



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**Милена Мишић**

**Дистрибуција фенотипова и гена резистенције на макролиде и  
линкозамиде код грам-позитивних кока**

**Докторска дисертација**

**Ментор: др сци. мед. Дејан Баскић, ванредни професор**

**Крагујевац, 2019. године**

<b><i>I Аутор</i></b>
Име и презиме: Милена Мишић
Датум и место рођења: 17.07.1973. године, у Лесковцу, Србија
Садашње запослење: спец. микробиологије са паразитологијом у Заводу за јавно здравље Врање у Врању
<b><i>II Докторска дисертација</i></b>
Наслов: Дистрибуција фенотипова и гена резистенције на макролиде и линкозамиде код грам-позитивних кока
Број страница: 145
Број слика: 10
Број библиографских података: 401
Установа и место где је рад израђен: Завод за јавно здравље Врање у Врању, Институт за јавно здравље Крагујевац у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: др сци. мед. Дејан Баскић, ванредни професор
<b><i>III Оцена и одбрана</i></b>
Датум пријаве теме: 26.11. 2013. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-184/11 од 02.04.2014.г.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. проф. др Драган Миловановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, председник;</li> <li>2. проф. др Дејан Баскић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан;</li> <li>3. НС Дејан Видановић, научни сарадник, Одељења за лабораторијску дијагностику, Ветеринарски специјалистички институт "Краљево", члан.</li> </ol>
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Проф. др Бранислава Коцић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник;</li> </ol>

2. Проф. др Лазар Ранин, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Медицинска микробиологија, члан;
3. Доц. др Деана Медић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Микробиологија са паразитологијом и имунологијом, члан.

Датум одбране дисертације:

## САЖЕТАК

**Увод/циљ** У последњој деценији забележено је повећање резистенције Грам-позитивних кока на антибиотике из групе макролида, линкозамида и стрептограмина А/Б (MLSa/b). Сложени механизми резистенције на MLS антибиотике укључују: модификацију рибозома, активно избацивање антибиотика и модификацију антибиотика. Породица гена одговорних за кодирање ензима који врше метилацију рибозома је означена скраћеницом *erm* (од енгл. erythromycin resistance methylase) и доводе до појаве унакрсне резистенције на макролиде, линкозамиде и стрептограмине групе Б (MLSb). Профил резистенције познат као MLSb фенотип може бити: индуцибилан (iMLSb) и конститутиван (cMLSb). Сојеви са *erm* посредованом еритромицин резистенцијом могу се показати осетљивим на клиндамицин у рутинском диск дифузионом тестирању осетљивости.

**Циљеви** Утврдити учесталост фенотипова и гена резистенције на MLS антибиотике код Грам-позитивних кока на подручју југоисточне Србије.

**Методе** MLS фенотипови резистенције: конститутивни (cMLSb), индуцибилни (iMLSb), M/MSb и LSa/b, били су утврђени дупли-диск дифузионом методом (D-тестом). Испитано је 2366 клиничких изолата Грам-позитивних кока, сакупљених у току једногодишњег периода у Центру за микробиологију Завода за јавно здравље Врање. Гени који кодирају MLSb резистенцију (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, *msrB*, *mefA/E*, *lnuA*, *lnuB*, *lsaA* и *lsaC*) су идентификовани коришћењем мултиплекс PCR-а.

**Резултати** Највећу учесталост резистенције на еритромицин имали су изолати метицилин-резистентних коагулаза-негативних стафилокока (MRCNS, 91,5%), затим метицилин-резистентних *S. aureus* (MRSA, 86,4%) и ентерокока (80,8%). Нижа, али још увек висока стопа резистенције на еритромицин је била присутна и код других изолата Грам-позитивних кока. Насупрот макролидима, изузев за изолате *Enterococcus* spp. (96,7%), *Streptococcus pneumoniae* (35,9%) и MRSA (28,4%), други изолати Грам-позитивних кока су показали значајно нижу резистенцију на клиндамицин. Открили смо да је iMLSb фенотип најучесталији код стафилокока, код ентерокока и бактерија *S. agalactiae* и *S. pneumoniae* био је доминантан cMLSb фенотип, док је M/MSb фенотип био најчешће присутан код бактерија *S. pyogenes*. Од укупног броја изолата четири соја су



показала нови "keyhole" фенотип. Најчешћи појединачни гени и њихове комбинације детектоване код стафилокока су биле *msrA/B*, *ermC* и *ermC+msrA/B*, док су код ентерокока и β-хемолитичких стрептокока биле *lsaA*, *ermB* и *ermB+lsaA*.

**Закључак** Утврдили смо високу стопу резистенције на еритромицин код Грам-позитивних кока. Метицилин-резистентне стафилококе су биле значајно резистентније на MLS антибиотике у односу на метицилин-сензитивне стафилококе. Најчешће идентификовани ген MLS резистенције међу стафилококама био је *ermC*, док је међу ентерококама и β-хемолитичким стрептококама био *ermB* ген. Утврђена је јасна разлика у обрасцу MLS осетљивости међу стафилококама и ентерококама/стрептококама и потврђена је неопходност увођења D теста у рутинском тестирању антимикробне осетљивости код изолата стафилокока.

**Кључне речи:** Грам-позитивне коке; D-тест; MLS фенотип резистенције; *erm*; *msrA/B*; *lsaA*; *lnuA*/ B ген.

## ABSTRACT

**Introduction** The increase of resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin a/b antibiotics (MLSa/b) among Gram-positive cocci has been reported in the last decade. The complex mechanisms of resistance to MLS antibiotics include: modification of ribosome, active efflux of antibiotics and antibiotic inactivation. The gene family called *erm* (erythromycin resistance methylase) that encoding enzymes responsible for ribosome methylation leads to cross- resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin b (MLSb resistance phenotype). The antimicrobial resistance profile known as MLSb resistance phenotype can be either inducible (iMLSb) and constitutive (cMLSb). Macrolide resistant strains carrying *erm* gene can show false sensitivity to clindamycin, using routine antimicrobial susceptibility test.

**Objective** This study investigated the prevalence of MLS resistance phenotypes and genes in Gram-positive cocci in region of the Southeast Serbia.

**Methods** MLS resistance phenotypes: constitutive (cMLSb), inducible (iMLSb), M/MSb, and LSa/b, were determined by the double-disk diffusion method. We have analyzed 2366 clinical isolates of Gram-positive cocci, collected during 1-year period at the Center for Microbiology of the Public Health Institute in Vranje, Serbia. The MLS resistance genes (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, *msrB*, *mefA/E*, *lnuA*, *lnuB*, *lsaA*, and *lsaC*) were identified by multiplex PCR.

**Results** The highest frequencies of isolates resistant to erythromycin were found among methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCNS, 91.5%), methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA, 86.4%) and Enterococcus strains (80.8%). Lower, but still high resistance rate to erythromycin was found among other Gram-positive cocci. Contrary to macrolides, except for *Enterococcus* spp. (96.7%), *S. pneumoniae* (35.9%), and MRSA (28.4%), other Gram-positive cocci showed significantly lower resistance to clindamycin. We have found that iMLSb is the most prevalent phenotype in staphylococci, the cMLSb is predominantly in enterococci, *S. agalactiae*, and *S. pneumoniae*, whereas the M/MSb phenotype is the most frequent in *S. pyogenes*. LSa/b phenotype was the most common in enterococci and beta haemolytic streptococci, but nearly or totally absented among staphylococci, *S. pneumoniae*, and *S. pyogenes*. The novel keyhole zone phenomenon was detected in four out of total number of clinical isolates. The most prevalent MLS resistance genes and their combinations detected

in staphylococci were *msrA/B*, *ermC* and *ermC+msrA/B*, whereas *lsaA*, *ermB* и *ermB+lsaA* were predominantly found in enterococci and beta haemolytic streptococci.

**Conclusion** Generally, high rates of erythromycin resistance in Gram-positive cocci was found. The methicillin-resistant staphylococci were significantly more resistant to MLS antibiotics than methicillin-sensitive staphylococci. The most frequent MLS resistance gen among staphylococci isolates was *ermC*, whereas the *ermB* gen was the most prevalent in enterococci and  $\beta$ -haemolytic streptococci. We have also discovered a clear differences of MLS resistance pattern in staphylococci and enterococci/streptococci, and confirmed the necessity of routine D-testing of all clinical isolates of staphylococci.

**Keywords:** Gram-positive cocci; MLSb resistance phenotypes; D-test; *erm*; *msrA/B*; *lsaA*; *lnuA*/ B genes.

## Захваљујем се:

ментору, проф. др Дејану Баскићу,

члановима комисије, проф. др Бранислави Коцић, проф. др Лазару Ранину,

доц. др Деани Медић,

проф. др Владимиру Јаковљевићу,

др Весни Станковић и др Весни Манојловић,

свим колегама из лабораторије Центра за микробиологију Завода за јавно

здравље Врање,

мојој породици.

# САДРЖАЈ

1	УВОД.....	1
1.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	3
1.2	Коагулаза негативне стафилококе .....	6
1.3	Метицилин резистентне стафилококе и метицилин сензитивне стафилококе .....	6
1.4	<i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	10
1.5	<i>Enterococcus</i> spp.....	13
1.6	<i>Streptococcus agalactiae</i> .....	14
1.7	<i>Streptococcus pyogenes</i> .....	15
1.8	Макролиди.....	17
1.9	Линкозамиди .....	20
1.10	Сложени механизми резистенције MLS антибиотика .....	22
1.10.1	Модификација рибозома .....	22
1.10.2	Активно избацивање антибиотика .....	24
1.10.3	Модификација антибиотика.....	25
1.11	D-тест .....	27
2	ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА .....	30
2.1	Циљеви истраживања.....	30
2.2	Хипотезе истраживања.....	30
3	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	31
3.1	План истраживања.....	31
3.2	Узорковање и примарна изолација .....	31
3.3	Бактеријски сојеви .....	33
3.4	Методe анализе бактеријских сојева .....	33
3.4.1	Микробиолошко испитивање .....	33

3.4.1.1	Идентификација бактерија .....	33
3.4.1.2	Тестирање антибиотске осетљивости .....	36
3.4.1.3	Метицилин резистенција .....	37
3.4.2	Утврђивање фенотипова MLS резистенције .....	37
3.4.3	Идентификација гена MLS резистенције.....	41
3.4.3.1	Изолација DNK и PCR прајмери.....	41
3.4.3.2	Идентификација гена .....	44
3.5	Статистичка анализа података .....	45
4	РЕЗУЛТАТИ.....	46
4.1	Учесталост резистенције на антибиотике Грам-позитивних кока.....	46
4.2	Учесталост резистенције на еритромицин код Грам-позитивних кока .....	48
4.3	Учесталост MLS фенотипова резистенције код Грам-позитивних кока.....	49
4.3.1	Учесталост MLS фенотипова резистенције код <i>S. aureus</i> .....	49
4.3.2	Учесталост MLS фенотипова резистенције код KNS.....	51
4.3.3	Учесталост MLS фенотипова резистенције код <i>Enterococcus spp.</i> .....	52
4.3.4	Учесталост MLS фенотипова резистенције код стрептокока.....	52
4.4	Поређење учесталости MLS фенотипова резистенције код Грам-позитивних кока.....	54
4.4.1	Поређење учесталости Er/Kli S код Грам-позитивних кока.....	54
4.4.2	Поређење учесталости sMLSb фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока.....	55
4.4.3	Поређење учесталости M/MSb фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока.....	56
4.4.4	Поређење учесталости iMLSb фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока.....	57
4.4.5	Поређење учесталости LСа/b фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока.....	58

4.5	Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала .....	59
4.5.1	Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала код <i>S. aureus</i> .....	60
4.5.2	Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала код KNS изолата.....	62
4.5.3	Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала код изолата <i>Enterococcus</i> spp. и <i>S. agalactiae</i> .....	64
4.5.4	Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала код изолата <i>S. pneumoniae</i> и <i>S. pyogenes</i> .....	66
4.6	Учесталост MLS фенотипова резистенције по пореклу материјала.....	68
4.6.1	Учесталост MLS фенотипова резистенције по пореклу материјала код стафилокока .....	70
4.6.2	Учесталост MLS фенотипова резистенције по пореклу материјала код ентерокока и стрептокока .....	71
4.7	Учесталост MLS гена резистенције код Грам-позитивних кока.....	73
4.7.1	Учесталост MLS гена резистенције код изолата стафилокока.....	74
4.7.1.1	Учесталост MLS гена резистенције код различитих врста стафилокока .	76
4.7.1.2	Учесталост MLS гена резистенције код различитих фенотипова стафилокока .....	77
4.7.1.3	Учесталост MLS гена резистенције према пореклу изолата код стафилокока .....	79
4.7.2	Учесталост MLS гена резистенције код ентерокока и β-хемолитичких стрептокока.....	80
4.7.2.1	Учесталост MLS гена резистенције код ентерокока и β-хемолитичких стрептокока .....	81
4.7.2.2	Учесталост MLS гена резистенције према фенотипу код ентерокока и β-хемолитичких стрептокока.....	82
4.7.2.3	Учесталост MLS гена резистенције према пореклу изолата ентерокока и β-хемолитичких стрептокока .....	84

4.8	Ваљаност D-теста .....	85
5	ДИСКУСИЈА .....	87
6	Закључци .....	106
7	Литература .....	108



## ПОПИС СЛИКА

Слика 1. Механизам деловања макролида .....	19
Слика 2. Механизам деловања клиндамицина .....	21
Слика 3. Положај Пчињског округа у оквиру територије Републике Србије .....	32
Слика 4. Диск дифузиона метода на Милер-Хинтон агару за израду антибиограма и D-тест .....	38
Слика 5. Диск дифузиона метода на Милер-Хинтон агару за израду антибиограма и D-тест .....	39
Слика 6. Диск дифузиона метода на Милер-Хинтон агару за израду антибиограма и D-тест .....	39
Слика 7. Диск дифузиона метода на Милер-Хинтон агару за израду антибиограма и D-тест .....	40
Слика 8. Диск дифузиона метода на Милер-Хинтон агару за израду антибиограма и D-тест .....	40
Слика 9. Еритромицин и клиндамицин дупли диск дифузиони тест на изолату <i>Enterococcus</i> spp. ....	41
Слика 10. PCR изолати <i>S. aureus</i> .....	45

## ПОПИС ГРАФИКОНА

<b>Графикон 1.</b> Осетљивост на еритромицин код Грам-позитивних кока .....	48
<b>Графикон 2.</b> Учесталост MLS фенотипова резистенције код <i>S. aureus</i> .....	50
<b>Графикон 3.</b> Учесталост MLS фенотипова резистенције код KNS изолата .....	51
<b>Графикон 4.</b> Учесталост MLS фенотипова резистенције код ентерокока .....	52
<b>Графикон 5.</b> Учесталост MLS фенотипова резистенције код стрептокока .....	53
<b>Графикон 6.</b> Учесталост MLS фенотипова резистенције код Грам-позитивних кока..	54
<b>Графикон 7.</b> Учесталост осетљивости на еритромицин и клиндамицин (Eг/Kli S) код Грам-позитивних кока .....	55
<b>Графикон 8.</b> Учесталост cMLSb фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока..	56
<b>Графикон 9.</b> Учесталост M/MSb фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока .	57
<b>Графикон 10.</b> Учесталост iMLSb фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока	58
<b>Графикон 11.</b> Учесталост LСа/b фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока ..	59
<b>Графикон 12.</b> Учесталост MLS фенотипова по врсти материјала код Грам-позитивних кока .....	60
<b>Графикон 13.</b> Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала код MRSA и MSSA изолата .....	62
<b>Графикон 14.</b> Учесталост MLS фенотипова резистенције према врсти материјала код MRKNS и MSKNS изолата .....	64
<b>Графикон 15.</b> Учесталост MLS фенотипова резистенције према врсти материјала код изолата <i>Enterococcus spp.</i> и <i>S. agalactiae</i> .....	66
<b>Графикон 16.</b> Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала код изолата <i>S. pneumoniae</i> и <i>S. pyogenes</i> .....	68
<b>Графикон 17.</b> Учесталост MLS фенотипова по пореклу материјала код Грам-позитивних кока .....	69
<b>Графикон 18.</b> Учесталост MLS фенотипова резистенције према врсти материјала код MRSA, MSSA, MRKNS и MSKNS .....	71

<b>Графикон 19.</b> Учесталост MLS фенотипова резистенције по пореклу материјала .....	73
<b>Графикон 20.</b> Учесталост MLS гена резистенције код Грам-позитивних кока са једним од четири MLS фенотипа резистенције .....	74
<b>Графикон 21.</b> Учесталост MLS гена међу изолатима стафилокока који су показивали један од четири MLS фенотипа резистенције .....	75
<b>Графикон 22.</b> Учесталост MLS гена резистенције и њихових комбинација код стафилокока .....	75
<b>Графикон 23.</b> Преваленција и експресија MLS гена и њихових комбинација код различитих фенотипова стафилокока .....	78
<b>Графикон 24.</b> Учесталост MLS гена резистенције међу изолатима ентерокока и стрептокока који су показивали један од три MLS фенотипа резистенције .....	80
<b>Графикон 25.</b> Учесталост MLS гена резистенције и њихових комбинација код ентерокока и $\beta$ -хемолитичких стрептокока .....	81
<b>Графикон 26.</b> Преваленција и експресија MLS гена резистенције и њихових комбинација код различитих фенотипова ентерокока и $\beta$ -хемолитичких стрептокока ..	84

## ПОПИС ТАБЕЛА

<b>Табела 1.</b> PCR прајмери коришћени за умножавање гена резистенције код Грам-позитивних кока и услови умножавања код извођења PCR реакције .....	43
<b>Табела 2.</b> Учесталост резистенције на антибиотике код Грам-позитивних кока .....	46
<b>Табела 3.</b> Учесталост MLS фенотипова резистенције код Грам-позитивних кока .....	49
<b>Табела 4.</b> Учесталост MLS фенотипова по врсти материјала код Грам-позитивних кока .....	59
<b>Табела 5.</b> Учесталост фенотипова резистенције по врсти материјала код MRSA и MSSA изолата.....	61
<b>Табела 6.</b> Учесталост фенотипова резистенције по врсти материјала код MRKNS и MSKNS изолата.....	63
<b>Табела 7.</b> Учесталост фенотипова резистенције по врсти материјала код изолата <i>Enterococcus</i> spp. и <i>S. agalactiae</i> .....	65
<b>Табела 8.</b> Учесталост фенотипова резистенције по врсти материјала код изолата <i>S. pneumoniae</i> и <i>S. pyogenes</i> .....	67
<b>Табела 9.</b> Учесталост MLS фенотипова по пореклу материјала код Грам-позитивних кока.....	69
<b>Табела 10.</b> Учесталост фенотипова резистенције по пореклу материјала код стафилокока.....	70
<b>Табела 11.</b> Учесталост фенотипова резистенције по пореклу материјала код ентерокока и стрептокока .....	72
<b>Табела 12.</b> Учесталост MLS гена резистенције и њихових комбинација код различитих врста стафилокока.....	76
<b>Табела 13.</b> Учесталост MLS гена и њихових комбинација код различитих фенотипова стафилокока.....	77
<b>Табела 14.</b> Учесталост MLS гена резистенције према пореклу изолата стафилокока ..	79
<b>Табела 15.</b> Учесталост MLS гена резистенције и њихових комбинација код ентерокока и β-хемолитичких стрептокока.....	82

<b>Табела 16.</b> Преваленција MLS гена резистенције и њихових комбинација код различитих фенотипова резистенције ентерокока и $\beta$ -хемолитичких стрептокока.....	83
<b>Табела 17.</b> Учесталост MLS гена резистенције према пореклу ентерокока и $\beta$ -хемолитичких стрептокока (амбулантни према болничким) .....	85
<b>Табела 18.</b> Број изолата коришћених за утврђивање ваљаности D-теста.....	85
<b>Табела 19.</b> Резултати теста ваљаности D-теста.....	86

## ПОПИС ОЗНАКА И СКРАЋЕНИЦА

Ознака или скраћеница	Значење
ABC	АТР-везујућа касета (енгл. АТР-binding cassette)
АОМ	акутно запаљење средњег уха (енгл. acute otitis media)
АТСС	америчка колекција култура сојева (енгл. American type culture collection)
bp	базни пар (енгл. base pairs)
CAMP	акроним за ауторе теста за идентификацију <i>Streptococcus agalactiae</i> "Christie-Atkins-Munch-Petersen"
CA-MRSA	стечен у заједници метицилин резистентни <i>Staphylococcus aureus</i> (енгл. Community-acquired methicillin-resistant <i>S. aureus</i> )
ccr	касетне хромозомске рекомбиназе (енгл. cassette chromosome recombinase)
cfu	јединице формираних колонија (енгл. colony forming units)
CLSI	Институт за клиничке и лабораторијске стандарде (енгл. Clinical and Laboratory Standards Institute)
cMLSb	конститутивна макролид-линкозамид-стрептограмин Б резистентност
DNaza	дезоксирубенуклеаза
DNK	дезоксирибонуклеинска киселина
EARS-Net	европска мрежа за праћење антимикробне резистенције (енгл. European Antimicrobial Resistance Surveillance System)
EF	<i>Enterococcus</i> spp.
Er	еритромицин
Er/Kli S	сензитивност на еритромицин и клиндамицин
erm	еритромицин рибозомска метилаза (енгл. erythromycin ribosome methylase)
FDA	америчка Агенција за храну и лекове (енгл. Food and Drug Administration)

G+C	гуанозин + цитозин базни пар
GAS	група А стрептокока (енгл. group A streptococci)
GBS	група Б стрептокока (енгл. group B streptococci)
HA-MRSA	стечен у болници метицилин резистентни <i>S. aureus</i> (енгл. Hospital-Acquired MRSA)
HIV	вирус хумане имунодефицијенције (енгл. human immunodeficiency virus)
iMLSb	индуцибилна макролид-линкозамид-стрептограмин Б резистентност
iRNK	информациона рибонуклеинска киселина
IU	међународна јединица (енгл. International Unit)
Kli	клиндамицин
KNS	коагулаза негативни <i>Staphylococcus</i> (енгл. coagulase negative staphylococci)
<i>lin</i>	ген за ензим линкозамид нуклеотидилтрансферазу (претходно <i>lin</i> )
LSA	линкозамид-стрептограмин А
LSa/b	линкозамид-стрептограмин А/Б резистентност
LSAP	линкозамид-стрептограмин А-плеуромутилин
M/MSb	макролид/макролид-стрептограмин Б резистентност
MIC	минимална инхибиторна концентрација (енгл. minimal inhibitory concentration)
MLS	макролид-линкозамид-стрептограмин
MLSb	макролид-линкозамид-стрептограмин Б
MRKNS	метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок (енгл. methicillin resistant coagulase negative staphylococci)
MRSA	метицилин резистентни <i>S. aureus</i> (енгл. methicillin resistant <i>S. aureus</i> )
MSKNS	метицилин сензитивни коагулаза негативан стафилокок (енгл. methicillin sensitive coagulase negative staphylococci)
MSSA	метицилин сензитивни <i>S. aureus</i> (енгл. methicillin sensitive <i>S. aureus</i> )

NIDR	Национални регистар заразних обољења (енгл. The National Infectious Disease Register)
NIPA	Национални информациони програм за антибиотике (енгл. National information program on antibiotics)
ORF	отворени оквир читања (енгл. open reading frame)
PBP2a	пеницилин везујући протеин 2a (енгл. Penicillin binding protein 2a)
PBPs	пеницилин везујући протеини (енгл. Penicillin binding proteins)
PCR	реакција ланчаног умножавања (енгл. polimerase chain reaction)
PCV	пнеумококна коњугована вакцина (енгл. Pneumomoccal Conjugate Vaccine)
PFGE	електрофореза у пулсирајућем електричном пољу (енгл. pulsed-field gel electrophoresis)
PTC	пептидилтрансфераза центар 50S подјединице рибозома
QC	контрола квалитета (енгл. Quality control)
Q-D	квинпристин-далфопристин (енгл. quinupristin dalfopristin)
RNK	рибонуклеинска киселина
rRNK	рибозомска рибонуклеинска киселина
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAD	Сједињене америчке државе
SaG	<i>Staphylococcus aureus</i> endo-beta-N-acetilglukozamidaze
SB	<i>Streptococcus agalactiae</i>
SCCmec	стафилококна хромозомска касета mec (енгл. Staphylococcal cassette chromosome mec)
Scvs	варијанте малих колонија <i>S. aureus</i> (енгл. Small colony variants of <i>S. aureus</i> )
Spa	стафилококни протеин А (енгл. Staphylococcal protein A)
SPn	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SPy	<i>Streptococcus pyogenes</i>
TNaza	термонуклеаза
tRNK	транспортна рибонуклеинска киселина



TSS	токсични шок синдром (енгл. toxic shock syndrom)
VISA	ванкомицин интермедијарно-резистентни <i>S. aureus</i>
VREF	ванкомицин - резистентни <i>Enterococcus faecium</i>
VRSA	ванкомицин резистентни <i>S. aureus</i>

## 1 УВОД

Резистенција на антибиотици међу Грам-негативним бактеријама је увек била израженија и присутнија него код Грам-позитивних кока. Међутим, због све веће и неконтролисане примене антибиотика, инфекције изазване Грам-позитивним кокама постају све већи терапијски проблем. Гликопептиди и ванкомицин као најпознатији њихов представник су последња линија антибиотика у лечењу мултирезистентних Грам-позитивних кока. Међутим, већ су изоловани сојеви бактерија који су резистентни и на те антибиотике. Постоје два важна пута преношења гена резистенције на антибиотике са животиња на људе, директни и индиректни трансфер. Директна трансмисија резистенције се догађа када резистентне животињске бактерије инфицирају људе. Индиректни пут је када резистентне бактерије пореклом из животиња пребаце гене резистенције хоризонталном трансмисијом на хуману популацију бактерија. Ово се дешава када анимални сојеви преживе, бар привремено на људима, превасходно у дигестивном тракту људи [1, 2, 3, 4]. Због тога су макролиди и линкозамиди јако битни у лечењу инфекција изазваних Грам-позитивним кокама, а утврђивање праве осетљивости на њих постаје од суштинске важности. Појава индуцибилне резистенције на клиндамицин, која се у току терапије линкозамидима јако брзо конвертује у конститутивну и доводи до неуспеха у лечењу представља велики проблем клиничарима. Тако да познавање механизма резистенције на антибиотике није питање само научно истраживачких институција већ и клиничких микробиолога.

Мултирезистентне Грам-позитивне, патогене коке (тј. *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*) су одговорне за већину инфекција стечених у заједници и болничком окружењу и растућа су претња јавном здрављу. Бактеријска резистенција се развила до клинички најзначајнијих антибиотика и настаје кроз један од три механизма резистенције: модификација места везивања, инактивација лека или активни процес избацивања лека из ћелије. Ови механизми доводе до повећања трошкова у лечењу инфекција изазваних овим бактеријама, али трошкови могу бити ублажени контролом експресије гена и/или протеина одговорних за резистенцију у одсуству антибиотика. Због конститутивне експресије гена резистенције могу се смањити

---

трошкови и може се створити селективни притисак на дисеминацију резистенције, пошто се индуцибилни гени резистенције дисеминују много спремније и перзистирају дуже у бактеријској популацији. Уз то, често прелазна природа експресије компликује клиничку детекцију индуцибилне резистенције фенотипским тестовима осетљивости. Ово може довести до неуспеха у лечењу због тога што изолати могу бити много резистентнији *in vivo* него што је утврђено *in vitro* или могу имати шири спектар резистенције од очекиваног. Разумевање молекуларне основе индукције, укључујући физиолошку улогу и механизме читавања и реаговања на антибиотике, дозвољава евалуацију индукционих механизма као потенцијалних антимикуробних циљева и помаже у дизајнирању и откривању неиндукујућих антимикуробних агенаса [5].

Сојеви Грам-позитивних бактерија, који показују индуцибилну клиндамицин-резистенцију у конвенционалним *in vitro* тестовима, одликују се резистентношћу на еритромицин и осетљивошћу на клиндамицин. Ови сојеви, међутим, имају високи степен мутација и током терапије антибиотикима могу развити конститутивни тип резистенције. У тим случајевима терапијска употреба клиндамицина може довести до селекције конститутивних MLSb мутаната и неуспешности терапије. Због тога је неопходно да се у рутинском раду сви еритромицин резистентни сојеви стафилокока испитају D-тестом, како би се издвојили сојеви који имају генетски потенцијал да током терапије развију резистенцију од сојева који су заиста осетљиви на клиндамицин. Са друге стране, уколико бисмо све сојеве бактерија које су резистентне на еритромицин прогласили истовремено резистентним и на клиндамицин, изгубили бисмо могућност примене клиндамицина у случајевима инфекција изазваних сојевима који су заиста осетљиви на овај антибиотик. Са клиничког аспекта, то значи да се у терапији инфекција изазваних бактеријама које су *in vitro* резистентне на еритромицин, клиндамицин не сме користити без претходне провере D-тестом.

Због свега наведеног неопходно је да се D-тест имплементира у рутински рад свих микробиолошких лабораторија, чиме би се направила разлика између сојева који показују праву осетљивост на клиндамицин и оних који показују индуцибилну клиндамицин-резистенцију.

## 1.1 *Staphylococcus aureus*

Стафилококе припадају *Phylum Firmicutes*, класи III *Bacilli*, реду *Bacillales*, фамилији *Staphylococcaceae* [6]. Оне су Грам-позитивне лоптасте коке које се при деоби не деле потпуно тако да остају у гроздастој формацији, због деобе у три правца [7]. Стафилококе су Грам-позитивне коке, каталаза позитивне, непокретне, не формирају споре [8].

Специјација изолата је есенцијална за разликовање бактерија *Staphylococcus aureus* од коагулаза негативних стафилокока [9]. Бактерије су идентификоване као *Staphylococcus aureus* на основу њихових карактеристика раста, каталаза теста, продукције коагулазе, слајд теста на "clumping" фактор, ферментације манитола и жутих колонија на манитол сланом агару [10]. Једина најпоузданија карактеристика *Staphylococcus*-а важна за идентификацију је коагулаза тест. Конвенционални коагулаза тест се може вршити на плочици и у епрувети. Највећи број сојева *S. aureus* врсте имају везану коагулазу ("clumping factor") на површини ћелијског зида. Овај фактор реагује директно са фибриногеном из плазме, изазивајући брзу ћелијску аглутинацију [11]. Аглутинација на плочици за детекцију везане коагулазе је веома брзи тест, али до 15% *S. aureus* сојева је негативно, тако да изолати негативни на плочици морају бити тестирани тестом аглутинације у епрувети, потврђеним тестом [9]. Коагулаза тест у епрувети са плазмом кунића и прегледањем епрувете после 4 сата и после 24 сата је стандардни тест за рутинску идентификацију врсте *S. aureus* [9]. Коагулаза у епрувети овом методом се секретује екстрацелуларно и реагује са супстанцом у плазми званом коагулаза реагујући фактор с којим формира комплекс, који заузврат реагује са фибриногеном да би формирао фибрин (угрушак) [11]. Неке друге врсте стафилокока, укључујући *Staphylococcus schleiferi* и *Staphylococcus intermedius* могу такође дати позитиван резултат коагулаза тестом у епрувети, али нису чести изолати код хуманих инфекција [9]. *S. aureus* продукује дезоксирибонуклеазу (DNaza) и термостабилну нуклеазу (термонуклеаза, TNaza) и ферментује неке шећере и манитол [7]. Ова својства се користе у епидемиолошким студијама да би се детектовао *S. aureus* из земље, фецеса и у скринингу назалног клицоноштва бактеријама *S. aureus*. Манитол слани агар се користи као селективна и диференцијална подлога за идентификацију врсте *S. aureus*. Подлога добије жуту боју, док коагулаза негативне стафилококе не мењају боју подлоге, и она остаје црвена [12]. Гузман и колеге су развили имунолошки тест за идентификацију врсте *S. aureus* који се користи за истовремену детекцију протеина А и endo-beta-N-

acetilglukozamidaze (SaG), ензима који продукују сви изолати ове врсте [8]. Синтетисани су прајмери и пробе за умножавање и детекцију *tecA* гена *S. aureus* и испитана је њихова корисност у потврди култивацијом и директном детекцијом *nuc* гена који кодира термостабилну ендонуклеазу бактерија *S. aureus*.

Типичне 24-оро часовне колоније *S. aureus* су велике, крем-жуте до наранчасте боје и оне хемолизирају крвни агар [13]. Најпознатији површински протеин бактерија *S. aureus* је стафилококни протеин А (Sra). Sra је био изолован први пут из *S. aureus* после лизостафин дигестије 1972. године [14]. Он садржи 5 готово идентичних Ig-везујућих домена, полиморфни регион X и C терминалну секвенцу причвршћену за ћелијски зид [15, 16, 17]. X регион *sra* гена садржи високо полиморфну секвенцу која је састављена од понављајућих секвенци од 24 bp [18]. Sra се везује за Fc регион IgG и блокира његово нормално функционисање. Ово инхибише фагоцитозу и може маскирати бактерију и заштитити је од урођеног имуног система спречавајући опсонизација-зависну активацију каскаде комплемента [19]. Протеин А је такође способан да се везује за тромбоците преко gC1qR/p33 рецептора и вон Вилебрандовога фактора [20, 21]. Уз то, *sra* типизирање је нашироко употребљавана метода генотипизирања за упоређивање изолата *S. aureus*, због високо варијабилног X-региона [18]. Компоненте на површини ћелије, укључујући полисахаридну капсулу и компоненте ћелијског зида пептидогликан, имају различите улоге у патогенези бактерија *S. aureus*. Мукоидна капсула може блокирати фагоцитозу маскирањем комплемент фактора C3b везаног за ћелијски зид [22]. Ћелијски зид *S. aureus* се састоји од пептидогликана и теихоинске киселине, која је повезана или са пептидогликаном или ћелијским зидом [23]. Такође, многи површински протеини стафилокока су уграђени у ћелијски зид. Више од 90% свих клиничких изолата *S. aureus* су прекривени полисахаридном капсулом и досад је регистровано 11 наводних капсуларних серотипова, од којих су најчешћи серотипови 5 и 8. Оба ова серотипа су честа међу изолатима из клиничких инфекција као и из коменсалне флоре [24]. Геном *S. aureus* се састоји од једног кружног хромозома са инсерционим секвенцама, транспозонима и геномским острвцима [25]. Профаги и острвца патогености су посебно били важни у еволуцији и вируленцији *S. aureus* [25]. До данас, секвенционирано је неколико комплетних генома *S. aureus* у оквиру различитих пројеката за секвенционирање генома [26, 27]. Геноми *S. aureus* су величине приближно 2,9 мегабазних парова (Mbp), са релативно ниским садржајем G+C [25].

