

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Dragana D. Božić

„Antimikrobna aktivnost halkona i
in vitro uticaj na fiziološko - biohemijske
karakteristike i ekspresiju faktora virulencije
meticilin - rezistentnih sojeva
Staphylococcus aureus“

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Dragana D. Božić

„Antimicrobial activity of chalcones and
in vitro effect on physiological and
biochemical characteristics and expression
of virulence factors of methicillin - resistant
Staphylococcus aureus“

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Mentor:

Dr Marina Milenković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Članovi komisije:

Dr Lazar Ranin, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

Dr Ivana Ćirković, docent
Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Na moje veliko zadovoljstvo, ova doktorska disertacija je nastala kao rezultat saradnje između Katedre za mikrobiologiju i imunologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, uz veliku i iskrenu podršku moje porodice.

Najveću zahvalnost na pruženoj podršci i ukazanom poverenju dugujem mentoru prof. dr Marini Milenković, koja je osmislila koncept ove doktorske disertacije, omogućila izradu svih eksperimenata koje sam zamislila i dala mi potpunu slobodu u radu. Hvala Vam što ste sa mnom delili svoje znanje, iskustvo i dragoceno vreme prilikom izrade doktorske disertacije i pisanja radova.

Deo rezultata prikazan u ovom doktoratu je dobijen u okviru projekta Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije pod nazivom „Bakterije rezistentne na antibiotike u Srbiji: fenotipska i genotipska karakterizacija“ (broj projekta 175039, rukovodilac prof. dr Lazar Ranin). Zahvaljujem se prof. dr Lazaru Raninu, koji je imao dovoljno poverenja u kvalitet ovog doktorata kada me je primio za saradnika na projektu, na velikoj predusretljivosti u svim fazama prijave i izrade doktorata, pregledu i oceni ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost osećam prema doc. dr Ivani Ćirković, ne samo na izuzetnoj profesionalnoj saradnji, pomoći i podršci, već i na iskrenom prijateljstvu koje se između nas razvilo tokom prethodnih godina.

Zahvaljujem se doc. dr Branki Ivković koja je sintetisala jedinjenja ispitana u ovom doktoratu i prof. dr Jeleni Kotur-Stevuljević i zaposlenima na Katedri za medicinsku biohemiju koji su mi omogućili korišćenje aparature prilikom eksperimentalnih istraživanja.

Naročito se zahvaljujem profesorima sa Katedre za mikrobiologiju i imunologiju Zorici, Neveni i Jeleni, mojim dragim drugarima Bilji, Brankici i Ivanu i ostalima sa Katedre na podršci i razumevanju.

Mojoj porodici dugujem najveću zahvalnost za sve što sam postigla u životu, mojoj majci Milici koja je najbolja majka na svetu, mom bratu Vuku koji mi je uvek bio i ostao najveća podrška, mom nesvakidašnje dobrom i pažljivom suprugu Aleksandru i mom malom sinu Svetozaru koji je NAJVREDNIJE što imam u životu!

Antimikrobna aktivnost halkona i *in vitro* uticaj na fiziološko-biohemijske karakteristike i ekspresiju faktora virulencije meticilin-rezistentnih sojeva *Staphylococcus aureus*

REZIME

Uvod: Meticilin-rezistentan *S. aureus* (MRSA) je jedan od glavnih izazivača intrahospitalnih infekcija sa čestim letalnim ishodom i infekcija kod mladih i zdravih ljudi koji dolaze iz vanbolničke sredine. Brz razvoj rezistencije stafilokoka na nove antimikrobne agense i interhumano širenje rezistentnih sojeva su glavni terapijski problemi današnjice. Iz tog razloga je neophodno razviti nove agense koji bi imali primenu u prevenciji ili lečenju stafilokoknih infekcija. Halkoni spadaju u grupu flavonoida, jedinjenja koja se mogu izolovati iz prirodnih izvora kao što su biljke, voće i povrće ili se dobiti metodama klasične i kombinatorne sinteze. Hemijska struktura halkona se sastoji od dva aril prstena koja su povezana α,β -nezasićenim ketonom. Dosadašnja istraživanja su pokazala da različiti halkoni ispoljavaju širok spektar bioloških aktivnosti, kao što su antibakterijska, antivirusna, antigljivična, antiangiogena, antitumorska, antiproliferativna i antiinflamatorna aktivnost.

Ciljevi istraživanja: Osnovni cilj istraživanja je bilo ispitivanje osetljivosti genotipski i fenotipski heterogenih MRSA sojeva na tri sintetisana halkona: Bis-(2-hydroxy-phenyl)-propenona (u daljem tekstu O-OH), 3-(3-Hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenona (u daljem tekstu M-OH) i 3-(4-Hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenona (u daljem tekstu P-OH) i ispitivanje *in vitro* uticaja halkona na biohemijsko-fiziološke osobine MRSA sojeva, ekspresiju faktora virulencije (produkciju glikokaliksa, produkciju biofilma i vezivanje za humani fibronektin) i produkciju stafilokoknih hemolizina. Takođe je izvršeno i ispitivanje efekta kombinovane primene halkona i antibiotika sa različitim mehanizmima delovanja na rast izolovanih MRSA sojeva.

Materijal i metode: Izolovani sojevi *S. aureus* su identifikovani kao MRSA pomoću konvencionalnih metoda, komercijalnim automatizovanim sistemom (VITEK 2 ID karticama) i molekularnim metodama (PCR metod - detekcija *nuc* i *mecA* gena). Genotipizacija izolovanih MRSA sojeva je izvršena različitim PCR protokolima na

osnovu čega su MRSA sojevi klasifikovani u različite SCC*mec* tipove, *agr* tipove, *spa* tipove i grupisani u *spa* klonske komplekse. PCR metodom je određeno i prisustvo gena koji kodira sintezu *Panton-Valentin leukocidina* (PVL). Analiza klonske povezanosti i klonske diseminacije izolovanih sojeva MRSA je izvršena PFGE metodom. Osetljivost MRSA sojeva na antibiotike i hemioterapeutike sa različitim mehanizmom dejstva je određena automatizovanim sistemom pomoću VITEK 2 kartica AST-P580 (na 19 antibiotika) i dopunjena agar difuzionim metodom antibiograma (na 17 antibiotika) prema preporukama CLSI (eng. Clinical and Laboratory Standard Institute).

Ispitivanje osetljivosti MRSA sojeva na tri sintetisana halkona je izvršeno bujon-mikrodilucionom metodom prema preporukama CLSI. MRSA sojevi su kultivisani tokom 24/48h sa različitim subinhibitornim koncentracijama testiranih jedinjenja nakon čega je ispitan *in vitro* uticaj halkona na biohemijsko-fiziološke osobine MRSA sojeva, ekspresiju faktora virulencije (produkciju glikokaliksa, produkciju biofilma i vezivanje za humani fibronektin) i produkciju stafilokoknih hemolizina. Ispitivanje *in vitro* uticaja halkona na biohemijsko-fiziološke osobine MRSA sojeva je izvršeno komercijalnim automatizovanim sistemom (VITEK 2 ID) na osnovu detekcije 43 biohemijske osobine. Uticaj halkona na ekspresiju faktora virulencije i produkciju stafilokoknih hemolizina je ispitan prema prethodno opisanim protokolima. Efekat kombinovane primene halkona i antibiotika sa različitim mehanizmima delovanja na rast izolovanih MRSA sojeva je ispitan tzv. "checkerboard" metodom.

Rezultati: Svi testirani sojevi su VITEK 2ID sistemom identifikovani kao *S. aureus*, sa nivoom pouzdanosti između 98.57-99.00%. Kod svih sojeva je detektovano prisustvo *nuc* i *mecA* gena. MRSA sojevi su klasifikovani u SCC*mec* tipove I-V, *agr* tipove 1-3, 13 *spa* tipova i 6 *spa* klonskih kompleksa, od kojih su dominantni klonski kompleks bili CC5 (43.3%) i CC8 (30%). PVL gen je detektovan kod 10% sojeva. PFGE metodom sojevi su klasifikovani u 9 različitih PFGE pulsotipova (A, B, C, D, E, F, G, H i M). Dominantan PFGE pulsotip je bio A.

Ispitivanjem osetljivosti na antibiotike i hemioterapeutike je utvrđeno da 86.7% sojeva ispoljava multirezistentan fenotip (rezistenciju na dve i više grupa antibiotika osim β -laktamskih antibiotika), od čega je 73.3% sojeva pripadalo SCC*mec* tipu I-III (tzv. bolničkim sojevima MRSA) a 13.3% SCC*mec* tipu IV-V (tzv. vanbolničkim sojevima MRSA).

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti O-OH, M-OH i P-OH halkona su pokazali da sva tri jedinjenja imaju značajan antimikrobni efekat prema kliničkim izolatima MRSA, sa vrednostima minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) u opsegu 25.0-200.0 µg/ml i minimalnih baktericidnih koncentracija u opsegu 50.0-400.0 µg/ml. Najizraženiji inhibitorni efekat je ispoljio O-OH halkon, zatim M-OH halkon a najslabiji P-OH halkon.

Kultivacija MRSA sa subinhibitornim koncentracijama halkona je dovela do gubitka aktivnosti enzima beta-galaktozidaze (55% sojeva), alfa-glukozidaze (30% sojeva) i ureaze (15% sojeva) i gubitka sposobnosti razgradnje D-galaktoze (35% sojeva) i laktoze (65% sojeva).

Produkcija glikokaliksa kod MRSA sojeva je određena primenom Kongo-crveno agar metoda i Christensenovog metoda. Rezultati dobijeni ovim metodama su pokazali da 67.7%-80.6% sojeva produkuje glikokaliks, a 19.4%-32.3% sojeva ima nedefinisano produkciju glikokaliksa. Nakon kultivacije sa subinhibitornim koncentracijama halkona došlo je do smanjenja produkcije glikokaliksa. Najizraženiji inhibitorni efekat na produkciju glikokaliksa je detektovan nakon kultivacije MRSA sa O-OH halkonom (80.6% sojeva) zatim sa P-OH halkonom (71.0%) i M-OH halkonom (64.5%).

Rezultati ispitivanja produkcije biofilma su pokazali da 48.4% sojeva ispoljava izraženu sposobnost produkcije biofilma, 48.4% sojeva umereno produkuje biofilm a 3.2% sojeva slabo produkuje biofilm. Nakon kultivacije sa subinhibitornim koncentracijama ispitanih jedinjenja došlo je do dozno zavisne inhibicije produkcije biofilma. Najizraženiji inhibitorni efekat je ispoljio O-OH, zatim M-OH i P-OH halkon.

Subinhibitorne koncentracije halkona su značajno smanjile vezivanje MRSA sojeva za humani fibronektin. Najizraženiji inhibitorni efekat je imao P-OH halkon (87.0% sojeva; $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) zatim M-OH (77.4% sojeva; $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) a najslabiji O-OH halkon (71.0% sojeva; $p < 0.05$, $p < 0.01$). Nakon produžene inkubacije sa halkonima uočeno je statistički značajno smanjenje adherencije za humani fibronektin kod svih sojeva ($p < 0.05$, $p < 0.01$).

Da bi se ispitaio uticaj halkona na produkciju α -hemolizina MRSA sojevi su kultivisani u prisustvu MIK i četiri subinhibitorne koncentracije halkona do kasne posteksponencijalne faze rasta (44-48h). Najizraženiji inhibitorni efekat je ispoljio O-OH, zatim M-OH i P-OH halkon. Inhibicija produkcije α -hemolizina u supernatantima

kultura MRSA sa O-OH halkonom je uočena pri koncentracijama halkona u opsegu 1/2-1/16 MIK ($p < 0.01$, $p < 0.001$), sa M-OH halkonom u opsegu 1/2-1/8 MIK ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) i sa P-OH halkonom u opsegu 1/2-1/4 MIK ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$).

Efekat kombinovane primene halkona i antibiotika na rast izolovanih MRSA sojeva je ispitan sa antibioticima sa različitim mehanizmom delovanja: β -laktamskim antibioticima (cefotaksim i ceftriakson), fluorohinolonima (ciprofloksacin), aminoglikozidima (gentamicin) i antimikrobnim lekovima koji inhibiraju sintezu folata (trimetoprim/sulfametoksazol). Ukupan efekat kombinacije halkona sa antibioticima se kretao između sinergizma i indiferentnog efekta. Najznačajniji sinergistički efekat je zapažen u kombinaciji sva tri halkona sa gentamicinom, ciprofloksacinom i trimetoprim/sulfametoksazolom.

Zaključak: Rezultati ove studije ukazuju da Bis-(2-hydroxy-phenyl)-propenon, 3-(3-Hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenon i 3-(4-Hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenon *in vitro* inhibišu rast i razmnožavanje genotipski i fenotipski heterogenih, multirezistentnih sojeva MRSA, deluju na metaboličke procese vezane za metabolizam ugljenih hidrata, smanjuju adherenciju sojeva za plastične polimerne površine i komponente ekstracelularnog matriksa, smanjuju produkciju α -hemolizina i stupaju u sinergističke interakcije sa antibioticima iz različitih klasa. Najizraženiji inhibični efekat na rast MRSA sojeva, produkciju glikokaliksa, biofilma i α -hemolizina u *in vitro* uslovima je imao O-OH halkon, dok je najizraženiji inhibični efekat na vezivanje MRSA za humani fibronektin imao P-OH halkon.

Ključne reči: halkoni, MRSA, biofilm, glikokaliks, α -hemolizin

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska Mikrobiologija

UDK broj: 57.085 : [615.281 : 579.845] (043.3)
615.281 : [591.046 : 547.631.6] (043.3)

Antimicrobial activity of chalcones and *in vitro* effect on physiological and biochemical characteristics and expression of virulence factors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Introduction: *Staphylococcus aureus* is potentially pathogenic bacterium that causes a broad spectrum of diseases, ranging from minor infections of the skin and soft tissue in the community, to severe nosocomial infections like endocarditis, bacteremia and sepsis. Multiresistance of methicillin-resistant *S.aureus* (MRSA) is one of the most serious therapeutical problems nowadays, and requires urgent development of new antibacterial compounds. Chalcones belong to a group of naturally occurring flavonoids with chemical structure made of two aryl rings linked by a α,β -unsaturated ketone. Although these compounds are usually isolated from various plant species, they can also be obtained by the methods of classical and combinatorial synthesis. Chalcones are compounds with potent biological activities, amongst which are antibacterial, antiviral, antifungal, antiproliferative and antiinflammatory.

The aim of the study: The goal of this study was to evaluate the antibacterial effect of three newly-synthesized chalcones: 1,3- Bis-(2-hydroxy-phenyl)-propenone (further referred as O-OH), 3-(3-hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenone (further referred as M-OH) and 3-(4-hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenone (further referred as P-OH) against genetically diverse clinical isolates of MRSA, and the effect on physiological and biochemical characteristics and expression of virulence factors (production of glycocalyx, biofilm and adherence to human fibronectin) and production of α -hemolysin of these bacteria. One of the aims of this study was also to investigate the synergism of chalcones with various β -lactam and non- β -lactam antibiotics.

Methods:

Clinical isolates of *S. aureus* were identified as MRSA with classical methods, commercial automated microbiological identification system (VITEK 2 ID test cards) and molecular methods (PCR method for detection of *nuc* and *mecA* gene). Genotyping of MRSA was performed with adequate PCR protocols for the detection of SCC*mec* type, *agr* type, *Panton-Valentin leucocidin* (PVL) gene and *spa* type. Different *spa*

types were clustered into *spa* clonal complexes (CC). Generic subtyping of bacteria was determined with PFGE typing. Antibiotic resistance profile of MRSA strains was determined by VITEK 2 test card AST-P580 and further supplemented with disc diffusion test according to Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) guidelines. Antibacterial activity of investigated chalcones was determined with broth-microdilution test according to CLSI guidelines. To evaluate the *in vitro* effect of chalcones on physiological and biochemical characteristics and expression of virulence factors (production of glycocalyx, biofilm and adherence to human fibronectin) and production of α -hemolysin, MRSA strains were cultivated in the presence of various subinhibitory concentrations of chalcones. The effect of chalcones on biochemical properties of MRSA was evaluated with commercial automated system (VITEK 2 ID test cards). The effect of chalcones on the production of glycocalyx, biofilm, adherence to human fibronectin and α -hemolysin production was determined by previously described protocols. The synergism with β -lactams (cefotaxime and ceftriaxone) and non- β -lactam antibiotics (trimethoprim/sulfamethoxazole, ciprofloxacin and gentamicin) was investigated by the checkerboard method.

Results:

All isolated strains were identified as *S. aureus*, with 98.57-99.00% level of confidence. Identification of the isolates and methicillin resistance were determined by VITEK 2 test cards GP and AST-P580 and confirmed by PCR for *nuc* and *mecA* genes. MRSA strains were classified into SCC*mec* type I-V, *agr* type 1-3, 13 *spa* types and 6 *spa* clonal complexes. The most frequent clonal complexes were CC5 (43.3%) and CC8 (30%). PVL gene was detected in 10% of the strains. MRSA strains were classified into 9 different PFGE subtypes (A, B, C, D, E, F, G, H i M), with dominant subtype A. Most of the strains (86.7%) expressed multiresistant phenotype, amongst which 73.3% were SCC*mec* type I-III (i.e. hospital-acquired MRSA) and 13.3% SCC*mec* type IV-V (i.e. community-acquired MRSA).

All tested compounds exerted significant antimicrobial activity against MRSA strains, with minimal inhibitory concentrations (MIC) in the range of 25.0-200.0 $\mu\text{g/ml}$ and minimal bactericidal concentrations in the range of 50.0-400.0 $\mu\text{g/ml}$.

After cultivation of MRSA strains in the presence of subinhibitory concentrations of the tested chalcones, significant alterations in metabolic activity of the bacteria were

detected for the following biochemical features: loss of the enzyme activity - β -galactosidase (55% of the strains), α -glucosidase (30% of the strains) and urease (15% of the strains) and loss of substrate degradation - D-galactose (35% of the strains) and lactose (65% of the strains).

Glycocalyx production of MRSA strains was investigated with Congo-red agar method and Christensens method. Most of the strains (67.7%-80.6%) produced glycocalyx and 19.4%-32.3% of the strains showed indeterminate production of glycocalyx. After precultivation in the presence of chalcones, all three tested compounds exerted significant inhibitory effect on the slime production detected by both methods. O-OH chalcone was the most effective chalcone since 80.6% of the strains reduced the production of glycocalyx, following P-OH (71.0%) and M-OH (64.5%) chalcone respectively.

All tested MRSA strains produced biofilm as following: 3.2% of the strains showed low biofilm production, 48.4% of the strains were moderate biofilm producers and 48.4% of the strains were strong biofilm producers. Inhibition of biofilm production after cultivation of MRSA strains in the presence of subinhibitory concentrations of chalcones was dose dependent, with most of the strains showing no production or low biofilm production at highest concentration of the chalcones applied. The most significant suppression of the biofilm production exhibited O-OH chalcone, following M-OH and P-OH chalcone, respectively.

Adherence of MRSA strains to human fibronectin was significantly decreased after cultivation with subinhibitory concentrations of tested compounds. Most significant inhibition was observed in the cultures with P-OH chalcone (87.0% of the strains; $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$), following M-OH (77.4% of the strains; $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) and O-OH chalcone (71.0% of the strains; $p < 0.05$, $p < 0.01$). Prolonged incubation of bacteria with chalcones significantly reduced fibronectin-binding ability of the strains that were primary resistant to the effect of chalcones during the 24h incubation ($p < 0.05$, $p < 0.01$).

The effect of chalcones on production of α -hemolysin was tested after cultivation of MRSA strains in the presence of MIC and four subinhibitory concentrations of chalcones until the late postexponential growth phase (44-48h). The most significant dose-dependent inhibition of rabbit erythrocyte hemolysis was observed in MRSA

supernatants cultivated with O-OH chalcone, following M-OH and P-OH chalcone, respectively. Inhibition of α -hemolysin production was observed in the supernatants of cultures of MRSA strains cultivated in the presence of O-OH chalcone in the range of 1/2-1/16 MIC ($p < 0.01$, $p < 0.001$), M-OH chalcone in the range of 1/2-1/8 MIC ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) and P-OH chalcone in the range of 1/2-1/4 MIC ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$).

The checkerboard method was performed with antibiotics that represent different groups of antimicrobial agents: β -lactam antibiotics cephalosporins (cefotaxime, ceftriaxone) and non β -lactam antibiotics fluoroquinolone (ciprofloxacin), aminoglycoside (gentamicin) and folate synthesis inhibitor (trimethoprim/sulfamethoxazole). Overall effect of antibiotic-chalcone combination varied from synergistic to indifferent. Most significant synergism was observed in the combinations of all three tested compounds with gentamicin, ciprofloxacin and trimethoprim/sulfamethoxazole.

Conclusion:

Results obtained in this study suggest that Bis-(2-hydroxy-phenyl)-propenone, 3-(3-Hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenone and 3-(4-Hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenone *in vitro* exhibit strong inhibitory effect against genetically diverse clinical isolates of MRSA, alter metabolic pathways associated with carbohydrate metabolism, inhibit adherence of bacteria to plastic polymer surfaces as well as to the extracellular matrix proteins, inhibit α -hemolysin production and evince synergistic interactions with different classes of antibiotics. Most significant *in vitro* inhibitory effect against MRSA strains, glycocalyx, biofilm and α -hemolysin production exerted O-OH chalcone, and most significant inhibition of adherence to human fibronectin exerted P-OH chalcone.

Key words: chalcones, MRSA, biofilms, glycocalyx, α -hemolysin

Scientific field: Pharmacy

Narrow scientific field: Pharmaceutical Microbiology

UDK N^o: 57.085 : [615.281 : 579.845] (043.3)
615.281 : [591.046 : 547.631.6] (043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Faktori virulencije <i>S. aureus</i>	3
1.1.1. α -hemolizin.....	3
1.1.2. β -hemolizin (sfingomijelinaza C).....	4
1.1.3. γ -hemolizin i Panton-Valentin leukocidin (PVL).....	4
1.1.4. δ -hemolizin i PSM (eng. phenol-soluble modulins).....	5
1.1.5. Proteinski toksini sa ulogom superantigena	5
1.1.6. Eksfolijativni toksini A-I.....	6
1.1.7. Biofilm.....	8
1.1.8. Genska regulacija ekspresije faktora virulencije i formiranja biofilma	9
1.2. Patogenost <i>S. aureus</i>	11
1.2.1. Uloga biofilma u patogenezi osteomijelitisa	12
1.2.2. Formiranje biofilma na implantiranim medicinskim uređajima i pomagalima	13
1.2.3. Endokarditis.....	13
1.2.4. Infekcije rana	13
1.2.5. Infekcije nosa, oka i usta	14
1.2.6. Infekcije udružene sa mešovitom florom mikroorganizama	14
1.3. Rezistencija <i>S. aureus</i> na antibiotike i hemioterapeutike	15
1.3.1. Stafilokokna hromozomska kasetna <i>mec-SCCmec</i>	16
1.3.2. <i>mec</i> genski kompleks.....	17
1.3.3. <i>ccr</i> genski kompleks	18
1.4. Klasična identifikacija i molekularna tipizacija MRSA sojeva.....	19
1.4.1. Identifikacija <i>S. aureus</i>	19
1.4.2. Detekcija rezistencije na meticilin.....	21
1.4.3. Molekularna tipizacija MRSA sojeva.....	22
1.4.4. Molekularna epidemiologija MRSA sojeva	24
1.5. Terapija infekcija izazvanih MRSA sojevima.....	25
1.5.1. Vankomicin i teikoplanin	26
1.5.2. Trimetoprim-sufametoksazol.....	26
1.5.3. Hloramfenikol.....	27
1.5.4. Tetraciklini	27
1.5.5. Streptogramini	27
1.5.6. Kombinovana antibiotska terapija u lečenju infekcija izazvanih MRSA sojevima.....	28
1.5.7. Antibiotici novije generacije koji se koriste u terapiji infekcija izazvanih MRSA sojevima	28
1.6. Antimikrobna aktivnost halkona	31
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	33
3. MATERIJAL I METODE	36
3.1. Poreklo i izolacija MRSA sojeva	37

3.2. Identifikacija MRSA sojeva	37
3.2.1. Identifikacija sojeva konvencionalnim metodama	38
3.2.2. Identifikacija sojeva komercijalnim automatizovanim sistemom	38
3.2.3. Identifikacija sojeva molekularnim metodama.....	40
3.3. Genotipizacija izolovanih MRSA sojeva	40
3.3.1. PFGE tipizacija.....	40
3.3.2. Određivanje SCC <i>mec</i> tipa	41
3.3.3. Određivanje <i>agr</i> tipa.....	41
3.3.4. Određivanje <i>spa</i> tipa.....	42
3.3.5. Detekcija gena koji kodiraju sintezu <i>Panton-Valentin leukocidina</i>	42
3.4. Ispitivanje osetljivosti MRSA na antibiotike i hemioterapeutike.....	42
3.4.1. Ispitivanje osetljivosti na antibiotike agar difuzionim metodom antibiograma	42
3.4.2. Ispitivanje osetljivosti na antibiotike automatizovanim sistemom.....	43
3.5. Halkoni	45
3.5.1. Ispitivanje osetljivosti MRSA sojeva na halkone.....	47
3.5.2. Ispitivanje uticaja halkona na biohemijske osobine MRSA sojeva i osetljivost na antibiotike	48
3.5.3. Ispitivanje uticaja halkona na ekspresiju faktora virulencije MRSA sojeva.....	48
3.5.3.1. Ispitivanje uticaja halkona na produkciju glikokaliksa	48
3.5.3.2. Ispitivanje uticaja halkona na produkciju biofilma	50
3.5.3.3. Ispitivanje uticaja halkona na adherenciju MRSA za humani fibronektin....	51
3.5.3.4. Ispitivanje uticaja halkona na produkciju stafilokoknih hemolizina.....	52
3.5.4. Ispitivanje efekta kombinovane primene halkona i antibiotika sa različitim mehanizmima delovanja na rast izolovanih MRSA sojeva	52
3.5.5. Statistička analiza podataka.....	53
4. REZULTATI	54
4.1. Poreklo MRSA sojeva	55
4.2. Identifikacija MRSA sojeva	56
4.2.1. Identifikacija sojeva konvencionalnim metodama	56
4.2.2. Identifikacija sojeva primenom VITEK automatizovanog sistema.....	56
4.2.3. Identifikacija sojeva molekularnim metodama.....	56
4.3. Genotipizacija izolovanih sojeva.....	57
4.3.1. Tipizacija sojeva PFGE metodom	58
4.3.2. Određivanje SCC <i>mec</i> tipa	58
4.3.3. Određivanje <i>agr</i> tipa.....	59
4.3.4. Određivanje <i>ccr</i> tipa	59
4.3.5. Određivanje <i>spa</i> tipa.....	59
4.4. Ispitivanje faktora virulencije MRSA sojeva	61
4.4.1. Ispitivanje produkcije glikokaliksa.....	61
4.4.2. Ispitivanje sposobnosti MRSA da produkuje biofilm	61
4.4.3. Ispitivanje adherencije MRSA sojeva za humani fibronektin.....	63
4.4.4. Ispitivanje prisustva <i>PVL</i> gena	65

4.5. Ispitivanje osetljivosti MRSA sojeva na antibiotike	65
4.6. Ispitivanje osetljivosti MRSA sojeva na halkone.....	72
4.7. Ispitivanje uticaja halkona na biohemijske osobine MRSA i osetljivost na antibiotike	74
4.7.1. Ispitivanje uticaja halkona na biohemijske osobine MRSA sojeva.....	74
4.7.2. Ispitivanje uticaja halkona na osetljivost MRSA sojeva na antibiotike	75
4.8. Ispitivanje uticaja halkona na ekspresiju faktora virulencije izolovanih MRSA sojeva	80
4.8.1. Ispitivanje uticaja halkona na produkciju glikokaliksa	80
4.8.2. Ispitivanje uticaja halkona na produkciju biofilma	85
4.8.3. Ispitivanje uticaja halkona na adherenciju MRSA za humani fibronektin.....	90
4.8.4. Ispitivanje uticaja halkona na produkciju α -hemolizina.....	93
4.9. Ispitivanje efekta kombinovane primene halkona i antibiotika na rast izolovanih MRSA sojeva.....	97
5. DISKUSIJA	103
6. ZAKLJUČAK.....	132
7. LITERATURA	135

1. UVOD

Stafilokoke su Gram pozitivne koke veličine 0.5-1.5 μm grupisane u parove, tetrade, kratke lance koji sadrže tri do četiri ćelije ili u nepravilne skupine koje podsećaju na grozd (grčki *staphylon*-grozd i *coccus*-zrno), po čemu su ove bakterije i dobile ime. Ove bakterije su nepokretne, asporogene, katalaza pozitivne i fakultativno anaerobne bakterije, sa izuzetkom *S. saprophyticus* i *S. aureus* subspec. *anaerobius* koje su anaerobne i katalaza negativne. Pripadnici roda *Staphylococcus* su svrstani u filum *Firmicutes*, klasu *Bacilli*, red *Bacillales* i familiju *Staphylococcaceae*. (Koneman 2006, Ludwig et al., 2009). Rod *Staphylococcus* obuhvata preko 40 vrsta i 17 podvrsta stafilokoka, od kojih se vrste *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. saccharolyticus*, *S. warneri*, *S. pasteurii*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. auricularis*, *S. cohnii*, *S. xylosus* i *S. simulans* mogu izolovati kod ljudi i drugih primata (Murray et al., 2003). Većina ovih stafilokoknih vrsta čini rezidentnu ili tranzitornu floru, dok su najznačajniji izazivači infekcija kod ljudi *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus* i *S. lugdunensis*.

U okviru vrste *S. aureus* se nalazi podvrsta *S. aureus* subspec. *aureus*, koji je izazivač humanih infekcija i *S. aureus* subspec. *anaerobius*, koji nema većeg značaja u humanoj medicini.

S. aureus subspec. *aureus* (skraćeno, *S. aureus*) je ubikvitarna bakterija koja izaziva širok spektar infekcija kod ljudi. Ona kolonizuje kožu i sluzokožu respiratornog, urogenitalnog trakta i kolona kod približno 30% zdravih osoba (Gorwitz et al., 2008).

S. aureus je Gram pozitivna, nepokretna, asporogena, katalaza pozitivna i koagulaza pozitivna koka. Na mikroskopskom preparatu grupiše se u grozdove, a na krvnom agaru formira zlatnožute kolonije (latinski *aureus*-zlato) po čemu je vrsta dobila naziv.

S. aureus poseduje veliki broj faktora virulencije koje sekretuju u spoljašnju sredinu ili su vezani za ćelijsku membranu kao sastavni deo bakterijske ćelije (Foster, 2005; DeLeo i Chambers, 2009). Ovi molekuli učestvuju u kolonizaciji tkiva domaćina, utiču na mobilizaciju i funkciju leukocita (Wang et al., 2007; Rooijackers i Van Strijp, 2007), inhibišu komponente komplementa (Rooijackers i Van Strijp, 2007) ili antimikrobnih peptida-defenzina, protegrina i sličnih molekula (Peschel et al., 1999; 2001; Collins et al., 2002; Li et al., 2007) ili dovode do destrukcije leukocita (Prevot et al., 1995; Valeva et al., 1997 b; Wang et al., 2007).

1.1. Faktori virulencije *S. aureus*

U sastavu ćelijskog omotača stafilokoka nalaze se peptidoglikan, teihoinska kiselina (kovalentno vezana za peptidoglikan ili membranske lipide-lipoteihoinska kiselina) i membranski lipidi. Ovi faktori virulencije su slične građe i funkcije kao i kod ostalih Gram pozitivnih bakterija. Peptidoglikan i teihoinska kiselina imaju ulogu u adherenciji bakterija za ćelije domaćina. Većina sojeva *S. aureus* proizvodi kapsularne polisaharide 5 i 8 koji imaju antifagocitnu funkciju (Gotz, 2002; 2004). Značajnu ulogu u procesima adherencije stafilokoka ostvaruje familija MSCRAMM proteina (eng. microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules), molekula koji su kovalentno vezani za peptidoglikan ćelijskog zida. U ovu familiju spadaju fibronektin-vezujući proteini A i B (FnBPA i FnBPB), fibrinogen-vezujući proteini ClfA, ClfB (eng. clumping factors A, B) i Efb (eng. extracellular fibrinogen-binding protein), Cna (eng. collagen-binding adhesin) i protein A (*spa*) (Gotz, 2002; 2004). Osim ovih proteina, ulogu u adherenciji imaju i polisaharidni intercelularni adhezini, Ehb (eng. extracellular-matrix (ECM)-binding protein homolog), autolizin (Aea), SasG protein, AAP (eng. accumulation-associated protein, homolog SasG proteina *S. aureus*) (Roche et al., 2003), Eap (eng. extracellular adherence protein), Bap (eng. biofilm-associated protein), vWbp (eng. von Willebrand factor binding protein), i dr (Foster i Hook, 1998). Pomoću adhezivnih molekula stafilokoke se vezuju za tkivo ili komponente ekstracelularnog matriksa-kolagen, elastin, laminin, fibronektin, fibrinogen, imunoglobuline, protrombin i dr., vrše invaziju na ćelije domaćina ili dovode do formiranja biofilma.

S. aureus proizvodi veliki broj toksina koji deluju različitim mehanizmima na ćelije domaćina dovodeći do njihovog oštećenja ili smrti, ili deluju kao superantigeni.

1.1.1. α -hemolizin

Alfa hemolizin (α -toksin) spada u grupu toksina koji formiraju pore na ćelijskoj membrani ciljnih ćelija. Nakon vezivanja toksina dolazi do osmotske lize ćelije (Menestrina, 1986; Valeva et al., 1997a; Vandana et al., 1997). Pored izraženog afiniteta prema eritrocitima, α -hemolizin se vezuje i za keratinocite, fibroblaste i limfocite i ima dermonekrotičko i neurotoksično dejstvo (Bhakdi i Tranum-Jensen, 1991; Dinges et al., 2000).

1.1.2. β -hemolizin (sfingomijelinaza C)

Beta hemolizin je sfingomijelinaza koja hidrolizuje sfingomijelin ćelijske membrane do ceramida i fosforilholina (Doery et al., 1963). Precizan mehanizam kojim nastaje oštećenje i smrt ćelija nakon delovanja ovog toksina nije poznat. Oštećenje ćelija najverovatnije nastaje usled poremećaja fluidnosti ćelijske membrane i destabilizacije lipidnog dvosloja, ili kao posledica nagomilavanja ceramida u ćelijskoj membrani (Vandenesch et al., 2012). Zbog različitog udela sfingomijelina u sastavu ćelijske membrane eritrocita, osetljivost eritrocita na hemolizu pod uticajem β -hemolizina nije ista među pripadnicima različitih vrsta sisara (Doery et al., 1965).

1.1.3. γ -hemolizin i Panton-Valentin leukocidin (PVL)

Gama hemolizin i PVL su dvokomponentni toksini koji formiraju pore na membrani ciljne ćelije. Oni se sastoje od dva međusobno nepovezana sekretovana proteina - S i F komponente, koje su ime dobile prema brzini kretanja tokom elektroforeze (eng. S-slow, F-fast) (Woodin 1959; 1960). Skoro svi sojevi *S. aureus* proizvode γ -hemolizin, dok PVL proizvode 2-3% sojeva (Dinges et al., 2000). Ovi toksini imaju sličnu strukturu, γ -hemolizin se sastoji od dve kombinacije S komponente (HigA i HigC) sa F komponentom (HigB) a PVL se sastoji od LukS-PV i LukF-PV. Svaka monomerna komponenta se vezuje za površinu ćelijske membrane ciljne ćelije i oligomerizuje u kompleks pre-pore koji se sastoji od četiri S komponente i četiri F komponente. Zreli hetero-oktamer formira transmembransku poru što dovodi do osmotske lize ćelije (Vandenesch et al., 2012). Oba toksina imaju afinitet prema neutrofilima i makrofagama dovodeći do oslobađanja proinflammatoryh medijatora i zapaljenske reakcije, a γ -hemolizin dovodi i do hemolize eritrocita različitih sisara.

Toksini LukED (Morinaga et al., 2003) i LukGH (ili LukAB) (Ventura et al., 2010; Dumont et al., 2011) ispoljavaju strukturnu homologiju i isti mehanizam dejstva kao γ -hemolizin i PVL. LukGH može postojati u formi sekretovanog proteina ali je on takođe i glavni površinski protein kasne eksponencijalne faze rasta *S. aureus* (Ventura et al., 2010).

1.1.4. δ -hemolizin i PSM (eng. phenol-soluble modulins)

Delta hemolizin proizvodi 97% sojeva *S. aureus* i 50-70% sojeva koagulaza-negativnih stafilokoka (KNS) (Dinges et al., 2000). Ovaj toksin ispoljava širok spektar citotoksičnih efekata na eritrocite i veliki broj drugih ćelija sisara, kao i na subcelularne strukture - ćelijske organele vezane za membranu, sferoplaste i protoplaste (Freer i Birbeck, 1982). δ -hemolizin je amfipatski molekul koji se sastoji od α -heliksa koji ima hidrofilan i hidrofoban domen na dva različita kraja. Mehanizam hemolitičkog dejstva ovog toksina nije u potpunosti razjašnjen. Zbog svoje specifične građe koja mu omogućava prolazak kroz ćelijsku membranu ciljne ćelije hemoliza može nastati usled formiranja pora, destabilizacije ćelijske membrane ili solubilizacije membrane (Verdon et al., 2009).

PSM spadaju u familiju malih citotoksičnih peptida koji imaju istu građu kao i δ -hemolizin. Do sada su opisane dve familije ovih citotoksina: PSM α (koji se sastoji od 20-26 aminokiselina) u koju spadaju δ -hemolizin, PSM α 1-4 i PSM mec, i PSM β (PSM β 1 i PSM β 2) (koji se sastoji od 44 aminokiseline). Mogući mehanizmi dejstva ovih toksina su isti kao i kod δ -hemolizina (Wang et al., 2007; Queck et al., 2009; Periasamy et al., 2011).

1.1.5. Proteinski toksini sa ulogom superantigena

Toksični-šok sindrom toksin-1 (TSST-1) i enterotoksini su toksini proteinske prirode i otporni su na dejstvo visokih temperatura i proteaza. Ovi toksini se sekretuju u postekspozicionoj fazi rasta stafilokoka. Oni spadaju u familiju superantigena zato što izazivaju poliklonsku aktivaciju T limfocita sa istim V β lancem T ćelijskog receptora (Marrack i Kappler, 1990; Dinges et al., 2000). Geni koji kodiraju sintezu TSST-1 i enterotoksina se nalaze na plazmidima, bakteriofagima ili posebnim heterologim genskim elementima koji se nazivaju ostrvca patogenosti (Lindsay et al., 1998; Zhang et al., 1998).

TSST-1 (ranije poznat kao stafilokokni pirogeni egzotoksin C ili stafilokokni enterotoksin F) je homodimer koji se sastoji od domena A i domena B (Prasad et al., 1993). Izrazito je otporan na dejstvo visokih temperatura i proteolitičku razgradnju pod dejstvom tripsina. Ovaj toksin izaziva stafilokokni toksični šok sindrom zahvaljujući

sposobnosti prolaska kroz mukozne membrane (Hamad et al., 1997; Bohach et al., 1998), nakon čega dolazi do aktivacije makrofaga i T limfocita i oslobađanja velikih količina proinflammatoryh limfokina i monokina.

S. aureus proizvodi više od dvadeset antigeni različiti enterotoksini (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH i SEI) od kojih su SEA i SEB glavni uzročnici trovanja hranom (Pinchuk et al., 2010). Enterotoksini se sastoje od veće subjediniice A i manje subjediniice B (Swaminathan et al., 1992). Mehanizam dejstva ovih toksina nije u potpunosti razjašnjen. Simptomi bolesti (povraćanje i proliv) nastaju kao posledica degranulacije mast ćelija i oslobađanja proinflammatoryh medijatora: prostaglandina E₂, leukotriena B₄, 5-hidroksieikozatetraenoične kiseline (Jett et al., 1990) i leukotriena E₄ (Scheuber et al., 1987) koji direktno deluju na centre za povraćanje u produženoj moždini. Smatra se da degranulacija mastocita nastaje usled direktnog vezivanja enterotoksina za specifične receptore na površini ciljnih ćelija, a ne usled interakcije enterotoksina sa IgE (Jett et al., 1990).

1.1.6. Eksfolijativni toksini A-I

Eksfolijativni toksini se vezuju za površinski sloj epiderma uzrokujući sindrom oparene kože (eng. staphylococcal scalded skin syndrome, SSSS). Ovi toksini se vezuju sa visokim afinitetom za glavni glikoprotein dezmozoma, dezoglein 1, koji se nalazi u *stratum corneum* epidermisa. Nakon vezivanja, toksini ispoljavaju aktivnost serin-proteaza i dovode do proteolitičkog cepanja peptidne veze glutaminske kiseline na poziciji 381, koja se nalazi između ekstracelularnog domena 3 i 4 adhezivnog molekula dezogleina 1 (Hanakawa et al., 2002). Na ovaj način nastaje oštećenje *stratum corneum* epidermisa, što dovodi do njegovog raslojavanja i daljeg širenja bakterija. Iako tokom infekcije eksfolijativni toksini slobodno cirkulišu po celom telu, zbog visoke specifičnosti prema površinskim ćelijama epiderma ne dolazi do drugih toksičnih manifestacija bolesti.

U Tabeli 1 je ukratko prikazana uloga pojedinih faktora viruencije *S. aureus* sa pregledom gena koji ih kodiraju i kliničkih sindroma koji su posredovani ovim faktorima.

Tabela 1. Uloga faktora virulencije *S. aureus*

Uloga	Faktori virulencije	Geni	Klinički sindromi
Vezivanje za ćeliju	MSCRAMM (clumping faktori, fibronektin-vezujući proteini, kolagen i sialoprotein-vezujući proteini)	<i>clfA, clfB, fnbA, fnbB, cna, sdr, bbp</i>	Endokarditis, osteomijelitis, septični artritis, infekcije pacijenata sa ugrađenim medicinskim implantima*
Perzistencija	Biofilm, intracelularna perzistencija	<i>ica</i> locus, <i>hemB</i> mutacije	Rekurentne infekcije, cistična fibroza i gore navedene bolesti*
Evazija imenskog odgovora domaćina	Leukocidini (PVL i γ -toksin), kapsularni polisaharid 5 i 8, protein A, Eap, PSM	<i>lukS-PV, lukF-PV, hlg, cap5</i> i 8 genski klaster, <i>spa, chp, eap, psm-a</i> genski klaster	Invazivne infekcije kože i nekrotizujuća pneumonija (PVL), apscesi (kapsularni polisaharid)
Invazija u tkivo domaćina	Proteaze, lipaze, nukleaze, hijalurinidaza, fosfolipaza C, metaloproteinaze (elastaza)	<i>V8, hysA, hla, plc, sepA</i>	Oštećenje tkiva domaćina i metastatsko širenje infekcije
Bolesti posredovane toksinima i sepsa	Enterotoksini, TSST-1, eksfolijativni toksin, α -toksin, peptidoglikan, lipoteihoinjska kiselina	<i>sea-q, tstH, eta, etb, hla</i>	Trovanje hranom, toksični šok sindrom, sindrom oparene kože, bulozni impetigo i sepsa

1.1.7. Biofilm

Jedan od značajnijih faktora virulencije stafilokoka kome se poslednjih godina pridaje sve veći značaj u patogenezi rekurentnih i prolongiranih infekcija je sposobnost formiranja biofilma. Biofilm je kompleksna višćelijska struktura koja se formira na različitim biotskim i abiotskim površinama (Periasamy et al., 2011). U odnosu na bakterije koje se nalaze u planktonskoj formi, bakterije u biofilmu pokazuju različite fenotipske osobine, osetljivost na antibiotike i hemioterapeutike i mehanizme urođenog i stečenog imuniteta (Donlan i Costerton, 2002). Tokom formiranja biofilma stafilokoke adherišu za površinu živih ćelija ili za plastične polimerne površine različitih medicinskih uređaja i implantata. Vezivanje za abiotske površine se odvija direktno za plastični polimer, ili indirektno, vezivanjem stafilokoka za komponente ECM i proteine domaćina koji oblažu implantat (Periasamy et al., 2011). Unutar biofilma se nalazi razvijena mreža kanalića kojima se kreću voda i nutrijenti obezbeđujući ćelijama uslove za rast i razmnožavanje (Watnick i Kolter 2000). Stafilokoke se u biofilmu nalaze u četiri različita metabolička stanja *in vitro* - prisutne su ćelije koje rastu u aerobnim uslovima, ćelije koje energiju obezbeđuju procesima fermentacije, metabolički neaktivne ćelije (tzv. perzistori i ćelije koje veoma sporo rastu) i mrtve ćelije. Metabolički najaktivnije ćelije se nalaze u površinskom sloju biofilma koji je bogat kiseonikom, i u dubljim slojevima biofilma koji su bogati hranljivim nutrijentima iz tečne faze. Ostale ćelije nalaze se u anoksičnoj sredini u metabolički neaktivnom stanju (Rani et al., 2007). Različita koncentracija nutrijenata kroz slojeve biofilma uslovljava drugačiju gensku ekspresiju i sintezu proteina među klasterima ćelija unutar istog biofilma (Brady et al., 2007). Specifičan način organizacije ćelija omogućava stafilokokama evaziju imunskog odgovora domaćina (otpornost na fagocitozu ili dejstvo proteaza i slobodnih radikala), kao i rezistenciju na antimikrobne agense (Archer et al., 2011). Kompaktnost biofilma i gustina ECM predstavljaju fizičku barijeru koja onemogućava difuziju antibiotika kroz slojeve biofilma, a ćelije koje se nalaze u metabolički neaktivnom stanju imaju smanjen stepen deobe i samim tim smanjen broj ciljnih molekula na koje bi antibiotici delovali. Perzistorne ćelije su tolerantne čak i na visoke koncentracije baktericidnih antibiotika i nakon ukidanja antibiotske terapije spontano prelaze u metabolički aktivno stanje predstavljajući konstantan izvor bakterija za rekurentne infekcije (Lewis 2005; 2010).

1.1.8. Genska regulacija ekspresije faktora virulencije i formiranja biofilma

Regulacija ekspresije faktora virulencije kod *S. aureus* se obavlja preko nekoliko regulatornih sistema (eng. quorum sensing sistem, QS), od kojih su najbolje proučena dva opšta regulatora: *agr* (eng. accessory gene regulator) i *sarA* (eng. staphylococcal accessory regulator). Pored njih, regulatornu ulogu obavlja još nekoliko QS sistema čija aktivnost prevashodno zavisi od faktora sredine u kojoj stafilokoke rastu.

***agr* quorum-sensing sistem** se smatra glavnim regulatorom ekspresije gena kod *S. aureus*. Ovaj regulatorni sistem se uključuje kada ćelijska populacija dostigne određenu gustinu i reguliše ekspresiju gena koji kodiraju sintezu toksina i ostalih faktora virulencije. *agr* genski lokus kodira dva primarna RNK transkripta (RNKII i RNKIII) koji imaju ulogu u sintezi signalnih i efektorskih proteina. P2 operon *agr* lokusa sadrži četiri strukturna gena: *agrB*, *agrD*, *agrC* i *agrA* koji preko RNKII transkripta kodiraju *agr* signalni mehanizam (Novick et al., 1995). AgrB je transmembranski protein koji ima ulogu u posttranslacionoj modifikaciji AgrD primarnog transkripta u oktapeptid (Saenz et al., 2000, Zhang et al., 2004) i njegovoj modifikaciji u aktivan oblik prstenaste forme (Otto et al., 1998). Ovako nastao autoinduktorski peptid (AIP) aktivira dvokomponentni AgrC-AgrA sistem vezivanjem za transmembranski protein AgrC, koji ima aktivnost histidin-kinaze i vrši fosforilaciju AgrA regulatora. Aktiviran AgrA dovodi do značajnog povećanja transkripcije P2 i P3 operona tokom kasne log-faze rasta stafilokoka. Transkripcija P3 operona preko RNKIII transkripta dovodi do sinteze δ -toksina i drugih sekretornih faktora virulencije, kao što su TSST-1 i α -hemolizin (Novick et al., 1995; Morfeldt et al., 1995) i vrši inhibiciju sinteze proteina A (Huntzinger et al., 2005). Tokom eksponencijalne faze rasta stafilokoka sinteza enterotoksina A i K nije pod uticajem RNKIII, a sinteza enterotoksina B, C i D je samo delimično regulisana preko RNKIII transkripta (Yarwood i Schlievert, 2003).

Na osnovu razlike u sekvenci *agrB*, *agrD* i *agrC* gena, utvrđeno je da postoji četiri *agr* tipa *S. aureus*. AIP koje proizvode različiti *agr* tipovi međusobno deluju inhibitoryno - AIP jednog *agr* tipa inhibiše ekspresiju *agr* drugih tipova (Novick, 2003).

Osim *agr* QS sistema koji ima centralnu ulogu u regulaciji virulencije stafilokoka, opisano je još nekoliko regulatora koji svoju funkciju obavljaju samostalno, ili u sprezi

sa *agr* regulatornim sistemom. SaeRS, ArlS-ArlR i SrrAB su dvokomponentni sistemi čija regulatorna aktivnost zavisi od faktora sredine u kojoj stafilokoke rastu.

SaeRS je sistem koji omogućava stafilokokama prepoznavanje i reakciju na stimuluse iz sredine: visoke koncentracije soli, niske vrednosti pH, glukozu i subinhibitorne koncentracije antibiotika (Novick, 2003). *sae* mutanti proizvode manje količine hemolizina i koagulaze bez uticaja na transkripciju RNKIII (Yarwood i Schlievert, 2003), ali je takođe pokazano da se *sae* sistem uključuje nishodno od *agr* lokusa (Giraud et al., 2003).

ArlS-ArlR reguliše autolitičku aktivnost, aktivnost NorA efluksne pumpe (Yarwood i Schlievert, 2003) i deluje suprotno od *agr* sistema suprotstavljajući se AIP, što dovodi do smanjenja produkcije α -toksina, β -hemolizina, egzoenzima - lipaze, koagulaze i serin proteaze (Ssp) i proteina A (Fournier i Hooper, 2000; Fournier et al., 2001). Mutanti za *arlRS* gen povećavaju produkciju adhezivnih molekula i polisaharidnih intercelularnih adhezina pri čemu nastaje povećano stvaranje biofilma, što ukazuje da ovaj regulator u svom nemutiranom obliku deluje inhibitorno na formiranje biofilma (Toledo-Arana et al., 2005).

SrrAB (eng. staphylococcal respiratory response regulator) je regulatorni sistem koji inhibiše ekspresiju RNKIII, a sam je pod kontrolom *agr* gena koji vrši njegovu represiju (Yarwood et al., 2001). *srrAB* mutanti gube sposobnost rasta u anaerobnoj sredini pa se smatra da je ekspresija *srrAB* neophodna za regulaciju gena koji učestvuju u energetskom metabolizmu (Throup et al., 2001).

Pored navedenih sistema koji regulišu ekspresiju faktora virulencije u procesu formiranja biofilma učestvuju dodatni genski lokusi. Njihova aktivnost dovodi do povećane ekspresije faktora virulencije koji imaju ulogu u formiranju biofilma, ali i drugih faktora virulencije koji ne učestvuju direktno u ovom procesu. Jedna od važnih komponenti biofilma je i ekstracelularna DNK (eDNK) koja povećava adherentnost biofilma za površinu na kojoj se on formira, što je važno u prvoj fazi formiranja biofilma (Mann et al., 2009). U lizi ćelija i oslobađanju eDNK učestvuje nekoliko enzima, od kojih je glavni murein hidrolaza koji je kodiran *cidA* genom. Pokazano je da delecija ili mutacije ovog gena dovode do smanjenja adherentnosti biofilma usled smanjene količine eDNK u matriksu biofilma (Rice et al., 2007). Produkti *lrgAB* gena

negativno regulišu *cidA*, aktivnost murein hidrolaze i oslobađanje eDNK, što takođe dovodi do smanjenja adherentnosti biofilma (Mann et al., 2009).

U oslobađanju eDNK učestvuju i autolizini stafilokoka- Atl autolizin *S. aureus* kodiran *atl* genom (Takahashi et al., 2002), odnosno, AtlE autolizin *S. epidermidis* kodiran *atlE* genom (Heilmann et al., 1997). U ranoj fazi formiranja biofilma AtlE omogućava adherenciju *S. epidermidis* direktno za hidrofobne površine medicinskih implantata, ili indirektno, adherencijom za proteine ekstracelularnog matriksa domaćina koji oblažu implantat (kao što je vitronektin) (Heilmann et al., 1997). Atl autolizin ima sličnu ulogu u adherenciji *S. aureus*.

