha SH. Trends of incidence of erythromycin-resistant group A streptococci in Korea from 1998 through 2002. *Infect Chemother.* 2004; 36:75–82.
86. Kreikmeyer B, Talay SR, and Chhatwal GS. Characterization of a novel fibronectin-binding surface protein in group A streptococci. *Mol. Microbiol.* 1995; 17:137–145.
87. Kwinn LA. and Nizet V. How group A *Streptococcus* circumvents host phagocyte defenses. *Future Microbiol.* 2007; 2:75-84.
88. Lancefield RC. A micro precipitin-technic for classifying hemolytic streptococci, and improved methods for producing antisera. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1938; 38:473-478.
89. Lancefield R and Todd E. Antigenic differences between matt hemolytic streptococci and their glossy variants. *Journal of Experimental Medicine.* 1928; 48:769-790.
90. Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of streptococci. *J. Exp. Med.* 1933; 59:441–158.
91. Lancefield RC. Current knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci. *J Immunol.* 1962; 89:307-313.
92. LaPenta D, Rubens C, Chi E, and Cleary PP. Group A streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91:12115–12119.
93. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis.* 2002; 34:482–492.
94. Liebowitz LD, Slabbert M, Huisamen A. National surveillance programme on susceptibility patterns of respiratory pathogens in South Africa: moxifloxacin compared with eight other antimicrobial agents. *J Clin Pathol* 2003; 56:344-347.
95. Lowbury EJ, Hurst L. The sensitivity of staphylococci and other wound bacteria to erythromycin, oleanomycin and spiramycin. *J Clin Pathol.* 1959; 12:163-169.
96. Luca-Harari B, Straut M, Cretoiu S, Surdeanu M, Ungureanu V, Van der Linden M, Jasif A. Molecular characterization of invasive and non-invasive *Streptococcus pyogenes* isolates from Romania. *Journal of Medical Microbiology.* 2008; 57:1354–1363.
97. Luca-Harari B. et al. Clinical and Microbiological Characteristics of Severe *Streptococcus pyogenes* Disease in Europe. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(4):1155–1165.

98. Littauer P, Caugant DA, Sangvik M, Hoiby EA, Sundsfjord A. and Simonsen GS. Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* in Norway: population structure and resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:1896-1899.
99. Liu X, Huang G, Fu Z, Zheng Y, Wang L, Li C, Liu L, Shen Y, Yang Y, Liu X, Shen X, Chang H, Huang G, Fu Z, Zheng Y, Wang L, Li C, Liu L, Shen Y, Yang Y. High macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* strains isolated from children with pharyngitis in China. *Pediatric Pulmonology.* 2009; 44(5):436 - 441.
100. Lukomski SC, Montgomery A, Rurangirwa J, Geske RS, Barrish JP, Adams GJ, and Musser JM. Extracellular cysteine protease produced by *Streptococcus pyogenes* participates in the pathogenesis of invasive skin infection and dissemination in mice. *Infection and Immunity.* 1999; 67:1779-1788.
101. Madden JC, Ruiz N, and Caparon M. Cytolysin-mediated translocation (CMT): a functional equivalent of type III secretion in Grampositive bacteria. *Cell.* 2001; 104:143-152.
102. Malbruny B, Nagai K, Coquemont M, Boydogan B, Andrasevic AT, Hupkova H i sar. Resistance to macrolides in clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* due to ribosomal mutations. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 49:935-949.
103. Malhotra-Kumar S, Lammens C, Coenen S, Van Herck K, Goossens H. Effect of azithromycin and clarithromycin therapy on pharyngeal carriage of macrolide-resistant streptococci in healthy volunteers: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet.* 2007; 369:482–90.
104. Malhotra-Kumar S, i sar. Macrolide- and telithromycin-resistant *Streptococcus pyogenes*, Belgium, 1999-2003. *Emerg, Infect. Dis.* 2005; 11:939-942.
105. Malhotra-Kumar S, Mazzariol A, Van Heirstraeten L i sar. Unusual resistance patterns in macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* harbouring *ermA*. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63:42–46.
106. -Trallero E, Ercibengoa M, Gonzalez A, Fenoll A, and the Spanish Pneumococcal Infection Study Network (G03/103). Molecular epidemiology and variants of the multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* Spain14-5 international clone among Spanish clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 57:654–660.
107. Maripuu L, Eriksson Aand Norgren M. Superantigen gene profile diversity among clinical group A streptococcal isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008; 54:236–244.
108. Martin JM, Green M, Barbadora KA, Wald ER. Erythromycin-resistant group A streptococci in schoolchildren in Pittsburg. *N Eng J Med* 2002; 346:1200-1206.