*S. aureus* је далеко најважнија патогена бактерија код људи и највирулентнија до сад откривена врста рода *Staphylococcus* [28]. *S. aureus* чини нормалну хуману флору ноздрва, назофаринкса, перинеума и коже, може колонизовати различите епителе или слузокоже. Предње носнице се сматрају примарним местом колонизације и приближно 30% здравих људи носи ову бактерију у својим носницама [29].

*S. aureus* може изазвати велики број различитих обољења, од благих инфекција коже до фаталних облика бактеријемииа. Најчешћа инфекција бактеријом *S. aureus* је површинска упала коже, фурункул или чир. Друге кожне и поткожне инфекције изазване бактеријама *S. aureus* укључују фоликулитисе, карбункуле, целулитисе, маститисе и импетиго. *S. aureus* може такође изазвати хроничне инфекције коже и меког ткива код људи са неким другим поремећајима. Много теже инфекције бактеријама *S. aureus* укључују остеомијелитисе, пнеумоније, артритисе, синдром опарене коже, ендокардитисе, миокардитисе, перикардитисе и бактеријемиие [30, 31]. Пнеумоније стечене у заједници које изазива *S. aureus* нису честе, али се дешавају. У болничком окружењу, *S. aureus* може изазвати пнеумонију, са 15-20% смртности. *S. aureus* је један од најчешћих изазивача нозокомијалних пнеумонија и инфекција хируршких рана и трећи по учесталости је изазивач нозокомијалних инфекција крви у јединицама интензивне неге у САД-у од 2000. до 2004. године [31]. Уз то, 2005. године, процењено је да је било 478 000 хоспитализација због инфекције бактеријом *S. aureus* у САД-у [32]. *S. aureus* је водећи узрочник бактеријемииа и повезан је са високим морбидитетом и морталитетом [33]. Према Националном регистру заразних обољења (the National Infectious Disease Register (NIDR)), *S. aureus* је годишње изазвао 1200 бактеријемиијских инфекција [34]. Неколико обољења изазвана бактеријом *S. aureus* су последица посредовања токсина, укључујући тровање храном, импетиго, токсични шок синдром (TSS) и некротизирајућу пнеумонију. Стафилококни ентеротоксин унесен преко контаминираних хране изазива самоограничавајуће стафилококно тровање храном. Симптоми стафилококног тровања храном укључују мучнину, повраћање, главобољу и ређе дијареју [31]. TSS настаје због токсичног шок синдром токсина 1, који је јак суперантиген [35, 36]. Менструални TSS је повезан са високо апсорбујућим тампонима у популацији претходно здравих жена [37]. Типична места колонизације бактеријом *S. aureus*, осим назофаринкса и носница, укључују кожу, перинеум, фаринкс и, нешто ређе, гастроинтестинални тракт, вагину и аксиле [38]. Ван Белкам и сар. су предложили само два типа носног клицоноштва *S. aureus*: перзистентни и други [39]. У студијама

израђеним у САД-у, преваленција назалног клицоноштва са бактеријом *S. aureus* је била процењена на око 30% и нађена је највише код деце између 6 и 7 година [40]. Назално клицоноштво *S. aureus*, посебно перзистентно назално клицоноштво, идентификовано је као фактор ризика за развој инфекције у различитом окружењу. То је главни фактор ризика код одређених група пацијената, као што су пацијенти подвргнути некој хируршкој интервенцији или хемодијализи и пацијенти са интраваскуларним уређајима и HIV инфекцијом [41].

## 1.2 Коагулаза негативне стафилококе

Коагулаза негативне стафилококе, међу којима је и *Staphylococcus epidermidis* један од најчешћих, су суштински мање вирулентне од врсте *S. aureus* и спадају у опортунистички патогене микроорганизме. Најчешће инфекције изазване овим бактеријама су нозокомијалне бактеријемие повезане са интравенским катетером, ендокардитис повезан са вештачким срчаним валвулама, инфекције на месту интравенског катетера, инфекције повезане са шантом цереброспиналне течности, инфекције повезане са вештачким зглобовима, постхируршке окуларне инфекције као и бактеријемие код новорођенчади у јединицама интензивне неге [28]. *Staphylococcus haemolyticus* и *Staphylococcus lugdunensis* обично изазивају инфекције након имплементације медицинских направа [28]. *Staphylococcus saprophyticus* се често повезује са уринарном инфекцијом стеченом у заједници код младих, сексуално активних жена [28].

## 1.3 Метицилин резистентне стафилококе и метицилин сензитивне стафилококе

Непосредно након открића, пеницилин је био лек избора за лечење стафилококних инфекција. Појава резистентности на пеницилин код стафилокока је настала ширењем гена који кодирају продукцију бета лактамаза путем плазмида. Сада је преко 80% изолата стафилокока резистентно на пеницилин [8] због продукције бета-лактамаза, које се везују за антибиотик и уништавају га отварајући му бета-лактамски прстен [7]. Полусинтетски пеницилини, пеницилиназа резистентни пеницилини, оксацилин и

метицилин су постали лекови избора за лечење инфекција изазваних пеницилин резистентним стафилококом [8]. Типични сојеви стафилокока имају четири пеницилин везујућа протеина (PBP). Ови протеини су ензими који катализују транспептидазну реакцију која је неопходна за синтезу ћелијског зида. Антибиотска активност оксацилина је заснована на способности лека да формира ковалентну везу са пеницилин везујућим протеинима на активном месту и инхибира реакцију транспептидације [9]. Метицилин резистентни *S. aureus* (MRSA) је био први пут откривен 1962. године и од онда је постао главни нозокомијални патоген широм света. Каснији тип резистенције је настао због присуства промењеног PBP познатог као PBP2a (или PBP2). PBP2 је кодиран од стране *mecA* гена, који је смештен на мобилном елементу, стафилококној хромозомској касети *mec* (*Scsmec*), која је хоризонтално преносива међу различитим врстама стафилокока [42]. PBP2 има низак афинитет за све бета-лактамске антибиотике, он наставља да функционише дозвољавајући бактерији да расте и дели се [8]. Стафилококе могу експримовати и другачији механизам резистенције на терапију у односу на класични механизам. Откриће и карактеризација варијанти малих колонија *S. aureus* (*Scvs*) је обезбедила нови поглед у разумевању патогенезе повезане са стафилококним обољењима [43]. Варијанте малих колонија *S. aureus* се све више јављају у рекурентним и перзистентним инфекцијама [43, 44]. *Scvs* су стекле способност преживљавања пошто могу да се сакрију унутар ћелије домаћина, која их штити од одбране домаћина и смањује њихову изложеност антибиотицима [45]. Кашњење тачне идентификације и теста осетљивости због све сложенијих процедура у лабораторијама може довести до грешака у дијагностици и погрешних терапија [45]. Фенотипска детекција MRSA је одувек проблематична још од њеног првог појављивања 1962. године [46]. Фенотипска експресија *mecA* гена може бити хетеротипска или хомотипска и због тога детекција метицилин резистенције може захтевати индукцију PBP2a у случају хетеротипске експресије [47]. Промене услова раста као што су температура и концентрација соли, значајно утичу на експресију резистенције [47]. Диск дифузиона метода остаје најшире примењена у рутинском раду клиничких лабораторија, међутим постоје и неки комерцијални системи за детекцију метицилин резистенције. Код диск дифузионих тестова хиперпродуктори пеницилиназе могу показати мале метицилин, оксацилин или цефокситин зоне инхибиције док прави метицилин/оксацилин/цефокситин резистентни изолати не показују зону инхибиције [9]. Детекција *mecA* гена или његовог продукта, пеницилин везујућег протеина (PBP2a), се сматра златним стандардом за потврду MRSA изолата [46]. *mecA* ген је регулисан



репресором MecI и метицилин-резистентним регулаторним протеином, MecR1. У одсуству бета-лактамског антибиотика, MecI потискује транскрипцију *mecA*, *mecR1* и *mecI*. У присуству бета-лактамских антибиотика, MecR1 се аутокаталитички поцепи и домен MecR1 који је металопротеаза постаје активан. Ова металопротеаза цепа MecI, дозвољавајући транскрипцију *mecA* гену продукцију PBP2a [48].

Ген *mecA* је лоциран на мобилном генетском елементу величине од 20 килобазних парова (kbp) до више од 100 kbp, који је назван стафилококна хромозомска касета *mec* (енгл. the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*)) [49]. Сматра се да SCC*mec* води порекло од других бактеријских врста и да је интегрисана у хромозом *S. aureus*. Уз то, постављена је хипотеза да се SCC*mec* пренеси хоризонталном трансмисијом између различитих врста стафилокока [50, 51, 52, 53]. SCC*mec* се састоји из гена који кодирају *ccr* рекомбиназе (енгл. cassette chromosome recombinase (*ccr*)), спајајући регион (J) и директно поновљене секвенце 15-базних парова (bp) на оба краја. SCC*mec* је присутан на специфичном месту на хромозому, SCC*mec* месту везивања (*attB<sub>scc</sub>*), на 3' крају отвореног оквира читања (енгл. open reading frame (ORF)) са непознатом функцијом (*orfX*) [50, 49]. На основу разлика у структури и величини, до сада је именовано 10 главних типова (I-X) SCC*mec* и неколико варијанти [49, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61]. SCC*mec* типови I, IV, V, VI и VII углавном изазивају резистенцију на бета-лактамске антибиотике, док SCC*mec* тип II и III изазивају мултирезистенцију због додатних гена резистенције интегрисане у SCC*mec* [55]. SCC*mec* тип је класификован по *mec* комплексу (региону који садржи *mecA*, *mecR*, IS/*mecI*, IS431) и *ccr* генском комплексу (регион са генима који кодирају рекомбиназе као што су *ccrA*, *ccrB* или *ccrC*). SCC*mec* може бити подељен на подтипове на основу различитих J региона (J1-J3), који ограничавају *mec* и *ccr* комплекс [49, 55, 62]. *S. aureus* може такође носити додатне гене резистенције на другим местима у геному, као што су транспозони и плазмиди [63]. Генерално, већина MRSA изолата стечених у заједници (енгл. community acquired CA-MRSA) носе SCC*mec* типа IV, V или VII, док се SCC*mec* типови I, II и III углавном налазе међу изолатима стеченим у болници (енгл. hospital-acquired MRSA (HA-MRSA)) [55, 64]. До данас нису нађени убедљиви докази да су MRSA сојеви вирулентнији од MSSA сојева. SCC*mec* не садржи ниједан ген вируленције и зато није директно повезан са могућим повећањем вируленције MRSA изолата. Међутим, неке епидемиолошке студије, укључујући мета-анализе, су откриле повећан морбидитет и/или морталитет од нозокомијалних MRSA изолата [65, 66]. Насупрот томе, друге студије су показале да

нема повећања у морталитету због нозокомијалних MRSA бактеријемија или пнеумонија у поређењу са инфекцијама MSSA сојевима [67, 68]. Међутим, према недавно изведеној мета-анализи, колонизација MRSA сојем је повезана са 4 пута већим ризиком од инфекције у поређењу са колонизацијом MSSA сојем [69]. Исходи инфекција са MRSA сојевима су лошији због тежине болести, неадекватне или неефикасне терапије и продуженог болничког лечења [70, 69, 71]. Иако питање да ли је MRSA вирулентнији од MSSA остаје нерешено, јасно је да су инфекције MRSA сојевима повезане са већим трошковима и ограниченом могућношћу лечења [67, 72, 73].

Недавно изведене студије су показале да је диск дифузиона метода тестирања осетљивости на цефокситин далеко супериорнија од фенотипске методе тестирања са оксацилин диском и оксацилин агаром у идентификацији MRSA изолата [74]. Резултати цефокситин диск дифузионог теста су у сагласности резултатима PCR детекције *tesA* гена. Отуд, тест може бити алтернатива за PCR детекцију MRSA сојева у лабораторијама где постоје ограничене финансијске могућности [75]. У тестовима за испитивање осетљивости на антибиотике, утврђивање MIC-а дилуционом методом је традиционално референтна метода, али на тест утврђивања MIC вредности за метицилин утиче много фактора, тако да су забележени и нетачни резултати [9]. Као референтне, MIC методе су сад замењене молекуларним методама, које детектују *tesA* ген [9]. Генотипизација бактерија је поље у коме се стално ради на техничким иновацијама [76]. Методе засноване на PCR техници се рутински користе у референтним лабораторијама као стандардне методе за детекцију *tesA* гена. Детекција MRSA изолата мултиплекс PCR методом се користи за Sccmec типизацију MRSA изолата [10]. Добијени умножени производи се детектују електрофорезом на 0,1% агарозном гелу који садржи етидијум бромид [76].

Подаци генотипизације из великих међународних студија су показали да је неколико клонова MRSA одговорно за ширење обољења у различитим деловима света [77]. Праћење географске дистрибуције епидемијских клонова може допринети разумевању због чега се неки клонови MRSA могу проширити по целом свету, док су други ограничени на једну земљу, град или болницу [78]. Ако се нађу неки клинички специфични сојеви стафилокока, било би важно идентификовати их фенотипски и генотипски да би се детектовале особине које их издвајају у посебну групу [10]. Клицоноштво у носу изгледа да има централну улогу у епидемиологији и патогенези инфекција са *S. aureus* [41]. Показано је да у већини случајева да је извор *S. aureus* који

је изазвао бактеријемiju пацијентов нос и да колонизација MRSA изолатима доводи до аутоинфекције у већем проценту него колонизација са MSSA [79]. Уколико су предње носнице биле колонизоване са MRSA сојем, бактерије су присутне и у грлу, тако да и грло мора бити укључено у скринингу на клицоноштво [29]. Недавни подаци сугеришу да су ректум и ране такође важна места за колонизацију и да ова места морају бити испитана као део протокола за праћење MRSA сојева. Једна студија је показала да је метицилин резистенција међу изолатима *S. aureus* достигла веома високу стопу, у неким болницама у Индији чак преко 70% [80]. Ширење MRSA сојева међу пацијентима у здравственим установама такође захтева ефикасну деколонизацију [29].

Разматрајући повећање инциденције инфекција изазваних метицилин резистентним стафилококом, поуздано, тачно и брзо тестирање на метицилин резистентност је најважније за терапију и контролу инфекција [29]. Инфекција метицилин резистентним сојевима има лош исход, дужу хоспитализацију и повећане трошкове у поређењу са инфекцијама метицилин осетљивим сојевима [43]. Ова појава сојева стафилокока резистентних на метицилин и друге антибиотике је главна брига, посебно у болничком окружењу, због повишене смртности услед системске инфекције метицилин резистентним стафилококом [81]. Пошто је инфекција MRSA сојевима постала све чешћа и у заједницама, развој емпиријске, антибиотске и терапијске стратегије за кожно и инфекције меког ткива је постао још проблематичнији [82]. Макролид-линкозамид-стрептограмин Б (MLSb) група антибитика је често коришћена у лечењу стафилококних инфекција [83].

#### **1.4 *Streptococcus pneumoniae***

*Streptococcus pneumoniae* изазива тешке инвазивне инфекције као што је менингитис, бактеријемija и пнеумоније, као и неинвазивне инфекције као што су синуситис и акутне упале средњег уха широм света [84]. Пнеумококи су такође и нормални становници слузокожа назофарингеалних мембрана код здраве деце и одраслих [85]. Иако се пнеумококна коњугована вакцина (PCV) све чешће користи, пнеумококне инфекције изазване не-вакциналним серотиповима и све већа резистенција *S. pneumoniae* на антибиотике постале су главни проблем јавног здравља [86, 87, 88].

*S. pneumoniae* или пнеумокок је Грам-позитивна, факултативно анаеробна, каталаза-негативна диплокока која продукује зелени хало (алфа-хемолизу) на крвном агару. Пнеумококе могу имати слузаве колоније због продукције различите количине капсуларног полисахарида [84]. Код људи, пнеумокок може изазвати лакше до јако тешке инфекције, а и назофарингеално клицоноштво пнеумокока је честа појава [84]. Полисахаридна капсула представља најспољашњи слој *S. pneumoniae*. Досада је откривен 91 структурно и серолошки различит тип капсуларног полисахарида [89]. Дистрибуција различитих серотипова се разликује зависно од година старости и географске локације, а посебни типови капсула се повезују са већом вирулентношћу [90]. Вишеструке студије су показале да неки серотипови и типови секвенци имају већи инвазивни потенцијал од других [91, 92, 93]. Испод дебеле полисахаридне капсуле налази се ћелијски зид, који се састоји од пептидогликана и теихоинске и липотеихоинске киселине, која садржи фосфорил холин. Теихоинска киселина је повезана са пептидогликаном, док је липотеихоинска киселина повезана са цитоплазматском мембраном [94, 95]. Уз то, најмање три различита сета пнеумококних површинских протеина је усидрено у ћелијски зид: холин-везујући протеини, протеини везани за пептидогликан и протеини везани за липид [94, 96]. 2001. године, Тетелин и сар. су описали цео геном пнеумококног серотипа [97]. Од тада, неколико комплетних пнеумококних генома било је секвенционирано, укључујући инвазивне и неинвазивне сојеве [26, 27, 98]. Геном *S. pneumoniae* се састоји од појединачног циркуларног хромозома, величине између 2,03 и 2,24 Мbp, која зависи од соја. Просечан садржај G+C пнеумококног генома је 40%. TIGR4, који је вирулентни пнеумококни изолат, има 2236 отворених оквира читања (open reading frames (ORF)), две трећине њих имају утврђену улогу и знају се њихови генетски продукти. Просечно 20% ORF-а постоји само код *S. pneumoniae*. Пнеумококе имају велики број инсерционих секвенци, које чине до 5% од целокупног генома [97, 99, 100].

Пнеумокок је важан људски патоген који изазива велики број различитих инфекција. Он може изазвати инфекцију слузокожа као што су синуситис и акутна упала средњег уха и тешке инвазивне инфекције као што је септикемија, менингитис, пнеумонија, артритис, перикардитис и перитонитис [85]. Инвазивно пнеумококно обољење је најчешће код деце млађе од 2 године, старијих од 65 година и имунокомпромитованих индивидуа. Сваке године, милион деце млађе од 5 година умре од пнеумококног обољења, углавном у Африци и земљама Азије [101]. Пре 2000. године инфекције бактеријом *S. pneumoniae*

годишње су биле узрок инвазивних обољења у просечно 60.000 случајева, укључујући 3300 случајева менингитиса у САД-у. Инциденција инфекција стерилних места варира од 21 до 33 случаја на 100.000 становника. Међутим, од увођења пнеумококне 7-валентне коњуговане вакцине (PCV7) 2000. године, инциденција инвазивних пнеумококних обољења била је 13 случајева на 100.000 становника у САД-у [102, 103]. У развијеним земљама, од 1995. до 2006. године, морталитет због инвазивних пнеумококних обољења кретао се од 5% до 30%, зависно од година старости, генетске предиспозиције, географске локације и основног здравственог стања, мада морталитет може бити висок и до 50%, као што је у Африци [92, 102, 104, 105, 106, 107]. У Европи, готово све северне земље имају опсежне системе надзора инвазивних пнеумококних обољења. 2007. године, пријављена инциденција за инвазивна пнеумококна обољења била је 21 случај/100.000 становника у Норвешкој и 16/100.000 у Шведској [108].

*S. pneumoniae* је најчешћи узрочник пнеумонија стечених у заједници [109]. Епидемије пнеумококних обољења се могу десити у пренатрпаним затвореним просторима, као што су здравствени центри, домови за незбринуте, касарне, сигурне куће [110, 111, 112]. Неколико фактора ризика су препознати за настанак пнеумококних пнеумонија и инвазивних пнеумококних обољења [107, 113, 114]. Акутна упала средњег уха (АОМ) је једно од најчешћих инфекција међу млађом децом у развијеним земљама, и представља значајно финансијско оптерећење систему здравствене заштите [115, 116]. Антибиотска резистенција код сојева *S. pneumoniae* је постала један од главних проблема јавног здравља. Према подацима европске мреже за праћење антимикуробне резистенције (the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)), 7% инвазивних изолата *S. pneumoniae* је пријављено од стране 27 европских земаља који су били резистентни на пеницилин 2009. године. Високи ниво (изнад 25%) инвазивних пеницилин резистентних сојева *S. pneumoniae* био је углавном пријављен од стране јужних и источних европских земаља, док су северне земље пријављивале ниже стопе резистенције, испод 5% [87]. Међутим, у Финској, еритромицин и пеницилин резистентни сојеви су били у порасту од 16% до 28%, односно, од 8% до 16% међу пнеумококним изолатима откривеним из узорака крви и цереброспиналне течности, између 2002. и 2006. године [117]. Пропорција пеницилин- и еритромицин-резистентних пнеумококних сојева који изазивају АОМ процењена на глобалном нивоу је између 30% и 70% [118].

Запажено је повећање инциденције пнеумококних обољења изазваних не-вакциналним серотиповима [86, 88, 119, 120]. *S. pneumoniae* може колонизовати назофарингеалне нише здраве деце и одраслих. Колонизација доводи до асимптоматског клицоноштва, мада у неким случајевима колонизација може довести и до обољења [121]. Пнеумококно клицоноштво почиње за време првог месеца живота и најзаступљеније је међу младом децом [121, 122, 123]. Стопа пнеумококног клицоноштва здраве деце широко варира од 2% до 70% [124, 125, 126, 127].

Пнеумококна инфекција обично настаје једним серотипом, стеченим непосредно пре почетка симптома. Међутим, код пнеумококног клицоноштва често може истовремено бити присутно више серотипова [85, 122, 128]. Чести фактори ризика од пнеумококног клицоноштва су националност, густина насељености, социоекономске карактеристике окружења. Средина и социоекономски фактори ризика укључују број чланова домаћинства, приходе, пушење и недавну употребу антибиотика [121]. Уз то, недавна студија је показала да за појаву астме, пнеумококно клицоноштво може представљати значајан фактор ризика [129].

## 1.5 *Enterococcus* spp.

Ентерококе, посебно врсте *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*, су одговорне за бројне инфекције широм света и друге или треће су по учесталости болничких сојева патогених микроорганизама [130]. Последњих година ове опортунистичке бактерије постале су све резистентније на антибиотике. У прилог томе говори и податак о појави ванкомицин-резистентног соја *E. faecium* (VREF) [131]. Пошто су VREF изолати резистентни на бета-лактамске и гликопептидне антибиотике, само још неколико антибиотика могу деловати на њих: квинпристин-далфопристин (Q-D), линезолид и даптомицин [131, 132]. Q-D је инјектабилан стрептограмин одобрен од FDA у САД-у за лечење тешких VREF инфекција повезаних са бактеријемјом [132]. Стрептограмини формирају са макролидима (тј. еритромицином) и линкозамидима (тј. линкомицином и клиндамицином) групу структурно различитих антибиотика (названих MLS), који имају сличне механизме деловања и унакрсно су резистентни [81]. У ствари, стрептограмини одговарају мешавини два једињења која делују синергистички: стрептограмина А (тј. далфопристин) и стрептограмина Б (тј. квинпристин). Уз то, плеуромутилини (тј.

тиамулин) су такође класа инхибитора синтезе протеина који деле место везивања на рибозому са линкозамидима и стрептограмином групе А [133]. Код ентерокока, MLS резистенција настаје углавном због алтерације рибозома, посредством рибозомалних метилаза кодираних *ermB* или *ermA* (раније именован *erm(TR)*) генима, који су одговорни за унакрсну резистенцију на све макролиде, линкозамиде и стрептограмине групе Б (MLS<sub>B</sub> фенотип), а која може бити конститутивна или индуцибилна [81]. Постоји такође, јединствен механизам унакрсне резистенције на линкозамиде, стрептограмине А и плеуромутилине посредством активног избацивања антибиотика из ћелије ABC транспортним системом (LSAP фенотип (LSa фенотип)). На пример, урођена LSAP резистенција код *E. faecalis* настаје услед продукције ABC (АТФ-везујућа касета) хомолога, LsaA [134, 135, 136]. Други Lsa-слични протеини укључени у LSAP резистенцији, LsaB и LsaE идентификовани су код *Staphylococcus* spp. [137, 138, 139, 140], док је LsaC протеин описан код *S. agalactiae* [141, 142]. За разлику од бактерија *E. faecalis*, врста *E. faecium* је урођено осетљива на све макролиде и њима сродна једињења, а LSAP резистенција може настати *in vivo* после терапије Q-D-ом [143]. Иако је LSAP резистенција највероватније последица мутације гена на бактеријском хромозому, биохемијски и генетски механизам ове резистенције није у потпуности расветљен [144].

## 1.6 *Streptococcus agalactiae*

*Streptococcus agalactiae* (група Б стрептокока) је главни узрочник инвазивне инфекције код новорођенчади и трудних жена. Такође се све чешће јавља као значајан узрочник инфекција код одраслих, посебно међу имунокомпромитованим пацијентима [145, 146]. *S. agalactiae* је одговорна за акутна и хронична обољења, као што су инфекције респираторног тракта, ендокардитиси, сепсе, менингитиси, пијелонефритиси и неуролошки проблеми [147]. Пеницилин Г и ампицилин су терапија избора за инфекције узроковане бактеријама *S. agalactiae*. Међутим, у случају толеранције на пеницилине или недостатка клиничког одговора, клиндамицин и макролиди су алтернативни антибиотици [148]. *S. agalactiae* (група Б стрептокок, GBS) је водећи узрочник неонаталних инфекција код људи. Важан је узрочник обољевања трудних жена и старијих са неком примарном болешћу као што је diabetes mellitus или се налазе на имunosупресивној терапији [149, 150, 151]. Овај микроорганизам представља део нормалне флоре дигестивног и гениталног тракта и колонизује генитални тракт 10-40%

трудних жена [152]. Код одраслих и трудних жена, GBS може изазвати уринарну инфекцију, хориоамнионитис, ендометритис, пнеумонију, инфекције коже и меког ткива [151, 152]. Код новорођенчади GBS је изазивач неонаталне сепсе, пнеумоније и менингитиса [153, 154, 155]. Трансмисија бактерија са мајке на дете се дешава асцендентно из гениталног тракта мајке на амнионску течност или при порођају [156]. Инфекције новорођенчади GBS бактеријама су класификоване на: обољења са раним почетком, када се дешавају у периоду од рођења до 6. дана (70-80% случајева) и обољења са касним почетком, када се дешавају у периоду после 7. и пре 90. дана од рођења. Ове инфекције настају трансмисијом бактерија од мајке или бабице на дете [157, 158, 159]. За лечење инфекција изазваних GBS-ом, пеницилин и ампицилин су лекови првог избора, а као алтернативни сматрају се цефалоспорини и ванкомицин [160, 161]. Ниједан случај резистенције на пеницилин досада није пријављен. Међутим, пријављени су случајеви GBS сојева са интермедијарном осетљивошћу, односно, повећаним вредностима минималне инхибиторне концентрације (MIC) за пеницилин [162, 163, 164]. Поред макролида и линкозамида постоје и други антибиотици који се користе као замена за пеницилине код пацијента преосетљивих на пеницилин, један од њих је ванкомицин [165, 166, 167]. Механизам резистенције на еритромицин код GBS-а је углавном модификација рибозома, кодирана *erm* генима (*ermB*, *ermA/ermTR*), која доводи до унакрсне резистенције на макролиде, линкозамиде и стрепторамине групе Б (MLSb) или активна ефлукс пумпа, кодирана *mefA* геном, која изазива резистенцију на 14-члане и 15-члане макролиде [168, 169, 170]. Резистенција на еритромицин настала посредством *erm* гена може бити индуцибилна (iMLSb) или конститутивна (cMLSb) [171, 172]. Резистенција на клиндамицин код GBS-а је мање учестала и настаје као последица модификације антибиотика од стране бактеријског ензима кодираног *lnuB* генима [173]. Мултиплекс PCR се може употребити за детекцију главних гена резистенције на еритромицин и клиндамицин код GBS сојева [170, 174].

## 1.7 *Streptococcus pyogenes*

Билрот је 1874. године први пут открио стрептококе код пацијента са инфекцијом коже, а 1879. године Пастер је пронашао ове бактерије у крви пацијенткиње са пуерпералном сепсом. Фејлаизен је 1883. године објавио рад о клиничком значају бактерија које формирају ланце код људи, а Розенбак је први пут 1884. године употребио име



---

*Streptococcus pyogenes*. *S. pyogenes* је Грам-позитивна кока, која је 1933. године сврстана у Лансфилдову групу А стрептокока (GAS) [175]. Појединачна бактеријска ћелија је сферног облика, величине од 0,5-1  $\mu\text{m}$ , непокретна је и обично се налази у паровима или дужим и краћим ланцима. То је факултативно анаеробни микроорганизам, каталаза и оксидаза негативан [176]. Лансфилдова класификациона шема је издвојила ове стрептококе на основу њиховог групног А угљеног хидрата, сачињеног од N-ацетилглюкозамина повезаног са мрежом полимера рамнозе [175]. На крвном агару, колоније формирају велику зону бета-хемоллизе, која настаје услед продукције стрептолизина-О који врши комплетну лизу еритроцита [177].

*S. pyogenes* изазива широк спектар обољења, од некомплицованих инфекција горњег респираторног тракта и коже, до тешких, животно угрожавајућих инфекција [178]. Глобалну учесталост инфекција изазваних GAS-ом је тешко проценити. Неке од инфекција изазване бактеријама *S. pyogenes* су веома честе у сиромашним и земљама у развоју, међутим, у тим регионима обично не постоје поуздани системи за пријаву болести и праћење исте [179]. Са доступним подацима, процењено је да постоји најмање 517.000 смртних случајева годишње узрокованих тешким GAS инфекцијама, а највише реуматским обољењем срца, чија је преваленција око 15,6 милиона случајева, инциденција 282.000 а и специфична стопа морталитета је 163.000 случајева годишње. Приближно 111 милиона случајева пиодермије и преко 616 милиона случајева фарингитиса се пријави годишње у свету [179]. Клиндамицин смањује и продукцију М протеина стрептокока групе А, смањењем продукције протеина умешаних у аутоимуну одговор, што доводи до бољег терапијског исхода [180, 181]. Удружена терапија клиндамицином и бета-лактамским антибиотицима се препоручује у лечењу инфекција непознатог узрочника да би се покриле и стрептококе и *S. aureus*, док се присуство GAS-а не потврди. Пеницилин је релативно неефикасан у лечењу стрептококних инфекција меког ткива с обзиром на велики број бактерија са ниском стопом репликације (eagle effect), што представља парадоксално смањење деловања пеницилина при високој концентрацији [182].

Постоје велике географске и временске варијације у учесталости макролид-резистентног *S. pyogenes*. Опадање резистентности на макролиде код *S. pyogenes* се повезује са контролисаном и смањеном употребом макролида у популацији, мада и природна флукуација макролид резистентних клонова игра важну улогу у укупној преваленцији тих сојева. Разлике пронађене међу GAS изолатима из узорка једног пацијента

покренуле су питање да ли је проучавање бактерије на основу једне колоније у микробиолошкој лабораторији довело да потцењивања стопе резистенције на макролиде међу стрептококама групе А. 321 изолат GAS-а из брисева 35 пацијената са фарингитисом прегледан је у једној болници, ради утврђивања потенцијалних разлика у профилу резистенције на антибиотике и *emm* типу [183]. Од тога је по 10 изолата узето из једног узорка. Сви изолати из узорка једног пацијента су имала исти профил резистенције на антибиотике и припадали су истом *emm* типу, чиме је утврђено да је лабораторијска анализа једне колоније изолата дала поуздану стопу макролид-резистенције међу стрептококама групе А [183].

Механизам деловања бета-лактамских антибиотика укључује везивање и инактивацију бактеријских протеина (PBP) који су одговорни за синтезу ћелијског зида [184]. Код бактерија *S. pneumoniae*, резистенција на пеницилин међу дивљим сојевима је везана за мозаик гена, који доводе до замене дела PBP-а осетљивог соја са делом резистентног соја путем природне трансформације. Упркос широкој употреби пеницилина у лечењу инфекција изазваних групом А стрептокока, досад није откривен *S. pyogenes* резистентан на бета-лактаме *in vivo*. Један од разлога за то је што PBP *S. pyogenes* не садржи дуге регионе сличне онима код других стрептокока, што смањује могућност хомологе рекомбинације са другим стрептококама [185]. На основу створених лабораторијских мутаната пеницилин-резистентних *S. pyogenes*, дошло се до закључка да би појава пеницилин резистентних стрептокока групе А довела до значајних промена у биологији саме бактерије. Дошло би до експресије PBP нижег афинитета, појаве физиолошких дефеката, слабог степена раста бактерије, смањења продукције M протеина и појаве других морфолошких абнормалности [186, 187].