U ranoj fazi formiranja biofilma kod *S. aureus* učestvuje i produkt *sigB* operona. Produkt ovog lokusa - faktor σ^B povećava ekspresiju Clf A i B, FnbpA i koagulaze, proteina koji su neophodni u inicijalnoj adherenciji stafilokoka (Nicholas et al., 1999; Nair et al., 2003). Nasuprot tome, aktivnost σ^B dovodi do smanjenja ekspresije β -hemolizina, enterotoksina B, serin i cistein proteaza (SplA i B), metaloproteinaze Aur i leukotoksina D koji su karakteristični za planktonski fenotip stafilokoka (Kullik i Giachino, 1997).

1.2. Patogenost *S. aureus*

Staphylococcus aureus kolonizuje nazalnu mukozu, aksile i perineum kod približno 30% zdravih osoba. Ova bakterija najčešće izaziva blage ili umereno teške infekcije kože i mekih tkiva, kao što su impetigo bulosa, apscesi, furunkuli i sindrom ošurene kože ili infekcije rana. Infekcije mogu biti posledica direktne invazije mikroorganizma (infekcije kože i mekih tkiva, sistemske infekcije sa letalnim ishodom-sepsa, endokarditis i pneumonija) ili produkcije stafilokoknih toksina (toksični šok sindrom i trovanje hranom) (Lowy, 1998; Tenover i Gorwitz, 2006; Durupt et al, 2007; Safdar i Bradley, 2008). Ove infekcije se najčešće javljaju kod novorođenčadi, pacijenata obolelih od hroničnih bolesti pluća (kao što su cistična fibroza, emfizem i hronični bronhitis), leukemija, malignih bolesti, gripa, pacijenata sa opekotinama, hroničnim kožnim bolestima, dijabetesom, transplantiranim organima, postoperativnim ranama, intravenskim kateterima, ugrađenim medicinskim implantatima ili kod imunokompromitovanih pacijenata (Gotz, 2004).

Poslednjih godina se pridaje značaj biofilmu kao posebnom faktoru virulencije *S. aureus* i bolestima koje nastaju kao posledica formiranja biofilma. Ove bolesti se karakterišu prolongiranim tokom, otpornošću na konvencionalnu antibiotsku terapiju, rekurentnim infekcijama i diseminacijom biofilma sa nastankom udaljenih žarišta infekcije. Stafilokokni biofilm je najčešći patoanatomski supstrat kod osteomijelitisa, infekcija kod pacijenata sa implantiranim medicinskim uređajima ili pomagalima, endokarditisa, infekcija rana, oka, nosa i usne duplje i infekcija uzrokovanih mešovitom florom mikroorganizama.

1.2.1. Uloga biofilma u patogenezi osteomijelitisa

Osteomijelitis je infekcija kosti koja može biti prouzrokovana različitim mikroorganizmima, među kojima je *S. aureus* najčešći izazivač hronične infekcije. Bakterije najčešće dolaze hematogenim putem ili direktnom inokulacijom nakon povrede ili hirurške intervencije (Ziran, 2007). Prvi korak u formiranju biofilma je povećanje ekspresije adhezivnih molekula kojima se bakterije vezuju za odgovarajuće receptore u koštanom matriksu: fibrinogen, fibrin, osteopontin, fibronektin, kolagen, elastin i dr. (Resch et al., 2006). Nakon adhezije za površinu kosti dolazi do umnožavanja bakterija i formiranja ranog biofilma. Sa porastom bakterijske populacije menja se i ekspresija molekula, smanjuje se ekspresija adhezivnih molekula a povećava ekspresija sekretornih faktora virulencije: toksina, enzima i drugih imunomodularnih molekula kojim se izbegava imunski odgovor domaćina (Dunman et al., 2001). Uporedo sa tim dolazi i do oslobađanja bakterijskih medijatora inflamacije, formilmetionil peptida, lipoteihoiinske kiseline, peptidoglikana, hemolizina i stafilokokne DNK (tj. nemetilisanih citozin-fosfo-guanozin sekvenci DNK). Ovi medijatori aktiviraju polimorfonuklearne leukocite, međutim, usled sekrecije velike količine različitih faktora virulencije nastaje njihova liza i neefektivna fagocitoza (Anwar et al., 2009). Aktivnost fagocita dodatno pogoršava tkivno oštećenje, što povećava devitalizovanu površinu na kojoj se formira biofilm. Uporedo sa širenjem biofilma po koštanom tkivu dolazi i do njegovog sazrevanja, otkidanja delova biofilma i formiranja metastatskih žarišta infekcije. Najefikasnija terapija osteomijelitisa kod odraslih je kombinovanje hirurškog odstranjivanja žarišta infekcije sa antibiotskom terapijom. Tokom antibiotske terapije kod dece najčešće dolazi do spontane resorpcije

nekrotične kosti i tkiva i nestanka površine na kojoj bi se formirao biofilm, pa je dovoljna samo primena antibiotika bez hirurškog zahvata (Lew i Waldvogel, 2004).

1.2.2. Formiranje biofilma na implantiranim medicinskim uređajima i pomagalima

S. aureus je jedan od glavnih uzročnika hroničnih infekcija nastalih usled formiranja biofilma na površini ili u unutrašnjosti medicinskih uređaja ili pomagala. Inokulacija stafilokoka nastaje tokom hirurške intervencije, hematogenim putem ili naknadnom povredom implanta. Biofilm se najčešće obrazuje na ortopedskim implantima-veštačkim zglobovima i osteosintetskom materijalu (hirurškim žicama, pločama, spoljašnjim fiksatorima, šrafovim, klinovima i sl.), kao i na materijalima na bazi plastičnih polimera i silikona (intravenski i urinarni kateteri, stentovi, veštačke valvule, endotrahealni tubusi, drenovi, šantovi, kozmetički implantati i dr.) (Costerton et al., 2005). Od medicinskih uređaja biofilm se obrazuje na površini aspiratora, ventilatora, defibrilatora ili električnih predvodnika srčanog ritma. Bakterije se vezuju direktno za hidrofobnu površinu implanta, ili indirektno za proteine i komponente ekstracelularnog matriksa domaćina koji ih oblažu (Periasamy et al., 2011). Gust polisaharidni matriks biofilma predstavlja fizičku barijeru za difuziju antibiotika pa je jedini tretman ovih infekcija hirurško odstranjivanje implantata i zamenjivanje sa novim (Herrmann et al., 1988).

1.2.3. Endokarditis

Infekcija srčanih valvula sa *S. aureus* udružena je sa visokom stopom mortaliteta. Formiranje biofilma i njegova veličina su ograničeni usled sila strujanja krvi. Najčešće nastaje hematogenim putem i predstavlja stalan izvor bakterija koje se metastatski šire po cirkulaciji i daju udaljena žarišta infekcije (Archer et al., 2011).

1.2.4. Infekcije rana

Hronične infekcije rana kod kojih se formira stafilokokni biofilm najčešće nastaju kod osoba sa poremećajem periferne arterijske ili venske cirkulacije. Biofilm se obrazuje na površini venskih ili arterijskih ulceracija i na površini rana koje se javljaju kod dijabetičara (npr. dijabetesno stopalo), otežavajući epitelizaciju i zarastanje rana (Schierle et al., 2009).

1.2.5. Infekcije nosa, oka i usta

Hronični rinosinuzitis je inflamatorno oboljenje nepoznate etiopatogeneze. *S. aureus* formira biofilm u 50% slučajeva, što dovodi do teških oblika bolesti sa lošim tokom i učestalim postoperativnim komplikacijama (Foreman i Wormald, 2010; Stephenson et al., 2010). Multirezistentni sojevi *S. aureus* formiraju biofilm na sluzokoži oka i najčešće uzrokuju konjunktivitis, a u težim slučajevima dolazi do prodora infekcije u dublje strukture oka sa nastankom keratitisa i endoftalmitisa. Meticilin-rezistentan *S. aureus* se znatno češće izoluje od sojeva osetljivih na meticilin (eng. methicillin susceptible *S. aureus*, MSSA), što dodatno otežava terapiju ovih oboljenja (Leid et al., 2002; Murugan et al., 2010). Biofilm se često formira i u okolini zuba dovodeći do nastanka periodontitisa (inflamacije ligamenata i kosti koji se nalaze u okolini zuba dajući mu potporu) i periimplantitisa (destruktivne inflamacije mekog i čvrstog tkiva koje se nalazi u okolini zubnih implanta). Osim što *S. aureus* formira biofilm na površini sluzokože usne duplje, bakterije se sa visokim afinitetom vezuju i za titanijumske površine zubnih implanta (Heitz-Mayfield i Lang, 2010).

1.2.6. Infekcije udružene sa mešovitom florom mikroorganizama

U brisu oralne ili vaginalne sluzokože najčešće se izoluju *Candida albicans* i *S. aureus* kao uzročnici udruženih infekcija. Pored stafilokoka koje formiraju biofilm, *C. albicans* takođe ima sposobnost formiranja biofilma. Osim što *S. aureus* formira biofilm na površini sluzokože, vezuje se i za površinu hifa *C. albicans* i na njima dodatno formira biofilm. Hife *C. albicans* imaju sposobnost prodiranja u epitelne ćelije domaćina, što dovodi do prenosa stafilokoka u intracelularnu sredinu i nastanka lokalne i/ili sistemske infekcije (Peters et al., 2010).

1.3. Rezistencija *S. aureus* na antibiotike i hemioterapeutike

Kada je penicilin uveden u širu terapijsku upotrebu 1944. godine prošlog veka došlo je do značajnog smanjenja stope mortaliteta od infekcija uzrokovanih sa *S. aureus*. Na samom početku kliničke upotrebe penicilina 94% sojeva *S. aureus* je bilo osetljivo na ovaj antibiotik. Tokom narednih nekoliko godina došlo je do pojave rezistencije na penicilin tako da se broj osetljivih sojeva već 1948. god. smanjio na 50% (Barber i Rozwadowska-Dowzenko, 1948). Rezistencija na penicilin G je nastala kao posledica produkcije penicilinaza (β -laktamaza), enzima koji vrše hidrolizu penicilina dovodeći do njegove inaktivacije (Kirby, 1944). Krajem 50-ih godina izolovani su prvi multirezistentni sojevi *S. aureus* koji su pored penicilina G bili rezistentni na hloramfenikol, tetraciklin i eritromicin. Sa razvojem nove generacije antibiotika rezistentnih na dejstvo β -laktamaza, kao što je meticilin, došlo je do kratkotrajnog poboljšanja u lečenju ovih infekcija, međutim, prvi soj meticilin-rezistentnog *S. aureus* je izolovan 1961. god., na samom početku terapijske upotrebe meticilina (Jevons et al., 1961). Tokom narednih decenija, MRSA je postao glavni izazivač intrahospitalnih infekcija sa čestim letalnim ishodom (eng. hospital-acquired MRSA, HA-MRSA), a krajem 90-ih godina, MRSA sojevi su izolovani i kod pacijenata koji dolaze iz vanbolničke sredine (eng. community-acquired MRSA ili community-associated MRSA, CA-MRSA). Sticanjem gena koji kodiraju rezistenciju i na druge antibiotike MRSA sojevi su tokom vremena razvili multirezistentan fenotip. Najaktuelniji problem u dosadašnjem lečenju infekcija izazvanih MRSA sojevima predstavlja pojava vankomicin-intermedijarno osetljivog *S. aureus* (VISA) (Hiramatsu i sar., 1997) i vankomicin-rezistentnog *S. aureus* (VRSA) (Chang i sar., 2003).

Pored nekoliko uočenih mehanizama rezistencije *S. aureus* na meticilin, rezistencija najčešće nastaje kao posledica produkcije novog PBP, poznatog kao PBP2a (ili PBP2'), koji ispoljava nizak afinitet za vezivanje svih β -laktamskih antibiotika (Brown i Reynolds, 1980; Hayes et al., 1981; Hartman i Tomasz, 1984; Utsui i Yokota, 1985). Zbog niskog afiniteta vezivanja, PBP2a može da zameni funkciju ostalih PBP koji vezuju β -laktamske antibiotike sa visokim afinitetom, pa MRSA sojevi mogu da rastu u prisustvu letalnih koncentracija β -laktamskih antibiotika. PBP2a je inducibilni PBP velike molekulske mase (76 kDa) i kodiran je *mecA* genom. *mecA* gen se nalazi na

hromozomu *S. aureus* u *mec* regionu koji je poznat i kao stafilokokna hromozomska kasetna *mec* (SCC*mec*) (Chambers, 1997).

1.3.1. Stafilokokna hromozomska kasetna *mec*-SCC*mec*

Stafilokokna hromozomska kasetna *mec* je locirana na 3' kraju *orfX* regiona u blizini mesta koje je origin replikacije *S. aureus* (Kuroda et al, 2001; Baba et al, 2002). SCC*mec* je mobilni genski element koji se sastoji od *mec* genskog kompleksa, koji sadrži *mecA* gen i regulatorne gene, i *ccr* genskog kompleksa, koji sadrži gene koji kodiraju rekombinaze (Katayama et al, 2000; Ito, 2004). Različiti SCC*mec* alotipovi nastaju međusobnom kombinacijom različitih tipova *mec* i *ccr* genskog kompleksa. Prema „Međunarodnoj radnoj grupi za klasifikaciju SCC elemenata“, (eng. “International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC) Elements (IWG-SCC)”) SCC*mec* je klasifikovan u jedanaest alotipova koji su prikazani u Tabeli 2 (<http://www.sccmec.org/>).

Tabela 2. SCC*mec* tipovi *S.aureus*

SCC <i>mec</i> tip	<i>ccr</i> genski kompleks	<i>mec</i> genski kompleks	MRSA sojevi
I	1 (A1B1)*	B	NCTC10442, COL
II	2 (A2B2)	A	N315, Mu50, Mu3, MRSA252, JH1, JH9
III	3 (A3B3)	A	85/2082
IV	2 (A2B2)	B	CA05, MW2, 8/6-3P, 81/108, 2314, cm11, JCSC4469, M03-68, E-MRSA-15, JCSC6668, JCSC6670
V	5 (C1)	C2	WIS(WBG8318), TSGH17, PM1,
VI	4 (A4B4)	B	HDE288
VII	5 (C1)	C1	JCSC6082
VIII	4 (A4B4)	A	C10682, BK20781
IX	1(A1B1)	C2	JCSC6943
X	7(A1B6)	C1	JCSC6945
XI	8(A1B3)	E	LGA251

* *ccr* gen/geni koji ulaze u sastav genskog kompleksa nalaze se navedeni u zagradi.

Pored *mecA*, SCC*mec* može sadržati i dodatne gene rezistencije koji su locirani na integrisanim plazmidima (pUB110, pI258 i pT181) ili transpozonu (Tn554) (Ito et al., 2003; Deurenberg et al., 2007).

1.3.2. *mec* genski kompleks

mec genski kompleks sadrži jednu ili dve insercione sekvence IS431, *mecA* gen i gene koji regulišu njegovu transkripciju - *mecI* i *mecR1* (Deurenberg et al., 2007). *mecI* vrši represiju transkripcije *mecA* gena, a *mecR1* aktivira transkripciju ovog gena. U odsustvu β -laktamskih antibiotika, produkt *mecI* gena-*mecI* protein je vezan za operatorski region *mecA* i vrši represiju transkripcije *mecA* i *mecR1*. U prisustvu β -laktamskih antibiotika dolazi do autokatalitičkog cepanja citoplazmatskog domena *mecR1*, koji ima funkciju metaloproteinaze. Nakon odvajanja i aktivacije metaloproteinaze dolazi do isecanja *mecI* iz *mecA*, transkripcije *mecA* i sinteze PBP2a (Berger-Bachi i Rohrer, 2002). Da bi vršili represiju transkripcije *mecA*, regulatorni geni *mecI* i *mecR1* moraju da budu strukturno i funkcionalno očuvani (Ryffel et al., 1992; Kuwahara-Arai et al., 1996). Delecija regulatornih gena (Hurlimann-Dalel et al., 1992; Suzuki et al., 1993; Archer et al., 1994), ili prisustvo insercionih mutacija (kao što su insercione sekvence IS431 i IS1272) dovode do derepresije *mecA* i povećane sinteze PBP2a (Katayama et al., 2001). Regulatorni geni na plazmidima koji vrše kontrolu produkcije β -laktamaza takođe mogu biti koregulatori ekspresije PBP2a (Ubukata et al., 1989; Hackbarth i Chambers, 1993).

Prema IWG-SCC utvrđeno je šest tipova *mec* genskog kompleksa koji su prikazani u Tabeli 3 (<http://www.sccmec.org/>).

Tabela 3. Tipovi *mec* genskih kompleksa *S.aureus*

<i>mec</i> genski kompleks		SCC <i>mec</i> tipovi koji imaju odgovarajuće <i>mec</i> genske komplekse
Klasa A	IS431- <i>mecA</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i>	II, III, VIII
Klasa B	IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS1272	I, IV, VI
Klasa C1	IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431(dve IS431 aranžirane u istom smeru)	VII,X
Klasa C2	IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431 (dve IS431 aranžirane u suprotnom smeru)	V, IX
Klasa D	IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i>	
Klasa E	<i>blaZ</i> - <i>mecALGA251</i> - <i>mecR1LGA251</i> - <i>mecILGA251</i>	XI

1.3.3. *ccr* genski kompleks

ccr genski kompleks sadrži gene (*ccrA*, *ccrB* i *ccrC*) koji kodiraju rekombinaze odgovorne za mobilnost SCC*mec* elementa. Ovi enzimi vrše precizno isecanje i integrisanje SCC*mec* na specifično mesto na hromozomu *S. aureus-attB_{scc}*, koje se nalazi na 3' kraju otvorenog okvira čitanja koji ima nepoznatu funkciju-*orfX* (Ito et al., 1999). Prema IWG-SCC utvrđeno je 8 tipova *ccr* genskog kompleksa koji su prikazani u Tabeli 4 (<http://www.sccmec.org/>).

Tabela 4. Tipovi *ccr* genskih kompleksa *S.aureus*

<i>ccr</i> genski kompleks	<i>ccr</i> geni	SCC <i>mec</i> tipovi koji imaju odgovarajuće <i>ccr</i> genske komplekse
Tip 1	A1B1	I, IX
Tip 2	A2B2	II, IV
Tip 3	A3B3	III
Tip 4	A4B4	VI, VIII
Tip 5	C1	V, VII
Tip 6	A5B3	
Tip 7	A1B6	X
Tip 8	A1B3	XI

Regioni SCC*mec* elementa koji oivičavaju *mec* i *ccr* genski kompleks nazivaju se „otpadni“ regioni (eng. junkyard, J). Postoje tri J regiona, J1 region predstavlja deo hromozoma od početka SCC*mec* elementa do *ccr* gena, J2 region koji predstavlja deo hromozoma između *ccr* gena i *mec* genskog kompleksa i J3 region koji se nalazi između *mec* genskog kompleksa i kraja SCC*mec* elementa (Shore et al., 2005; Chongtrakool et al., 2006; Deurenberg et al., 2007).

Struktura *mecA* gena je visoko konzervirana među različitim pripadnicima *Staphylococcus spp.*, sa 96-99% međusobne strukturne homologije (Beck et al., 1986; Reynolds i Fuller, 1986; Chambers, 1987; Ubukata et al., 1990; Wu et al., 1992; Archer et al., 1994). Poreklo *mecA* gena kod *S. aureus* još uvek nije sa sigurnošću potvrđeno. Kod *Staphylococcus sciuri* je utvrđeno prisustvo *mecA* homologa koji ispoljava 88% strukturne homologije sa *mecA* genom MRSA (Wu et al., 1996). *mecA* je nađen i kod nekih vrsta bakterija iz familije *Enterobacteriaceae* (*Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*), *Enterococcus hirae* i *Enterococcus faecalis* (Kassem et al, 2008). Kod

meticilin rezistentnih koagulaza negativnih stafilokoka (MRKNS) takođe je utvrđeno prisustvo SCC*mec* elementa. Pojedini sojevi *Staphylococcus epidermidis* imaju prisutan SCC*mec* element I-V (Wisplinghoff et al., 2003; Miragaia et al., 2005). Novija istraživanja su pokazala da je moguće prisustvo i SCC elemenata bez *mecA* gena, pa se pretpostavlja da ovi elementi predstavljaju rezervoar gena rezistencije kod *S. aureus* (Corkill et al., 2004; Mongkolrattanothai et al., 2004).

Smatra se da su MRSA sojevi stekli *mecA* gen horizontalnim transferom od koagulaza negativnih stafilokoka (Archer et al., 1994; Hiramatsu, 1995; Wu et al., 1996), i da svi sojevi predstavljaju klonske potomke jednog ili nekoliko ancestralnih klonova (Kreiswirth et al., 1993). Precizan mehanizam kojim je došlo do inkorporacije *mecA* gena u hromozom *S.aureus* nije sa sigurnošću utvrđen, ali se na osnovu strukture SCC*mec* regiona može pretpostaviti da je ovaj gen unet transpozicijom (Gillespie et al., 1987; Skinner et al., 1988; Archer i Niemeyer, 1994; Stewart et al, 1994; Hiramatsu, 1996; Chambers, 1997).

1.4. Klasična identifikacija i molekularna tipizacija MRSA sojeva

1.4.1. Identifikacija *S. aureus*

Identifikacija *S. aureus* se vrši klasičnim metodama (testovi koagulaze, lateks-aglutinacioni test, detekcija enzima dezoksiribonukleaze i termostabilne endonukleaze i komercijalni biohemijjski testovi) i molekularnim metodama.

1.4.1.1. Testovi koagulaze

Za razlikovanje *S. aureus* od koagulaza-negativnih stafilokoka (KNS) koriste se testovi slobodne i vezane koagulaze. Test slobodne koagulaze je standardni test za rutinsku identifikaciju *S. aureus*. On se izvodi u epruveti sa zečijom plazmom a stvaranje fibrinskog ugruška se proverava nakon 4h i 24h. Prilikom tumačenja ovog testa može doći do greške zato što neke vrste *Staphylococcus spp.* daju pozitivan koagulaza test (*S. schleiferi* i *S. intermedius*) a neki sojevi *S. aureus* ne daju pozitivan test slobodne koagulaze (Cookson, 1997; Wichelhaus et al., 1999).

Detekcija vezane koagulaze (eng. clumping factor) je brz dijagnostički test koji se vrši na pločici. Nedostatak ovog testa je što oko 15% sojeva *S. aureus* daje negativan

rezultat (Bannerman, 2003), a druge vrste stafilokoka (*S. schleiferi* i *S. lugdunensis*) daju pozitivan test vezane koagulaze (Brown et al., 2005).

1.4.1.2. Lateks-aglutinacioni test

Prvi komercijalni lateks-aglutinacioni testovi za identifikaciju *S. aureus* su se zasnivali na detekciji stafilokoknog proteina A i/ili vezane koagulaze. Ovi testovi nisu pogodni za identifikaciju MRSA sojeva koji proizvode malu količinu vezane koagulaze ili proteina A (Kuusela et al., 1994). Novija generacija lateks-aglutinacionih testova pored vezane koagulaze ili proteina A detektuje i različite površinske antigene stafilokoka. Ovi testovi imaju veću senzitivnost od prvobitnih testova, ali im je manja specifičnost zbog unakrsne reakcije sa KNS (Blake i Metcalfe, 2001; van Griethuysen et al., 2001). Kao i u slučaju koagulaza testa, druge vrste stafilokoka (*S. schleiferi* i *S. lugdunensis*) daju pozitivan lateks-aglutinacioni test (Wichelhaus et al., 1999).

1.4.1.3. Detekcija enzima dezoksiribonukleaze (DNaze) i termostabilne endonukleaze

Detekcija DNaze se vrši na DNaza agaru a termostabilne endonukleaze na toluidin-plavo metahromatskom agaru (Menzies, 1977). Neki sojevi KNS daju pozitivne testove DNaze i termostabilne endonukleaze pa se ovi testovi ne koriste samostalno za identifikaciju *S. aureus* već kao dodatni testovi za identifikaciju stafilokoka. Termostabilna endonukleaza se može detektovati i lateks-aglutinacionim testom (Bannerman, 2003).

1.4.1.4. Komercijalni biohemijski testovi

Postoje brojni komercijalni biohemijski testovi za identifikaciju stafilokoka koji se izvode manuelno, sa kitovima za identifikaciju stafilokoka, ili pomoću automatizovanih sistema kao što su Phoenix ili VITEK. Ovi testovi imaju veliku senzitivnost i specifičnost ali traju duže i skuplji su od koagulaza ili lateks-aglutinacionih testova pa se retko koriste u rutinskoj identifikaciji (Ligozzi et al., 2002; Spanu et al., 2004).

1.4.1.5. Molekularne metode za identifikaciju *S. aureus*

Identifikacija *S. aureus* molekularnim metodama se retko koristi u rutinskoj dijagnostici, osim u slučajevima kada sve ostale metode nisu dale jasan rezultat. Identifikacija se najčešće izvodi PCR metodom za detekciju vrsno-specifičnih gena kao što su geni za nukleazu (*nuc*), koagulazu (*coa*), protein A (*spa*), *femA* i *femB*, *Sa442*,

16S rRNK i gena koji kodiraju ekspresiju fibrinogen-vezujućeg proteina (Keams et al., 1999; Mason et al., 2001; Grisod et al., 2002).

1.4.2. Detekcija rezistencije na meticilin

Detekcija rezistencije na meticilin se vrši klasičnim metodama antibiograma, lateks-aglutinacijom, automatizovanim metodama, fluorescentnim bojenjem i molekularnim metodama.

1.4.2.1. Klasične metode antibiograma

Klasične metode antibiograma koje se koriste za detekcije rezistencije na meticilin su agar-difuzioni, agar i bujon-dilucionni metod i E-test. Na rezultat ovih testova utiče nekoliko faktora: medijum koji se koristi za kultivaciju, veličina inokuluma, uslovi inkubacije (dužina i temperatura) i vrsta antimikrobnog agensa kojim se testira osetljivost na meticilin. Izvođenje testova za detekciju rezistencije na meticilin treba vršiti prema standardima Nacionalnog Komiteta za Kliničke i Laboratorijske Standarde (eng. National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) ili Britanskog Društva za Antimikrobnu Hemoterapiju (eng. British Society for Antimicrobial Chemotherapy, BSAC). U rutinskoj dijagnostici se najčešće primenjuje agar-difuzioni metod antibiograma uz upotrebu diskova/tableta meticilina, oksacilina ili cefoksitina. Poslednjih godina se preporučuje upotreba cefoksitina zato što je pouzdaniji od oksacilina, i na rezultat testa ne utiče vrsta medijuma ili uslovi inkubacije (Mougeot et al., 2001; Cauwelier i Gordts, 2004). Sojevi *S. aureus* koji pokazuju heterorezistenciju na meticilin se teško detektuju agar-difuzionim metodom, a sojevi *S. aureus* koji proizvode velike količine penicilinaze ovim metodom mogu biti pogrešno dijagnostikovani kao MRSA.

1.4.2.2. Lateks-aglutinacioni test

Za brzu detekciju MRSA je razvijen lateks-aglutinacioni test za detekciju PBP2' (Nakatomi i Sugiyama, 1998). Ovaj test ima veliku senzitivnost i specifičnost (Jureen et al., 2001; Smyth et al., 2001). MRSA sojevi koji proizvode malu količinu PBP2' daju slabu aglutinaciju, ili je produženo vreme za aglutinaciju, pa mogu greškom biti dijagnostikovani kao MSSA.

1.4.2.3. Detekcija osetljivosti na meticilin automatizovanim metodama

Osetljivost na oksacilin/meticilin se može odrediti sa velikim stepenom pouzdanosti pomoću VITEK/VITEK2 (bioMerieux), Phoenix (Becton Dickinson) ili Microscan (Dade Behring) automatizovanog sistema (Farrell, 1997; Ligozzi et al., 2002; Spanu et al., 2004).

1.4.2.4. Fluorescentne tehnike za detekciju osetljivosti na meticilin

Detekcija osetljivosti na meticilin se može izvršiti pomoću fluorescentne metode sa BBL Crystal MRSA identifikacionim sistemom (Becton Dickinson). Ovaj metod se zasniva na detekciji ćelijske respiracije pomoću fluorescentnog indikatora (Tris-1,4-difenil-1,10-fenatrolin rutenijum hlorid pentahidrat) koji je osetljiv na prisustvo kiseonika. Oksacilin je inkorporiran u podlogu na kojoj se ispituje osetljivost sojeva. Ako je soj osetljiv na oksacilin, dolazi do inhibicije njegovog rasta i povećanja koncentracije kiseonika u podlozi, što se detektuje kao gašenje signala fluorescencije. MRSA sojevi troše kiseonik iz podloge tokom ćelijske respiracije pa se fluorescentni signal detektuje UV lampom (Quadri et al., 1994).

1.4.2.5. Molekularne metode za identifikaciju MRSA sojeva

Za brzu identifikaciju MRSA sojeva se najčešće koristi multipleks-PCR koji kombinuje molekularne metode za identifikaciju *S. aureus* uz istovremenu detekciju *mecA* gena (Bignardi et al., 1996).

1.4.3. Molekularna tipizacija MRSA sojeva

Da bi se izvršila analiza klonske diseminacije i epidemiologije MRSA sojeva, neophodno je da se sojevi najpre okarakterišu na genskom nivou. Genska tipizacija MRSA sojeva se najčešće vrši na osnovu MLST (eng. multilocus sequence type) tipizacije, tipizacije gena za stafilokokni protein A (*spa* tipizacija), određivanja SCC*mec* tipa, *agr* tipa i tipa koagulaze. Zlatni standard za ispitivanje molekularne epidemiologije MRSA sojeva je PFGE (eng. pulsed-field gel electrophoresis) metod.

1.4.3.1. MLST tipizacija

MLST tipizacija se koristi za utvrđivanje klonske evolucije MRSA sojeva. Ovaj metod se zasniva na određivanju sekvence fragmenata DNK veličine 0.5 kb kod sedam tzv. „housekeeping“ gena *S. aureus* (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* i *ygiL*) (Deurenberg et

al., 2007). Dobijen tip sekvenci, odnosno, alelski profil predstavlja ST tip (eng. sequence type). Na osnovu dobijenih ST tipova klonovi se grupišu u klonske komplekse (CC) pomoću eBURST softvera (eng. based upon related sequence types) (<http://eburst.mlst.net/>) i baze podataka koja je dostupna na MLST vebsajtu (<http://www.mlst.net/>) (Enright et al., 2000). Sojevi *S. aureus* se grupišu u isti CC kada imaju identične sekvence pet od sedam „housekeeping“ gena, a pretečom svakog CC se smatra ST tip sa najvećim brojem varijanti pojedinačnog lokusa (Deurenberg et al., 2007).

1.4.3.2. *spa* tipizacija

Za razliku od MLST tipizacije, koja se dobija na osnovu analize sedam gena, određivanje *spa* tipa se vrši na osnovu analize sekvence polimorfnog regiona X kod stafilokoknog gena za protein A (*spa*) (Frenay et al., 1996). Postojeći *spa* tipovi su dostupni u javnoj bazi podataka <http://tools.eugenomics.com/>. Dobijeni *spa* tipovi se grupišu u *spa* klonske komplekse (CC) pomoću algoritma baziranog na obrascu ponavljanja (eng. based upon repeat pattern, BURP) sa Ridom Staph-Type softverom (<http://spaserver.ridom.de/>). Svaki klon određenog ST tipa može imati nekoliko različitih *spa* tipova (Shopsin et al., 1999; Harmsen et al., 2003; Koreen et al., 2004). Prednost *spa* tipizacije u odnosu na MLST je što se jednostavnije izvodi (tj. detektuje se sekvenca pojedinačnog genskog lokusa) i ima veću moć diskriminacije od MLST tipizacije. Kao i MLST, *spa* tipizacijom se utvrđuje klonska evolucija MRSA sojeva, ali se za razliku od MLST koristi i za utvrđivanje porekla i pravca širenja intrahospitalnih infekcija izazvanih određenim MRSA sojem.

1.4.3.3. SCC*mec* tipizacija

SCC*mec* tipizacija se vrši pomoću multipleks-PCR metode kojom se najčešće detektuje tip *mec* i *ccr* genskog kompleksa, ili se određuje i tip J regiona (Oliveira et al., 2002; Ito et al., 2004; Zhang et al., 2005; IWG-SCC). Prema IWG-SCC klasifikaciji do sada je utvrđeno prisustvo jedanaest SCC*mec* alotipova (sa nekoliko podtipova prisutnih kod SCC*mec*II, III i IV tipa), šest tipova *mec* genskog kompleksa i osam tipova *ccr* genskog kompleksa (<http://www.sccmec.org/>). Smatra se da MRSA sojevi SCC*mec* I, II, i III tipa predstavljaju HA-MRSA, a da SCC*mec* IV i V tipovi predstavljaju CA-MRSA sojeve (Enright et al., 2002; Robinson i Enright, 2003; Vandenesch et al., 2003; Ender

et al., 2004; Boyle-Vavra et al., 2005; Lee et al., 2007; Diep et al., 2008; Takano et al., 2008).

1.4.3.4. *agr* tipizacija

agr tipizacija se vrši pomoću PCR metode. Do sada je utvrđeno postojanje *agr* tipova I-IV, od kojih tip *agrI* ima nekoliko podtipova (Gilot et al., 2002; Strommenger et al., 2004).

1.4.3.5. Određivanje tipa koagulaze

Određivanje tipa koagulaze je moguće izvršiti pomoću standardnih kitova koji sadrže antitela na različite tipove koagulaze. Do sada je određeno osam tipova koagulaze (I-VIII). Tip koagulaze je u korelaciji sa ST tipom. Tipizacija *coa* gena za koagulazu pomoću PCR metode nije pouzdana, tako da se standardno za tipizaciju koagulaze koriste specifična antitela na tipove koagulaze I-VIII (Kinoshita et al., 2008; Sakai et al., 2008).

1.4.4. Molekularna epidemiologija MRSA sojeva

Pored navedenih metoda koje se koriste za gensku tipizaciju MRSA sojeva, pomoću PFGE metode se vrši identifikacija epidemijskih sojeva i analiza njihove divergencije, odnosno, klonske povezanosti (Tenover et al., 2006; Tenover i Goering, 2009). Fragmentacija DNK se vrši *in situ* u agarozu gelu pomoću *SmaI* endonukleaze nakon čega se fragmenti razdvajaju elektroforezom u pulsnom električnom polju. Određivanje PFGE tipa se vrši prema postojećim kriterijumima Tenovera i sar. (Tenover et al., 1995; Tenover et al., 2006; Tenover i Goering, 2009). PFGE metod ima veliku moć diskriminacije i koristi se za analizu povezanosti epidemijskih sojeva ili analizu porekla sojeva prilikom prenosa bolničkih sojeva iz jedne bolnice u drugu.

1.5. Terapija infekcija izazvanih MRSA sojevima

Infekcije uzrokovane MRSA sojevima se najčešće leče antibioticima iz grupe glikopeptida, kao što su vankomicin i teikoplanin. Međutim, od 1995. god. je u nekoliko laboratorija u Evropi, SAD i Japanu registrovana pojava glikopeptid-intermedijarno osetljivih sojeva *S. aureus* (GISA) (Hiramatsu et al., 1997; Ploy et al., 1998, Walsh et al., 2001). Do sada su opisana dva fenotipa GISA sojeva: GISA u užem smislu reči, kod kojih je MIK za vankomicin i teikoplanin $> 4\text{mg/l}$ i heterogeni sojevi GISA (hGISA) kod kojih je MIK za vankomicin i teikoplanin $\leq 4\text{ mg/l}$, ali sadrže subpopulacije ćelija koji imaju MIK za vankomicin $> 4\text{ mg/l}$ (Garnier et al., 2006). Sa pojavom MRSA rezistentnih na vankomicin postavilo se pitanje koji je terapijski pristup najbolje primeniti u empirijskoj terapiji infekcija uzrokovanih ovim sojevima. Većina CA-MRSA još uvek pokazuje osetljivost na vankomicin, teikoplanin, gentamicin, klindamicin, trimetoprim-sufametoksazol (TMP-SMX), doksiciklin, minociklin, hloramfenikol, fluorohinolone, rifampin i linezolid (Maltezou i Goamarellou, 2006). Izbor antibiotika koji se primenjuju kao prva linija takođe zavisi i od tipa infekcije. Sepsa i invazivne infekcije (pneumonija, endokarditis, artritis i osteomijelitis) se empirijski leče vankomicinom, teikoplaninom i linezolidom (Falcone et al., 2009). Kod nekomplikovanih infekcija kože i potkožnih mekih tkiva najčešće se empirijski primenjuje TMP-SMX (Szumowski et al., 2007), kome se po potrebi dodaje rifampin koji vrši eliminaciju intracelularnih *S. aureus* (Krut et al., 2004). Iako većina MRSA sojeva pokazuje osetljivost na klindamicin, empirijska primena ovog leka nije pogodna zato što se inducibilna rezistencija na klindamicin ne detektuje rutinskim laboratorijskim testovima za ispitivanje osetljivosti na antibiotike (Lewis i Jorgensen, 2005). Veći problem u terapiji predstavljaju HA-MRSA sojevi koji ispoljavaju multirezistentan fenotip zahvaljujući prisustvu gena rezistencije koji se mogu prenositi između sojeva *S. aureus*. Infekcije uzrokovane ovim sojevima najčešće se leče kombinovanom antibiotskom terapijom ili novim antibioticima kao što su daptomicin, linezolid, tigeciklin i sl. Brojni antimikrobni agensi koji bi se potencijalno primenjivali u terapiji infekcija izazvanih multirezistentnim sojevima *S. aureus* se još uvek nalaze u fazi kliničkih ispitivanja.

1.5.1. Vankomicin i teikoplanin

Vankomicin i teikoplanin su glikopeptidni antibiotici koji vrše inhibiciju sinteze ćelijskog zida. Na mestu izlaska prekursora peptidoglikana kroz ćelijsku membranu molekul antibiotika se vezuje vodoničnom vezom za karboksilnu grupu terminalnog D-alanil-D-alanina. Zbog veličine molekula antibiotika vezanog za D-alanil-D-alanin onemogućen je pristup enzimima koji učestvuju u reakciji transglikozilacije, usled čega nastaje inhibicija sinteze peptidoglikana.

Vankomicin i teikoplanin imaju sličan spektar dejstva. Teikoplanin ima duže poluvreme eliminacije (83-168h), manje toksičnih neželjenih dejstava od vankomicina i može se primenjivati i intravenski i intramuskularno, ali je u terapiji sepse manje efikasan od vankomicina ili antistafilokoknih penicilina (Falcone et al., 2009). Klinička primena vankomicina je ograničena zbog pojave sojeva hGISA, vankomicin-intermedijerno osetljivih- (VISA) i vankomicin rezistentnih *S. aureus* (VRSA), a u terapiji sepse i endokarditisa zbog sporog kliničkog odgovora i prolongirane bakterijemije tokom upotrebe ovog leka (Levine et al., 1991). Empirijska upotreba vankomicina u terapiji bakterijemije i endokarditisa je udružena sa većom stopom mortaliteta (Garau et al., 2009).

1.5.2. Trimetoprim-sufametoksazol

Kombinacija sulfonamida sulfametoksazola sa trimetoprimom dovodi do inhibicije sinteze folne kiseline kod mikroorganizama na dva načina: sulfametoksazol je analog *p*-aminobenzeove kiseline i vrši kompetitivnu inhibiciju enzima dihidropteroat-sintetaze, a trimetoprim je pirimidinski analog koji inhibira sledeći korak u sintezi folata-enzim dihidrofolat reduktazu. Usled blokade sinteze folne kiseline dolazi do prekida sinteze purinskih i pirimidinskih nukleotida i sinteze bakterijske DNK. Sinergistički efekat ove kombinacije je baktericidan. Većina MRSA sojeva pokazuje osetljivost na TMP-SMX *in vitro* (Garau et al., 2009). Ovaj antibiotik se koristi kao alternativa klasičnoj terapiji kod bolesnika kod kojih postoji loša tolerancija na neki od aktivnijih lekova, kao što su glikopeptidi ili linezolid. Najčešće se primenjuje u terapiji hroničnog osteomijelitisa. Sepsa i apscesi izazvani MRSA sojevima nisu pogodni za lečenje TMP-SMX usled prisustva velikog broja bakterija i nekrotičnog tkiva u kome se oslobađa timidin koji inaktivira TMP-SMX.

1.5.3. Hloramfenikol

Hloramfenikol je bakteriostatski antibiotik koji inhibiše sintezu proteina. Ovaj antibiotik se vezuje za 50S subjedinicu bakterijskog ribozoma na mestima A2451 i A2452 na 23S rRNK, blokira aktivnost peptidil-transferaze, reakciju transpeptidacije i elongaciju polipeptidnog lanca. Osetljivost kliničkih izolata MRSA na hloramfenikol se kreće između 82-98% (Hoban et al., 2003; Cuevas et al., 2008). Klinička upotreba ovog leka u terapiji infekcija izazvanih MRSA sojevima je ograničena zbog izraženog toksičnog dejstva na koštanu srž i brojnih neželjenih efekata, tako da se ovaj antibiotik upotrebljava samo kada postoji rezistencija na sve druge antibiotike.

1.5.4. Tetraciklini

Tetraciklini su bakteriostatski antibiotici širokog spektra dejstva koji inhibišu sintezu proteina. Antibiotik se vezuje za 30S subjedinicu ribozoma, blokira pristup aminoacil-tRNK kompleksu RNK-ribozom i onemogućava dodavanje nove aminokiseline na polipeptidni lanac koji se sintetiše. Tetraciklini sa dugim dejstvom, kao što su doksiciklin i minociklin, pokazuju bolju antistafilokoknu aktivnost od tetraciklina (Garau et al., 2009). Do sada je pokazano da minociklin ima veću anti-MRSA aktivnost od doksiciklina *in vitro* (Minuth et al., 1974).

1.5.5. Streptogramini

Streptogramini se vezuju za 50S subjedinicu ribozoma i prekidaju sintezu proteina. Kvinupristin-dalfopristin je prva kombinacija streptogramina za parenteralnu upotrebu nastala kombinacijom hidrosolubilnih derivata streptogramina grupe B-pristinamicina I_A (kvinupristina) i streptogramina grupe A-pristinamicina II_A (dalfopristina). Vezivanje dalfopristina za 23S subjedinicu ribozoma dovodi do konformacione promene, što povećava afinitet za vezivanje kvinupristina. Dalfopristin inhibiše peptidil-transferazu i stvaranje peptidne veze tokom elongacije polipeptidnog lanca, dok kvinupristin dovodi do otpuštanja nekompletnog polipeptidnog lanca sa ribozoma (Hugo et al, 2007).

Kombinacija kvinupristin-dalfopristin *in vitro* ima baktericidan efekat na veliki broj MRSA sojeva. Ovaj lek takođe utiče na metabolizam drugih lekova u jetri putem blokade citohroma P450. Zbog brojnih neželjenih efekata koji se ispoljavaju u vidu flebitisa na mestu primene leka, reverzibilne artralgijske i mijalgijske i kožnih reakcija, ovaj antibiotik se najčešće primenjuje u terapiji infekcija kože i mekih tkiva uzrokovanih

MRSA sojevima i kao alternativna terapija u lečenju infekcija izazvanih VISA i VRSA (Garau et al., 2009).

1.5.6. Kombinovana antibiotska terapija u lečenju infekcija izazvanih MRSA sojevima

Lečenje infekcija izazvanih multirezistentnim sojevima MRSA najčešće podrazumeva kombinovanu antibiotsku terapiju u cilju postizanja sinergističkog efekta antibiotika. Do sada su dobar terapijski efekat pokazale kombinacije vankomicina sa aminoglikozidima i rifampinom i kombinacija fosfomicina sa imipenemom (Garau et al., 2009).

Kombinacija vankomicina sa gentamicinom je pokazala najbolji terapijski efekat kod većine infekcija koje su izazvane sa MRSA, uključujući i bakterijski endokarditis na veštačkim valvulama. Ova kombinacija dovodi do brzog nestanka bakterijemije i smanjenja broja metastatskih žarišta infekcije (Mulazimoglu et al., 1996). Kombinacije vankomicina sa rifampinom i fosfomicina sa imipenemom u terapiji endokarditisa su još uvek u fazi ispitivanja i nisu ušle u širu kliničku upotrebu (Garau et al., 2009).

1.5.7. Antibiotici novije generacije koji se koriste u terapiji infekcija izazvanih MRSA sojevima

1.5.7.1. Daptomicin

Daptomicin je lipopeptidni antibiotik koji deluje samo na Gram pozitivne bakterije. Ovaj antibiotik se vezuje za ćelijsku membranu preko fosfatidil-glicerolskog repa. Nakon vezivanja dolazi do stvaranja agregata daptomicina koji dovode do poremećaja zakrivljenosti ćelijske membrane i stvaranja otvora kroz koje slobodno cirkulišu joni. Kao krajnji rezultat nastaje depolarizacija ćelijske membrane, prekid sinteze makromolekula (proteina, DNK i RNK) i smrt ćelije (Pogliano et al., 2012). Osetljivost *S. aureus* na daptomicin je u korelaciji sa osetljivošću na vankomicin, sojevi *S. aureus* koji su osetljivi na vankomicin su u 97% slučajeva osetljivi i na daptomicin (Patel et al., 2006). Heterorezistencija *S. aureus* na vankomicin koja se razvija tokom dugotrajne upotrebe vankomicina je u korelaciji sa heterorezistencijom na daptomicin. VISA sojevi pokazuju smanjenu osetljivost na daptomicin, najverovatnije usled zadebljanja ćelijskog zida koji predstavlja fizičku barijeru za prolazak daptomicina i vezivanje za ćelijsku membranu stafilokoka (Cui et al., 2006). Za razliku od vankomicina, baktericidni efekat

daptomicina je dozno zavisna, ima duži post-antibiotski efekat i deluje na MRSA i u stacionarnoj, a ne samo u eksponencijalnoj fazi rasta (Garau et al., 2009).

Daptomicin je lek izbora u terapiji bolesnika koji su intolerantni na vankomicin ili imaju infekciju uzrokovanu VISA ili VRSA sojevima koji su osetljivi na daptomicin. Ovaj antibiotik nije pogodan za terapiju pneumonija izazvanih MRSA sojevima zato što ga inaktivira plućni surfaktant. Najbolji terapijski efekat se postiže kod infekcija kože i potkožnog tkiva, endokarditisa desne polovine srca i bakterijemije udružene sa ovim bolestima (European Medicines Agency, 2006).

1.5.7.2. Linezolid

Linezolid spada u klasu oksazolidinona, lekova koji inhibišu sintezu proteina sprečavanjem formiranja inicijalnog kompleksa koji se sastoji od tRNA, mRNA i 30S i 50S subjedinice ribozoma. Ovaj antibiotik se vezuje za 23S komponentu 50S subjedinice ribozoma, što dovodi do promene mesta za vezivanje rRNA i izostanka formiranja funkcionalnog 70S inicijalnog kompleksa (Herrmann et al. 2008). Linezolid deluje bakteriostatski na *S. aureus* i koristi se kao alternativna terapija u lečenju infekcija uzrokovanih MRSA i VRSA sojevima. Dugotrajna klinička upotreba ovog leka nije preporučljiva zbog ozbiljnih neželjenih efekata kao što su supresija koštane srži, trombocitopenija, periferna neuropatija i neuropatija optičkog nerva. Zbog jedinstvenog mehanizma dejstva do sada nije uočena unakrsna rezistencija na linezolid sa drugim antibioticima (Garau et al., 2009).

1.5.7.3. Tigeciklin

Tigeciklin je novi lek koji predstavlja strukturni derivat minociklina. On pripada grupi glicilciklina, antibiotika koji imaju tetraciklinsko jezgro sa supstituisanim dugim bočnim lancem (9-tert-butil-glicilamid) na položaju 9 D prstena (Pankey, 2005). Bočni lanac sterički ometa aktivni efluks leka pa ne dolazi do razvoja rezistencije na tigeciklin. Tigeciklin ima bakteriostatski efekat prema MRSA, dok je antimikrobna aktivnost prema VISA i VRSA do sada pokazana *in vitro* (Chopra, 2001). Klinička upotreba ovog antibiotika je opravdana kod lakih ili umereno teških infekcija kože i potkožnog tkiva i komplikovanih abdominalnih infekcija, dok ne postoje podaci o upotrebi tigeciklina kod sepse i endokarditisa uzrokovanih MRSA sojevima (Garau et al., 2009).

Novi antibiotici koji se koriste kao poslednja linija terapije kod multirezistentnih MRSA sojeva, ili su još uvek u fazi kliničkih ispitivanja, su polusintetski lipoglikopeptidi

(telavancin, dalbavancin i oritavancin), everninomicin, lizostafin, iklaprim i ceftobiprol (Kollef, 2009; Falcone et al., 2009).

1.5.7.4. Telavancin je derivat vankomicina. On deluje baktericidno na MRSA sojeve na dva načina: inhibicijom sinteze ćelijskog zida i poremećajem integriteta ćelijske membrane. Poluvreme eliminacije iz plazme iznosi 7h. Koristi se u terapiji komplikovanih infekcija kože i mekih tkiva (Higgins et al., 2005).

1.5.7.5. Dalbavancin pripada drugoj generaciji polusintetskih lipoglikopeptida. Ima dugo poluvreme eliminacije iz plazme (7 dana) pa se daje u dve doze sa razmakom od nedelju dana. Odobren je za terapiju infekcija kože i mekih tkiva koje su uzrokovane MRSA sojevima (Falcone et al., 2009).

1.5.7.6. Oritavancin takođe pripada drugoj generaciji polusintetskih lipoglikopeptida. Ovaj antibiotik ima brz i snažan baktericidan *in vitro* efekat prema multirezistentnim sojevima Gram pozitivnih bakterija. Poluvreme eliminacije iz plazme je nešto duže od dalbavancina (195h). Upotreba oritavancina u terapiji infekcija uzrokovanih MRSA sojevima je u fazi III kliničkih ispitivanja (Belley et al., 2010).

1.5.7.7. Everninomicin pripada grupi oligosaharidnih antibiotika iz familije everninomicina sa dobrom antimikrobnom aktivnošću protiv multirezistentnih sojeva Gram pozitivnih bakterija. Bakteriostatski efekat everninomicina nastaje nakon vezivanja leka za L16 protein ribozoma što dovodi do inhibicije sinteze proteina. Ovaj lek ima snažno antibakterijsko dejstvo na MRSA sojeve ali je njegova terapijska upotreba ograničena zbog izražene toksičnosti (Terakubo et al., 2001; Falcone et al., 2009).

1.5.7.8. Lizostafin je glicil-glicin endopeptidaza koja vrši presecanje pentaglicinskih mostova u ćelijskom zidu stafilokoka. Antimikrobna aktivnost prema MRSA sojevima je dokazana *in vitro* i *in vivo* u modelu zečijeg MRSA endokarditisa i keratitisa (Falcone et al., 2009). Novija istraživanja ukazuju na potencijalnu terapijsku primenu lizostafina u tretmanu stafilokoknih infekcija udruženih sa stvaranjem biofilma (Aguinaga et al., 2011).

1.5.7.9. Iklaprim je inhibitor dihidrofolat-reduktaze. Ostvaruje brz baktericidan efekat prema MRSA, VRSA i sojevima *S. aureus* rezistentnim na TMP. Ovaj lek se dobro

podnosi uz minimalna neželjena dejstva pa je ušao u III fazu kliničkih ispitivanja (Falcone et al., 2009).

1.5.7.10. Ceftobiprol je novi cefalosporin pete generacije sa širokim spektrom dejstva (Kollef, 2009). Ovaj antibiotik ima dobru antimikrobnu aktivnost prema MRSA sojevima zato što ima visok afinitet vezivanja za PBP2' i stabilan je prema dejstvu β -laktamaza. Trenutno se nalazi u fazi III kliničkih ispitivanja (Kollef, 2009; Falcone et al., 2009).

1.6. Antimikrobna aktivnost halkona

Brz razvoj rezistencije stafilokoka na nove antimikrobne agense i interhumano širenje rezistentnih sojeva su glavni terapijski problemi današnjice. Iz tog razloga je neophodno razviti nove agense koji bi imali ulogu u prevenciji ili lečenju stafilokoknih infekcija, kao samostalni antimikrobni agensi ili kao adjuvantna terapija konvencionalnim antibioticima. Brojne studije se poslednjih godina bave uticajem različitih jedinjenja na patogeni potencijal ili specifične faktore virulencije različitih mikroorganizama. Najveći deo ovih istraživanja bavi se ispitivanjem uticaja različitih jedinjenja dobijenih iz prirodnih izvora, kao što je biljni svet, ili jedinjenja dobijenih sintetskim putem.