109. Markowitz M. Rheumatic fever: Recent outbreaks of an old disease. *Conn Med.* 1987; 51:229.
110. Martin DR, Single LA. Molecular epidemiology of group A streptococcus M type 1 infections. *J. Infect. Dis.* 1993; 167:1112–1117.
111. Maruyama S, Yoshioka H, Fujita K, Takimoto M, Satake Y. Sensitivity of group A streptococci to antibiotics. Prevalence of resistance to erythromycin in Japan. 1979; 133(11):1143-5.
112. McDougal LK, Tenover F, Lee LN, Rasheed JK, Patterson JE, Jorgensen JH, and Leblanc DJ. Detection of Tn 917 -like sequences within a Tn 916 -like conjugative transposon (Tn 3872) in erythromycin-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42:2312–2318.
113. McGregor KF, Spratt BG, Kalia A, Benett A, Bilek N, Beall B, Bessen DE. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* representing most known emm types and distinctions among subpopulation genetic structures. *J. Bacteriology.* 2004; 186:4285–4294.
114. McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu Rev Microbiol.* 2001; 55:77-104.
115. Meleney FI. Hemolytic streptococcus gangrene. *Archives of Surgery.* 1924; 9:317-364.
116. Mendes C, Marin ME, Quinones F, Sifuentes-Osornio J, Siller CC, Castanheira M i sar. Antibacterial resistance of community-acquired respiratory tract pathogens recovered from patients in Latin America: results from the PROTEKT surveillance study (1999-2000). *Braz J Infect Dis.* 2003; 7:44-61.
117. Mert A, Ozaras R, Tabak F, Pekmezci S, Demirkesen C, Ozturk R. Erythema nodosum: an experience of 10 years. *Scand J Infect Dis.* 2004; 36:424–7.
118. Metzgar D. and Zampolli A. The M protein of group A Streptococcus is a key virulence factor and a clinically relevant strain identification marker. *Virulence.* 2011; 2:402-12.
119. Michos AG, Bakoula CG, Braoudaki M, Koutouzi FI, Roma ES, Pangalis A, Nikolopoulou G, Kirikou E. and Syriopoulou VP. Macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes*: prevalence, resistance determinants, and *emm* types. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009; 64:295-299.
120. Mija V, Ranin L, Markovi M, Heeg C, Reinert RR, Opavski N. Distribution of *emm* types among group A streptococcal isolates from Serbia. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16:295-298.

121. Mija V, Opavski N, Markovi M, Gaji I, Vasiljevi Z, Šipeti T, Bajeti M. Trends in macrolide resistance of respiratory tract pathogens in pediatric population in Serbia from 2004 to 2009. *Epidemiology and Infection*. 2014 (in press).
122. Montes M, Orden B, Tamayo E, Alos J.I, Pérez-Trallero E. Characterisation of the main clones of *Streptococcus pyogenes* carrying the *ermA* (subclass TR) gene in Spain. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2006; 28:408–412.
123. Nakae M, Murai T, Kaneko Y, Mitsuhashi S. Drug resistance in *Streptococcus pyogenes* isolated in Japan (1974–1977) *Antimicrob Agents Chemother*. 1977;12:427–428.
124. Nandi S, Ganguly NK, Kumar R, Bakshi DK, Sagar V, Chakraborti A. Genotyping of group A streptococcus by various molecular methods. *Indian J Med Res*. 2008; 127:71-77.
125. Nelson K, Schlievert PM, Selander RK, and Musser JM. Characterization and clonal distribution of four alleles of the *speA* gene encoding pyrogenic exotoxin A (scarlet fever toxin) in *Streptococcus pyogenes*. *J. Exp. Med*. 1991; 174:1271–1274.
126. Nielsen HU, Hammerum AM, Ekelund K, Bang D, Pallesen LV. and Frimodt-Moller N. Tetracycline and macrolide co-resistance in *Streptococcus pyogenes*: co-selection as a reason for increase in macrolide-resistant *S. pyogenes*? *Microb Drug Resist*. 2004; 10:231-238.
127. Nir-Paz R, Block C, Shasha D i sar. Macrolide, lincosamide and tetracycline susceptibility and *emm* characterisation of invasive *Streptococcus pyogenes* isolates in Israel. *Int J Antimicrob Agents*. 2006; 28:313-319.
128. Nir-Paz R, Korenman Z, Ron M, Michael-Gayego A, Cohen-Poradosu R, Valinsky L, Beall B. and Moses AE. *Streptococcus pyogenes emm* and T types within a decade, 1996-2005: implications for epidemiology and future vaccines. *Epidemiol Infect*. 2006; 138:53-60.
129. Oda T, Yamakami K, Omasu F, Suzuki S, Miura S, Sugisaki T, Yoshizawa N. Glomerular plasmin-like activity in relation to nephritis- associated plasmin receptor in acute poststreptococcal glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16:247–254.
130. Okada N, Liszevski MK, Atkinson JP, Caparon M. Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:2489-2493.
131. Olive C, Schulze K, Sun HK, Ebensen T, Horvath A, Toth I. and Guzman CA. Enhanced protection against *Streptococcus pyogenes* infection by intranasal vaccination with a dual antigen component M protein/SfbI lipid core peptide vaccine formulation. *Vaccine*. 2007; 25:1789-1797.