## 1.8 Макролиди

Макролиди су позната класа антибиотика често препоручивана за лечење неспецифичних инфекција респираторног тракта стечених у заједници. Бројни антибиотици са различитим спектром деловања су синтетисани хемијском модификацијом структурног језгра макролида, тј. макроцикличног лактамског прстена. Иако структурно разноврсни, макролиди деле заједничку способност везивања за 50S под-јединицу бактеријског рибозома на месту пептидилтрансфераза центра или ефлукс

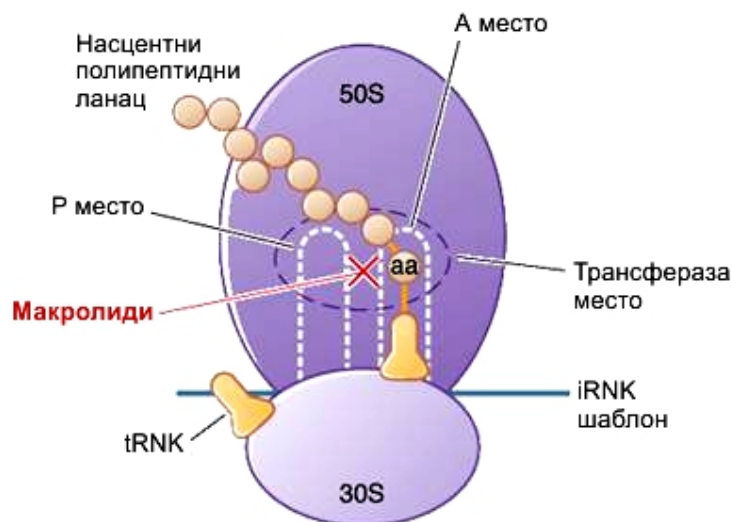
пумпе. Новији макролиди, а посебно азитромицин са својим широким спектром деловања, проширили су терапеутску примену ове класе антибиотика [188].

Доктор Абелардо Б. Агвилар, филипински научник, 1949. године је послао узорке земље свом послодавцу Ели Лили. Њен истраживачки тим је успео да из тог узорка земље одвоји еритромицин од осталих метаболитских продуката актиномицете врсте *Streptomyces erythreus* (назив је промењен у *Saccharopolyspora erythraea*). 1952. године је еритромицин постао доступан за терапијску примену, под именом Илосон (према филипинском острву са кога је узорак земље донет, Илиолио). Роберт Б. Вудворд, професор са Харвардског универзитета, је 1981. године постхумно добио Нобелову награду зато што је заједно са великим бројем других истраживача успео да синтетише еритромицин А.

Антибиотик кларитромицин је откривен од стране јапанске фармацеутске компаније 70-тих година као резултат труда да се превазиђе нестабилност еритромицина у киселој средини. Једињења која су изведена из еритромицина су: азитромицин, кларитромицин, диритромицин, митемицанл, олеандомицин, рокситромицин, спирамицин, телитромицин.

Макролиди садрже вишечлане лактонске прстенове (14-члани прстенови еритромицина и кларитромицина и 15-члани прстенови азитромицина) за које су припојени један или више деокси шећера. Кларитромицин се разликује од еритромицина само по метилисаној хидроксилној групи на 6. позицији, а азитромицин се разликује по додатку метил групе уместо атома азота у лактонском прстену. Ова структурна модификација повећава ацидо-резистентност, пенетрацију лека у ткива и проширује спектар деловања лека [189].

Еритромицин показује бактериостатско деловање, односно, инхибише раст бактерија. Везивањем за 50S подјединицу бактеријског 70S rRNK комплекса, еритромицин и други макролиди инхибирају синтезу протеина, важних за структуру, функционисање и репликацију бактерија. Еритромицин ремети аминоксил транслокацију, спречава пребацивање tRNK са А места на Р место rRNK комплекса. Ако не дође до транслокације А-место остаје заузето, чиме се спречава везивање нових tRNK са аминокиселинама и долази до инхибиције елонгације полипептидног ланца (Слика 1). Ово је основни механизам деловања макролида на бактерије [189].



**Слика 1.** Механизам деловања макролида (преузето са сајта NIPA, National information program on antibiotics, <http://www.antibiotics-info.org/azithromycin.html>)

Еритромицин је антибиотик који се користи за третман бројних бактеријских инфекција. Он спада у класу макролида и има исти или незнатно шири спектар деловања од пеницилина. Он се често користи као замена за пеницилин код људи преосетљивих на пеницилин. Код инфекција респираторног тракта, еритромицин делује и на изазиваче атипичних пнеумонија, као што су бактерије рода *Mycoplasma* и *Legionella*. Осетљиви сојеви *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* и вириданс стрептокока имају вредности МИС-а за еритромицин од 0,015 до 1  $\mu\text{g/ml}$ . Резистенција на макролиде је честа међу стрептококама. Резистенција на еритромицин подразумева резистенцију и на све остале макролиде, односно унакрсна резистентности међу макролидима је комплетна [189]. Стафилококе често нису осетљиве на еритромицин. Макролид-резистентни сојеви *S. aureus* су потенцијално унакрсно резистентни и на клиндамицин и на стрептограмин групе Б [189].

Кларитромицин је незнатно делотворнији од еритромицина на стрептококе и стафилококе, а има скромнији ефекат на *Haemophilus influenzae* и *Neisseria gonorrhoeae*. Кларитромицин добро делује на *Moraxella catarrhalis*, *Chlamydia* spp., *Legionella pneumophila*, *Borrelia burgdorferi*, *Mycoplasma pneumoniae* и *Helicobacter pylori* [189]. Азитромицин је мање ефикасан од еритромицина на Грам-позитивне микроорганизме и за нијансу је ефикаснији и од еритромицина и кларитромицина против *H. influenzae* и *Campylobacter* spp. Азитромицин је веома ефикасан против бактерија *Moraxella*

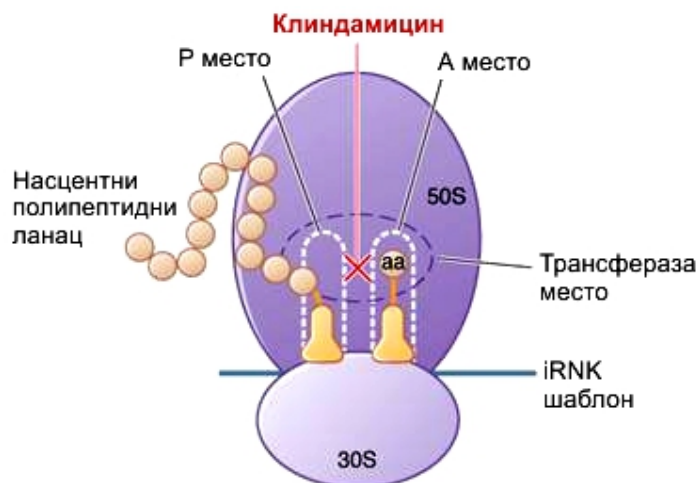
---

*catarrhalis*, *Pasteurella multocida*, *Chlamydia* spp., *M. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *B. burgdorferi*, *Fusobacterium* spp. и *N. gonorrhoeae* [189].

## 1.9 Линкозамиди

Линкозамиди укључују линкомицин, природни производ неколико актиномицета и клиндамицин полусинтетски дериват добијен хлоринацијом линкомицина. Ови антибиотици делују на Грам-позитивне коке и анаеробе. Линкозамиди се нормално користе за третирање стафилокока и стрептокока и делују ефикасно на *Bacteroides fragilis* и неке друге анаеробе. Они се користе у лечењу токсичног шок синдрома и директно блокирају продукцију М протеина код стрептокока доводећи до јачег инфламаторног одговора. Линкозамиди су класа антибиотика која се најчешће повезује са настанком псеудомембранозног колитиса врстом *Clostridium difficile* [190]. Линкозамиди делују на све Грам-позитивне коке, изузев на *Enterococcus faecalis* [134]. Они инхибирају синтезу протеина блокирујући активност пептидилтрансферазе 50S подјединице бактеријског рибозома [191]. Први откривени линкозамид био је линкомицин, а изолован је из актиномицете *Streptomyces lincolnensis*, нађене у узорку земље из Линколна у Небраски [192]. Жуч је важан пут екскреције линкомицина из организма. Значајна концентрација линкомицина је присутна у већини ткива. Иако, линкомицин дифундује у среброспиналну течност, концентрација линкомицина није довољна за лечење менингитиса. Линкомицин има узак спектар деловања, делује на Грам-позитивне бактерије и оне без ћелијског зида: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Mycoplasma*. Линкомицин се користи за лечење тешких бактеријских инфекција код људи који су преосетљиви на пеницилине. Линкомицин слабо делује на Грам-негативне бактерије. Линкомицини спречавају репликацију бактерија реметећи синтезу протеина у њима. Они се везују за 23S део 50S подјединице бактеријског рибозома и доводе до прераног одвајања пептидил-tRНК од рибозома. Линкозамиди не ремете синтезу протеина у хуманим ћелијама (као ни у другим еукариотским ћелијама) зато што се хумани рибозоми структурно разликују од бактеријских рибозома.

Клиндамицин је полусинтетски дериват линкомицина [189]. Искључиво се везује за 50S подјединицу бактеријског рибозома и супримира синтезу протеина (Слика 2).



**Слика 2.** Механизам деловања клиндамицина (преузето са сајта NIPA, National information program on antibiotics, <http://www.antibiotics-info.org/clindamycin.html>)

Резистенција на макролиде услед метилације рибозома *erm*-кодираном метилазом, такође може довести и до резистенције на клиндамицин. Међутим, пошто клиндамицин не индукује продукцију метилаза, унакрсна резистенција се јавља само уколико се ензим продукује конститутивно [189]. Клиндамицин није супстрат макролид ефлукс пумпе, па сојеви који су резистентни на макролиде, деловањем овог механизма резистенције остају и даље осетљиви на клиндамицин. Клиндамицин као и еритромицин *in vitro* делује на пнеумококе, *S. pyogenes* и вириданс стрептококе. Метицилин осетљиви сојеви *S. aureus* су обично осетљиви, док су метицилин резистентни сојеви стафилокока углавном резистентни на клиндамицин. Клиндамицин је ефикасан лек за лечење кожних и инфекција меких ткива и озбиљних инфекција изазваних стафилококом, као и анаеробним бактеријама. Он одлично продире у сва ткива (изузев централног нервног система) и акумулира се у апсцесима, полиморфонуклеарним леукоцитима и алвеоларним макрофагима, не показујући потребу за дозним прилагођавањем код бубрежних болесника [193]. Добра орална апсорпција чини га важним у терапији амбулантних пацијената, али је добар и за наставак лечења хоспитализованих пацијената након интравенске терапије. Клиндамицин је такође посебно важан као алтернативни антибиотик код пацијената преосетљивих на пеницилин [194].

## 1.10 Сложени механизми резистенције MLS антибиотика

Механизми резистенције на макролиде и линкозамиде су већ описани код микроорганизама који их продукују. Ти микроорганизми истовремено поседују и механизме заштите од сопствених токсичних метаболита [81]. Резистенција на макролиде и линкозамиде је обично резултат деловања једног од три механизма резистенције:

1. Модификација рибозома: Индуцибилна или конститутивна продукција ензима, метилаза, који модификују место везивања антибиотика на рибозому и на тај начин умањује деловање лека, посредством *ermA*, *ermB* и *ermC* гена.
2. Активно избацивање антибиотика: Ефлукс антибиотика механизмом активне пумпе, кодиране *msrA*, *msrB*, *mefA* или *mefE* геном код стафилокока, односно, групе А стрептокока или *S. pneumoniae*.
3. Модификација антибиотика: Идентификовано је неколико ензима који модификују и инактивишу MLS антибиотике, а најзначајнији је линкомицин нуклеотидилтрансфераза који кодирају: *lnuA* ген код стафилокока и *lnuB* ген код бактерија врсте *Enterococcus faecium* и *Streptococcus agalactiae* [149].

### 1.10.1 Модификација рибозома

N<sup>6</sup>диметилације специфичног аденина, A2058, који се налази у региону пептидил трансферазе унутар V домена на 23S RNK - компоненти 50S рибозомске подјединице бактерија, доводи до унакрсне резистенције на макролиде, линкозамиде и стрептограмине групе Б (MLSb) [195, 196].

Породица ензима одговорних за метилацију је означена скраћеницом *erm* (од енгл. erythromycin resistance methylase - еритромицин рибозом метилаза).

Профил резистенције познат као MLSb фенотип може бити:

- индуцибилан (iMLSb)
- конститутиван (cMLSb).

Гени одговорни за модификацију рибозома код различитих врста бактерија су:

- Пет *erm* гена откривено је код бактерија *S. aureus*: *ermA*, *ermC*, и мање присутни *ermB*, *ermF* и *ermY* [197].
- Резистентност на макролиде код бактерија *S. pyogenes* је примарно кодирана *erm* генима, *ermA/ermTR* и *ermB*. [81, 198].
- Код бактерија *S. agalactiae* резистентност на еритромицин и клиндамицин се углавном приписује *ermB*, *ermA/ermTR* и *ermC* генима [199].
- На ограниченом броју изолата бактерија *S. pneumoniae* и *Enterococcus* spp. доминантно су описани *ermB* гени. [200].
- ДиПерсио и сар. су први објавили присуство *ermT* гена резистенције код бактерија *Streptococcus β-haemolyticus* групе Д и *Enterococcus* spp. [201].

Метилација је први механизам резистенције на макролиде и јавља се услед посттранскрипционе модификације 23S rRNA метилтрансферазама [196]. Генерално, гени који кодирају ове метилазе се означавају са *erm* и до сад је описано неколико класа *erm* гена [202]. Пошто се место везивања на 50S рибозомској подјединици за еритромицин преклапа са местом везивања за новије макролиде као и линкозамиде и стрептограмин групе Б, модификација метилацијом смањује везивање и највећег броја макролида, линкозамида и стрептограмина групе Б, стварајући MLSb фенотип резистенције [203]. Експресија MLSb резистенције може бити конститутивна или индуцибилна, стварајући cMLSb, односно, iMLSb фенотип. У случају iMLSb фенотипа, бактерија продукује инактивну iRNA која постаје активна само у присуству макролида као индуктора. У присуству индуктора (обично еритромицина), настаје прерасподела iRNA, која дозвољава рибозому да преведе секвенцу која кодира метилазу [81]. Насупрот томе, код бактерија које показују cMLSb фенотип резистенције активна iRNA метилаза се продукује у одсуству индуктора. Фенотипски, iMLSb изолати показују смањену зону инхибиције клиндамицина према еритромицин диску у дуплом диск дифузионом тесту, док је уобичајени кружни облик зоне инхибиције присутан око клиндамицина кад је удаљен од диска еритромицина [204]. Многи од *erm* гена су повезани са конјугабилним и неконјугабилним транспонзонима који су често повезани са другим генима резистенције, мада су неки од ових гена нађени и на плазмидима [202, 205]. Ови транспонзони, који имају могућност премештања гена резистенције на



осетљиве изолате конјугацијом [206, 207], имају велики број могућих домаћина, што објашњава запажање да различите врсте бактерија носе *erm* гене [202].

Антибиотиком индуковано заустављање транслације *i*RNK и синтезе протеина у бактеријској ћелији води до повећане реактивности ErmC протеина, метилтрансферазе, која модификовањем велике подјединице рибозомалне RNK (rRNK) доводи до резистенције на макролиде. Заустављање транслације *i*RNK од стране насцентног полипептидног ланца настаје због интеракције тог ланца и рибозомалног тунела.

Велики број лидер пептида индукује одлагање транслације и тиме регулише транслацију нисходног гена. За време синтезе протеина, насцентни полипептидни ланци унутар рибозомалног канала може у цис облику индуковати кочење рибозома и може утицати на експресију нисходних гена. ErmCL лидер код пептида *S. aureus* индукује кочење у присуству клинички важних антибиотика из групе макролида, као што је еритромицин, индукујући експресију нисходног гена и продукцију ErmC метилтрансфераза. ErmCL насцентни пептидни ланац под утицајем директне везе антибиотика и тунела индукује алостеричну конформацију и премештања у пептидилтрансфераза центру (PTC) рибозома. ErmCL-индуковано премештање у пептидил трансфераза центар спречава стабилно везивање и смештај аминокиселине тРНК на А-место, чиме доводи до инхибиције формирања пептида и заустављања процеса транслације.

### 1.10.2 Активно избацивање антибиотика

Ген *msrA*, *msrB* и новооткривени *msrC* кодирају АТФ-зависну ефлуку пумпу (ABC), која доводи до резистенције на 14-члане и 15-члане макролиде и стрептограмине Б (MSb фенотип резистенције) [81, 200]. Други механизам, одговоран за резистенцију на 14-члане и 15-члане макролиде и осетљивост на 16-члане макролиде, линкозамиде и стрептограмине групе Б (M/MSb фенотип), настаје акцијом протеина везаних за цитоплазматску мембрану који испумпавају антибиотике изван ћелије, одржавајући интрацелуларну концентрацију антибиотика ниском и спречавајући везивање антибиотика за рибозоме. Ова пумпа, повезана са цитоплазматском мембраном, је кодирана *mef* генима (макролид ефлуку) [208]. Описано је већ неколико *mef* гена, а најчешћи међу њима је *mefA* ген [209]. *mefE* ген је прво описан код *S. pneumoniae* и он дели 90% DNK и 91% аминокиселина са *mefA* геном, односно, његовим протеином

[210]. Присуство овог гена је такође потврђено у изолатима *S. pyogenes* [211]. Разлика између *mefA* и *mefE* гена је епидемиолошки важна зато што их носе различити генетски елементи, а њихов начин преношења је различит [212, 213]. Код *S. pyogenes* су нађени и други *mef* гени, као што су *mefI*, *mefO* и *mef* ген мозаичне структуре, код које је 5' регион идентичан оном код *mefA* и 3' регион идентичан оном код *mefE* [211, 214]. *mefA* ген је обично повезан са химеричним елементом, састављеним од транспонзона инсертованог у профаг [215], док су *mefE* гени често повезани са сложеним транспонзонима, у којима се налазе и други гени резистенције [213]. Генетски елементи који носе *mef* гене су већ показали способност хоризонталног преношења унутар врсте *S. pyogenes* [207, 216, 217]. Ген *mefA* код бактерија *S. pyogenes* и ген *mefE* нађен код *S. pneumoniae* и *Enterococcus* spp., доводе до резистенције на 14-члане и 15-члане макролиде и осетљивости на линкозамиде и стрептограмине (М фенотип резистенције) [218]. Бактерије рода *Enterococcus*, према досадашњим истраживањима, могу имати у свом геному и *msrC* ген, који кодира активно избацивање макролида и стрептограмина групе Б [201].

Холенбек и сар. су показали важност *lsa* гена, одговорног за урођену резистенцију на стрептограмине А и линкозамиде код бактерија *E. faecalis* (LSa фенотип) [219].

### 1.10.3 Модификација антибиотика

Идентификовано је неколико ензима који модификују MLS антибиотике, а најзначајнији међу њима је линкомицин нуклеотидилтрансфераза кога кодирају:

- *lnuA* ген код стафилокока
- *lnuB* ген код бактерија врсте *E. faecium* и *S. agalactiae*.

Овај ензим је одговоран за настанак резистенције на линкозамиде и стрептограмине Б (LSb фенотип резистенције) [220]. Насупрот MLSb фенотипу резистенције, специфична резистенција на линкозамиде настаје ензимском инактивацијом антибиотика. Фосфорилација и нуклеотидилација хидроксил групе на позицији 3 је била запажена код неколико врста стрептомицета [221, 222]. Линкозамид нуклеотидилтрансферазе кодирани *lnu* генима (претходно *lin*) су биле проучаване и код људи и код животињских врста [223, 224, 225, 226]. Код клиничких изолата било је описано 6 *lnu* гена: *lnuA*, *lnuA'*, *lnuB*, *lnuB-like*, *lnuAN<sub>2</sub>* и *linF* [227, 228, 229, 230, 231]. О-нуклеотидилтрансферазе кодирани овим генима инактивирају аденилацију линкозамида [227, 229]. *lnuA* и *lnuA'*

гени су нађени код врсте *S. haemolyticus* и *S. aureus* [228, 229]. *InuA* и *InuA'* кодирају два изоензима од 161 аминокиселине, који се разликују у 14 аминокиселина. *InuA<sub>N2</sub>* ген, хомологан *InuA* и *InuA'* генима (55% идентичности), је нађен код бактерија *Bacteroides* spp. [231]. Овај ген носе мобилни транспозони. *InuB* ген је описан код врсте *E. faecium* [227]. *InuB* ген не показује хомологију са другим *Inu* генима и носи га велики конјугабилни плазмид. Недавно су идентификовани *InuB*-like ген (79% идентичности са *InuB*) и *linF* ген (34,9% идентичности са *InuB*) код *Eubacterium*, односно код врсте *Escherichia coli* [230]. Код *E. coli*, *linF* ген даје унакрсну резистенцију на линкомицин и клиндамицин, док код других микроорганизама, *Inu* гени дају резистенцију на линкомицин али не и на клиндамицин. Међутим, клиндамицин у том случају више не делује бактерицидно на осетљиве сојеве [226]. Нови *InuC* ген даје резистенцију на линкомицин код клиничких сојева *S. agalactiae*.

Изолована резистенција на линкозамиде која дефинише L фенотип је ретка и описана је код *S. agalactiae*. Недавно су на Новом Зеланду пријављени сојеви *S. agalactiae* интермедијарно осетљиви или резистентни на клиндамицин и линкомицин, а осетљиви на еритромицин [141]. Међутим, ова резистенција на линкозамиде је комбинована са високом вредношћу MIC-а за далфопристин (4 до 32 µg/ml), стрептограмин групе А, што дефинише такозвани L<sub>Sa</sub> фенотип. Биохемијска и генетска основа ове резистенције је за сад непозната.

У Канади је пријављен један сој резистентан на клиндамицин и осетљив на еритромицин који је носио *InuB* (*linB*) ген, сличан гену који је први пут нађен код соја *E. faecium*, а био је одговоран за линкозамид нуклеотидилацију [227, 232].

Нови ген, назван *InuC*, није тако блиско сродан другим *Inu* генима. Масеном спектрофотометријом је доказано да он доводи до резистенције на линкомицин због нуклеотидилације антибиотика. Прецизно место нуклеотидилације линкомицина и клиндамицина није описано. LnuA нуклеотидилтрансфераза модификује хидроксил групу на клиндамицину и линкомицину на позицији 3, односно 4. Насупрот томе, LnuB модификује хидроксил групу на позицији 3 и на клиндамицину и на линкомицину. *InuC* ген је посредовао у инактивацији и линкомицина и клиндамицина у Грам-позитивној бактерији и у трансформисаној *E. coli*. Међутим, код *S. agalactiae* је била констатована само резистентност на линкомицин, док је код *E. coli* била констатована резистентност и на линкомицин и на клиндамицин. Разлог за различиту фенотипску експресију гена

резистенције остаје неразјашњен. Можда је структурна разлика између два линкозамида повезана са разликама у афинитету клиндамицина и линкомицина за везивање на рибозому код Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија и за *LnuC* ензим. Клиндамицин можда има већи афинитет за рибозоме Грам-позитивних бактерија него за *LnuC* ензим. Ген *lnuC* је лоциран на генетском елементу који садржи *IS1* транспозаза ген и који је карактеристичан по несавршеним инвертованим понављањима. Структура овог генетског елемента је слична али не и идентична структури транспонзона, а постоје и сличности и разлике између овог генетског елемента и класичних инсерционих секвенци.

## 1.11 D-тест

Још давне 1969. године примећена је повезаност резистентности на еритромицин и клиндамицин [233]. Касније је показано да се индуцибилна резистенција на клиндамицин може конвертовати у конститутивну [234], а бројни извештаји о неуспеху терапије инфекција изазваних стафилококама, које показују индуцибилни тип MLS резистенције, потврђују претходне налазе [235, 236].

Клиндамицин осетљив и еритромицин резистентан сој бактерије може развити резистенцију на клиндамицин [81]. Производ *erm* гена је рибозом метилаза чија је експресија нормално минимална. Еритромицин индукује продукцију метилазе, због чега су ти сојеви резистентни на еритромицин, али мутација у региону промотера *erm* гена доводи до продукције метилаза без индуктора [204, 237]. Ови мутанти су конститутивно еритромицин и клиндамицин резистентни, мада се еритромицин резистенција може јавити и захваљујући другим механизмима (тј. ефлукс пумпа и ензимска модификација лека) [238]. D-тест идентификује индуцибилну клиндамицин резистенцију која указује на могућност конвертовања индуцибилне у конститутивну клиндамицин резистенцију [239]. Ниски нивои еритромицина су најефикаснији индуктори индуцибилне MLSb резистенције. Постоје специјални диск дифузиони тестови који детектују, уз помоћ еритромицина као индуктора, сојеве са iMLSb фенотипом резистенције [237]. Ови тестови подразумевају стављање еритромицин диска у непосредној близини диска са клиндамицином или линкомицином. Пошто еритромицин дифундује кроз агар, индукује резистентност на линкозамиде, доводећи до заравњења зоне инхибиције око

---

линкозамида на страни окренутој према диску еритромицина, дајући јој облик великог латиничног слова D (ефекат D-зоне). Фибелкорн и сар. су сугерисали да је мањи простор између дискова у односу на стандардни, неопходан за добијање индуцибилне резистенције, оптимално растојање између дискова је од 10 до 15 mm; растојање 20 mm између дискова и већа концентрација еритромицина (30 µg) се такође препоручују [193].

Позитивни D-тест указује на присуство *erm* гена који могу довести до конститутивне клиндамицин резистенције и неуспеха у лечењу инфекције клиндамицином [239]. Осетљивост D-теста за детекцију iMLSb сојева који садрже *ermA* или *ermC* ген била је 100% на 15 до 20 mm и 97% на 26 до 28 mm за *S. aureus*, док је за коагулаза негативне стафилококе била 100% на 20 и 26 mm растојања између дискова [193]. Осетљивост D-теста са 15-20 mm растојања између дискова еритромицина и клиндамицина била је 100% у поређењу са анализом реакције ланчаног умножавања (енг. polymerase chain reaction (PCR)) *erm* и *msr* гена [193, 240, 241]. Клинички изолати који показују iMLSb фенотип резистенције имају високу стопу спонтаних мутација, употреба неиндукторских антибиотика као што је клиндамицин могу довести до селекције конститутивних мутаната са учесталашћу од 10<sup>-7</sup> cfu (енг. colony forming units, јединица формираних колонија) [242, 243, 244]. МекГи и други истраживачи су потврдили ову брзу *in vitro* конверзију индуцибилне у конститутивну MLSb резистенцију код стафилокока [242]. Постоје бројни случајеви лоших исхода лечења озбиљних инфекција изазваних сојевима стафилокока са iMLSb фенотипом резистенције клиндамицином или линкомицином [242, 245]. Клиндамицин је био дуго времена коришћен за лечење кожних, инфекција меког ткива и озбиљнијих инфекција, и то све због његове ефикасности против MRSA и MSSA сојева, као и анаеробних бактерија. Индуцибилна клиндамицин резистенција је довела у питање употребу клиндамицина код еритромицин резистентних стафилокока. Међутим, уколико индуцибилна резистенција може бити рутински поуздано откривена код клинички значајних изолата, клиндамицин се може са сигурношћу употребити код пацијената инфицираним сојевима бактерија које показују "праву" клиндамицин осетљивост [242]. CLSI препоручује растојање између дискова од 15 до 26 mm [246].

Тестови који се користе за детекцију индуцибилне макролид-линкозамид-стрептограмин Б (iMLSb) резистенције су:

- 
- Фенотипска метода: диск дифузиони индукциони тест односно дупли диск дифузиони тест, познат као "D-тест"
  - Генотипска метода: идентификација *erm* гена мултиплекс PCR-ом.

Клиндамицин није подесан уколико су изолати D-тест позитивни, све док се дефинитивно не докаже да је изолат D-тест негативан [247]. Сојеви са *erm* посредованом еритромицин резистенцијом могу поседовати индуцибилну клиндамицин резистенцију али се могу показати и осетљивим на клиндамицин у рутинском диск дифузионом тестирању осетљивости. Лабораторије и клиничари морају бити свесни преваленције iMLSb фенотипа резистенције међу Грам-позитивним кокама у свом окружењу. Преваленција индуцибилне клиндамицин резистенције се може разликовати и између две болнице у истом географском подручју [242]. Пошто је D-тест једноставан, јефтин и лак за извођење, може бити укључен као део рутинског тестирања бактеријске осетљивости на антибиотике. Корист од рутинског извођења D-теста је идентификација сојева са правом осетљивошћу на клиндамицин [82].

## 2 ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

### 2.1 Циљеви истраживања

1. Утврдити један од пет фенотипова MLSb резистенције за изолате *S. aureus*, коагулаза негативне стафилококе, *Enterococcus* spp., *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* и *S. pyogenes*, коришћењем D-теста.
2. Идентификовати гене одговорне за MLSb резистенцију: *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, *msrB*, *mefA/E*, *lnuA*, *lnuB*, *lsaA* и *lsaC* за изолате *S. aureus*, коагулаза негативне стафилококе, *Enterococcus* spp., *S. agalactiae* и *S. pyogenes*, коришћењем мултиплекс PCR-а.
3. Утврдити и упоредити учесталост фенотипова и гена MLSb резистенције код Грам-позитивних кока према: врстама бактерија, врстама материјала (брисеви грла и носа, генитални секрет, пиокултуре) и пореклу материјала (амбулантни и болнички).
4. Утврдити сензитивност и специфичност D-теста, на основу присуства *erm* гена, код изолата који су показали iMLSb фенотип резистенције.

### 2.2 Хипотезе истраживања

1. Постоји статистички значајна разлика у учесталости фенотипова и гена MLSb резистенције између метицилин-резистентних и осетљивих стафилокока.
2. Постоји статистички значајна разлика у учесталости фенотипова и гена MLSb резистенције између различитих врста Грам-позитивних кока.
3. Постоји статистички значајна разлика у учесталости фенотипова и гена MLSb резистенције између болничких и амбулантних изолата Грам-позитивних кока.
4. Постоји статистички значајна разлика у учесталости фенотипова и гена MLSb резистенције између изолата Грам-позитивних кока изолованих из различитих врста материјала.

### **3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

#### **3.1 План истраживања**

Истраживање спроведено у оквиру ове студије имало је две фазе:

- У Центру за микробиологију Завода за јавно здравље у Врању извршено је микробиолошко испитивање и утврђивање фенотипова MLSb резистенције.
- У Центру за микробиологију Института за јавно здравље у Крагујевцу обављена је екстракција бактеријске DNK и припрема узорака за даљу анализу, изведено је умножавање секвенци испитиваних гена резистенције (PCR) као и њихова визуелизација гел-електрофорезом на агарозном гелу.

#### **3.2 Узорковање и примарна изолација**

Бактерије су биле изоловане из редовног материјала који је упућиван из пријемних амбуланти свих шест општина Пчињског округа у Центар за микробиологију Завода за јавно здравље у Врању, у периоду између новембра 2013. и априла 2014. године. Завод за јавно здравље у Врању налази се на територији Пчињског округа смештеног на југу Србије (Слика 3). Пчињски округ има површину од 3.520 km<sup>2</sup>, приближно 245.000 становника и чини га град Врање и општине Владичин Хан, Сурдулица, Босилеград, Трговиште, Бујановац и Прешево.





**Слика 3.** Положај Пчињског округа у оквиру територије Републике Србије

У студију је био укључен само по један изолат од сваког пацијента. Изолати су били преузети из различитих врста материјала и то: 881 изолат из брисева грла и носа, 858 из пиокултура и 617 из гениталних секрета и из материјала различитог порекла укључујући изолате амбулантног и болничког порекла. Узорци су обрађивани унутар двосатног временског оквира од тренутка пријема, како је прописано стандардном процедуром [28]. Они су засејавани на неселективну чврсту подлогу са 5% овчијом крви (крвни агар), ендо агару, диференцијалној подлози, и инокулисани су у декстрозни бујон за обогаћивање, а затим су инкубирани 24 до 48 сати на 37 °С.

### 3.3 Бактеријски сојеви

Истраживање је спроведено у виду експерименталне студије на микроорганизмима *in vitro*. У испитивање су били укључени клинички изолати Грам-позитивних кока: *Staphylococcus aureus*, коагулаза-негативне стафилококе, *Enterococcus* spp, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* и *Streptococcus pyogenes* и референтни сојеви *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

### 3.4 Методе анализе бактеријских сојева

У студији су као варијабле испитиване: врста бактерија и њихова осетљивост на антибиотике, MLS фенотипови резистенције и гени MLS резистенције.

#### 3.4.1 Микробиолошко испитивање

Микробиолошко испитивање подразумевало је идентификацију бактерија и испитивање њихове осетљивости на доступне антибиотике. Сви приспели узорци били су засејани на храњиву неселективну подлогу крвни агар и инкубирани 18 до 24 часа на 37°C у термостату у аеробним условима. Бактерије су биле идентификоване, у зависности од морфологије њихових колонија, класичном биохемијском идентификацијом и серолошком идентификацијом. Испитивање осетљивости изолованих бактерија на антибиотике (антибиограм) било је рађено према препорукама CLSI [246].