Antimikrobna aktivnost biljnih proizvoda je najčešće uslovljena prisustvom malih molekula kao što su terpenoidi, flavonoidi i polifenoli (Mahady, 2005). Tokom poslednje decenije nekoliko studija je detaljno opisalo antimikrobnu aktivnost flavonoida (Nowakowska, 2007; Batovska i Todorova Todorova, 2010; Cushnie i Lamb, 2011). Halkoni spadaju u grupu flavonoida, jedinjenja koja se mogu izolovati iz prirodnih izvora kao što su biljke, voće i povrće. Osim halkona koji se izoluju iz prirodnih izvora, brojna jedinjenja se mogu dobiti u laboratorijskim uslovima metodama klasične i kombinatorne sinteze. Hemijska struktura halkona se sastoji od dva aril prstena koja su povezana α,β -nezasićenim ketonom. Dosadašnja istraživanja su pokazala da različiti halkoni ispoljavaju širok spektar bioloških aktivnosti kao što su antibakterijska, antivirusna, antigljivična, antiangiogena, antitumorska, antiproliferativna i antiinflamatorna (Nowakowska, 2007; Mojzic et al., 2008; Kontogiorgis et al., 2008; Boumendjel et al., 2009; Batovska i Todorova Todorova, 2010).

Precizan mehanizam antibakterijskog dejstva halkona do sada nije utvrđen, ali se smatra da njihova antimikrobna aktivnost zavisi od hemijske strukture molekula (Nielsen et al., 2005; Nowakowska, 2007; Batovska i Todorova Todorova, 2010). Osim ispitivanja antimikrobnog efekta halkona, novija istraživanja se bave sinergizmom između flavonoida/halkona i antibiotika koji se koriste kao konvencionalna terapija u lečenju infekcija prouzrokovanih sa *S. aureus* (Williamson, 2001; Hemaiswarya et al., 2008; Talia et al., 2011; Tran et al., 2012).

Na osnovu pregleda dostupne literature sa sigurnošću se može zaključiti da nema podataka o ispitivanju osetljivosti MRSA sojeva na tri sintetisana halkona: Bis-(2-hydroxy-phenyl)-propenona, 3-(3-Hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenona i 3-(4-Hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenona, kao ni o ispitivanju uticaja ovih jedinjenja na fiziološko-biohemijske karakteristike i ekspresiju faktora virulencije MRSA sojeva.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U skladu sa prethodno iznetim, formulisani su sledeći ciljevi istraživanja :

1. Identifikacija izolovanih sojeva *S. aureus* konvencionalnim metodama, komercijalnim automatizovanim sistemom i molekularnim metodama i dokazivanje rezistencije na meticilin.
2. Genotipizacija izolovanih MRSA sojeva:
 - PFGE tipizacija;
 - određivanje *SCCmec* tipa;
 - određivanje *agr* tipa;
 - određivanje *spa* tipa i grupisanje dobijenih *spa* tipova u *spa* klonske komplekse (CC);
 - analiza genoma na prisustvo gena koji kodiraju sintezu *Panton-Valentin leukocidina*.
3. Ispitivanje osetljivosti MRSA sojeva na antibiotike i hemioterapeutike sa različitim mehanizmom dejstva.
4. Ispitivanje ekspresije faktora virulencije izolovanih MRSA sojeva (produkcije glikokaliksa, formiranja biofilma, vezivanja za humani fibronektin i produkcije hemolizina).
5. Ispitivanje osetljivosti MRSA sojeva na tri sintetisana halkona:
Bis-(2-hydroxy-phenyl)-propenona,
3-(3-Hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenona i
3-(4-Hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenona.

6. Ispitivanje *in vitro* uticaja halkona na:
 - biohemijsko-fiziološke osobine MRSA sojeva;
 - ekspresiju faktora virulencije (produkciju glikokaliksa, produkciju biofilma i vezivanje za humani fibronektin);
 - produkciju stafilokoknih hemolizina.

7. Ispitivanje efekta kombinovane primene halkona i antibiotika sa različitim mehanizmima delovanja na rast izolovanih MRSA sojeva.

3. MATERI JAL I METODE

3.1. Poreklo i izolacija MRSA sojeva

Klinički izolati MRSA sojeva su prikupljeni u periodu od januara do juna 2007. godine u mikrobiološkim laboratorijama u Srbiji. Sakupljan je jedan MRSA soj po pacijentu. Za svaki prikupljen soj je popunjavao upitnik sa osnovnim podacima o pacijentu, zdravstvenoj ustanovi u kojoj je pacijent hospitalizovan ili ambulantno lečen i mikrobiološkoj laboratoriji koja vrši analizu uzorka. Drugi deo upitnika odnosio se na podatke o uzorku iz koga je izolovan MRSA soj, načinu identifikacije soja i ispitivanju osetljivosti na antimikrobne agense. Nakon izolacije sojevi su poslani Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Svi sojevi MRSA su čuvani na -70°C u triptikaza-soja bujonu (TSB, LabM Ltd., Velika Britanija) sa dodatkom 12.5% sterilnog glicerola. Pre eksperimenata sojevi su odmrznuti i presejani na triptikaza-soja agar (TSA, LabM Ltd.) i kultivisani u aerobnim uslovima tokom 18-24h na 35°C .

Kao pozitivna kontrola rezistencije na meticilin u eksperimentima je korišćen kontrolni soj meticilin-rezistentnog *S. aureus* ATCC 43300 (KWIK-STIKTM, Microbiologics, SAD).

3.2. Identifikacija MRSA sojeva

Izolovani MRSA sojevi su identifikovani konvencionalnim metodama, komercijalnim automatizovanim sistemom za identifikaciju i molekularnim metodama. Identifikacija sojeva konvencionalnim metodama je izvršena u primarnim laboratorijama koje su primile uzorak na mikrobiološku analizu a potvrda tačnosti identifikacije je izvršena na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu komercijalnim metodama i PCR metodom.

3.2.1. Identifikacija sojeva konvencionalnim metodama

Pripadnost vrsti *S. aureus* određena je na osnovu morfoloških osobina analiziranih na preparatu bojenom po Gramu, kulturelnih osobina, testovima slobodne koagulaze (u epruveti) i/ili vezane koagulaze (na pločici) ili latex aglutinacionim testom (Slidex Staph Plus, bioMérieux, Francuska).

Rezistencija na meticilin je određena disk difuzionim metodom antibiograma pomoću tableta ili diskova meticilina (1 μ g) (Torlak, Beograd, Srbija), oksacilina (1 μ g) (Becton Dickinson Diagnostic Systems, SAD) ili cefoksitina (30 μ g) (Becton Dickinson).

3.2.2. Identifikacija sojeva komercijalnim automatizovanim sistemom

Identifikacija sojeva *S. aureus* izvršena je VITEK 2 ID karticama za Gram pozitivne mikroorganizme (VITEK 2 GP, bioMérieux). GP kartica sadrži udubljenja sa odgovarajućim supstratima za detekciju 43 biohemijske osobine navedene u Tabeli 5. Bakterijska suspenzija je podešena pomoću denzitometra (VITEK Densichek, bioMérieux) sa rastvorom 0.45% NaCl na gustinu od 0.5 po McFarland standardu. Svaka test kartica je automatski napunjena bakterijskom suspenzijom i inkubirana tokom 3h u VITEK aparatu. Tokom ovog perioda, svakih 15 minuta je automatski očitavano oslobađanje fluorescencije koja nastaje kao posledica razgradnje supstrata usled rasta mikroorganizama u odgovarajućim udubljenjima kartice. Analiza podataka urađena je automatski pomoću VITEK 2 softvera, nakon čega su dobijeni rezultati za svaki soj.

Tabela 5. Biohemijske osobine na osnovu kojih je izvršena identifikacija MRSA sojeva VITEK 2 GP karticom

polje	test	skraćena	količina po polju
2	D-amigdalín	AMY	0.1875 mg
4	Fosfatidilinozitol fosfolipaza C	PIPLC	0.015 mg
5	D-ksiloza	dXYL	0.3 mg
8	Arginin dihidrolaza 1	ADH1	0.111 mg
9	Beta-galaktozidaza	BGAL	0.036 mg
11	Alfa-glukozidaza	AGLU	0.036 mg
13	Ala-Phe-Pro arilamidaza	APPA	0.0384 mg
14	Ciklodekstrin	CDEX	0.3 mg
15	L-Aspartat arilamidaza	AspA	0.024 mg
16	Beta-galaktopiranozidaza	BGAR	0.00204 mg
17	Alfa-manozidaza	AMAN	0.036 mg
19	Fosfataza	PHOS	0.0504 mg
20	Leucin arilamidaza	LeuA	0.0234 mg
23	L-Prolin arilamidaza	ProA	0.0234 mg
24	Beta-glukuronidaza	BGURr	0.0018 mg
25	Alfa-galaktozidaza	AGAL	0.036 mg
26	L-Pirolidonil-arilamidaza	PyrA	0.018 mg
27	Beta.glukuronidaza	BCUR	0.0378 mg
28	Alanin arilamidaza	AlaA	0.0216 mg
29	Tirozin arilamidaza	TyrA	0.0276 mg
30	D-sorbitol	dSOR	0.1875 mg
31	Ureaza	URE	0.15 mg
32	rezistancija na POLIMIKSIN B	POLYB	0.00093 mg
37	D-galaktoza	dGAL	0.3 mg
38	D-riboza	dRIB	0.3 mg
39	L-laktat alkalinizacija	ILATk	0.15 mg
42	Laktoza	LAC	0.96 mg
44	N-Acetil-D-Glukozaamin	NAG	0.3 mg
45	D-Maltoza	dMAL	0.3 mg
46	rezistancija na BACITRACIN	BACI	0.0006 mg
47	rezistancija na NOVOBIOCIN	NOVO	0.000075 mg
50	rast u prisustvu 6.5% NaCl	NC6.5	1.68 mg
52	D-Manitol	dMAN	0.1875 mg
53	D-Manoza	dMNE	0.3 mg
54	Metil-B-D-Glukopiranozid	MBdG	0.3 mg
56	Pululan (α -1,4- ; α -1,6-glukan)	PUL	0.3 mg
57	D-Rafinoza	dRAF	0.3 mg
58	rezistancija na 0/129 (comp. vibrio.)	0129R	0.0084 mg
59	Salicin	SAL	0.3 mg
60	Saharoza	SAC	0.3 mg
62	D-Trehaloza	dTRE	0.3 mg
63	Arginin dihidrolaza 2	ADH2S	0.27 mg
64	rezistancija na OPTOHIN	OPTO	0.000399 mg

3.2.3. Identifikacija sojeva molekularnim metodama

Klinički izolati MRSA su identifikovani PCR metodom detekcijom *nuc* i *mecA* gena. Ispitivanje je izvršeno radi potvrde fenotipske identifikacije izolata kao MRSA.

3.2.3.1. Ispitivanje prisustva *nuc* gena

Prisustvo *nuc* gena (gena za termonukleazu) koji je specifičan za vrstu *S. aureus* ispitano je PCR metodom prema protokolu Brakstad i sar. (1992). Kao pozitivna kontrola je korišćen *S. aureus* NCTC 8325, a kao negativna kontrola *S. sciuri* NCTC 12103.

3.2.3.2. Ispitivanje prisustva *mecA* gena

Prisustvo *mecA* gena je ispitano PCR metodom u skladu sa protokolom Bignardi i sar. (1996). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *S. aureus* C1 a kao negativna soj *S. aureus* NCTC 8325.

3.3. Genotipizacija izolovanih MRSA sojeva

3.3.1. PFGE tipizacija

Analiza klonske povezanosti i klonske diseminacije izolovanih sojeva MRSA je izvršena PFGE metodom prema Bannerman i sar. (1995). Ovom metodom su bakterijske ćelije lizirane *in situ* u agarozu gelu, nakon čega je urađena makrorestrikcija hromozomske DNK sa 30U *Sma*I endonukleazom na 30°C u toku 3h. Razdvajanje DNK fragmenata je izvršeno elektroforezom u pulsnom električnom polju pomoću CHIEF-DR II sistema (BioRad, Hemel Hempstead, Velika Britanija) koji menja smer struje prema zadatom programu: početni interval 5s i završni interval 35s u ukupnom trajanju od 23h na 17°C. Nakon elektroforeze, gelovi su obojeni rastvorom etidijum-bromida (1 µl/ml) tokom 30 min, pregledani u komori pod UV zracima i fotografisani.

Dobijeni PFGE profili su analizirani prema kriterijumu Tenovera i sar. (1995) (Tabela 6).

Rezultati dobijeni PFGE metodom analizirani su u NTSys pc ver. 2.02g (Exeter Software Ltd., SAD) i BioNumerics ver. 3.50 (Applied Maths, Belgija). PFGE pulsotipovi su označavani prema abecednom redosledu. Blisko srodni i verovatno

srodni PFGE profili predstavljali su podtipove PFGE pulсотипа i označavani su arapskim brojem kao sufiksom (Tenover et al., 1995).

Tabela 6. Određivanje PFGE tipa prema kriterijumu Tenover i sar. (1995)

Kategorija	Razlika u broju fragmenata u odnosu na glavni soj	Tipičan broj fragmenata za razlikovanje od glavnog soja	Epidemiološka interpretacija
Ne mogu se razlikovati	0	0	Izolat je deo epidemije
Blisko srodni	1	2-3	Izolat je verovatno deo epidemije
Verovatno srodni	2	4-6	Izolat je mogući deo epidemije
Različiti	≥ 3	≥ 7	Izolat nije deo epidemije

3.3.2. Određivanje SCCmec tipa

Kod kliničkih sojeva MRSA SCCmec tip je analiziran PCR metodom prema preporučenom protokolu (Kondo et al., 2007). Kontrolni sojevi za SCCmec tipove su bili sledeći:

NCTC10442 za tip I SCCmec

MRSA soj N315 za tip II SCCmec

MRSA soj 85/2082 za tip III SCCmec

MRSA soj MR108 za tip IV SCCmec

MRSA soj WIS-JCSC3624 za tip V SCCmec

3.3.3. Određivanje agr tipa

Kod kliničkih izolata MRSA određivanje agr tipa je izvršeno PCR metodom prema protokolu Lina i sar. (2003). Kao kontrolni sojevi korišćeni su:

S. aureus RN6390 za agr 1

S. aureus RN6923 za agr 2

S. aureus RN8462 za agr 3

S. aureus A880740 za agr 4

Za analizu značajnosti korelacije između *agr* tipa i količine produkovanog biofilma korišćen je ANOVA test. Granicom statističke značajnosti smatrana je verovatnoća od 0.05 ($p < 0.05$).

3.3.4. Određivanje *spa* tipa

Određivanje *Staphylococcus aureus* protein A (*spa*) tipa kod kliničkih sojeva MRSA izvršeno je prema protokolu Harmsen i sar. (2003). Dobijeni *spa* tipovi grupisani su u *spa* klonske komplekse (CC) pomoću algoritma baziranog na obrascu ponavljanja (eng. based upon repeat pattern, BURP) sa Ridom Staph-Type 1.4 softverom (<http://www.ridom.de>).

3.3.5. Detekcija gena koji kodiraju sintezu *Panton-Valentin leukocidina*

Da bi se ispitao patogeni potencijal kliničkih izolata MRSA određeno je prisustvo *lukS*-PV i *lukF*-PV gena koji kodiraju sintezu PVL pomoću PCR metode prema protokolu Lina i sar. (1999).

3.4. Ispitivanje osetljivosti MRSA na antibiotike i hemioterapeutike

Ispitivanje osetljivosti MRSA na antibiotike i hemioterapeutike izvršeno je agar difuzionim metodom i automatizovanim sistemom.

3.4.1. Ispitivanje osetljivosti na antibiotike agar difuzionim metodom antibiograma

Agar difuzioni metod je izvršen prema preporukama CLSI (CLSI, 2007) na Müeller-Hinton agaru (Oxoid Limited, Basingstoke, Hampshire, Velika Britanija) sa antibioticima iz grupe aminoglikozida; makrolida, linkozamida i streptogramina (MLS); tetraciklina i hloramfenikolom (BioRad, Hercules, California, SAD) (Tabela 7).

Za ispitivanje inducibilne rezistencije na makrolide, linkozamide i streptogramin B (MLS_B) urađen je D-test prema preporukama CLSI. Diskovi eritromicina i klindamicina

su postavljeni na rastojanju od 20 mm. Rezultat je očitao nakon 24h inkubacije na 35°C u aerobnim uslovima. Pozitivnu inducibilnu rezistenciju MLS_B tipa je označavala pojava „D“ oblika zone inhibicije rasta oko diska klindamicina u prisustvu eritromicina.

Tabela 7. Spisak antibiotika kojima je izvršeno ispitivanje osetljivosti MRSA sojeva agar difuzionim metodom

AMINOGLIKOZIDI	MLS	TETRACIKLINI
Amikacin (30 µg)	Linkomicin (15 µg) ¹	Tetraciklin (30 µg)
Gentamicin (10 µg)	Klindamicin (2 µg) ¹	Doksiciklin (30 µg)
Kanamycin (30 µg)	Eritromicin (15 µg) ²	Minociklin (30 µg)
Tobramicin (10 µg)	Klaritromicin (15 µg) ²	
Netilmicin (30 µg)	Azitromicin (15 µg) ³	OSTALI
Streptomycin (10 µg)	Spiramicin (100 µg) ⁴	Hloramfenikol (30 µg)
	Pristinamicin (15 µg) ⁵	

¹linkozamidi; ²14-člani makrolidi, ³15-člani makrolid, ⁴16-člani makrolid; ⁵streptogramin

3.4.2. Ispitivanje osetljivosti na antibiotike automatizovanim sistemom

Osetljivost MRSA na antibiotike je ispitana automatizovanim sistemom pomoću VITEK2 kartica AST-P580 (bioMérieux). AST kartice sadrže ukupno 62 udubljenja sa supstratima za ispitivanje osetljivosti bakterija na 19 antibiotika (57 udubljenja), 3 udubljenja za detekciju mehanizama rezistencije na cefoksitin i klindamicin, udubljenje za pozitivnu kontrolu na oksacilin i udubljenje za pozitivnu kontrolu rasta (Tabela 8). Bakterijska suspenzija je podešena na gustinu od 0.5 po McFarland standardu sa rastvorom 0.45% NaCl pomoću denzitometra (VITEK Densichek, bioMérieux). Svaka test kartica je automatski napunjena bakterijskom suspenzijom i inkubirana tokom 3h u VITEK aparatu. Tokom ovog perioda, svakih 15 minuta je automatski očitavano oslobađanje fluorescence koja nastaje kao posledica razgradnje supstrata usled rasta mikroorganizama u odgovarajućim udubljenjima kartice. Analiza podataka urađena je automatski pomoću VITEK 2 softvera, nakon čega su dobijeni rezultati za svaki soj.

Tabela 8. Spisak antibiotika VITEK AST-P580 kartice pomoću kojih je izvršeno ispitivanje osetljivosti MRSA sojeva na antibiotike automatizovanim sistemom

KLASA ANTIBIOTIKA	GENERIČKO IME LEKA	MIK (µg/ml)	broj polja
Penicilini	Benzilpenicilin	0.03 - 0.5	3
Detekcija mehanizama rezistencije	Cefoksitin skrining	+/-	1
Linkozamidi	Klindamicin	0.25 - 8	3
Makrolidi	Eritromicin	0.25 - 8	3
Drugi	Fosfomicin	8 - 128	2
Drugi	Fuzidinska kiselina	0.5 - 32	3
Aminoglikozidi	Gentamicin	0.5 - 16	3
Detekcija mehanizama rezistencije	Inducibilna rezistencija na klindamicin	+/-	2
Fluorohinoloni	Levofloksacin	0.125 - 8	3
Oksazolidin	Linezolid	0.5 - 8	3
Fluorohinoloni	Moksifloksacin	0.25 - 8	3
Drugi	Mupirocin	2 - 8	1
Drugi	Nitrofurantoin	16 - 512	3
Izoksazolil penicilini	Oksacilin	0.25 - 4	3
Drugi	Rifampicin	0.5 - 32	3
Glikopeptidi	Teikoplanin	0.5 - 32	4
Tetraciklini	Tetraciklin	1 - 16	3
Glicilciklini	Tigeciklin	0.12 - 2	3
Aminoglikozidi	Tobramicin	1-16	3
Drugi	Trimetoprim/Sulfametoksazol	10 - 320	3
Glikopeptidi	Vankomicin	0.5 - 32	5
Pozitivna kontrola V2			1
Pozitivna kontrola-oksacilin			1

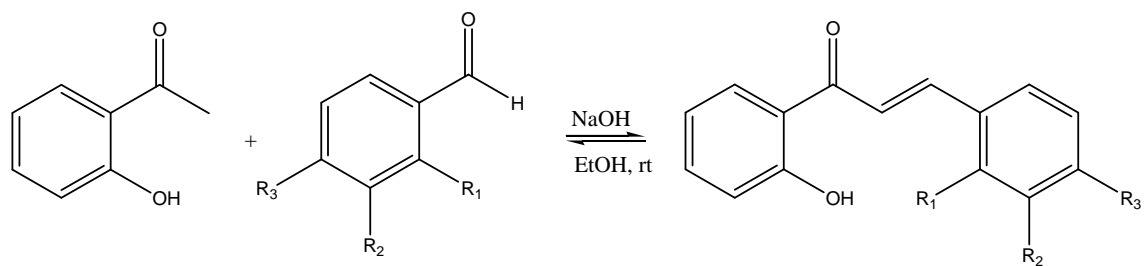
3.5. Halkoni

U ovoj studiji je ispitana antimikrobna aktivnost tri novosintetisana halkona: Bis-(2-hydroxy-phenyl)-propenona (u daljem tekstu O-OH), 3-(3-Hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenona (u daljem tekstu M-OH) i 3-(4-Hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenona (u daljem tekstu P-OH). Sve testirane supstance su sintetisane na Katedri za farmaceutsku hemiju i strukturnu analizu Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

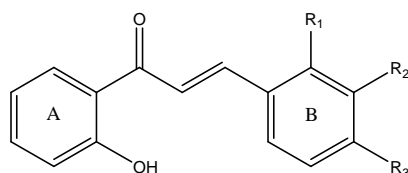
Halkoni su dobijeni Claisen-Schmidt kondenzacijom *orto*, *meta* ili *para* hidroksi substituisanih benzaldehida sa 2-hidroksi acetofenonima. Sve sintetisane supstance su dalje okarakterisane infra-crvenom spektroskopijom (eng. Infra Red spectroscopy, IR), NMR spektroskopijom (eng. Nuclear Magnetic Resonance – NMR spectroscopy) i masenom spektrometrijom (MS). Čistoća supstanci je proverena hromatografijom pod visokim pritiskom (eng. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) i hromatografijom na tankom sloju (eng. Thin Layer Chromatography, TLC).

Sinteza i strukture novosintetisanih halkona su predstavljene na Figuri 1.

U toku eksperimenata ispitani halkoni su rastvarani u sterilnom dimetilsulfoksidu (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Company Inc, SAD) u koncentraciji 1000 µg/ml a zatim su rastvori dalje razblaženi u odgovarajućem medijumu do radnih koncentracija.



a)



Halkon	R1	R2	R3
O-OH	- OH	- H	- H
M-OH	- H	- OH	- H
P-OH	- H	- H	- OH

b)

Figura 1. a) sinteza i b) hemijska struktura testiranih halkona:

1,3- Bis-(2-hydroxy-phenyl)-propenon (O-OH),

3-(3-Hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenon (M-OH) i

3-(4-Hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenon (P-OH).

3.5.1. Ispitivanje osetljivosti MRSA sojeva na halkone

Osetljivost MRSA sojeva na halkone je određena bujon-mikrodilucionim testom. Nakon rastvaranja supstanci u DMSO do koncentracije 1000 µg/ml, halkoni su razblaženi u moždano-srčanom infuzionom bujonu (*eng.* Brain heart infusion broth, BHI, Lab M Limited, Velika Britanija) do radnih koncentracija u opsegu 3.1 – 200.0 µg/ml.

Svakom razblaženju je dodato 10 µl/ml 2,3,5 trifenil tetrazolijum hlorida (TTC, Sigma-Aldrich) koji je redoks indikator koji se koristi za detekciju ćelijske respiracije i samim tim za diferenciranje metabolički aktivnih od metabolički neaktivnih ćelija. Pod uticajem ćelijskih dehidrogenaza dolazi do enzimske redukcije TTC koji je bezbojan do 1,3,5 trifenilformazana (TFF) koji je crvene boje. Enzimska redukcija TTC je predstavljena na Figuri 2.

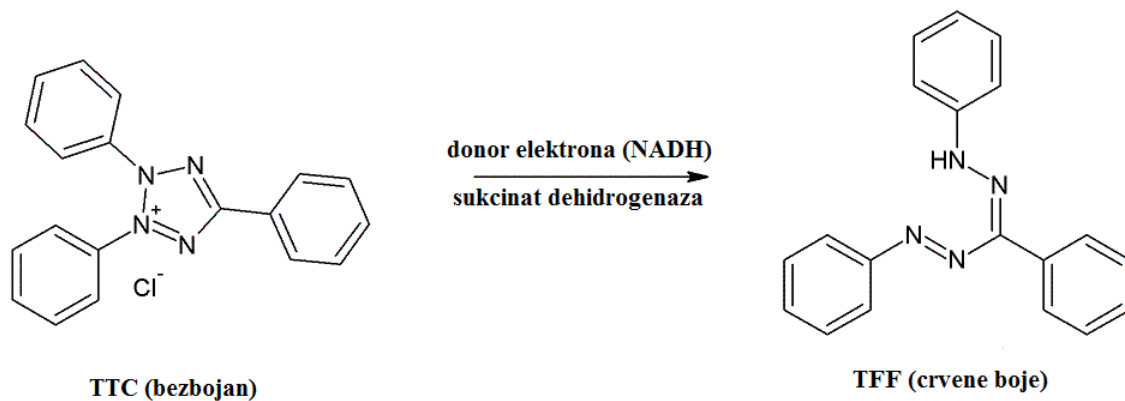


Figura 2. Enzimska redukcija trifenil tetrazolijum hlorida pod uticajem ćelijskih dehidrogenaza

U mikrotitracionu ploču sa 96 mesta sa ravnim dnom (Starstedt, SAD) je dodato po 180 µl razblaženja halkona u triplikatima i po 20 µl bakterijske suspenzije gustine 0.5 po McFarland standardu. Kao pozitivna kontrola su postavljena dva triplikata bakterija u BHI bujonu bez dodatka halkona. Nakon 24h kultivacije u termostatu na 35°C u aerobnim uslovima očitana je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). Kao vrednost MIK je uzeta najmanja koncentracija halkona u kojoj je boja medijuma ostala nepromenjena (žuta). Svaki eksperiment je ponovljen tri puta.

Minimalna baktericidna koncentracija je određena presejavanjem svake koncentracije halkona u kojoj je boja medijuma ostala nepromenjena na TSA. Nakon 24h kultivacije na 35°C MBK je određena kao najmanja koncentracija halkona koja je imala baktericidan efekat.

3.5.2. Ispitivanje uticaja halkona na biohemijske osobine MRSA sojeva i osetljivost na antibiotike

Uticaj halkona na biohemijske osobine MRSA i osetljivost na antibiotike je ispitan automatizovanim sistemom pomoću VITEK2 GP i AST-P580 kartica, kao što je prethodno opisano. MRSA sojevi su kultivisani sa subinhibitornim koncentracijama halkona (0.5 x MIK) u pločama sa 24 mesta (Sarstedt, SAD). Razblaženja halkona su napravljena u 2 ml TSB, nakon čega je dodat bakterijski inokulum gustine 0.5 po McFarland standardu. Bakterije su inkubirane u aerobnim uslovima na 35°C tokom 24h, nakon čega su presejane na TSA. Nakon 24h inkubacije na 35°C, ispitan je uticaj halkona na biohemijske osobine i osetljivost na antibiotike. Kao pozitivna kontrola postavljene su bakterije kultivisane pod istim uslovima samo u medijumu. Svaki test je ponovljen tri puta.

3.5.3. Ispitivanje uticaja halkona na ekspresiju faktora virulencije MRSA sojeva

Na izolovanim MRSA sojevima je ispitan *in vitro* uticaj halkona na ekspresiju sledećih faktora virulencije: produkciju glikokaliksa, produkciju biofilma, adherenciju MRSA za humani fibronektin i produkciju stafilokoknih hemolizina.

3.5.3.1. Ispitivanje uticaja halkona na produkciju glikokaliksa

Produkcija glikokaliksa je ispitana primenom Kongo-crveno agar metoda (eng. Congo red agar method; CRA) prema Freeman i sar. (1989), i Christensenovog metoda (Christensen et al., 1982).

Za detekciju uticaja halkona na produkciju glikokaliksa korišćene su subinhibitorne koncentracije halkona (0.5 x MIK) utvrđene bujon-mikrodilucionim testom koji je prethodno opisan. Razblaženja halkona su napravljena u TSB. Bakterijski inokulum gustine 0.5 po McFarland standardu je inkubiran u aerobnim uslovima na 35°C u 2 ml razblaženja halkona u pločama sa 24 mesta (Sarstedt) za izvođenje CRA metoda, ili u plastičnim mikrotubama (Eppendorf, Nemačka) za Christensenov metod. Kao pozitivna kontrola postavljene su bakterije kultivisane pod istim uslovima samo u medijumu bez prisustva halkona. Svaki test je ponovljen tri puta.

3.5.3.1.1. Congo red agar metod

Nakon 24h ili 48h kultivacije u prisustvu halkona, bakterije su presejane na agar ploče sa 20 ml BH agara (Himedia, Indija) kome je dodato 5% saharoze i 0.08% Kongo crvene boje (Fisher scientific, Velika Britanija). Ploče su inkubirane 24h na 35°C u aerobnim uslovima nakon čega su očitani rezultati prema sledećem kriterijumu (Freeman et al., 1989; Cree et al., 1995):

Pozitivan rezultat (produkcija glikokaliksa): prisustvo suvih, crnih kolonija kristalnog izgleda

Negativan rezultat (nema produkcije glikokaliksa): prisustvo vlažnih ružičastih kolonija

Nedefinisan rezultat: prisustvo tamnijih, manje suvih kolonija bez kristalnog izgleda.

3.5.3.1.2. Christensenov metod

Nakon 48h kultivacije bakterija u statičnim uslovima, sadržaj plastičnih mikrotuba je pažljivo odličen nakon čega je u svaku dodat 1 ml 0.4% vodenog rastvora tripan plavog (BDH chemicals Ltd., Velika Britanija). Tube su pažljivo rotirane da bi se obezbedilo uniformno bojenje glikokaliksa i nakon odlivanja boje i sušenja na vazduhu očitani su rezultati. Prisustvo obojenog taloga u donjoj trećini epruvete je kategorisano kao pozitivna produkcija glikokaliksa. Odsustvo obojenog taloga na dnu epruvete ili prisustvo obojenog prstena na prelazu između vazduha i medijuma, ili u gornjoj trećini epruvete tumačeno je kao negativan rezultat (Christensen et al., 1982; Freeman et al., 1989).

3.5.3.2. Ispitivanje uticaja halkona na produkciju biofilma

Sposobnost produkcije biofilma je ispitana u mikrotitracionim pločama sa 96 mesta prema protokolu Stepanovića i sar. (2007). Jedna kolonija prekonocne kulture MRSA sojeva je resuspendovana u fiziološkom rastvoru radi dobijanja bakterijske suspenzije koja odgovara McFarland standardu 0.5 ($\approx 10^8$ CFU/ml).

Napravljena su serijska razblaženja halkona (12.5 - 50.0 $\mu\text{g/ml}$ za M-OH i P-OH, i 6.2 - 25.0 $\mu\text{g/ml}$ za O-OH halkon) u TSB bujonu (sa dodatkom 1% glukoze) ili BHI bujonu (sa dodatkom 2% glukoze i 2% saharoze) prema Knobloch i sar. (2002). U mikrotitracionu ploču je dodato po 180 μl svakog razblaženja u triplikatima. U svako polje ploče je dodato po 20 μl prethodno pripremljene bakterijske suspenzije. Pozitivna kontrola svakog soja su bile bakterije kultivisane samo u medijumu bez prisustva halkona. Dva triplikata samog medijuma su predstavljala negativnu kontrolu svake ploče.

Nakon 24h ili 48h kultivacije na 35°C u aerobnim uslovima, ploče su odlivene, tri puta isprane sa 300 μl temperiranog fosfatnog pufera (eng. phosphate-buffered saline, PBS; pH 7.2) i osušene na vazduhu. Ploče su fiksirane tokom 20 min. sa 150 μl metanola po polju ploče, osušene i obojene sa 150 μl rastvora 2% kristal violeta (Himedia) tokom 15 min. Višak nevezane boje je ispran tekućom vodom a boja vezana za adherentne bakterije je oslobođena sa 150 μl 96% etanola tokom 20 min. Optička gustina je pročitana na 570 nm (ICN Flow Titertek Multiscan Plus) nakon čega su izračunate srednje vrednosti triplikata za sve testirane sojeve i negativne kontrole. Da bi se odredila kategorija produkcije biofilma, za svaku mikrotitracionu ploču je definisana „cut off“ vrednost (ODc) kao srednja vrednost apsorbance negativnih kontrola uvećana za vrednost 3 SD (srednja vrednost OD negativne kontrole +3SD). Prema dobijenoj vrednosti ODc su preračunati rezultati prema sledećoj šemi (Stepanović et al., 2000):

$OD \leq ODc$ - nema produkcije biofilma (kategorija 0)

$ODc < OD \leq 2 \times ODc$ – slaba produkcija biofilma (kategorija 1 ili +)

$2 \times ODc < OD \leq 4 \times ODc$ – umerena produkcija biofilma (kategorija 2 ili ++)

$4 \times ODc < OD$ – izražena produkcija biofilma (kategorija 3 ili +++)

Svaki eksperiment je ponovljen tri puta tokom tri uzastopna dana.

Da bi ispitali da li je inhibicija formiranja biofilma pod uticajem halkona trajni efekat, MRSA sojevi su nakon 24h kultivacije u medijumu sa halkonima presejani na TSA i nakon 24h je ponovo ispitana sposobnost formiranja biofilma kao što je prethodno opisano. Svaki eksperiment je ponavljen tri puta.

3.5.3.3. Ispitivanje uticaja halkona na adherenciju MRSA za humani fibronektin

Sposobnost MRSA sojeva da adherišu za humani fibronektin je ispitana prema protokolu Peacock i sar. (2000). MRSA sojevi su kultivisani tokom 24h i 48h sa subinhibitornim koncentracijama testiranih halkona na isti način kao što je opisano kod ispitivanja sposobnosti produkcije glikokaliksa. Pozitivna kontrola svakog soja su bile bakterije kultivisane pod istim uslovima bez prisustva halkona.

Mikrotitracione ploče (polysorp microtitre plates, NUNC, Danska) su obložene sa 25 µg/ml humanog fibronektina (Serva, Nemačka) tokom 1h na 37°C, nakon čega je izvršena prekonocna blokada preostalih veznih mesta sa 200 µl 2% govedjeg serumskog albumina (Sigma-Aldrich) u PBS na 4°C. Ploče su isprane tri puta sa PBS nakon čega je svakom polju ploče dodat inokulum od 1×10^8 CFU/ml u PBS. Svaki uzorak je postavljen u triplikatu. Ploče su inkubirane 1h na 37°C nakon čega su isprane tri puta sa PBS, fiksirane sa 2% glutaraldehydom (TCI Europe) u PBS tokom 1h i obojene sa kristal violetom (Himedia) tokom 5 min. Nakon ispiranja sa vodom i sušenja na vazduhu, boja vezana za adherentne bakterije je oslobođena sa 150 µl 96% etanola tokom 20 min i izmerena je apsorbance na OD₄₀₅. Negativna kontrola svake ploče su bila dva triplikata PBS bez bakterija. Rezultati su preračunati kao srednje vrednosti apsorbance triplikata i izraženi kao procenat apsorbance pozitivne kontrole (izražene kao 100%). Svaki eksperiment je ponavljen tri puta.

Da bi ispitali da li je inhibicija vezivanja MRSA za humani fibronektin pod uticajem halkona trajni efekat, MRSA sojevi su nakon 24h kultivacije u medijumu sa halkonima presejani na TSA i nakon 24h ponovo je ispitana sposobnost adherencije za fibronektin, kao što je prethodno opisano. Svaki eksperiment je ponavljen tri puta.

3.5.3.4. Ispitivanje uticaja halkona na produkciju stafilokoknih hemolizina

Produkcija α -hemolizina u supernatantima kultura MRSA određena je prema metodi Rowe i Welch (1994). Za detekciju hemolitičke aktivnosti α -hemolizina odabrani su zečiji eritrociti koji su 1000x osetljiviji na hemolitičko dejstvo α -hemolizina *S. aureus* u odnosu na humane eritrocite.

Bakterije su kultivisane u Müeller-Hinton bujonu u prisustvu subinhibitornih koncentracija halkona (kao što je prethodno opisano) do posteksponencijalne faze rasta ($OD_{600}=2.5$, ili 1×10^9 CFU/ml). Kontrolne kulture su kultivisane pod istim uslovima bez dodatka halkona. Bakterijske kulture su zatim centrifugirane na $5.500 \times g$ na $4^\circ C$ tokom 1 min i filtrirane kroz membranski filter promera pora $0.22 \mu m$ u cilju otklanjanja rezidualnih ćelija. Po 100 μl supernatanta je razblaženo sa PBS do finalne zapremine od 1 ml nakon čega je dodato 25 μl defibrinisane zečije krvi. Nakon 15 min inkubacije na $37^\circ C$, nelizirane ćelije su otklonjene centrifugiranjem na $5.500 \times g$ na sobnoj temperaturi tokom 1 min, a hemolitička aktivnost je očitana na OD_{543} . Rezultati su predstavljeni kao procenat hemolitičke aktivnosti pozitivne kontrole (izražene kao 100% hemolitičke aktivnosti). Svaki test je ponovljen tri puta.

3.5.4. Ispitivanje efekta kombinovane primene halkona i antibiotika sa različitim mehanizmima delovanja na rast izolovanih MRSA sojeva

Efekat kombinacije halkona sa antibioticima na rast MRSA sojeva je ispitan pomoću tzv. "checkerboard" metoda prema White i sar. (1996). Testiranje je izvršeno sa pet antibiotika sa različitim mehanizmom delovanja: β -laktamskim antibioticima cefotaksimom (CFX) i ceftriaksonom (CTX), fluorohinolonom ciprofloksacinom (CIP), aminoglikozidom gentamicinom (GEN) i inhibitorom sinteze folne kiseline trimetoprim/sulfametoksazolom (TMP-SMX) (Sigma-Aldrich). Ispitivanje je izvršeno u mikrotitracionim pločama sa 96 mesta sa serijskim razblaženjima antibiotika i halkona u

deset opadajućih koncentracija počev od 2 x MIK. Interakcija između antibiotika i halkona je procenjena nakon izračunavanja frakcione inhibitorne koncentracije (eng. fractional inhibitory concentration; FIC) i indeksa frakcione inhibitorne koncentracije (eng. fractional inhibitory concentration indices; FICI).

FIC za svaku supstancu je preračunat deljenjem MIK supstance u kombinaciji halkona i antibiotika sa MIK same supstance ($FIC_{\text{halkona}} = \text{MIK}_{\text{kombinacije halkon-antibiotik}} / \text{MIK}_{\text{halkona}}$). FICI vrednosti su izračunate kao suma FIC_{halkona} i $FIC_{\text{antibiotika}}$ i tumačene prema sledećem kriterijumu: $FICI \leq 0.5$ sinergizam; $0.5 < FICI \leq 1$ aditivnost; $1 < FICI \leq 2$ indiferentan efekat i $FICI \geq 2$ antagonizam (Hu et al., 2002; Orhan et al., 2005). Svaki test je ponavljen tri puta.

3.5.5. Statistička analiza podataka

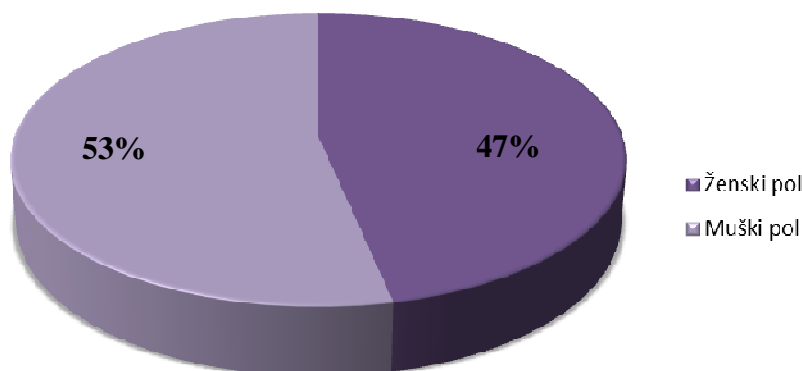
Podaci dobijeni u ovoj studiji su analizirani u SPSS statističkom programu (PASW statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS Inc.) pomoću Studentovog *t*-testa. Za analizu korelacije između *agr* tipa i sposobnosti produkcije biofilma korišćen je ANOVA test.

Granicom statističke značajnosti smatrana je verovatnoća od 0.05 ($p < 0.05$).

4. REZULTATI

4.1. Poreklo MRSA sojeva

U ispitivanje je uključeno ukupno 30 MRSA sojeva izolovanih od hospitalizovanih pacijenata (25) i pacijenata koji dolaze iz vanbolničke sredine (5). U eksperimentima je kao kontrola korišćen standardni soj MRSA ATCC 43300. Distribucija MRSA sojeva prema polu ispitanika i prema poreklu uzorka su predstavljene na Grafikonu 1. i u Tabeli 9.



Grafikon 1. Distribucija MRSA sojeva prema polu ispitanika

Tabela 9. Distribucija MRSA sojeva prema poreklu uzorka

Uzorak	Broj sojeva (%)	Poreklo
Krv	3 (10.0%)	Hospitalizovani bolesnik
Bris rane	11 (36.7%)	Hospitalizovani bolesnik
Trahealni aspirat	3 (10.0%)	Hospitalizovani bolesnik
Sputum	3 (10.0%)	Hospitalizovani bolesnik
Bris traheostome	2 (6.7%)	Hospitalizovani bolesnik
Aspirat abdominalnog drena	2 (6.7%)	Hospitalizovani bolesnik
Bris nosa	2 (6.7%)	Ambulantni bolesnik
Bris kože	1 (3.3%)	Ambulantni bolesnik
Urin	1 (3.3%)	Hospitalizovani bolesnik
Bris uretre	1 (3.3%)	Ambulantni bolesnik
Bris spoljašnjeg ušnog kanala	1 (3.3%)	Ambulantni bolesnik

4.2. Identifikacija MRSA sojeva

Identifikacija MRSA sojeva je izvršena konvencionalnim metodama, komercijalnim automatizovanim sistemom za identifikaciju i molekularnim metodama.

4.2.1. Identifikacija sojeva konvencionalnim metodama

Identifikacija sojeva konvencionalnim metodama je izvršena u primarnim laboratorijama koje su primile uzorak na mikrobiološku analizu, a potvrda tačnosti identifikacije je izvršena u Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Za identifikaciju su korišćeni koagulaza test u epruveti, koagulaza test na pločici i kombinacija ova dva testa kao i kombinacija koagulaza testa u epruveti i latex aglutinacionog testa.

Svih 30 sojeva je konvencionalnim metodama identifikovano do nivoa vrste kao *S. aureus*.

Rezistencija na meticilin je određena disk difuzionim metodom antibiograma pomoću tableta ili diskova meticilina, oksacilina ili cefoksitina. Kod svih 30 sojeva uključenih u istraživanje je detektovana rezistencija na meticilin.

4.2.2. Identifikacija sojeva primenom VITEK automatizovanog sistema

Identifikacija sojeva *S. aureus* VITEK 2 ID karticama izvršena je na osnovu detekcije 43 biohemijske osobine. Svi testirani sojevi su identifikovani kao *S. aureus* sa nivoom pouzdanosti između 98.57-99.00%.

4.2.3. Identifikacija sojeva molekularnim metodama

Radi potvrde fenotipske identifikacije izolata kao MRSA, klinički izolati MRSA su identifikovani PCR metodom detekcijom *nuc* gena (gen za termonukleazu), koji je specifičan za vrstu *S. aureus* i *mecA* gena, koji je specifičan za MRSA. Svi sojevi koji su konvencionalnim metodama identifikovani kao meticilin-rezistentni su bili pozitivni na *nuc* i *mecA* gen.

4.3. Genotipizacija izolovanih sojeva

Genotipizacija izolovanih sojeva izvršena je PFGE metodom, ispitivanjem *SCCmec* tipa, *agr* tipa, *ccr* tipa, *spa* tipa i grupisanjem *spa* tipova u klonske komplekse (CC tip) (Tabela 10).

Tabela 10 . Genska tipizacija MRSA sojeva

Broj soja	PFGE tip	SCC <i>mec</i> tip	<i>agr</i> tip	<i>ccr</i> tip	<i>spa</i> tip	CC tip
3	-	1	2	1	T041	CC5
4	-	1	2	1	T015	CC45
5	F	3	1	5	T030	CC8
6	H	5	1	5	T6371	CC152
7	A1	1	2	1	T041	CC5
8	-	4	3	2	T044	CC80
10	A	1	2	1	T041	CC5
12	C	1	2	1	T041	CC5
13	F	3	1	5	T030	CC8
14	G	4	1	2	T583	CC45
15	H	5	1	0	T595	CC152
16	-	2	2	2	T003	CC5
17	E	1	2	1	T041	CC5
18	A	1	2	1	T041	CC5
19	A1	1	2	1	T041	CC5
20	D	3	1	5	T969	CC8
21	-	3	2	5	T030	CC8
24	C	1	2	1	T041	CC5
25	C	1	2	1	T041	CC5
26	-	1	1	1	T041	CC5
27	-	5	1	5	T1183	CC152
28	M	4	1	2	T292	CC8
29	-	3	2	5	T030	CC8
34	F	3	1	5	T030	CC5
35	B2	3	1	5	T969	CC8
47	B	3	1	5	T030	CC8
50	A5	1	2	1	T041	CC5
53	-	4	1	2	T032	CC22
58	-	3	1	5	T030	CC8
89	G	4	1	2	T630	CC45

4.3.1. Tipizacija sojeva PFGE metodom

Od 30 testiranih MRSA sojeva, 20 sojeva (66.7%) je PFGE metodom klasifikovano u 9 različitih PFGE pulsotipova (A, B, C, D, E, F, G, H i M). Ostalih 10 sojeva (33.3%) je imalo jedinstven PFGE profil i nije se moglo klasifikovati u neki od PFGE pulsotipova. Dominantan PFGE pulsotip je bio A (16.7% sojeva) (Tabela 11).

Tabela 11. PFGE tipizacija MRSA sojeva

PFGE pulsotip	A	B	C	D	E	F	G	H	M
Broj sojeva (%)	5 (16.7%)	2 (6.7%)	3 (10%)	1 (3.3%)	1 (3.3%)	3 (10%)	2 (6.7%)	2 (6.7%)	1 (3.3%)

4.3.2. Određivanje SCCmec tipa

Najveći broj izolovanih sojeva je pripadao SCCmec tipu I (40.0%). Distribucija SCCmec tipova prema poreklu uzorka prikazana je u Tabeli 12.

Tabela 12. Distribucija SCCmec tipova kod MRSA sojeva

SCCmec tip	Hospitalizovani bolesnik (%)	Ambulantni bolesnik (%)	Ukupan broj izolata (%)
I	11 (36.7%)	1 (3.3%)	12 (40.0%)
II	1 (3.3%)	-	1 (3.3%)
III	9 (30.0%)	-	9 (30.0%)
IV	3 (10.0%)	2 (6.7%)	5 (16.7%)
V	1 (3.3%)	2 (6.7%)	3 (10.0%)

4.3.3. Određivanje *agr* tipa

Najveći broj izolovanih sojeva je pripadao *agr* tipu 1 (50.0%) i *agr* tipu 2 (46.7%). Distribucija *agr* tipova je predstavljena u Tabeli 13.

Tabela 13. Distribucija *agr* tipova kod MRSA sojeva

<i>agr</i> tip	1	2	3	4
Broj sojeva (%)	15 (50.0%)	14 (46.7%)	1 (3.3%)	-

4.3.4. Određivanje *ccr* tipa

Određivanjem *ccr* tipa je utvrđeno da najveći broj MRSA ima *ccr* tip 1 (40.0%) i 5 (36.6%). *ccr* tip nije identifikovan kod jednog soja, a ostali *ccr* tipovi nisu pronađeni kod MRSA sojeva (Tabela 14).

Tabela 14. Distribucija *ccr* tipova kod MRSA sojeva

<i>ccr</i> tip	1	2	3	4	5
Broj sojeva (%)	12 (40.0%)	6 (20.0%)	-	-	11 (36.6%)

4.3.5. Određivanje *spa* tipa

MRSA sojevi su klasifikovani u 13 *spa* tipova od kojih su najzastupljeniji bili T041 (36.7%) i T030 (23.3%). Distribucija MRSA sojeva prema *spa* tipu je prikazana u Tabeli 15.

Tabela 15. Distribucija MRSA sojeva prema *spa* tipu

<i>spa</i> tip	Broj izolovanih sojeva (%)
T003	1 (3.3%)
T015	1 (3.3%)
T030	7 (23.3%)
T032	1 (3.3%)
T041	11 (36.7%)
T044	1 (3.3%)
T292	1 (3.3%)
T583	1 (3.3%)
T595	1 (3.3%)
T630	1 (3.3%)
T969	2 (6.7%)
T1183	1 (3.3%)
T6371	1 (3.3%)

Nakon *spa* tipizacije, MRSA sojevi su grupisani u šest klonskih kompleksa. Najveći broj izolovanih sojeva je pripadao klonskom kompleksu CC5 (43.3%) i CC8 (30.0%). Pripadnost MRSA sojeva klonskim kompleksima prema *spa* tipu je prikazana u Tabeli 16.

Tabela 16. Pripadnost MRSA sojeva klonskim kompleksima prema *spa* tipu

Klonski kompleks	Broj sojeva (%)	<i>spa</i> tip (%)
CC5	13 (43.3%)	T041 (36.7%); T030 (3.3%); T003 (3.3%)
CC8	9 (30.0%)	T030 (20.0%); T969 (6.7%); T292 (3.3%)
CC22	1 (3.3%)	T032 (3.3%)
CC45	3 (10.0%)	T015 (3.3%); T583 (3.3%); T630 (3.3%)
CC80	1 (3.3%)	T044 (3.3%)
CC152	3 (10.0%)	T595 (3.3%); T1183 (3.3%); T6371 (3.3%)

4.4. Ispitivanje faktora virulencije MRSA sojeva

U cilju ispitivanja faktora virulencije MRSA testirani su:

- produkcija glikokaliksa
- formiranje biofilma
- vezivanje za humani fibronektin
- produkcija α -hemolizina
- prisustvo *PVL* gena koji kodira sintezu Panton-Valentin leukocidina

4.4.1. Ispitivanje produkcije glikokaliksa

Produkcija glikokaliksa je određena primenom CRA i Christensenovog metoda kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Svaki eksperiment je ponavljen tri puta.

Rezultati dobijeni CRA metodom su pokazali da je 25/31 (80.6%) sojeva (uključujući i kontrolni MRSA ATCC 43300) formiralo suve, crne kolonije kristalnog izgleda, što ukazuje na pozitivnu produkciju glikokaliksa. Kod 6/31 (19.4%) sojeva rezultat je bio nedefinisan zato što je uočeno formiranje tamnih, roze-crvenih kolonija bez kristalnog izgleda (Tabela 11).

Rezultati dobijeni Christensenovim metodom su potvrdili produkciju glikokaliksa kod 21/31 (67.7%) sojeva dok je kod 10/31 (32.3%) sojeva produkcija glikokaliksa bila nedefinisana. Diskrepanca između CRA i Christensenovog metoda je utvrđena kod 4/31 (12.9%) sojeva kod kojih je CRA metodom utvrđena pozitivna produkcija glikokaliksa a Christensenovim metodom nedefinisana produkcija glikokaliksa (Tabela 19).

4.4.2. Ispitivanje sposobnosti MRSA da produkuju biofilm

Sposobnost produkcije biofilma kod MRSA je ispitana u tri eksperimenta koji su urađeni tokom tri uzastopna dana. Produkcija biofilma je ispitana u TSB bujonu (sa dodatkom 1% glukoze) ili BHI bujonu (sa dodatkom 2% glukoze i 2% saharoze), bez statistički značajne razlike u produkciji biofilma u odnosu na primenjen medijum ($p > 0.05$). Predstavljeni rezultati su dobijeni kao prosečna vrednost tri eksperimenta koja su izvedena sa TSB medijumom sa dodatkom 1% glukoze.

Ispitivanjem sposobnosti produkcije biofilma kod MRSA utvrđeno je da je 1/31 (3.2%) sojeva ispoljio slabu produkciju biofilma (kategorija 1), 15/31 (48.4%) sojeva je umereno produkovalo biofilm (kategorija 2) i 15/31 (48.4%) sojeva je ispoljilo izraženu sposobnost produkcije biofilma (kategorija 3). Nije utvrđena statistički značajna razlika u produkciji biofilma kod MRSA sojeva izolovanih iz različitih uzoraka ($p>0.05$, Tabela 17).