132. Palmieri C, Vecchi M, Littauer P i sar. Clonal spread of macrolide- and tetracycline-resistant (*ermA tetO*) *emm77 Streptococcus pyogenes* isolates in Italy and Norway. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:4229–4230.
133. Pandey M, Sekuloski S. and Batzloff MR. Novel strategies for controlling *Streptococcus pyogenes* infection and associated diseases: from potential peptide vaccines to antibody immunotherapy. *Immunology and cell biology.* 2009; 87:391-399.
134. Pavlovic Lj, Grego E, and Sipetic-Grujicic S. Prevalence of Macrolide Resistance in *Streptococcus pyogenes* Collected in Serbia. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2010; 63 (4):275-276.
135. Pe´rez-Trallero E, Martin Herrero M, Mayon A i sar. Antimicrobial resistance among respiratory pathogens in Spain: latest data and changes over 11 years (1996-1997 to 2006-2007). *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54:2953-2959.
136. Pe´rez-Trallero E, Montes M, Orden B, Tamayo E, Jose´ M. Garcı´a-Arenzana, and Marimo´n JM. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Streptococcus pyogenes* Isolates Displaying the MLSB Phenotype of Macrolide Resistance in Spain, 1999 to 2005. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51:1228–1233.
137. Peterson PK, Schmeling D, Cleary PP, Wilkinson BJ, Kim Y, Quie PG. Inhibition of alternative complement pathway opsonization by group A streptococcal M protein. *J Infect Dis.* 1979; 139(5):575–585.
138. Podbielski A, Melzer B, and Lu¨tticken R. Application of the polymerase chain reaction to study the M protein(-like) gene family in beta hemolytic streptococci. *Med. Microbiol. Immunol.* 1991; 180:213–227.
139. Poon-King R, Bannan J, Viteri A, Cu G, Zabriskie JB: Identification of an extracellular plasmin binding protein from nephritogenic streptococci. *J Exp Med.*1993; 178:759– 763.
140. Porat N, Leibowitz E, Dagan R, Coman G, Sfartz S, Peled N, Trefler R, and Tomasz A.. Molecular typing of *Streptococcus pneumoniae* in northeastern Romania: unique clones of *S. pneumoniae* isolated from children hospitalized for infections and from healthy and human immuno-deficiency virus-infected children in the community. *J. Infect. Dis.* 2000; 181:966–974.
141. Proft T, Moffatt SL, Berkahn CJ, and Fraser JD. Identification and characterization of novel superantigens from *Streptococcus pyogenes*. *J. Exp. Med.* 1999; 189:89–101.
142. Ranin L, Opavski N, uki S, Mija V. Epidemiology of diseases caused by *Streptococcus pyogenes* in Serbia during a nine-year period (1991-1999). 2004; 119:155-159.