##### 3.4.1.1 Идентификација бактерија

- **Вактерије рода *Staphylococcus*:** Узорци су били инокулисани у декстрозни бујон и на крвном агару, инкубисани од 18 до 24 сата на 37°C. Забележена је свака појава златно жутих или беж обојених, непрозирних колонија на крвном агару. Од примарних култура је прављен размаз на предметном стаклу, који је затим био бојен по Граму. Микроскопирањем су се на препарату виделе Грам-позитивне коке у гроздовима. После опсервације примарних култура, у даљој

идентификацији стафилокока до нивоа врсте рађен је коагулаза тест на плочици (везана коагулаза) за детекцију "clumping" фактора [248]. По две капи физиолошког раствора су стављане на два места на предметном стаклу. По једна колонија је стављана у круг сваке капи и затим је размућивана. Једна кап плазме је додавана на први круг и мешана дрвеним штапићем. Једна кап физиолошког раствора је додавана у други круг, мешана и затим коришћена као негативна контрола. Плочица је нагињана напред-назад. Посматрана је на присуство аглутинације, тј. "clumping" фактора. Слична суспензија позитивне и негативне контроле је тестирана истовремено. Хомогена и млечна суспензија контроле са физиолошким раствором указивала је на то да нема аутоаглутинације. Тест је сматран позитивним уколико се аглутинација појави у року од 10 до 15 секунди. Тест је сматран негативним уколико се не виде громуљице после два минута.

Тест коагулазе у епрувети је вршен тако што је 0,5 ml хумане плазме (растворене физиолошким раствором у односу 1:5) одмеравано у стерилну епрувету. Затим је у епрувету додавано 0,1 ml једнодневне културе стафилококног бујона. Позитивна контрола *S. aureus* ATCC 25923 и позната негативна контрола су постављане истовремено. Епрувете се инкубирају 4 сата на 37°C. Формација угрушка се видела лаганим нагињањем епрувете после 4 сата. Уколико се угрушак није видео после 4 сата, епрувета је даље инкубирана на собној температури и читавана после 18 до 24 сата. Тест је сматран позитивним уколико се могао видети било који степен згрушавања. Тест је сматран негативним уколико није било згрушавања чак ни после 18 до 24 сата инкубације. На манитол сланом агару ("Charman" подлози), од 18 до 24 сата инкубирани смо суспектне колоније на стафилокок. Посматрали смо присуство жуто пребојених колонија које су указивале на ферментацију манитола и на толеранцију бактерија на 7,5% концентрацију соли. Кремасто/златно жуте, бета-хемолитичке колоније, каталаза позитивне, коагулаза позитивне и манитол ферментујуће су биле идентификоване као *S. aureus*. Кремасто/беле колоније, каталаза позитивне, коагулаза негативне и манитол неферментујуће су биле идентификоване као коагулаза негативне стафилококе.

- ***Streptococcus pneumoniae***: Прелиминарна идентификација вршена је према фенотипским карактеристикама колонија примарне културе на крвном агару (морфологија и  $\alpha$ -хемолиза), после инкубације на 35°C, 24 сата. Тест каталазе за *S. pneumoniae* је био негативан. У каталаза тесту, каталаза ензим разлаже водоник

пероксид ( $H_2O_2$ ) који се дода у капима на суспектне колоније, на  $H_2O$  и  $O_2$ . Код каталаза позитивних колонија кисеоник се ослобађа у виду мехурића. Каталаза тест примарно служи за диференцијацију бактерија рода *Staphylococcus*, које су каталаза позитивне, од бактерија рода *Streptococcus* и *Enterococcus*, које су каталаза негативне. Потврдна идентификација *S. pneumoniae* је вршена тестом осетљивости на оптохин (etilhidrokuprein hidrohlorid) [249].

- **Бактерије рода *Enterococcus*:** На основу фенотипских карактеристика колонија на примарној култури на крвном агару (морфологија колоније,  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -хемолитичке) извршена је прелиминарна идентификација бактерија рода *Enterococcus*. Сви суспектни изолати субкултивисани су на ескулин жучни агар, или Рошеову (Rochaix) подлогу, која је диференцијална подлога намењена за идентификацију бактерија рода *Enterococcus*, и извршен је тест ферментације шећера малтозе и сахарозе (бактерије рода *Enterococcus* врше ферментацију малтозе и сахарозе).
- ***Streptococcus agalactiae*:** Прелиминарна идентификација вршена је према фенотипским карактеристикама колонија примарне културе на крвном агару (морфологија и  $\alpha$ '-хемолитичка), после инкубације на  $35^\circ C$ , 24 сата. Идентификација *S. agalactiae* је вршена CAMP тестом [250]. Идентификација сваког изолата је потврђена на групу Б  $\beta$ -хемолитичког стрептокока тј. *S. agalactiae* латекс аглутинацијом на плочици (Streptex-Slidex® Strepto Plus-bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).
- ***Streptococcus pyogenes*:** Идентификација је вршена провером свих бета-хемолитичких сјајних колонија, на крвном агару са 5% овчије крви. Прелиминарна идентификација је урађена тестирањем осетљивости изолата на бацитрацин [251, 252, 253, 254] (0.04 UI, Тахо А, BBL Microbiology system). На основу серолошке класификације од стране Ребеке Ленсфилд, 1933. године [175], постоји комерцијални кит за идентификацију бета-хемолитичких стрептокока, који укључује ензимску екстракцију угљених хидрата и аглутинацију са специфичним серумом. Потврдна идентификација бета-хемолитичких стрептокока рађена је латекс аглутинацијом на плочици (Streptex-Slidex® Strepto Plus-bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) [251].

### 3.4.1.2 Тестирање антибиотске осетљивости

Тестиран је само један изолат по пацијенту. Чишћење културе изолата је урађено пре сваког тестирања осетљивости бактерија на антибиотике. Тестирање осетљивости на антибиотике је рађено на Милер Хинтон агару по Кирби Бауер диск дифузионој методи према CLSI препорукама [246]. За прављење суспензије је коришћено четири до пет колонија од културе старе 16 до 24 часа са чврсте подлоге и 0,85% NaCl раствор. Ова суспензија је упоређивана са 0,5 МекФарланд стандардом, да би се добио инокулум приближне мутноће, а затим је инокулисан на Милер Хинтон агару да би се добио конфлуентни пораст испитиване бактерије.

Употребљавани су следећи антибиотски дискови:

1. Ампицилин 10 µg
2. Амоксицилин /клавуланска киселина 20/10 µg
3. Еритромицин 15 µg
4. Клиндамицин 2 µg
5. Гентамицин 10 µg
6. Гентамицин 100 µg (висока доза гентамицина за тестирање ентерокока)
7. Амикацин 30 µg
8. Ципрофлоксацин 5 µg
9. Тетрациклин 30 µg
10. Котримоксазол 25 µg
11. Пеницилин Г 10 µg
12. Цефтриаксон 30 µg
13. Цефокситин 30 µg
14. Ванкомицин 30 µg
15. Линезолид 30 µg.

Плоче су биле инкубирани на 37°C, 18 до 24 сата. За читавање резултата теста мерили смо пречнике зона инхибиције. Антибиотска активност читавана је као пречник зоне инхибиције у mm. Изолати су били класификовани као осетљиви (S), резистентни (R) и интермедијарно осетљиви (I), према критеријумима CLSI [28]. За контролу квалитета коришћени су контролни сојеви *S. pneumoniae* ATCC 49619 и *S. agalactiae* ATCC 12403. Контрола квалитета (енг. Quality control (QC)) за еритромицин (Er) и клиндамицин (Kli) дискове била је извршена са *S. aureus* ATCC 25923 према стандардној диск дифузионој

QC процедури [255]. Додатно, QC је била вршена са сопственим лабораторијским сојевима *S. aureus*, од којих су једни имали позитиван а други негативан резултат D-теста [255]. Резултати су интерпретирани према CLSI препорукама из 2012. године [256].

### 3.4.1.3 Метицилин резистенција

Метицилин резистенција била је идентификована на основу осетљивости стафилокока на цефокситин. Изолат је сматран метицилин резистентним уколико је зона инхибиције имала пречник око цефокситин диска (30  $\mu\text{g}$ ) мањи или једнак 21 mm [257].

### 3.4.2 Утврђивање фенотипова MLS резистенције

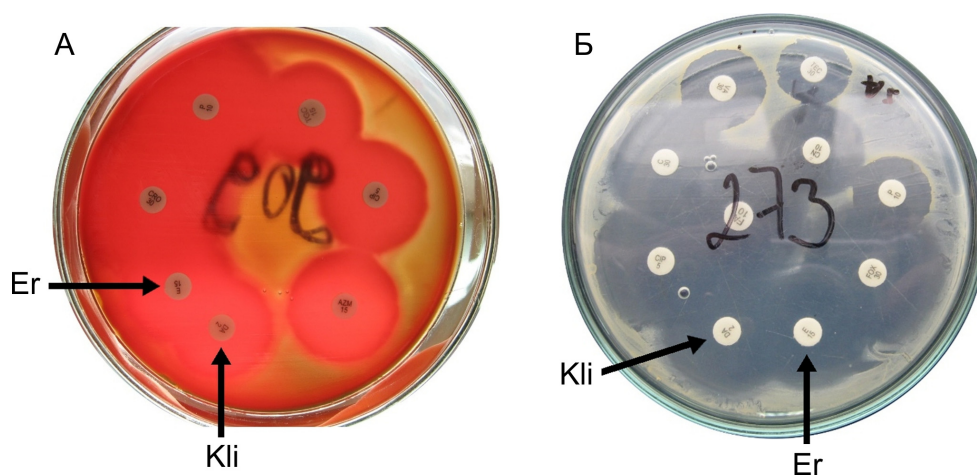
Фенотипови резистенције на макролиде и линкозамиде су утврђени D-тестом са растојањем између дискова еритромицина (15  $\mu\text{g}$ ) и клиндамицина (2  $\mu\text{g}$ ) од 12 mm (ивица од ивице). Антибиотска активност читавана је као пречник зоне инхибиције у mm. Изолати су били класификовани као осетљиви (S), резистентни (R) и интермедијарно осетљиви (I), према критеријумима CLSI [256].

У дупли диск дифузионом тесту (D-тест) смо инокулисали Милер Хинтон и Милер Хинтон са 5% овчијом крви подлоге суспензијом бактерија густине 0,5 МекФарланда. Еритромицин (15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) диск је стављан на удаљености од 12 mm (ивица од ивице) од клиндамицин (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) диска. После једноноћне инкубације на 37°C, вршено је читавање пречника зоне инхибиције у mm, присуство зоне инхибиције облика великог латиничног слова D око клиндамицин диска, као и присуство канала осетљивости између еритромицин и клиндамицин диска [246].

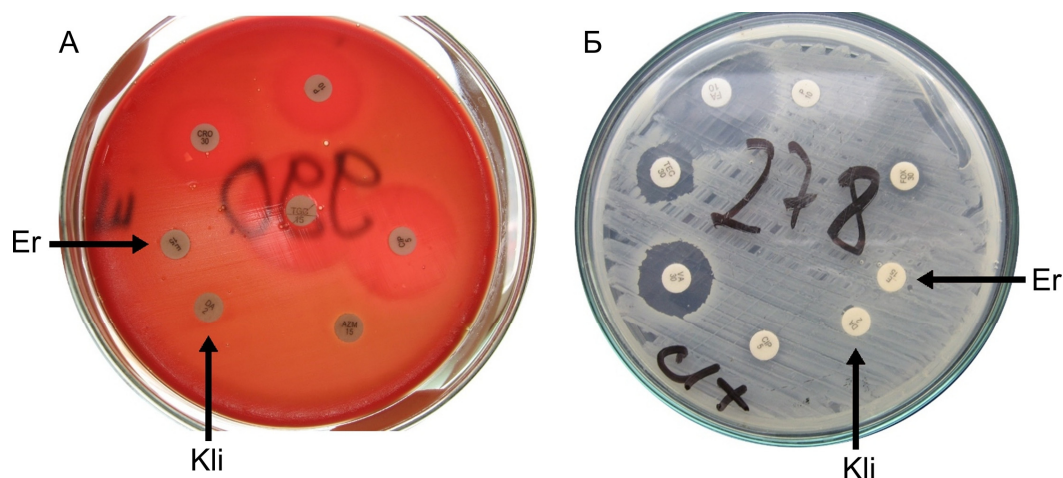
У овој студији су коришћени следећи критеријуми за читавање фенотипова резистенције:

- Eг/Kli S - изолат осетљив на еритромицин (пречник зоне инхибиције  $\geq 23$  mm) и осетљив на клиндамицин (пречник зоне инхибиције  $> 21$  mm) (Слика 4).
- cMLSb - конститутивни MLSb фенотип - изолат резистентан на еритромицин (пречник зоне инхибиције  $\leq 13$  mm) и резистентан на клиндамицин (пречник зоне инхибиције  $\leq 14$  mm) (Слика 5).

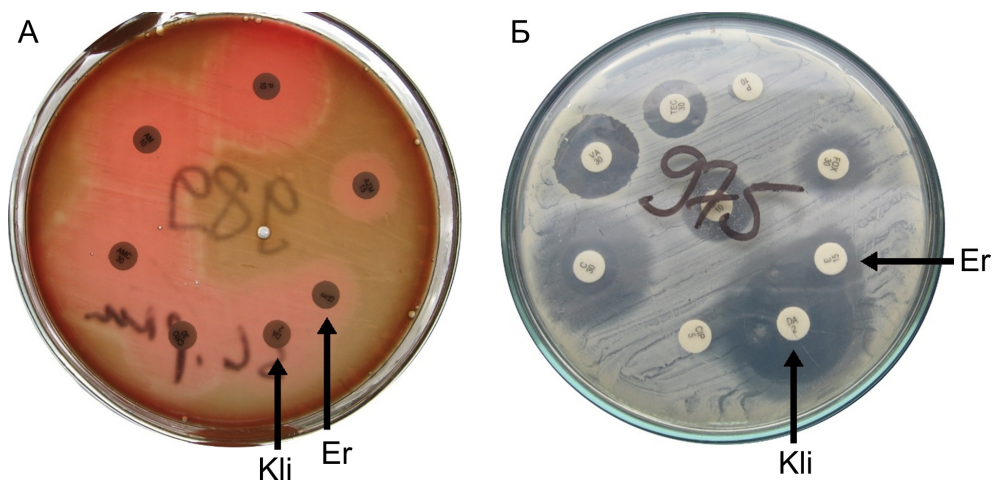
- M/MSb фенотип - изолат показују резистенцију на еритромицин (пречник зоне инхибиције  $\leq 13$  mm) и осетљивост на клиндамицин (пречник зоне инхибиције  $> 21$  mm) (Слика 6).
- iMLSb - индуцибилни MLSb фенотип - изолат показује резистенцију на еритромицин (пречник зоне инхибиције  $\leq 13$  mm) и осетљивост на клиндамицин (пречник зоне инхибиције  $> 21$  mm), зона инхибиције облика слова D око клиндамицина са заравњењем према еритромицин диску (Слика 7).
- L<sub>Sa</sub>/b - изолат осетљив на еритромицин (пречник зоне инхибиције  $\geq 23$  mm) и резистентан на клиндамицин (пречник зоне инхибиције  $\leq 14$  mm) (Слика 8).
- Нови "keyhole" фенотип - изолат осетљив на еритромицин (пречник зоне инхибиције  $\geq 23$  mm) и резистентан на клиндамицин (пречник зоне инхибиције  $\leq 14$  mm) са каналом осетљивости између диска еритромицина и клиндамицина указује на нови такозвани "keyhole" фенотип [246, 258] (Слика 9).



**Слика 4.** Диск дифузиона метода на Милер-Хинтон агару за израду антибиограма и D-тест (еритромицин и клиндамицин дискови обележени су стрелицама); **А:** Еритромицин осетљиви и клиндамицин осетљиви сој *S. pyogenes* (Er/Kli S); **Б:** Еритромицин осетљиви и клиндамицин осетљиви сој *S. aureus* (Er/Kli S)

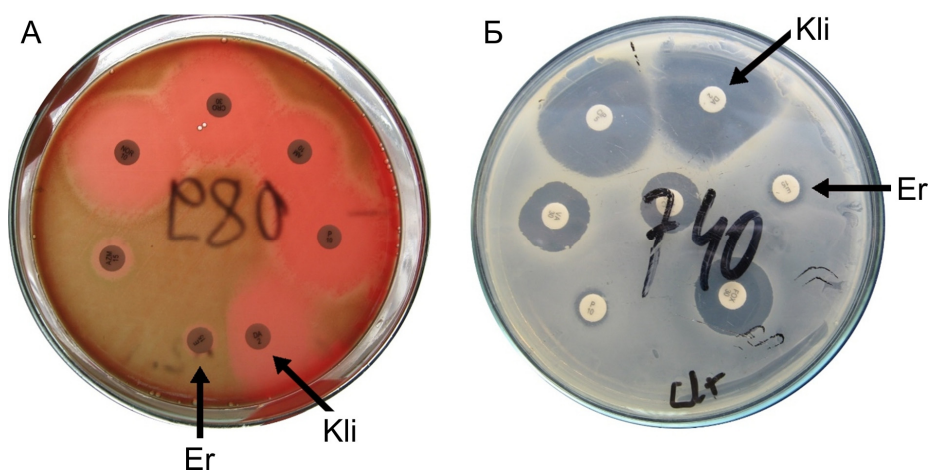


**Слика 5.** Диск дифузиона метода на Милер-Хинтон агару за израду антибиограма и D-тест (еритромицин и клиндамицин дискови обележени су стрелицама); **А:** Еритромицин резистентни и клиндамицин резистентни сој *S. agalactiae* (cMLSb); **Б:** Еритромицин резистентни и клиндамицин резистентни сој коагулаза негативног стафилокока (cMLSb)

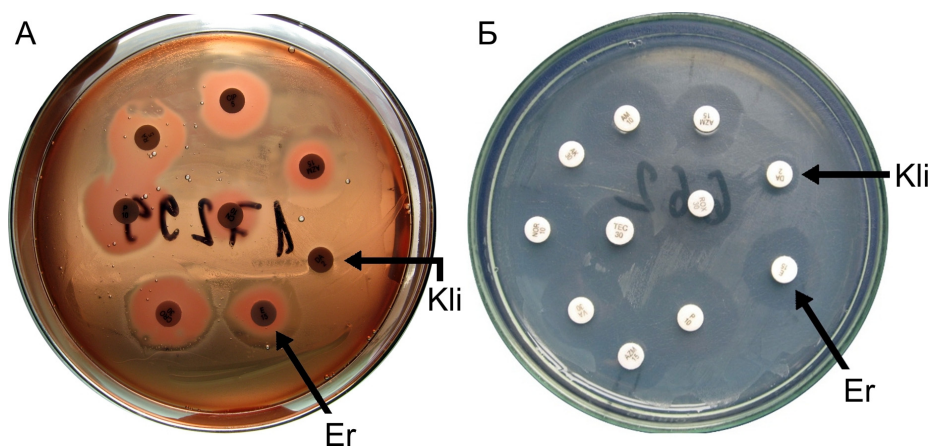


**Слика 6.** Диск дифузиона метода на Милер-Хинтон агару за израду антибиограма и D-тест (еритромицин и клиндамицин дискови обележени су стрелицама); **А:** Еритромицин резистентни и клиндамицин осетљиви сој *S. pneumoniae* (M/MSb); **Б:** Еритромицин резистентни и клиндамицин осетљиви сој коагулаза негативног стафилокока (M/MSb)

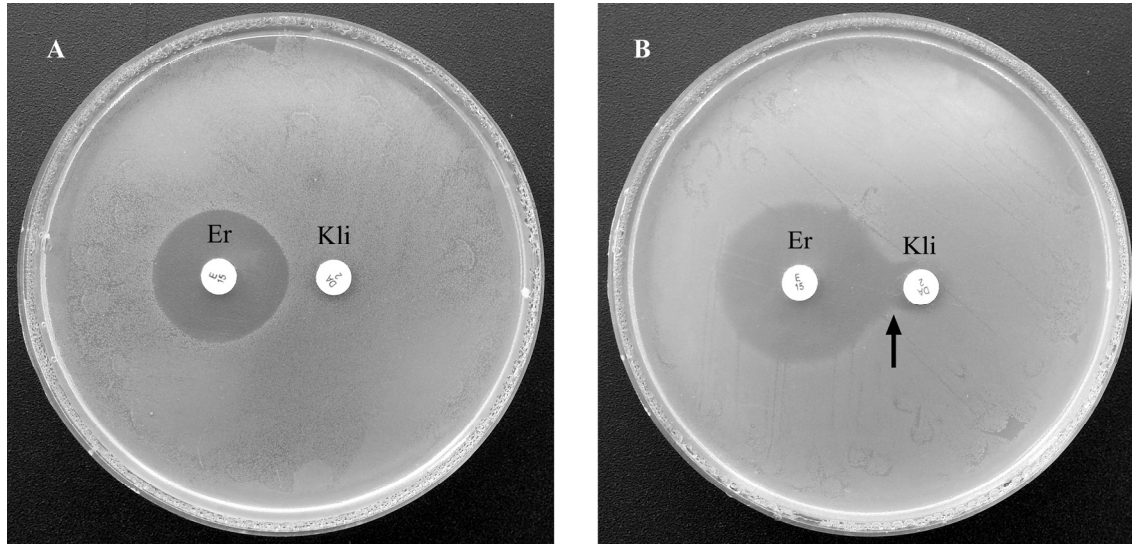




**Слика 7.** Диск дифузиона метода на Милер-Хинтон агару за израду антибиограма и D-тест (еритромицин и клиндамицин дискови обележени су стрелицама); **А:** Еритромицин резистентни и клиндамицин осетљиви сој *S. pneumoniae*, са заравњењем зоне инхибиције око клиндамицин диска са стране окренуте према еритромицин диску, у облику слова D (iMLSb); **Б:** Еритромицин резистентни и клиндамицин осетљиви сој *S. aureus*, са заравњењем зоне инхибиције око клиндамицин диска са стране окренуте према еритромицин диску, у облику слова D (iMLSb)



**Слика 8.** Диск дифузиона метода на Милер-Хинтон агару за израду антибиограма и D-тест (еритромицин и клиндамицин дискови обележени су стрелицама); **А:** Еритромицин осетљиви и клиндамицин резистентни сој *S. agalactiae* (LSa/b); **Б:** Еритромицин осетљиви и клиндамицин резистентни сој *Enterococcus* spp. (LSa/b)



**Слика 9.** Еритромицин (Er) и клиндамицин (Kli) дупли диск дифузиони тест на изолату *Enterococcus* spp.; **А:** Еритромицин осетљив и клиндамицин резистентни сој *Enterococcus* spp. (LSa/b); **Б:** LSa/b фенотип који личи на нови "keyhole" фенотип, са карактеристичним каналом сензитивности на клиндамицин у присуству еритромицина (обележен је стрелицом)

### 3.4.3 Идентификација гена MLS резистенције

#### 3.4.3.1 Изолација DNK и PCR прајмери

Бактеријска DNK је екстрахована китом PrepMan Ultra sample Preparation Reagent (Applied Biosystems, Inc.), према протоколу произвођача. Промућкали смо пре употребе бочицу PrepMan Ultra sample Preparation Reagent, а затим смо оставили бочицу да се садржај у њој слегне и нестану мехурићи из ње. У следећем кораку смо, да би спречили контаминацију боце са PrepMan Ultra sample Preparation Reagent, при свакој новој тури екстракције DNA одвајали у стерилну епрувету од 50 ml потребну количину реагенса стерилном пипетом, рачунајући да је за сваки узорак потребна количина од 100µl. У трећем кораку смо обележили све епрувете са поклопцем за микроцентрифугирање бројем узорка и отворили поклопце. Затим смо расподелили по 100µl PrepMan Ultra sample Preparation Reagent у сваку означену епрувету стерилном пипетом. После тога смо по пуну езу колонија са осамнаест часова старе културе суспендовали са 100µl PrepMan Ultra sample Preparation Reagent у одговарајуће обележене епрувете. Чврсто затворене епрувете за микроцентрифугирање су затим појединачно енергично на вортексу хомогенизоване од 10 до 30 секунди, а затим су смештене у термостат на 95°C

до 100 °C, 10 минута. За то време смо припремили други сет епрувета за микроцентрифуирање од 2 ml и означили их бројевима узорака. После вађења епрувета из термостата, остављене су на собној температури 2 минута, а затим су центрифугиране у микроцентрифуги на највећој брзини 2 минута. Затим је пребачено по 50µl супернатанта из сваке центрифугиране епрувете у други сет означених епрувета. После завршетка екстракције DNK, епрувете за микроцентрифуирање су чуване на -20°C све до започињања термичког циклусног протокола, односно умножавања DNK.

На 330 изолата, од укупног броја испитиваних сојева Грам-позитивних кока којима је утврђен MLS фенотип резистенције, мултиплекс PCR методом идентификовани су гени MLS резистенције (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA/B*, *mefA/E*, *lnuA*, *lnuB*, *lsaA* и *lsaC*) коришћењем прајмера, чије су секвенце (Табела 1) претходно публиковане [137, 143, 210, 259, 260, 261, 262].

**Табела 1.** PCR прајмери коришћени за умножавање гена резистенције код Грам-позитивних кока и услови умножавања код извођења PCR реакције

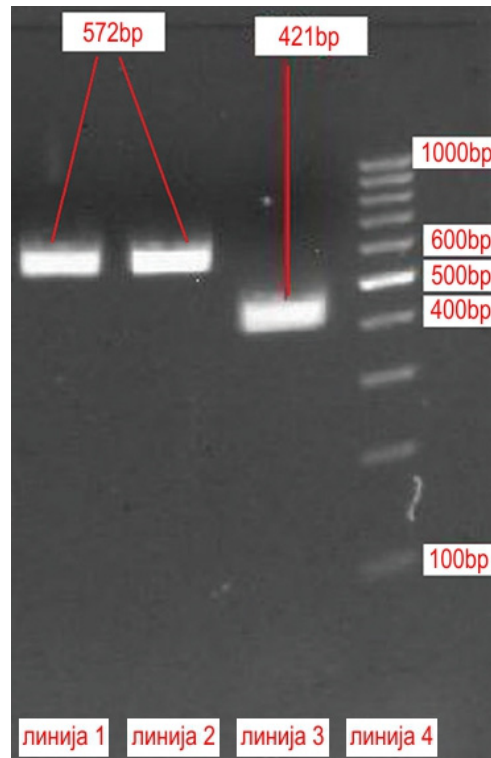
Ген	Секвенца прајмера (5'-3') Величина секвенце Референца	Услови PCR реакције
<i>ermA</i>	F: TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA R: CTTTCGATAGTTTATTAATATTAG 421bp [259]	95°C 180s; 40 циклуса (95°C 30s, 52°C 40s, 72°C 120s); 72°C 120s.
<i>ermB</i>	F: GAAAAAGTACTCAACCAAATA R: AGTAACGGTACTTAAATTGTTTA 639bp [259]	95°C 180s; 40 циклуса (95°C 30s, 52°C 40s, 72°C 120s); 72°C 120s.
<i>ermC</i>	F: TCAAAAACATAATATAGATAAA R: GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT 572bp [259]	95°C 180s; 40 циклуса (95°C 30s, 52°C 40s, 72°C 120s); 72°C 120s.
<i>msrA</i>	F: GGCACAATAAGAGTGTTTAAAGG R: AAGTTATATCATGAATAGATTGTCCTGTT 940bp [260]	95°C 180s; 40 циклуса (94°C 60s, 50°C 60s, 72°C 90s); 72°C 120s.
<i>msrB</i>	F: TATGATATCCATAATAATTATCCAATC R: AAGTTATATCATGAATAGATTGTCCTGTT 595bp [260]	95°C 180s; 40 циклуса (94°C 60s, 50°C 60s, 72°C 90s); 72°C 120s.
<i>mefA</i>	F: STATGACAGCCTCAATGCG R: ACCGATTCTATCAGCAAAG 1400bp [261]	95°C 180s; 40 циклуса (95°C 30s, 50°C 40s, 72°C 120s); 72°C 120s.
<i>mefE</i>	F: AAAAAGTGCAGGCGTTTAAAGATAAGCTGGC R: CCAATGCATCCTGCACCATTGCTCCTAC 1355bp [210]	95°C 180s; 40 циклуса (95°C 30s, 50°C 40s, 72°C 120s); 72°C 120s.
<i>lnuA</i>	F: GGTGGCTGGGGGGTAGATGTATTAAGTGG R: GCTTCTTTGAAATACATGGTATTTTCGATC 323bp [262]	95°C 180s; 40 циклуса (95°C 30s, 57°C 30s, 72°C 60s); 72°C 120s.
<i>lnuB</i>	F: CCTACSTATGTTTGTGGAA R: ATAACGTTACTCTCSTATTC 925bp [262]	95°C 180s; 40 циклуса (95°C 30s, 54°C 45s, 72°C 120s); 72°C 120s.
<i>lsaA</i>	F: GGCAATCGCTTGTGTTTTAGCG R: GTGAATCCCATGATGTTGATACC 1200bp [136]	95°C 180 s; 40 циклуса (95°C 30s, 55°C 30s, 72°C 120s); 72°C 120s.
<i>lsaC</i>	F: GGSTATGTAAAACCTGTATTTG R: ACTGACAATTTTCTTCCGT 429bp [142]	95°C 180 s; 40 циклуса (95°C 30s, 55°C 30s, 72°C 120s); 72°C 120s.

### 3.4.3.2 Идентификација гена

Свака реакција била је изведена у коначном волумену од 50  $\mu\text{l}$  и укључивала је 2  $\mu\text{l}$  геномске ДНК, 1  $\mu\text{l}$  (50 nmol/ $\mu\text{l}$ ) сваког прајмера (Invitrogen), 25  $\mu\text{L}$  Maxima® Hot Start Green PCR Master Mix (Fermentas) и 21  $\mu\text{l}$  DEPC H<sub>2</sub>O. Позитивне и негативне контроле су биле укључене у сваки тест. Умножавање је вршено на SaCycler-96 термосајклеру (Sacace Biotechnologies S.r.l.). Услови под којима су се одвијале реакције ланчаног умножавања приказани су у Табели 1, са временом, температуром и бројем циклуса за сваки прајмер који укључује следеће кораке:

1. Иницијалну денатурацију
2. Денатурацију
3. Везивање прајмера
4. Екстензију
5. Финалну екстензију.

Умножени производи су детектовани гел-електрофорезом на E-Gel iBase (Invitrogen) на 2% (w/v) агарозном гелу (E-Gel® 2%, Invitrogen) и визуализовани просветљавањем гелова коришћењем UltraBright LED трансилуминатора (Maestrogen Inc.). Различити гени резистенције су анализирани на основу присуства или одсуства трака на агарозном гелу [152]. Величина PCR производа је била упоређивана са стандардном молекуларном тежином маркера (Слика 10) [193].



Слика 10. PCR изолати *S. aureus*; **линија 1** и **линија 2**: умножени производ (572 bp) *ermC* гена; **линија 3**: умножени производ (421bp) *ermA* гена; **линија 4**: молекуларна тежина маркера

### 3.5 Статистичка анализа података

Експериментално добијени подаци и њихова статистичка анализа је приказана табеларно и графички, коришћењем програма Excel из софтверског пакета Microsoft Office 2013. За утврђивање специфичности и сензитивности D-теста коришћен је Diagnostic test evaluation calculator [263]. За утврђивање разлика у дистрибуцији учесталости коришћен је Фишеров егзактни тест на нивоу значајности од  $p < 0,05$ .

## 4 РЕЗУЛТАТИ

### 4.1 Учесталост резистенције на антибиотике Грам-позитивних кока

Учесталост резистенције на антибиотике Грам-позитивних кока приказана је у Табели 2.

**Табела 2.** Учесталост резистенције на антибиотике код Грам-позитивних кока

	Cefoksitin n (%)	Ceftriakson n (%)	Penicilin n (%)	Eritromicin n (%)	Klindamicin n (%)	Gentamicin n (%)	Ciprofloksa- cin n (%)	Vankomi- cin n (%)	Linezolid n (%)
<i>S. aureus</i> (N=944)	162 (17,2)	-	865 (91,6)	558 (59,1)	78 (8,3)	215 (22,8)	119 (12,6)	0 (0,0)	0 (0,0)
MSSA <sup>a</sup> (N=782)	0 (0,0)	-	703 (89,9)	418 (53,5)	32 (4,1)	137 (17,5)	45 (5,8)	0 (0,0)	0 (0,0)
MRSA <sup>b</sup> (N=162)	162 (100,0)	-	162 (100,0)	140 (86,4)	46 (28,4)	79 (48,8)	70 (43,2)	0 (0,0)	0 (0,0)
KNS <sup>c</sup> (N=699)	71 (10,2)	-	637 (91,1)	426 (60,9)	85 (12,2)	141 (20,2)	77 (11,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
MSKNS <sup>d</sup> (N=628)	0 (0,0)	-	566 (90,1)	361 (57,5)	74 (11,8)	102 (16,2)	52 (8,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
MRKNS <sup>e</sup> (N=71)	71 (100,0)	-	71 (100,0)	65 (91,5)	11 (15,5)	37 (52,1)	26 (36,6)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Enterococcus</i> spp. (N=245)	-	-	7 (2,9)	198 (80,8)	237 (96,7)	86 (35,1)	54 (22,0)	1 (0,4)	0 (0,0)
<i>S. pneumoniae</i> (N=64)	21 (32,8)	0 (0,0)	6 (9,4)	42 (65,6)	23 (35,9)	27 (42,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>S. agalactiae</i> (N=150)	-	0 (0,0)	0 (0,0)	47 (31,3)	31 (20,7)	109 (72,7)	49 (32,7)	0 (0,0)	-
<i>S. pyogenes</i> (N=264)	-	0 (0,0)	0 (0,0)	116 (43,9)	47 (17,8)	89 (33,7)	57 (21,6)	0 (0,0)	-

<sup>a</sup> Метицилин резистентан *S. aureus*

<sup>b</sup> Метицилин сензитиван *S. aureus*

<sup>c</sup> Коагулаза негативни стафилокок

<sup>d</sup> Метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок

<sup>e</sup> Метицилин сензитивни коагулаза негативни стафилокок

Од укупног броја изолата *S. aureus*, 17,2% било је резистентно на цефокситин и ти сојеви су идентификовани као метицилин резистентни *S. aureus* (MRSA), док је од укупног броја коагулаза негативних изолата, 10,2% било резистентно на цефокситин, те су ти

сојеви идентификовани као метицилин резистентне коагулаза негативне стафилококе (MRKNS). Резистентно на цефокситин је било и 32,8% изолата *S. pneumoniae*. Међутим, сви изолати стрептокока су били осетљиви на цефтриаксон.