Tabela 17. Produkcija biofilma kod MRSA sojeva izolovanih iz uzoraka različitog porekla

Uzorak	Broj sojeva	Kategorija produkcije biofilma		
		1	2	3
Krv	3	-	3	-
Bris rane	11	-	5	6
Trahealni aspirat	3	-	1	2
Sputum	3	1	1	1
Bris traheostome	2	-	1	1
Aspirat abdominalnog drena	2	-	1	1
Bris nosa	2	-	-	2
Bris kože	1	-	-	1
Urin	1	-	1	-
Bris uretre	1	-	1	-
Bris spoljašnjeg ušnog kanala	1	-	-	1
ATCC 43300	1	-	1	-
Σ	31	1	15	15

* 1 - slaba produkcija biofilma, 2 - umerena produkcija biofilma i 3- izražena produkcija biofilma.

Odnos *agr* tipa i količine produkovanog biofilma MRSA sojeva je predstavljen u Tabeli 18. Nije utvrđena statistička povezanost između *agr* tipa i količine produkovanog biofilma ($p>0.05$).

Tabela 18. Distribucija agr tipa u odnosu na količinu biofilma koju su proizveli MRSA sojevi

agr tip	Količina proizvedenog biofilma (broj i % sojeva)		
	1	2	3
1	-	6 (20.0%)	8 (26.7%)
2	1 (3.3%)	7 (23.3%)	6 (20.0%)
3	-	1 (3.3%)	

* 1 - slaba proizvodnja biofilma, 2 - umerena proizvodnja biofilma i 3- izražena proizvodnja biofilma.

4.4.3. Ispitivanje adhezije MRSA sojeva za humani fibronektin

Rezultati dobijeni nakon kultivacije MRSA sa 25 µg/ml humanog fibronektina su pokazali da svi testirani sojevi imaju sličnu sposobnost vezivanja za fibronektin (Tabela 19). Nije uočena statistički značajna razlika u vezivanju za humani fibronektin između sojeva kultiviranih sa halkanima tokom 24h ili 48h, kao ni između sojeva izolovanih iz različitih uzoraka ($p > 0.05$).

Tabela 19. Produkcija glikokaliksa, biofilma i vezivanje za humani fibronektin izolovanih MRSA

Broj soja	CRA	Christensenov metod	Produkcija biofilma	Vezivanje za fibronektin 24h	Vezivanje za fibronektin 48h
3	+	+/-	1	0.080 ± 0.006	0.134 ± 0.016
4	+/-	+/-	3	0.085 ± 0.003	0.142 ± 0.006
5	+/-	+/-	2	0.091 ± 0.003	0.130 ± 0.006
6	+	+	3	0.077 ± 0.003	0.111 ± 0.007
7	+	+	3	0.095 ± 0.010	0.123 ± 0.007
8	+	+	2	0.084 ± 0.004	0.123 ± 0.007
10	+	+	2	0.083 ± 0.006	0.114 ± 0.014
12	+	+	3	0.092 ± 0.011	0.122 ± 0.003
13	+	+	2	0.086 ± 0.003	0.131 ± 0.018
14	+	+	3	0.097 ± 0.012	0.116 ± 0.008
15	+	+	3	0.077 ± 0.003	0.118 ± 0.003
16	+	+	3	0.101 ± 0.001	0.133 ± 0.021
17	+/-	+/-	3	0.085 ± 0.001	0.139 ± 0.021
18	+	+	2	0.097 ± 0.010	0.102 ± 0.003
19	+	+	2	0.164 ± 0.019	0.113 ± 0.013
20	+	+	2	0.123 ± 0.004	0.109 ± 0.010
21	+	+	2	0.079 ± 0.001	0.098 ± 0.006
24	+	+	3	0.077 ± 0.001	0.140 ± 0.017
25	+	+	2	0.125 ± 0.017	0.115 ± 0.001
26	+	+	3	0.120 ± 0.021	0.124 ± 0.006
27	+	+/-	3	0.109 ± 0.013	0.123 ± 0.016
28	+	+/-	2	0.095 ± 0.001	0.107 ± 0.001
29	+/-	+/-	2	0.122 ± 0.018	0.111 ± 0.004
34	+	+	3	0.125 ± 0.002	0.120 ± 0.003
35	+/-	+/-	2	0.109 ± 0.003	0.146 ± 0.023
47	+	+	3	0.136 ± 0.001	0.116 ± 0.003
50	+	+	2	0.136 ± 0.014	0.126 ± 0.006
53	+/-	+/-	2	0.119 ± 0.005	0.128 ± 0.011
58	+	+	3	0.104 ± 0.002	0.129 ± 0.007
89	+	+/-	3	0.109 ± 0.001	0.112 ± 0.003
ATCC 43300	+	+	2	0.110 ± 0.002	0.144 ± 0.014

* Pozitivna produkcija glikokaliksa (+), nedefinisan rezultat (+/-) i negativna produkcija glikokaliksa (-). Kategorija produkcije biofilma: 1 - slaba produkcija biofilma, 2 - umerena produkcija biofilma i 3- izražena produkcija biofilma. Vezivanje za fibronektin je predstavljeno kao srednja vrednost apsorbance ± SD.

4.4.4. Ispitivanje prisustva *PVL* gena

Rezultati dobijeni ispitivanjem prisustva *PVL* gena koji kodira sintezu Panton-Valentin leukocidina su potvrdili prisustvo ovog gena kod tri soja (10.0%) dobijena od dva ambulantna bolesnika i jednog hospitalizovanog bolesnika. Poreklo sojeva i genska tipizacija su prikazani u Tabeli 20.

Tabela 20. Poreklo i genska tipizacija MRSA sojeva

Broj soja	Poreklo soja	<i>PVL</i>	<i>agr</i> tip	<i>SCCmec</i> tip	PFGE tip	<i>ccr</i> tip	<i>spa</i> tip	CC tip
8	Bris rane	+	3	4	-	2	T044	CC80
15	Bris kože	+	1	5	H	0	T595	CC152
27	Bris spoljašnjeg ušnog kanala	+	1	5	-	5	T1183	CC152

4.5. Ispitivanje osetljivosti MRSA sojeva na antibiotike

Ispitivanje osetljivosti MRSA na antibiotike i hemioterapeutike izvršeno je automatizovanim sistemom i agar difuzionim metodom. Automatizovanim sistemom je ispitana osetljivost na 19 antibiotika koji su pripadnici 15 grupa antibiotika sa različitim mehanizmom dejstva. Agar difuzionim metodom je dopunjeno ispitivanje osetljivosti MRSA na antibiotike koji nisu bili obuhvaćeni testiranjem automatizovanim sistemom.

Multirezistentnost (rezistenciju na dve i više grupa antibiotika osim β -laktamskih antibiotika) je utvrđena kod 26 sojeva (86.7%) od kojih je 22 soja (73.3%) pripadalo *SCCmec* tipu I-III a 4 soja (13.3%) *SCCmec* tipu IV-V. Kontrolni MRSA soj ATCC 43300 je takođe ispoljio multirezistentan fenotip.

Dva soja (6.7%) *SCCmec* tipa IV su bila osetljiva na sve antibiotike osim β -laktamskih antibiotika, a dva soja *SCCmec* tipa IV i V su pokazala rezistenciju na jednu grupu antibiotika osim β -laktamskih antibiotika (aminoglikozide ili tetracikline).

Svi testirani sojevi (uključujući i kontrolni MRSA ATCC43300) su bili osetljivi na vankomicin (100% S), teikoplanin (100% S), trimetoprim/sulfametoksazol (100% S), pristinamicin (100% S), linezolid (100% S), mupirocin (100% S), nitrofurantoin (100% S), tigeciklin (100% S) i netilmicin (97% S, 3% I).

Najveći broj sojeva (95-100%) je ispoljio rezistenciju na benzilpenicilin, ampicilin i kombinacije penicilina sa inhibitorima beta laktamaza, drugu i treću generaciju cefalosporina, oksacilin i imipenem (Tabela 21 i 22).

Rezistencija na aminoglikozide je utvrđena kod svih sojeva *SCCmec* tipa I-III (73.3%) i 4 soja (13.3%) *SCCmec* tipa IV-V. Pripadnost različitim profilima rezistencije na aminoglikozide je pokazala dominantan tip rezistencije MRSA na Kan, Tob, Gen (92.3%), dok su se ostali tipovi rezistencije (Kan, Tob i Kan) pojavili kod po jednog soja (3.8%).

Konstitutivna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramin B (MLS_B) ispitana agar difuzionim metodom antibiograma je uočena kod 19 sojeva (63.3%).

Ispitivanje inducibilne rezistencije MLS_B tipa automatizovanim sistemom je pokazalo MLS_B rezistenciju kod 5% sojeva, dok je D-test pokazao rezistenciju kod 13.3% sojeva. Rezistencija je indukovana 14-članim (eritromicin, klaritromicin, roksitromicin ali ne i oleandromicin) i 15-članim makrolidima (azitromicin) kod 10.0% sojeva, a istim makrolidima uz dodatak 14-članog oleandromicina kod 3.3% sojeva.

Takođe je uočeno da MRSA sojevi *SCCmec* tipa I-III pokazuju veći stepen rezistencije na sve testirane antibiotike u odnosu na sojeve *SCCmec* tipa IV i V. Osetljivosti MRSA sojeva na antibiotike prema *SCCmec* tipu dobijena VITEK automatizovanim sistemom i agar difuzionim metodom predstavljena je u Tabelama 23 i 24.

U odnosu na aminoglikozidne antibiotike, MRSA sojevi su sa najvećom učestalošću ispoljili rezistenciju na kanamicin (14.4%), tobramicin (13.9%) i gentamicin (13.3%); u MLS grupi antibiotika na eritromicin, klaritromicin i azitromicin (po 11.0%), a u grupi tetraciklina na tetraciklin (14.4%). Relativna osetljivost MRSA sojeva na pojedine antibiotike koji pripadaju grupi aminoglikozida, MLS i tetraciklina predstavljena je u Tabeli 25.

Tabela 21. Osetljivosti 20 MRSA sojeva na antibiotike ispitana VITEK automatizovanim sistemom

Antibiotik	osetljivost (% sojeva)		
	S	I	R
Benzilpenicilin	0	0	100
Klindamicin	45	0	55
Eritromicin	50	5	45
Fosfomicin	90	0	10
Fuzidinska kiselina	75	10	15
Gentamicin	35	0	65
Levofloksacin	45	0	55
Linezolid	100	0	0
Moksifloksacin	45	35	20
Mupirocin	100	0	0
Nitrofurantoin	100	0	0
Oksacilin	5	0	95
Rifampicin	55	5	40
Teikoplanin	100	0	0
Tetraciklin	40	0	60
Tigeciklin	100	0	0
Tobramicin	25	0	75
Trimetoprim/Sulfametoksazol	100	0	0
Vankomicin	100	0	0

Predviđena osetljivost na antibiotike dobijena softverskom dedukcijom VITEK sistema
(% sojeva)

	S	I	R
Amoksisilin/klavulanska kiselina	5	0	95
Ampicilin	0	0	100
Ampicilin/sulbaktam	5	0	95
Azitromicin	50	5	45
Cefaklor	5	0	95
Cefotaksim	5	0	95
Ceftriakson	5	0	95
Cefuroksim	5	0	95
Klaritromicin	50	5	45
Imipenem	5	0	95

Ostali testovi dobijeni VITEK sistemom

	(% sojeva)	
	+	-
Cefoksitin skrining	95	5
Inducibilna rezistencija na klindamicin	5	95

* Ispitano na 20 sojeva, 14 sojeva (70%) SCCmec I, II i III i 6 sojeva (30%) SCCmec IV i V

Tabela 22. Osetljivost MRSA sojeva na antibiotike ispitana agar difuzionim metodom antibiograma

Antibiotik	osetljivost (% sojeva)		
	S	I	R
AMINOGLIKOZIDI			
Amikacin (30 µg)	40.0	3.3	56.7
Gentamicin (10 µg)	20.0	0.0	80.0
Kanamycin (30 µg)	13.3	0.0	86.7
Tobramicin (10 µg)	16.7	0.0	83.3
Netilmicin (30 µg)	96.7	3.3	0.0
Streptomycin (10 µg)	26.7	0.0	73.3
MLS			
Linkomicin (15 µg)	33.3	0.0	66.7
Klindamicin (2 µg)	36.7	0.0	63.3
Eritromicin (15 µg)	23.3	0.0	76.7
Klaritromicin (15 µg)	23.3	0.0	76.7
Azitromicin (15 µg)	23.3	0.0	76.7
Spiramicin (100 µg)	36.7	0.0	63.3
Pristinamicin (15 µg)	100.0	0.0	0.0
TETRACIKLINI			
Tetraciklin (30 µg)	56.7	0.0	43.3
Doksiciklin (30 µg)	63.3	16.7	20.0
Minociklin (30 µg)	73.3	20.0	6.7
OSTALI			
Hloramfenikol (30 µg)	76.7	0.0	23.3
		% sojeva	
Ostali testovi	+	-	
Indukcija rezistencije D oblika	13.3	86.7	

* Ispitano na 30 sojeva, 20 sojeva SCCmec I, IV i V i 10 sojeva SCCmec II i III

Tabela 23. Osetljivosti MRSA sojeva na antibiotike prema SCCmec tipu dobijena VITEK automatizovanim sistemom

Antibiotik	SCCmec I, II, III (% sojeva)			SCCmec IV, V (% sojeva)		
	S	I	R	S	I	R
Benzilpenicilin	0	0	70	0	0	30
Klindamicin	20	0	50	25	0	5
Eritromicin	30	5	35	20	0	10
Fosfomicin	60	0	10	30	0	0
Fuzidinska kiselina	50	5	15	25	5	0
Gentamicin	20	0	50	15	0	15
Levofloksacin	15	0	55	30	0	0
Linezolid	70	0	0	30	0	0
Moksifloksacin	20	35	15	25	0	5
Mupirocin	70	0	0	30	0	0
Nitrofurantoin	70	0	0	30	0	0
Oksacilin	5	0	65	0	0	30
Rifampicin	25	5	40	30	0	0
Teikoplanin	70	0	0	30	0	0
Tetraciklin	25	0	45	15	0	15
Tigeciklin	70	0	0	30	0	0
Tobramicin	10	0	60	15	0	15
Trimetoprim/Sulfametoksazol	70	0	0	30	0	0
Vankomicin	70	0	0	30	0	0

Predviđena osetljivost na antibiotike dobijena softverskom dedukcijom VITEK sistema
(% sojeva)

	S	I	R	S	I	R
Amoksisicilin/klavulanska kiselina	5	0	65	0	0	30
Ampicilin	0	0	70	0	0	30
Ampicilin/sulbaktam	5	0	65	0	0	30
Azitromicin	30	5	35	20	0	10
Cefaklor	5	0	65	0	0	30
Cefotaksim	5	0	65	0	0	30
Ceftriakson	5	0	65	0	0	30
Cefuroksim	5	0	65	0	0	30
Klaritromicin	30	5	35	20	0	10
Imipenem	5	0	65	0	0	30

Ostali testovi dobijeni VITEK sistemom (% sojeva)

	+	-	+	-
Cefoksitin skrining	65	5	30	0
Inducibilna rezistencija na klindamicin	0	70	5	25

* Ispitano na 20 sojeva, 14 sojeva (70%) SCCmec I, II i III i 6 sojeva (30%) SCCmec IV i V

Tabela 24. Osetljivosti 30 MRSA sojeva na antibiotike ispitana agar difuzionim metodom prema SCCmec tipu

	SCCmec I, II, III (% sojeva)			SCCmec IV, V (% sojeva)		
	S	I	R	S	I	R
AMINOGLIKOZIDI						
Amikacin (30 µg)	13.3	3.3	56.7	26.7	0.0	0.0
Gentamicin (10 µg)	3.3	0.0	70.0	16.7	0.0	10.0
Kanamycin (30 µg)	0.0	0.0	73.3	13.3	0.0	13.3
Tobramycin (10 µg)	0.0	0.0	73.3	16.7	0.0	10.0
Netilmicin (30 µg)	70.0	3.3	0.0	26.7	0.0	0.0
Streptomycin (10 µg)	3.3	0.0	70.0	23.3	0.0	3.3
MLS						
Linkomicin (15 µg)	13.3	0.0	60.0	20.0	0.0	6.7
Klindamicin (2 µg)	13.3	0.0	60.0	23.3	0.0	3.3
Eritromicin (15 µg)	3.3	0.0	70.0	20.0	0.0	6.7
Klaritromicin (15 µg)	3.3	0.0	70.0	20.0	0.0	6.7
Azitromicin (15 µg)	3.3	0.0	70.0	20.0	0.0	6.7
Spiramicin (100 µg)	13.3	0.0	60.0	23.3	0.0	3.3
Pristinamicin (15 µg)	73.3	0.0	0.0	26.7	0.0	0.0
TETRACIKLINI						
Tetraciklin (30 µg)	40.0	0.0	33.3	16.7	0.0	10.0
Doksiciklin (30 µg)	43.3	13.3	16.7	20.0	3.3	3.3
Minociklin (30 µg)	46.7	20.0	6.7	26.7	0.0	0.0
OSTALI						
Hloramfenikol (30 µg)	50.0	0.0	23.3	26.7	0.0	0.0

* Kategorija osetljivosti: S-osetljiv, I-intermedijerno osetljiv i R-rezistentan (ispitano na 30 sojeva, 22 soja (73.3%) SCCmec I, II i III i 8 sojeva (26.7%) SCCmec IV i V).

Tabela 25. Relativni procenat osetljivosti 30 MRSA sojeva na antibiotike prema grupi antibiotika

	Svi sojevi (SCCmec I-V) (% sojeva)			SCCmec I, II, III (% sojeva)			SCCmec IV, V (% sojeva)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
AMINOGLIKOZIDI									
Amikacin (30 µg)	6.7	0.6	9.4	2.2	0.6	9.4	4.4	0.0	0.0
Gentamicin (10 µg)	3.3	0.0	13.3	0.6	0.0	11.7	2.8	0.0	1.7
Kanamycin (30 µg)	2.2	0.0	14.4	0.0	0.0	12.2	2.2	0.0	2.2
Tobramycin (10 µg)	2.8	0.0	13.9	0.0	0.0	12.2	2.8	0.0	1.7
Netilmicin (30 µg)	16.1	0.6	0.0	11.7	0.6	0.0	4.4	0.0	0.0
Streptomycin (10 µg)	4.4	0.0	12.2	0.6	0.0	11.7	3.9	0.0	0.6
Σ	35.6	1.1	63.3	15.0	1.1	57.2	20.6	0.0	6.1
MLS									
Linkomicin (15 µg)	4.8	0.0	9.5	1.9	0.0	8.6	2.9	0.0	1.0
Klindamicin (2 µg)	5.2	0.0	9.0	1.9	0.0	8.6	3.3	0.0	0.5
Eritromicin (15 µg)	3.3	0.0	11.0	0.5	0.0	10.0	2.9	0.0	1.0
Klaritromicin (15 µg)	3.3	0.0	11.0	0.5	0.0	10.0	2.9	0.0	1.0
Azitromicin (15 µg)	3.3	0.0	11.0	0.5	0.0	10.0	2.9	0.0	1.0
Spiramicin (100 µg)	5.2	0.0	9.0	1.9	0.0	8.6	3.3	0.0	0.5
Pristinamicin (15 µg)	14.3	0.0	0.0	10.5	0.0	0.0	3.8	0.0	0.0
Σ	39.5	0.0	60.5	17.6	0.0	55.7	21.9	0.0	4.8
TETRACIKLINI									
Tetraciklin (30 µg)	18.9	0.0	14.4	13.3	0.0	11.1	5.6	0.0	3.3
Doksiciklin (30 µg)	21.1	5.6	6.7	14.4	4.4	5.6	6.7	1.1	1.1
Minociklin (30 µg)	24.4	6.7	2.2	15.6	6.7	2.2	8.9	0.0	0.0
Σ	64.4	12.2	23.3	43.3	11.1	18.9	21.1	1.1	4.4
OSTALI									
Hloramfenikol (30 µg)	76.7	0.0	23.3	50.0	0.0	23.3	26.7	0.0	0.0

* Kategorija osetljivosti: S-osetljiv, I-intermedijerno osetljiv i R-rezistentan (ispitano na 30 sojeva, 20 sojeva SCCmec I, IV i V i 10 sojeva SCCmec II i III).

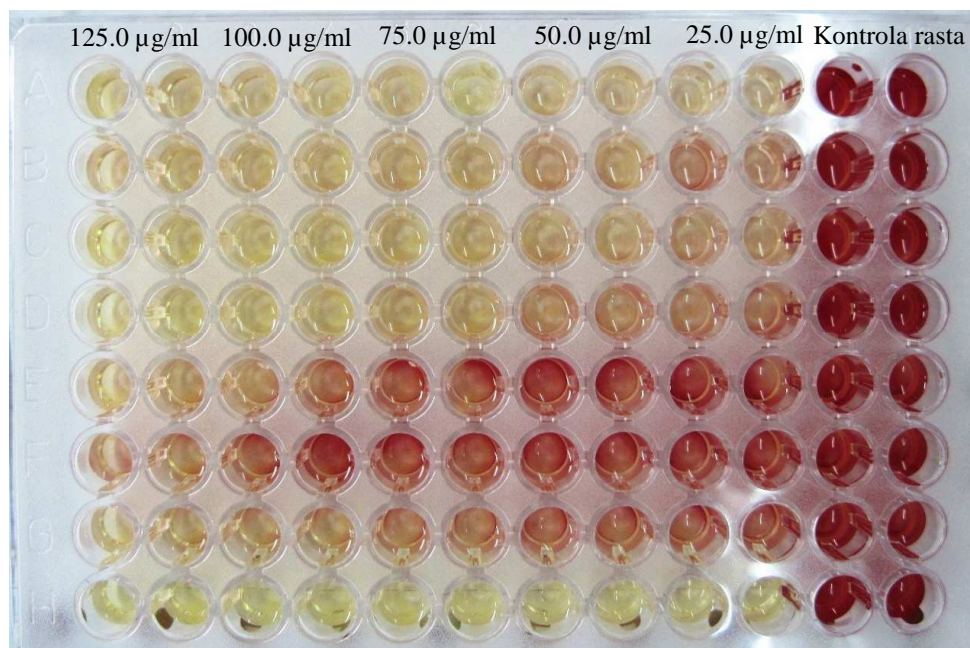
4.6. Ispitivanje osetljivosti MRSA sojeva na halkone

Sva tri ispitana halkona su ispoljila značajan antimikrobni efekat prema kliničkim izolatima MRSA, sa MIK vrednostima u opsegu 25.0-200.0 µg/ml, i standardnom soju MRSA ATCC 43300 u opsegu 50.0-75.0 µg/ml (Tabela 26; Slika 1).

Najizraženiji inhibitorni efekat na MRSA sojeve je ispoljio O-OH halkon, sa 93.5% sojeva čije su se vrednosti MIK kretale u opsegu 25.0-75.0 µg/ml i MBK 50.0-150.0 µg/ml. Samo dva ispitana soja su imala vrednosti MIK >100.0 µg/ml (soj br. 17 i 18), a MBK vrednosti kod ovih sojeva nisu utvrđene.

M-OH halkon je delovao na MRSA sojeve u opsegu MIK 50.0-200.0 µg/ml i MBK 100.0-400.0 µg/ml. Većina sojeva je imala vrednosti MIK u opsegu 50.0-175.0 µg/ml (22 soja) dok je devet sojeva imalo MIK \geq 200.0 µg/ml. Vrednosti MBK su iznosile 2xMIK a za tri soja čija je vrednost MIK bila veća od 200.0 µg/ml vrednost MBK nije utvrđena. P-OH halkon je delovao na MRSA u opsegu MIK 50.0-175.0 µg/ml i MBK 100.0-350.0 µg/ml.

Dva soja (broj 17 i 18) su pokazala slabiju osetljivost na delovanje ispitanih halkona, sa MIK vrednostima od 175.0 µg/ml (O-OH i P-OH) i 200.0 µg/ml (M-OH) i MBK vrednostima preko 400.0 µg/ml za sva tri halkona.



Slika 1. MIK vrednosti O-OH halkona

Crveno obojeni bunarčići-pozitivan rast; žuto obojeni bunarčići-negativan rast bakterija.

Tabela 26. Minimalne inhibitorne koncentracije i minimalne baktericidne koncentracije O-OH, M-OH i P-OH halkona

Broj soja	O-OH ($\mu\text{g/ml}$)		M-OH ($\mu\text{g/ml}$)		P-OH ($\mu\text{g/ml}$)	
	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
3	50.0	100.0	75.0	150.0	125.0	250.0
4	50.0	100.0	100.0	200.0	125.0	250.0
5	50.0	100.0	100.0	200.0	125.0	250.0
6	50.0	100.0	100.0	200.0	125.0	250.0
7	50.0	100.0	175.0	350.0	125.0	250.0
8	50.0	100.0	150.0	300.0	125.0	250.0
10	50.0	100.0	>200.0	n.t.	125.0	250.0
12	50.0	100.0	>200.0	n.t.	125.0	250.0
13	50.0	100.0	75.0	150.0	100.0	200.0
14	50.0	100.0	125.0	250.0	125.0	250.0
15	50.0	100.0	125.0	250.0	125.0	250.0
16	50.0	100.0	125.0	250.0	125.0	250.0
17	175.0	>400.0	200.0	>400.0	175.0	>400.0
18	175.0	>400.0	200.0	>400.0	175.0	>400.0
19	50.0	100.0	200.0	400.0	125.0	250.0
20	50.0	100.0	50.0	100.0	50.0	100.0
21	50.0	100.0	100.0	200.0	125.0	250.0
24	75.0	150.0	200.0	400.0	175.0	350.0
25	50.0	100.0	200.0	400.0	175.0	350.0
26	75.0	150.0	>200.0	n.t.	125.0	250.0
27	50.0	100.0	75.0	150.0	100.0	200.0
28	75.0	150.0	150.0	300.0	125.0	250.0
29	50.0	100.0	75.0	150.0	100.0	200.0
34	50.0	100.0	75.0	150.0	100.0	200.0
35	25.0	50.0	50.0	100.0	50.0	100.0
47	25.0	50.0	175.0	350.0	125.0	250.0
50	25.0	50.0	200.0	400.0	175.0	350.0
53	25	50.0	150.0	300.0	125.0	250.0
58	25.0	50.0	50.0	100.0	75.0	150.0
89	25.0	50.0	75.0	150.0	100.0	200.0
ATCC 43300	50.0	100.0	50.0	100.0	75.0	150.0

* n.t. - nije testirano

4.7. Ispitivanje uticaja halkona na biohemijske osobine MRSA i osetljivost na antibiotike

4.7.1. Ispitivanje uticaja halkona na biohemijske osobine MRSA sojeva

Biohemijska tipizacija MRSA sojeva je pokazala da svi ispitivani sojevi pripadaju vrsti *Staphylococcus aureus* sa nivoom pouzdanosti koji se kretao između 98.57 i 99.00%.

Prekultivacija MRSA sa halkonima je dovela do najznačajnijih promene sledećih osobina detektovanih VITEK GP karticom: aktivnosti enzima beta-galaktozidaze, alfa-glukozidaze, ureaze; razgradnje D-galaktoze i laktoze i alkalizacije L-laktata (Grafikon 2; Tabele 27-30).

4.7.1.1. Beta-galaktozidaza

Nakon kultivacije sa halkonima 55% MRSA sojeva je postalo negativno na aktivnost beta-galaktozidaze u odnosu na kontrolne sojeve, od čega 30% sojeva nakon kultivacije sa sva tri halkona (O-OH, M-OH ili P-OH), 15% sojeva nakon kultivacije sa dva halkona (10% sa O-OH ili P-OH i 5% sa M-OH ili P-OH) i 10% sojeva nakon kultivacije sa jednim halkonom (M-OH).

4.7.1.2. Alfa-glukozidaza

Odsustvo aktivnosti alfa-glukozidaze nakon kultivacije sa halkonima je uočeno kod 30% sojeva koji su prethodno bili pozitivni na aktivnost ovog enzima. Pet procenata sojeva je imalo negativnu aktivnost ovog enzima nakon kultivacije sa sva tri halkona, 10% sojeva u prisustvu O-OH ili P-OH, 5% u prisustvu O-OH ili M-OH i 10% nakon kultivacije sa jednim halkonom (M-OH).

4.7.1.3. Ureaza

Negativna aktivnost ureaze je uočena kod 15% sojeva u odnosu na kontrolne sojeve koji su pre kultivacije sa halkonima bili ureaza-pozitivni.

4.7.1.4. D-galaktoza

Nakon kultivacije sa halkonima 35% MRSA sojeva je postalo negativno na razgradnju D-galaktoze u odnosu na kontrolne sojeve. Dvadeset procenata sojeva je imalo negativnu razgradnju D-galaktoze nakon kultivacije sa O-OH ili P-OH (15%) i M-OH

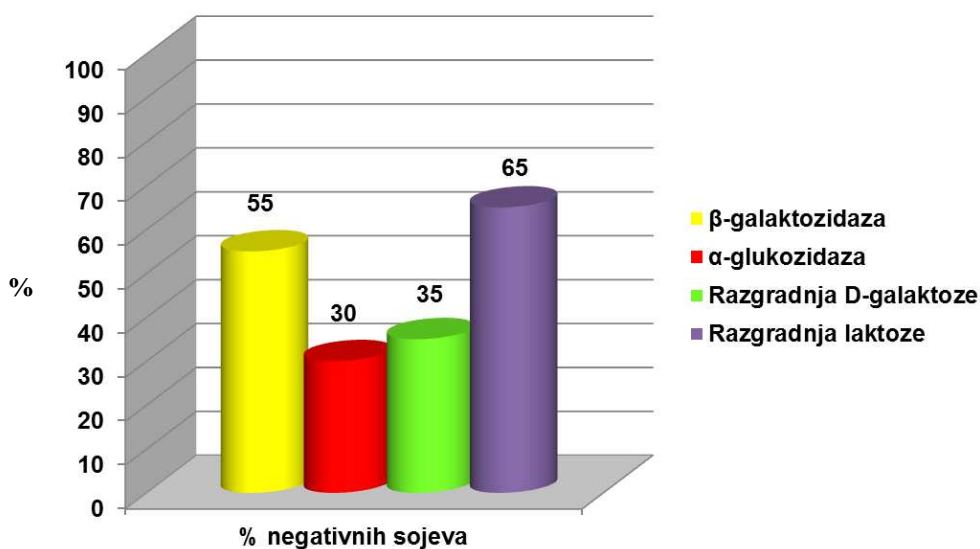
ili P-OH (5%) a 15% sojeva nakon kultivacije sa jednim halkonom (5% O-OH i 10% P-OH).

4.7.1.5. Laktoza

Razgradnja laktoze je inhibirana kod 65% MRSA sojeva koji su prethodno bili laktoza-pozitivni. Najveći broj sojeva (35%) je imao negativnu razgradnju laktoze pod uticajem sva tri halkona, 20% sojeva pod uticajem dva halkona (10% M-OH ili P-OH; 5% O-OH ili P-OH i 5% O-OH ili M-OH) i 10% pod uticajem jednog halkona (P-OH).

4.7.1.6. Alkalinizacija L-laktata

Nakon kultivacije sa halkonima 30% MRSA sojeva je pokazalo pozitivnu alkalinizaciju L-laktata u odnosu na kontrolu, dok je 15% sojeva imalo negativnu reakciju u odnosu na kontrolu koja je bila pozitivna.



Grafikon 2. Uticaj halkona na biohemijske osobine MRSA sojeva

* Rezultati su prikazani kao % negativnih sojeva u odnosu na pozitivnu kontrolu.

4.7.2. Ispitivanje uticaja halkona na osetljivost MRSA sojeva na antibiotike

VITEK automatizovanim sistemom je utvrđeno da prekultivacija MRSA sojeva sa ispitanim halkonima ne dovodi do promena u osetljivosti MRSA na antibiotike.

Tabela 27. Biohemijske osobine kontrolnih MRSA sojeva dobijene VITEK GP karticom

Biohem. test	soj																			K	%
	3	4	5	6	8	13	15	16	20	21	27	29	34	35	47	50	53	58	89		
AMY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	5
PIPLC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
dXYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
ADH1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
BGAL	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	60
AGLU	+	?	-	-	?	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	?	20
APPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
CDEX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AspA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
BGAR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AMAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
PHOS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
LeuA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
ProA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
BGURr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AGAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
PyrA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
BCUR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AlaA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
TyrA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
dSOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	?	-	-	10
POLYB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	95
dGAL	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	75
dRIB	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	?	-	-	+	-	-	-	25
ILATk	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	70
LAC	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	80
NAG	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	?	-	-	+	+	+	60
dMAL	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	95
BACI	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	55
NOVO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
NC6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
dMAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
dMNE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	95
MBdG	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	90
PUL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
dRAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
0129R	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	70
SAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
dTRE	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	90
ADH2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	10
OPTO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100

* Rezultati su prikazani kao procenat pozitivnih sojeva. K – MRSA ATCC 43300.

Tabela 28. Biohemijske osobine MRSA sojeva nakon kultivacije sa O-OH halkonom

Biohem. test	soj																			K	%
	3	4	5	6	8	13	15	16	20	21	27	29	34	35	47	50	53	58	89		
AMY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
PIPLC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
dXYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
ADH1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
BGAL	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	30
AGLU	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	?	-	-	-	+	-	-	-	15
APPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
CDEX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AspA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
BGAR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AMAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
PHOS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
LeuA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
ProA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
BGURr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AGAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
PyrA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
BCUR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AlaA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
TyrA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
dSOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	5
POLYB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
dGAL	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	55
dRIB	-	-	?	+	-	?	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	25
ILATk	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	90
LAC	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	35
NAG	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	70
dMAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
BACI	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	60
NOVO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
NC6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
dMAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
dMNE	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	95
MBdG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	95
PUL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
dRAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
0129R	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	80
SAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
dTRE	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	95
ADH2S	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	25
OPTO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100

* Rezultati su prikazani kao procenat pozitivnih sojeva. K – MRSA ATCC 43300.

Tabela 29. Biohemijske osobine MRSA sojeva nakon kultivacije sa M-OH halkanom

Biohem. test	soj																				K	%
	3	4	5	6	8	13	15	16	20	21	27	29	34	35	47	50	53	58	89			
AMY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
PIPLC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
dXYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
ADH1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	+	+	+	95	
BGAL	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	15	
AGLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	15	
APPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
CDEX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
AspA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
BGAR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
AMAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
PHOS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	
LeuA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
ProA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
BGURr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
AGAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
PyrA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	
BCUR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
AlaA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
TyrA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
dSOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
URE	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	+	-	-	?	-	-	10	
POLYB	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	95	
dGAL	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	85	
dRIB	-	-	?	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	35	
ILATk	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	85	
LAC	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	30	
NAG	-	-	-	-	+	?	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	65	
dMAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	
BACI	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	60	
NOVO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
NC6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	
dMAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	
dMNE	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	95	
MBdG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	95	
PUL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
dRAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
0129R	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	75	
SAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	
dTRE	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	95	
ADH2S	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	25	
OPTO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	

* Rezultati su prikazani kao procenat pozitivnih sojeva. K – MRSA ATCC 43300.

Tabela 30. Biohemijske osobine MRSA sojeva nakon kultivacije sa P-OH halkonom

Biohem. test	soj																			K	%
	3	4	5	6	8	13	15	16	20	21	27	29	34	35	47	50	53	58	89		
AMY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
PIPLC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
dXYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
ADH1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
BGAL	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	20
AGLU	+	-	-	-	+	-	?	-	-	+	?	-	-	-	-	?	+	-	-	-	20
APPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
CDEX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AspA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
BGAR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AMAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
PHOS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
LeuA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
ProA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
BGURr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AGAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
PyrA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
BCUR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AlaA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
TyrA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
dSOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
URE	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	-	5
POLYB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
dGAL	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	40
dRIB	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	30
ILATk	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	90
LAC	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	15
NAG	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	65
dMAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
BACI	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	65
NOVO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
NC6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
dMAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
dMNE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
MBdG	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	90
PUL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
dRAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
0129R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	95
SAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
dTRE	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	95
ADH2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
OPTO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100

* Rezultati su prikazani kao procenat pozitivnih sojeva. K – MRSA ATCC 43300.

4.8. Ispitivanje uticaja halkona na ekspresiju faktora virulencije izolovanih MRSA sojeva

U cilju ispitivanja uticaja halkona na adhezivne karakteristike MRSA sojeva ispitana je sposobnost produkcije glikokaliksa, formiranja biofilma i adhezije za humani fibronektin.

4.8.1. Ispitivanje uticaja halkona na produkciju glikokaliksa

Produkcija glikokaliksa je određena u tri nezavisna eksperimenta primenom CRA i Christensenovog metoda kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode.

CRA metodom je utvrđeno da je prekultivacija MRSA sojeva sa O-OH (25.0 µg/ml), M-OH (50.0 µg/ml) i P-OH halkonom (50.0 µg/ml) dovela do značajnog smanjenja produkcije glikokaliksa (Tabela 31; Slika 2).

Najizraženiji inhibitorski efekat na produkciju glikokaliksa je uočen nakon kultivacije sa O-OH halkonom, gde je 25 sojeva (80.6%) izgubilo produkciju glikokaliksa, 5 sojeva (16.1 %) je imalo nedefinisane produkcije glikokaliksa a samo jedan soj je zadržao produkciju glikokaliksa kao pozitivna kontrola. Od 25 sojeva koji su izgubili produkciju glikokaliksa, kod 19 sojeva (61.3 %) je prethodno detektovana produkcija glikokaliksa a 6 sojeva (19.4%) je imalo nedefinisane produkcije glikokaliksa.

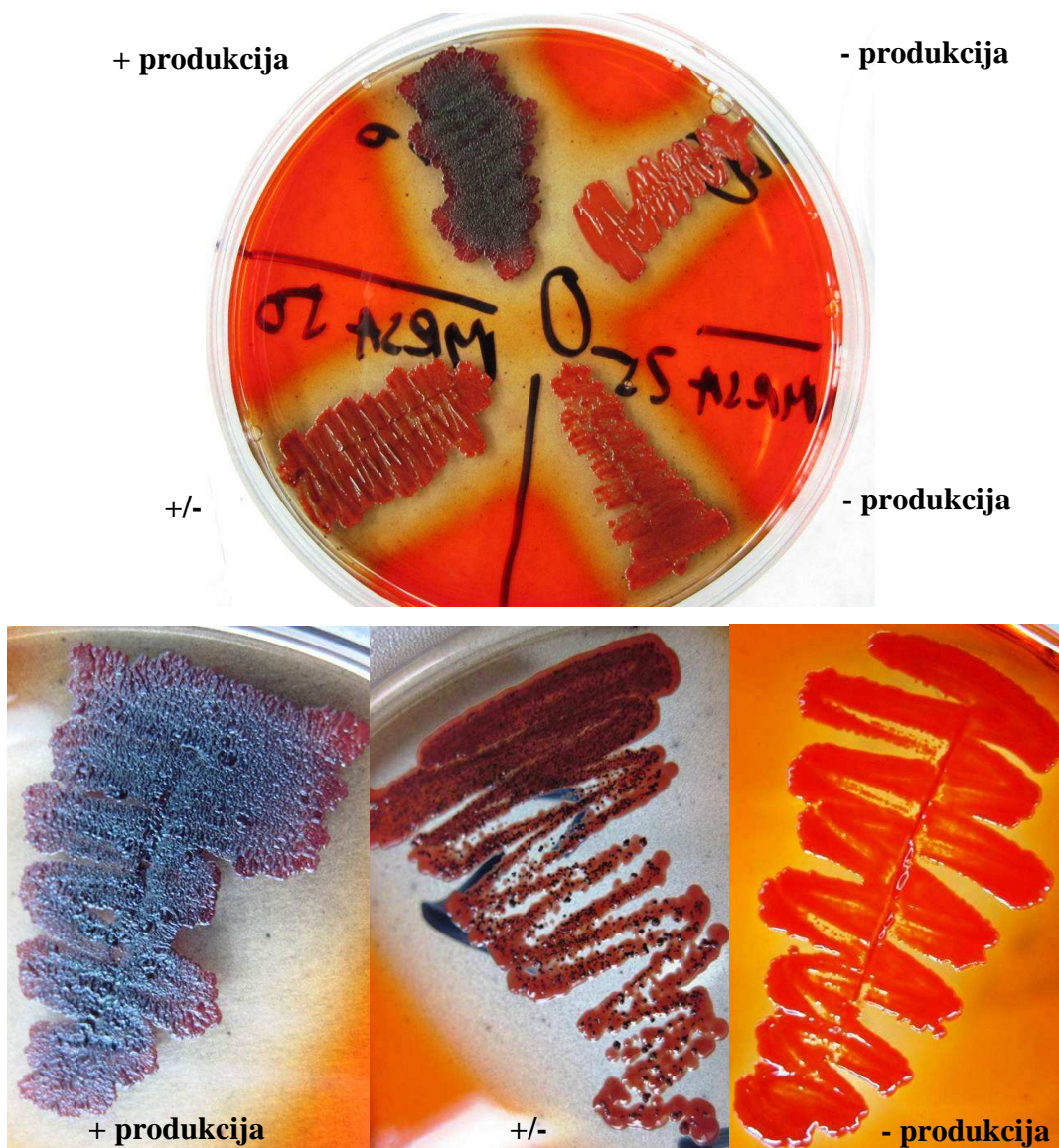
Nakon kultivacije sa M-OH halkonom 20/31 (64.5%) sojeva je izgubilo produkciju glikokaliksa (od kojih je 14 sojeva (45.2 %) prethodno proizvelo glikokaliks, a 6 sojeva (19.4%) je imalo nedefinisane produkcije glikokaliksa), 10/31 (32.3 %) sojeva koji su prethodno proizveli glikokaliks je imalo nedefinisane produkcije, a jedan soj je zadržao produkciju glikokaliksa.

Najslabiji efekat na produkciju glikokaliksa je uočen nakon kultivacije sa P-OH halkonom, gde je 4/31 (12.9 %) sojeva zadržalo istu kategoriju produkcije glikokaliksa kao kontrola (3 soja pozitivnu i 1 soj nedefinisane produkcije), 22/31 (71.0%) sojeva je izgubilo produkciju glikokaliksa (17 sojeva (54.8 %) koji su prethodno proizveli glikokaliks i 5 sojeva (16.1 %) sa nedefinisane produkcijom) a kod 5/31 (16.1 %) sojeva produkcija glikokaliksa je bila nedefinisana.

Tabela 31. Produkcija glikokaliksa nakon kultivacije MRSA sojeva sa O-OH, M-OH i P-OH halkonom – Kongo-crveno metod

Broj soja	Kontrola	O-OH 25.0 µg/ml	M-OH 50.0 µg/ml	P-OH 50.0 µg/ml
3	+	-	+/-	-
4	+/-	-	-	-
5	+/-	-	-	-
6	+	-	+/-	+/-
7	+	-	+/-	-
8	+	-	-	-
10	+	-	-	-
12	+	-	-	-
13	+	-	-	-
14	+	+/-	+/-	+
15	+	+	+	+
16	+	-	-	-
17	+/-	-	-	+/-
18	+	-	-	-
19	+	-	-	-
20	+	-	-	-
21	+	-	-	-
24	+	-	-	-
25	+	-	-	+/-
26	+	+/-	+/-	+/-
27	+	-	+/-	+/-
28	+	+/-	+/-	+/-
29	+/-	-	-	-
34	+	-	-	-
35	+/-	-	-	-
47	+	+/-	+/-	-
50	+	-	-	-
53	+/-	-	-	-
58	+	-	-	-
89	+	+/-	+/-	+
ATCC 43300	+	-	+/-	-

* Pozitivna produkcija glikokaliksa (+), nedefinisan rezultat (+/-) i negativna produkcija glikokaliksa (-).



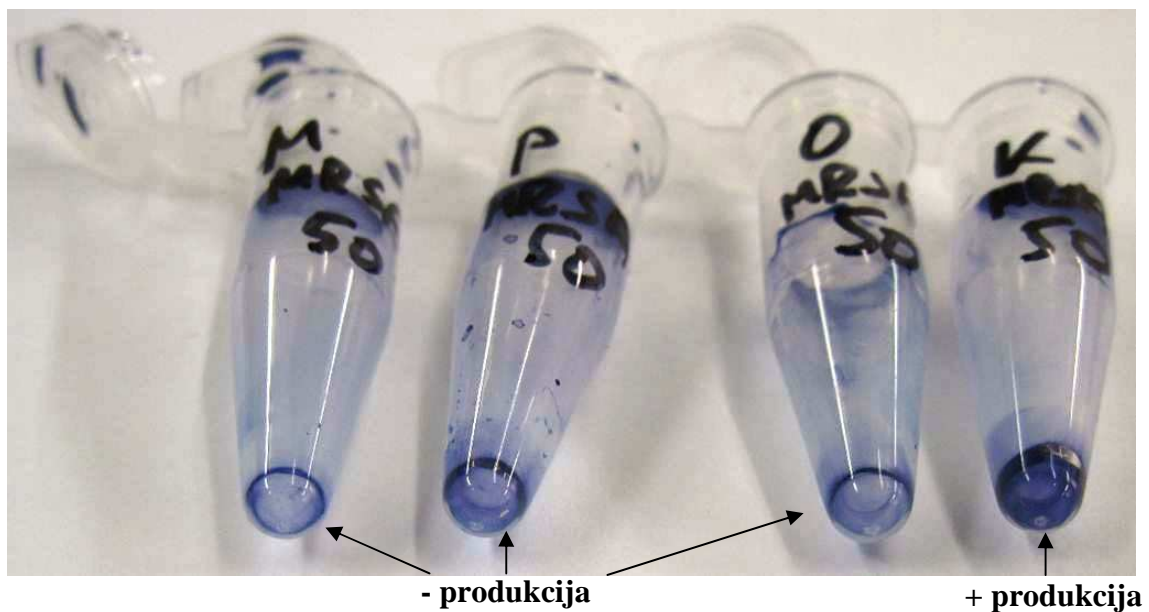
Slika 2. Produkcija glikokaliksa ispitana CRA metodom

Pozitivna produkcija glikokaliksa (+)-suve, crne kolonije kristalnog izgleda;

Negativna produkcija glikokaliksa (-)-vlažne ružičaste kolonije;

Nedefinisan rezultat (+/-)-tamnije, manje suve kolonije bez kristalnog izgleda.

Rezultati dobijeni Christensenovim metodom su pokazali da nakon kultivacije sa O-OH halkonom kod 28/31 (90.3%) sojeva nije utvrđena produkcija glikokaliksa dok je 3/31 (9.7%) sojeva imalo nedefinisanu produkciju glikokaliksa. Kultivacija sa M-OH halkonom je dovela do inhibicije produkcije glikokaliksa kod 23/31 (74.2%) sojeva, 7/31 (22.6%) sojeva je imalo nedefinisan rezultat, a 1/31 (3.2%) soj je zadržao produkciju glikokaliksa. Najslabiji efekat na produkciju glikokaliksa je opet detektovan kod sojeva kultivisanih sa P-OH halkonom, gde je samo 15/31 (48.4%) sojeva izgubilo produkciju glikokaliksa, 15/31 (48.4%) sojeva je imalo nedefinisan rezultat a 1/31 (3.2%) sojeva je zadržalo produkciju glikokaliksa (Tabela 32; Slika 3).



Slika 3. Produkcija glikokaliksa određena Christensenovom metodom

Ispitan je uticaj O-OH, M-OH i P-OH halkona na produkciju glikokaliksa kliničkog izolata MRSA broj 50. Na slici se vidi pozitivna produkcija glikokaliksa kod kontrolnog soja MRSA 50 koji nije rastao u prisustvu halkona (mikrotuba K) i odsustvo produkcije glikokaliksa nakon kultivacije ovog soja sa halkonima (mikrotube M, P, O).

Tabela 32. Produkcija glikokaliksa nakon kultivacije MRSA sojeva sa O-OH, M-OH i P-OH halkonom – Christensenov metod

Broj soja	Kontrola	O-OH 25.0 µg/ml	M-OH 50.0 µg/ml	P-OH 50.0 µg/ml
3	+/-	-	-	-
4	+/-	-	-	-
5	+/-	-	-	-
6	+	-	-	+/-
7	+	-	-	-
8	+	-	-	-
10	+	-	-	-
12	+	-	-	-
13	+	-	-	+/-
14	+	+/-	+/-	+/-
15	+	+/-	+/-	+/-
16	+	-	+/-	+/-
17	+/-	-	-	+/-
18	+	-	+/-	+/-
19	+	-	-	-
20	+	-	-	-
21	+	-	-	-
24	+	-	-	+/-
25	+	-	+/-	+/-
26	+	-	+	+
27	+/-	-	-	+/-
28	+/-	-	-	+/-
29	+/-	-	-	+/-
34	+	-	-	+/-
35	+/-	-	+/-	-
47	+	-	-	-
50	+	-	-	-
53	+/-	-	-	-
58	+	+/-	+/-	-
89	+/-	-	-	+/-
ATCC 43300	+	-	-	+/-

* Pozitivna produkcija glikokaliksa (+), nedefinisan rezultat (+/-) i negativna produkcija glikokaliksa (-).

4.8.2. Ispitivanje uticaja halkona na produkciju biofilma

Produkcija biofilma kod izolovanih MRSA sojeva je određena nakon 24h i 48h kultivacije bez statistički značajne razlike u produkciji biofilma u odnosu na dužinu kultivacije ($p > 0.05$). Iz tog razloga je uticaj halkona na produkciju biofilma ispitan posle 24h kultivacije MRSA u prisustvu tri opadajuće koncentracije O-OH halkona (25.0, 12.5 i 6.2 $\mu\text{g/ml}$) i tri opadajuće koncentracije M-OH i P-OH halkona (50.0, 25.0 i 12.5 $\mu\text{g/ml}$). Kultivacija sa O-OH halkonom je dovela do smanjenja produkcije biofilma kod svih MRSA na sledeći način: pod uticajem najveće koncentracije O-OH (25.0 $\mu\text{g/ml}$), 21/31 (67.7%) sojeva nije produkovalo biofilm, pod uticajem srednje inhibitorne koncentracije (12.5 $\mu\text{g/ml}$) 18/31 (58.0%) sojeva nije produkovalo biofilm i pod uticajem najniže inhibitorne koncentracije (6.2 $\mu\text{g/ml}$) 8/31 (25.8%) sojeva nije produkovalo biofilm. Osim jednog soja koji je pri najnižoj primenjenoj koncentraciji O-OH halkona zadržao produkciju biofilma kao kontrola, ostali sojevi su produkovali manju količinu biofilma u odnosu na pozitivnu kontrolu u svim primenjenim koncentracijama O-OH (Tabela 33).

M-OH i P-OH halkan su najznačajniji inhibitorni efekat na produkciju biofilma ostvarili u najvećoj primenjenoj koncentraciji (50.0 $\mu\text{g/ml}$) gde je produkcija biofilma inhibisana kod 6/31 (19.3%) sojeva pod uticajem M-OH i 2/31 (6,4%) sojeva pod uticajem P-OH (Tabela 34 i 35). Pri najnižoj primenjenoj koncentraciji P-OH i M-OH (12.5 $\mu\text{g/mL}$) 13/31 (42.0%) sojeva je dostiglo produkciju biofilma kao pozitivna kontrola pod uticajem P-OH, i 18/31 (58.0%) sojeva pod uticajem M-OH.

Dobijeni rezultati su pokazali da je inhibicija produkcija biofilma pod uticajem sva tri halkona dozno zavisna (Tabele 33-35) i da je redosled najizraženijeg inhibitornog efekta O-OH > M-OH > P-OH halkan.

Tabela 33. Produkcija biofilma MRSA sojeva nakon 24h kultivacije sa O-OH halkonom (25.0 µg/ml, 12.5 µg/ml i 6.2 µg/ml)

Produkcija biofilma kod kontrolnih sojeva	Produkcija biofilma nakon kultivacije sa O-OH (µg/ml)			
	kategorija	25.0	12.5	6.2
Slaba (1/31)	0	1/1	1/1	-
	1	-	-	1/1
	2	-	-	-
	3	-	-	-
Umerena (15/31)	0	11/15	11/15	6/15
	1	4/15	4/15	9/15
	2	-	-	-
	3	-	-	-
Izražena (15/31)	0	9/15	6/15	2/15
	1	6/15	9/15	13/15
	2	-	-	-
	3	-	-	-

* 0 – odsustvo produkcije biofilma, 1 - slaba produkcija biofilma, 2 - umerena produkcija biofilma i 3- izražena produkcija biofilma.