143. Reinert RR, Lutticken R, Sutcliffe JA, Tait-Kamradt A, Cil MY, Schorn HM, Bryskier A. and Al-Lahham A. Clonal relatedness of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates in Germany. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 1369-73.
144. Reinert RR, Franken C, Van der Linden M, Lutticken R, Cil M, Al Lahham A. Molecular characterisation of macrolide resistance mechanisms of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolated in Germany, 2002–2003. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2004; 24:43–47.
145. Rice LB. Tn916 family conjugative transposons and dissemination of antimicrobial resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42:1871-1877.
146. Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Beekmann SE, Riahi F, Garcia-de-Lomas J, Ferech M, Goossens H. and Doern GV. Increasing telithromycin resistance among *Streptococcus pyogenes* in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61:603-11.
147. Rivera A i sar. Superantigen gene profile, *emm* type and antibiotic resistance genes among group A streptococcal isolates from Barcelona, Spain. *J. Med. Microbiol.* 2006; 55:1115-1123.
148. Rogers S, Commons R, Danchin MH, Selvaraj G, Kelpie L, Curtis N, Robins-Brown R, Carapetis J. Strain prevalence, rather than innate virulence potential, is the major factor responsible for an increase in serious group A streptococcus infections. *J Infect Dis.* 2007; 195 (11): 1625-1633.
149. Rubio-Lopez V, Valdezate S, Alvarez D, Villalon P, Medina MJ, Salcedo C. and Saez-Nieto JA. Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibilities and resistance mechanisms of *Streptococcus pyogenes* isolates resistant to erythromycin and tetracycline in Spain (1994-2006). *BMC Microbiol.* 2012; 12:215.
150. Sauermann R, Gattringer R, Graninger W, Buxbaum A, Georgopoulos A. Phenotypes of macrolide resistance of group A streptococci isolated from outpatient in Bavaria and susceptibility to 16 antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51:53-57.
151. Schnappinger D, and W. Hillen. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch. Microbiol.* 1996; 165:359–369.
152. Schragger HM, Alberti S, Cywes C, Dougherty GJ. and Wessels MR. Hyaluronic acid capsule modulates M protein-mediated adherence and acts as a ligand for attachment of group A streptococcus to CD44 on human keratinocytes. *Journal of Clinical Investigation.* 1998; 101(8):1708–1716.
153. Schulze K, Medina E, Chhatwal GS. and Guzman CA. Stimulation of long-lasting protection against *Streptococcus pyogenes* after intranasal vaccination with non adjuvanted fibronectin-binding domain of the SfbI protein. *Vaccine.* 2003; 21:1958-1964.

154. Schwartz M. 1996. Historical Streptococci, p. 1-2. In T. Horaud (ed.), Streptococci and the Host.
155. Seppala H, He Q, Osterblad M, and Huovinen P. Typing of group A streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. J. Clin. Microbiol. 1994; 32:1945–1948.
156. Seppala H, Klaukka T, Vuopio-Varkila J, Muotiala A, Helenius H, Lager K, i sar. The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics on erythromycin resistance in group A streptococci in Finland. N Eng J Med. 1997; 337:441–446.
157. Seppälä H, Nissinen A, Järvinen H, Huovinen S, Henriksson T, Herva E, Holm SE, Jahkola M, Katila ML, Klaukka T, Klaukka T, Kontiainen S, Liimatainen O, Oinonen S, Passi-Metsomaa L, and Huovinen P. Resistance to erythromycin in group A streptococci. N Engl J Med. 1992; 30;326(5):292-7.
158. Seppala H, Qiushui He I, Osterblad M, Huovinen P. Typing of Group A Streptococci by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. Journal of clinical microbiology. 1994; 8 (32): 1945-1948.
159. Sherman JM. The streptococci. Bacteriol. Rev. 1937; 1:3–97.
160. Shottmuller H. Die Artunterscheidung der für den menschen Pathogen Streptokokken durch Blutagar. Munch. Med. Wochenschr. 1903; 50:849-853.
161. Shulman S, Tanz R and Gerber M. Streptococcal Pharyngitis, 2000.p. 76-101. In D. Stevens and E. Kaplan (ed.), Streptococcal Infections.
162. Silva FG. 1998. Acute postinfectious glomerulonephritis and glomerulonephritis complicating persistent bacterial infection, p. 389–453. In J. C. Jennette, J. L. Olson, M. M. Schwartz, and F. G. Silva (ed.), Hepinstall's pathology of the kidney, 5th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.
163. Silva-Costa C, Pinto FR, Ramirez M, Melo-Cristino J, study group. Decrease in macrolide resistance and clonal instability among *Streptococcus pyogenes* in Portugal. Clin Microbial Infect. 2008; 14:1152–1159.
164. Silva-Costa C, Ramirez M, Melo-Cristino J. Rapid inversion of the prevalences of macrolide resistance phenotypes paralleled by a diversification of T and *emm* types among *Streptococcus pyogenes* in Portugal. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49:2109–2111.
165. Smeesters PR, McMillan DJ, Sriprakash KS. The streptococcal M protein: a highly versatile molecule. Trends Microbiol.2010; 18:275–282.
166. Stathi A, Papaparaskevas J, Zachariadou L, Pangalis A, Legakis NJ, Tseleni-Kotsovili A. and Tassios PT. Prevalence of *emm* types 1 and 12 from invasive