Највећи проценат изолата резистентних на пеницилин имале су врсте *S. aureus* (91,6%) и коагулаза негативне стафилококе (91,1%), а међу њима, резистенција на пеницилин је забележена код свих MRSA (100,0%) и MRKNS (100,0%) изолата.

Резистенција на пеницилин је детектована у 9,4% изолата *S. pneumoniae*, а само у 2,9% изолата *Enterococcus* spp. Међу изолатима *S. agalactiae* и *S. pyogenes* није било сојева резистентних на пеницилин.

Код изолата стафилокока, MRSA (86,4%) и MRKNS (91,5%) су показали највећу резистентност на еритромицин, док су изолати MSSA (53,5%) и MSKNS (57,5%) имали значајно нижу резистенцију на овај антибиотик. Велика резистентност на еритромицин утврђена је и код изолата *Enterococcus* spp. (80,8%), *S. pneumoniae* (65,6%), *S. agalactiae* (31,3%) и *S. pyogenes* (43,9%).

Изолати MRSA (28,4%) и MRKNS (15,5%) су показали већи степен резистенције на клиндамицин од изолата MSSA (4,1%) и MSKNS (11,8%). Ипак, највећи проценат сојева резистентних на овај антибиотик, чак 96,7%, детектовали смо код изолата *Enterococcus* spp. Резистенцију на клиндамицин смо добили и код изолата стрептокока, мада не у тако високом проценту: *S. pneumoniae* (35,9%), *S. agalactiae* (20,7%) и *S. pyogenes* (17,8%).

Међу изолатима стафилокока, највећу резистентност на гентамицин су показали изолати MRSA (48,8%) и MRKNS (52,1%), док су изолати MSSA (17,5%) и MSKNS (16,2%) били знатно осетљивији. Међу стрептококама, највећу резистенцију на гентамицин су показали изолати *S. agalactiae* (72,7%), а затим су следиле изолати *S. pneumoniae* (42,2%) и *S. pyogenes* (33,7%), док је резистенција на гентамицин забележена код *Enterococcus* spp. изолата била 35,1%.

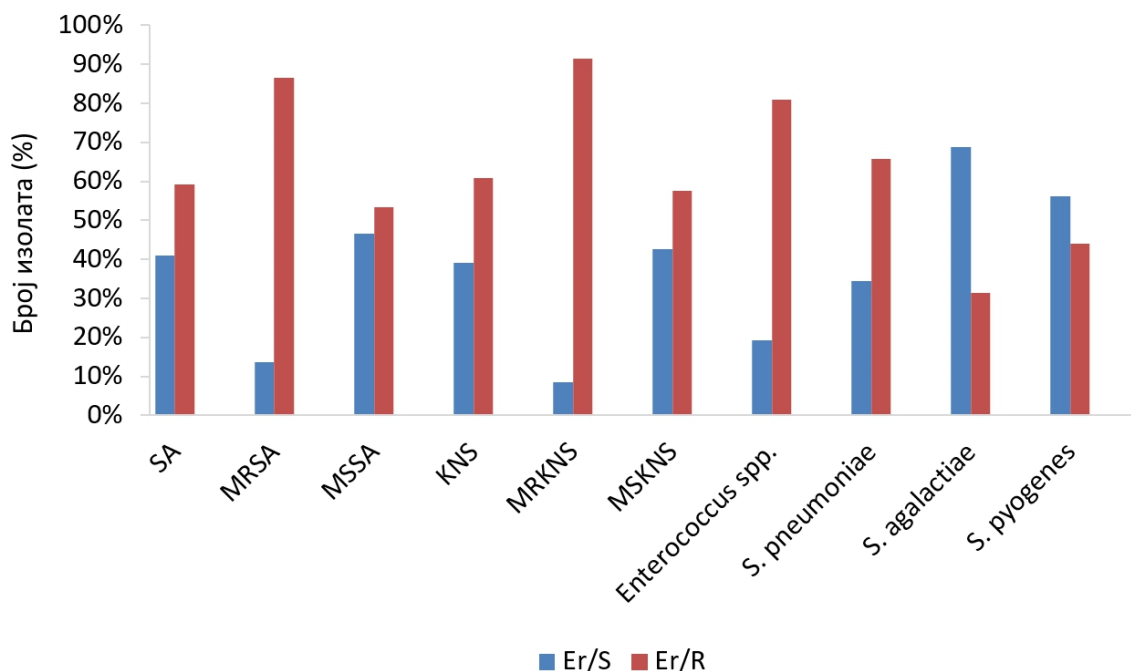
Резистенција на ципрофлоксацин је било највиша код MRSA (43,2%) и MRKNS (36,6%) изолата, док је значајно мања евидентирана код изолата MSSA (5,8%) и MSKNS (8,3%). Међу стрептококама највећу резистентност на ципрофлоксацин су показали изолати *S. agalactiae* (32,7%), а затим *S. pyogenes* (21,6%). Међу изолатима *S. pneumoniae* није било сојева резистентних на ципрофлоксацин, док је код изолата *Enterococcus* spp. резистенција на ципрофлоксацин била 22,0%.



Резистенција на линезолид није била забележена ни код једног изолату Грам-позитивних кока, док је резистенција на ванкомицин нађена код само 0,6% изолату *Enterococcus* spp.

#### 4.2 Учесталост резистенције на еритромицин код Грам-позитивних кока

На Графикону 1 приказана је осетљивост изолату Грам-позитивних кока на еритромицин. MRSA и MRKNS изолату су показали највећу резистентност на еритромицин, а затим су следили изолату *Enterococcus* spp. и *S. pneumoniae*. Најмању резистентцију на еритромицин су показали изолату *S. agalactiae*.



**Графикон 1.** Осетљивост на еритромицин код Грам-позитивних кока; SA - *S. aureus*, MRSA- метицилин резистентан *S. aureus*, MSSA - метицилин сензитиван *S. aureus*, KNS - коагулаза негативни стафилокок, MRKNS - метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок, MSKNS - метицилин сензитивни коагулаза негативни стафилокок; Er/S - еритромицин сензитивност, Er/R - еритромицин резистентност

### 4.3 Учесталост MLS фенотипова резистенције код Грам-позитивних кока

У Табели 3 приказана је учесталост MLS фенотипова резистенције код Грам-позитивних кока. Сумарно, резистенција на MLS антибиотике је у највећем проценту забележена код изолата *Enterococcus* spp. и метицилин резистентних сојева стафилокока, док су сојеви *S. agalactiae* и *S. pyogenes* показали највећу осетљивост.

**Табела 3.** Учесталост MLS фенотипова резистенције код Грам-позитивних кока

	<i>S. aureus</i> n (%)	MRSA <sup>a</sup> n (%)	MSSA <sup>b</sup> n (%)	KNS <sup>b</sup> n (%)	MRKNS <sup>r</sup> n (%)	MSKNS <sup>r</sup> n (%)	<i>Enterococcus</i> spp. n (%)	<i>S. pneumo- niae</i> n (%)	<i>S. agalactiae</i> n (%)	<i>S. pyogenes</i> n (%)
Er/Cli S <sup>b</sup>	380 (40,3)	19 (11,7)	361 (46,2)	263 (37,6)	6 (8,5)	257 (40,9)	2 (0,8)	22 (34,4)	94 (62,7)	148 (56,1)
cMLSb <sup>c</sup>	72 (7,6)	43 (26,5)	29 (3,7)	75 (10,7)	11 (15,5)	64 (10,2)	192 (78,4)	23 (35,9)	22 (14,7)	47 (17,8)
M/MSb <sup>*j</sup>	141 (14,9)	26 (16,0)	115 (14,7)	148 (21,2)	23 (32,4)	125 (19,9)	2 (0,8)	12 (18,8)	19 (12,7)	50 (18,9)
iMLSb <sup>3</sup>	345 (36,5)	71 (43,8)	274 (35,0)	203 (29,0)	31 (43,7)	172 (27,4)	4 (1,6)	7 (10,9)	6 (4,0)	19 (7,2)
LSa/b <sup>u</sup>	6 (0,6)	3 (1,9)	3 (0,4)	10 (1,4)	0 (0,0)	10 (1,6)	45 (18,4)	0 (0,0)	9 (6,0)	0 (0)
<b>Укупно</b>	<b>944</b> (100,0)	<b>162</b> (100,0)	<b>782</b> (100,0)	<b>699</b> (100,0)	<b>71</b> (100,0)	<b>628</b> (100,0)	<b>245</b> (100,0)	<b>64</b> (100,0)	<b>150</b> (100,0)	<b>264</b> (100,0)

<sup>a</sup> Метицилин резистентан *S. aureus*

<sup>b</sup> Метицилин сензитиван *S. aureus*

<sup>b</sup> Коагулаза негативни стафилокок

<sup>r</sup> Метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок

<sup>r</sup> Метицилин сензитивни коагулаза негативни стафилокок

<sup>b</sup> Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

<sup>c</sup> Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

<sup>\*</sup> Резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б

<sup>3</sup> Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

<sup>u</sup> Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

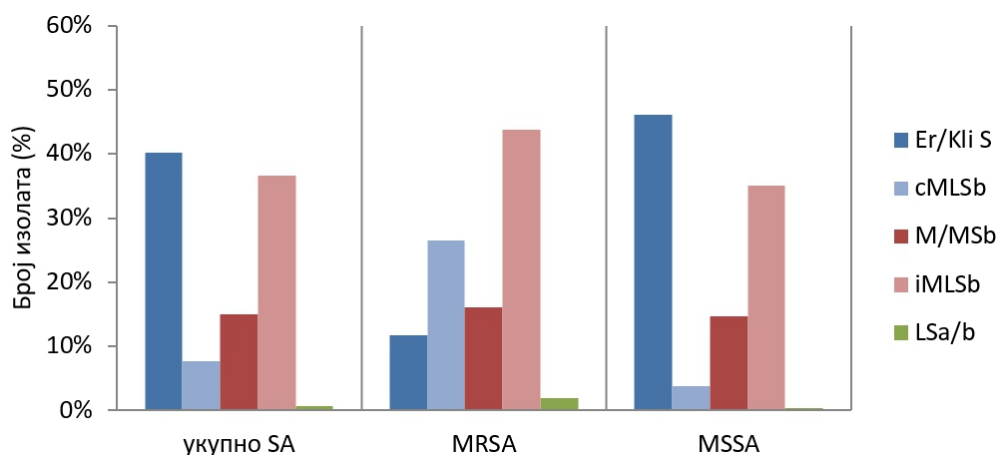
#### 4.3.1 Учесталост MLS фенотипова резистенције код *S. aureus*

Најчешћи фенотип MLS резистенције код изолата *S. aureus* је био iMLSb (36,6%), док су M/MSb (14,9%) и cMLSb (7,6%) били заступљени у мањем проценту, а у најмањем је био заступљен LSa/b (0,6%) фенотип (Табела 3 и Графикон 2).

Међу MRSA изолатима, на првом месту по учесталости је био iMLSb фенотип, затим је следио cMLSb, док је најређи био LSa/b фенотип (Графикон 2).

Код изолата MSSA, најчешћи фенотип MLS резистенције је био iMLSb, затим је следио M/MSb, а најређе заступљен је био LSa/b фенотип. Највећи број MSSA изолата био је осетљив на еритромицин и клиндамицин (Графикон 2).

Када се упореде метицилин резистентни и метицилин осетљиви изолати *S. aureus*, уз мање разлике, уочава се слично понашање. Наиме, и код MRSA (43,8%) и код MSSA (35,0%) изолата, најчешће детектован фенотип MLS резистенције је био iMLSb, при чему је проценат cMLSb резистентних сојева значајно већи код MRSA (26,5%) него код MSSA (3,7%) изолата ( $p < 0,001$ ). Учесталост M/MSb фенотипа код MRSA (16,0%) и MSSA (14,7%) изолата била је слична ( $p > 0,05$ ). Учесталост изолата осетљивих на еритромицин и клиндамицин је била статистички значајно већа код MSSA у односу на MRSA изолате ( $p < 0,001$ ) (Графикон 2).



**Графикон 2.** Учесталост MLS фенотипова резистенције код *S. aureus*; SA - *S. aureus*, MRSA - метицилин резистентан *S. aureus*, MSSA - метицилин сензитиван *S. aureus*; Er/Kli S - сензитивни на еритромицин и клиндамицин, cMLSb - конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, M/MSb - резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б, iMLSb - индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, LSa/b - резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

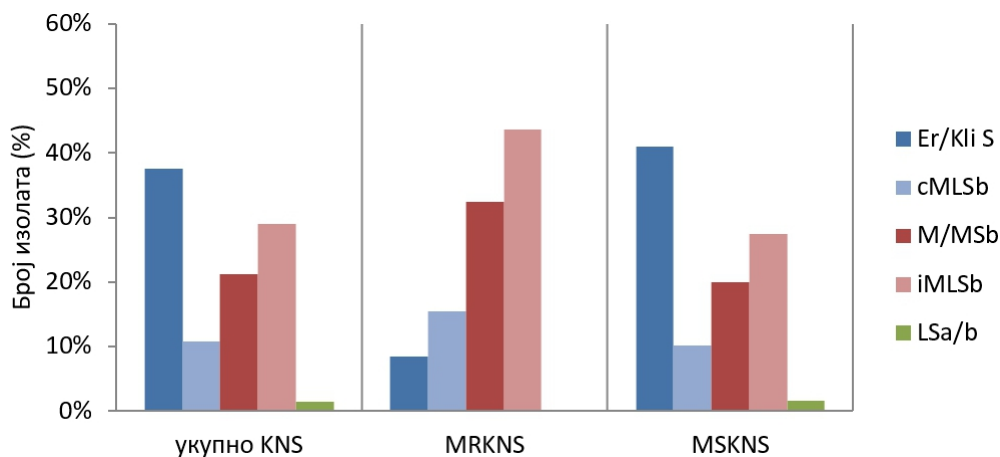
### 4.3.2 Учесталост MLS фенотипова резистенције код KNS

Профил резистенције коагулаза негативних стафилокока је веома сличан профилу резистенције *S. aureus*. Најчешћи фенотип MLS резистенције код коагулаза негативних стафилокока био је iMLSb (29,0%), затим су следили M/MSb (21,2%) и cMLSb (10,7%), док је LSa/b фенотип био најмање заступљен (1, 4%) (Табела 3 и Графикон 3).

Најучесталији фенотип међу изолатима MRKNS био је iMLSb, затим је следио M/MSb, док су на последњем месту по заступљености били изолати осетљиви на еритромицин и клиндамицин. Изолати са LSa/b фенотипом нису били детектовани (Графикон 3).

Међу изолатима MSKNS, најучесталији фенотип MLS резистенције је био iMLSb, затим је следио M/MSb, а на последњем месту по учесталости је био LSa/b фенотип. Највећи број изолата MSKNS је био осетљив на еритромицин и клиндамицин (Графикон 3).

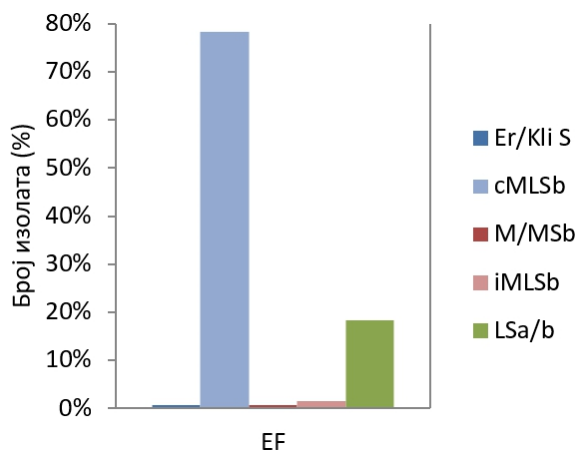
Дистрибуција MLS фенотипова резистенција код MRKNS и MSKNS је била потпуно иста, уз разлику да је проценат изолата осетљивих на еритромицин и клиндамицин био значајно већи код MSKNS ( $p < 0,001$ ). Такође, iMLSb и M/MSb фенотипови су били статистички значајно заступљенији код изолата MRKNS у односу на MSKNS ( $p < 0,05$ ).



**Графикон 3.** Учесталост MLS фенотипова резистенције код KNS изолата; KNS - коагулаза негативни стафилокок, MRKNS - метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок, MSKNS - метицилин сензитивни коагулаза негативни стафилокок; Er/Kli S - сензитивни на еритромицин и клиндамицин, cMLSb - конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, M/MSb - резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б, iMLSb - индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, LSa/b - резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

#### 4.3.3 Учесталост MLS фенотипова резистенције код *Enterococcus* spp.

Насупрот стафилококама, најучесталији MLS фенотип резистенције међу изолатима ентерокока био је cMLSb (78,4%), а одмах затим по учесталости следио је LСа/b фенотип (18,4%). Изолати осетљиви на еритромицин и клиндамицин и сојеви који су показивали M/MSb и iMLSb фенотип били су заступљени у веома ниском проценту (Графикон 4).



**Графикон 4.** Учесталост MLS фенотипова резистенције код ентерокока; EF - *Enterococcus* spp.; Er/Kli S - сензитивни на еритромицин и клиндамицин, cMLSb - конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, M/MSb - резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б, iMLSb - индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, LСа/b - резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

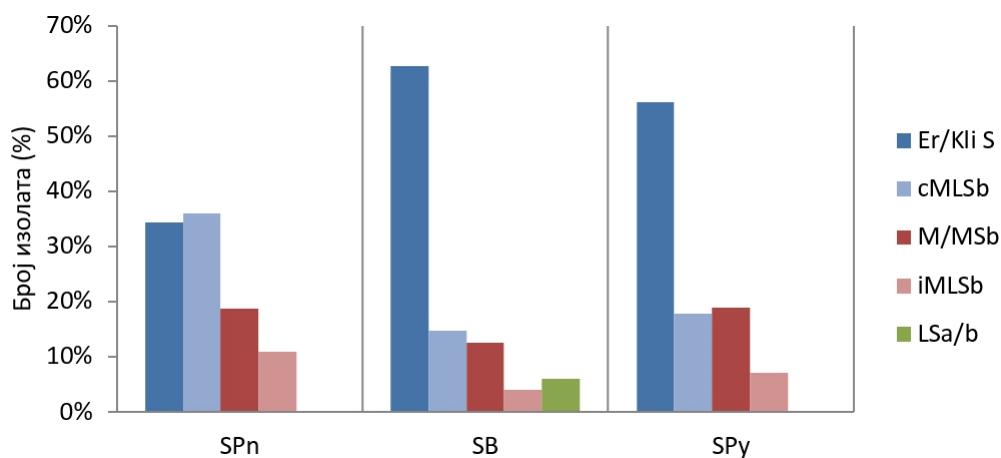
#### 4.3.4 Учесталост MLS фенотипова резистенције код стрептокока

Профил резистенције на MLS антибиотике код различитих врста стрептокока је сличан и ближи је профилима резистенције ентерокока него стафилокока. Слично ентерококама, мада не у тако високом проценту, доминантни фенотип резистенције код стрептокока био је cMLSb, док је iMLSb, насупрот стафилококама, био један од најређе заступљених фенотипова резистенције. *S. pneumoniae* је карактерисала ниска заступљеност сојева осетљивих на еритромицин и клиндамицин, са друге стране, готово 60% тестираних изолата *S. agalactiae* и *S. pyogenes* је било осетљиво на еритромицин и клиндамицин. Интересантно је да смо нашли код сојева *S. agalactiae*, иако у ниском проценту, LСа/b фенотип резистенције.

Процент изолата *S. pneumoniae* са cMLSb фенотипом (35,9%) је био статистички значајно учесталији у односу на проценат изолата са iMLSb (10,9%) и M/MSb (18,8%) фенотипом резистенције ( $p < 0,05$ ). Учесталост изолата са овим фенотипом се није битно разликовала од учесталости изолата који су били осетљиви на еритромицин и клиндамицин (34,4%) ( $p > 0,05$ ). LСа/b фенотип резистенције није био детектован код изолата *S. pneumoniae* (Табела 3 и Графикон 5).

Највећи број изолата *S. agalactiae* је био осетљив на еритромицин и клиндамицин (62,7%), а најучесталији MLS фенотип резистенције био је cMLSb (14,7%), затим M/MSb (12,7%), док је на последњем месту по заступљености био LСа/b (6,0%) фенотип (Табела 3 и Графикон 5).

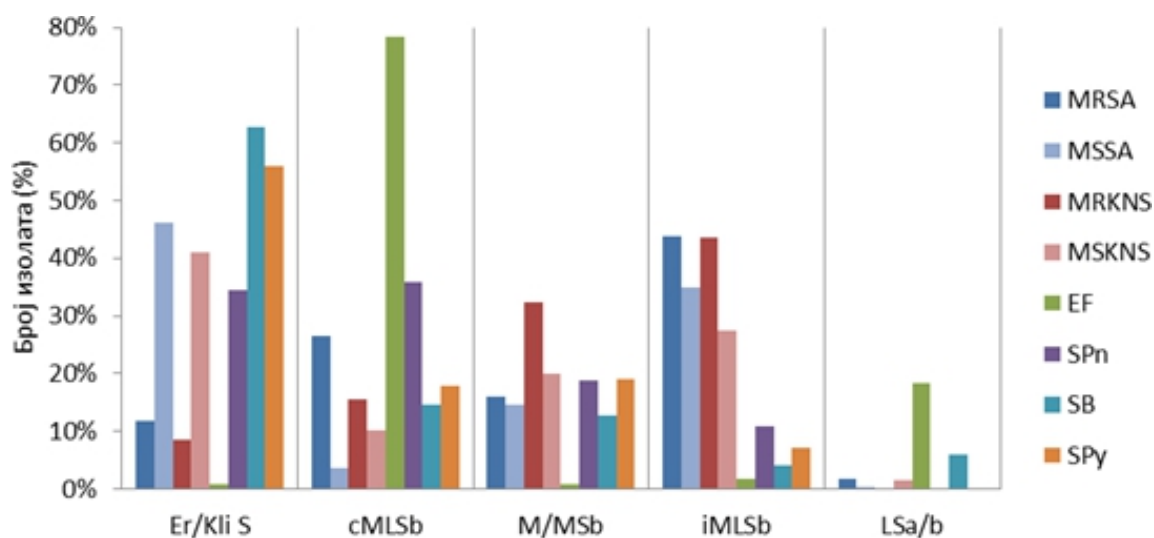
Највећи број изолата *S. pyogenes* био је осетљив на еритромицин и клиндамицин (56,1%), а најчешћи фенотип резистенције је био M/MSb (18,9%), затим cMLSb (17,8%), док је најређе заступљен био iMLSb (7,2%) фенотип. Ниједан изолат *S. pyogenes* није показао LСа/b фенотип резистенције (Табела 3 и Графикон 5).



**Графикон 5.** Учесталост MLS фенотипова резистенције код стрептокока; SPn - *S. pneumoniae*; SB - *S. agalactiae*; SPy - *S. pyogenes*; Er/Kli S - сензитивни на еритромицин и клиндамицин, cMLSb - конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, M/MSb - резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б, iMLSb - индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, LСа/b - резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

#### 4.4 Поређење учесталости MLS фенотипова резистенције код Грам-позитивних кока

Упоредном анализом учесталости MLS фенотипова резистенције код Грам-позитивних кока, утврдили смо да су cMLSb и LSa/b фенотип најзаступљенији код изолата *Enterococcus* spp, а iMLSb фенотип међу изолатима MRSA и MRKNS, док је M/MSb фенотип био најзаступљенији код MRKNS изолата. Са друге стране, осетљивост на еритромицин и клиндамицин је била најзаступљенија међу изолатима *S. agalactiae* и *S. pyogenes* (Графикон 6).

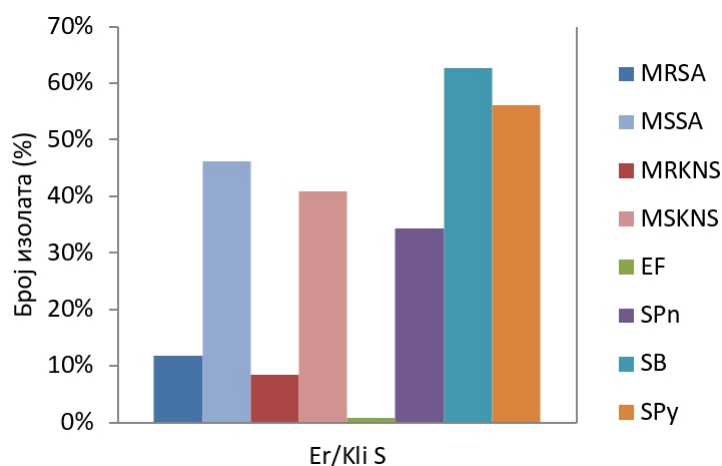


**Графикон 6.** Учесталост MLS фенотипова резистенције код Грам-позитивних кока; MRSA- метицилин резистентан *S. aureus*, MSSA - метицилин сензитиван *S. aureus*, MRKNS - метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок, MSKNS - метицилин сензитивни коагулаза негативни стафилокок, EF - *Enterococcus* spp., SPn - *S. pneumoniae*, SB - *S. agalactiae*, SPy - *S. pyogenes*; Er/Kli S - сензитивни на еритромицин и клиндамицин, cMLSb - конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, M/MSb - резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б, iMLSb - индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, LSa/b - резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

##### 4.4.1 Поређење учесталости Er/Kli S код Грам-позитивних кока

Поређењем учесталости изолата осетљивих на еритромицин и клиндамицин код различитих врста Грам-позитивних кока, утврдили смо да је она била највећа међу

изолатима *S. agalactiae* и *S. pyogenes* и статистички се значајно разликовала у односу на остале испитиване врсте бактерија ( $p < 0,01$ ). На другом месту, по учесталости изолата осетљивих на еритромицин и клиндамицин, у приближно једнаком проценту, били су изолати MSSA, MSKNS и *S. pneumoniae* ( $p > 0,05$ ). Најмањи број изолата осетљивих на ова два антибиотика био је међу изолатима *Enterococcus* spp., MRSA и MRKNS и статистички се значајно разликовала у односу на остале испитиване врсте ( $p < 0,001$ ) (Графикон 7).

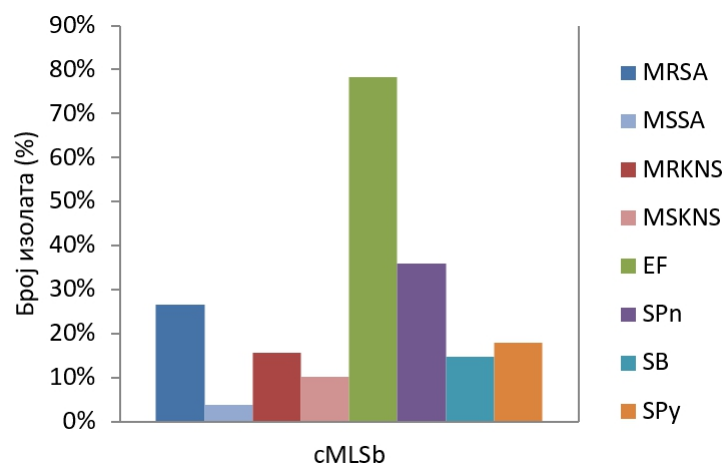


**Графикон 7.** Учесталост осетљивости на еритромицин и клиндамицин (Er/Kli S) код Грам-позитивних кока; MRSA - метицилин резистентан *S. aureus*, MSSA - метицилин сензитиван *S. aureus*, MRKNS - метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок, MSKNS - метицилин сензитивни коагулаза негативни стафилокок, EF - *Enterococcus* spp., SPn - *S. pneumoniae*, SB - *S. agalactiae*, SPy - *S. pyogenes*

#### 4.4.2 Поређење учесталости cMLSb фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока

Поређењем учесталости cMLS фенотипа резистенције код различитих врста Грам-позитивних кока, утврдили смо да је овај фенотип био статистички значајно најзаступљенији код изолата *Enterococcus* spp. ( $p < 0,001$ ). Мању заступљеност смо добили код изолата *S. pneumoniae* и MRSA ( $p > 0,05$ ), а најмању код MSSA изолата ( $p < 0,05$ ) (Графикон 8).

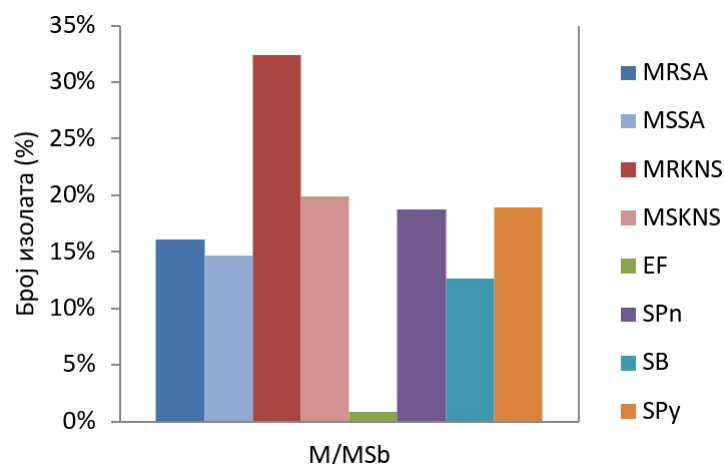




**Графикон 8.** Учесталост cMLSb фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока; MRSA - метицилин резистентан *S. aureus*, MSSA - метицилин сензитиван *S. aureus*, MRKNS - метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок, MSKNS - метицилин сензитивни коагулаза негативни стафилокок, EF - *Enterococcus spp.*, SPn - *S. pneumoniae*, SB - *S. agalactiae*, SPy - *S. pyogenes*

#### 4.4.3 Поређење учесталости M/MSb фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока

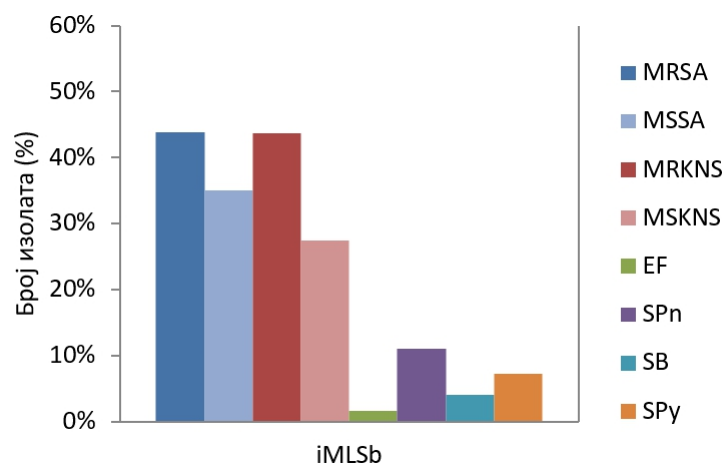
Упоредном анализом учесталости M/MSb фенотипа код различитих врста Грам-позитивних кока, утврдили смо да је овај фенотип најучесталији код изолата MRKNS ( $p < 0,05$ ). Затим по заступљености следе изолати MSKNS, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, MRSA, MSSA и *S. agalactiae* са приближно једнаком учесталошћу и без статистички значајне разлике ( $p > 0,05$ ). Овај фенотип је био најмање заступљен код изолата *Enterococcus spp.* ( $p < 0,001$ ) (Графикон 9).



**Графикон 9.** Учесталост M/MSb фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока; MRSA - метицилин резистентан *S. aureus*, MSSA - метицилин сензитиван *S. aureus*, MRKNS - метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок, MSKNS - метицилин сензитивни коагулаза негативни стафилокок, EF - *Enterococcus spp.*, SPn - *S. pneumoniae*, SB - *S. agalactiae*, SPy - *S. pyogenes*

#### 4.4.4 Поређење учесталости iMLSb фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока

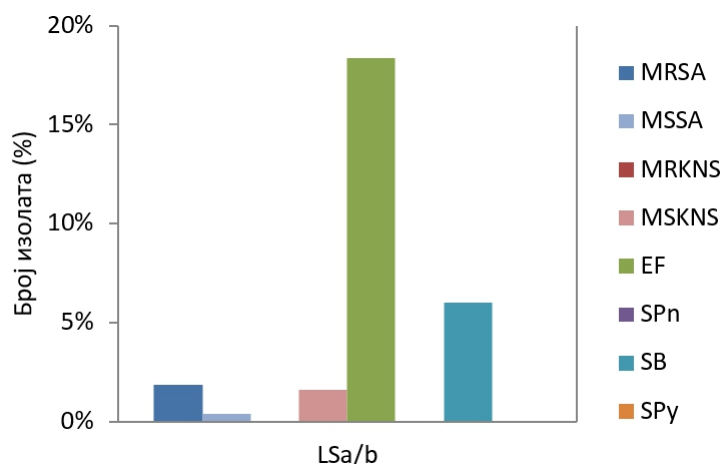
Поређењем учесталости iMLSb фенотипа код различитих врста Грам-позитивних кока, утврдили смо да је овај фенотип био најзаступљенији код изолата MRSA и MRKNS, са статистички значајном разликом у односу на све остале врсте ( $p < 0,05$ ). Затим су по заступљености следили изолати MSSA и MSKNS ( $p < 0,05$ ), а у значајно нижем и међусобно приближно једнаком проценту код изолата стрептокока. Код изолата ентерокока је био најмање заступљен ( $p < 0,05$ ) (Графикон 10).