Tabela 34. Produkcija biofilma MRSA sojeva nakon 24h kultivacije sa M-OH halkonom (50.0 µg/ml, 25.0 µg/ml i 12.5 µg/ml)

Produkcija biofilma kod kontrolnih sojeva	Produkcija biofilma nakon kultivacije sa M-OH (µg/ml)			
	kategorija	50.0	25.0	12.5
Slaba (1/31)	0	1/1	1/1	-
	1	-	-	1/1
	2	-	-	-
	3	-	-	-
Umerena (15/31)	0	5/15	-	-
	1	10/15	14/15	5/15
	2	-	1/15	10/15
	3	-	-	-
Izražena (15/31)	0	-	-	-
	1	11/15	3/15	-
	2	4/15	10/15	8/15
	3	-	2/15	7/15

* 0 – odsustvo produkcije biofilma, 1 - slaba produkcija biofilma, 2 - umerena produkcija biofilma i 3- izražena produkcija biofilma.

Tabela 35. Produkcija biofilma MRSA sojeva nakon 24h kultivacije sa P-OH halkonom (50.0 µg/ml, 25.0 µg/ml i 12.5 µg/ml)

Produkcija biofilma kod kontrolnih sojeva	Produkcija biofilma nakon kultivacije sa P-OH (µg/ml)			
	kategorija	50.0	25.0	12.5
Slaba (1/31)	0	-	-	-
	1	1/1	1/1	1/1
	2	-	-	-
	3	-	-	-
Umerena (15/31)	0	2/15	-	-
	1	13/15	14/15	10/15
	2	-	1/15	5/15
	3	-	-	-
Izražena (15/31)	0	-	-	-
	1	10/15	5/15	-
	2	3/15	8/15	8/15
	3	2/15	2/15	7/15

* 0 – odsustvo produkcije biofilma, 1 - slaba produkcija biofilma, 2 - umerena produkcija biofilma i 3- izražena produkcija biofilma.

Da bi ispitali da li je inhibicija formiranja biofilma pod uticajem halkona trajni efekat, MRSA sojevi su nakon 24h kultivacije sa halkonima presejani na TSA i nakon 24h rekultivacije bez halkona ponovo je ispitana sposobnost formiranja biofilma.

Svi sojevi su nakon 24h kultivacije na TSA ponovo pokazali sposobnost formiranja biofilma. Kultivacija sa najvećom koncentracijom O-OH halkona (25.0 µg/ml) je kod 7/31 (22.6%) sojeva dovela do smanjenja kategorije produkcije biofilma od umerene (kategorija 2) na slabu produkciju (kategorija 1) i kod 6/31 (19.3%) sojeva od izražene produkcije biofilma (kategorija 3) na umerenu (16.1%) i slabu (3.2%). Niže koncentracije O-OH halkona nisu imale efekat na promenu kategorije produkcije biofilma nakon rekultivacije na TSA (Tabela 36).

Najveća primenjena koncentracija M-OH i P-OH (50.0 µg/ml) je takođe dovela do smanjenja kategorije produkcije biofilma od umerene na slabu kod 6/31 (19.3%) sojeva pod uticajem M-OH i 3/31 (9.7%) pod uticajem P-OH i smanjenja kategorije od izražene produkcije biofilma na umerenu kod 4/31 (12.9%) sojeva pod uticajem M-OH ili P-OH halkona. Niže koncentracije oba halkona nisu imale uticaja na promenu kategorije produkcije biofilma (Tabela 37 i 38).

Tabela 36. Produkcija biofilma MRSA sojeva posle 24h rekultivacije na TSA nakon kultivacije sa O-OH halkanom (25.0 µg/ml, 12.5 µg/ml i 6.2 µg/ml)

Produkcija biofilma kod kontrolnih sojeva	Produkcija biofilma posle 24h kultivacije na TSA nakon kultivacije sa O-OH (µg/ml)			
	kategorija	25.0	12.5	6.2
Slaba (1/31)	0	-	-	-
	1	1/1	1/1	1/1
	2	-	-	-
	3	-	-	-
Umerena (15/31)	0	-	-	-
	1	7/15	1/15	-
	2	8/15	14/15	15/15
	3	-	-	-
Izražena (15/31)	0	-	-	-
	1	1/15	-	-
	2	5/15	1/15	-
	3	9/15	14/15	15/15

0 – odsustvo produkcije biofilma, 1 - slaba produkcija biofilma, 2 - umerena produkcija biofilma i 3- izražena produkcija biofilma.

Tabela 37. Produkcija biofilma MRSA sojeva posle 24h rekultivacije na TSA nakon kultivacije sa M-OH halkanom (50.0 µg/ml, 25.0 µg/ml i 12.5 µg/ml)

Produkcija biofilma kod kontrolnih sojeva	Produkcija biofilma posle 24h kultivacije na TSA nakon kultivacije sa M-OH (µg/ml)			
	kategorija	50.0	25.0	12.5
Slaba (1/31)	0	-	-	-
	1	1/1	1/1	1/1
	2	-	-	-
	3	-	-	-
Umerena (15/31)	0	-	-	-
	1	6/15	-	-
	2	9/15	15/15	15/15
	3	-	-	-
Izražena (15/31)	0	-	-	-
	1	-	-	-
	2	4/15	2/15	-
	3	11/15	13/15	15/15

0 – odsustvo produkcije biofilma, 1 - slaba produkcija biofilma, 2 - umerena produkcija biofilma i 3- izražena produkcija biofilma.

Tabela 38. Produkcija biofilma MRSA sojeva posle 24h rekultivacije na TSA nakon kultivacije sa P-OH halkonom (50.0 µg/ml, 25.0 µg/ml i 12.5 µg/ml)

Produkcija biofilma kod kontrolnih sojeva	Produkcija biofilma posle 24h kultivacije na TSA nakon kultivacije sa P-OH (µg/ml)			
	kategorija	50.0	25.0	12.5
Slaba (1/31)	0	-	-	-
	1	1/1	1/1	1/1
	2	-	-	-
	3	-	-	-
Umerena (15/31)	0	-	-	-
	1	3/15	-	-
	2	12/15	15/15	15/15
	3	-	-	-
Izražena (15/31)	0	-	-	-
	1	-	-	-
	2	4/15	-	-
	3	11/15	15/15	15/15

0 – odsustvo produkcije biofilma, 1 - slaba produkcija biofilma, 2 - umerena produkcija biofilma i 3- izražena produkcija biofilma.

4.8.3. Ispitivanje uticaja halkona na adherenciju MRSA za humani fibronektin

Rezultati dobijeni nakon kultivacije MRSA sa 25.0 µg/ml humanog fibronektina su pokazali da svi testirani sojevi imaju sličnu sposobnost vezivanja za humani fibronektin. Nakon 24h inkubacije sa O-OH (25.0 µg/ml), M-OH ili P-OH (50.0 µg/ml) uočeno je statistički značajno smanjenje adherencije MRSA za humani fibronektin u odnosu na pozitivne kontrole (Tabela 39). Najizraženija inhibicija adherencije je uočena u kulturama sa P-OH, gde je 27/31 (87.0%) sojeva statistički značajno smanjilo vezivanje za humani fibronektin ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$). Procenat vezivanja za fibronektin se kretao između 30.6% - 79.6% adherencije pozitivne kontrole. Kultivacija sa M-OH je dovela do statistički značajnog smanjenja adherencije za fibronektin kod 24/31 (77.4%) sojeva, sa procentom adherencije između 27.5% - 80.3% pozitivne kontrole ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$), dok je u kulturama sa O-OH uočeno statistički značajno smanjenje vezivanja za fibronektin kod 22/31 (71.0%) sojeva sa procentom adherencije između 31.2% - 73.7% pozitivne kontrole ($p < 0.05$, $p < 0.01$).

Nakon produžene inkubacije sa O-OH, M-OH i P-OH tokom 48h uočeno je statistički značajno smanjenje adherencije za humani fibronektin kod svih sojeva kultivisanih sa halkonima ($p < 0.05$, $p < 0.01$, Tabela 40).

Nije uočena statistički značajna razlika u vezivanju za humani fibronektin između MRSA izolovanih iz uzoraka iz respiratornog trakta, rana, hemokultura i drugih mesta nakon 24h/48h kultivacije sa halkonima ($p > 0.05$, rezultati nisu prikazani).

Da bi ispitali da li je inhibicija vezivanja MRSA za humani fibronektin pod uticajem halkona trajni efekat, MRSA sojevi su nakon 24h kultivacije sa halkonima presejani na TSA i nakon 24h rekultivacije bez halkona ponovo je ispitana sposobnost adherencije za fibronektin. Nije uočena statistički značajna razlika u adherenciji MRSA za humani fibronektin između sojeva kultivisanih sa halkonima i pozitivnih kontrola ($p > 0.05$, rezultati nisu prikazani).

Tabela 39. Vezivanje MRSA sojeva za humani fibronektin nakon 24h kultivacije u prisustvu O-OH, M-OH i P-OH halkona

Broj soja	O-OH 24h 25.0 µg/ml	M-OH 24h 50.0 µg/ml	P-OH 24h 50.0 µg/ml	Kontrola 24h
3	66.7 ± 2.7 *	71.7 ± 12.4	66.0 ± 1.3 *	100.0 ± 8.0
4	73.7 ± 1.1 **	63.7 ± 5.2 **	77.9 ± 8.6	100.0 ± 3.8
5	69.4 ± 0.6 **	60.1 ± 1.3 **	55.1 ± 2.8 **	100.0 ± 3.5
6	68.0 ± 4.0 *	80.3 ± 4.6 *	64.1 ± 1.4 **	100.0 ± 4.1
7	55.1 ± 4.0 *	63.5 ± 15.2	55.6 ± 0.4 *	100.0 ± 10.0
8	63.1 ± 8.0 *	65.5 ± 0.5 *	59.5 ± 0.6 **	100.0 ± 5.1
10	56.4 ± 1.5 *	75.2 ± 11.4	66.7 ± 2.6 *	100.0 ± 7.7
12	54.3 ± 1.5	61.1 ± 3.9	62.7 ± 7.6	100.0 ± 12.3
13	71.3 ± 8.0 *	65.5 ± 6.3 *	58.6 ± 1.4 **	100.0 ± 3.7
14	68.2 ± 8.6	58.9 ± 0.7 *	52.2 ± 1.4 *	100.0 ± 12.1
15	66.0 ± 5.5 *	66.7 ± 1.4 **	79.6 ± 5.7 *	100.0 ± 4.1
16	56.8 ± 11.1 *	50.9 ± 1.4 ***	49.4 ± 2.8 ***	100.0 ± 1.0
17	57.4 ± 7.3 **	68.0 ± 13.5	63.3 ± 14.5 *	100.0 ± 0.8
18	52.2 ± 1.4 *	56.8 ± 12.9	49.6 ± 0.3 *	100.0 ± 9.9
19	31.2 ± 8.3 *	27.5 ± 3.1 *	30.6 ± 14.1 *	100.0 ± 11.7
20	59.3 ± 9.7 *	39.4 ± 4.4 **	40.7 ± 5.7 **	100.0 ± 3.4
21	73.7 ± 7.3 *	55.9 ± 6.4 **	53.3 ± 3.4 **	100.0 ± 1.3
24	62.8 ± 1.5 **	59.5 ± 9.2 **	57.0 ± 3.2 **	100.0 ± 1.4
25	38.2 ± 4.3 *	43.5 ± 1.3 *	42.4 ± 2.6 *	100.0 ± 13.9
26	35.3 ± 8.0	36.3 ± 1.3	39.7 ± 15.4	100.0 ± 17.7
27	48.5 ± 6.1	55.8 ± 8.2	45.6 ± 10.5	100.0 ± 12.4
28	65.1 ± 4.6 **	55.6 ± 0.6 **	55.1 ± 6.7 **	100.0 ± 1.1
29	59.7 ± 11.6	42.9 ± 6.7 *	43.4 ± 0.8 *	100.0 ± 14.7
34	64.7 ± 11.4	44.2 ± 5.1 **	44.6 ± 3.8 **	100.0 ± 1.7
35	59.3 ± 14.3	52.0 ± 6.3 **	58.9 ± 2.2 **	100.0 ± 2.9
47	56.7 ± 12.9	44.6 ± 1.2 **	44.9 ± 7.0 **	100.0 ± 0.8
50	48.3 ± 7.6 *	51.2 ± 11.2 *	41.6 ± 3.8 *	100.0 ± 10.2
53	64.6 ± 12.9	45.3 ± 2.6 **	48.2 ± 8.6 **	100.0 ± 4.4
58	58.9 ± 2.3 **	52.2 ± 2.6 **	50.7 ± 1.3 **	100.0 ± 2.0
89	63.9 ± 1.0 **	61.6 ± 4.2 **	49.2 ± 4.0 **	100.0 ± 1.0
ATCC 43300	63.4 ± 5.5 **	63.0 ± 10.2 **	47.5 ± 5.4 **	100.0 ± 1.9

Rezultati su prikazani kao procenat apsorbance pozitivne kontrole (izražene kao 100% ± SD).

* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001

Tabela 40. Vezivanje MRSA sojeva za humani fibronektin nakon 48h kultivacije u prisustvu O-OH, M-OH i P-OH halkona

Broj soja	O-OH 48h 25.0 µg/ml	M-OH 48h 50.0 µg/ml	P-OH 48h 50.0 µg/ml	Kontrola 48h
3	41.4 ± 8.9 *	39.9 ± 1.3 *	37.3 ± 5.7 *	100.0 ± 11.6
4	43.7 ± 6.8 **	39.4 ± 0.3 **	43.0 ± 7.0 **	100.0 ± 4.0
5	45.0 ± 1.2 **	48.1 ± 14.7 *	38.5 ± 0.8 *	100.0 ± 4.4
6	52.3 ± 4.9 **	48.6 ± 0.4 **	50.9 ± 8.8 *	100.0 ± 6.4
7	56.1 ± 12.3 *	41.9 ± 1.4 **	41.9 ± 6.9 **	100.0 ± 5.7
8	44.7 ± 7.7 **	43.9 ± 7.9 **	44.7 ± 7.7 **	100.0 ± 5.7
10	46.9 ± 6.6 *	51.3 ± 6.0 *	40.4 ± 0.6 *	100.0 ± 12.4
12	49.6 ± 12.9 **	46.3 ± 11.3 **	52.9 ± 14.3 *	100.0 ± 2.3
13	44.7 ± 6.0 *	47.3 ± 11.4 *	42.0 ± 15.4 *	100.0 ± 14.0
14	51.3 ± 1.2 *	51.3 ± 1.2 *	54.7 ± 14.5 *	100.0 ± 7.3
15	44.9 ± 5.3 **	44.5 ± 6.7 **	44.9 ± 13.3 **	100.0 ± 2.4
16	47.0 ± 12.4 *	41.0 ± 11.7 *	36.8 ± 0.6 *	100.0 ± 15.9
17	35.3 ± 8.7 *	33.1 ± 0.4 *	32.4 ± 0.4 *	100.0 ± 15.3
18	44.6 ± 7.8 **	45.1 ± 3.1 **	51.5 ± 14.8 *	100.0 ± 2.8
19	40.7 ± 0.3 *	46.0 ± 10.9 *	42.0 ± 7.4 *	100.0 ± 11.3
20	56.4 ± 14.9 *	42.7 ± 1.5 *	50.5 ± 2.6 *	100.0 ± 9.1
21	45.4 ± 7.9 **	47.4 ± 7.6 **	50.0 ± 2.9 **	100.0 ± 5.8
24	32.5 ± 4.7 *	30.4 ± 5.0 *	42.5 ± 15.4 *	100.0 ± 12.1
25	54.3 ± 14.7 *	57.4 ± 12.9 *	39.6 ± 4.7 **	100.0 ± 1.2
26	46.4 ± 6.1 **	45.2 ± 5.1 **	41.5 ± 6.9 **	100.0 ± 4.6
27	48.0 ± 0.4 *	46.7 ± 11.1 *	41.1 ± 7.0 *	100.0 ± 12.6
28	59.8 ± 11.0 *	56.5 ± 12.9 *	54.2 ± 7.3 **	100.0 ± 1.3
29	48.6 ± 2.6 **	53.2 ± 2.4 **	45.9 ± 5.5 **	100.0 ± 3.8
34	46.3 ± 3.8 **	50.0 ± 14.1 *	42.1 ± 12.6 **	100.0 ± 2.4
35	36.3 ± 2.7 *	36.6 ± 6.6 *	43.2 ± 0.8 *	100.0 ± 15.5
47	49.1 ± 0.3 **	57.3 ± 13.8 *	43.1 ± 0.3 *	100.0 ± 2.4
50	43.3 ± 1.3 **	44.8 ± 11.3 **	42.9 ± 2.6 **	100.0 ± 4.5
53	47.3 ± 3.5 *	49.2 ± 0.7 *	48.8 ± 1.1 *	100.0 ± 8.8
58	48.1 ± 16.0 *	43.8 ± 13.8 *	40.3 ± 2.7 **	100.0 ± 5.5
89	50.4 ± 6.3 **	45.1 ± 9.8 **	50.4 ± 11.3 **	100.0 ± 2.5
ATCC 43300	41.8 ± 4.0 **	38.2 ± 2.6 **	37.5 ± 7.9 **	100.0 ± 9.8

Rezultati su prikazani kao procenat apsorbance pozitivne kontrole (izražene kao 100% ± SD).

* p<0.05; ** p<0.01

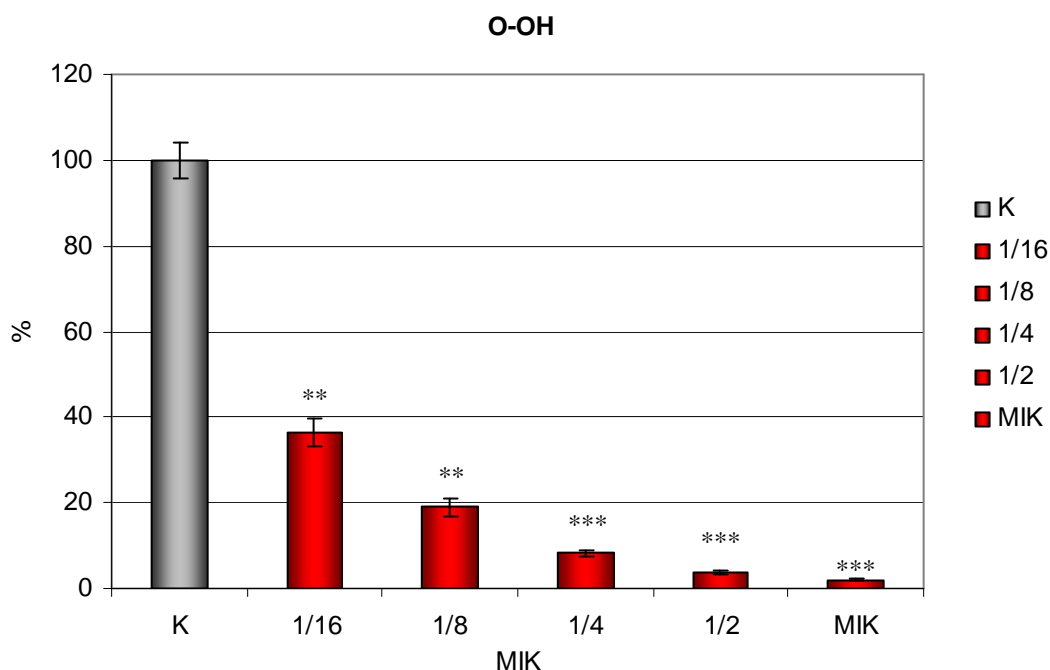
4.8.4. Ispitivanje uticaja halkona na produkciju α -hemolizina

Uticaj halkona na produkciju α -hemolizina je ispitan u tri nezavisna eksperimenta. MRSA sojevi su kultivisani u prisustvu MIK i četiri subinhibitorne koncentracije halkona (1/2xMIK; 1/4xMIK; 1/8xMIK i 1/16xMIK) do kasne postekspozicionarne faze rasta (44-48h). Kontrola hemolitičke aktivnosti supernatanta su bili supernatanti MRSA sojeva koji su kultivisani u medijumu bez halkona. Rezultati su prikazani kao procenat hemolize u odnosu na kontrolu, koja je predstavljena kao 100.0% hemolitičke aktivnosti svakog pojedinačnog soja.

Najznačajnija inhibicija hemolize zečijih eritrocita se javila u supernatantima kultura sa O-OH halkonom. Pri koncentraciji 1/2xMIK (25.0 μ g/ml) i 1/4xMIK (12.5 μ g/ml), hemoliza se kretala između 3.8-8.2% kontrolne hemolize ($p < 0.001$), dok je kultivacija sa ostalim subinhibitornim koncentracijama testiranog jedinjenja dovela do blagog porasta hemolitičke aktivnosti na 19.0% (1/8xMIK) ($p < 0.01$) i 34.6% (1/16xMIK) ($p < 0.01$) (Grafikon 3; Tabela 41). Pri najmanjoj primenjenoj koncentraciji halkona (1/16xMIK) nije došlo do značajnog porasta hemolitičke aktivnosti.

Za razliku od O-OH halkona, uticaj M-OH i P-OH halkona na inhibiciju produkcije α -hemolizina je ispitan u koncentracijama od 50.0 μ g/ml (1/2xMIK) do 6.2 μ g/ml (1/16xMIK). Inhibicija hemolize pod uticajem M-OH halkona se javila pri koncentraciji 1/2xMIK i 1/4xMIK, i kretala se između 7.1-18.8% kontrolne hemolize ($p < 0.01$; $p < 0.001$), dok je subinhibitorna koncentracija od 1/8xMIK dovela do porasta hemolitičke aktivnosti na 40.7% ($p < 0.05$). Pri najmanjoj koncentraciji M-OH halkona hemolitička aktivnost supernatanta je iznosila 62.8% aktivnosti kontrole (1/16xMIK) (Grafikon 4; Tabela 42).

Najslabiji inhibitorni efekat na produkciju α -hemolizina je zapažen u supernatantima kultura sa P-OH halkonom. Statistički značajna inhibicija produkcije α -hemolizina se javila pri koncentraciji 1/2xMIK i iznosila je 7.7% ($p < 0.01$), ali se brzi porast hemolitičke aktivnosti zapaža već pri dvostruko (43.8%; $p < 0.05$) i četverostruko (72.6%; $p > 0.05$) manjim koncentracijama ispitivanog jedinjenja, dok do potpunog oporavka hemolitičke aktivnosti dolazi pri koncentraciji 1/16xMIK (94.2%) (Grafikon 5; Tabela 43).



Grafikon 3. Procenat hemolize zečijih eritrocita u prisustvu supernatanta kultura MRSA kultivisanih sa subinhibitornim koncentracijama O-OH halkona

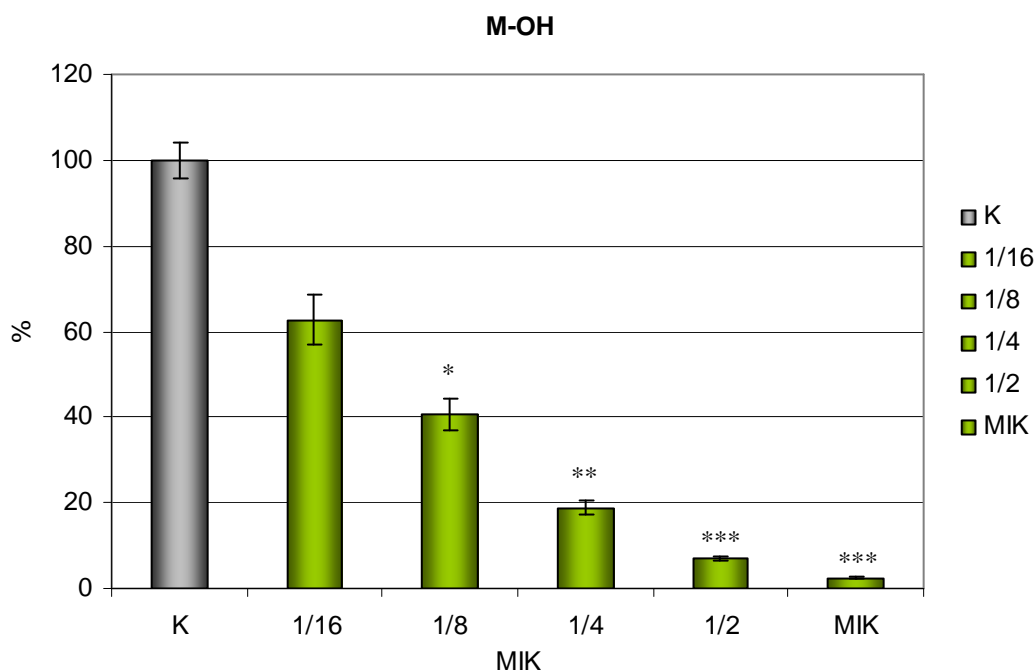
Rezultati su prikazani kao procenat apsorbance pozitivne kontrole (izražene kao 100% ± SD).

** p<0.01; *** p<0.001

Tabela 41. Procenat hemolize zečijih eritrocita u prisustvu supernatanta kultura MRSA kultivisanih sa subinhibitornim koncentracijama O-OH halkona

broj soja	% hemolize O-OH (µg/ml)					K
	MIK	1/2xMIK (25.0µg/ml)	1/4xMIK (12.5 µg/ml)	1/8xMIK (6.2 µg/ml)	1/16xMIK (3.1 µg/ml)	
5	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	1.4 ± 0.2	13.4 ± 2.0	19.0 ± 2.1	100.0 ± 4.9
6	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	3.7 ± 0.3	7.9 ± 0.9	14.6 ± 1.6	100.0 ± 1.9
7	2.1 ± 0.2	2.5 ± 0.3	3.4 ± 0.3	6.6 ± 0.8	36.0 ± 3.2	100.0 ± 2.4
8	0.3 ± 0.0	3.4 ± 0.2	4.0 ± 0.4	11.3 ± 1.1	20.3 ± 2.0	100.0 ± 2.6
10	4.5 ± 0.3	8.2 ± 0.4	13.6 ± 0.6	22.7 ± 2.3	31.6 ± 3.5	100.0 ± 3.2
12	3.1 ± 0.2	6.9 ± 0.3	17.7 ± 0.9	28.8 ± 2.8	48.5 ± 3.9	100.0 ± 8.3
13	2.2 ± 0.1	3.7 ± 0.3	12.2 ± 0.7	20.6 ± 1.9	38.7 ± 3.4	100.0 ± 1.6
14	6.0 ± 0.3	8.0 ± 0.4	17.3 ± 1.0	37.5 ± 4.0	62.5 ± 5.3	100.0 ± 8.6
15	0.8 ± 0.1	3.0 ± 0.3	6.6 ± 0.5	27.6 ± 3.7	55.7 ± 4.9	100.0 ± 6.7
17	1.3 ± 0.1	1.5 ± 0.2	2.3 ± 0.3	13.1 ± 2.3	18.9 ± 2.0	100.0 ± 2.7
sr vr ± SD	2.1 ± 0.1	3.8 ± 0.3	8.2 ± 0.5	19.0 ± 2.2	34.6 ± 3.2	100.0 ± 4.3

K-kontrolna hemoliza (MRSA kultivisane u MHB bez dodatka halkona). Rezultati su prikazani kao procenat hemolize u odnosu na kontrolu, koja je predstavljena kao 100% hemolitičke aktivnosti svakog pojedinačnog soja.



Grafikon 4. Procenat hemolize zečijih eritrocita u prisustvu supernatanta kultura MRSA kultivisanih sa subinhibitornim koncentracijama M-OH halkona

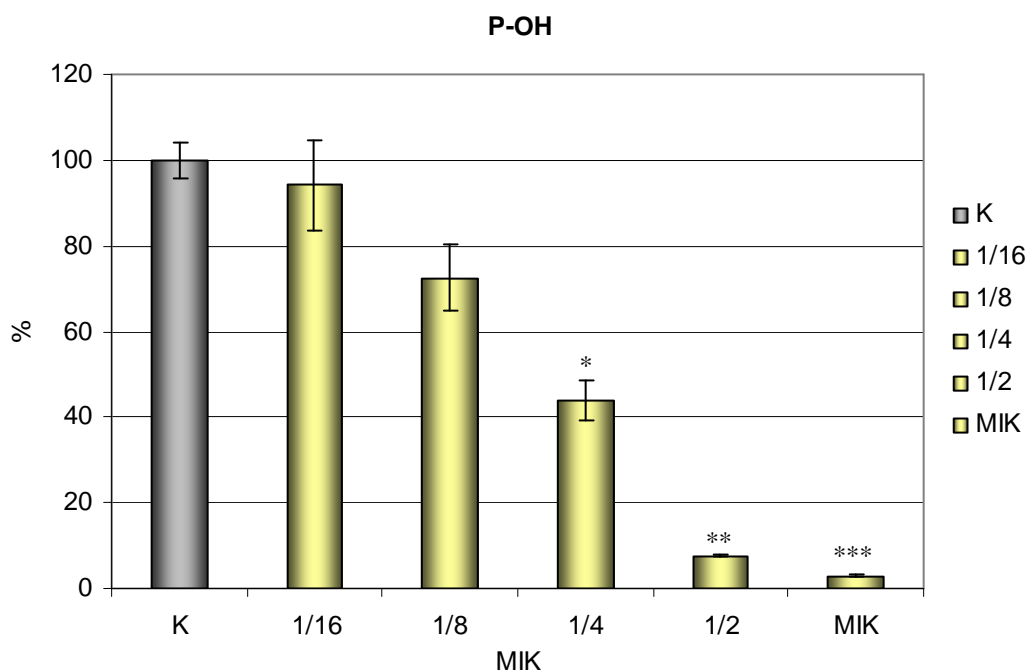
Rezultati su prikazani kao procenat apsorbance pozitivne kontrole (izražene kao 100% ± SD).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Tabela 42. Procenat hemolize zečijih eritrocita u prisustvu supernatanta kultura MRSA kultivisanih sa subinhibitornim koncentracijama M-OH halkona

broj soja	% hemolize M-OH ($\mu\text{g/ml}$)					K
	MIK (50.0 $\mu\text{g/ml}$)	1/2xMIK (25.0 $\mu\text{g/ml}$)	1/4xMIK (12.5 $\mu\text{g/ml}$)	1/8xMIK (12.5 $\mu\text{g/ml}$)	1/16xMIK (6.2 $\mu\text{g/ml}$)	
5	3.0 ± 0.1	7.7 ± 0.2	22.5 ± 1.3	44.2 ± 3.2	60.2 ± 6.1	100.0 ± 4.9
6	0.6 ± 0.1	6.9 ± 0.3	12.9 ± 1.1	30.2 ± 3.0	59.5 ± 5.4	100.0 ± 1.9
7	1.7 ± 0.2	7.3 ± 0.4	11.5 ± 1.2	32.4 ± 2.9	68.1 ± 8.2	100.0 ± 2.4
8	0.5 ± 0.1	6.7 ± 0.4	22.6 ± 2.0	46.1 ± 4.7	58.8 ± 3.1	100.0 ± 2.6
10	4.4 ± 0.3	8.0 ± 0.8	13.7 ± 1.0	29.0 ± 3.2	63.2 ± 3.3	100.0 ± 3.2
12	3.4 ± 0.2	5.0 ± 0.6	21.2 ± 2.3	46.5 ± 4.1	67.1 ± 6.8	100.0 ± 8.3
13	3.2 ± 0.1	9.0 ± 0.8	23.3 ± 2.3	47.6 ± 3.9	57.9 ± 4.6	100.0 ± 1.6
14	5.6 ± 0.3	8.9 ± 1.0	36.7 ± 3.1	56.7 ± 5.0	70.1 ± 7.8	100.0 ± 8.6
15	0.9 ± 0.1	4.8 ± 0.6	12.4 ± 1.1	37.9 ± 2.9	57.5 ± 6.2	100.0 ± 6.7
17	1.4 ± 0.2	6.4 ± 0.5	11.0 ± 0.4	36.9 ± 4.0	66.0 ± 6.9	100.0 ± 2.7
sr vr ± SD	2.5 ± 0.2	7.1 ± 0.6	18.8 ± 1.6	40.7 ± 3.7	62.8 ± 5.8	100.0 ± 4.3

K-kontrolna hemoliza (MRSA kultivisane u MHB bez dodatka halkona). Rezultati su prikazani kao procenat hemolize u odnosu na kontrolu, koja je predstavljena kao 100% hemolitičke aktivnosti svakog pojedinačnog soja.



Grafikon 5. Procenat hemolize zečijih eritrocita u prisustvu supernatanta kultura MRSA kultivisanih sa subinhibitornim koncentracijama P-OH halkona

Rezultati su prikazani kao procenat apsorbance pozitivne kontrole (izražene kao 100% ± SD).

* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001

Tabela 43. Procenat hemolize zečijih eritrocita u prisustvu supernatanta kultura MRSA kultivisanih sa subinhibitornim koncentracijama P-OH halkona

broj soja	% hemolize P-OH (µg/ml)					K
	MIK (50.0 µg/ml)	1/2xMIK (25.0 µg/ml)	1/4xMIK (12.5 µg/ml)	1/8xMIK (6.2 µg/ml)	1/16xMIK (3.1 µg/ml)	
5	3.2 ± 0.3	7.7 ± 0.2	37.9 ± 3.2	80.0 ± 7.4	98.0 ± 10.0	100.0 ± 4.9
6	1.6 ± 0.2	8.8 ± 0.3	48.3 ± 4.1	75.2 ± 6.9	95.3 ± 11.2	100.0 ± 1.9
7	1.8 ± 0.3	6.4 ± 0.2	36.7 ± 3.6	68.6 ± 8.1	89.9 ± 11.0	100.0 ± 2.4
8	2.5 ± 0.4	5.9 ± 0.4	45.3 ± 5.1	81.4 ± 9.8	97.7 ± 9.8	100.0 ± 2.6
10	3.4 ± 0.3	6.5 ± 0.2	49.5 ± 5.2	69.7 ± 7.1	91.2 ± 9.7	100.0 ± 3.2
12	2.5 ± 0.3	8.7 ± 0.5	37.9 ± 4.1	68.7 ± 6.8	87.9 ± 9.4	100.0 ± 8.3
13	3.3 ± 0.4	7.6 ± 0.3	36.4 ± 4.6	58.3 ± 5.4	98.1 ± 10.6	100.0 ± 1.6
14	5.1 ± 0.3	8.8 ± 0.5	40.8 ± 4.7	66.0 ± 7.1	96.7 ± 9.3	100.0 ± 8.6
15	2.8 ± 0.2	7.6 ± 0.5	49.6 ± 5.6	70.0 ± 8.6	92.6 ± 11.7	100.0 ± 6.7
17	2.4 ± 0.3	8.6 ± 0.5	55.1 ± 7.6	88.2 ± 9.2	94.8 ± 12.1	100.0 ± 2.7
sr vr ± SD	2.9 ± 0.3	7.7 ± 0.4	43.8 ± 4.8	72.6 ± 7.6	94.2 ± 10.5	100.0 ± 4.3

K-kontrolna hemoliza (MRSA kultivisane u MHB bez dodatka halkona). Rezultati su prikazani kao procenat hemolize u odnosu na kontrolu, koja je predstavljena kao 100% hemolitičke aktivnosti svakog pojedinačnog soja.

4.9. Ispitivanje efekta kombinovane primene halkona i antibiotika na rast izolovanih MRSA sojeva

Ispitivanje efekta kombinacije halkona sa antibioticima je izvršeno na dvadeset odabranih MRSA sojeva kojima su prethodnim ispitivanjem utvrđene najniže MIK vrednosti za halkone. Ispitivanje je izvršeno sa pet antibiotika koji su predstavnici grupa antibiotika sa različitim mehanizmom delovanja - β -laktamskim antibioticima cefotaksimom (CFX) i ceftriaksonom (CTX), fluorohinolonom ciprofloksacinom (CIP), aminoglikozidom gentamicinom (GEN) i inhibitorom sinteze folne kiseline trimetoprim/sulfametoksazolom (TMP-SMX). Određene su vrednosti MIK za antibiotike koje su se kretale u opsegu 4.0-64.0 $\mu\text{g/ml}$ (CFX), 4.0-128.0 $\mu\text{g/ml}$ (CTX), 0.5-64.0 $\mu\text{g/ml}$ (CIP), 1.0-16.0 $\mu\text{g/ml}$ (GEN) i 1/19-2/38 $\mu\text{g/ml}$ (TMP-SMX). Redosled inhibitorne aktivnosti halkona (srednja vrednost $\text{MIK} \pm \text{SD}$) je bio: O-OH ($\text{MIK} = 42.5 \pm 11.8 \mu\text{g/ml}$) > M-OH ($\text{MIK} = 98.8 \pm 43.3 \mu\text{g/ml}$) > P-OH ($\text{MIK} = 108.8 \pm 29.6 \mu\text{g/ml}$). MIK vrednosti za halkone i antibiotike su predstavljene u Tabeli 44.

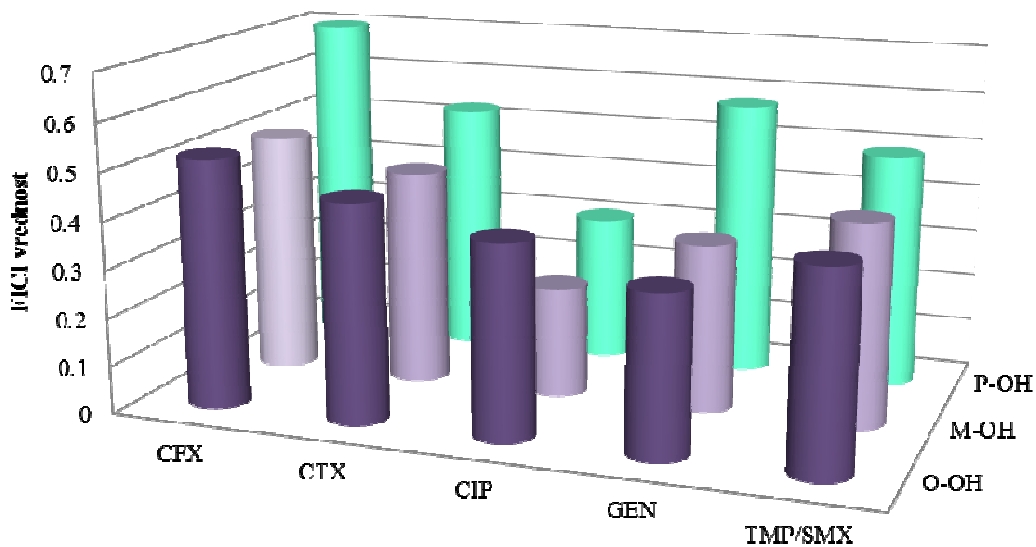
Ukupan efekat kombinacije halkona sa antibioticima se kretao između sinergizma ($\text{FICI} \leq 0.5$) i indiferentnog efekta ($1 < \text{FICI} \leq 2$). Srednje FICI vrednosti su predstavljene na Grafikonu 6.

Najznačajniji sinergizam utvrđen je u kombinaciji O-OH sa GEN ($\text{FICI} = 0.125-0.500$), CIP ($\text{FICI} = 0.188-0.750$) i TMP-SMX ($\text{FICI} = 0.250-0.750$). Efekat je ostvaren u kombinaciji O-OH/GEN pri koncentracijama 1/16-1/8 MIK (3.1-12.5 $\mu\text{g/mL}$ O-OH) i 1/16-1/4 MIK (0.5-4.0 $\mu\text{g/mL}$ GEN), kod O-OH/CIP kombinacije u koncentracijama 1/16-1/2 MIK (3.1-25.0 $\mu\text{g/mL}$ O-OH) i 1/256-1/2 MIK (0.2-4.0 $\mu\text{g/mL}$ CIP) i kombinaciji O-OH/TMP-SMX u koncentracijama 1/8-1/2 MIK (6.2-25.0 $\mu\text{g/mL}$ O-OH) i 1/8-1/4 MIK (0.2/4.7-0.5/9.5 $\mu\text{g/mL}$ TMP-SMX) (Tabela 37). Redosled sinergističkog efekta (srednji % redukcije MIK, srednji FICI) je bio GEN (80.3%, 0.334) > CIP (87.6%, 0.402) > TMP-SMX (83.1%, 0.413) > CTX (80.2%, 0.455) > CFX (71.9%, 0.519). Sve kombinacije O-OH/GEN su bile u kategoriji sinergizma; 80% O-OH/TMP-SMX kombinacija je bilo u kategoriji sinergizma a 20.0% je imalo aditivni efekat; 75.0% kombinacija O-OH/CIP je bilo u kategoriji sinergizma a 25.0% je imalo aditivni efekat. Kombinacije O-OH sa cefalosporinima bile su u kategoriji sinergizma u 70.0-

75.0% slučajeva, jedna kombinacija (O-OH/CFX) je pokazala indiferentni efekat a ostale kombinacije su pokazale aditivni efekat (Tabela 45).

Efekat kombinacija M-OH sa antibioticima je bio sličan efektu kombinacija sa O-OH halkanom (Tabela 46). Redosled sinergističkog efekta (srednji % redukcije MIK, srednji FICI) je bio CIP (96.0%, 0.229) > GEN (78.4%, 0.349) > TMP-SMX (83.1%, 0.421) > CTX (79.7%, 0.449) > CFX (70.9%, 0.503).

Najslabiji efekat je uočen kod kombinacija P-OH sa cefalosporinima (srednji FICI CFX=0.700, CTX=0.527) i GEN (srednji FICI =0.576), sa najvećim brojem interakcija (55.0% - 60.0%) koje su pokazale aditivan efekat i 20.0% interakcija sa indiferentnim efektom (Tabela 47). Za razliku od toga, kombinacije P-OH/CIP (srednji FICI=0.305) i TMP-SMX (srednji FICI=0.489) su bile u kategoriji sinergizma (90.0% P-OH/CIP i 65.0% P-OH/TMP-SMX kombinacija).



	CFX	CTX	CIP	GEN	TMP/SMX
■ O-OH	0.519	0.455	0.402	0.334	0.413
■ M-OH	0.503	0.449	0.229	0.349	0.421
■ P-OH	0.7	0.527	0.305	0.576	0.489

Grafikon 6. Srednje FICI vrednosti testiranih halkona u kombinaciji sa antibioticima

CFX-cefotaksim, CTX-ceftriakson, CIP-ciprofloksacin, GEN-gentamicin i TMP-SMX-trimetoprim/sulfametoksazol; $FICI \leq 0.5$ sinergizam; $0.5 < FICI \leq 1$ aditivnost.

Tabela 44. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK, µg/ml) halkona i antibiotika

Soj	O-OH	M-OH	P-OH	CFX	CLSI	CTX	CLSI	CIP	CLSI	GEN	CLSI	TMP-SMX	CLSI
	MIK (µg/ml)	MIK (µg/ml)	MIK (µg/ml)	MIK (µg/ml)		MIK (µg/ml)		MIK (µg/ml)		MIK (µg/ml)		MIK (µg/ml)	
3	50.0	75.0	125.0	64.0	R	64.0	R	16.0	R	4.0	S	2.0/38.0	S
4	50.0	100.0	125.0	4.0	S	4.0	S	8.0	R	4.0	S	1.0/19.0	S
5	50.0	100.0	125.0	32.0	R	32.0	R	16.0	R	8.0	R	2.0/38.0	S
6	50.0	100.0	125.0	32.0	R	32.0	R	16.0	R	8.0	R	2.0/38.0	S
8	50.0	150.0	125.0	16.0	R	32.0	R	32.0	R	2.0	S	2.0/38.0	S
13	50.0	75.0	100.0	16.0	R	64.0	R	16.0	R	8.0	R	2.0/38.0	S
15	50.0	125.0	125.0	64.0	R	128.0	R	64.0	R	8.0	R	2.0/38.0	S
16	50.0	125.0	125.0	16.0	R	64.0	R	16.0	R	1.0	S	1.0/19.0	S
20	50.0	50.0	50.0	32.0	R	64.0	R	8.0	R	8.0	R	2.0/38.0	S
21	50.0	100.0	125.0	8.0	R	16.0	R	16.0	R	4.0	S	2.0/38.0	S
27	50.0	75.0	100.0	64.0	R	128.0	R	64.0	R	8.0	R	2.0/38.0	S
29	50.0	75.0	100.0	32.0	R	32.0	R	64.0	R	8.0	R	2.0/38.0	S
34	50.0	75.0	100.0	16.0	R	32.0	R	16.0	R	8.0	R	2.0/38.0	S
35	25.0	50.0	50.0	8.0	R	16.0	R	32.0	R	8.0	R	2.0/38.0	S
47	25.0	175.0	125.0	16.0	R	32.0	R	16.0	R	8.0	R	2.0/38.0	S
50	25.0	200.0	175.0	32.0	R	64.0	R	8.0	R	16.0	R	1.0/19.0	S
53	25.0	150.0	125.0	32.0	R	32.0	R	16.0	R	2.0	S	2.0/38.0	S
58	25.0	50.0	75.0	8.0	R	32.0	R	16.0	R	8.0	R	2.0/38.0	S
89	25.0	75.0	100.0	16.0	R	64.0	R	16.0	R	2.0	S	2.0/38.0	S
ATCC 43300	50.0	50.0	75.0	8.0	R	16.0	R	0.5	S	16.0	R	1.0/19.0	S

* CFX-cefotaksim, CTX-ceftriakson, CIP-ciprofloksacin, GEN-gentamicin i TMP-SMX-trimetoprim/sulfametoksazol. Kategorija osetljivosti na antibiotike prema preporukama CLSI: S-osetljiv i R-rezistentan.

Tabela 45. Efekat kombinacije O-OH halkona i antibiotika

	O-OH/CFX			O-OH/CTX			O-OH/CIP			O-OH/GEN			O-OH/TMP-SMX		
	MIK	FICI	eff	MIK	FICI	eff	MIK	FICI	eff	MIK	FICI	eff	MIK	FICI	eff
3	6.2/4.0	0.188	sin	6.2/2.0	0.156	sin	12.5/2.0	0.375	sin	6.2/0.5	0.250	sin	12.5/0.2/4.7	0.375	sin
4	6.2/4.0	0.375	sin	6.2/2.0	0.625	adi	12.5/0.2	0.281	sin	3.1/1.0	0.312	sin	12.5/0.2/4.7	0.500	sin
5	6.2/4.0	0.250	sin	12.5/8.0	0.500	sin	25.0/2.0	0.625	adi	6.2/2.0	0.375	sin	6.2/0.2/4.7	0.250	sin
6	12.5/4.0	0.375	sin	12.5/16.0	0.750	adi	12.5/4.0	0.500	sin	12.5/1.0	0.375	sin	6.2/0.5/9.5	0.375	sin
8	12.5/8.0	0.750	adi	12.5/4.0	0.375	sin	12.5/0.2	0.258	sin	6.2/0.5	0.375	sin	6.2/0.2/4.7	0.250	sin
13	6.2/4.0	0.375	sin	6.2/2.0	0.156	sin	6.2/1.0	0.188	sin	3.1/2.0	0.312	sin	6.2/0.2/4.7	0.250	sin
15	12.5/4.0	0.313	sin	12.5/32.0	0.500	sin	12.5/4.0	0.313	sin	3.1/0.5	0.125	sin	6.2/0.2/4.7	0.250	sin
16	12.5/4.0	0.500	sin	12.5/4.0	0.313	sin	6.2/1.0	0.188	sin	3.1/0.2	0.312	sin	25.0/0.2/4.7	0.750	adi
20	12.5/4.0	0.375	sin	12.5/4.0	0.313	sin	12.5/2.0	0.500	sin	6.2/2.0	0.375	sin	6.2/0.2/4.7	0.250	sin
21	12.5/8.0	1.250	ind	12.5/8.0	0.750	adi	12.5/0.2	0.266	sin	3.1/0.5	0.187	sin	6.2/0.5/9.5	0.375	sin
27	12.5/4.0	0.313	sin	12.5/64.0	0.750	adi	12.5/0.2	0.254	sin	12.5/2.0	0.500	sin	25.0/0.2/4.7	0.625	adi
29	12.5/4.0	0.375	sin	12.5/4.0	0.375	sin	12.5/4.0	0.313	sin	12.5/1.0	0.375	sin	6.2/0.2/4.7	0.250	sin
34	12.5/4.0	0.500	sin	12.5/4.0	0.375	sin	12.5/4.0	0.500	sin	12.5/1.0	0.375	sin	25.0/0.5/9.5	0.750	adi
35	6.2/4.0	0.750	adi	6.2/2.0	0.375	sin	6.2/1.0	0.281	sin	3.1/2.0	0.375	sin	6.2/0.2/4.7	0.375	sin
47	6.2/4.0	0.500	sin	6.2/4.0	0.375	sin	12.5/0.2	0.516	adi	3.1/1.0	0.250	sin	6.2/0.2/4.7	0.375	sin
50	12.5/2.0	0.563	adi	12.5/16.0	0.750	adi	12.5/2.0	0.750	adi	3.1/2.0	0.250	sin	6.2/0.2/4.7	0.500	sin
53	6.2/4.0	0.375	sin	6.2/4.0	0.375	sin	6.2/1.0	0.313	sin	6.2/0.5	0.500	sin	6.2/0.2/4.7	0.375	sin
58	6.2/8.0	1.250	ind	12.5/4.0	0.625	adi	6.2/1.0	0.313	sin	3.1/2.0	0.375	sin	6.2/0.2/4.7	0.375	sin
89	6.2/4.0	0.500	sin	6.2/2.0	0.281	sin	12.5/4.0	0.750	adi	3.1/0.5	0.375	sin	12.5/0.2/4.7	0.625	adi
ATCC 43300	12.5/2.0	0.500	sin	12.5/2.0	0.375	sin	3.1/0.2	0.562	adi	3.1/4.0	0.312	sin	6.2/0.2/4.7	0.375	sin
		0.519			0.455			0.402			0.334			0.413	

* CFX-cefotaksim, CTX-ceftriakson, CIP-ciprofloksacin, GEN-gentamicin i TMP-SMX-trimetoprim/sulfametoksazol.
 FICI \leq 0.5 sinergizam (sin), 0.5 < FICI \leq 1 aditivnost (adi) i 1 < FICI \leq 2 indiferentan efekat (ind). MIK vrednosti su izražene u μ g/ml.

Tabela 46. Efekat kombinacije M-OH halkona i antibiotika

	M-OH/CFX			M-OH/CTX			M-OH/CIP			M-OH/GEN			M-OH/TMP-SMX		
	MIK	FICI	eff	MIK	FICI	eff	MIK	FICI	eff	MIK	FICI	eff	MIK	FICI	eff
3	25.0/2.0	0.458	sin	12.5/8.0	0.292	sin	25.0/0.2	0.349	sin	6.2/1.0	0.333	sin	25.0/0.2/4.7	0.458	sin
4	6.2/2.0	0.563	adi	25.0/2.0	0.750	adi	12.5/0.2	0.156	sin	25.0/1.0	0.500	sin	12.5/0.2/4.7	0.375	sin
5	25.0/2.0	0.375	sin	25.0/8.0	0.500	sin	25.0/0.2	0.266	sin	25.0/2.0	0.500	sin	6.2/0.2/4.7	0.188	sin
6	25.0/2.0	0.313	sin	25.0/16.0	0.750	adi	6.2/0.2	0.078	sin	6.2/1.0	0.188	sin	50.0/0.5/9.5	0.750	adi
8	25.0/2.0	0.292	sin	25.0/4.0	0.292	sin	25.0/0.2	0.174	sin	25.0/1.0	0.667	sin	25.0/0.2/4.7	0.292	sin
13	25.0/2.0	0.458	sin	12.5/2.0	0.198	sin	6.2/0.2	0.099	sin	6.2/2.0	0.333	sin	12.5/0.2/4.7	0.292	sin
15	6.2/2.0	0.175	sin	25.0/32.0	0.450	sin	25.0/0.2	0.204	sin	6.2/0.5	0.113	sin	25.0/0.2/4.7	0.325	sin
16	25.0/2.0	0.450	sin	25.0/4.0	0.263	sin	25.0/0.2	0.216	sin	6.2/0.2	0.300	sin	50.0/0.2/4.7	0.650	adi
20	12.5/2.0	0.375	sin	12.5/4.0	0.313	sin	25.0/0.2	0.531	adi	6.2/2.0	0.375	sin	12.5/0.2/4.7	0.375	sin
21	6.2/2.0	1.063	sin	25.0/8.0	0.750	adi	12.5/0.2	0.141	sin	6.2/1.0	0.313	sin	6.2/0.5/9.5	0.313	sin
27	12.5/2.0	0.229	sin	25.0/64.0	0.833	adi	25.0/0.2	0.337	sin	12.5/2.0	0.417	sin	50.0/0.2/4.7	0.792	adi
29	12.5/2.0	0.417	sin	25.0/4.0	0.458	sin	25.0/0.2	0.337	sin	12.5/1.0	0.292	sin	6.2/0.2/4.7	0.208	sin
34	12.5/2.0	0.667	sin	25.0/4.0	0.458	sin	12.5/0.2	0.182	sin	12.5/1.0	0.292	sin	50.0/0.5/9.5	0.917	adi
35	25.0/2.0	0.750	adi	12.5/2.0	0.375	sin	6.2/0.2	0.133	sin	6.2/2.0	0.375	sin	25.0/0.2/4.7	0.625	adi
47	6.2/2.0	0.536	sin	25.0/4.0	0.268	sin	25.0/0.2	0.158	sin	6.2/1.0	0.161	sin	6.2/0.2/4.7	0.161	sin
50	25.0/2.0	0.250	sin	25.0/16.0	0.375	sin	12.5/0.2	0.094	sin	25.0/2.0	0.250	sin	6.2/0.2/4.7	0.281	sin
53	6.2/2.0	0.104	sin	25.0/4.0	0.292	sin	25.0/0.2	0.182	sin	25.0/0.5	0.417	sin	12.5/0.2/4.7	0.208	sin
58	25.0/2.0	1.500	adi	25.0/4.0	0.625	adi	6.2/0.2	0.141	sin	6.2/2.0	0.375	sin	12.5/0.2/4.7	0.375	sin
89	25.0/2.0	0.583	sin	25.0/2.0	0.365	sin	12.5/0.2	0.182	sin	12.5/0.5	0.417	sin	25.0/0.2/4.7	0.458	sin
ATCC 43300	12.5/2.0	0.500	sin	12.5/2.0	0.375	sin	6.2/0.2	0.625	adi	12.5/2.0	0.375	sin	6.2/0.2/4.7	0.375	sin
		0.503			0.449			0.229			0.349			0.421	

* CFX-cefotaksim, CTX-ceftriakson, CIP-ciprofloksacin, GEN-gentamicin i TMP-SMX-trimetoprim/sulfametoksazol.