Streptococcus pyogenes disease in Greece--results of enhanced surveillance. ClinMicrobiol Infect. 2008; 14: 808-12.

167. Stevens DL. Group A beta-hemolytic streptococci: virulence factors, pathogenesis, and spectrum of clinical infections. In: Stevens DL and Kaplan EL (ed.), Streptococcal infections: clinical aspects, microbiology, and molecular pathogenesis, Oxford University Press, 2000. p. 19-36.

168. Stevens DL. Invasive group A streptococcus infections. Clin Infect Dis. 1992; 14:2-13.

169. Stevens DL. 2000. Life-threatening streptococcal infections: scarlet fever, necrotizing fasciitis, myositis, bacteremia, and streptococcal toxic shock syndrome, p. 163-179. In D. L. Stevens and E. L. Kaplan (ed.), Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis. Oxford University Press, New York.

170. Steer AC, Law I, Matatolu L, Beall BW, Carapetis JR. Global *emm* type distribution of group A streptococci: systematic review and implications for vaccine development. Lancet Infect Dis. 2009; 9:611-616.

171. Stollerman GH. 1975. Rheumatic fever and streptococcal infection, p. 1–303. In G. H. Stollerman (ed.), Clinical cardiology monographs. Grune and Stratton, New York, N.Y.

172. Stollerman GH, Dale JB. The importance of the group a streptococcus capsule in the pathogenesis of human infections: a historical perspective. Clin Infect Dis. 2008; 46:1038-45.

173. Sun H, Ringdahl U, Homeister JW, Fay WP, Engleberg NC, Yang AY, Rozek LS, Wang X, Sjobring U, and Ginsburg D. Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group A streptococcal infection. Science. 2004; 305:1283-1286.

174. Szczypa K, Sadowy E, Izdebski R, Hryniewicz W. A rapid increase in macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* isolated in Poland during 1996–2002. J. Antimicrob. Chemother. 2004; 54:828–831.

175. Talay SR, Zock A, Rohde M, Molinari G, Oggioni M, Pozzi G, Guzman CA, and Chhatwal GS. Co-operative binding of human fibronectin to SfbI protein triggers streptococcal invasion into respiratory epithelial cells. Cell Microbiol. 2000; 2:521–535.

176. Talay SR, Valentin-Weigand P, Jerlström PG, Timmis KN, Chhatwal GS. Fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*: sequence of the binding domain involved in adherence of streptococci to epithelial cells. Infect Immun. 1992; 60(9):3837-44.