**Графикон 10.** Учесталост iMLSb фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока; MRSA - метицилин резистентан *S. aureus*, MSSA - метицилин сензитиван *S. aureus*, MRKNS - метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок, MSKNS - метицилин сензитивни коагулаза негативни стафилокок, EF - *Enterococcus spp.*, SPn - *S. pneumoniae*, SB - *S. agalactiae*, SPy - *S. pyogenes*

#### 4.4.5 Поређење учесталости LSa/b фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока

Поређењем учесталости LSa/b фенотипа код различитих врста Грам-позитивних кока, утврдили смо да је он најзаступљенији код изолата *Enterococcus spp.*, са статистички значајном разликом у односу на све остале врсте ( $p < 0,05$ ). На другом месту по заступљености је био код изолата *S. agalactiae*, док је у ниском проценту био откривен код MRSA, MSKNS и MSSA изолата ( $p < 0,05$ ). Код изолата MRKNS, *S. pneumoniae* и *S. pyogenes*, LSa/b фенотип није био идентификован (Графикон 11).



**Графикон 11.** Учесталост LСа/b фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока; MRSA - метицилин резистентан *S. aureus*, MSSA - метицилин сензитиван *S. aureus*, MRKNS - метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок, MSKNS - метицилин сензитивни коагулаза негативни стафилокок, EF - *Enterococcus spp.*, SPn - *S. pneumoniae*, SB - *S. agalactiae*, SPy - *S. pyogenes*

#### 4.5 Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала

iMLSb фенотип резистенције је био доминантан у изолатима Грам-позитивних кока из брисева грла и носа (32,8%) и пиокултура (24,2%), док је cMLSb преовладавао међу изолатима из гениталних секрета (33,3%) и урина (60,0%) (Табела 4).

**Табела 4.** Учесталост MLS фенотипова по врсти материјала код Грам-позитивних кока

	Врста материјала n (%)			
	Брисеви грла и носа	Пиюкултуре	Генитални секрет	Урин
Er/Kli S <sup>a</sup>	371 (42,7)	363 (42,0)	172 (27,6)	3 (30,0)
cMLSb <sup>b</sup>	89 (10,3)	128 (14,8)	208 (33,3)	6 (60,0)
M/MSb <sup>b</sup>	120 (13,8)	136 (15,7)	116 (18,6)	0 (0,0)
iMLSb <sup>c</sup>	285 (32,8)	209 (24,2)	90 (14,4)	0 (0,0)
LSa/b <sup>d</sup>	3 (0,4)	28 (3,3)	38 (6,1)	1 (10,0)
<b>Укупно</b>	<b>868 (100,0)</b>	<b>864 (100,0)</b>	<b>624 (100,0)</b>	<b>10 (100,0)</b>

<sup>a</sup> Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

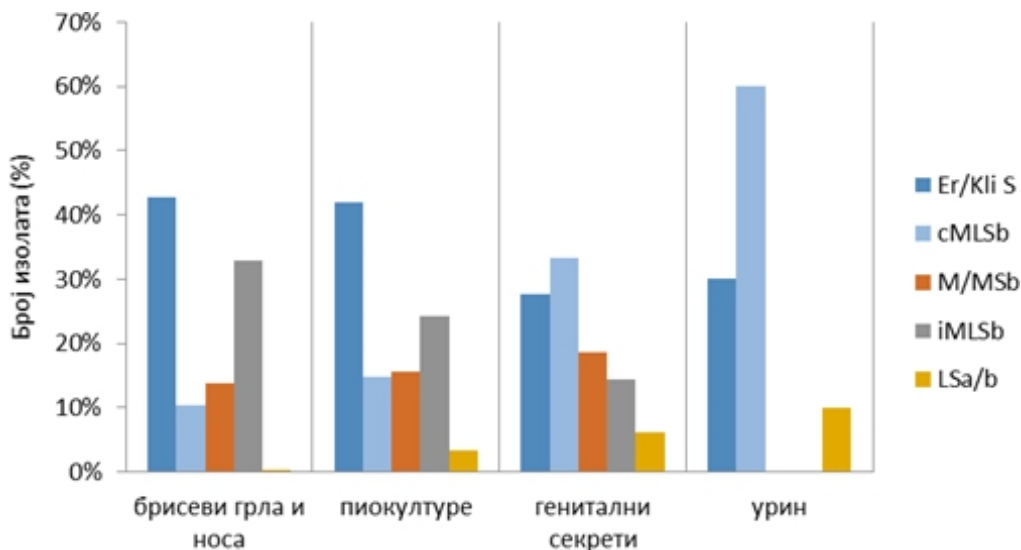
<sup>b</sup> Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

<sup>b</sup> Резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б

<sup>c</sup> Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

<sup>d</sup> Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

Поређењем учесталости MLS фенотипова резистенције по врсти материјала код Грам-позитивних кока утврдили смо да је највећи проценат изолата сензитивних на еритромицин и клиндамицин био међу изолатима брисева грла и носа и пиокултура. cMLSb и L<sub>Sa/b</sub> фенотип су били најчешћи код изолата из уринокултура, M/MSb је био најчешћи код изолата из гениталних секрета, док је iMLSb фенотип био најучесталији код изолата из брисева грла и носа (Табела 4 и Графикон 12).



**Графикон 12.** Учесталост MLS фенотипова по врсти материјала код Грам-позитивних кока; Er/Kli S - сензитивни на еритромицин и клиндамицин, cMLSb - конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, M/MSb - резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б, iMLSb - индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, L<sub>Sa/b</sub> - резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

#### 4.5.1 Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала код *S. aureus*

Поређењем учесталости MLS фенотипова по врсти материјала код MRSA изолата, утврдили смо да је највећи проценат изолата сензитивних на еритромицин и клиндамицин био присутан код изолата из пиокултура ( $p > 0,05$ ). Показало се да је cMLSb фенотип такође најчешћи код изолата из пиокултура ( $p < 0,01$ ). M/MSb и L<sub>Sa/b</sub> фенотип су били најучесталији код изолата MRSA из гениталних секрета ( $p < 0,05$  и  $p > 0,05$  респективно), док је iMLSb био најзаступљенији у изолатима из брисева грла и носа ( $p < 0,05$ ) (Табела 5 и Графикон 13).

Поређењем учесталости MLS фенотипова по врсти материјала код MSSA изолата, утврдили смо да је највећи проценат изолата сензитивних на еритромицин и клиндамицин био присутан међу изолатима из пиокултура ( $p < 0,05$ ). cMLSb и M/MSb фенотип су били најчешћи међу изолатима из гениталних секрета ( $p > 0,05$  и  $p < 0,05$  респективно), док је iMLSb фенотип био најучесталији код изолата из брисева грла и носа ( $p < 0,05$ ), а Lsa/b фенотип код MSSA изолата из пиокултура ( $p > 0,05$ ) (Табела 5 и Графикон 13).

**Табела 5.** Учесталост фенотипова резистенције по врсти материјала код MRSA и MSSA изолата

	MRSA <sup>a</sup>			MSSA <sup>b</sup>		
	Врста материјала n (%)			Врста материјала n (%)		
	Брисеви грла и носа	Пиокултуре	Генитални секрет	Брисеви грла и носа	Пиокултуре	Генитални секрет
Er/Kli S <sup>b</sup>	5 (12,2)	11 (14,3)	3 (6,8)	115 (38,6)	201 (58,1)	45 (32,6)
cMLSb <sup>c</sup>	1 (2,4)	30 (39,0)	12 (27,3)	8 (2,7)	13 (3,8)	8 (5,8)
M/MSb <sup>d</sup>	2 (4,9)	10 (13,0)	14 (31,8)	26 (8,7)	41 (11,8)	48 (34,8)
iMLSb <sup>e</sup>	33 (80,5)	25 (32,5)	13 (29,5)	149 (50,0)	88 (25,4)	37 (26,8)
Lsa/b <sup>e</sup>	0 (0,0)	1 (1,3)	2 (4,5)	0 (0,0)	3 (0,9)	0 (0,0)
<b>Укупно</b>	<b>41 (100,0)</b>	<b>77 (100,0)</b>	<b>44 (100,0)</b>	<b>298 (100,0)</b>	<b>346 (100,0)</b>	<b>138 (100,0)</b>

<sup>a</sup> Метицилин сензитиван *S. aureus*

<sup>b</sup> Метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок

<sup>c</sup> Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

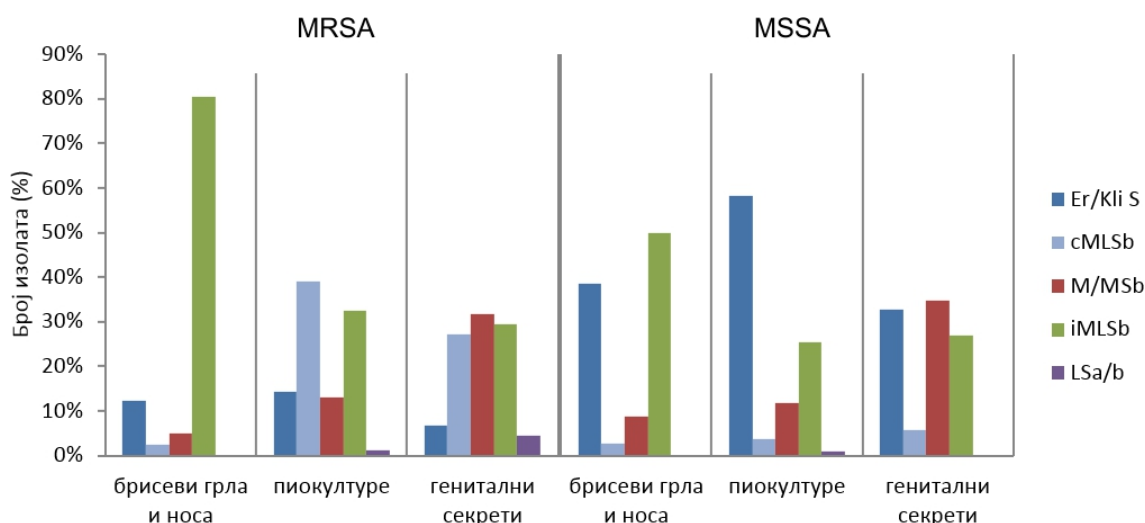
<sup>d</sup> Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

<sup>e</sup> Резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б

<sup>f</sup> Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

<sup>g</sup> Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

Поређењем учесталости MLS фенотипова резистенције према врсти материјала код изолата MRSA и MSSA, утврдили смо да је највећа учесталост изолата осетљивих на еритромицин и клиндамицин била код изолата MRSA и MSSA из пиокултура ( $p < 0,05$ ), M/MSb фенотипа резистенције из гениталних секрета ( $p > 0,05$ ) и iMLSb фенотипа код изолата из брисева грла и носа ( $p < 0,05$ ). cMLSb фенотип је био најучесталији код MRSA изолата из пиокултура а код MSSA изолата из гениталних секрета ( $p < 0,05$ ). Lsa/b фенотип је био најчешћи код MRSA изолата из гениталних секрета, а код MSSA изолата из пиокултура ( $p > 0,05$ ) (Табела 5 и Графикон 13).



**Графикон 13.** Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала код MRSA и MSSA изолата; Er/Kli S - сензитивни на еритромицин и клиндамицин, cMLSb - конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, M/MSb - резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б, iMLSb - индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, LSa/b - резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

Када се упореде метицилин резистентни и метицилин осетљиви изолати *S. aureus*, уз мање разлике, уочава се слична тенденција. Наиме, и код MRSA и код MSSA изолата најчешће детектован фенотип MLS резистенције међу изолатима из брисева грла и носа је био iMLSb, а међу изолатима из гениталних секрета M/MSb фенотип. Дистрибуција MLS фенотипова код MSSA и MRSA изолата из пиокултура се разликовала, и iMLSb је био доминантан код MSSA изолата, а cMLSb фенотип код MRSA изолата (Табела 5 и Графикон 13).

#### 4.5.2 Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала код KNS изолата

Поређењем учесталости MLS фенотипова по врсти материјала код MRKNS изолата утврдили смо да је највећи проценат изолата сензитивних на еритромицин и клиндамицин био међу изолатима из брисева грла и носа ( $p > 0,05$ ), cMLSb и M/MSb фенотип међу изолатима из гениталних секрета ( $p > 0,05$ ) и iMLSb међу изолатима из пиокултура ( $p > 0,05$ ). LSa/b фенотип није идентификован код MRKNS изолата (Табела 6 и Графикон 14).

Поређењем учесталости MLS фенотипова по врсти материјала код MSKNS изолата утврдили смо да је највећи проценат изолата сензитивних на еритромицин и клиндамицин био међу изолатима из брисева грла и носа ( $p > 0,05$ ), а да су cMLSb, M/MSb и LSa/b фенотип били најчешћи међу изолатима из гениталних секрета ( $p > 0,05$ ), а iMLSb међу изолатима из брисева грла и носа ( $p > 0,05$ ) (Табела 6 и Графикон 14).

**Табела 6.** Учесталост фенотипова резистенције по врсти материјала код MRKNS и MSKNS изолата

	MRKNS <sup>a</sup>			MSKNS <sup>b</sup>		
	Врста материјала n (%)			Врста материјала n (%)		
	Брисеви грла и носа	Пиокултуре	Генитални секрет	Брисеви грла и носа	Пиокултуре	Генитални секрет
<b>Er/Kli S<sup>b</sup></b>	2 (13,3)	3 (8,3)	1 (5,0)	96 (43,2)	126 (41,3)	35 (34,7)
<b>cMLSb<sup>c</sup></b>	2 (13,3)	5 (13,9)	4 (20,0)	15 (6,8)	36 (11,8)	13 (12,9)
<b>M/MSb<sup>d</sup></b>	5 (33,3)	10 (27,8)	8 (40,0)	33 (14,9)	66 (21,6)	26 (25,7)
<b>iMLSb<sup>e</sup></b>	6 (40,0)	18 (50,0)	7 (35,0)	75 (33,8)	73 (23,9)	24 (23,8)
<b>LSa/b<sup>e</sup></b>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (1,4)	4 (1,3)	3 (3,0)
<b>Укупно</b>	15 (100,0)	36 (100,0)	20 (100,0)	222 (100,0)	305 (100,0)	101 (100,0)

<sup>a</sup> Метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок

<sup>b</sup> Метицилин сензитивни коагулаза негативни стафилокок

<sup>c</sup> Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

<sup>d</sup> Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

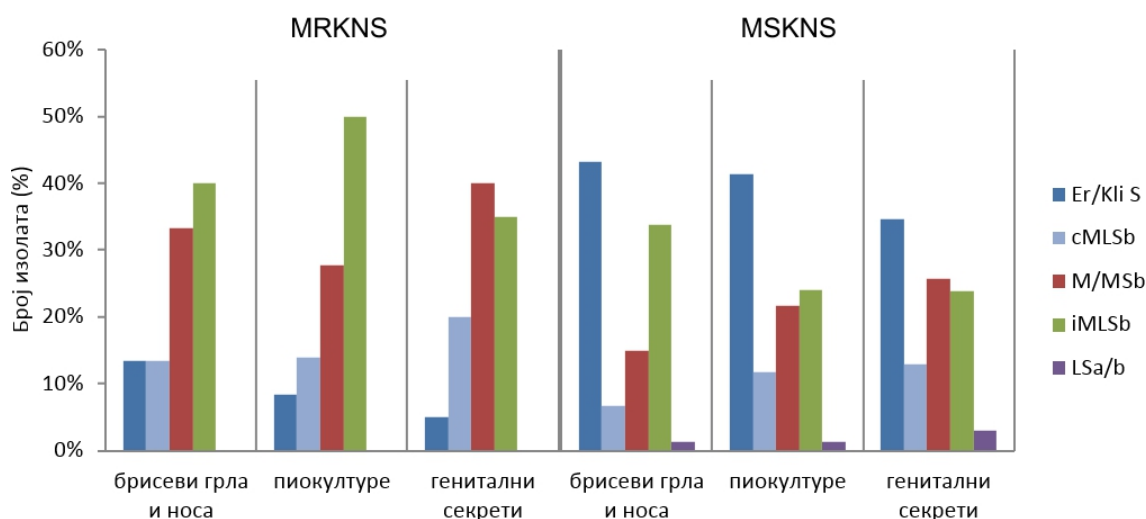
<sup>e</sup> Резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б

<sup>f</sup> Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

<sup>g</sup> Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

Поређењем учесталости MLS фенотипова резистенције према врсти материјала код изолата MRKNS и MSKNS, утврдили смо да је највећа учесталост изолата осетљивих на еритромицин и клиндамицин била код изолата MRKNS и MSKNS из брисева грла и носа ( $p < 0,05$ ), а M/MSb, cMLSb и LSa/b фенотипа резистенције из гениталних секрета ( $p > 0,05$ ). iMLSb фенотип је био најучесталији код MSKNS изолата из брисева грла и носа, а код MRKNS изолата из пиокултура ( $p < 0,05$ ) (Табела 6 и Графикон 14).





**Графикон 14.** Учесталост MLS фенотипова резистенције према врсти материјала код MRKNS и MSKNS изолата; Er/Kli S - сензитивни на еритромицин и клиндамицин, cMLSb - конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, M/MSb - резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б, iMLSb - индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, LSa/b - резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

Када се упореди учесталост MLS фенотипова резистенције према врсти материјала код метицилин резистентних и метицилин осетљивих изолата коагулаза негативних стафилокока, уочава се слична тенденција. Наиме, и код MRKNS и код MSKNS изолата, најчешћи је био iMLSb фенотип резистенције међу изолатима из брисева грла и носа и пиокултура, а M/MSb фенотип међу изолатима из гениталних секрета (Табела 6 и Графикон 14).

#### 4.5.3 Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала код изолата *Enterococcus* spp. и *S. agalactiae*

Поређењем учесталости MLS фенотипова резистенције по врсти материјала код изолата *Enterococcus* spp. утврдили смо да је највећи проценат изолата сензитивних на еритромицин и клиндамицин, као и изолата са M/MSb, iMLSb и LSa/b фенотипом био међу изолатима из пиокултура ( $p > 0,05$ ). cMLSb фенотип био најчешћи међу изолатима из брисева грла и носа ( $p > 0,05$ ) (Табела 7 и Графикон 15).

Поређењем учесталости MLS фенотипова по врсти материјала код изолата *S. agalactiae* утврдили смо да је највећи проценат изолата сензитивних на еритромицин и

клиндамицин био међу изолатима из брисева грла и носа ( $p > 0,05$ ), cMLSb фенотипа међу изолатима из уринокултура ( $p > 0,05$ ), а M/MSb и iMLSb фенотипа међу изолатима из гениталних секрета ( $p > 0,05$ ). L<sub>Sa</sub>/b фенотип је био најчешћи међу изолатима из пиокултура ( $p > 0,05$ ) (Табела 7 и Графикон 15).

**Табела 7.** Учесталост фенотипова резистенције по врсти материјала код изолата *Enterococcus* spp. и *S. agalactiae*

	<i>Enterococcus</i> spp.				<i>S. agalactiae</i>			
	Врста материјала n (%)				Врста материјала n (%)			
	Урин	Брисеви грла и носа	Пиокултуре	Генитални секрет	Урин	Брисеви грла и носа	Пиокултуре	Генитални секрет
E <sub>r</sub> /K <sub>li</sub> S <sup>a</sup>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,9)	1 (0,5)	3 (75,0)	2 (100,0)	7 (63,6)	82 (61,7)
cMLSb <sup>b</sup>	5 (83,3)	3 (100,0)	33 (61,1)	151 (83,0)	1 (25,0)	0 (0,0)	1 (9,1)	20 (15,0)
M/MSb <sup>b</sup>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,9)	1 (0,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (9,1)	18 (13,5)
iMLSb <sup>c</sup>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,9)	3 (1,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (4,5)
L <sub>Sa</sub> /b <sup>d</sup>	1 (16,7)	0 (0,0)	18 (33,3)	26 (14,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (18,2)	7 (5,3)
<b>Укупно</b>	<b>6 (100,0)</b>	<b>3 (100,0)</b>	<b>54 (100,0)</b>	<b>182 (100,0)</b>	<b>4 (100,0)</b>	<b>2 (100,0)</b>	<b>11 (100,0)</b>	<b>133 (100,0)</b>

<sup>a</sup> Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

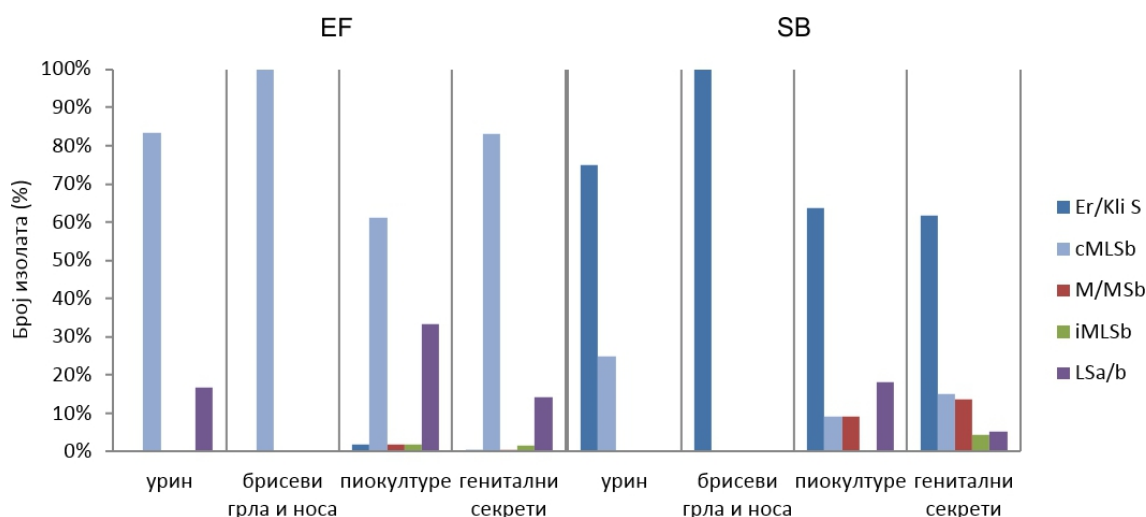
<sup>b</sup> Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

<sup>b</sup> Резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б

<sup>c</sup> Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

<sup>d</sup> Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

Поређењем учесталости MLS фенотипова резистенције по врсти материјала између изолата *Enterococcus* spp. и *S. agalactiae* утврдили смо да је највећа учесталост изолата ентерокока осетљивих на еритромицин и клиндамицин била међу изолатима из пиокултура, изолата *S. agalactiae* из брисева грла и носа ( $p < 0,05$ ), изолата ентерокока са cMLSb фенотипом међу изолатима из брисева грла и носа, а изолата *S. agalactiae* из уринокултура ( $p < 0,05$ ). Највећа учесталост изолата ентерокока са M/MSb и iMLSb фенотипом била је међу изолатима из пиокултура, а изолата *S. agalactiae* из гениталних секрета ( $p > 0,05$ ). Најучесталији изолати ентерокока и *S. agalactiae* са L<sub>Sa</sub>/b фенотипом резистенције су били међу изолатима из пиокултура (Табела 7 и Графикон 15).



**Графикон 15.** Учесталост MLS фенотипова резистенције према врсти материјала код изолата *Enterococcus spp.* (EF) и *S. agalactiae* (SB); Er/Kli S - сензитивни на еритромицин и клиндамицин, cMLSb - конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, M/MSb - резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б, iMLSb - индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, LSa/b - резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

Поређењем дистрибуције учесталости MLS фенотипова резистенције према врсти материјала, запажене су велике разлике између изолата ентерокока и *S. agalactiae*. Једина сличност у учесталости код изолата *Enterococcus spp.* и *S. agalactiae* била је код LSa/b фенотипа резистенције, који је био најучесталији међу изолатима обе бактерије из пиокултура (Табела 7 и Графикон 15).

#### 4.5.4 Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала код изолата *S. pneumoniae* и *S. pyogenes*

Поређењем учесталости MLS фенотипова по врсти материјала код изолата *S. pneumoniae* утврдили смо да је највећи проценат изолата сензитивних на еритромицин и клиндамицин и изолата са M/MSb фенотипом био међу изолатима из гениталних секрета ( $p > 0,05$ ), cMLSb из брисева грла и носа ( $p > 0,05$ ) и iMLSb фенотип из пиокултура ( $p > 0,05$ ) (Табела 8 и Графикон 16).

Поређењем учесталости MLS фенотипова по врсти материјала код изолата *S. pyogenes* утврдили смо да је највећи проценат изолата сензитивних на еритромицин и

клиндамицин био међу изолатима из гениталних секрета ( $p > 0,05$ ), а cMLSb, M/MSb и iMLSb из пиокултура ( $p > 0,05$ ). LSa/b фенотип није идентификован код ове врсте бактерија, као ни код *S. pneumoniae* (Табела 8 и Графикон 16).

**Табела 8.** Учесталост фенотипова резистенције по врсти материјала код изолата *S. pneumoniae* и *S. pyogenes*

	<i>S. pneumoniae</i>			<i>S. pyogenes</i>		
	Врста материјала n (%)			Врста материјала n (%)		
	Брисеви грла и носа	Пиокултуре	Генитални секрет	Брисеви грла и носа	Пиокултуре	Генитални секрет
Er/Kli S <sup>a</sup>	15 (28,8)	4 (50,0)	3 (75,0)	136 (57,9)	10 (37,0)	2 (100,0)
cMLSb <sup>b</sup>	21 (40,4)	2 (25,0)	0 (0,0)	39 (16,6)	8 (29,6)	0 (0,0)
M/MSb <sup>a</sup>	10 (19,2)	1 (12,5)	1 (25,0)	44 (18,7)	6 (22,2)	0 (0,0)
iMLSb <sup>c</sup>	6 (11,5)	1 (12,5)	0 (0,0)	16 (6,8)	3 (11,1)	0 (0,0)
LSa/b <sup>d</sup>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<b>Укупно</b>	<b>52 (100,0)</b>	<b>8 (100,0)</b>	<b>4 (100,0)</b>	<b>235 (100,0)</b>	<b>27 (100,0)</b>	<b>2 (100,0)</b>

<sup>a</sup> Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

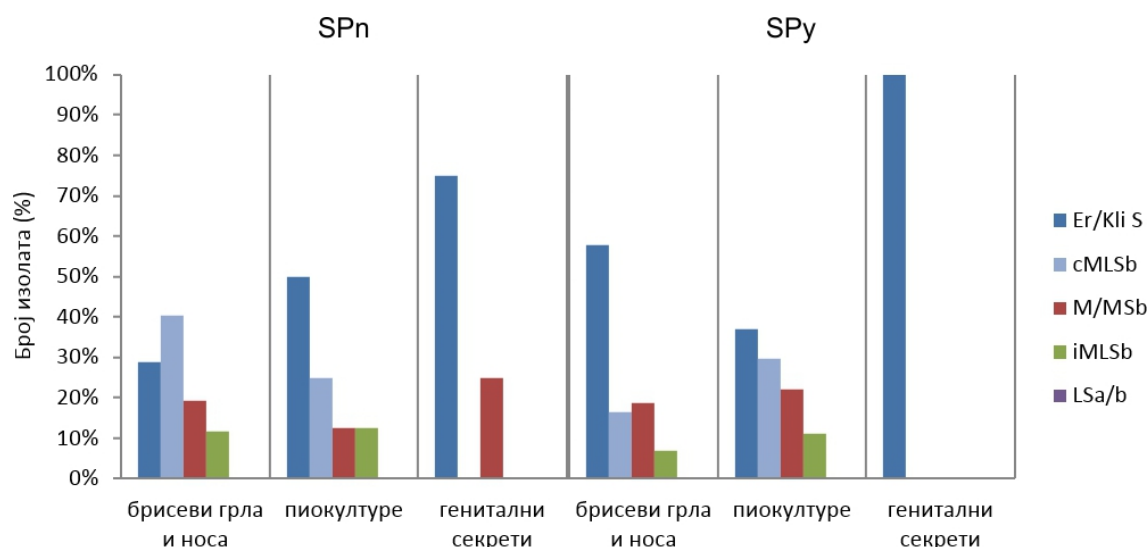
<sup>b</sup> Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

<sup>a</sup> Резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б

<sup>c</sup> Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

<sup>d</sup> Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

Поређењем учесталости MLS фенотипова резистенције код изолата *S. pneumoniae* и *S. pyogenes* према врсти материјала утврдили смо да највећи проценат изолата *S. pneumoniae* и *S. pyogenes* осетљивих на еритромицин и клиндамицин био међу изолатима из гениталних секрета ( $p > 0,05$ ), а iMLSb фенотипа из пиокултура ( $p > 0,05$ ). cMLSb фенотип је био најучесталији код изолата *S. pneumoniae* међу изолатима из брисева грла и носа, а код изолата *S. pyogenes* из пиокултура ( $p > 0,05$ ). M/MSb фенотип је био најчешћи међу изолатима *S. pneumoniae* из гениталних секрета, а међу изолатима *S. pyogenes* из пиокултура ( $p > 0,05$ ). iMLSb фенотип је био најзаступљенији међу изолатима *S. pneumoniae* и *S. pyogenes* из пиокултура ( $p > 0,05$ ) (Табела 8 и Графикон 16).



**Графикон 16.** Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала код изолати *S. pneumoniae* (SPn) и *S. pyogenes* (SPy); Er/Kli S - сензитивни на еритромицин и клиндамицин, cMLSb - конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, M/MSb - резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б, iMLSb - индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, LСа/b - резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

Када се упореде изолати *S. pneumoniae* и *S. pyogenes*, уочава се делимична сличност у дистрибуцији фенотипова MLS резистенције међу изолатима из различитих врста материјала. Наиме, и код *S. pneumoniae* и код *S. pyogenes* изолати најчешће је детектован iMLSb фенотип из пиокултура, док LСа/b фенотип није био идентификован ни код једне од ових врста бактерија (Табела 8 и Графикон 16).

#### 4.6 Учесталост MLS фенотипова резистенције по пореклу материјала

Поређењем учесталости MLS фенотипова резистенције код изолати Грам-позитивних кока међу изолатима амбулантног и болничког порекла није утврђена статистички значајна разлика ( $p > 0,05$ ) (Табела 9 и Графикон 17).

**Табела 9.** Учесталост MLS фенотипова по пореклу материјала код Грам-позитивних кока

	Порекло материјала n (%)	
	Амбулантни	Болнички
<b>Er/Kli S<sup>a</sup></b>	786 (39,0)	123 (35,1)
<b>cMLSb<sup>b</sup></b>	383 (19,0)	48 (13,8)
<b>M/MSb<sup>b</sup></b>	291 (14,4)	81 (23,1)
<b>iMLSb<sup>†</sup></b>	493 (24,5)	91 (26,0)
<b>LSa/b<sup>‡</sup></b>	63 (3,1)	7 (2,0)
<b>Укупно</b>	2016 (100,0)	350 (100,0)

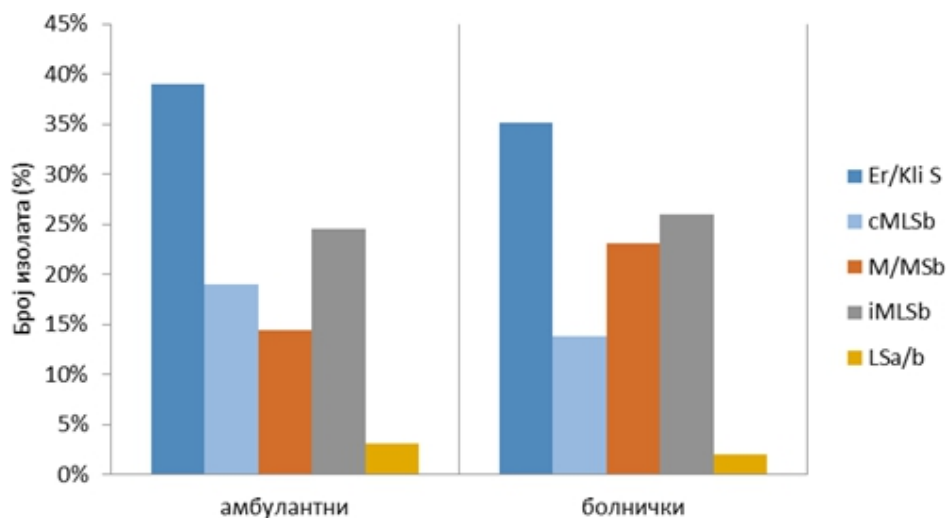
<sup>a</sup> Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

<sup>b</sup> Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

<sup>b</sup> Резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б

<sup>†</sup> Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

<sup>‡</sup> Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б



**Графикон 17.** Учесталост MLS фенотипова по пореклу материјала код Грам-позитивних кока; Er/Kli S - сензитивни на еритромицин и клиндамицин, cMLSb - конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, M/MSb - резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б, iMLSb - индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, LSa/b - резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

#### 4.6.1 Учесталост MLS фенотипова резистенције по пореклу материјала код стафилокока

У односу на порекло материјала, профил учесталости MLS фенотипова резистенције код изолата MRSA и MRKNS и изолата MSSA и MSKNS био је сличан. iMLSb је био доминантан MLS фенотип резистенције код стафилокока међу амбулантним и болничким изолатима и није било статистички значајне разлике међу њима ( $p > 0,05$ ) (Табела 10 и Графикон 18). Међутим, постојала је статистички значајна разлика у учесталости M/MSb фенотипа међу болничким и амбулантним сојевима стафилокока. Наиме, M/MSb фенотип је био чешће заступљен међу болничким изолатима у односу на амбулантне ( $p < 0,05$ ) (Табела 10 и Графикон 18).