FICI \leq 0.5 sinergizam (sin), $0.5 < \text{FICI} \leq 1$ aditivnost (adi) i $1 < \text{FICI} \leq 2$ indiferentan efekat (ind). MIK vrednosti su izražene u $\mu\text{g/ml}$.

Tabela 47. Efekat kombinacije P-OH halkona i antibiotika

	P-OH/CFX			P-OH/CTX			P-OH/CIP			P-OH/GEN			P-OH/TMP-SMX		
	MIK	FICI	eff	MIK	FICI	eff	MIK	FICI	eff	MIK	FICI	eff	MIK	FICI	eff
3	25.0/2.0	0.231	sin	25.0/4.0	0.263	sin	25.0/2.0	0.325	sin	6.2/2.0	0.550	adi	50.0/0.5/9.5	0.650	adi
4	6.2/2.0	0.550	adi	12.5/2.0	0.600	adi	12.5/0.2	0.131	sin	6.2/2.0	0.550	adi	50.0/0.5/9.5	0.900	adi
5	50.0/8.0	0.650	adi	50.0/8.0	0.650	adi	25.0/2.0	0.325	sin	12.5/4.0	0.600	adi	6.2/0.5/9.5	0.300	sin
6	50.0/8.0	0.650	adi	50.0/8.0	0.650	adi	12.5/0.2	0.116	sin	12.5/4.0	0.600	adi	6.2/0.5/9.5	0.300	sin
8	25.0/2.0	0.325	sin	25.0/4.0	0.325	sin	25.0/2.0	0.263	sin	6.2/1.0	0.550	adi	50.0/0.5/9.5	0.650	adi
13	6.2/8.0	0.563	adi	12.5/2.0	0.156	sin	25.0/2.0	0.375	sin	12.5/4.0	0.625	adi	6.2/0.5/9.5	0.313	sin
15	50.0/8.0	0.525	adi	50.0/8.0	0.463	sin	12.5/4.0	0.163	sin	12.5/4.0	0.600	adi	25.0/0.5/9.5	0.450	sin
16	75.0/8.0	1.100	ind	75.0/8.0	0.725	adi	25.0/2.0	0.325	sin	6.2/0.5	0.550	adi	25.0/0.5/9.5	0.700	adi
20	50.0/8.0	1.250	ind	50.0/8.0	1.125	ind	12.5/0.2	0.281	sin	6.2/2.0	0.375	sin	6.2/0.5/9.5	0.375	sin
21	50.0/8.0	1.400	ind	50.0/8.0	0.900	adi	25.0/2.0	0.325	sin	6.2/2.0	0.550	adi	6.2/0.5/9.5	0.300	sin
27	50.0/8.0	0.625	adi	50.0/8.0	0.563	adi	12.5/0.2	0.129	sin	12.5/4.0	0.625	adi	25.0/0.5/9.5	0.500	sin
29	50.0/8.0	0.750	adi	50.0/8.0	0.750	adi	12.5/4.0	0.188	sin	12.5/4.0	0.625	adi	6.2/0.5/9.5	0.313	sin
34	50.0/8.0	1.000	adi	50.0/4.0	0.625	adi	12.5/4.0	0.375	sin	12.5/4.0	0.625	adi	25.0/0.5/9.5	0.500	sin
35	25.0/2.0	0.750	adi	25.0/4.0	0.750	adi	25.0/2.0	0.563	adi	6.2/2.0	0.375	sin	6.2/0.5/9.5	0.375	sin
47	50.0/8.0	0.900	adi	50.0/8.0	0.650	adi	25.0/2.0	0.325	sin	6.2/2.0	0.300	sin	50.0/0.5/9.5	0.650	adi
50	25.0/2.0	0.205	sin	25.0/4.0	0.205	sin	25.0/2.0	0.393	sin	6.2/2.0	0.161	sin	50.0/0.5/9.5	0.786	adi
53	6.2/8.0	0.300	sin	12.5/2.0	0.163	sin	25.0/2.0	0.325	sin	6.2/2.0	1.050	ind	6.2/0.5/9.5	0.300	sin
58	6.2/8.0	1.083	ind	12.5/2.0	0.229	sin	25.0/2.0	0.458	sin	12.5/4.0	0.667	adi	6.2/0.5/9.5	0.333	sin
89	6.2/8.0	0.563	adi	12.5/2.0	0.156	sin	12.5/0.2	0.141	sin	12.5/2.0	1.125	ind	25.0/0.5/9.5	0.500	sin
ATCC 43300	25.0/2.0	0.583	adi	25.0/4.0	0.583	adi	6.2/0.2	0.583	adi	12.5/4.0	0.417	sin	6.2/0.5/9.5	0.583	adi
		0.700			0.527			0.305			0.576			0.489	

* CFX-cefotaksim, CTX-ceftriakson, CIP-ciprofloksacin, GEN-gentamicin i TMP-SMX-trimetoprim/sulfametoksazol.

FICI \leq 0.5 sinergizam (sin), $0.5 < \text{FICI} \leq 1$ aditivnost (adi) i $1 < \text{FICI} \leq 2$ indiferentan efekat (ind). MIK vrednosti su izražene u $\mu\text{g/ml}$.

5. DISKUSIJA

Pojava rezistencije stafilokoka na jedan od prvih β -laktamaza-rezistentnih penicilina, meticilin, koja se javila odmah nakon uvođenja ovog leka u širu kliničku upotrebu, postavila je ozbiljno pitanje izbora optimalne terapije za lečenje infekcija izazvanih multirezistentnim sojevima stafilokoka. Iako se ovaj antibiotik odavno ne koristi u kliničkoj upotrebi, obeležio je naziv MRSA sojeva stafilokoka. Jedan od osnovnih ciljeva u borbi protiv ovih mikroorganizama je identifikacija novih antibakterijskih jedinjenja i razvoj novog leka. Osim jedinjenja koja imaju bakteriostatski ili baktericidan efekat, poslednje decenije veliki broj eksperimentalnih studija se bavi razvojem novih agenasa koji bi delovali na faktore virulencije bakterija.

U skladu sa savremenim istraživanjima, cilj ovog doktorata je bilo ispitivanje antimikrobnog efekta novih jedinjenja: Bis-(2-hydroxy-phenyl)-propenona, 3-(3-Hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenona i 3-(4-Hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenona i njihovog uticaja na fiziološko-biohemijske karakteristike i faktore virulencije kliničkih izolata MRSA.

Svi klinički izolati ispitani u ovoj studiji su identifikovani konvencionalnim metodama i automatizovanim sistemom kao *S. aureus*. Rezistencija na meticilin je detektovana disk difuzionim metodom antibiograma i automatizovanim sistemom, a potvrđena PCR metodom. Rezistencija na meticilin može da se ispolji kao rezistencija niskog (eng. low-level resistance) ili visokog nivoa (eng. high-level resistance). Rezistencija niskog nivoa je uglavnom posredovana prekomernom produkcijom β -laktamaza, povećanom ekspresijom intrinzičkih PBP ili smanjenjem afiniteta vezivanja za PBP (Tomasz et al., 1989; Barg et al., 1991), a rezistencija visokog nivoa nastaje usled produkcije PBP2' koji je kodiran *mecA* genom (Berger-Bachi, 1994; Chambers, 1997). Ekspresija *mecA* može biti konstitutivna, inducibilna (nastala pod uticajem drugih β -laktamskih antibiotika, a ne oksacilina ili meticilina) ili heterogena, gde se *mecA* gen eksprimira samo kod pojedinih subpopulacija ćelija (Berger-Bachi, 1994).

Svi sojevi ispitani u ovoj studiji fenotipski su ispoljili konstitutivnu rezistenciju na meticilin homogenog tipa. Prisustvo *mecA* gena je kod svih sojeva potvrđeno PCR metodom, koja se smatra tzv. „zlatnim standardom“ za detekciju MRSA sojeva (Kampf et al., 1997; Tenover et al., 1999).

Jedan od osnovnih ciljeva ove studije je bio da se ispita uticaj halkona na što veći broj genski heterogenih MRSA sojeva, pa je u daljem istraživanju urađena tipizacija MRSA sojeva. PFGE tipizacijom je utvrđeno prisustvo 9 različitih PFGE pulsotipova, u koje je svrstano 2/3 ispitanih sojeva, dok preostali sojevi nisu mogli biti klasifikovani u neki od PFGE pulsotipova zato što su imali jedinstven PFGE profil. Sojevi koji su svrstani u isti PFGE pulsotip spadaju u blisko srodne i pokazuju visok stepen klonske povezanosti, a neklasifikovani sojevi spadaju u sporadične izolate. Distribucija *agr* i *ccr* tipova među blisko srodnim sojevima je bila homogena među pripadnicima istog SCCmec tipa, što je u skladu sa postojećom klasifikacijom (<http://www.sccmec.org/>). Svi sojevi PFGE pulsotipa A i C su bili nosioci SCCmec elementa tipa I, *agr* tipa II i *ccr* tipa 1; pulsotipovi B i F SCCmec elementa tipa II, *agr* tipa I i *ccr* tipa 5; pulsotipa G SCCmec elementa tipa IV *agr* tipa I i *ccr* tipa 2 i pulsotipa H SCCmec elementa tipa V, *agr* tipa I i *ccr* tipa 5.

Distribucija *agr* tipova među neklasifikovanim sojevima je bila heterogena, a *ccr* tipa homogena među pripadnicima istog SCCmec tipa. Sporadični izolati SCCmec tipa I su imali *agr* tip I (1 soj) ili *agr* tip II (2 soja) i *ccr* tip 1; SCCmec tipa II *agr* tip II i *ccr* tip 2; SCCmec tipa III *agr* tip I (1 soj) i *agr* tip II (2 soja) i *ccr* tip 5; SCCmec tipa IV *agr* tip I (1 soj) i *agr* tip III (1 soj) i *ccr* tip 2 i SCCmec tipa V *agr* tip I i *ccr* tip 5.

Iako PFGE metod ima veliku moć diskriminacije i predstavlja tzv. „zlatni standard“ za epidemiološku tipizaciju MRSA sojeva, poređenje rezultata dobijenih ovim metodom je teško usled nepostojanja adekvatne baze podataka ili uniformne klasifikacije pulsotipova. PFGE profili dobijeni u različitim populacijama imaju lokalni značaj i ne mogu se međusobno porediti i zbog toga što se PFGE tipizacija primenjuje u epidemiološke svrhe, na ograničenom broju sojeva izolovanih tokom kratkog vremenskog perioda (1-3 meseca), gde je uobičajna genska varijabilnost sojeva minimalna. Ovaj metod nije primenljiv za ispitivanje genske povezanosti sojeva koji su prikupljeni tokom vremenskog perioda dužeg od godinu dana (Trindade et al., 2003).

Na osnovu *spa* tipizacije, sojevi su klasifikovani u šest klonskih kompleksa: CC5, CC8, CC22, CC45, CC80 i CC152. Svaki klonski kompleks je obuhvatao između jednog i tri različita *spa* tipa. Poređenje publikovanih podataka dobijenih *spa* tipizacijom je otežano usled postojanja dva sistema nomenklature (Harmsen et al., 2003; Koreen et al., 2004).

Rezultati populaciono-genetskih studija baziranih na MLST tipizaciji su pokazali da glavni MRSA klonovi vode poreklo od pet klonskih kompleksa: CC5, CC8, CC22, CC30 i CC45 (Tristan et al., 2007). Većina MRSA sojeva ispitanih u ovoj studiji je bila svrstana u jedan od četiri klonska kompleksa od kojih potiču glavni MRSA sojevi. Najzastupljeniji klonski kompleksi su bili CC5 (43.3%) i CC8 (30.0%), što je u skladu sa rezultatima drugih istraživača (Enright et al., 2002; Deurenberg et al., 2005).

Na osnovu polimorfizma *agrB*, *agrD* i *agrC* gena je utvrđeno da kod *S. aureus* postoji četiri *agr* tipa (Novick, 2003). Distribucija *agr* tipova među sojevima *S. aureus* se razlikuje u zavisnosti od geografske rasprostranjenosti sojeva. Na primer, u Francuskoj je na osnovu analize *agr* tipova kod 198 sojeva *S. aureus* utvrđena homogena distribucija sva četiri *agr* tipa (Jarraud et al., 2002), dok je u Grčkoj, koja spada u zemlje sa veoma visokom incidencom MRSA u Evropi, utvrđena homogena distribucija *agr* tipova I, II i IV kod 74 testirana soja (Ikonomidis et al., 2009). Nasuprot tome, u Holandiji, koja spada u zemlje sa najnižom incidencom izolacije MRSA sojeva (0.3%) kod 192 analizirana soja *S. aureus* je utvrđeno da je dominantan *agr* tip I (92.2%), dok su se *agr* tip II i III javljali znatno ređe, a prisustvo *agr* tipa IV nije potvrđeno (van Leeuwen i sar., 2000).

Za razliku od Evrope, studije izvedene u Aziji ukazuju na nešto drugačiju distribuciju *agr* tipova. Manago i saradnici su na osnovu analize 316 MRSA sojeva utvrdili prisustvo *agr* tipova I-III, od čega se *agr* tip II javljao sa najvećom učestalošću (63.9%) u Japanu (Manago et al., 2006). Novija studija iz Tajvana, koja je obuhvatila 1000 MRSA sojeva, je pokazala da je na ovom geografskom području dominantna pojava *agr* tipa I (91.2%), dok se *agr* tip II javlja znatno ređe (7.8%), a ostali *agr* tipovi u minimalnom broju slučajeva (0.1%-0.2%) (Ho et al., 2010).

Najveći broj MRSA sojeva ispitanih u ovoj studiji je imao *agr* tip I (50.0%) i *agr* tip II (46.7%), dok je prisustvo *agr* tipa III utvrđeno kod jednog soja, a *agr* tip IV nije bio prisutan kod ispitivanih sojeva. Precizni podaci o distribuciji *agr* tipova u ovom delu Evrope ne postoje. Studija našeg autora koja je obuhvatila *agr* tipizaciju 196 sojeva *S. aureus* izolovanih u različitim mikrobiološkim laboratorijama u Republici Srbiji je ukazala na dominantno prisustvo *agr* tipova II (54.9%) i I (43.9%), dok je prisustvo *agr* tipa III utvrđeno kod malog broja sojeva (1.2%) a takođe nije utvrđeno prisustvo *agr* tipa IV (Ćirković, 2009).

Osim razlike u geografskoj distribuciji *agr* tipova, dosadašnja istraživanja su ukazala i na korelaciju između određenih *agr* tipova i patogenog potencijala MRSA. Sojevi *S. aureus* koji uzrokuju endokarditis uglavnom ispoljavaju *agr* tip I i II (Jarraud et al., 2002; Dufour et al., 2002). Korelacija između *agr* tipa II i bakterijemije je pokazana kod više od 60% MRSA izolata u SAD (Moise-Broder et al., 2004). Veća učestalost *agr* tipa I je uočena kod VISA i heterorezistentnih VISA (hVISA) sojeva (Ho et al., 2010) i *agr* tipa II kod hVISA sojeva (Sakoulas et al., 2002) ili infekcija izazvanih MRSA sojevima koje nisu imale adekvatan terapijski odgovor na vankomicin (Moise-Broder et al., 2004). Stafilokokni toksični šok sindrom je najčešće izazvan sojevima sa *agr* tipom III (Naimi et al., 2003) a *agr* tip IV se češće javlja kod sojeva *S. aureus* koji proizvode ekfolijatin, što dovodi do generalizovanog ekfolijativnog sindroma i sindroma oparene kože (Jarraud et al., 2000; 2002). Pored navedenih *agr* tipova koji koreliraju sa određenim kliničkim sindromom, *agr* genski lokus ima značajnu ulogu i u regulaciji procesa formiranja biofilma (Vuong et al., 2000; Kong et al., 2006).

Rezultati genske tipizacije MRSA su pokazali da su sojevi genski heterogeni, što je zadovoljilo polazni kriterijum ove studije. Poseban značaj za tumačenje rezultata dobijenih u ovoj studiji je imala SCC*mec* tipizacija. Kao što je spomenuto u uvodnom delu, smatra se da MRSA sojevi SCC*mec* I, II, i III tipa predstavljaju HA-MRSA, a da SCC*mec* IV i V tipovi predstavljaju CA-MRSA sojeve (Enright et al., 2002; Robinson i Enright, 2003; Vandenesch et al., 2003; Ender et al., 2004; Boyle-Vavra et al., 2005; Lee et al., 2007; Diep et al., 2008; Takano et al., 2008). CA-MRSA i HA-MRSA se međusobno razlikuju po genskoj strukturi, osetljivosti na antibiotike i hemioterapeutike i bolestima koje izazivaju.

HA-MRSA su epidemiološki definisani kao MRSA sojevi izolovani kod hospitalizovanih bolesnika koji su pre hospitalizacije bili MRSA negativni, ili sojevi izolovani kod bolesnika do 48h nakon otpuštanja iz bolnice. Faktori rizika za nastanak infekcije uzrokovane HA-MRSA su prethodne hirurške intervencije, boravak u stacionarnim zdravstvenim ustanovama za dugotrajnu negu, ugradnja medicinskih implantata ili katetera, imunosupresija, transplantacija organa i hemodijaliza (Brumfitt i Hamilton-Miller, 1989; Tacconelli et al., 1998; Naimi et al., 2003; Vandenesch et al., 2003). Do sada je identifikovano nekoliko različitih tipova HA-MRSA koji su najverovatnije nastali preuzimanjem SCC*mec* kasete od MSSA (Enright et al., 2002;

Robinson i Enright, 2003; Aires de Sausa et al., 2005). Smatra se da se sticanje *SCCmec* kasete kod MSSA desilo ograničen broj puta, ali se ovako mali broj nastalih MRSA klonova neočekivano brzo diseminovao širom sveta dovodeći do pojave epidemija u bolničkoj sredini (Aires de Sausa et al., 2005; Noto et al., 2008).

Nasuprot sojevima izolovanim kod hospitalizovanih pacijenata, CA-MRSA sojevi se definišu kao MRSA sojevi izolovani kod pacijenata koji nisu bili hospitalizovani tokom prethodne godine i nemaju nijedan faktor rizika za razvoj MRSA infekcije. Ove infekcije se javljaju kod mlađih i zdravih osoba i najčešće se prenose direktnim kontaktom preko kože. U rizičnu grupu za razvoj kožnih infekcija izazvanih CA-MRSA spadaju zdrave osobe koje borave u kolektivima, kao što su deca školskog uzrasta, adolescenti, studenti, sportisti, vojnici, zatvorenici, članovi porodice obolelih od CA-MRSA, žrtve elementarnih nepogoda i ljudi sa tetovažama (Zetola et al., 2005; Tenover et al., 2006; Wijaya et al., 2006; Okubo et al., 2008; Redziniak et al., 2009). Smatra se da su CA-MRSA sojevi virulentniji od HA-MRSA, ali pokazuju veći stepen osetljivosti na antibiotike različitih klasa u odnosu na HA-MRSA.

Prema *SCCmec* tipizaciji, u ovoj studiji je utvrđeno prisustvo 73.3% sojeva *SCCmec* tipa I, II, ili III i 26.7% sojeva *SCCmec* tipa IV ili V. Najveći broj sojeva *SCCmec* tipa I, II, ili III je izolovan kod hospitalizovanih pacijenata (70.0%), dok je, suprotno očekivanjima, polovina sojeva *SCCmec* tipa IV ili V izolovana kod hospitalizovanih pacijenata a druga polovina kod ambulantnih pacijenata. Takođe je jedan soj *SCCmec* tipa I izolovan kod ambulantnog pacijenta. U odnosu na poreklo uzorka, sojevi *SCCmec* tipa IV ili V su izolovani iz briseva nosa, spoljašnjeg ušnog kanala, kože, rane, trahealnog aspirata i hemokulture. Kao što je prethodno spomenuto, CA-MRSA su tipični uzročnici kožnih infekcija, pa nije očekivano da budu izolovani kod težih infekcija, kao što su plućne infekcije ili sepsa.

Iako su ustanovljeni precizni kriterijumi za definiciju i razlikovanje CA-MRSA i HA-MRSA, poslednjih godina se sve češće izoluju CA-MRSA sojevi kao uzročnici intrahospitalnih infekcija. Iz tog razloga se CA-MRSA sojevi više ne definišu samo po epidemiološkim, već i prema bakteriološkim kriterijumima - na osnovu genske tipizacije (ST tip, *spa* tip i *SCCmec* tip), PFGE tipizacije, pozitivne produkcije PVL, prisustvu *SCCmec* tipa IV ili V i rezistenciji samo na β -laktamske antibiotike

(Vandenesch et al., 2003; Tenover et al., 2006; Yamamoto et al., 2006; Diep et al, 2006; Takano et al., 2008; Tenover i Goering, 2009).

U skladu sa navedenim bakteriološkim kriterijumima, sojevi ispitani u ovoj studiji se ne mogu precizno definisati kao CA-MRSA ili HA-MRSA. MRSA sojevi SCC*mec* tipa IV i V su ispoljili rezistenciju na pojedine lekove iz grupe aminoglikozida, MLS i tetraciklina pa se može pretpostaviti da su ovi sojevi stekli dodatne gene rezistencije lokalizovane izvan SCC*mec* elementa, na hromozomu ili plazmidima. Takođe su ovi sojevi izolovani i kod hospitalizovanih pacijenata, što govori u prilog činjenici da je poslednjih godina došlo do širenja CA-MRSA u bolničku sredinu, kao i HA-MRSA u vanbolničku sredinu.

Na osnovu SCC*mec* tipizacije takođe se može pretpostaviti kakav profil osetljivosti na antibiotike i hemioterapeutike ima određeni MRSA soj. Smatra se da SCC*mec* tipovi I, IV i V kodiraju rezistenciju isključivo na β -laktamske antibiotike, dok SCC*mec* tipovi II i III kodiraju multirezistentan fenotip zahvaljujući prisustvu dodatnih gena rezistencije na plazmidima (pUB110, pI258 i pT181) ili transpozonima (Tn554) integrisanim u okviru SCC*mec* elementa (Deurenberg et al., 2005). Plazmid pUB110 nosi *ant(4')* gen za rezistenciju na kanamicin, tobramicin i bleomicin, plazmid pI258 nosi *blaZ* gen za rezistenciju na β -laktamske antibiotike i teške metale, a pT181 nosi *tetK* gen za rezistenciju na tetracikline. Transpozon Tn554 nosi *ermA* gen odgovoran za inducibilnu rezistenciju na makrolide, linkozamide i streptogramine (MLS) i *ant(9)* gen odgovoran za rezistenciju na spektinomycin (Leclercq, 2002; Ito et al., 2003; Deurenberg et al., 2007).

Većina sojeva testiranih u ovoj studiji je pokazala rezistenciju na antibiotike iz grupe aminoglikozida. Rezistencija na aminoglikozide je česta kod bakterija i nastaje usled produkcije enzima koji modifikuju molekul leka. Do sada je opisano preko pedeset enzima koji vrše inaktivaciju aminoglikozida, a klasifikovani su u tri glavne grupe: aminoglikozid-acetiltransferaze (AAC), aminoglikozid-adeniltransferaze (poznate i kao aminoglikozid-nukleotidiltransferaze, ANT) i aminoglikozid-fosfotransferaze (APH) (Fluit et al., 2001). Modifikacija molekula leka pod dejstvom enzima nastaje na amino grupama (AAC) ili hidroksilnim grupama (ANT, APH) leka, što dovodi do izostanka vezivanja aminoglikozida za ribosome i nastavka sinteze proteina kod bakterija (Paulsen et al., 1997). U retkim slučajevima rezistencija na aminoglikozide može nastati

kao posledica aktivnosti efluksnih pumpi ili mutacija rRNK (Shaw et al., 1993; Quintiliani i Courvalin, 1995; Schmitz i Fluit, 1999). Kod stafilokoka je glavni mehanizam rezistencije na aminoglikozide enzimska inaktivacija leka.

Najveći procenat sojeva ispitanih u ovoj studiji (92.3%) je prema profilima rezistencije na aminoglikozide pokazao dominantan tip rezistencije na gentamicin, tobramicin i kanamicin. Rezistencija na gentamicin, tobramicin i kanamicin nastaje usled produkcije enzima sa bifunkcionalnom AAC(6') i APH(2'') aktivnošću (Matsumura et al., 1984; Ubukata et al., 1984). Gen koji kodira sintezu ovog enzima nalazi se na kompozitnom transpozonu Tn4001, koji je prisutan kod *S. aureus* i KNS na plazmidima ili na različitim lokacijama na hromozomu (Paulsen et al., 1997).

Rezistencija na kanamicin i tobramicin se kod MRSA sojeva takođe može objasniti i prisustvom integrisanog plazmida pUB110 u predelu SCC*mec* elementa, koji nosi *ant(4')* gen za rezistenciju na kanamicin, tobramicin i bleomicin (Ito et al., 2003; Deurenberg et al., 2007). Rezistencija na neomicin, kanamicin, tobramicin i amikacin može biti posredovana i produkcijom ANT(4')-I enzima koji je kodiran genom koji se nalazi na malim plazmidima integrisanim na veći konjugativni plazmid lociran u *mec* regionu *S. aureus* (Byrne et al., 1991; Stewart et al., 1994). Takođe je opisana i rezistencija na neomicin i kanamicin koja je posredovana produkcijom APH(3')-III enzima koji je kodiran genom koji se nalazi na transpozonu Tn5405, koji može biti lociran na hromozomu ili plazmidima (Derbise et al., 1996).

Do sada je opisano nekoliko mogućih mehanizama rezistencije Gram-pozitivnih bakterija na makrolide, od čega najčešći mehanizam rezistencije predstavlja posttranskripciona modifikacija 23S rRNK pod uticajem enzima adenin-N⁶-metiltransferaze koji je kodiran *erm* (eng. erythromycin ribosome methylation) genima (Leclercq i Courvalin, 1991; Roberts et al., 1999; Weisblum, 1999). Metilacija 23S rRNK dovodi do izmene mesta za vezivanje svih MLS_B antibiotika (MLS_B-rezistencija). Kod *S. aureus* rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramine može biti konstitutivna i inducibilna. Sojevi koji ispoljavaju konstitutivni tip rezistencije su rezistentni na sve MLS antibiotike, dok kod inducibilne rezistencije dolazi do rezistencije na 14-člane i 15-člane makrolide, a očuvana je osetljivost sojeva na 16-člane makrolide, linkozamide i streptogramine (Fluit et al., 2001). Većina MRSA sojeva obuhvaćena ovom studijom (63.3%) je ispoljila MLS_B tip rezistencije, dok se

inducibilna rezistencija indukovana 14-članim (eritromicin, klaritromicin, roksitromicin i oleandomicin) i 15-članim makrolidima (azitromicin) javila u 13.3% slučajeva. MLS rezistencija kod MRSA takođe može biti posledica prisustva transpozona Tn554 u okviru SCC_{mec} elementa koji nosi *ermA* gen odgovoran za inducibilnu rezistenciju na makrolide, linkozamide i streptogramine (Ito et al., 2003; Deurenberg et al., 2007). Pored opisanih mehanizama rezistencije, kod *S. aureus* su otkriveni i geni koji kodiraju efluksne pumpe ili enzime koji dovode do inaktivacije antibiotika, što za posledicu ima rezistenciju na pojedinačne antibiotike iz MLS grupe (Leclercq i Courvalin, 1991; Roberts et al., 1999; Weisblum, 1999).

Fluorohinoloni su antibiotici koji inhibišu bakterijsku DNK girazu i topoizomerazu IV. Rezistencija na fluorohinolone se najčešće javlja usled izmene ciljnog enzima, ali je kod Gram-negativnih bakterija opisan i smanjen unos leka u unutrašnjost bakterijske ćelije usled promena u spoljašnjoj membrani (Quintiliani i Courvalin, 1995; Drlica i Zhao, 1997; Everett i Piddock, 1998; Hooper, 1998, 1999). Rezistencija MRSA na ispitivane fluorohinolone (levofloksacin i moksifloksacin) je najverovatnije bila posledica izmene u funkciji ciljnog enzima. Do sada je kod *S. aureus* opisana mutacija u GrlA subjedinici topoizomeraze IV koja dovodi do inaktivacije ovog enzima (Quintiliani i Courvalin, 1995; Drlica i Zhao, 1997; Pan i Fisher, 1997; Everett i Piddock, 1998; Schmitz et al., 1998; Hooper, 1998, 1999;). Osim izmene ciljnog enzima, kod *S. aureus* je utvrđeno i prisustvo NorA efluksne pumpe koja može imati ulogu u aktivnom efluksu leka iz bakterijske ćelije usled čega nastaje rezistencija na fluorohinolone (Neyfakh et al., 1993).

Rezistencija na glikopeptidne antibiotike nastaje usled prisustva *vanA* gena, koji kodira enzim VanA (D-Ala-D-Ala ligazu). Ovaj enzim resintetiše bočni lanac peptidoglikana dovodeći do zamene D-alanil-D-alanina sa D-alanil-D-laktatom koji ima značajno manji afinitet za vezivanje glikopeptidnih antibiotika (Fluit et al., 2001). Smanjena osetljivost *S. aureus* na glikopeptidne antibiotike je do sada opisana u malom broju slučajeva i uglavnom se pripisuje fenotipski heterogenoj rezistenciji (Hiramatsu et al., 1997; Ploy et al., 1998, Sieradzki et al., 1999; Smith et al., 1999; Walsh et al., 2001). MRSA sojevi obuhvaćeni ovom studijom nisu ispoljili rezistenciju na vankomicin i teikoplanin, iz čega se indirektno može zaključiti da ovi sojevi ne ispoljavaju prisustvo *vanA* gena, što je u skladu sa podacima iz dostupne literature.

Rezistencija na trimetoprim-sulfametoksazol najčešće nastaje usled prekomerne produkcije dihidrofolat-reduktaze, mutacije gena za ovaj enzim ili izmene ciljnog enzima (Schmitz i Fluit, 1999). Svi ispitani MRSA sojevi su bili osetljivi na TMP-SMX, što je u skladu sa podacima koje navode drugi autori (Garau et al., 2009).

Najveći broj sojeva ispitanih u ovoj studiji (87.0%) je imao multirezistentan fenotip, od čega je 73.3% sojeva pripadalo *SCCmec* tipu I-III a 13.3% *SCCmec* tipu IV-V. Na osnovu prethodno iznesene činjenice da *SCCmec* tipovi I, IV i V kodiraju rezistenciju isključivo na β -laktamske antibiotike, očekivalo bi se da sojevi ispitani u ovoj studiji koji ispoljavaju *SCCmec* tip IV i V nemaju multirezistentan fenotip. Međutim, osim u okviru *SCCmec* elementa, geni rezistencije se mogu nalaziti locirani na različitim mestima u hromozomu *S. aureus*, ili na plazmidima, tako da se multirezistentan fenotip ovih sojeva može objasniti prisustvom drugih gena rezistencije (Deurenberg et al., 2005).

Kao što je prethodno spomenuto, glavni problem u terapiji infekcija uzrokovanih multirezistentnim sojevima stafilokoka predstavlja brz razvoj rezistencije bakterija na nove antimikrobne agense i širenje multirezistentnih sojeva u vanbolničku sredinu. Stoga je neophodno razviti nove antimikrobne agense koji bi se koristili kao samostalni agensi ili u kombinaciji sa konvencionalnim antistafilokoknim antibioticima. Prilikom dizajniranja novih lekova sa potencijalnim antimikrobnim dejstvom kao polazna jedinjenja najčešće se koriste jedinjenja dobijena iz prirodnih izvora ili njihovi sintetski analozi. Flavonoidi su heterociklična jedinjenja koja su prisutna u biljkama ili biljnim proizvodima kao što su propolis i med. Preparati koji sadrže flavonoide se tradicionalno koriste u lečenju različitih infekcija kao što su infekcije rana, furunkuli, akne, respiratorne infekcije, gastrointestinalne bolesti i infekcije urinarnog trakta (Cushnie i Lamb, 2011). Na osnovu hemijske strukture flavonoidi su podeljeni u 14 klasa, među koje spadaju i halkoni. Halkoni su jedinjenja koja se mogu izolovati iz različitih prirodnih izvora ili dobiti u laboratorijskim uslovima metodama klasične i kombinatorne sinteze. Pored brojnih bioloških aktivnosti, halkoni poseduju i značajnu antibakterijsku, antivirusnu, antigljivičnu i antiparazitarnu aktivnost (Nowakowska, 2007).

Antimikrobna aktivnost halkona zavisi od hemijske strukture molekula (Nielsen et al., 2005; Nowakowska, 2007; Batovska i Todorova, 2010). Na osnovu brojnih studija koje su se bavile ispitivanjem odnosa strukture i aktivnosti jedinjenja (eng. structure-activity relationship, SAR) uočeno je više različitih hemijskih karakteristika molekula halkona koje su neophodne za ostvarivanje antimikrobnog efekta. Do sada je utvrđeno nekoliko osobina molekula halkona koje su vezane za antistafilokoknu aktivnost, među kojima su najvažnije lipofilnost molekula i prisustvi funkcionalnih grupa, kao što je hidroksilna grupa (OH) na različitim položajima A ili B prstena halkona (Nowakowska, 2007; Alcaraz et al., 2000; Kromann et al., 2004). Osim samog prisustva OH grupe, važna je i njena lokalizacija zbog intramolekulskih interakcija u koje ona stupa. Hidroksilacija u A prstenu, naročito u položajima 2 i 4 je važna za antibakterijsku aktivnost halkona (Alvarez et al., 2004; Avila et al., 2008; Moreira Osorio et al., 2012). Hidroksilna grupa u položaju 2 A prstena stupa u interakciju sa karbonilnom grupom halkona, a u položaju 4 A prstena aktivira deo molekula na kome se nalazi hidroksilna grupa u položaju 2 A prstena i α,β -nezasićena karbonilna grupa (Moreira Osorio et al., 2012). Osim toga, prisustvo hidroksilne grupe u položaju 2 A prstena obezbeđuje strukturnu stabilnost samog jedinjenja, što indirektno može uticati na njegovu antibakterijsku aktivnost (Avila et al., 2008). Nasuprot tome, acetilacija ili metoksilacija A prstena u položaju 2, ili fluorinacija u položaju 3 ili 5 značajno redukuju antimikrobnu aktivnost halkona (Avila et al., 2008). Prisustvo hidroksilne grupe u položaju 4 B prstena je važno za antimikrobni efekat halkona, ali je samo po sebi nedovoljno. Osim hidroksilnih supstituenata, za antimikrobnu aktivnost je važna i lipofilnost A prstena, pa se smatra da značajan antimikroban efekat ostvaruju halkoni sa ovom karakteristikom (Avila et al., 2008; Batovska et al., 2009).

U ovoj studiji ispitana je antimikrobna aktivnost tri jedinjenja: Bis-(2-hydroxy-phenyl)-propenona, 3-(3-Hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenona i 3-(4-Hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenona, i uticaj ovih jedinjenja na fiziološko-biohemijske karakteristike i ekspresiju faktora virulencije MRSA sojeva. Sva tri sintetisana halkona poseduju hidroksilnu grupu vezanu u položaju 2 A prstena i za jedan od C atoma B prstena (2, 3 ili 4). Rezultati dobijeni ispitivanjem antimikrobne aktivnosti ovih jedinjenja su pokazali da sva tri jedinjenja ispoljavaju inhibitorni efekat na rast i razmnožavanje MRSA sojeva, sa MIK vrednostima u opsegu 25.0-50.0 $\mu\text{g/ml}$

za O-OH i 50.0-200.0 $\mu\text{g/ml}$ za M-OH i P-OH halkon. Antibakterijska aktivnost prirodnih ili sintetisanih halkona je predmet istraživanja brojnih autora. Flavonoidi prirodnog porekla koji imaju MIK vrednosti ≤ 100 $\mu\text{g/ml}$ se smatraju značajnim za dalja istraživanja, a flavonoidi koji imaju MIK vrednosti ≤ 10 $\mu\text{g/ml}$ veoma značajnim za dalja istraživanja (Cushnie i Lamb, 2011). Hatano i sar. i Fukai i sar. su pokazali da Likohalkon A izolovan iz korena i rizoma *Glycyrrhiza spp.* ispoljava značajnu antibakterijsku aktivnost prema MRSA sojevima, sa vrednostima MIK između 6.2-16.0 $\mu\text{g/ml}$ (Hatano et al., 2000; Fukai et al., 2002). Antibakterijska aktivnost analoga Likohalkona A se pripisuje prisustvu hidroksilne grupe u položaju 4 B prstena (Kromann et al., 2004).

Prilikom sinteze halkona, najčešće se dobija veliki broj jedinjenja od kojih samo nekoliko ispoljava bilo kakav biološki efekat. Bowman i sar. (2007) su od 198 ispitanih halkona identifikovali samo pet jedinjenja sa antibakterijskom aktivnošću, od kojih je samo jedno jedinjenje imalo značajan inhibitorni efekat prema MRSA. Moreira Osorio i sar. (2012) su od 49 ispitanih jedinjenja identifikovali tri halkona sa značajnim inhibitornim efektom prema MRSA sa MIK vrednostima između 15.6-250.0 $\mu\text{g/ml}$. Dihidroksi- i trihidroksi-halkoni takođe ispoljavaju snažan antibakterijski efekat prema MRSA sojevima, sa MIK vrednostima u rangu od 15.3-45.0 $\mu\text{g/ml}$ i 25.0-50.0 $\mu\text{g/ml}$ (Sato et al., 1996; Talia et al., 2011). Svojim istraživanjima Alcaraz i sar. (2000) su potvrdili da su halkoni sa najsnažnijim dejstvom na MRSA upravo jedinjenja koja se sastoje od dva aromatična prstena koja su povezana sa α,β -nezasićenom karbonilnom grupom. Prisustvo OH- grupe u položaju 2 ili 2, 4 B prstena je esencijalno za antimikrobnu aktivnost ovih jedinjenja prema MRSA sojevima, sa MIK vrednostima u opsegu 12.7-38.7 $\mu\text{g/ml}$ (Alcaraz et al., 2000).

Iako su brojne SAR studije ukazale na hemijske karakteristike halkona koje su bitne za antimikrobni efekat, precizan mehanizam antibakterijskog dejstva do sada nije utvrđen. Flavonoidi i farmakološka jedinjenja slične strukture antimikrobni efekat ostvaruju putem nekoliko različitih mehanizama: smanjenjem fluidnosti ili oštećenjem ćelijske membrane (Ikigai et al., 1993; Tsuchiya i Iinuma, 2000); inhibicijom enzima koji učestvuju u sintezi DNK ili RNK, kao što su DNK giraza, topoizomeraza ili dihidrofolat-reduktaza (Mori et al., 1987; Ohemeng et al., 1993; Bernard et al., 1997; Plaper et al., 2003; Gradisar et al., 2007; Wang et al., 2010) i smanjenjem energetske

metabolizma blokadom NADH-citohrom c reduktaze ili ATP-sintetaze čime se smanjuje energija neophodna za aktivni transport ili biosintezu makromolekula (Haraguchi et al., 1998; Chinnam et al., 2010). Osim ovih mehanizama, opisana je i inhibicija enzima koji učestvuju u sintezi ćelijskog zida (kao što je D-alanin-D-alanin ligaza) ili sintezi ćelijske membrane (Cushnie i Lamb, 2011). Pored činjenice da navedene studije ukazuju na raznovrsne mehanizme antimikrobnog dejstva različitih jedinjenja, ozbiljan nedostatak ovih studija je ispitivanje ograničenog broja jedinjenja (samo jednog ili nekoliko različitih jedinjenja). Na osnovu toga bi se moglo pogrešno zaključiti da jedno ispitano jedinjenje pokazuje više različitih mehanizama delovanja. S' obzirom da svi pripadnici različitih klasa flavonoida pokazuju strukturnu sličnost, mala je verovatnoća da će različita jedinjenja imati više različitih mehanizama delovanja. Pretpostavlja se da ova jedinjenja imaju jedan mehanizam dejstva, što za posledicu ima više različitih promena u ćeliji. Na primer, oštećenje ćelijske membrane dovodi do poremećaja u transportu protona, što dovodi do poremećaja u sintezi ATP i transporta kroz ćelijsku membranu. Usled smanjenog stvaranja energije i transporta nutrijenata kroz ćelijsku membranu dolazi do poremećaja u sintezi peptidoglikana, nukleinskih kiselina, proteina i ostalih esencijalnih komponenti bakterijske ćelije.

Na osnovu navedenih podataka o uticaju flavonoida i halkona na enzimsku aktivnost i transport energije u metaboličkim procesima, u ovoj studiji je poseban interes posvećen ispitivanju uticaja tri halkona na biohemijske karakteristike MRSA sojeva. Aktivnost enzima koji učestvuju u metabolizmu *S. aureus* prevashodno zavisi od uslova sredine u kojoj raste, odnosno od koncentracije kiseonika i prisustva ugljenih hidrata. *S. aureus* je fakultativno anaerobna bakterija koja energiju i gradivne materije dobija uglavnom razgradnjom ugljenih hidrata putem Krebsovog ciklusa limunske kiseline, pentoza-fosfatnog puta (tj. heksoza-monofosfatnog šanta) i glikolize (Kim i Gadd, 2011; Sun et al., 2012). Takođe je moguće dobijanje energije i putem oksidacije aminokiselina, što se dešava u uslovima kada su prisutne manje koncentracije glukoze tokom kultivacije (Strasters i Winkler, 1963). U aerobnim uslovima energija se obezbeđuje razgradnjom glukoze, alanina, arginina, glicina, izoleucina, leucina, fenilalanina i acetata, a u anaerobnim uslovima razgradnjom glukoze, arginina i treonina (Sun et al., 2012). Aktivnost određenih enzima se koristi za preciznu identifikaciju stafilokoka pomoću

komercijalnih testova, kao što je API Staph, ili automatizovanih sistema kao što su VITEK ili BD Phoenix sistem.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da pod uticajem ispitanih halkona dolazi do smanjenja aktivnosti enzima koji učestvuju u metabolizmu ugljenih hidrata (β -galaktozidaze i α -glukozidaze), smanjene razgradnje D-galaktoze i laktoze i smanjene aktivnosti ureaze. Najizraženija redukcija enzimske aktivnosti je uočena kod β -galaktozidaze (55% sojeva) i razgradnje laktoze (65% sojeva). Beta galaktozidaza je enzim koji katalizuje razgradnju laktoze i analoga laktoze - *o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozida (ONPG). Ovaj enzim razlaže laktozu tako što hidrolizuje β -glikozidnu vezu između galaktoze i glukoze. Smanjena aktivnost ovog enzima, koja posledično ima i smanjenu razgradnju laktoze, može nastati iz nekoliko razloga: usled mutacije gena koji kodiraju sintezu ovog enzima, mutacije gena koji učestvuju u transportu laktoze ili ONPG, promene u funkciji regulatornih gena ili konformacione promene samog enzima (Morse et al., 1968). U metabolizmu galaktoze učestvuju tri glavna enzima: galaktokinaza, galaktozo-1-fosfat uridiltransferaza i UDP-galaktozo-4' epimeraza. Aktivnost ovih enzima dovodi do konverzije galaktoze u glukozu, koja se dalje metabolički degradira obezbeđujući bakterijama energiju neophodnu za druge biosintetske procese. Osim što galaktoza predstavlja potencijalni izvor energije, uočeno je da ima značajnu ulogu i u procesu formiranja biofilma kod *Bacillus subtilis* (Chai et al., 2012). Smanjena razgradnja D-galaktoze nakon kultivacije MRSA sojeva sa halkonima je uočena kod 35% sojeva.

U literaturi nema podataka o aktivnosti halkona i sličnih jedinjenja na enzime koji učestvuju u metabolizam laktoze ili galaktoze, ali postoje istraživanja koja ukazuju na uticaj flavonoida ili halkona na inhibiciju prečišćenih bakterijskih enzima u *in vitro* uslovima (Cushnie i Lamb, 2011). Ansari i sar. (2005) su testirali 24 halkona od kojih su sva jedinjenja ispoljila značajan inhibitorski efekat na aktivnost α -glukozidaze, a jedno jedinjenje na aktivnost ureaze. Takođe je pokazano da derivat halkona-sofalkon smanjuje ativnost ureaze i ispoljava mukoprotektivan efekat kod infekcija prouzrokovanih sa *H. pylori* u kombinaciji sa rabeprazolom, amoksicilinom i klaritromicinom (Isomoto et al., 2005). Ovaj efekat može biti posledica smanjenja aktivnosti ureaze, ali i direktnog antibakterijskog efekta na *H. pylori*.

Pod uticajem sva tri jedinjenja koja su ispitana u ovoj studiji došlo je do smanjenje aktivnosti α -glukozidaze kod 30% MRSA sojeva, što je u skladu sa rezultatima drugih istraživača (Ansari et al., 2005). Takođe je zapažena i smanjena aktivnost ureaze, koja se javila kod 15% MRSA sojeva. Za razliku od ureaze koja ima značajnu ulogu u patogenezi gastritisa i ulkusne bolesti izazvane sa *H. pylori*, smatra se da aktivnost ureaze kod *S. aureus* nema značajan efekat na tok infekcija prouzrokovanih ovom bakterijom.

Na osnovu iznesenih podataka postavlja se pitanje kojim mehanizmom dejstva halkoni vrše smanjenje aktivnosti enzima koji učestvuju u različitim metaboličkim putevima i da li je to zaista posledica prave inhibicije enzima ili nečeg drugog. Poznato je da svaki enzim ima aktivno mesto za koje se supstrat vezuje na osnovu svoje konformacione kompatibilnosti. Veze koje se uspostavljaju između enzima i supstrata su najčešće slabe, kao što su vodonične veze, tako da se supstrat otpušta iz aktivnog mesta enzima nakon završene reakcije. Molekul halkona ima više slobodnih funkcionalnih grupa preko kojih može da se veže za aktivno mesto enzima. Sva tri jedinjenja ispitana u ovoj studiji su skoro identične strukture, sa dve slobodne hidroksilne grupe u A i B prstenu, koja može da uspostavlja vodonične veze sa drugim molekulima. Na osnovu toga bi se moglo pretpostaviti da ova jedinjenja mogu da ostvare vezu sa aktivnim mestom enzima. S' obzirom da su sva tri jedinjenja dovela do smanjene aktivnosti različitih enzima koji imaju različitu konformaciju aktivnih mesta, mala je verovatnoća da je došlo do potpunog vezivanja molekula halkona za aktivno mesto enzima i kompetitivne inhibicije enzima. Veća verovatnoća je da su se molekuli halkona vezali za jednu ili dve funkcionalne grupe aktivnog mesta, i na taj način onemogućili vezivanje samog supstrata. To je moguće zato što je konformacioni oblik molekula halkona planaran, a sam molekul se sastoji od dva prstena koji bi svojom veličinom onemogućili pristup molekulu supstrata. Takođe postoji mogućnosti da molekul halkona uspostavi vezu sa dva ili više molekula enzima dovodeći do njihove agregacije, što bi indirektno dovelo do smanjene aktivnosti enzima a ne do njegove prave inhibicije. Do sada je već opisana agregacija purifikovanog FabG enzima *E. coli* (eng. 3-ketoacyl-acyl carrier protein reductase) pod uticajem flavonoida epigallocatechin gallate (Li et al., 2006; Zhang et al., 2008), tako da se agregacija enzima može smatrati jednim od potencijalnih mehanizama dejstva halkona.

Drugi mogući mehanizam dejstva halkona na aktivnost enzima bi bio preko uticaja ovih jedinjenja na gene koji kodiraju enzime, uticaja na regulatorne gene ili gene koji kodiraju sintezu transportnih proteina za određene supstrate. Do sada nije pokazano da halkoni ispoljavaju mutageni potencijal na ove gene pa se može pretpostaviti da smanjena aktivnost enzima ne nastaje usled mutacije strukturnih ili regulatornih gena.

Takođe je već spomenuto da halkoni i slična jedinjenja mogu da utiču na smanjenje energetskeg metabolizma blokadom NADH-citohrom c reduktaze ili ATP-sintetaze, što dovodi do smanjenja energije potrebne za aktivni transport makromolekula (Haraguchi et al., 1998; Chinnam et al., 2010). Na osnovu toga se može pretpostaviti da bi uočeno smanjenje aktivnosti enzima pod uticajem halkona ispitanih u ovoj studiji moglo nastati i usled deficita energije i posledičnog smanjenja preuzimanja supstrata iz ekstracelularne sredine.

Osim enzima koji su sastavna komponenta metaboličkih puteva, *S. aureus* proizvodi veliki broj ekstracelularnih enzima koji imaju ulogu faktora virulencije. Glavna uloga ovih enzima je u invaziji i diseminaciji stafilokoka kroz različita tkiva domaćina. Osim enzima, ekstracelularni produkti *S. aureus* su i toksini koji su važni u patogenezi STSS, SSSS ili stafilokoknog trovanja hranom, a bakterije proizvode i veliki broj toksina koji nisu vezani za određeni klinički sindrom. Veliki značaj u patogenezi infekcije izazvane MRSA sojevima, naročito CA-MRSA sojevima, pridaje se produkciji toksina koji izazivaju direktnu lizu ćelija. Dva najbolje proučena toksina koji spadaju u grupu glavnih faktora virulencije stafilokoka su PVL i α -hemolizin.

Efekat leukocidina je prepoznao još 1894. god. van de Velde, a Panton i Valentin su 1932. god. pokazali da ovaj toksin nema letalni efekat *in vivo* i da se značajno razlikuje od ostalih hemolitičkih toksina *S. aureus* koji imaju letalni efekat (van de Velde, 1894; Panton i Valentin, 1932). Ova dva autora su prvi put ukazala na korelaciju između leukocidina i teških infekcija kože i mekih tkiva, kao što su furunkuli ili apscesi, koje su u to doba bile potencijalno fatalne usled nedostatka adekvatne antibiotske terapije. PVL se sastoji od LukS-PV i LukF-PV subjedinice koje su kodirane genima *lukS-PV* i *lukF-PV*. Ovi geni se nalaze u specifičnim bakteriofagima pa je moguć horizontalni transfer gena između različitih sojeva *S. aureus* (Kaneko et al., 1998; Baba et al., 2002; Diep et al., 2006). Uloga PVL u patogenezi različitih stafilokoknih infekcija još uvek nije sa preciznošću utvrđena. Ovaj toksin ima izražen afinitet prema ćelijama mijeloidne linije,

posebno prema granulocitima i makrofagama. Velike koncentracije toksina izazivaju lizu neutrofila, dok manje (sublitične) koncentracije dovode do degranulacije, oslobađanja proinflammatoryh medijatora (leukotriena B₄ i interleukina 8) i reaktivnih kiseoničnih radikala (Konig et al., 1995; Colin i Monteil, 2003). Krajnji rezultat dejstva PVL je mobilizacija i aktivacija neutrofila, što doprinosi razvoju zapaljenske reakcije. Prve epidemiološke studije su utvrdile postojanje korelacije između sekrecije PVL i teških infekcija kože (Finck-Barbancon et al., 1991; Cribier et al., 1992), da bi istraživanja koja su sledila utvrdila korelaciju sa teškim oblikom furunkuloze i hemoragičnom nekrotizujućom pneumonijom kod prethodno zdravih osoba (Lina et al., 1999; Gillet et al., 2002). Određeni CA-MRSA sojevi, kao što su USA300 i USA400 su nosioci gena koji kodiraju PVL (Baba et al., 2002; Vandenesch et al., 2003; Diep et al., 2006), pa se smatra da se PVL može koristiti kao epidemiološki marker CA-MRSA. S' obzirom na činjenicu da PVL produkuje manje od 5% sojeva *S. aureus* (Couppie et al., 1994; Holmes et al., 2005; Robert et al., 2005; Ellington et al., 2007), odnosno, da je prevalenca PVL-pozitivnih sojeva kod nazalnog kliconoštva mala ($\approx 0.6\%$) (Melles et al., 2006; Gorwitz et al., 2008), verovatno je uloga PVL u patogenezi infekcija koje izazivaju CA-MRSA mala. Shallcross i sar. su 2013. god. objavili rezultate meta-analize 509 naučnih radova koji su se bavili ulogom PVL u patogenezi stafilokoknih infekcija na osnovu koje su došli do zaključka da postoji snažna korelacija između prisustva PVL-pozitivnih sojeva i infekcija kože i mekih tkiva, dok je prisustvo ovih sojeva retko kod pacijenata sa stafilokoknom pneumonijom, osteomuskularnim infekcijama, bakterijemijom ili kod kliconoša (Shallcross et al., 2013).