177. Tylewska S, Hjertén S, and Wadström T. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on the adhesion of *Streptococcus pyogenes* to pharyngeal epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 1981; 20(5):563–566.
178. Valentin-Weigand P, Grulich-Henn J, Chhatwal GS, Muller-Berghaus G, Blobel H, and Preissner KT. Mediation of adherence of streptococci to human endothelial cells by complement S protein (vitronectin). *Infect. Immun.* 1988; 56:2851–2855.
179. Van Heirstraeten L, Coenen S, Lammens C, Hens N, Goossens H. and Malhotra-Kumar S. Antimicrobial drug use and macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*, Belgium. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18: 1515-8.
180. Varaldo PE, Montanari MP. and Giovanetti E. Genetic elements responsible for erythromycin resistance in streptococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53:343-53.
181. Veasy LG, Tani LY, Daly JA, Korgenski K, Miner L, Bale J, Kaplan EL, Musser JM, and Hill HR. Temporal association of the appearance of mucoid strains of *Streptococcus pyogenes* with a continuing high incidence of rheumatic fever in Utah. *Pediatrics.* 2004; 113:168–172.
182. Vilhelmsson SE, Tomasz A, and Kristinsson KG. Molecular evolution in a multidrug-resistant lineage of *Streptococcus pneumoniae*: emergence of strains belonging to the serotype 6B Icelandic clone that lost antibiotic resistance traits. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38:1375–1381.
183. Visai L, Bozzini S, Raucci G, Toniolo A, and Speziale P. Isolation and characterization of a novel collagen-binding protein from *Streptococcus pyogenes* strain 6414. *J. Biol. Chem.* 1995; 270:347–353.
184. Weiss K, De Azavedo J, Restieri C. et al. Phenotypic and genotypic characterization of macrolide-resistant group A streptococcus strains in the province of Quebec, Canada. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2001; 47:345–348.
185. Weber P, Filipecki J, Bingen E, Fitoussi F, Goldfarb G, Chauvin JP, Reitz C. and Portier H. Genetic and phenotypic characterization of macrolide resistance in group A streptococci isolated from adults with pharyngo-tonsillitis in France. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48:291–294.
186. Wilson AT. The relative importance of the capsule and the M-antigen in determining colony form of group A streptococci. *Journal of Experimental Medicine,* 1959; 109(3):257–270.
187. Villasenor-Sierra A, Katahira E, Jaramillo-Valdivia AN, De los Angeles Barajas-Garcia M, Bryant A, Morfin-Otero R, Marquez-Diaz F, Tinoco HC, Sanchez-Corona J, Stevens DL. Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains isolated from invasive and non-invasive infectious from Mexico and the USA during 1999-2010. *Inf J Infect Dis.* 2012; 16(3):178-181.

188. York MK, Gibbs L, Perdreau-Remington F, and Brooks GF. Characterization of antimicrobial resistance in *Streptococcus pyogenes* isolates from the San Francisco Bay Area of Northern California. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37:1727-1731.
189. Zampaloni C, Cappelletti P, Prenna M, Vitali LA, Rips S. *emm* gene distribution among erythromycin-resistant and -susceptible Italian isolates of *Streptococcus pyogenes*. 2003; 41:1307-1310.



Skra enice

8. Skra enice

APC	– antigen-prezentuju e elije
APGN	– akutni post-streptokokni glomerulonefritis
apoAI	– apolipoprotein AI
ARG	– akutna reumatska groznica
ASO test	– antistreptolizin O test
ATCC	– ameri ka kolekcija kultura sojeva (engl. American type culture collection)
bp	– bazni parovi
BHS	– beta hemoliti ki streptokok
CDC	– Centri za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. Centers for disease control and prevention)
CI	– interval poverenja (engl. confidence interval)
DNK	– dezoksiribunukleinska kiselina
EUCAST	– evropsko udruženje za testiranje antimikrobne osetljivosti (engl. the european committee on antimicrobial susceptibility testing)
FBP54	– fibronektin vezuju i protein 54 (engl. fibronectin binding protein 54)
GAS	– grupa A streptokoka (engl. group A streptococci)
IFN- γ	– interferon gama
IL	– interleukin
KKA	– Kolumbija krvni agar
McF	– McFarland
MHC	– glavni kompleks histokompatibilnosti (engl. major histocompatibility complex)
MHKA	– Müller-Hinton krvni agar
MIK	– minimalna inhibitorna koncentracija
MLS	– makrolidi, linkozamidi i streptogramini
MLST	– tipizacija na osnovu sekvenci visoko konzerviranih lokusa (engl. multilocus sequence typing)
μ m	– mikrometar
MRGAS	– grupa A streptokoka rezistentna na makrolidne antibiotike (engl. macrolide resistant group A streptococci)
NAPlr	– plazmin receptor udružen sa nefritisom (engl. nephritis associated plasmin receptor)
NF	– nekrotiziraju i fascitis