**Табела 10.** Учесталост фенотипова резистенције по пореклу материјала код стафилокока

	MRSA <sup>a</sup>		MSSA <sup>b</sup>		MRKNS <sup>b</sup>		MSKNS <sup>c</sup>	
	Порекло материјала n (%)		Порекло материјала n (%)		Порекло материјала n (%)		Порекло материјала n (%)	
	Амбулантни	Болнички	Амбулантни	Болнички	Амбулантни	Болнички	Амбулантни	Болнички
Ef/Kli S <sup>d</sup>	16 (12,3)	3 (9,4)	299 (45,7)	62 (48,4)	6 (12,2)	0 (0,0)	225 (42,1)	32 (34,0)
eMLSb <sup>b</sup>	36 (27,7)	7 (21,9)	27 (4,1)	2 (1,6)	10 (20,4)	1 (4,5)	55 (10,3)	9 (9,6)
M/MSb <sup>c</sup>	16 (12,3)	10 (31,3)	91 (13,9)	24 (18,8)	13 (26,5)	10 (45,5)	98 (18,4)	27 (28,7)
iMLSb <sup>*</sup>	60 (46,2)	11 (34,4)	234 (35,8)	40 (31,3)	20 (40,8)	11 (50,0)	147 (27,5)	25 (26,6)
LSa/b <sup>3</sup>	2 (1,5)	1 (3,1)	3 (0,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	9 (1,7)	1 (1,1)
<b>Укупно</b>	<b>130 (100,0)</b>	<b>32 (100,0)</b>	<b>654 (100,0)</b>	<b>128 (100,0)</b>	<b>49 (100,0)</b>	<b>22 (100,0)</b>	<b>534 (100,0)</b>	<b>94 (100,0)</b>

<sup>a</sup> Метицилин резистентан *S. aureus*

<sup>b</sup> Метицилин сензитиван *S. aureus*

<sup>B</sup> Метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок

<sup>r</sup> Метицилин сензитивни коагулаза негативни стафилокок

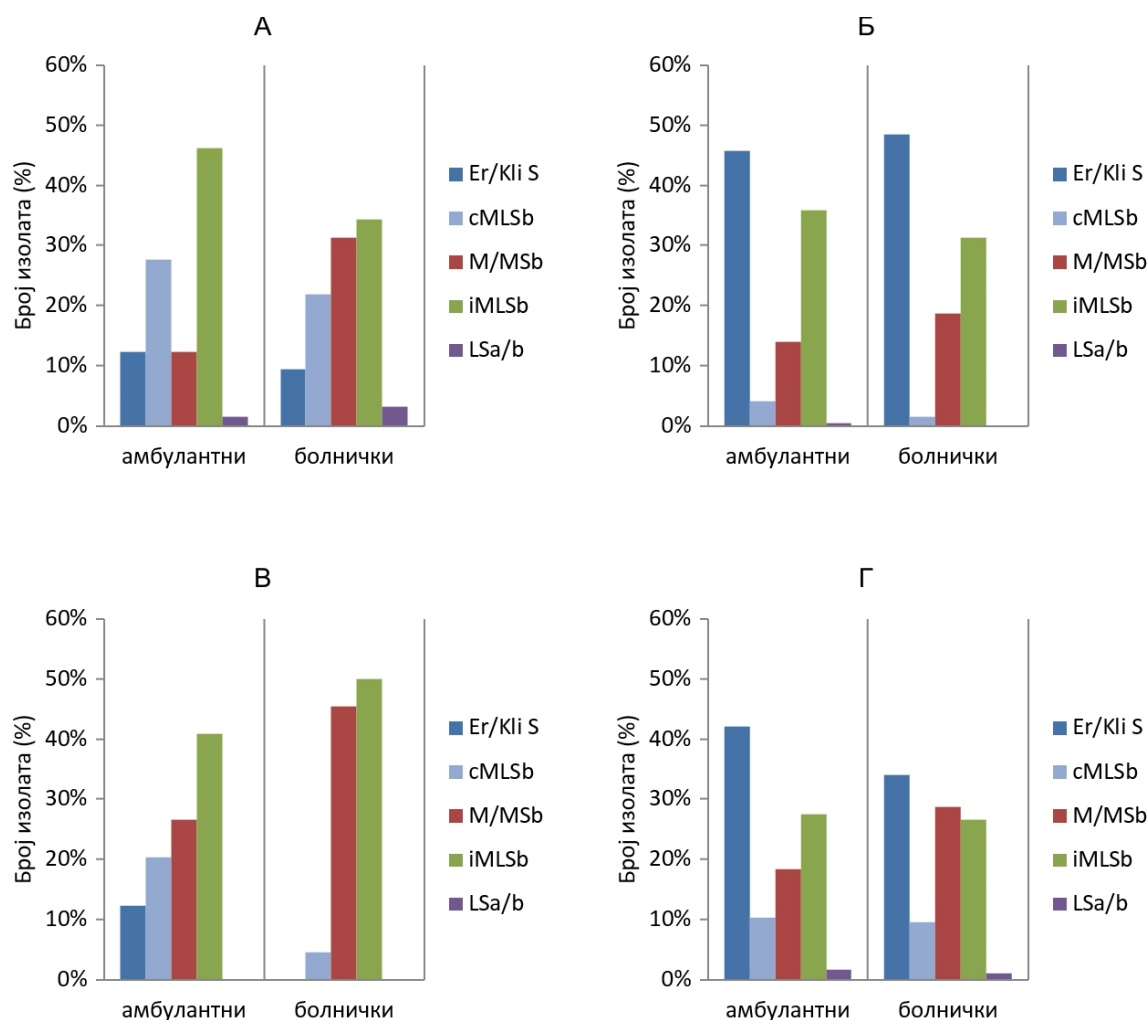
<sup>d</sup> Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

<sup>b</sup> Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

<sup>c</sup> Резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б

<sup>\*</sup> Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

<sup>3</sup> Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б



**Графикон 18.** Учесталост MLS фенотипова резистенције према врсти материјала код MRSA (A), MSSA (Б), MRKNS (B) и MSKNS (Г); Er/Kli S - сензитивни на еритромицин и клиндамицин, cMLSb - конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, M/MSb - резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б, iMLSb - индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, LSa/b - резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

#### 4.6.2 Учесталост MLS фенотипова резистенције по пореклу материјала код ентерокока и стрептокока

У односу на порекло материјала, проценат изолата ентерокока и стрептокока истог MLS фенотипа резистенције је био приближно исти између изолата амбулантног и болничког порекла и није било статистички значајне разлике међу њима (Табела 11).



**Табела 11.** Учесталост фенотипова резистенције по пореклу материјала код ентерокока и стрептокока

	<i>Enterococcus spp.</i>		<i>S. pneumonia</i>		<i>S. agalactiae</i>		<i>S. pyogenes</i>	
	Порекло материјала		Порекло материјала		Порекло материјала		Порекло материјала	
	n (%)		n (%)		n (%)		n (%)	
	Амбулантни	Болнички	Амбулантни	Болнички	Амбулантни	Болнички	Амбулантни	Болнички
Er/Kli S <sup>a</sup>	1 (0,5)	1 (3,6)	20 (36,4)	2 (22,2)	85 (61,2)	9 (81,8)	134 (56,3)	14 (53,8)
cMLSb <sup>b</sup>	173 (79,7)	19 (67,9)	21 (38,2)	2 (22,2)	21 (15,1)	1 (9,1)	40 (16,8)	7 (26,9)
M/MSb <sup>b</sup>	1 (0,5)	1 (3,6)	9 (16,4)	3 (33,3)	18 (12,9)	1 (9,1)	45 (18,9)	5 (19,2)
iMLSb <sup>c</sup>	2 (0,9)	2 (7,1)	5 (9,1)	2 (22,2)	6 (4,3)	0 (0,0)	19 (8,0)	0 (0,0)
LSa/b <sup>d</sup>	40 (18,4)	5 (17,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	9 (6,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<b>Укупно</b>	<b>217 (100,0)</b>	<b>28 (100,0)</b>	<b>55 (100,0)</b>	<b>9 (100,0)</b>	<b>139 (100,0)</b>	<b>11 (100,0)</b>	<b>238 (100,0)</b>	<b>26 (100,0)</b>

<sup>a</sup> Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

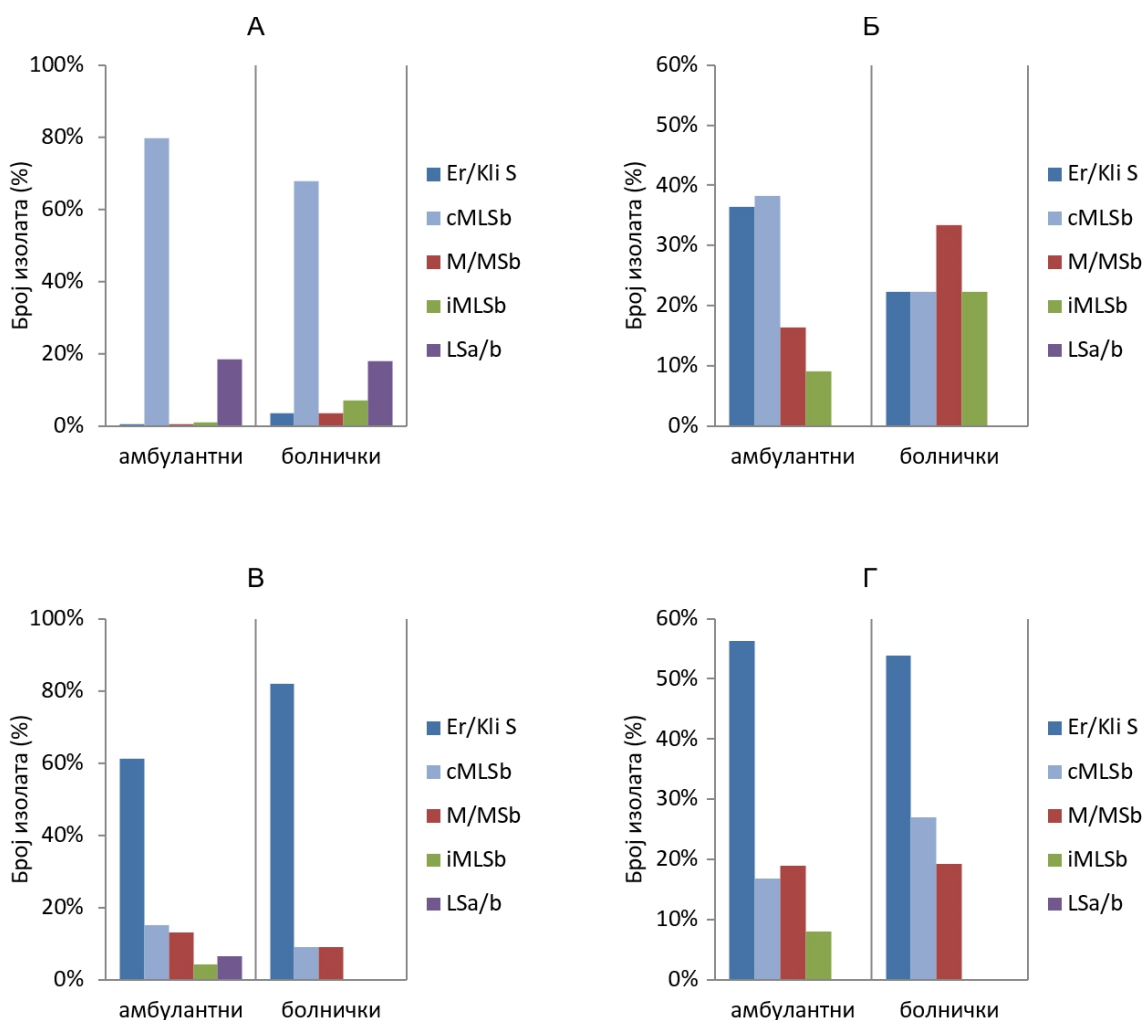
<sup>b</sup> Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

<sup>b</sup> Резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б

<sup>c</sup> Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

<sup>d</sup> Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

Поређењем учесталости појединачних MLS фенотипова резистенције код ентерокока и стрептокока према пореклу материјала, утврдили смо да није било статистички значајне разлике у заступљености фенотипова између амбулантних и болничких изолата. Доминантан MLS фенотип резистенције код изолата ентерокока и *S. agalactiae* амбулантног и болничког порекла био је cMLSb ( $p > 0,05$ ). Код изолата *S. pneumoniae* доминантан фенотип међу амбулантним изолатима био је cMLSb ( $p > 0,05$ ), а међу болничким M/MSb ( $p > 0,05$ ). Међу изолатима *S. pyogenes* било је обрнуто, доминантан фенотип код амбулантних био је M/MSb ( $p > 0,05$ ), а код болничких cMLSb ( $p > 0,05$ ) (Табела 11 и Графикон 19).

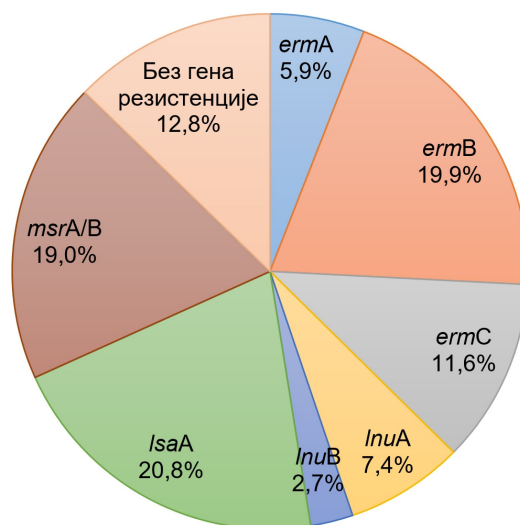


**Графикон 19. Учесталост MLS фенотипова резистенције по пореклу материјала; А: *Enterococcus* spp.; Б: *S. pneumoniae*; В: *S. agalactiae*; Г: *S. pyogenes*; Er/Kli S - сензитивни на еритромицин и клиндамицин, cMLSb - конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, M/MSb - резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б, iMLSb - индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, LSa/b - резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б**

#### 4.7 Учесталост MLS гена резистенције код Грам-позитивних кока

Триста тридесет изолата Грам-позитивних кока са различитим MLS фенотиповима резистенције смо селектовали за даљу генетску анализу. Да бисмо детектовали клинички релевантне MLS гене резистенције, урадили смо End-point PCR анализу (Графикон 20). Најчешће детектовани MLS гени резистенције међу изолатима Грам-позитивних кока били су *lsaA*, затим су следили *erm* гени: *ermB*, *ermC* и *ermA* и на трећем месту по

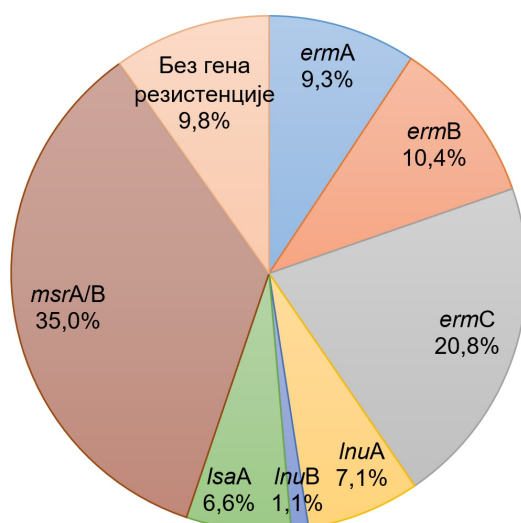
учесталости био је *msrA/B* ген. Код 12,8% изолата Грам-позитивних кока који су показивали iMLSb, M/MSb или LSa/b фенотип резистенције, нисмо идентификовали MLS гене резистенције (Графикон 20).



**Графикон 20.** Учесталост MLS гена резистенције код Грам-позитивних кока са једним од четири MLS фенотипа резистенције

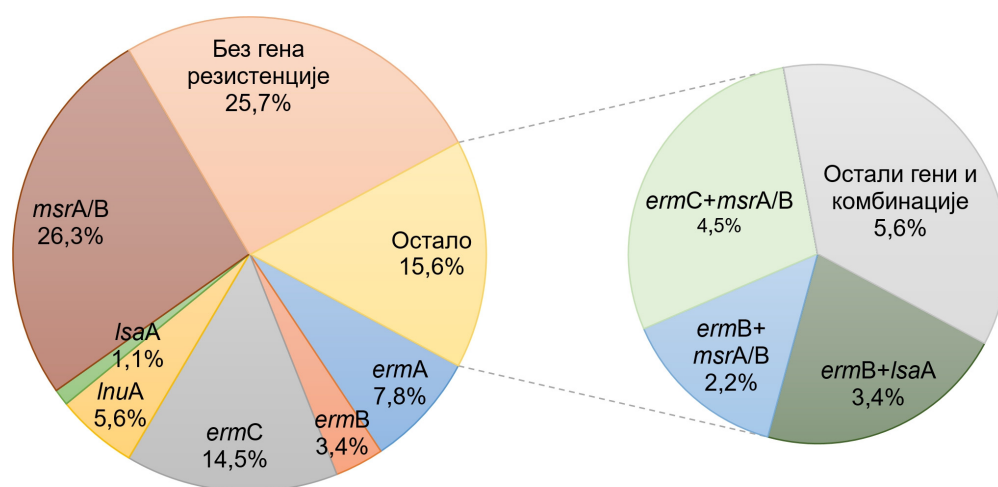
#### 4.7.1 Учесталост MLS гена резистенције код изолата стафилокока

Сто седамдесет девет изолата стафилокока са различитим MLS фенотиповима резистенције смо селектовали за даљу генетску анализу. Да бисмо детектовали клинички релевантне MLS гене резистенције урадили смо End-point PCR анализу (Графикон 21). Најчешће детектовани MLS гени резистенције међу изолатима стафилокока били су *msrA/B*, затим су следили *erm* гени *ermC*, *ermB* и *ermA*. Код 9,8% изолата стафилокока са iMLSb, M/MSb или LSa/b фенотипом резистенције, нису били идентификовани MLS гени резистенције (Графикон 21).



**Графикон 21.** Учесталост MLS гена међу изолатима стафилокока који су показивали један од четири MLS фенотипа резистенције

MLS фенотипови резистенције које смо анализирали су углавном настали посредством појединачног гена, а то су били најчешће *msrA/B* и *ermC*. Међутим, ови фенотипови су такође били детерминисани и комбинацијама два или више гена резистенције, а најчешће детектоване комбинације гена биле су *ermC+msrA/B*, *ermB+isaA*, и *ermB+msrA/B* (Графикон 22).



**Графикон 22.** Учесталост MLS гена резистенције и њихових комбинација код стафилокока

4.7.1.1 Учесталост *MLS* гена резистенције код различитих врста стафилокока

Учесталост *MLS* гена резистенције и њихових комбинација код различитих група стафилокока приказана је у Табели 12. *ermA* и *ermC* ген су били најчешћи код *MSSA*, док је *ermB* ген био најучесталији код *MRKNS* изолата. *lnuA* ген је био у највећем броју заступљен код *MSKNS* изолата, док је *lsaA* ген био, као појединачни ген, детектован само код изолата *S. aureus*. Највећи проценат *msrA/B* гена био је идентификован код изолата *MSKNS*. Комбинације два или више гена резистенције су биле углавном детектоване код метицилин-резистентних изолата стафилокока (Табела 12).

**Табела 12.** Учесталост *MLS* гена резистенције и њихових комбинација код различитих врста стафилокока

	<i>Staphylococcus</i> spp. n (%)				
	<i>MSSA</i> <sup>а</sup>	<i>MRSA</i> <sup>б</sup>	<i>MSKNS</i> <sup>в</sup>	<i>MRKNS</i> <sup>г</sup>	Укупно
<i>ermA</i>	8 (16,7)	3 (6,7)	2 (4)	1 (2,8)	14 (7,8)
<i>ermB</i>		2 (4,4)	1 (2)	3 (8,3)	6 (3,4)
<i>ermC</i>	8 (16,6)	7 (15,6)	6 (12)	5 (13,9)	26 (14,5)
<i>lnuA</i>	1 (2,1)	3 (6,6)	6 (12)		10 (5,6)
<i>lsaA</i>	1 (2,1)	1 (2,2)			2 (1,1)
<i>msrA/B</i>	14 (29,2)	11 (24,4)	15 (30)	7 (19,4)	47 (26,3)
<i>ermA+ermC</i>	1 (2,1)				1 (0,6)
<i>ermA+msrA/B</i>	1 (2,1)	1 (2,2)			2 (1,1)
<i>ermB+ermC</i>				1 (2,8)	1 (0,6)
<i>ermB+lsaA</i>			1 (2)	5 (13,9)	6 (3,4)
<i>ermB+msrA/B</i>		3 (6,7)		1 (2,8)	4 (2,2)
<i>ermC+lsaA</i>	1 (2,1)				1 (0,6)
<i>ermC+msrA/B</i>		2 (4,4)	2 (4)	4 (11,2)	8 (4,5)
<i>lnuA+lnuB</i>			1 (2)		1 (0,6)
<i>msrA/B+lsaA</i>		1 (2,2)			1 (0,6)
<i>ermB+msrA/B+lsaA</i>		1 (2,2)			1 (0,6)
<i>ermC+msrA/B+lnuA</i>	1 (2,1)				1 (0,6)
<i>ermB+lnuA+lnuB+lsaA</i>				1 (2,8)	1 (0,6)
Без гена резистенције	12 (25)	10 (22,1)	16 (32)	8 (22,2)	46 (25,7)
Укупно	48 (100)	45 (100)	50 (100)	36 (100)	179 (100)

а Метицилин-сензитиван *S. aureus*

б Метицилин-резистентан *S. aureus*

в Метицилин-сензитиван коагулаза-негативан стафилокок

г Метицилин-резистентан коагулаза-негативан стафилокок

#### 4.7.1.2 Учесталост *MLS* гена резистенције код различитих фенотипова стафилокока

Учесталост *MLS* гена резистенције и њихових комбинација код различитих *MLS* фенотипова стафилокока је представљена у Табели 13.

**Табела 13.** Учесталост *MLS* гена и њихових комбинација код различитих фенотипова стафилокока

	Фенотипови резистенције n (%)					
	Er/Cli S <sup>a</sup>	cMLSb <sup>b</sup>	M/MSb <sup>b</sup>	iMLSb <sup>c</sup>	LSa/b <sup>d</sup>	Укупно
<i>ermA</i>		1 (2,6)		13 (25,5)		14 (7,8)
<i>ermB</i>		2 (5,3)		4 (7,8)		6 (3,4)
<i>ermC</i>		11 (28,9)		15 (29,4)		26 (14,5)
<i>lnuA</i>				1 (2)	9 (56,3)	10 (5,6)
<i>lsaA</i>		1 (2,6)			1 (6,3)	2 (1,1)
<i>msrA/B</i>	1 (3,4)	1 (2,6)	43 (95,6)	1 (2)	1 (6,3)	47 (26,3)
<i>ermA+ermC</i>				1 (2)		1 (0,6)
<i>ermA+msrA/B</i>		1 (2,6)		1 (2)		2 (1,1)
<i>ermB+ermC</i>		1 (2,6)				1 (0,6)
<i>ermB+lsaA</i>		6 (15,8)				6 (3,4)
<i>ermB+msrA/B</i>		4 (10,5)				4 (2,2)
<i>ermC+lsaA</i>		1 (2,6)				1 (0,6)
<i>ermC+msrA/B</i>		5 (13,2)		3 (5,9)		8 (4,5)
<i>lnuA+lnuB</i>					1 (6,3)	1 (0,6)
<i>msrA/B+lsaA</i>		1 (2,6)				1 (0,6)
<i>ermB+msrA/B+lsaA</i>		1 (2,6)				1 (0,6)
<i>ermC+msrA/B+lnuA</i>		1 (2,6)				1 (0,6)
<i>ermB+lnuA+lnuB+lsaA</i>		1 (2,6)				1 (0,6)
<b>Без гена резистенције</b>	28 (96,6)		2 (4,4)	12 (23,5)	4 (25)	46 (25,7)
<b>Укупно</b>	29 (100)	38 (100)	45 (100)	51 (100)	16 (100)	179 (100)

<sup>a</sup> Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

<sup>b</sup> Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

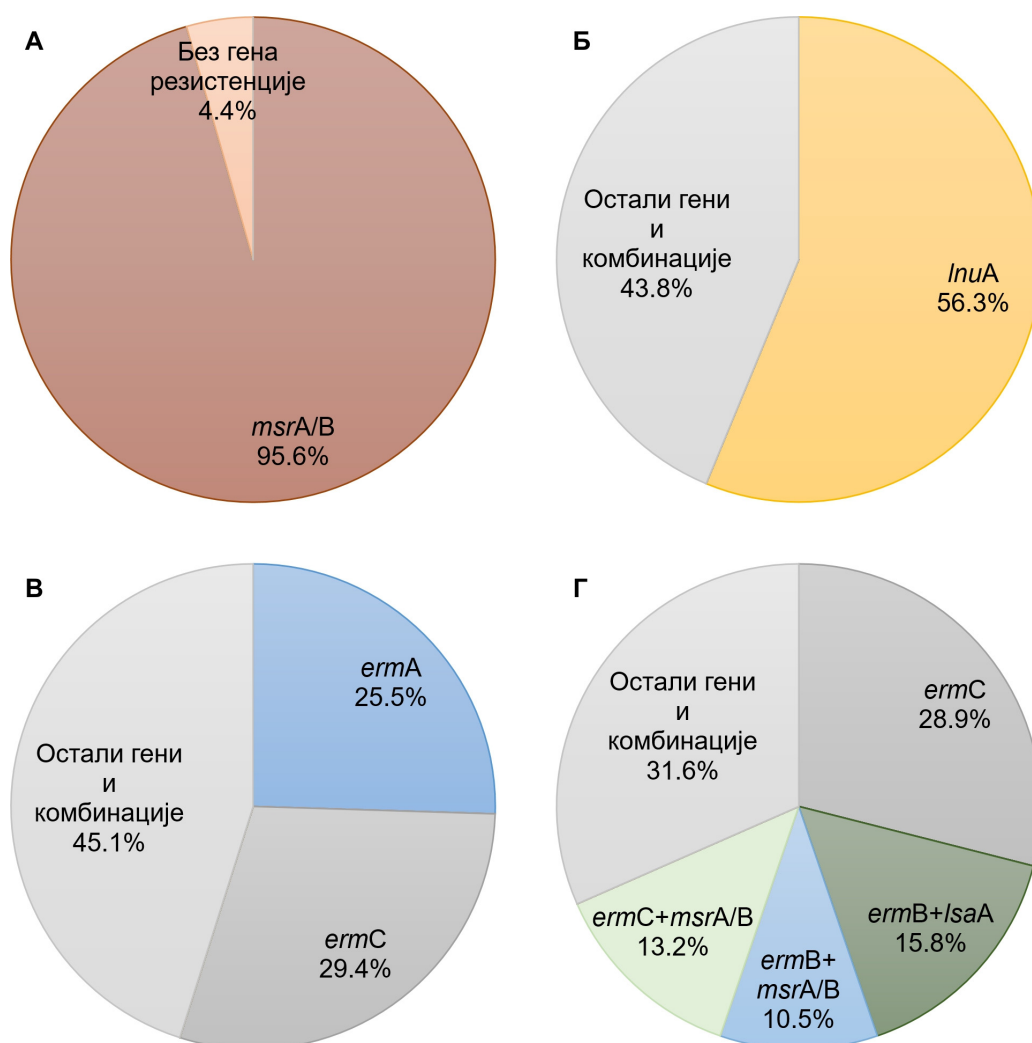
<sup>b</sup> Резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б

<sup>c</sup> Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

<sup>d</sup> Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

M/MSb фенотип резистенције је углавном био детерминисан *msrA/B* (95,6%) (Графикон 23А), а LSa/b претежно *lnuA* геном (56,3%) (Графикон 23Б). *ermC* (29,4%) и *ermA* (25,5%) су били најучесталији појединачни гени који су детерминисали iMLSb фенотип

резистенције (Графикон 23В). *ermC* (28,9%) је био најчешћи ген код изолата стафилокока са cMLSb фенотипом резистенције, који је био карактеристичан по великом броју комбинација два или више гена резистенције, а најчешће комбинације гена биле су *ermB+lsaA* (15,8%), *ermC+msrA/B* (13,2%) и *ermB+msrA/B* (10,5%) (Графикон 23Г). Овај тренд је био посебно заступљен код MRSA (58,3%) и MRKNS (90,9%) сојева, односно комбинације гена су доминантно детерминисале cMLSb фенотип код метицилин-резистентних врста стафилокока. У складу са овом опсервацијом, код једног MRKNS соја детектована је комбинација чак четири гена резистенције (*ermB+lnuA+lnuB+lsaA*) (Табела 12).



**Графикон 23.** Преваленција и експресија MLS гена и њихових комбинација код различитих фенотипова стафилокока; **А:** M/MSb; **Б:** LSa/b; **В:** iMLSb; **Г:** cMLSb

#### 4.7.1.3 Учесталост *MLS* гена резистенције према пореклу изолата код стафилокока

Учесталост *MLS* гена резистенције и њихових комбинација према пореклу изолата стафилокока приказана је у Табели 14. *msrA/B* ген је био статистички значајно чешћи код болничких изолата стафилокока него код амбулантних ( $p < 0,05$ ). Није постојала статистички значајна разлика у проценту између изолата стафилокока амбулантног и болничког порекла који су носили остале *MLS* гене резистенције и њихове комбинације ( $p > 0,05$ ).

Табела 14. Учесталост *MLS* гена резистенције према пореклу изолата стафилокока

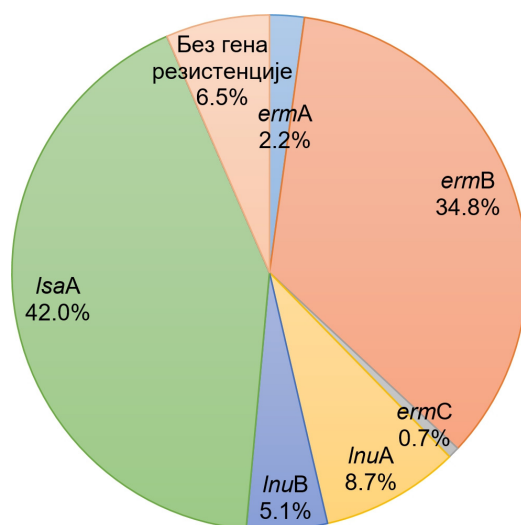
	Порекло материјала n (%)		p-вредност <sup>a</sup>
	Амбулантни	Болнички	
<i>ermA</i>	13 (8,6)	1 (3,4)	0,47
<i>ermB</i>	4 (2,6)	2 (6,9)	0,25
<i>ermC</i>	24 (16,0)	2 (6,9)	0,26
<i>lnuA</i>	7 (4,6)	3 (10,3)	0,21
<i>lsaA</i>	2 (1,3)	0	1,00
<i>msrA/B</i>	34 (22,6)	13 (44,8)	0,02
<i>ermA+ermC</i>	1 (0,6)	0	1,00
<i>ermA+msrA/B</i>	2 (1,3)	0	1,0
<i>ermB+ermC</i>	1 (0,6)	0	1,0
<i>ermB+lsaA</i>	5 (3,3)	1 (3,4)	1,0
<i>ermB+msrA/B</i>	4 (2,6)	0	1,0
<i>ermC+lsaA</i>	1 (0,6)	0	1,0
<i>ermC+msrA/B</i>	7 (4,6)	1 (3,4)	1,0
<i>lnuA+lnuB</i>	1 (0,6)	0	1,0
<i>msrA/B+lsaA</i>	1 (0,6)	0	1,0
<i>ermB+msrA/B+lsaA</i>	0	1 (3,4)	0,16
<i>ermC+msrA/B+lnuA</i>	1 (0,6)	0	1,0
<i>ermB+lnuA+lnuB+lsaA</i>	1 (0,6)	0	1,0
Без гена резистенције	41 (27,3)	5 (17,2)	0,35
Укупно	150 (100)	29 (100)	

<sup>a</sup> Све p-вредности мање од 0,05 сматране су статистички значајним



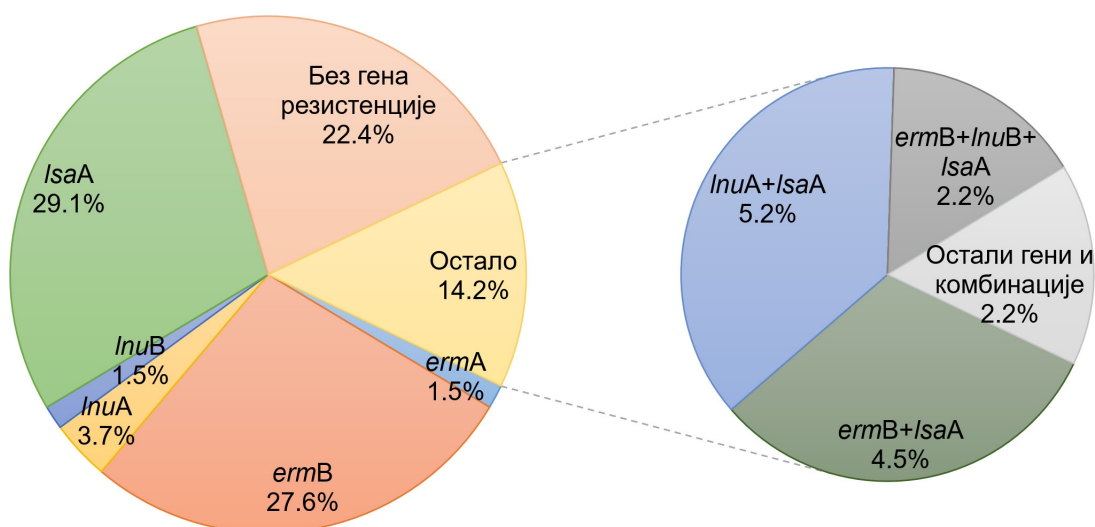
#### 4.7.2 Учесталост MLS гена резистенције код ентерокока и β-хемолитичких стрептокока

Сто педесет један изолат ентерокока и β-хемолитичких стрептокока са различитим MLS фенотиповима резистенције смо селектовали за даљу генетску анализу. Да бисмо детектовали клинички релевантне MLS гене резистенције урадили смо End-point PCR анализу. Због сумње да је дошло до деградације екстраховане ДНК, седамнаест изолата ентерокока и β-хемолитичких стрептокока који су показивали M/MSb фенотип резистенције је искључено из даље анализе. Најчешће детектован MLS ген резистенције међу изолатима ентерокока и β-хемолитичких стрептокока био је *lsaA*, а затим је следио *ermB* ген. Код 6,5% изолата ентерокока и β-хемолитичких стрептокока са iMLSb и LSa/b фенотипом резистенције нису били идентификовани MLS гени резистенције (Графикон 24).