Rezultati prikazani u ovoj studiji su potvrdili prisustvo *PVL* gena kod tri soja (10%) dobijena od dva ambulanta bolesnika i jednog hospitalizovanog bolesnika. Zbog ograničenog broja ispitanih sojeva u ovoj studiji, relativno veliki procenat PVL-pozitivnih sojeva se ne može uzeti kao siguran podatak o učestalosti izolacije ovih sojeva na našoj teritoriji. Studija koja je ispitala prisustvo *PVL* gena kod 196 sojeva *S. aureus* izolovanih u različitim mikrobiološkim laboratorijama u Republici Srbiji je ukazala na prisustvo malog broja (2.5%) PVL-pozitivnih sojeva na našoj teritoriji (Ćirković, 2009). Genska tipizacija PVL-pozitivnih sojeva je pokazala da jedan soj ima *SCCmec* IV i *agr* tip III, a dva preostala soja *SCCmec* V i *agr* tip I. PVL-pozitivni sojevi sa *SCCmec* V i *agr* tipom I su takođe pripadali istom klonskom kompleksu

CC152. Kao što je već spomenuto, smatra se da MRSA sojevi SCC*mec* I, II, i III tipa predstavljaju HA-MRSA, a da SCC*mec* IV i V tipovi predstavljaju CA-MRSA sojeve. Dominantan evropski klon ST80, koji ima SCC*mec* IV i *agr* tip III, je rezistentan na sve β -laktamske antibiotike, kanamicin i tetraciklin i intermedijerno osetljiv na fuzidinsku kiselinu (Vandenesch et al., 2003). Jedan PVL-pozitivan soj u ovoj studiji sa SCC*mec* IV i *agr* tipom III je imao isti profil rezistencije kao i ST80 pa se može pretpostaviti da ovaj klon pripada dominantnom evropskom klonu ST80 PVL-pozitivnih CA-MRSA. Pored prisustva SCC*mec* IV i V tipa, sva tri PVL-pozitivna soja u ovoj studiji su izolovana kod pacijenata sa kožnim infekcijama (bris kože, bris rane i bris spoljašnjeg ušnog kanala) što dodatno govori u prilog tome da su ovo CA-MRSA (Vandenesch et al., 2003).

Za razliku od PVL, koji proizvodi mali broj sojeva *S. aureus*, α -hemolizin proizvodi većina sojeva ove bakterije (Bhakdi i Tranum-Jensen, 1991). α -hemolizin (poznat i kao HIIa ili α -toksin) je jedan od najbolje proučenih toksina *S. aureus*. Ovaj toksin nije konstitutivno eksprimiran, već se sekretuje u kasnoj posteksponencijalnoj fazi rasta kao hidrosolubilni monomer molekulske mase 33.2 kDa (Bhakdi i Tranum-Jensen, 1991). Pored eritrocita, ovaj hemolizin dovodi do destrukcije velikog broja ćelija kao što su epitelne ćelije, fibroblasti, makrofage i monociti, a njegov letalni potencijal je dokazan *in vivo* u animalnom modelu bakterijemije prouzrokovane sa *S. aureus* (Bhakdi i Tranum-Jensen, 1991; Menzies i Kernodle, 1994). Ovaj toksin spada u grupu toksina koji stvaraju pore na ćelijskoj membrani ciljnih ćelija. Monomeri α -hemolizina se vezuju za površinu ćelija i integrišu unutar lipidnog dvosloja ćelijske membrane. Vezivanje za ćeliju može biti posredovano specifičnim receptorima (kada se toksin nalazi u niskim koncentracijama) ili dolazi do nespecifične adherencije za ćelijsku membranu (kada se toksin nalazi u visokim koncentracijama) (Hildebrand et al., 1991). Nakon vezivanja monomera dolazi do njihove difuzije kroz lipidni dvosloj i oligomerizacije u cilindričan kompleks veličine 1-2 nm, molekulske mase 232.4 kDa, koji se sastoji od sedam monomernih podjedinica (homoheptamer) (Valeva et al., 1997a; Gouaux, 1998). Formiranje pre-pore izaziva konformacione promene u samom homoheptamernom kompleksu što dovodi do aktivacije pore (Vandana et al., 1997). Krajnji rezultat je izlazak malih molekula i jona K^+ iz ćelije i ulazak Na^+ , Ca^{++} i drugih malih molekula mase ispod 2 kD što dovodi do osmotske lize ćelija (Menestrina, 1986).

Smatra se da α -hemolizin ima vodeću ulogu u patogenezi infekcija prouzrokovanih sa *S. aureus* (Menzies i Kernodle, 1994). Iako se ranije smatralo da PVL ima glavnu ulogu u nastanku teških oblika pneumonije uzrokovane sa CA-MRSA, brojni *in vivo* modeli ukazuju na korelaciju između produkcije α -hemolizina i težine kliničke slike plućnih infekcija (Bubeck Wardenburg et al., 2007; Burlak et al., 2007; Montgomery et al., 2008). Wang i sar. i Montgomery i sar. su ukazali da je za težinu kliničke slike infekcije izazvane sa CA-MRSA najverovatnije odgovorna povećana ekspresija faktora virulencije koji su kodirani *agr* regulatornim sistemom (Wang et al., 2007; Montgomery et al., 2008).

Poslednjih godina veliko interesovanje privlače studije koje se bave razvojem antimikrobnih jedinjenja koja selektivno deluju na faktore virulencije (enterotoksine, hemolizine i adhezine) (Escaich, 2008; Cegelski et al., 2008). Poznato je da klinički uspeh konvencionalnih antibiotika ne zavisi samo od bakteriostatskog ili baktericidnog efekta, već i od njihovog uticaja na sintezu i oslobađanje faktora virulencije, u prvom redu egzotoksina. Mnogi antibiotici u suboptimalnim koncentracijama utiču na sekreciju egzotoksina koje proizvodi *S. aureus*. Lekovi koji inhibišu sintezu proteina, kao što su klindamicin, linezolid i kvinupristin/dalfopristin, u subinhibitornim koncentracijama dovode do smanjene produkcije α - i γ -hemolizina, SEA, SEB, TSST-1 i proteina A (Edwards-Jones i Foster, 2002; Herbert et al., 2001; Bernardo et al., 2004; Koszczol et al., 2006). Nasuprot tome, antibiotici koji ostvaruju baktericidan efekat dejstvom na ćelijski zid, kao što su β -laktamski i glikopeptidni antibiotici, dovode do povećane ekspresije α -hemolizina, enterotoksina i TSST-1 preko stimulacije sinteze egzoproteina kod *S. aureus* (Stevens et al., 2007). Takođe postoje podaci o uticaju jedinjenja prirodnog porekla na produkciju α -hemolizina i drugih egzotoksina. Do sada je pokazano da određena jedinjenja u biljnim ekstraktima (oleuropein, epicatechin gallate, thymol, eugenol) ili etarska ulja lovora, cimeta ili karanfilića u subinhibitornim koncentracijama dovode do smanjenja produkcije egzotoksina (Tranter et al., 1993; Smith-Palmer et al., 2004; Shah et al., 2008; Qiu et al., 2010a, 2010c; Qiu et al., 2011). Rezultati ove studije su pokazali da subinhibitorne koncentracije sva tri halkona dovode do smanjenja produkcije α -hemolizina, sa potpunom inhibicijom produkcije u koncentracijama 1/2-1/4 MIK. Uočena inhibicija hemolitičke aktivnosti je bila dozno-zavisna. Halkon sa hidroksilnom grupom u položaju 2 B prstena je imao najizraženiji

efekat na smanjenje produkcije α -hemolizina. Pri najmanjoj primenjenoj koncentraciji ovog halkona (1/16xMIK, odnosno 3.1 $\mu\text{g/ml}$) nije došlo do značajnog porasta hemolitičke aktivnosti ispitanih MRSA sojeva. Ostala dva jedinjenja su ispoljila slične efekte, sa delimičnim ili potpunim oporavkom hemolitičke aktivnosti testiranih sojeva pri najmanjim primenjenim koncentracijama (1/16xMIK, odnosno 6.2 $\mu\text{g/ml}$).

U literaturi ne postoje podaci o uticaju jedinjenja testiranih u ovoj studiji na produkciju α -hemolizina kod MRSA. Jedinjenja prirodnog porekla koja spadaju u klasu halkona, kao što su likohalkon A i E, u subinhibitornim koncentracijama dovode do inhibicije produkcije α -hemolizina (Qiu et al., 2010b; Zhou et al., 2012). Likohalkon A ispoljava inhibitorni efekat na MRSA i MSSA sojeve sa vrednostima MIK 2.0-8.0 $\mu\text{g/ml}$ (Fukai et al., 2002; Qiu et al., 2010b) i inhibitoran efekat na produkciju α -hemolizina u opsegu 1/2-1/8xMIK (Qiu et al., 2010b). Od svih ispitanih likohalkona, likohalkon E je pokazao najbolji efekat. Zhou i sar. (2012) su ustanovili da ovaj likohalkon ima izražen antistafilokokni efekat, sa MIK vrednostima u opsegu 1.0-4.0 $\mu\text{g/ml}$. Osim bakteriostatskog efekta na *S. aureus*, likohalkon E je pokazao inhibitorni uticaj na produkciju α -hemolizina u koncentracijama 1/4-1/16xMIK, što je veoma značajan nalaz ako se uzme u obzir da su to veoma male koncentracije ovog jedinjenja (125-500 ng/ml).

Kao što je prethodno spomenuto, ekspresija faktora virulencije je kod *S. aureus* pod kontrolom nekoliko regulatornih sistema, od kojih su najznačajniji *agr*, *sar* i *sae* (Novick et al., 1995; Morfeldt et al., 1995; Yarwood i Schlievert, 2003; Kong et al., 2006; Yarwood et al., 2007). Dosadašnja istraživanja su pokazala da subinhibitorne koncentracije antibiotika utiču na translaciju genskih produkata ovih gena, što dovodi do promene nivoa transkripcije gena koji kodiraju sintezu egzoproteina (Herbert et al. 2001; Kuroda et al. 2007). Lekovi koji inhibišu sintezu proteina, kao što je klindamicin, dovode do inhibicije transkripcije gena koji kodiraju sintezu egzoproteina preko *sar* regulatornog sistema (Herbert et al. 2001), a β -laktamski antibiotici stimulišu hemolitičku aktivnost preko SaeRS dvokomponentnog sistema (Kuroda et al. 2007). Jedinjenja prirodnog porekla, kao što su timol (Qiu et al., 2010c) ili likohalkon A (Qiu et al., 2010b) inhibišu produkciju stafilokoknih hemolizina putem inhibicije transkripcije *agrA*, dok likohalkon E pored ovog mehanizma inhibiše i ekspresiju *hla* gena koji kodira sintezu α -hemolizina (Zhou et al., 2012).

Precizan mehanizam dejstva O-OH, M-OH i P-OH halkona ispitanih u ovoj studiji nije utvrđen, ali se na osnovu nalaza drugih autora može pretpostaviti da ova jedinjenja smanjuju ekspresiju gena koji kodira sintezu α -hemolizina, bilo putem inhibicije transkripcije jedne od komponenti *agr* lokusa, ili na direktan način, inhibicijom ekspresije *hla* gena.

Kao jedan od najvažnijih QS sistema kod stafilokoka *agr* lokus ima značajnu ulogu i u procesu stvaranja biofilma. Formiranje biofilma je višefazni proces koji započinje adherencijom bakterija za komponente ECM ili površinu ćelija pomoću MSCRAMM proteina, nakon čega sledi umnožavanje bakterija, njihova agregacija i formiranje višeslojne strukture. Kada se formira zreo biofilm dolazi do odvajanja bakterija sa njegove površine i širenja biofilma na druga mesta u organizmu, što dovodi do metastatskog širenja infekcije (Otto 2008, Wang et al., 2011). Debljina biofilma zavisi od uslova sredine u kojima se on formira. Biofilm može biti jednoslojan ili se sastoji od više slojeva gusto zbijenih ćelija koje retko mogu formirati izraštaje u obliku stuba ili pečurke (Costerton et al., 1995). Unutar biofilma stafilokoke su povezane u ćelijske agregate pomoću amorfne sluzave materije koja se sastoji od sekretovanih egzopolisaharida (tj. glikokaliksa), teihoinse kiseline, proteina i ekstracelularne DNK koja se oslobađa iz liziranih ćelija (Otto 2008). Ranija istraživanja su pokazala da se glikokaliks sastoji od teihoinse kiseline (80%) i mešavine proteina stafilokoka i domaćina (Hussain et al., 1993), ali su kasnije studije identifikovale specifičan polisaharidni intercelularni adhezin koji se sastoji od β -1,6-N-acetilglukozamina (80-85%) i frakcije neacetilisanih D-glukozamina koji sadrže fosfate i estarski vezan sukcinat (15-20%) (Mack et al., 1996). Danas se ekstracelularni polisaharidni matriks kod *S. epidermidis* naziva polisaharidni intercelularni adhezin (PIA), odnosno PNAG (eng. poly-N-acetylglucosamine) kod *S. aureus* (Fitzpatrick et al., 2005). Formiranje biofilma je složen proces koji zavisi od uslova sredine u kojoj se biofilm formira, i razlikuje se *in vitro* i *in vivo*. Do sada je opisano nekoliko različitih *in vitro* metoda za detekciju sposobnosti formiranja biofilma. Ove metode mogu biti specifične, kao što su ispitivanje adherencije za kulture ćelija ili za proteine ECM, ili nespecifične, kao što su ispitivanje produkcije glikokaliksa ili adherencije za plastične polimerne površine (Cree et al., 1995).

Da bi se kod MRSA sojeva utvrdila sposobnost produkcije biofilma ili uticaj halkona na ovaj proces, u ovoj studiji je ispitana sposobnost produkcije glikokaliksa i sposobnost formiranja biofilma na plastičnim polimernim površinama (tj. u mikrotitracionoj ploči). Takođe je ispitana i sposobnost vezivanja MRSA sojeva za humani fibronektin. Uticaj halkona na produkciju glikokaliksa kod MRSA sojeva je ispitan pomoću CRA i Christensenovog metoda. Nakon kultivacije sa subinhibitornim koncentracijama testiranih halkona došlo je do značajnog smanjenja produkcije glikokaliksa i adherencije bakterija za plastične polimerne površine. CRA i Christensenov metod su kvalitativne i subjektivne metode koje pokazuju različitu pouzdanost prilikom očitavanja rezultata. Christensenov metod se može koristiti za skrining sojeva *S. aureus* koji pokazuju jaku produkciju biofilma ali nije pouzdan za detekciju sojeva koji slabo produkuju biofilm (Christensen et al., 1982; Johannes et al., 2002). Ovaj metod je u dobroj korelaciji sa kvantitativnim metodom detekcije biofilma u mikrotitracionim pločama, pa se mogu koristiti zajedno radi pouzdanije detekcije sojeva koji produkuju veće količine biofilma. Kod CRA metoda može doći do nepravilne interpretacije rezultata usled varijacija u boji crnog pigmenta koji prebojava kolonije ili opadanju boje pigmenta koje nastaje nakon dužeg stajanja kulture (Freeman et al., 1989; Mariana et al., 2009). U ovom istraživanju nije utvrđena značajna razlika između CRA i Christensenovog metoda, što je u skladu sa rezultatima Freeman i sar. (1989) i Cree i sar. (1995). Nasuprot tome, Johannes i sar. (2002) nisu pronašli korelaciju između morfološkog izgleda kolonija *S. aureus* detektovanog CRA metodom i produkcije biofilma u mikrotitracionim pločama ili mikrotubama.

Produkcija PIA/PNAG je kodirana genima koji se nalaze u sastavu *ica* operona (eng. intercellular adhezin operon) (Heilmann et al., 1996; Cramton et al., 1999). *ica* operon se sastoji od *icaADBC* gena koji kodiraju sintezu enzima koji učestvuju u formiranju PIA/PNAG i *icaR* regulatornog gena. Transkripcija *ica* operona je pod kontrolom faktora sredine kao što su koncentracija kiseonika (Cramton et al., 2001), glukoza (Dobinsky et al., 2003; Lim et al., 2004), etanol (Knobloch et al., 2001; 2002), visoka osmolarnost i temperatura (Knobloch et al., 2001) i subinhibitorne koncentracije tetraciklina ili kombinacija kvinupristin-dalfopristin (Rachid et al., 2000; Fitzpatrick et al., 2005). Transkripcija *icaADBC* genskog klastera i sinteza PIA/PNAG su negativno regulisane preko *icaR* genskog produkta, *TcaR* lokusa (eng. teicoplanin-associated

locus) (Jefferson et al., 2003; 2004) i Spx regulatora koji modifikuje aktivnost *icaR* (Pamp et al., 2006). Nasuprot tome, proteinski regulator formiranja biofilma Rbf (eng. regulator of biofilm formation) vrši represiju transkripcije *icaR* lokusa što indirektno povećava aktivnost *icaADBC* gena, sintezu PIA/PNAG i formiranje biofilma (Cue et al., 2009).

Ispitivanjem velikog broja kliničkih izolata *S. aureus* je utvrđeno da je *ica* operon prisutan kod skoro svih sojeva ove bakterije (Cramton et al., 2001; Johannes et al., 2002; Fitzpatrick et al., 2005). Ispitivanja korelacije između prisustva *ica* operona i pozitivne produkcije biofilma koja je detektovana različitim metodama je dalo kontradiktorne rezultate. Generalno se smatra da je prisustvo *ica* operona u korelaciji sa pozitivnom produkcijom biofilma utvrđenom CRA metodom (Aricola et al., 2001; 2002) ili produkcijom biofilma u mikrotitracionim pločama (Gad et al., 2009; Iorio et al., 2011). Na osnovu toga se može zaključiti da su svi biofilm-pozitivni MRSA sojevi detektovani sa navedenim metodama u ovoj studiji istovremeno bili nosioci *ica* operona.

Samo prisustvo *ica* operona ne znači i njegovu ekspresiju, odnosno, produkciju PIA/PNAG. U slučaju mutacije ili delecije *ica* genskog klastera formiranje biofilma se dešava nezavisno od produkcije PIA/PNAG (Archer et al., 2011). Takođe je zapaženo da delecija *icaADBC* genskog klastera dovodi do potpunog izostanka formiranja biofilma kod MSSA sojeva, dok MRSA sojevi i dalje zadržavaju sposobnost formiranja biofilma (O'Neill et al., 2007). Kod *ica*-delecionih mutanata formiranje biofilma zavisi od drugih molekula koji imaju ulogu u adherenciji, kao što su AAP, protein A (Merino et al., 2009), FnBP (Houston et al., 2011) i Bap (Lasa i Penades, 2005). Iz tog razloga je u ovoj studiji, osim produkcije glikokaliksa, kao model alternativnog načina formiranja biofilma ispitana i sposobnost vezivanja MRSA sojeva za humani fibronektin.

Vezivanje stafilokoka za fibronektin se odvija pomoću FnBPA i FnBPB koji spadaju u familiju MSCRAMM proteina (Peacock et al., 2000). Oni se sintetišu tokom rane eksponencijalne faze rasta i omogućavaju adherenciju stafilokoka za fibronektin koji se nalazi u plazmi ili na površini ćelija (Cree et al., 1995). U stacionarnoj fazi rasta moguća je modifikacija ovih proteina pod dejstvom stafilokoknih proteaza, što dovodi do smanjenog vezivanja bakterija za fibronektin i smanjene sposobnosti formiranja biofilma (Peacock et al., 2000). Svi sojevi ispitani u ovom istraživanju su pokazali

sličnu sposobnost vezivanja za humani fibronektin, koja je značajno smanjena nakon kultivacije u prisustvu subinhibitornih koncentracija halkona.

Osim *ica* i *fnb* genskih lokusa stafilokoke u biofilmu međusobno komuniciraju pomoću QS sistema koji reguliše ekspresiju gena i sintezu proteina koji učestvuju u svim fazama formiranja biofilma ili imaju ulogu faktora virulencije (Yarwood i Schlievert, 2003; Fitzpatrick et al., 2005). Kod stafilokoka je do sada opisano dvadesetak različitih gena koji imaju regulatornu ulogu u procesu formiranja biofilma (O’Gara 2007) od kojih je najznačajnija uloga već spomenutih *agr* i *sarA* regulatornih sistema (Beenken et al., 2010). Ova dva regulatora imaju suprotne uloge u procesu formiranja biofilma, ekspresija *agr* regulatora inhibiše formiranje biofilma (Vuong et al., 2000; Kong et al., 2006; Yarwood et al., 2007) i utiče na otpuštanje bakterija iz biofilma (Yarwood et al., 2004; Boles i Horswill, 2008; Lauderdale et al., 2009), dok ekspresija *sarA* stimuliše formiranje biofilma kod *S. aureus* i *S. epidermidis* (Vuong et al., 2000; Beenken et al., 2003; Valle et al., 2003; Kong et al., 2006; Yarwood et al., 2007).

U ranim fazama formiranja biofilma, produkti *sarA* lokusa inhibišu aktivnost proteaza, ekspresiju *nuc* gena i produkciju termostabilne endonukleaze čime se sprečava degradacija proteina i ekstracelularne DNK koji predstavljaju važne strukturne komponente biofilma (Archer et al., 2011). *sarA* mutanti imaju značajno smanjen kapacitet formiranja biofilma (Beenken et al., 2003). Ekspresija *agr* lokusa dovodi do nishodne regulacije gena koji kodiraju sintezu površinskih faktora adherencije, što dovodi do smanjenja sposobnosti adherencije stafilokoka i smanjenog formiranja biofilma. Produkti *agr* lokusa su bitni u kasnoj fazi formiranja biofilma, kada dovode do ushodne regulacije gena koji kodiraju sintezu proteaza, nukleaza i peptida koji imaju ulogu surfaktanata i omogućavaju otpuštanja stafilokoka sa površine zrelog biofilma (Kong et al., 2006; Beeneken et al., 2010). Značajnu ulogu u maturaciji biofilma i otpuštanju ćelija i ćelijskih klastera sa površine biofilma imaju i PSM β peptidi, koji deluju kao surfaktanti (Wang et al., 2007; Cheung et al., 2010). Transkripcija PSM operona je pod direktnom kontrolom *agrA*, pa *agr* mutanti formiraju značajno deblji biofilm zbog smanjene produkcije PSM (Vuong et al., 2004; Wang et al., 2007; Queck et al., 2008). Pored uloge u otpuštanju ćelija sa površine biofilma, tokom prelaska ćelija iz kasne eksponencijalne faze u stacionarnu fazu, *agr* lokus dovodi do povećane ekspresije gena koji kodiraju sintezu sekretornih faktora virulencije, omogućavajući

otpuštenim ćelijama izbegavanje imunskog odgovora domaćina, preživljavanje i kolonizaciju udaljenih tkiva (Novick, 2003; Archer et al., 2011).

Kao što je prethodno spomenuto dosadašnja istraživanja su ukazala na korelaciju između određenih *agr* tipova i patogenog potencijala MRSA sojeva. Tako je utvrđeno da postoji korelacija između *agr* tipa I i slabe produkcije biofilma (Manago et al., 2006) i *agr* tipa II i jake produkcije biofilma (Manago et al., 2006; Cafiso et al., 2007; Ikonomidis et al., 2009). Istraživanje sprovedeno na teritoriji Republike Srbije je takođe potvrdilo prisustvo MRSA sojeva *agr* tipa II koji pokazuju jaku sposobnost produkcije biofilma (Ćirković, 2009). Nasuprot tome, rezultati ove studije, koja je obuhvatila 30 MRSA sojeva, nisu pokazali korelaciju između *agr* tipa II i jake produkcije biofilma. Ovaj rezultat je najverovatnije posledica malog broja ispitanih MRSA sojeva, relativno homogene distribucije *agr* tipova I i II i istog broja sojeva koji produkuju umerenu i veliku količinu biofilma.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su MRSA sojevi kultivisani u prisustvu subinhibitornih koncentracija halkona produkovali značajno manje količine glikokaliksa i biofilma i slabije se vezivali za humani fibronektin. Na osnovu toga se može zaključiti da ispitani halkoni dovode do smanjenog vezivanja MRSA sojeva za plastične polimerne površine i proteine ECM i tkiva, odnosno, deluju na prvu fazu u nastanku infekcije - adherenciju bakterija. U literaturi ne postoje podaci o efektu ova tri jedinjenja na faktore virulencije koji utiču na adherenciju MRSA sojeva, a mali broj studija se bavio ispitivanjem uticaja različitih jedinjenja iz klase flavonoida na produkciju biofilma kod *S. aureus*. Najnovija studija u kojoj su Manner i sar. (2013) ispitali uticaj 500 flavonoida na produkciju biofilma kod *S. aureus* je identifikovala samo deset jedinjenja koja imaju značajan inhibitorni efekat (>85%) na produkciju biofilma kada su primenjena u koncentraciji od 400.0 μM . Tri od deset jedinjenja su pripadala grupi prirodnih halkona koji imaju prisutnu jednu ili dve OH^- grupe u položajima 2 i/ili 4 A prstena. Glavna aktivna komponenta biljke *Muntingia calabura*, 2',4'-dihidroksihalkon je pokazao značajan inhibitoran efekat na *S. aureus* sa MIK vrednostima od 50.0 $\mu\text{g/mL}$ (208.0 μM) (Sufian et al., 2013). Primenom nižih koncentracija ovih halkona (100.0 μM) nije detektovan značajan inhibitorni efekat na formiranje biofilma.

Kao što je već prethodno spomenuto, prisustvo hidroksilne grupe u A ili B prstenu halkona ima ulogu u antistafilokoknom dejstvu ovih jedinjenja. O-OH, M-OH i P-OH

halkoni koji su testirani u ovoj studiji su doveli do smanjenja formiranja biofilma kod MRSA sojeva u subinhibitornim koncentracijama (6.2-50.0 µg/ml) koje su bile značajno niže od onih koje su testirali Manner i sar. i Sufian i sar. Takođe sva tri testirana jedinjenja imaju prisutnu OH⁻ grupu u položaju 2 A prstena, kao i najaktivnije jedinjenje koje su testirali Manner i sar. (2013). Na osnovu toga se može pretpostaviti da prisustvo OH⁻ grupe osim direktnog antistafilokoknog efekta ima ulogu i u inhibiciji formiranja biofilma.

Potencijalni mehanizmi kojim halkoni inhibišu formiranje biofilma do sada nisu opisani. Određeni flavonoidi deluju inhibitorno na enzim sortazu koja katalizuje sklapanje površinskih proteina u koje spadaju i adhezini. Kang i sar. (2006) su pokazali da flavonoid morin u subinhibitornim koncentracijama vrši specifičnu inhibiciju sortaze A i B kod *S. aureus*, što dovodi do smanjenog vezivanja stafilokoka za fibrinogen. Na ovaj način se ometa prva faza u nastanku biofilma (Cushnie i Lamb, 2011).

Poslednjih godina se brojna istraživanja bave razvojem jedinjenja koja bi vršila inhibiciju formiranja biofilma, ili bi dovela do razgradnje već formiranog biofilma. Naročita pažnja je posvećena jedinjenjima u formi malih molekula, koja bi bila pogodna za upotrebu *in vivo*. Smatra se da ovi molekuli mogu uticati na formiranje i disperziju biofilma kod različitih vrsta bakterija preko ubikvitarnih signalnih puteva, kao što su QS sistemi. Do sada su identifikovana jedinjenja koja deluju na autoinduktorske peptide i regulišu formiranje biofilma kod *S. aureus* preko *agr* lokusa, AgrAC dvokomponentnog sistema, cikličnog-di-guanozin-monofosfata, sinteze i metabolizma indola ili sinteze nukleotida i replikacije DNK (Fowler et al., 2008; Landini et al., 2010; Lee et al., 2012; Worthington et al., 2012). Iako većina tih jedinjenja ne pokazuje visok stepen strukturne homologije sa halkonima, zbog hemijske strukture halkona se može pretpostaviti da i oni mogu inhibirati formiranje biofilma preko nekog od navedenih mehanizama.

Osim ispitivanja antimikrobnog efekta halkona i uticaja ovih jedinjenja na pojedine faktore virulencije, novija istraživanja se bave sinergizmom između flavonoida/halkona i antibiotika koji se koriste kao konvencionalna terapija u lečenju infekcija prouzrokovanih sa *S. aureus* (Williamson, 2001; Hemaiswarya et al., 2008; Talia et al., 2011; Tran et al., 2012). Ovim pristupom se značajno redukuju MIK vrednosti halkona i antibiotika, čime se smanjuje mogućnost za nastanak neželjenih efekata usled terapijske primene visokih doza antibiotika. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da dolazi do

značajnog sinergističkog efekta u kombinaciji ispitanih jedinjenja sa gentamicinom, trimetoprim-sulfametoksazolom i ciprofloksacinom i nešto slabijeg sinergizma sa β -laktamskim antibioticima.

Sinergizam između halkona prirodnog porekla ili novosintetisanih jedinjenja i antibiotika su uočili i drugi istraživači. Lee i saradnici (2010) su pokazali da halkoni prirodnog porekla, kao što je 7,9,2',4'-Tetrahidroksi-8-izopentenil-5-metoksihalkon, koji se izoluje iz korena *Sophora flavescens* Ait. ispoljavaju izraženu aktivnost prema MRSA sojevima, sa MIK vrednostima halkona 1.0-8.0 $\mu\text{g/ml}$. U kombinaciji ovog halkona sa ampicilinom i gentamicinom dolazi do višestruke redukcije MIK (2-10 puta) za obe supstance (Lee et al., 2010). Za razliku od ovako niskih MIK vrednosti prirodnih halkona, heterociklični analozi halkona pokazuju umerenu inhibitornu aktivnost prema *S. aureus*, sa vrednostima MIK u opsegu 32.0-512.0 $\mu\text{g/ml}$, međutim, u kombinaciji sa antibioticima dolazi do značajne redukcije MIK halkona (2-4 puta) i antibiotika (do 16 puta) (Tran et al., 2012). Talia i saradnici (2012) su ispitivali efekat kombinacije dihidroksi- i trihidroksi-halkona sa oksacilinom i takođe pokazali značajan sinergizam između novosintetisanih halkona i antibiotika (Talia et al., 2012).

Sinergistički efekat kombinacije halkona sa antibioticima koji imaju različit mehanizam delovanja se ne može objasniti jedinstvenim mehanizmom. Sinergizam halkona sa β -laktamskim antibioticima najverovatnije nastaje kao posledica izmena u PBP2' usled njegove inaktivacije (Bernal et al., 2009) ili strukturnih promena u ćelijskoj membrani koje dovode do njegove delokalizacije (Bernal et al., 2010). Sinergizam sa ostalim antibioticima se može objasniti preko inhibicije β -laktamaza (Kusuda et al., 2006; Eumkeb et al., 2010), inaktivacije efluksnih pumpi (Fujita et al., 2005; Lechner et al., 2008), destabilizacije ćelijske membrane (Wang et al., 2010; Eumkeb et al., 2010), poremećaja sinteze PBP2' (Eumkeb et al., 2010) ili inhibicije topoizomeraze (Liu et al., 2009).

Rezultati ove studije su pokazali da dolazi do sinergističkog efekta sva tri ispitana jedinjenja sa antibioticima koji imaju različit mehanizam delovanja na multirezistentne sojeve MRSA. Najizraženije smanjenje vrednosti MIK antibiotika je uočeno u kombinaciji ispitanih jedinjenja sa ciprofloksacinom. Uočeni efekat najverovatnije nastaje usled uticaja na funkciju efluksnih pumpi koje su specifične za veći broj antibiotika (tzv. multidrug resistance efflux pumps, MDR). Kod *S. aureus* je opisana

NorA efluksna pumpa koja spada u MFS superfamiliju transportera (eng. major facilitator superfamily), klasu PMF zavisnih pumpi (eng. proton motive force). Ova pumpa ima ulogu u transportu različitih metabolita i lekova kao što su fluorohinoloni (Kaatze et al., 1993; Neyfakh et al., 1993), fenotijazini, tioksanteni, verapamil, omeprazol, dezinficijensi i boje (etidijum bromid, akridin i rodamin) (Holler et al., 2012). Pojačana ekspresija MDR transportera dovodi do rezistencije na različite antibiotike, ali se ovaj efekat može prevazići istovremenom primenom antibiotika i inhibitora efluksnih pumpi. Do sada je opisan mali broj inhibitora efluksnih pumpi, pa se brojna istraživanja bave ispitivanjem efekta različitih jedinjenja na ovaj sistem. Najnovija studija iz 2012. god. se bavila ispitivanjem inhibitornog efekta 117 sintetisanih halkona na funkciju NorA efluksne pumpe kod *S. aureus*. Rezultati ovog istraživanja su identifikovali samo šest supstanci sa značajnom inhibitornom aktivnošću, od kojih je pet imalo hidroksilnu grupu vezanu za četvrti C atom u B prstenu (Holler et al., 2012). U kombinaciji ovih jedinjenja sa ciprofloksacinom, antibiotikom iz grupe fluorohinolona koji predstavlja prirodan supstrat za NorA efluksnu pumpu, uočeno je četverostruko smanjenja MIK za ciprofloksacin, što dodatno potvrđuje inhibiciju NorA efluksne pumpe.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da sva tri jedinjenja (O-OH, M-OH i P-OH) najizraženiji sinergistički efekat ispoljavaju u kombinaciji sa ciprofloksacinom, od kojih jedno jedinjenje ima hidroksilnu grupu u B prstenu vezanu za četvrti C atom. Na osnovu rezultata Holler i sar. se može pretpostaviti da je potencijalan mehanizam sinergističkog efekta tri halkona ispitana u ovoj studiji izmena aktivnosti NorA efluksne pumpe.

Rezultati ove studije ukazuju da Bis-(2-hydroxy-phenyl)-propenon, 3-(3-Hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenon i 3-(4-Hydroxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-phenyl)-propenon *in vitro* inhibišu rast i razmnožavanje MRSA sojeva, deluju na metaboličke procese vezane za metabolizam ugljenih hidrata, smanjuju adherenciju sojeva za plastične polimerne površine i komponente ECM, smanjuju produkciju α -hemolizina i stupaju u sinergističke interakcije sa antibioticima iz različitih klasa. Na osnovu dobijenih rezultata bi trebalo koncipirati dalja istraživanja koja bi detaljnije ispitala mehanizam dejstva ovih jedinjenja i njihovu eventualnu terapijsku upotrebu. Zbog izraženog inhibitornog efekta na faktore virulencije koji učestvuju u adherenciji

bakterija, ova jedinjenja bi mogla da se koriste za oblaganje plastičnih materijala koji se koriste u medicinske svrhe. Rezultati istraživanja različitih grupa autora su ukazali da se kolonizacija sa stafilokokama smanjuje kada se vrši oblaganje silikonskih katetera sa kombinacijom rifampina i trimetoprima (Kohnen et al., 1998; Kockro et al., 2000), srebrom (Gatter et al., 1998; Illingworth et al., 2000) ili želatinom (Farooq et al., 1999). Imajući u vidu činjenicu da testirani halkoni stupaju u sinergističke interakcije sa antibioticima, možda bi oblaganje plastičnih polimera moglo da se vrši sa kombinacijom halkona i antibiotika u subinhibitornim koncentracijama. Kao što je već spomenuto, biofilm se drugačije formira u zavisnosti od uslova sredine u kojoj se nalaze stafilokoke. Iz tog razloga bi dalja istraživanja antimikrobnog potencijala ispitanih halkona morala biti dopunjena *in vivo* studijama, pa bi se tek nakon sagledavanja efekata *in vivo* moglo razmišljati o eventualnoj terapijskoj primeni halkona.

6. ZAKLJUČAK

1. Sva tri sintetisana halkona su ispoljila značajan *in vitro* antimikrobni efekat prema genotipski heterogenim, multirezistentnim kliničkim izolatima MRSA, sa MIK vrednostima u opsegu 25.0-200.0 µg/ml.
2. Najizraženiji inhibitorski efekat na MRSA sojeve je ispoljio O-OH halkan, sa vrednostima MIK manjim od 100.0 µg/ml i vrednostima MBK manjim od 150.0 µg/ml.
3. Kultivacija MRSA sojeva sa halkanima je dovela do smanjenja aktivnosti enzima koji učestvuju u metabolizmu ugljenih hidrata (β -galaktozidaze i α -glukozidaze), smanjene razgradnje D-galaktoze i laktoze i smanjene aktivnosti ureaze.
4. VITEK automatizovanim sistemom je utvrđeno da kultivacija MRSA sojeva sa ispitanim halkanima ne dovodi do promena u osetljivosti MRSA na antibiotike.
5. Kultivacija MRSA sojeva sa subinhibitorskim koncentracijama O-OH, M-OH i P-OH halkona je dovela do gubitka sposobnosti produkcije glikokaliksa.
6. Kultivacija MRSA sojeva sa subinhibitorskim koncentracijama O-OH, M-OH i P-OH halkona je dovela do dozno zavisne inhibicije produkcije biofilma, pri čemu je najizraženiji inhibitorski efekat ispoljio O-OH halkan, zatim M-OH halkan a najslabiji P-OH halkan.
7. Kultivacija MRSA sojeva sa subinhibitorskim koncentracijama ispitanih halkona je dovela do dozno i vremenski zavisnog smanjenja adhezije stafilokoka za humani fibronektin, pri čemu je najizraženiji inhibitorski efekat ispoljio P-OH halkan, zatim M-OH halkan a najslabiji O-OH halkan.
8. Nije uočena statistički značajna razlika u vezivanju MRSA za humani fibronektin između sojeva rekultivisanih na TSA nakon 24h kultivacije sa najvećom subinhibitorskom koncentracijom halkona, i pozitivnih kontrola.
9. Nije uočena statistički značajna razlika u vezivanju za humani fibronektin između ispitanih MRSA sojeva izolovanih iz uzoraka različitog porekla.

10. Kultivacija MRSA sa subinhibitornim koncentracijama ispitanih halkona je dovela do dozno zavisnog smanjenja produkcije α -hemolizina, sa potpunom inhibicijom produkcije u koncentracijama halkona od 1/2-1/4 MIK. Najizraženiji inhibitorni efekat je imao O-OH halkona, zatim M-OH halkon a najslabiji P-OH halkon.
11. Efekat kombinacije ispitanih halkona sa antibioticima sa različitim mehanizmom dejstva na MRSA je bio u kategoriji sinergizma, aditivnosti ili indiferentnog efekta.
12. Najznačajniji sinergizam je utvrđen u kombinaciji O-OH i M-OH halkona sa gentamicinom, ciprofloksacinom i sulfametoksazol-trimetoprimom i kombinaciji P-OH sa ciprofloksacinom i gentamicinom.
13. Najizraženiji inhibitorni efekat na rast MRSA sojeva, produkciju glikokaliksa, biofilma i α -hemolizina u *in vitro* uslovima imao je O-OH halkon, dok je najizraženiji inhibitorni efekat na vezivanje MRSA za humani fibronektin imao P-OH halkon.

7. LITERATURA

- Aguinaga A, Francés ML, Del Pozoa JL, Alonso M, Serrera A, Lasa I et al. Lysostaphin and clarithromycin: a promising combination for the eradication of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 37(6): 585-7.
- Aires de Sousa M, Conceicao T, Simas C, de Lencastre H. Comparison of genetic backgrounds of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals and the community. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5150-7.
- Alcaraz LE, Blanco SE, Puig ON, Tomas F, Ferretti FH. Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Theor Biol* 2000; 205: 231-40.
- Alvarez MD, Zarelli VEP, Pappano NB, Debattista NB. Bacteriostatic action of synthetic polyhydroxylated chalcones against *Escherichia coli*. *Biocell* 2004; 28: 31-4.
- Ansari FL, Umbreen S, Hussain L, Makhmoor T, Nawaz SA, Lodhi MA et al. Syntheses and biological activities of chalcone and 1,5-benzothiazepine derivatives: promising new free-radical scavengers, and esterase, urease, and α -glucosidase inhibitors. *Chem Biodivers* 2005; 2: 487-96.
- Anwar S, Prince LR, Foster SJ, Whyte MK, Sabroe I. The rise and rise of *Staphylococcus aureus*: laughing in the face of granulocytes. *Clin Exp Immunol* 2009; 157: 216-24.
- Archer G L, Niemeyer DM, Thanassi JA, Pucci MJ. Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 447-54.
- Archer G L, Niemeyer DM. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends Microbiol* 1994; 2: 343-7.
- Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton W, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms. Properties, regulation and roles in human disease. *Virulence* 2011; 2(5): 445-59.
- Aricola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2151-6.
- Aricola CR, Campoccia D, Gamberini S, Cervellati M, Donati E, Montanaro L. Detection of slime production by means of an optimized Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. *Biomaterials* 2002; 23: 4233-9.
- Avila HP, Smania EdeFA, Monache FD, Smania Junior A. Structure-activity relationship of antibacterial chalcones. *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 9790-4.

- Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* 2002; 359: 1819-27.
- Bannerman TL. *Staphylococci, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. U: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JM et al. (urednici). *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Washington: American Society for Microbiology Press; 2003. 384-404.
- Barber M, Rozwadowska-Dowzenko M. Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet* 1948; ii: 641-4.
- Barg N, Chambers H, Kernodle D. Borderline susceptibility to antistaphylococcal penicillins is not conferred exclusively by the hyperproduction of beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1975-9.
- Batovska D I, Todorova Todorova I. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. *Curr Clin Pharmacol*, 2010; 5(1): 1-29.
- Batovska D, Parushev S, Stamboliyska B, Tsvetkova I, Ninova M, Najdenski H. Examination of growth inhibitory properties of synthetic chalcones for which antibacterial activity was predicted. *Eur J Med Chem* 2009; 44: 2211-8.
- Beck WD, Berger-Bachi B, Kayser FH. Additional DNA in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and molecular cloning of *mec*-specific DNA. *J Bacteriol* 1986; 165: 373-8.
- Beenken KE, Blevins JS, Smeltzer MS. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. *Infect Immun* 2003; 71: 4206-11.
- Beenken KE, Mrak LN, Griffin LM, Zielinska AK, Shaw LN, Rice KC et al. Epistatic relationships between *sarA* and *agr* in *Staphylococcus aureus* biofilm formation. 2010; *PLoS ONE* 5(5): e10790. doi: 10.1371/journal.pone.0010790
- Belley A, McKay GA, Arhin FF, Sarmiento I, Beaulieu S, Fadhil I et al. Oritavancin disrupts membrane integrity of *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant Enterococci to effect rapid bacterial killing. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(12): 5369-71.
- Berger-Bachi B, Rohrer S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol* 2002; 178: 165-71.
- Berger-Bachi B. Expression of resistance to methicillin. *Trends Microbiol* 1994; 2: 389-93.
- Bernal P, Lamaire S, Pinho MG, Mobashery S, Hinds J, Taylor PW. Insertion of epicatechin gallate into the cytoplasmic membrane of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disrupts penicillin-binding protein (PBP) 2a-mediated β -lactam resistance by delocalizing PBP2. *J Biol Chem* 2010; 285: 24055-65.

- Bernal P, Zloh M, Taylor PW. Disruption of D-alanyl esterification of *Staphylococcus aureus* cell wall teichoic acid by the β -lactam resistance modifier (-)-epicatechin gallate. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 1156-62.
- Bernard FX, Sable S, Cameron B, Provost J, Desnottes JF, Crouzet J et al. Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 992-8.
- Bernardo K, Pakulat N, Fleer S, Schnaith A, Utermohlen O, Krut O et al. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 546-55.
- Bhakdi S, Trantum-Jensen J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev* 1991; 55: 733-51.
- Bignardi GE, Woodford N, Chapman A, Johnson AP, Speller DC. Detection of the *mecA* gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin resistance. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37: 53-63.
- Blake JE, Metcalfe MA. A shared noncapsular antigen is responsible for false-positive reactions by *Staphylococcus epidermidis* in commercial agglutination tests for *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 544-50.
- Bohach G A, Jablonski L, Roggiani M, Sadler I, Schlievert PM, Mitchell D et al. Biological activity of pyrogenic toxins delivered at the mucosal surface. U: J Arbutnott and B Furman (urednici), European Conference on Toxic Shock Syndrome. International Congress and Symposium Series 229. New York: Royal Society of Medicine Press Ltd.; 1998. 170-2.
- Boles BR, Horswill AR. *agr*-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog* 2008; 4: e1000052.
- Boumendjel A, Ronot X, Boutonnat J. Chalcones derivatives acting as cell cycle blockers: potential anti cancer drugs? *Curr Drug Targets* 2009; 10(4): 363-71.
- Bowman MD, O'Neill JC, Stringer JR, Blackwell HE. Rapid identification of antibacterial agents effective against *Staphylococcus aureus* using small-molecule microarrays. *Chem Biol* 2007; 14: 351-7.
- Boyle-Vavra S, Ereshefsky B, Wang CC, Daum RS. Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel Staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) type *V_T* or SCC*mec* type IV. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4719-30.
- Brady RA, Leid JG, Kofonow J, Costerton JW, Shirtliff ME. Immunoglobulins to surface-associated biofilm immunogens provide a novel means of visualization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 6612-9.

- Brakstad OG, Aabakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *J Clin Microbiol*, 1992; 30: 1654-60.
- Brown DFJ, Reynolds PE. Intrinsic resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett* 1980; 122: 275-8.
- Brumfitt W, Hamilton-Miller J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 1989; 320: 1188-96.
- Bubeck Wardenburg J, Bae T, Otto M, DeLeo FR, Schneewind O. Poring over pores: alpha-hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nat Med* 2007; 13: 1405-6.
- Burlak C, Hammer CH, Robinson MA, Whitney AR, McGavin MJ, Kreiswirth BN et al. Global analysis of community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exoproteins reveals molecules produced *in vitro* and during infection. *Cell Microbiol* 2007; 9: 1172-90.
- Byrne ME, Gillespie MT, Skurray RA. 4'-4''-Adenylyltransferase activity on conjugative plasmids isolated from *Staphylococcus aureus* is encoded on an integrated copy of pUB110. *Plasmid* 1991; 24: 70-5.
- Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Demelio V, Spina D, Nicoletti G et al. *agr*-genotyping and transcriptional analysis of biofilm-producing *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 51: 220-7.
- Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Van Landuyt H. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 microg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 389-92.
- Cegelski L, Marshall GR, Eldridge GR, Hultgren SJ. The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6: 17-27.
- Chai Y, Beauregard PB, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. Galactose metabolism plays a crucial role in biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *MBio* 2012; 3(4):e00184-12. doi: 10.1128/mBio.00184-12
- Chambers FH. Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(4): 781-91.
- Chambers HF. Coagulase-negative staphylococci resistant to β -lactam antibiotics *in vivo* produced penicillin-binding protein 2a. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 919-24.
- Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med* 2003; 348: 1342-7.

- Cheung GY, Rigby K, Wang R, Queck SY, Braughton KR, Whitney AR et al. *Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils. PLoS Pathog 2010; 6: e1001133.
- Chinnam N, Dadi PK, Sabri SA, Ahmad M, Kabir MA, Ahmad Z. Dietary bioflavonoids inhibit *Escherichia coli* ATP synthase in a differential manner. Int J Biol Macromol 2010; 46: 478-86.
- Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C et al. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCC*mec* elements. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 1001-12.
- Chopra I. Glycylcyclines: third generation tetracycline antibiotics. Curr Opin Pharmacol 2001; 1: 464-9.
- Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect Immun, 1982; 37(1): 318-26.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 17th Informational Supplement. Approved Standard. CLSI document M100-S17. Wayne, PA, USA.
- Colin DA, Monteil H. Control of the oxidative burst of human neutrophils by staphylococcal leukotoxins. Infect Immun 2003; 71: 3724-9.
- Collins LV, Kristian SA, Weidenmaier C, Faigle M, Van Kessel KP, Van Strijp JA et al. *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. J Infect Dis 2002; 186: 214-9.
- Cookson B. *Staphylococcus aureus*. U: Emmerson M, Kibbler C, Hawkey P (urednici). Principles of Clinical Bacteriology. Oxford: John Wiley; 1997. 109-30.
- Corkill JE, Anson JI, Griffiths P, Anthony Hart C. Detection of elements of the staphylococcal cassette chromosome (SCC) in methicillin-susceptible (*mecA* gene negative) homologue of fucidin-resistant MRSA. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 229-31.
- Costerton JW, Montanaro L, Aricola BR. Biofilm in implant infections: its production and regulation. Int J Artif Organs 2003; 28: 1062-8.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. Annu Rev Microbiol 1995; 49: 711-45.
- Couppie P, Cribier B, Prevost G. Leukocidin from *Staphylococcus aureus* and cutaneous infections: an epidemiologic study. Arch Dermatol 1994; 130: 1208-9.

- Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Gotz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* 1999; 67: 5427-33.
- Cramton SE, Ulrich M, Gotz F, Doring G. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 2001; 69: 4079-85.
- Cree RGA, Phillips I, Noble WC. Adherence characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from patients with infective endocarditis. *J Med Microbiol* 1995; 43: 161-8.
- Cribier B, Prevost G, Couppie P, Finck-Barbancon V, Grosshans E, Piemont Y. *Staphylococcus aureus* leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study. *Dermatology* 1992; 185: 175-80.
- Cue D, Lei MG, Luong TT, Kuechenmeister L, Dunman PM, O'Donnell S et al. Rbf promotes biofilm formation by *Staphylococcus aureus* via repression of *icaR*, a negative regulator of *icaADBC*. *J Bacteriol* 2009; 191: 6363-73.
- Cuevas O, Cercenado E, Goyanes MG, A. Vindel, P. Trincado, T. Boquete et al. *Staphylococcus spp.* in Spain: present situation and evolution of antimicrobial resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26: 269-77.
- Cui L, Tominaga E, Neoh HM, Hiramatsu K. Correlation between reduced daptomycin susceptibility and vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1079-82.
- Cushnie TP, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38: 99-107.
- Ćirković I (2009). Genotipska i fenotipska karakterizacija sojeva meticilin-rezistentnog *Staphylococcus aureus* izolovanih u Republici Srbiji. Doktorska disertacija. Beograd: Univerzitet u Beogradu-Medicinski fakultet.
- Derbise A, Dyke KG, El Solh N. Characterization of a *Staphylococcus aureus* transposon Tn5405 located within Tn5404 and carrying the aminoglycoside resistance genes, *aphA-3* and *aadE*. *Plasmid* 1996; 35: 174-88.
- Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 222-35.
- Deurenberg RH, Vink C, Oudhuis GJ, Mooij JE, Driessen C, Coppens G et al. Different clonal complexes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are disseminated in the Euregio Meuse-Rhine Region. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(10): 4263-71.

- Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 2006; 367: 731-9.
- Diep BA, Stone GG, Basuino L, Graber CJ, Miller A, des Etages SA et al. The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette *mec* linkage: convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis 2008; 197: 1523-30.
- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 2000; 13(1): 16-34.
- Dobinsky S, Kiel K, Rohde H, Bartscht K, Knobloch JK, Horstkotte MA et al. Glucose-related dissociation between *icaADBC* transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. J Bacteriol 2003; 185: 2879-86.
- Doery HM, Magnuson BJ, Cheyne IM, Galasekharam J. A phospholipase in staphylococcal toxin which hydrolyzes sphingomyelin. Nature (London) 1963; 198: 1091-3.
- Doery HM, Magnuson BJ, Galasekharam J, Pearson JE. The properties of phospholipase enzymes in staphylococcal toxins. J Gen Microbiol 1965; 40: 283-96.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 167-93.
- Drlica K, Zhao XL. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. Microbiol Rev 1997; 61: 377-92.
- Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentin leukocidin. Clin Infect Dis 2002; 35: 819-24.
- Dumont AL, Nygaard TK, Watkins R L, Smith A, Kozhaya L, Kreiswirth BN et al. Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. Mol Microbiol 2011; 79: 814-25.
- Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S et al. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *SarA* loci. J Bacteriol 2001; 183: 7341-53.
- Durupt F, Mayor L, Bes M, Reverdy ME, Vandenesch F, Thomas L et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* toxins and nasal carriage in furuncles and impetigo. Br J Dermatol 2007; 157: 1161-7.
- Edwards-Jones V, Foster HA. Effects of silver sulphadiazine on the production of exoproteins by *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol 2002; 51: 50-5.