PBS	– fosforilisani fiziološki rastvor (engl. phosphated buffer saline)
PCR	– reakcija lan anog umnožavanja (engl. polimerase chain reaction)
PFGE	– elektroforeza u pulsiraju em elektri nom polju (engl. pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)
PYR	– piroolidonil-arilamidaza (engl. pyrrolidonyl-arylamidase)
RAPD	– nasumi no umnožavanje polimorfne DNK (engl. randomly amplified of polymorphic DNA, RAPD)
rpm	– broj obrtaja u minuti (engl. rotation per minute)
Sfbi	– streptokokni fibronektin vezuju i protein I (engl. streptococcal fibronectin binding protein I)
SLO	– streptolizin O
SLS	– streptolizin S
SMEZ	– streptokokni mitogeni egzoprotein Z
SOF	– factor zamu enja (engl. serum opacity factor)
Spe	– streptokokni pirogeni egzotoksin
SSA	– streptokokni superantigen (engl. streptococcal superantigen)
ST	– tip sekvence (engl. sequence type)
STŠS	– streptokokni toksini šok sindrom (engl. streptococcal toxic shock syndrome)
T _A	– temperatura na kojoj se vezuju prajmeri za DNK(engl. annealing temperature)
TAE pufer	– rastvor pufera koji sadrži Tris baze, sir etnu kiselinu i EDTA
Taq polimeraza	– termostabilna DNK polimeraza izolovana iz termofilne bakterije <i>Thermus aquaticus</i>
TCR	– T elijski receptor
T _m	– temperatura topljenja (engl. melting temperature)
T _n	– transpozon
TNF	– faktor nekroze tmora (engl. tumor necrosis factor)
TRGAS	– grupa A streptokoka rezistentna na tetracikline (engl. tetracycline resistant group A streptococci)
V	– volt

BIOGRAFIJA

Dr Ina Gaji je rođena 07.05.1980. godine u Beogradu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1999. godine, a diplomirala je 2006. godine sa srednjom ocenom 9,29. Dr Gaji je završila obavezni lekarski staž u KC Srbije.

Od 2009. godine radi u Nacionalnoj laboratoriji za streptokok, Institutu za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu, gde pored konvencionalnih mikrobioloških tehnika primenjuje i metode molekularne biologije. Iste godine je upisala doktorske studije iz oblasti Molekularna medicina na Medicinskom fakultetu, pod mentorstvom prof. dr Nataše Opavski. Od januara 2011. godine radi kao istraživač-saradnik na projektu finansiranom od strane Ministarstva prosvete i nauke br. 175039 - Bakterije rezistentne na antibiotike u Srbiji: fenotipska i genotipska karakterizacija.

Od novembra 2011. godine, uključuje se u nastavnu delatnost Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, kao saradnik u nastavi u okviru predmeta Mikrobiologija i Klinička mikrobiologija. U isto zvanje ponovo je izabrana u novembru 2012. godine. Specijalističke studije iz Medicinske mikrobiologije je upisala 2012. godine. Iste godine je boravila u referentnoj laboratoriji za pneumokok u Ljubljani, u Institutu za javno zdravlje Slovenije, radi obuke za serotipizaciju pneumokoka. U zvanje asistenta je imenovana 2013. godine. Uključena je u redovan, konsultativni rad sa pacijentima u ambulanti Instituta, u domenu bakterijskih infekcija.

Dr Gaji je bila predavačica na stručnom sastanku u organizaciji SLD, pod nazivom „Fenotipovi makrolid-rezistentnih invazivnih sojeva *Streptococcus pneumoniae*“, i na kontinuiranoj medicinskoj edukaciji „*Streptococcus pneumoniae* – mikrobiološka dijagnostika i prevencija bolesti“.

Dr Ina Gaji je autor i koautor pet originalnih radova objavljenih *in extenso* u asopisima sa JCR liste i brojnih radova koji su štampani u formi izvoda u zbornicima međunarodnih i nacionalnih naučnih skupova.

Izjava o autorstvu

Potpisana Ina V. Gajić

broj upisa _____

Izjavljujem

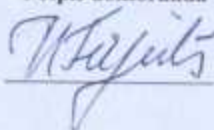
da je doktorska disertacija pod naslovom

„FENOTIPSKA I GENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA I KLONSKA
POVEZANOST FARINGEALNIH IZOLATA STREPTOKOKA GRUPE A
REZISTENTNIH NA MAKROLIDE U SRBIJI “

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 24.03.2014.

Potpis doktoranda



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Ina V. Gajić

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada: "Fenotipska i genotipska karakterizacija i klonaska povezanost faringealnih izolata streptokoka grupe A rezistentnih na makrolide u Srbiji"

Mentor: prof. dr Nataša Opavski

Potpisana Ina V. Gajić

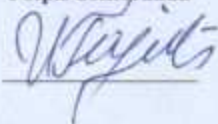
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 24.03.2014.

Potpis doktoranda



Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„ FENOTIPSKA I GENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA I KLONSKA POVEZANOST FARINGEALNIH IZOLATA STREPTOKOKA GRUPE A REZISTENTNIH NA MAKROLIDE U SRBIJI“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

U Beogradu, 24.03.2014.

Potpis doktoranda