- Ellington MJ, Hope R, Ganner M, Ganner M, East C, Brick G et al. Is Panton-Valentine leucocidin associated with the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in the UK? *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 402-5.
- Ender M, McCallum N, Adhikari R, Berger-Bachi B. Fitness cost of SCCmec and methicillin resistance levels in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2295-7.
- Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1008-15.
- Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 7687-92.
- Escaich S. Antivirulence as a new antibacterial approach for chemotherapy. *Curr Opin Chem Biol* 2008; 12: 400-8.
- Eumkeb G, Sakdarat S, Siritwong S. Reversing β -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. *Phytomedicine* 2010; 18: 40-5.
- European Medicines Agency (EMA). Cubicin. European Public Assessment Report. 2006.
- Everett MJ, Piddock LJV. Mechanisms of resistance to fluoroquinolones. U: J. Kuhlmann, A. Dahloff, and H. J. Zeiler (urednici), Quinolone antibacterials. Berlin, Germany: Springer-Verlag KG; 1998. 259-97.
- Falcone M, Serra P, Venditti M. Serious infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving challenge for physicians. *Eur J Intern Med* 2009; 20: 343-7.
- Farooq M, Freischlag J, Kelly H, Seabrook G, Cambria R, Towne J. Gelatin-sealed polyester resist *Staphylococcus epidermidis* biofilm infection. *J Surg Res* 1999; 87: 57-61.
- Farrell DJ. The reliability of Microscan conventional and rapid panels to identify *Staphylococcus aureus* and detect methicillin resistance: an evaluation using the tube coagulase test and *mecA* PCR. *Pathology* 1997; 29: 406-10.
- Finck-Barbancon V, Prevost G, Piemont Y. Improved purification of leukocidin from *Staphylococcus aureus* and toxin distribution among hospital strains. *Res Microbiol* 1991; 142: 75-85.
- Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. The genetics of staphylococcal biofilm formation-will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 967-73.

- Fluit AC, Visser MR, Schmitz F-J. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4): 836-71.
- Foreman A, Wormald PJ. Different biofilms, different disease? A clinical outcomes study. *Laryngoscope* 2010; 120: 1701-6.
- Foster TJ, Hook M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 1998; 6: 484-8.
- Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 948-58.
- Fournier B, Hooper DC. A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2000; 182: 3955-64.
- Fournier B, Klier A, Rapoport G. The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 2001; 41: 247-61.
- Fowler SA, Stacy DM, Blackwell HE. Design and synthesis of macrocyclic peptomers as mimics of a quorum sensing signal from *Staphylococcus aureus*. *Org Lett* 2008; 10(12): 2329-32.
- Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989; 42: 872-4.
- Freer JH, Birbeck TH. Possible conformation of delta-lysin, a membrane-damaging peptide of *Staphylococcus aureus*. *J Theor Biol* 1982; 94: 535-40.
- Frenay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 60-4.
- Fujita M, Shiota S, Kuroda T, Hatano T, Yoshida T, Mizushima T et al. Remarkable synergies between baicalein and tetracycline, and baicalein and β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* 2005; 49: 391-6.
- Fukai T, Marumo A, Kaitou K, Kanda T, Terada S, Nomura T. Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia* 2002; 73: 536-9.
- Gad GF, El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella H, El-Baky RM. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *J Infect Dev Ctries* 2009; 3: 342-51.
- Garau J, Bouza E, Chastre J, Gudiol F, Harbarth S. Management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 125-36.

- Garnier F, Chainier D, Walsh T, Karlsson A, Bolmstrom A, Grelaud C et al. A 1 year surveillance study of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* strains in a French hospital. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 146-9.
- Gatter N, Kohnen W, Jansen B. *In vitro* efficacy of a hydrophilic central venous catheter loaded with silver to prevent microbial colonization. *Zentralbl Bakteriol* 1998; 287: 157-69.
- Gillespie MT, Lyon BR, Loo LS, Matthews PR, Stewart PR, Skurray RA. Homologous direct repeat sequences associated with mercury, methicillin, tetracycline, and trimethoprim resistance determinants in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1987; 43: 165-71.
- Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantone-Valentine leukocidin and highly lethal necrotizing pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 2002; 359: 753-9.
- Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4060-7.
- Giraud AT, Mansilla C, Chan A, Raspanti C, Nagel R. Studies on the expression of regulatory locus *sae* in *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol* 2003; 46: 246-50.
- Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE et al. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. *J Infect Dis* 2008; 197: 1226-34.
- Götz F. Staphylococci in colonization and disease: prospective targets for drugs and vaccines. *Curr Opin Microbiol*, 2004; 7: 477-87.
- Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 2002; 43(6): 1367-78.
- Gouaux E. Alpha-hemolysin from *Staphylococcus aureus*: An archetype of beta-barrel, Channel-forming toxins. *J Struct Biol* 1998; 121: 110-22.
- Gradisar H, Pristovsek P, Plaper A, Jerala R. Green tea catechins inhibit bacterial DNA gyrase by interaction with its ATP binding site. *J Med Chem* 2007; 50: 264-71.
- Grisold AJ, Leitner E, Muhlbauer G, Marth E, Kessler HH. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2392-7.
- Hackbarth CJ, Chambers HF. *blaI* and *blaR1* regulate β -lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1144-9.

- Hamad AR, Marrack P, Kappler JW. Transcytosis of staphylococcal superantigen toxins. *J Exp Med* 1997; 185: 1447-54.
- Hanakawa Y, Schechter NM, Lin C, Garza L, Li H, Yamaguchi T et al. Molecular mechanisms of blister formation in bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. *J Clin Invest* 2002; 110: 53-60.
- Haraguchi H, Tanimoto K, Tamura Y, Mizutani K, Kinoshita T. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry* 1998; 48: 125-9.
- Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothganger J, Turnwald D, Vogel U. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5442-8.
- Hartman DJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1984; 158: 513-6.
- Hatano T, Shintani Y, Aga Y, Shiota S, Tsuchiya T, Yoshida T. Phenolic constituents of Licorice. VIII. Structures of glicophenone and glicoisoflavanone, and effects of licorice phenolics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Chem Pharm Bull* 2000; 48: 1286-92.
- Hayes MV, Curtiss NAC, Wyke AW, Ward JB. Decreased affinity of a penicillin-binding protein for beta-lactam antibiotics in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin. *FEMS Microbiol Lett* 1981; 10: 119-22.
- Heilmann C, Hussain M, Peters G, Gotz F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* 1997; 24: 1013-24.
- Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Gotz F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* 1996; 20: 1083-91.
- Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontol* 2000 2010; 53: 167-81.
- Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* 2008; 15: 639-52.
- Herbert S, Barry P, Novick RP. Subinhibitory clindamycin differentially inhibits transcription of exoprotein genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2001; 69: 2996-3003.
- Herrmann DJ, Peppard WJ, Ledebor NA, Theesfeld ML, Weigelt JA, Buechel BJ. Linezolid for the treatment of drug-resistant infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008; 6(6): 825-48.

Herrmann M, Vaudaux PE, Pittet D, Auckenthaler R, Lew PD, Schumacher-Perdereau F et al. Fibronectin, fibrinogen and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J Infect Dis* 1988; 158: 693-701.

Higgins DL, Chang R, Debatov DV, Leung J, Wu T, Krause KM et al. Telavancin, a multifunctional lipoglycopeptide, disrupts both cell wall synthesis and cell membrane integrity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49 (3): 1127-34.

Hildebrand A, Roth M, Bhakdi S. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: dual mechanisms of binding to target cells. *J Biol Chem* 1991; 266: 17195-200.

Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997; 350: 1670-3.

Hiramatsu K, Konodo N, Ito T. Genetic basis for molecular epidemiology of MRSA. *J Infect Chemother* 1996; 2: 117-29.

Hiramatsu, K. Molecular evolution of MRSA. *Microbiol Immunol* 1995; 39: 531-43.

Ho CM, Hsueh PR, Liu CY, Lee SY, Chiueh TS, Shyr JM et al. Prevalence and accessory gene regulator (*agr*) analysis of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* among methicillin-resistant isolates in Taiwan-SMART program, 2003. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 4: 383-9.

Hoban DJ, Biedenbach DJ, Mutnick AH, Jones RN. Pathogen of occurrence and susceptibility patterns associated with pneumonia in hospitalized patients in North America: results of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Study (2000). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45: 279-85.

Holler JG, Slotved H-C, Molgaard P, Olsen CE, Christensen SB. Chalcone inhibitors of the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus* whole cells and enriched everted membrane vesicles. *Bioorg Med Chem* 2012; 20: 4514-21.

Holmes A, Ganner M, McGuane S, Pitt TL, Cookson BD, Kearns AM. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2384-90.

Hooper DC. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases and anti-topoisomerase resistance. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 54-63.

Hooper DC. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updates* 1999; 2: 38-55.

Houston P, Rowe SE, Pozzi C, Waters EM, O'Gara JP. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infect Immun* 2011; 79: 1153-65.

Hu ZQ, Zhao WH, Asano N, Yoda Y, Hara Y, Shimamura T. Epigallocatechin gallate synergistically enhances the activity of carbapenems against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(2): 558-60.

Hugo WB, Denyer SP, Hodges NA, Gorman SP. Hugo and Russell's pharmaceutical microbiology. 7th ed, Oxford, United Kingdom: Wiley-Blackwell; 2004. 212p.

Huntzinger E, Boisset S, Saveanu C, Benito Y, Geissmann T, Namane A et al. *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate *spa* gene expression. *EMBO J* 2005; 24: 824-35.

Hurlimann-Dalel RL, Ryffel C, Kayser FH, Berger-Bachi B. Survey of the methicillin resistance-associated genes *mecA*, *mecRI-mecI*, and *femA-femB* in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 2617-21.

Hussain M, Wilcox MH, White PJ. The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol Rev* 1993; 10: 191-207.

Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1147: 132-6.

Ikonomidis A, Vasdeki A, Kristo I, Maniatis AN, Tsakris A, Malizos KN et al. Association of biofilm formation and methicillin-resistance with accessory gene regulator (*agr*) loci in Greek *Staphylococcus aureus* clones. *Microbial Pathogenesis* 2009; 47: 341-4.

Illingworth B, Bianco RW, Weisberg S. *In vivo* efficacy of silver-coated fabric against *Staphylococcus epidermidis*. *J Heart Valve Dis* 2000; 135-41.

International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC) Elements (IWG-SCC) [<http://www.sccmec.org/>]. Currently identified SCC*mec* types in *S.aureus* strains. [cited 2014 Feb 15]. Available from: http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html

Iorio NLP, Lopes APCN, Schuenck RP, Barcellos AG, Olendzki AN, Lopez GL et al. A combination of methods to evaluate biofilm production may help to determine the clinical relevance of *Staphylococcus* in blood cultures. *Microbiol Immunol* 2011; 55: 28-33.

Isomoto H, Furusu H, Ohnita K, Wen CY, Inoue K, Kohno S. Sofalcone, a mucoprotective agent, increases the cure rate of *Helicobacter pylori* infection when combined with rabeprazole, amoxicillin and clarithromycin. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1629-33.

Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1449-58.

- Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2637-51.
- Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Update* 2003; 6: 41-52.
- Jarraud S, Lyon GJ, Figueiredo AM, Lina G, Vandenesch F, Etienne J et al. Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2000; 182: 6517-22.
- Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect Immun* 2002; 70: 631-41.
- Jefferson KK, Cramton SE, Gotz F, Pier GB. Identification of a 5-nucleotide sequence that controls expression of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus* and characterization of the DNA-binding properties of IcaR. *Mol Microbiol* 2003; 48: 889-99.
- Jefferson KK, Pier DB, Goldmann DA, Pier GB. The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2004; 186: 2449-56.
- Jett M, Brinkley W, Neill R, Gemski P, Hunt R. *Staphylococcus aureus* enterotoxin B challenge of monkeys: correlation of plasma levels of arachidonic acid cascade products with occurrence of illness. *Infect Immun* 1990; 58: 3494-9.
- Jevons MP, Rolinson GN, Knox R. Celbenin-resistant staphylococci. *British Med J* 1961; 1: 124-5.
- Johannes KM, Knobloch MA, Horstkotte HR, Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* 2003; 191: 101-6.
- Jureen R, Bottolfson KL, Grewal H, Digranes A. Comparative evaluation of a commercial test for rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *APMIS* 2001; 109: 787-90.
- Kaatz GW, Seo SM, Ruble CA. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(5): 1086-94.
- Kampf G, Weist K, Swidinsky S, Kegel M, Ruden H. Comparison of screening methods to identify methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 301-7.
- Kaneko J, Kimura T, Narita S, Tomita T, Kamio Y. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage phiPVL carrying Pantone-Valentine leukocidin genes. *Gene* 1998; 215: 57-67.

- Kang SS, Kim JG, Lee TH, Oh KB. Flavonols inhibit sortases and sortase-mediated *Staphylococcus aureus* clumping to fibrinogen. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 1751-5.
- Kassem II, Esseili MA, Sigler V. Occurrence of *mecA* in nonstaphylococcal pathogens in surface waters. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3868-9.
- Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcal cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1549-55.
- Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1955-63.
- Kearns AM, Seiders PR, Wheeler J, Freeman R, Steward M. Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci by multiplex PCR. *J Hosp Infect* 1999; 43: 33-7.
- Kim BH, Gadd GM. *Bacterial Physiology and Metabolism*. 3rd ed, Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 2011.
- Kinoshita M, Kobayashi N, Nagashima S, Ishino M, Otokozawa S, Mise K et al. Diversity of staphylocoagulase and identification of novel variants of staphylocoagulase gene in *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* 2008; 52: 334-48.
- Kirby WMM. Extraction of highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science* 1944; 99: 452-3.
- Knobloch JK, Bartscht K, Sabottke A, Rohde H, Feucht HH, Mack D. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J Bacteriol* 2001; 183: 2624-33.
- Knobloch JK, Horstkotte MA, Rohde H, Kaulfers PM, Mack D. Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 683-7.
- Kockro RA, Hampl JA, Jansen B, Peters G, Scheihing M, Giacomelli R et al. Use of scanning electron microscopy to investigate the prophylactic efficacy of rifampin-impregnated CSF shunt catheters. *J Med Microbiol* 2000; 49: 441-50.
- Kohnen W, Schaper J, Klein O, Tieke B, Jansen B. A silicone ventricular catheter coated with a combination of rifampin and trimethoprim for the prevention of catheter-related infections. *Zentralbl Bakteriol* 1998; 287: 147-56.
- Kollef MH. New antimicrobial agents for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Crit Care Resusc* 2009; 11(4): 282-6.
- Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K. Combination multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type

assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr* and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 264-74.

Koneman EW, Winn W, Jr, Allen S, Janda W, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Gram - positive cocci. Deo I: *Staphylococci and related Gram - positive cocci*. U: Koneman's Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed, Philadelphia, New York: Lippincot; 2006. 623-71.

Kong KF, Vuong C, Otto M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol* 2006; 296: 133-9.

Konig B, Prevost G, Piemont Y, Konig W. Effects of *Staphylococcus aureus* leukocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes. *J Infect Dis* 1995; 171: 607-13.

Kontogiorgis C, Mantzanidou M, Hadjipavlou-Litina D. Chalcones and their potential role in inflammation. *Mini Rev Med Chem*, 2008; 8(12): 1224-42.

Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. *spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 792-9.

Koszczol C, Bernardo K, Kronke M, Krut O. Subinhibitory quinupristin/dalfopristin attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 564-74.

Kreiswirth B, Kornblum J, Arbeit RD, Eisner W, Maslow JN, McGeer A et al. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* 1993; 259: 227-30.

Kromann H, Larsen M, Boesen T, Schønning K, Nielsen SF. Synthesis of prenylated benzaldehydes and their use in the synthesis of analogues of licochalcone A. *Eur J Med Chem* 2004; 39: 993-1000.

Krut O, Sommer H, Kronke M. Antibiotic-induced persistence of cytotoxic *Staphylococcus aureus* in non-phagocytic cells. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 167-73.

Kullik I, Giachino P. The alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus*: regulation of the sigB operon in response to growth phase and heat shock. *Arch Microbiol* 1997; 167: 151-9.

Kuroda H, Kuroda M, Cui L, Hiramatsu K. Subinhibitory concentrations of beta-lactam induce haemolytic activity in *Staphylococcus aureus* through the SaeRS two-component system. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 268: 98-105.

Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba H, Yuzawa I, Kobayashi L et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2001; 357: 1225-40.

- Kusuda M, Inada K, Ogawa TO, Yoshida T, Shiota S, Tsuchiya T et al. Polyphenolic constituent structures of *Zanthoxylum piperitum* fruit and the antibacterial effects of its polymeric procyanidin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; 70: 1423-31.
- Kuusela P, Hilden P, Savolainen K, Vuento M, Lyytikäinen O, Vuopio-Varkila J. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains not identified by slide agglutination tests. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 143-47.
- Kuwahara-Arai K, Kondo K, Hori S, Tateda-Suzuki E, Hiramatsu K. Suppression of methicillin resistance in a *mecA*-containing premethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is caused by the *mecI*-mediated repression of PBP2' production. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2680-5.
- Landini P, Antoniani D, Burgess JG, Nijland R. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 86: 813-23.
- Lasa I, Penades JR. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* 2006; 157: 99-107.
- Lauderdale KJ, Boles BR, Cheung AL, Horswill AR. Interconnections between Sigma B, *agr*, and proteolytic activity in *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *Infect Immun* 2009; 77: 1623-35.
- Lechner D, Gibbons S, Bucar F. Plant phenolic compounds as ethidium bromide efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 345-8.
- Leclercq R, Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35(7): 1267-72.
- Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 482-92.
- Lee G-S, Kim E-S, Cho S-I, Kim J-H, Choi G, Ju Y-S et al. Antibacterial and synergistic activity of prenylated chalcone isolated from the roots of *Sophora flavescens*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2010; 53(3): 290-96.
- Lee J-H, Kim Y-G, Kim C-J, Lee J-C, Cho MH, Lee J. Indole-3-acetaldehyde from *Rhodococcus sp.* BFI 332 inhibits *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; DOI: 10.1007/s00253-012-3881-y
- Lee SM, Ender M, Adhikari R, Smith JM, Berger-Bachi B, Cook GM. Fitness cost of staphylococcal cassette chromosome *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by way of continuous culture. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1497-9.

- Leid JG, Costerton JW, Shirtliff ME, Gilmore MS, Engelbert M. Immunology of Staphylococcal biofilm infections in the eye: new tools to study biofilm endophthalmitis. *DNA Cell Biol* 2002; 21: 405-13.
- Levine DP, Fromm BS, Reddy BR. Slow response to vancomycin or vancomycin plus rifampin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Ann Intern Med* 1991; 115: 674-80.
- Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet* 2004; 364: 369-79.
- Lewis JS, Jorgensen JH. Inducible clindamycin resistance in staphylococci: should clinicians and microbiologists be concerned? *Clin Infect Dis* 2005; 40: 280-5.
- Lewis K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)* 2005; 70: 267-74.
- Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol* 2010; 64: 357-72.
- Li BH, Zhang R, Du YT, Sun YH, Tian WX. Inactivation mechanism of the β -ketoacyl-[acyl carrier protein] reductase of bacterial type-II fatty acid synthase by epigallocatechin gallate. *Biochem Cell Biol* 2006; 84: 755-62.
- Li M, Cha DJ, Lai Y, Villaruz AE, Sturdevant DE, Otto M. The antimicrobial peptide-sensing system *aps* of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 2007; 66: 1136-47.
- Ligozzi M, Bernini C, Bonora MG, De Fatima M, Zuliani J, Fontana R. Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant Gram-positive cocci. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1681-6.
- Lim Y, Jana M, Luong TT, Lee CY. Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2004; 186: 722-9.
- Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 1128-32.
- Lindsay JA, Ruzin A, Ross HF, Kurepina N, Novick RP. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 1998; 29: 527-43.
- Liu MH, Otsuka N, Noyori K, Shiota S, Ogawa W, Kuroda T et al. Synergistic effect of kaempferol glycosides purified from *Laurus nobilis* and fluoroquinolones on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull* 2009; 32: 489-92.
- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 1998; 339: 520-32.
- Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB. Revised road map to the phylum *Firmicutes*. U: Vos PD, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB, (urednici). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Ed. Vol. 3. Springer; New York: 2009.

- Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H et al. The intercellular adhesion involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* 1996; 178: 175-83.
- Mahady GB. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 2405-27.
- Maltezou HC, Giamarellou H. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 87-96.
- Manago K, Nishi J, Wakimoto N, Miyanochara H, Sarantuya J, Tokuda K et al. Biofilm formation by and accessory gene regulator typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains recovered from patients with nosocomial infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27: 188-90.
- Mann EE, Rice KC, Boles BR, Endres JL, Ranjit D, Chandramohan L et al. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS ONE* 2009; 4: 5822; PMID:19513119; DOI:10.1371/journal.pone.0005822
- Manner S, Skogman M, Goeres D, Vuorela P, Fallarero A. Systematic exploration of natural and synthetic flavonoids for the inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 19434-51.
- Mariana NS, Salman SA, Neela V, Zamberi S. Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *Afr J Microbiol Res* 2009; 3(6): 330-8.
- Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 1990; 248: 705-11.
- Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smeltzer MS. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3332-8.
- Matsumura M, Karakura T, Imanaka T, Aiba S. Enzymatic and nucleotide sequence studies of a kanamycin inactivating enzyme encoded by a plasmid from thermophilic bacilli in comparison with that encoded by plasmid pUB110. *J Bacteriol* 1984; 160: 413-20.
- Melles DC, van Leeuwen WB, Boelens HA, Peeters JK, Verbrugh HA, van Belkum A. Panton-Valentine leukocidin genes in *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1174-5.
- Menestrina G. Ionic channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: voltage-dependent inhibition by divalent and trivalent cations. *J Membr Biol* 1986; 90: 177-90.
- Menzies BE, Kernodle DS. Site-directed mutagenesis of the alpha-toxin gene of *Staphylococcus aureus*: role of histidines in toxin activity *in vitro* and in a murine model. *Infect Immun* 1994; 62: 1843-7.

- Menzies RE. Comparison of coagulase, deoxyribonuclease (DNase), and heat-stable nuclease tests for identification of *Staphylococcus aureus*. J Clin Pathol 1977; 30(7): 606-8.
- Merino N, Toledo-Arana A, Vergara-Irigaray M, Valle J, Solano C, Calvo E et al. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 2009; 191: 832-43.
- Minuth JN, Holmes TM, Musher DM. Activity of tetracycline, doxycycline, and minocycline against methicillin-susceptible and -resistant staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1974; 6: 411-4.
- Miragaia M, Couto I, de Lancastre H. Genetic diversity among methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). Microb Drug Resist 2005; 11: 83-93.
- Moise-Broder PA, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Schentag JJ, Forrest A, Moellering Jr RC. Accessory gene regulator group II polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. Clin Infect Dis 2004; 38: 1700-5.
- Mojzis J, Varinska L, Mojzisova G, Kostova I, Mirossay L. Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. Pharmacol Res, 2008; 57(4): 259-65.
- Mongkolrattanothai K, Boyle S, Murphy TV, Daum RS. Novel non-*mecA*-containing staphylococcal cassette composite island containing *pbp4* and *tagF* genes in a commensal staphylococcal species: a possible reservoir for antibiotic resistance islands in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1823-36.
- Montgomery CP, Boyle-Vavra S, Adem PV, Lee JC, Husain AN, Clasen J et al. Comparison of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pulsotypes USA300 and USA400 in a rat model of pneumonia. J Infect Dis 2008; 198: 561-70.
- Moreira Osorio T, Monache FD, Chiaradia LD, Mascarello A, Stumpf TR, Zanetti CR et al. Antibacterial activity of chalcones, hydrazones and oxadiazoles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Bioorg Med Chem Lett 2012; 22: 225-30.
- Morfeldt E, Taylor D, von Gabain A, Arvidson S. Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. EMBO J 1995; 14: 4569-77.
- Mori A, Nishino C, Enoki N, Tawata S. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. Phytochemistry 1987; 26: 2231-4.
- Morinaga N, Kaihou Y, Noda M. Purification, cloning and characterization of variant Luke-LukD with strong leukocidal activity of staphylococcal bi-component leukotoxin family. Microbiol Immunol 2003; 47: 81-90.

- Morse ML, Hill KL, Egan JB, Hengstenberg W. Metabolism of lactose by *Staphylococcus aureus* and its genetic basis. *J Bacteriol* 1968; 95(6): 2270-4.
- Mougeot C, Guillaumat-Tailliet J, Libert JM. *Staphylococcus aureus*: new detection of intrinsic resistance using the diffusion method. *Pathol Biol (Paris)* 2001; 49: 199-204.
- Mulazimoglu L, Drenning SD, Muder RR. Vancomycin-gentamicin synergism revisited: effect of gentamicin susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1534-5.
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen HJ, Tenover FC, Tenover MC. *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. Washington DC, USA: ASM Press; 2003.
- Murugan K, Usha M, Malathi P, Al-Sohaibani AS, Chandrasekaran M. Biofilm forming multi drug resistant *Staphylococcus spp.* among patients with conjunctivitis. *Pol J Microbiol* 2010; 59: 233-9.
- Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Archer G, Archer G, Archer G et al. Comparison of community- and health care associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA* 2003; 290: 2976-84.
- Nair SP, Bischoff M, Senn MM, Berger-Bachi B. The sigmaB regulon influences internalization of *Staphylococcus aureus* by osteoblasts. *Infect Immun* 2003; 71: 4167-70.
- Nakatomi Y, Sugiyama J. A rapid latex agglutination assay for the detection of penicillin-binding protein 2'. *Microbiol Immunol* 1998; 42: 739-43.
- Neyfakh AA, Borsch CM, Kaatz GW. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(1): 128-9.
- Nicholas RO, Li T, McDevitt D, Marra A, Socoloski S, Demarsh PL et al. Isolation and characterization of a sigB deletion mutant of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1999; 67: 3667-9.
- Nielsen SF, Larsen M, Boesen T, Schønning K, Kromann H. Cationic chalcone antibiotics. Design, synthesis, and mechanism of action. *J Med Chem*; 2005; 48: 2667-77.
- Noto MJ, Kreiswirth BN, Monk AB, Archer GL. Gene acquisition at the insertion site for SCCmec, the genomic island conferring methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2008; 190: 1276-83.
- Novick RP, Projan SJ, Kornblum J, Ross HF, Ji G, Kreiswirth B et al. The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* 1995; 248: 446-58.
- Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* 2003; 48: 1429-49.

- Nowakowska Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *Eur J Med Chem*, 2007; 42: 125-37.
- O’Gara JP. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 270: 179-88.
- O’Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson DA et al. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1379-88.
- Ohemeng KA, Schwender CF, Fu KP, Barrett JF. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1). *Bioorg Med Chem Lett* 1993; 3: 225-30.
- Okubo T, Yabe S, Otsuka T, Takizawa Y, Takano T, Dohmae S et al. Multifocal pelvic abscesses and osteomyelitis from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a 17-year-old basketball player. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60: 313-8.
- Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2155-61.
- Orhan G, Bayram A, Zer Y, Balci I. Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 140-3.
- Otto M, Sussmuth R, Jung G, Gotz F. Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis agr* system. *FEBS Lett* 1998; 424: 89-94.
- Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 322: 207-28.
- Pamp SJ, Frees D, Engelmann S, Hecker M, Ingmer H. Spx is a global effector impacting stress tolerance and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2006; 188: 4861-70.
- Pan XS, Fisher LM. Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 471-4.
- Pankey GA. Tigecycline. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(3): 470-80.
- Panton PN, Valentine FCO. Staphylococcal toxin. *Lancet* 1932; 1: 506-8.
- Patel JB, Jevitt LA, Hageman J, McDonald LC, Tenover FC. An association between reduced susceptibility to daptomycin and reduced susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1652-3.
- Paulsen IT, Firth N, Skurray RA. Resistance to antimicrobial agents other than β -lactams, p. 175–212. U: K. B. Crossley G. L. Archer (urednici), *The staphylococci in human disease*. London, United Kingdom: Churchill Livingstone, Inc.; 1997.

- Peacock SJ, Day NPJ, Thomas MG, Berendt AR, Foster TJ. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in *fnb* genes and adhesion to human fibronectin. *J Infect*, 2000; 41: 23-31.
- Periasamy S, Joo HSJ, Duong AC, Bach THL, Tan VY, Chatterjee SS et al. How *Staphylococcus aureus* biofilm develop their characteristic structure. *PNAS* 2011; doi:10.1073/pnas.1115006109
- Peschel A, Jack RW, Otto M, Collins LV, Staubitz P, Nicholson G et al. *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J Exp Med* 2001; 193: 1067-76.
- Peschel A, Otto M, Jack RW, Kalbacher H, Jung G, Götz F. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 1999; 274: 8405-10.
- Peters BM, Jabra-Rizk MA, Scheper MA, Leid JG, Costerton JW, Shirtliff ME. Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus*-*Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 59: 493-503.
- Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal enterotoxins. *Toxins* 2010; 2: 2177-97.
- Plaper A, Golob M, Hafner I, Oblak M, Solmajer T, Jerala R. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306: 530-6.
- Ploy MC, Grelaud C, Martin C, de LumleyL, Denis F. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet* 1998; 340: 493-501.
- Pogliano J, Pogliano N, Silverman JA. Daptomycin-mediated reorganization of membrane architecture causes mislocalization of essential cell division proteins. *J Bacteriol* 2012; 194(17): 4494-504.
- Prasad GS, Earhart CA, Murray DL, Novick RP, Schlievert PM, Ohlendorf DH. Structure of toxic shock syndrome toxin-1. *Biochemistry* 1993; 32: 13761-6.
- Prevost G, Cribier B, Couppie P, Petiau P, Supersac G, Finck-Barbancon V et al. Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun* 1995; 63: 4121-9.
- Qiu J, Feng H, Lu J, Xiang H, Wang D, Dong J et al. Eugenol reduces the expression of virulence-related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 2010a; p.5846-51.

- Qiu J, Jiang Y, Xia L, Xiang H, Feng H, Pu S et al. Subinhibitory concentrations of licochalcone A decrease alpha-toxin production in both methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Lett Appl Microbiol* 2010b; 50: 223-9.
- Qiu J, Wang D, Xiang H, Feng H, Jiang Y, Xia L et al. Subinhibitory concentrations of thymol reduce enterotoxins A and B and alpha-hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates. *PLoS One* 2010c; 5(3):e 9736. doi: 10.1371/journal.pone.0009736
- Qiu J, Zhang X, Luo M, Li H, Dong J, Wang J et al. Subinhibitory concentrations of perilla oil affect the expression of secreted virulence factor genes in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2011; 6(1):e16160. doi: 10.1371/journal.pone.0016160
- Quadril SMH, Ueno Y, Imambaccus H, Almodovar E. Rapid detection of methicillin-resistant *S. aureus* by Crystal MRSA ID system. *J Clin Microbiol* 1994; 32(7): 1830-2.
- Queck SY, Jameson-Lee M, Villaruz AE, Bach TH, Khan BA, Sturdevant DE et al. RNAlII-independent target gene control by the *agr* quorum sensing system: Insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell* 2008; 32: 150-8.
- Queck SY, Khan BA, Wang R, Bach TH, Kretschmer D, Chen L et al. Mobile genetic element-encoded cytolysin connects virulence to methicillin resistance in MRSA. *PLoS Pathog* 2009; 5(7): e1000533. doi: 10.1371/ journal. ppat.1000533
- Quintiliani R, Courvalin P. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents, U: P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. R. Tenover, R. H. Tenover (urednici), *Manual of clinical microbiology*. 6th ed. Washington, D.C.: ASM Press, 1995. p. 1308-26.
- Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, Ziebuhr W. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3357-63.
- Rani SA, Pitts B, Beyenal H, Veluchamy RA, Lewandowski Z, Davison WM et al. Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J Bacteriol* 2007; 189: 4223-33.
- Redziniak DE, Diduch DR, Turman K, Hart J, Grindstaff TL, MacKnight JM et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the Athlete. *Int J Sports Med* 2009; 30: 557-62.
- Resch A, Leicht S, Saric M, Pasztor L, Jakob A, Gotz F et al. Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. *Proteomics* 2006; 6: 1867-77.
- Reynolds PE, Fuller C. Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*: presence of identical additional penicillin-binding protein in all strains examined. *FEMS Microbiol Lett* 1986; 33: 251-4.

- Rice KC, Mann EE, Endres JL, Weiss EC, Cassat JE, Smeltzer MS et al. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 8113-8.
- Robert J, Etienne J, Bertrand X. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin in a retrospective case series from 12 French hospital laboratories, 2000-2003. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 585-7.
- Roberts M C, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide streptogramin B resistance determinants. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2823-30.
- Robinson DA, Enright MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 3926-34.
- Roche FM, Meehan M, Foster TJ. The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. Microbiology 2003; 149: 2759-67.
- Rooijackers SH, Van Strijp JA. Bacterial complement evasion. Mol Immunol 2007; 44: 23-32.
- Rowe GE, Welch RA. Assays of hemolytic toxins. Methods Enzymol 1994; 235: 657-67.
- Ryffel C, Kayser FH, Berger-Bachi B. Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 25-31.
- Saenz HL, Augsburg V, Vuong C, Jack RW, Gotz F, Otto M. Inducible expression and cellular location of AgrB, a protein involved in the maturation of the staphylococcal quorum-sensing pheromone. Arch Microbiol 2000; 174: 452-5.
- Safdar N, Bradley EA. The risk of infection after nasal colonization with *Staphylococcus aureus*. Am J Med 2008; 121: 310-5.
- Sakai F, Takemoto A, Watanabe S, Aoyama K, Ohkubo T, Yanahira S et al. Multiplex PCRs for assignment of Staphylocoagulase types and subtypes of type VI Staphylocoagulase. J Microbiol Methods 2008; 75: 312-7.
- Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering Jr RC, Wennersten C, Venkataraman L, Novick RP et al. Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1492-502.
- Sato M, Tsuchiya H, Miyazaki T, Fujiwara S, Yamaguchi R, Kureshiro H, Inuma M. Antibacterial activity of hydroxychalcone against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Agents, 1996; 6: 227-31.

- Scheuber PH, Golecki JR, Kickhofen B, Scheel D, Beck G, Hammer DK. Cysteinyl leukotrienes as mediators of staphylococcal enterotoxin B in the monkey. *Eur J Clin Invest* 1987; 17: 455-9.
- Schierle CF, De la Garza M, Mustoe TA, Galiano RD. Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model. *Wound Repair Regen* 2009; 17: 354-9.
- Schmitz F-J, Fluit AC. Mechanisms of resistance, U: D.Armstrong, S. Cohen (urednici), *Infectious diseases*. London, United Kingdom: C. V. Mosby, Ltd.; 1999. 7.2.1-7.2.14.
- Schmitz F-J, Jones ME, Hofmann B, Hansen B, Scheuring S, Luckefahr M et al. Characterization of *grlA*, *grlB*, *gyrA* and *gyrB* mutations in 116 unrelated isolates of *Staphylococcus aureus* in relation to minimal inhibitory concentrations of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1249-52.
- Shah S, Stapleton PD, Taylor PW. The polyphenol (2)-epicatechin gallate disrupts the secretion of virulence-related proteins by *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol* 2008; 46: 181-5.
- Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2013; 13(1): 43-54.
- Shaw K J, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 1993; 57: 138-63.
- Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE et al. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3556-63.
- Shore A, Roosney AS, Keane Ct, Enright MC, Coleman DC. Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2070-83.
- Sieradzki K, Roberts RB, Haber SW, Tomasz A. The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection *N Engl J Med* 1999; 340: 517-23.
- Skinner S, Inglis B, Matthews PR, Stewart PR. Mercury and tetracycline resistance genes and flanking repeats associated with methicillin resistance on the chromosome of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 1988; 2: 289-97.
- Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, Robinson-Dunn B et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 1999; 340: 493-501.

- Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Influence of subinhibitory concentrations of plant essential oils on the production of enterotoxins A and B and alpha-toxin by *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol 2004; 53: 1023-7.
- Smyth RW, Kahlmeter G, Olsson Liljequist B, Hoffman B. Methods for identifying methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Hosp Infect 2001; 48: 103-7.
- Spanu T, Sanguinetti M, D'Inzeo A, Ciccaglione D, Romano L, Leone F et al. Identification of methicillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci responsible for bloodstream infections with the Phoenix system. Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 48: 221-7.
- Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Ćirković I, Ruzicka F. Quantification of biofilm microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS, 2007; 115: 891-9.
- Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Methods, 2000; 40: 175-9.
- Stephenson MF, Mfuna I, Dowd SE, Wolcott RD, Barbeau J, Poisson M et al. Molecular characterisation of polymicrobial flora in chronic rhinosinusitis. J Otolaryngol Head Neck Surg 2010; 39: 182-7.
- Stevens DL, Ma Y, Salmi DB, McIndoo E, Wallace RJ et al. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis 2007; 195: 202-11.
- Stewart PR, Dubin DT, Chikramane SG, Inglis B, Matthews PR, Poston SM. IS257 and small plasmid insertions in the *mec* region of the chromosome of *Staphylococcus aureus*. Plasmid 1994; 31: 12-20.
- Strasters KC, Winkler KC. Carbohydrate metabolism of *Staphylococcus aureus*. J Gen Microbiol 1963; 33: 213-29.
- Strommenger B, Cuny C, Werner G, Witte W. Obvious lack of association between dynamics of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in central Europe and *agr* specificity groups. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23: 15-9.
- Sufian AS, Ramasamy K, Ahmat N, Zakaria ZA, Yusof MI. Isolation and identification of antibacterial and cytotoxic compounds from the leaves of *Muntingia calabura* L. J Ethnopharmacol 2013; 146: 198-204.
- Sun J-L, Zhang S-K, Chen J-Y, Han B-Z. Metabolic profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under aerobic and anaerobic conditions with ¹H NMR-based nontargeted analysis. Can J Microbiol 2012; 58(6): 709-18.

- Suzuki E, Kuwahara-Arai K, Richardson JF, Hiramatsu K. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1219-26.
- Swaminathan S, Furey W, Pletcher J, Sax M. Crystal structure of staphylococcal enterotoxin B, a superantigen. *Nature (London)* 1992; 359: 801-6.
- Szumowski JD, Cohen DE, Kanaya F, Mayer KH. Treatment and outcomes of infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at an ambulatory clinic. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 423-8.
- Tacconelli E, Tumbarello M, Cauda R. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 1998; 339: 2026-7.
- Takahashi J, Komatsuzawa H, Yamada S, Nishida T, Labischinski H, Fujiwara T et al. Molecular characterization of an *atl* null mutant of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* 2002; 46: 601-12.
- Takano T, Higuchi W, Otsuka T, Baranovich T, Enany S, Saito K et al. Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 837-45.
- Talia JM, Debattista NB, Pappano NB. New antimicrobial combinations: substituted chalcones-oxacillin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Braz J Microbiol* 2011; 42: 470-5.
- Tenover F, Gorwitz RJ. The epidemiology of *Staphylococcus* infections U: Fischetti VA, Novick RP, Ferreti JJ, Portnoy DA, Rood JJ, (urednici). *Gram positive pathogens*. 2nd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2006. 526-34.
- Tenover FC, Goering RV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 441-6.
- Tenover FC, Jones RN, Swenson JM, Zimmer B, McAllister S, Jorgensen JH. Methods for improved detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci: results of a multicenter study. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 4051-8.
- Tenover FC, McDougal LK, Goering RV, Killgore G, Projan SJ, Patel JB et al. Characterization of a strain of community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 108-18.
- Terakubo S, Takemura H, Yamamoto H, Ikejima H, Kunishima H, Kanemitsu K et al. Antimicrobial activity of everninomicin against clinical isolates of *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., and *Streptococcus* spp. tested by Etest. *J Infect Chemother* 2001; 7(4): 263-6.

- Throup JP, Zappacosta F, Lunsford RD, Annan RS, Carr SA, Lonsdale JT et al. The *srhSR* gene pair from *Staphylococcus aureus*: genomic and proteomic approaches to the identification and characterization of gene function. *Biochemistry* 2001; 40: 10392–401.
- Toledo-Arana A, Merino N, Vergara-Irigaray M, Debarbouille M, Penades JR, Lasa I. *Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica*-independent biofilm in the absence of the arlRS two-component system. *J Bacteriol* 2005; 187: 5318-29.
- Tomasz A, Drugeon HB, de Lencastre HM, Jabes D, McDougall L, Bille J. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding protein with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1869-74.
- Tran TD, Nguyen TTN, Do TH, Huynh TNP, Tran CD, Thai KM. Synthesis and antibacterial activity of some heterocyclic chalcone analogues alone and in combination with antibiotics. *Molecules* 2012; 17: 6684-96.
- Tranter HS, Tassou SC, Nychas GJ. The effect of the olive phenolic compound, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*. *J Appl Bacteriol* 1993; 74: 253-9.
- Trindade PA, McCulloch JA, Oliveira GA, Mamizuka EM. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. *Braz J Infect Dis* 2003; 7(1): 32-43.
- Tristan A, Ferry T, Durand G, Dauwalder O, Bes M, Lina G et al. Virulence determinants in community and hospital methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* 2007; 65(52): 105-9.
- Tsuchiya H, Inuma M. Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine* 2000; 7: 161-5.
- Ubukata K, Nonoguchi R, Matsushashi M, Konno M. Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. *J Bacteriol* 1989; 171: 2882-5.
- Ubukata K, Nonoguchi R, Song MD, Matsushashi M, Konno M. Homology of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus simulans* to that of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 170-2.
- Ubukata K, Yamashita N, Gotoh A, Konno M. Purification and characterization of aminoglycoside-modifying enzymes from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 25: 754-9.
- Utsui Y, Yokota T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28: 397-403.
- Valeva A, Palmer M, Bhakdi S. Staphylococcal exotoxin: formation of the heptameric pore is cooperative and proceeds through multiple intermediate stages. *Biochemistry* 1997a; 36: 13298-304.

- Valeva A, Walev I, Pinkernell M, Walker B, Bayley H, Palmer M et al. Transmembrane beta-barrel of staphylococcal alpha-toxin forms in sensitive but not in resistant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997b; 94: 11607-11.
- Valle J, Toledo-Arana A, Berasain C, Ghigo JM, Amorena B, Penades JR et al. *SarA* and not *sigmaB* is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 2003; 48: 1075-87.
- van de Velde H. Etude sur le mecanisme de la virulence du *Staphylocoque pyogène*. *La Cellule* 1894; 10: 401-60.
- van Griethuysen A, Bes M, Etienne J, Zbinden R, Kluytmans J. International multicenter evaluation of latex agglutination tests for identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 86-9.
- van Leeuwen W, van Nieuwenhuizen W, Gijzen C, Verbrugh H, van Belkum A. Population studies of methicillin-resistant and - sensitive *Staphylococcus aureus* strains reveal a lack of variability in the *agrD* gene, encoding a staphylococcal autoinducer peptide. *J Bacteriol* 2000; 182: 5721-9.
- Vandana S, Raje M, Krishnasastry MV. The role of the amino terminus in the kinetics and assembly of a hemolysin of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 1997; 272: 24858-63.
- Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2(article 12): 1-15.
- Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 978-84.
- Ventura CL, Malachowa N, Hammer CH, Nardone GA, Robinson MA, Kobayashi SD et al. Identification of a novel *Staphylococcus aureus* two-component leukotoxin using cell surface proteomics. *PLoS ONE* 2010; 5(7): e11634. doi:10.1371/ journal.pone.0011634
- Verdon J, Girardin N, Lacombe C, Berjeaud JM, Hechard Y. Delta-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. *Peptides* 2009; 30: 817-23.
- Vuong C, Dürr M, Carmody AB, Peschel A, Klebanoff SJ, Otto M. Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: Quorum-sensing determines pro-inflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins. *Cell Microbiol* 2004; 6: 753-9.
- Vuong C, Saenz HL, Gotz F, Otto M. Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2000; 182: 1688-93.

- Walsh TR, Holmstrom A, Qwarnstrom A, Ho P, Wootton M, Howe RA et al. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2439-44.
- Wang Q, Wang H, Xie M. Antibacterial mechanism of soybean isoflavone on *Staphylococcus aureus*. *Arch Microbiol* 2010; 192: 893-8.
- Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach TH, Queck SY, Li M et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med* 2007; 13: 1510-4.
- Wang R, Khan BA, Cheung GY, Bach TH, Jameson-Lee M, Kong KF et al. *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *J Clin Invest* 2011; 121: 238-48.
- Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 2000; 182: 2675-9.
- Weisblum B. Resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotics, p. 682–698. U: V. A. Fischetti (ed.), Gram-positive pathogens. 1999. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- White RL, Burgess DS, Mandru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard and E-test. *Antimicrobial Agents Chemother* 1996; 40: 1914-18.
- Wichelhaus TA, Kern S, Schafer V, Brade V, Hunfeld KP. Evaluation of modern agglutination tests for identification of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18(10): 756-8.
- Wijaya L, Hsu LY, Kurup A. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: overview and local situation. *Ann Acad Med Singapore* 2006; 35: 479-86.
- Williamson EM. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine* 2001; 8: 401-9.
- Wisplinghoff H, Rosato AE, Enright MC, Noto M, Craig W, Archer GL. Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3574-9.
- Woodin AM. Fractionation of the two components of leukocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochem J* 1959; 73: 225-37.
- Woodin AM. Purification of the two components of leukocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochem J* 1960; 75: 158-65.
- Worthington RJ, Richards JJ, Melander C. Small molecule control of bacterial biofilms. *Org Biomol Chem* 2012; 10: 7457-74.

- Wu CY, Hoskins J, Blaszczyk LC, Preston DA, Skatrud PL. Construction of a water-soluble form of penicillin-binding protein 2a from a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 533-9.
- Wu S, Piscitelli C, deLencastre H, Tomasz A. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. *Microb Drug Resistance* 1996; 2: 435-41.
- Yamamoto T, Dohmae S, Saito K, Otsuka T, Takano T, Chiba M et al. Molecular characteristics and *in vitro* susceptibility to antimicrobial agents, including the des-fluoro(6) quinolone DX-619, of Panton-Valentine leucocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the community and hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 4077-86.
- Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 2004; 186: 1838-50.
- Yarwood JM, McCormick JK, Schlievert PM. Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2001; 183: 1113-23.
- Yarwood JM, Paquette KM, Tikh IB, Volper EM, Greenberg EP. Generation of virulence factor variants in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 2007; 22: 7961-7.
- Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR. Community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 275-86.
- Zhang F, Luo SY, Ye YB, Zhao WH, Sun XG, Wang ZQ et al. The antibacterial efficacy of an aceraceous plant [Shantung maple (*Acer truncatum* Bunge)] may be related to inhibition of bacterial β -oxoacyl-acyl carrier protein reductase (FabG). *Biotechnol Appl Biochem* 2008; 51: 73-8.
- Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in MRSA. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5026-33.
- Zhang L, Lin J, Ji G. Membrane anchoring of the AgrD N-terminal amphipathic region is required for its processing to produce a quorum-sensing pheromone in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 2004; 279: 19448-56.
- Zhang S, Iandolo JJ, Stewart GC. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). *FEMS Microbiol Lett* 1998; 168: 227-33.
- Zhou T, Xuming D, Qiu J. Antimicrobial activity of Licochalcone E against *Staphylococcus aureus* and its impact on the production of staphylococcal alpha-toxin. *J Microbiol Biotechnol* 2012; 22(6): 800-5.
- Ziran BH. Osteomyelitis. *J Trauma* 2007; 62: 59-60.

BIOGRAFIJA

Mr sc. med. Dragana Božić (rođena Vučićević) je rođena 22.09.1975. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Studije na Medicinskom fakultetu u Beogradu je upisala školske 1994/95. godine. Tokom studija je bila stipendista Ministarstva za prosvetu Republike Srbije i stipendista Vlade Kraljevine Norveške u školskoj 2000/01. god. Diplomirala je 2001. godine sa prosečnom ocenom 9,77. Tokom 2001/02 godine je obavila opšti lekarski staž kao stažer Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, nakon čega je položila stručni ispit.

Poslediplomske studije iz Imunologije je upisala školske 2002/03. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a eksperimentalni deo magistarskog rada je obavila pod rukovodstvom mentora akademika prof. dr sc. med. Miodraga Čolića u Institutu za medicinska istraživanja VMA. Magistarsku tezu pod nazivom "Diferentovanje T limfocita sa regulatornom aktivnošću u kokulturi timocita pacova i kortikalne timusne epitelne ćelijske linije *in vitro*" odbranila je u junu 2007. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. U školskoj 2006/07 godini upisala je prvu godinu specijalizacije iz Mikrobiologije sa parazitologijom na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a u školskoj 2008/09 prvu godinu doktorskih akademskih studija-modul Farmaceutska mikrobiologija na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Zaposlena je na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu od februara 2004. godine, gde radi najpre kao saradnik u nastavi na Katedri za mikrobiologiju i imunologiju, a od 2007. godine kao asistent. U dosadašnjem naučno-istraživačkom radu Dragana Božić je objavila 19 radova u časopisima međunarodnog značaja (dva u vrhunskim međunarodnim časopisima kategorije M21, 4 rada u istaknutim međunarodnim časopisima kategorije M22 i 13 radova u međunarodnim časopisima kategorije M23), 1 rad u časopisu nacionalnog značaja (M52), 2 saopštenja na skupovima međunarodnog značaja štampana u celini (M33), 20 saopštenja na skupovima međunarodnog značaja štampanih u izvodu (M34) i 15 saopštenja na kongresima nacionalnog značaja (M64).

Od 2011. godine angažovana je kao saradnik na projektu Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije pod nazivom „Bakterije rezistentne na antibiotike u Srbiji: fenotipska i genotipska karakterizacija“ (broj projekta 175039).

Član je Društva imunologa Srbije od 2004. godine.

OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Radovi iz teze prihvaćeni za publikaciju:

Božić DD, Milenković M, Ivković B, Ćirković I. Antibacterial activity of newly-synthesized chalcones and synergism with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Indian Journal of Medical Research, submitted 15.02.2013., accepted 12.07.2013., *Article in press*. (M21)

Božić DD, Milenković M, Ivković B, Ćirković I. Newly-synthesized chalcones-inhibition of adherence and biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Brazilian Journal of Microbiology, submitted 04.07.2012., accepted 24.05.2013., *Article in press*. (M23)

Saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampana u izvodu (M34) iz teze:

Vucicevic D, Ivkovic B, Ćirkovic I, Milenkovic M. Antibacterial activity of chalcones against biofilm producing MRSA. 4th Congress of European Microbiologists, FEMS 2011. Geneva, Switzerland, June 26-30, 2011. Abstract 2624.

D. Božić, M. Milenković, B. Ivković, I. Ćirković. Synergism with antibiotics and antibacterial activity of chalcones against MRSA. 5th Congress of European Microbiologists, FEMS 2013. Leipzig, Germany, July 21-25, 2013.

Radovi saopšteni na skupu nacionalnog značaja štampani u izvodu (M64) iz teze:

Radoičić R, **Vučičević D**, Ivković B, Milenković M. Novosintetisani halkoni kao potencijalni antimikrobni lekovi. Mikromed 2008, VI kongres medicinske mikrobiologije, Beograd 11-14. jun 2008. Zbornik sažetaka 87-88.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Драгана Д. Божић
број уписа 42/08

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Антимикробна активност халкона и *in vitro* утицај на физиолошко-биохемијске карактеристике и експресију фактора вируленције метицилин-резистентних сојева *Staphylococcus aureus*“

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

Потпис докторанта

У Београду, 10.04.2014.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Драгана Д. Божић
Број уписа 42/08
Студијски програм Фармацеутска микробиологија
Наслов рада **„Антимикробна активност халкона и *in vitro* утицај на физиолошко-биохемијске карактеристике и експресију фактора вируленције метицилин-резистентних сојева *Staphylococcus aureus*“**
Ментор: др Марина Миленковић, редовни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет

Потписани Драгана Д. Божић

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

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

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

Потпис докторанта

У Београду, 10.04.2014.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Антимикробна активност халкона и *in vitro* утицај на физиолошко-биохемијске карактеристике и експресију фактора вируленције метицилин-резистентних сојева *Staphylococcus aureus*“ која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- ③ Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанта

У Београду, 10.04.2014.