**Графикон 24.** Учесталост MLS гена резистенције међу изолатима ентерокока и стрептокока који су показивали један од три MLS фенотипа резистенције

MLS фенотипови резистенције које смо анализирали су углавном настали посредством појединачног гена, а то су најчешће били *lsaA* и *ermB*. Међутим, ови фенотипови такође су били детерминисани и комбинацијама два или више гена резистенције, а најчешће детектоване комбинације гена биле су *InuA+lsaA* и *ermB+lsaA* (Графикон 25).



**Графикон 25.** Учесталост MLS гена резистенције и њихових комбинација код ентерокока и β-хемолитичких стрептокока

#### 4.7.2.1 Учесталост MLS гена резистенције код ентерокока и β-хемолитичких стрептокока

Учесталост MLS гена резистенције и њихових комбинација код ентерокока и β-хемолитичких стрептокока приказана је у Табели 15. *ermA* ген смо идентификовали само код изолата *S. agalactiae*, док *ermC* ген нисмо детектовали ни код једног изолата ентерокока и β-хемолитичког стрептокока, док је *ermB* ген био најучесталији међу изолатима *S. pyogenes*. *InuA*, *InuB* и *IsaA* гени су били у највећем броју заступљени код ентерокока, док код изолата *S. pyogenes* нису били идентификовани. Комбинације два или више гена резистенције су биле једнако заступљене код све три групе бактерија, док је комбинација четири гена MLS резистенције (*ermA+ermB+InuB+IsaA*) неочекивано идентификована код изолата *S. pyogenes* (Табела 15).

**Табела 15.** Учесталост MLS гена резистенције и њихових комбинација код ентерокока и β-хемолитичких стрептокока

	<i>Enterococcus spp.</i> n (%)	<i>S. agalactiae</i> n (%)	<i>S. pyogenes</i> n (%)	Укупно n (%)
<i>ermA</i>		2 (4,9)		2 (1,5)
<i>ermB</i>	12 (20)	10 (24,4)	15 (45,5)	37 (27,6)
<i>lnuA</i>	4 (6,7)	1 (2,4)		5 (3,7)
<i>lnuB</i>	2 (3,3)			2 (1,5)
<i>lsaA</i>	30 (50)	9 (21,9)		39 (29,1)
<i>ermB+lsaA</i>		3 (7,3)	3 (9,1)	6 (4,5)
<i>lnuA+lsaA</i>	5 (8,3)	2 (4,9)		7 (5,2)
<i>lnuB+lsaA</i>	1 (1,7)			1 (0,7)
<i>ermB+ermC+lsaA</i>	1 (1,7)			1 (0,7)
<i>ermB+lnuB+lsaA</i>		1 (2,4)	2 (6,1)	3 (2,2)
<i>ermA+ermB+lnuB+lsaA</i>			1 (3)	1 (0,7)
Без гена резистенције	5 (8,3)	13 (31,6)	12 (36,3)	30 (22,4)
Укупно	60 (100)	41 (100)	33 (100)	134 (100)

#### 4.7.2.2 Учесталост MLS гена резистенције према фенотипу код ентерокока и β-хемолитичких стрептокока

Учесталост MLS гена резистенције и њихових комбинација код ентерокока и β-хемолитичких стрептокока са различитим MLS фенотиповима резистенције представљена је у Табели 16.

**Табела 16.** Преваленција MLS гена резистенције и њихових комбинација код различитих фенотипова резистенције ентерокока и β-хемолитичких стрептокока

	Фенотипови резистенције n (%)				Укупно
	Er/Cl <sup>i</sup> S <sup>a</sup>	cMLSb <sup>b</sup>	iMLSb <sup>b</sup>	LSa/b <sup>c</sup>	
<i>ermA</i>			2 (22,2)		2 (1,5)
<i>ermB</i>		34 (65,4)	3 (33,3)		37 (27,6)
<i>InuA</i>				5 (9,6)	5 (3,7)
<i>InuB</i>				2 (3,8)	2 (1,5)
<i>lsaA</i>		4 (7,7)		35 (67,3)	39 (29,1)
<i>ermB+lsaA</i>		6 (11,5)			6 (4,5)
<i>InuA+lsaA</i>				7 (13,5)	7 (5,2)
<i>InuB+lsaA</i>				1 (1,9)	1 (0,7)
<i>ermB+ermC+lsaA</i>		1 (1,9)			1 (0,7)
<i>ermB+InuB+lsaA</i>		3 (5,8)			3 (2,2)
<i>ermA+ermB+InuB+lsaA</i>		1 (1,9)			1 (0,7)
<b>Без гена резистенције</b>	21 (100)	3 (5,8)	4 (44,4)	2 (3,8)	30 (22,4)
<b>Укупно</b>	21 (100)	52 (100)	9 (100)	52 (100)	134 (100)

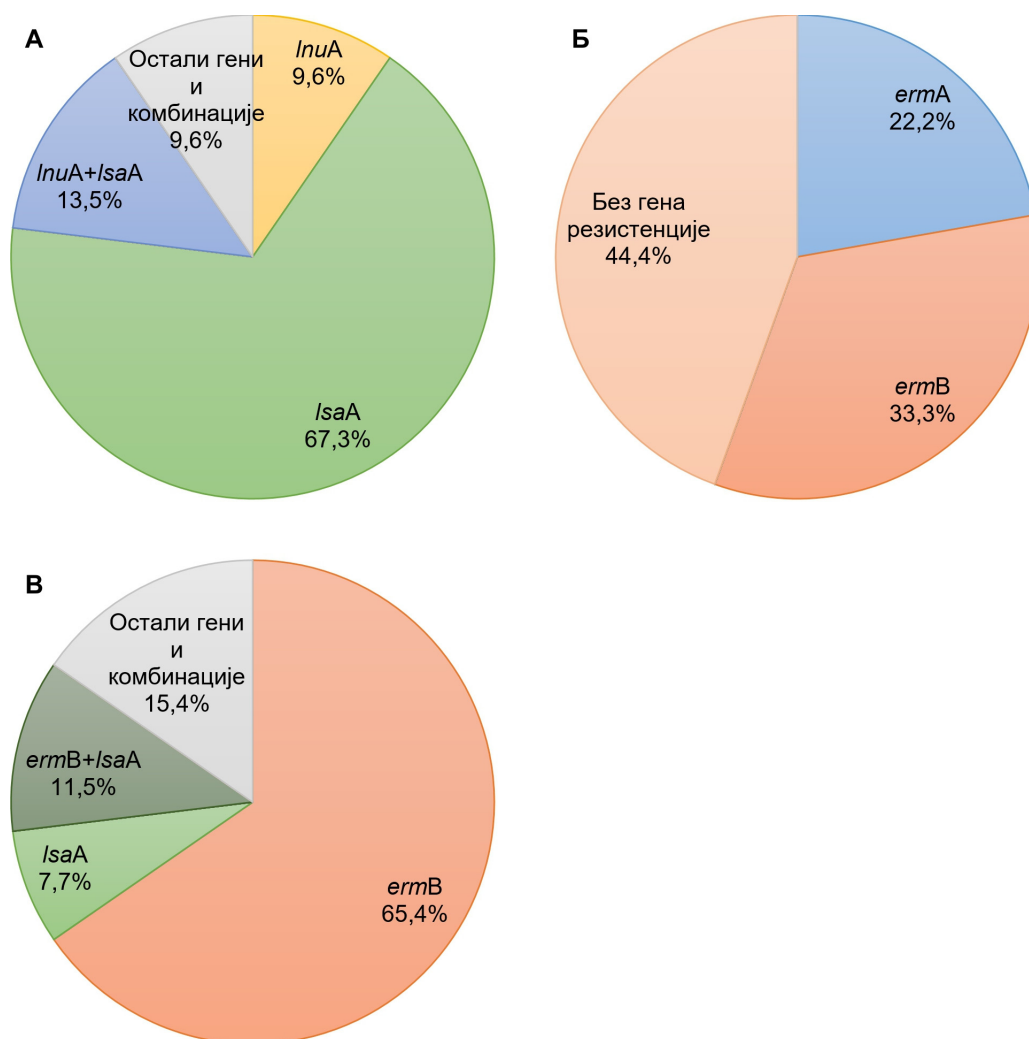
<sup>a</sup> Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

<sup>b</sup> Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

<sup>b</sup> Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

<sup>c</sup> Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

LSa/b фенотип је био углавном детерминисан *lsaA* геном (67,3%) (Графикон 26А). *ermB* (33,3%) и *ermA* (22,2%) су били једини гени који су као појединачни гени детерминисали iMLSb фенотип (Графикон 26Б), док код 44,4% изолата нисмо идентификовали MLS ген резистенције. *ermB* (65,4%) је био најчешћи ген код изолата ентерокока и β-хемолитичких стрептокока са cMLSb фенотипом резистенције, који је био карактеристичан и по присуству великог броја комбинација два или више гена резистенције. Најчешћа комбинација гена код изолата са cMLSb фенотипом резистенције била је *ermB+lsaA* (11,5%) (Графикон 26В). Овај тренд је неочекивано највише био заступљен код изолата *S. pyogenes* (18,2%) и *S. agalactiae* (14,6%), док је код ентерокока број комбинација гена био присутан у мањем проценту (11,7%). У складу са овом опсервацијом, код једног соја *S. pyogenes* детектована је комбинација чак четири гена (*ermA+ermB+InuB+lsaA*) (Табела 15).



**Графикон 26.** Преваленција и експресија MLS гена резистенције и њихових комбинација код различитих фенотипова ентерокока и  $\beta$ -хемолитичких стрептокока; **А:** LSa/b; **Б:** iMLSb; **В:** cMLSb

#### 4.7.2.3 Учесталост MLS гена резистенције према пореклу изолата ентерокока и $\beta$ -хемолитичких стрептокока

Учесталост MLS гена резистенције и њихових комбинација према пореклу изолата ентерокока и  $\beta$ -хемолитичких стрептокока приказана је у Табели 17. *ermB* и *IsaA* ген су били статистички значајно чешћи код амбулатних у односу на болничке сојеве ентерокока и  $\beta$ -хемолитичких стрептокока ( $p < 0,05$ ). Није постојала статистички значајна разлика у проценту изолата ентерокока и  $\beta$ -хемолитичких стрептокока амбулантног и болничког порекла који су носили остале гене MLS резистенције ( $p > 0,05$ ).

**Табела 17.** Учесталост MLS гена резистенције према пореклу ентерокока и  $\beta$ -хемолитичких стрептокока (амбулантни према болничким)

	Ентерококе и $\beta$ -хемолитичке стрептококе n (%)		p-вредност
	Амбулантни	Болнички	
<i>ermA</i>	2 (2,1)		1
<i>ermB</i>	32 (34,0)	5 (12,5)	0,01131
<i>lnuA</i>	5 (5,3)		0,32147
<i>lnuB</i>	1 (1,1)	1 (2,5)	0,50948
<i>lsaA</i>	36 (38,3)	3 (7,5)	0,0003
<i>ermB+lsaA</i>	6 (6,4)		0,17824
<i>lnuA+lsaA</i>	6 (6,4)	1 (2,5)	0,6738
<i>lnuB+lsaA</i>	1 (1,1)		1
<i>ermB+ermC+lsaA</i>	1 (1,1)		1
<i>ermB+lnuB+lsaA</i>	3 (3,2)		0,55408
<i>ermA+ermB+lnuB+lsaA</i>	1 (1,1)		1
Без гена резистенције		30 (75,0)	0
Укупно	94 (100)	40 (100)	

<sup>a</sup> Све p-вредности мање од 0,05 сматране су статистички значајним

#### 4.8 Ваљаност D-теста

Да бисмо утврдили ваљаност D-теста, упоредили смо резултате које смо добили D-тестом (користили смо га за детектовање iMLSb фенотипа резистенције) са резултатима које смо добили PCR анализом (користили смо је за идентификовање *erm* гена, који детерминишу iMLSb фенотип) (Табела 18).

**Табела 18.** Број изолата коришћених за утврђивање ваљаности D-теста

D-тест на присуство iMLSb <sup>a</sup> фенотипа резистенције	PCR <sup>b</sup> тест на <i>erm</i> ген		
	Позитиван	Негативан	Укупно
Позитиван	42	18	60
Негативан	0	34	34
Укупно	42	52	94

<sup>a</sup> Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

<sup>b</sup> Реакција ланчаног умножавања

Добијени резултати теста ваљаности D-теста приказани су у Табели 19.

Табела 19. Резултати теста ваљаности D-теста

Карактеристика D-теста	Вредност
Осетљивост	100,0%
Специфичност	65,4%
Пропорција лажно позитивних	0,34615
Пропорција лажно негативних	0
Позитивна предиктивна вредност	70,0%
Негативна предиктивна вредност	100,0%
Преваленција	44,7%
Укупно	1643 (100)

Овом статистичком анализом D-тест је показао осетљивост од 100% и специфичност од 65,4% у детекцији индуцибилне клиндамицин резистенције на 94 соја Грам-позитивних кока (*S aureus*, коагулаза негативне стафилококе, ентерококе и β-хемолитичке стрептококе) (Табела 19). Исте резултате смо добили и тестом ваљаности D-теста појединачно за *S aureus*, коагулаза негативне стафилококе, ентерококе и β-хемолитичке стрептококе.

## 5 ДИСКУСИЈА

Открићем и убацивањем у званичну листу лекова сулфонамида 1930-тих година и пеницилина 1940-тих година почела је тзв. "антибиотска ера". Овај догађај, који се сматра најважнијим у историји медицине, довео је до револуције у пољу инфективних обољења и дао је могућност клиничарима да спречавају, лече и редукују преношење инфективних болести. Морбидитет и морталитет повезани са инфективним обољењима су, почетком ове нове "антибиотске ере", значајно смањени [264]. Након открића првих антибиотика, од 1970-тих година уведено је још неколико класа нових антибиотика, а онда после дуже паузе од око 30 година, почетком 2000-тих произведени су оксазолидини [265]. Више од 60 година, антибиотици су сматрани универзалним лековима, без обзира да ли је њихова употреба адекватна и да ли су инфекције изазване амбулатним или болничким сојевима. Међутим, још 1954. године у свом говору на свечаној додели Нобелове награде, Александар Флеминг, који је открио пеницилин, упозорио је јавност на могућу појаву резистентности бактерија на ове универзалне лекове.

Први сведоци неделотворности антибиотика на бактерије које су развиле резистенцију били су клиничари. Од бактерија које су биле резистентне на један антибиотик, појавиле су се бактерије резистентне на више антибиотика одједном и ти сојеви и гени резистенције су почели све више да се шире. Ово је за последицу имало суочавање клиничара са неуспесима у лечењу инфекција изазваних мултирезистентним сојевима патогених бактерија [266]. Највећи проблем у болницама пре открића антибиотика представљале су бактерије *S. aureus* и  $\beta$ -хемолитичке стрептококе групе А [267]. Данас, када нам је доступан велики број антибиотика, поново се суочавамо са проблемом лечења инфекција изазваних пеницилин-резистентним пнеумококама, ванкомицин-резистентним ентерококама, и метицилин и ванкомицин резистентним сојевима *S. aureus* и коагулаза негативним стафилококама [268, 269]. Инфекције изазване овим врстама бактерија, које су у скоријој прошлости ефикасно лечене антибиотицима, данас представљају тежак или нерешив проблем. Ово је проблем нове "пост-антибиотске ере", у којој узрочници инфекција више неће бити осетљиви на доступне антибиотике [270]. Антибиотска резистенција је постала глобални проблем и изазов за јавно здравље и више



ниједна појединачна или једноставна стратегија нису у стању да у потпуности обухвате настанак и ширење микроорганизама резистентних на доступне антибиотике. Истовремено са убрзаном појавом резистенције на антибиотике произведено је само неколико нових антибактеријских лекова, те је постало очигледно да је опрезна и мудра употреба антибиотика неопходна да би се спречио даљи развој резистенције [271]. Већ се може уочити недостатак нових антибиотика којима би се заменили они који су постали неефикасни, што тражи хитну потребу да се сачува ефикасност већ постојећих антибиотика. Светска здравствена организација [272] и Центар за контролу обољевања и превенцију [273] окарактерисали су резистенцију на антибиотике као највећи проблем јавног здравља у свету. Европска мрежа за праћење антимикробне резистенције (EARSS) од 1998. године прати развој резистенције на антибиотике у земљама Европе и покушава да смањи употребу антибиотика минимизирањем њихове неадекватне употребе [274, 275].

Код свих популација организама могу се јавити појединачне јединке са неком другачијом особином од других чланова популације. У случају популације бактерија, особина резистенције на антибиотике се може јавити код неких јединки бактерија из те популације. Сваки пут кад се користи одређени антибиотик, јединка која је носилац те специфичне особине отпорности на тај антибиотик се бројчано повећава и на крају почиње да доминира над остатком бактеријске популације. Развој резистенције на антибиотике је природни феномен и саставни је део еволутивног процеса сваког микроорганизама. Међутим, он је значајно убрзан широко распрострањеном употребом антибиотика код људи и животиња [276]. Бактерије могу поседовати природну резистенцију на неке антибиотике, нпр. бактерије *Mycoplasma* spp. су урођено резистентне на β-лактамске антибиотике јер немају пептидогликански ћелијски зид на чију синтезу ови антибиотици делују, или могу поседовати "стечену резистенцију", односно могу се генетски променити и тако постати резистентне на антибиотике [277]. Бактерија може стећи гене резистенције спонтаном мутацијом или пак хоризонталним трансфером гена, који представља размену генетског материјала између бактерија истих или различитих врста. Гени који детерминишу резистенцију на антибиотике се налазе у нашој животној средини, а ту су се налазили и милионима година пре открића антибиотика [278]. По једној теорији, присуство гена резистенције у животној средини се објашњава присуством тих гена код бактерија и гљива које производе антибиотике, а имају у свом геному сопствене гене резистенције на антибиотике које производе друге

бактерије и гљиве [279]. По другој теорији, извор гена резистенције се налази међу нашим генима који кодирају шећерну киназу и ацетилтрансферазу и могу еволуирати и модификовати антибиотик, као што је у случају резистенције на аминокликозиде [278].

Антибиотици из групе макролида и линкозамида се често користе у терапији инфекција изазваних Грам-позитивним кокама. Резистенција на ове антибиотике је константно у порасту и то услед раширене, нерационалне и интензивне употребе ових антибиотика за лечење људи и у исхрани товних животиња. Рутинским тестирањем диск дифузионом методом осетљивости бактеријских изолата на антибиотике, не може се са сигурношћу детектовати индуцибилна клиндамицин резистенција. Макролиди са 14-чланом прстеновима индукују резистенцију на 16-члане макролиде, линкозамиде и стрептограмине групе Б. Диск дифузионом тестом, онда када су стандардни дискови еритромицина и клиндамицина смештени један поред другог, може се детектовати индуцибилна клиндамицин резистенција у виду заравњења зоне инхибиције око клиндамицин диска према еритромицин диску, дајући изглед зоне инхибиције клиндамицина у облику великог латиничног слова D. Индуцибилна MLSb резистенција настала експресијом *erm* гена доводи до неефикасног лечења инфекција клиндамицином, услед брзе *in vitro* конверзије индуцибилне у конститутивну MLSb резистенцију. Изостављање D-теста у рутинском тестирању може довести до погрешног избора антибиотика за лечење тешких инфекција узрокованих Грам-позитивним кокама. D-тест је једноставан и поуздан метод за одвајање сојева са правом осетљивошћу на клиндамицин, од сојева који показују лажну осетљивост на клиндамицин.

Род бактерија *Staphylococcus* spp. укључује најмање 40 врста. Оне могу изазвати широк дијапазон болести код људи и животиња, иако су неке од њих генерално апатогене и сматрају се саставним делом коменсалне флоре. *S. aureus* је Грам-позитивна бактерија која може бити део нормалне флоре коже и носница човека, али је и друга по важности патогена бактерија људи. *S. aureus* може изазвати велики број различитих инфекција, најчешће меких ткива и коже, костију и сепсу, а чест је узрочник инфекција постоперативних рана. Неки сојеви *S. aureus* продукују токсине који могу да дати специфичне симптоме, укључујући токсични шок синдром и тровање храном [280]. Иако је на почетку примене пеницилин био делотворан на *S. aureus*, резистенција на њега се код *S. aureus* развила у истој деценији кад је антибиотик откривен [281]. Ова резистенција је настала посредством продукције ензима β-лактамазе који инактивира пеницилине, ампицилине и амоксицилине. Затим су произведени β-лактамаза отпорни

антибиотици (тј. метицилин и клоксацилин), као и  $\beta$ -лактамаза инхибитори (тј. клавуланска киселина и сулбактам), који су комбиновани са другим антибиотцима. Сојеви *S. aureus* резистентни на ове пеницилиназа отпорне антибиотике су стекли нови ген (*mecA*) који кодира нови пеницилин-везујући протеин и названи су метицилин-резистентни *S. aureus* (MRSA). Први MRSA сојеви су се појавили 1960-тих година. На почетку, MRSA сојеви су углавном изазивали болничке инфекције [281]. Међутим, од пре десетак година, у већем броју земаља је забележено значајно повећање броја амбулантних сојева MRSA [276], који су на срећу задржали осетљивост на велики број других не- $\beta$ -лактамских антибиотика, док су болнички сојеви MRSA углавном били резистентни. Као последњи лек избора код мултирезистентних MRSA сојева коришћени су гликопептиди, као што су ванкомицин и теикопланин, који су откривени и регистровани за употребу 1950-тих година, а могу се давати само парентерално уз пажљиво ординирање због могућих нежељених дејстава. Нове опције за лечење мултирезистентних MRSA сојева представљају линезолид (1970-тих) и даптомицин (1980-тих), који су засад последње регистроване класе антибиотика [276].

*Staphylococcus epidermidis* припада групи коагулаза негативних стафилокока и најзаступљенији је код нормалне људске флоре [282]. Као и ентерококе, KNS сојеви се јављају као једни од најчешћих узрочника болничких инфекција, посебно оних повезаних са имплантантама [283]. KNS је трећи по учесталости узрочник болничких бактеријемја. Инфекције код имунокомпромитованих пацијената су посебно компликоване и тешке за лечење због велике резистенције ове групе бактерија на антибиотике. *S. epidermidis* је последњих година постао резистентан на велики број антибиотика и углавном представља резервоар гена резистенције у болничкој средини [284].

Висока учесталост резистенције на пеницилин међу стафилококама у нашој студији је била у сагласности са резултатима других аутора [234, 242, 285]. Међу нашим изолатима *S. aureus* готово 20% је било метицилин-резистентно, што значи да се налазимо у опсегу преваленције MRSA изолата европских земаља према извештају Светске здравствене организације [276]. Према извештају Светске здравствене организације о глобалној бактеријској резистенцији на антибиотике из 2013. године, преваленција MRSA изолата се кретала од 12 до 80% у Африци, од 21 до 90% у Америци, од 10 до 53% у источно-медитеранској регији, од 0,3 до 60% у Европи, од 10 до 26% у југоисточној азијској регији и од 4 до 84% у западно пацифичкој регији [276].

У нашој студији смо идентификовали 10,16% метицилин резистентних изолата међу коагулаза негативним стафилококама. Процент MRKNS изолата нижи од 20% био је забележен у студијама које су испитивале изолате амбулантног порекла [286, 287, 288], док је проценат MRKNS изолата виши од 40% био идентификован међу изолатима болничког порекла, посебно међу изолатима пацијената из јединица интензивне неге [289, 290].

Приближно половина наших изолата метицилин резистентних стафилокока била је резистентна на гентамицин, док је најмања резистентност на гентамицин била нађена код метицилин осетљивих стафилокока. У односу на наше резултате, знатно већи проценат резистентних стафилокока на гентамицин евидентиран је у Индији и Ирану [291, 292]. Међу MRS изолатима забележили смо највећу резистенцију на ципрофлоксацин (око 40%) , док смо значајно мању резистенцију на овај антибиотик евидентирали код MSS изолата (испод 10%). Други аутори [291, 292, 293] су објавили много вишу стопу резистенције на флуороквинолоне MRS изолата у односу на нашу студију. Ниједан од изолата стафилокока у нашој студији није показао резистенцију на линезолид и ванкомицин, иако су неки аутори детектовали изолате стафилокока резистентне на линезолид и ванкомицин код болничких MRSA сојева [294, 295]. Више од половине наших изолата стафилокока је било резистентно на еритромицин, као и код већине других аутора [234, 286, 296, 297, 298, 299, 300], за разлику од Хамилтон-Милера и О'Саливана [244, 301], који су забележили значајно нижи проценат. Код приближно 90% изолата метицилин резистентних стафилокока открили смо резистенцију на еритромицин, што се такође подудара са резултатима већине других студија [83, 289, 297, 302, 303]. У нашој студији мање од 30% MRS изолата је било резистентно на клиндамицин, док је резистенција на клиндамицин била забележена у јако високом проценту у Турској, Индији и Пакистану [286, 304, 305]. Међу метицилин осетљивим стафилококама забележена је ниска резистенција на клиндамицин (око 20%) и у нашој студији, и у студијама других аутора [296, 299, 302].

У нашој студији је највећи број изолата стафилокока био сензитиван на еритромицин и клиндамицин, а најзаступљенији фенотип резистенције међу њима био је iMLSb. На другом месту по учесталости код MSSA, MRKNS и MSKNS изолата био је M/MSb фенотип, док је код MRSA изолата био cMLSb фенотип. Овај образац MLS фенотипова резистенције је био исти и код изолата стафилокока амбулантног и код изолата болничког порекла. Сличне резултате су добили Хамилтон-Милер и Фокс, код којих је

iMLSb фенотип био најчесталији код стафилокока [301, 306]. Наши резултати су у сагласности и са резултатима других студија урађених у Србији [307]. За разлику од нас, аутори из Индије и Ирана [234, 308] су описали cMLSb фенотип као доминантан код MRSA и MRKNS изолата болничког порекла. Такође, различиту у односу на нашу дистрибуцију MLS фенотипова резистенције су имали на Универзитетској клиници у Индији, где је доминантан фенотип резистенције међу метицилин-резистентним стафилококама био M/MSb, а други по учесталости iMLSb [309]. Дистрибуција MLS фенотипова резистенције може варирати зависно од географског подручја и од тога да ли се испитују изолати амбулантног или болничког порекла. У различитим географским регијама постоје различите навике прописивања и употребе макролида и линкозамида, а разлике у употреби MLS антибиотика могу постојати чак и на нивоу две здравствене установе исте земље [299]. У нашој студији је M/MSb фенотип резистенције био статистички значајно више заступљен код изолата амбулантног порекла него код изолата болничког порекла ( $p < 0,05$ ). У складу са тим, детектовали смо *msrA* ген (који детерминише M/MSb фенотип) много чешће код болничких него код амбулантних сојева стафилокока ( $p < 0,05$ ). Ово указује на важност фенотипске диференцијације стварно осетљивих од лажно (iMLSb) осетљивих сојева стафилокока на клиндамицин, посебно код изолата стафилокока који потичу из болничке средине. Међутим, Лал и сар. су, у односу на наше резултате, имали вишу преваленцију iMLSb фенотипа код болничких у односу на амбулантне изолате стафилокока (86,5% према 13,4% респективно) [294].

У оквиру наше студије смо молекуларном анализом идентификовали *msrA* ген, који кодира активну ефлукс пумпу код стафилокока, као најфреквентнији (35%) MLS ген резистенције. Више од половине наших изолата стафилокока резистентних на макролиде су носили *msrA* ген као појединачни или у комбинацији са *erm* генима. Друге студије су имале сличне резултате нашим [310, 311]. У нашој студији је *ermC* ген био најчешћи од свих *erm* гена, како код изолата врсте *S. aureus*, тако исто и код коагулаза-негативних стафилокока са cMLSb или iMLSb фенотипом резистенције. Сличне податке су објавили и Цад и сар. [312]. Ниску фреквенцију *ermB* гена код стафилокока коју смо имали у нашој студији, имали су и Котино и сар. [313]. У литератури, *ermA* и *ermC* ген доминантно детерминишу MLSb резистенцију код стафилокока и те гене индукују 14-члани макролиди (еритромицин) и линкозамид (целестицетин), али не и 16-члани макролид и линкомицин [314]. У нашој студији је само мали број изолата стафилокока

са *lnuA* и *lsaA* генима имало ретки LSa/b фенотип резистенције, што је у сагласности са резултатима из студија Лозана и Денга [262, 315]. Најчешће детектоване комбинације гена код стафилокока у нашој студији биле су *ermC+msrA/B*, *ermB+lsaA* и *ermB+msrA/B*. Као што је и очекивано, идентификовали смо највећи број комбинација гена резистенције код метицилин-резистентних изолата стафилокока. Комбинације гена резистенције које су посебно забележене међу изолатима стафилокока и то нарочито метицилин резистентним стафилококама, постоје и у студијама других аутора [316]. Такође, истовремено присуство два или више MLS гена резистенције у истом изолату стафилокока код MRSA и MRKNS изолата болничког порекла било је забележено у Аргентини, САД и Пољској [240, 317, 318]. Насупрот нашим очекивањима није постојала значајна разлика у учесталости изолата стафилокока са комбинацијом MLS гена између болничких и амбулантних сојева ( $p > 0,05$ ). Код 9,8% наших изолата са iMLSb, M/MSb или LSa/b фенотипом резистенције нисмо идентификовали ниједан MLS ген резистенције. Са сличним дискрепанцама између фенотипа и генотипа резистенције су се сретали и у другим студијама [299, 300].

Већи проценат *msrA/B* гена смо идентификовали код изолата MS стафилокока у односу на MR стафилококе. Резистенција на макролиде као последица експресије *msrA* гена била је превалентнија код коагулаза-негативних стафилокока него код *S. aureus*. Слични подаци постоје и у студији Змантара и сар. [319], док је у другим студијама [193, 320, 321] стопа заступљености *msrA/B* гена била различита у односу на нашу. Према студији [322] из 2006. године, утврђено је да је стафилококни *msrA* ген, који кодира макролид ефлукс протеин, идентификован код још три нова рода Грам-позитивних и једног рода Грам-негативних бактерија, укључујући и род ентерокока и стрептокока. Ови *msrA* гени су показивали од 99 до 100% подударности са *msrA* геном из стафилокока [322]. У нашој студији, *ermA* (16,7%) и *ermC* (16,6%) ген су били најчешће идентификовани код MSSA изолата. Међутим, Вест и сар. [323] су детектовали *ermA* ген углавном код изолата MRSA, док је код њих *ermC* ген у највећем проценту био заступљен међу изолатима MRKNS. У нашим резултатима је *ermB* ген био доминантан (8,3%) код MRKNS изолата, док у студији Бучамија и сар. *ermB* ген није уопште детектован код стафилокока [324]. *lnuA* ген смо најчешће (12%) идентификовали код MSKNS изолата, а готово идентичне резултате су добили и Лина и сар. у својој студији [325]. Ми смо по први пут детектовали *lsaA* ген (2 изолата, тј. 1,1%) као појединачни ген код изолата *S. aureus*. *lsaA* ген код ентерокока кодира протеин сличан ABC транспортерима, који избацују лекове који

припадају MLS групи антибиотика из бактеријске ћелије [135]. *lsaA* ген као урођени ген врсте *Enterococcus faecalis* је показао високи степен сличности новом гену који кодира ABC транспортер (*lsaE* ген који је већ идентификован код стафилокока). Преношење гена резистенције са ентерокока на *S. aureus* је већ обрађено у литератури, и то гена резистенције на тетрациклин *tetL* и триметоприм *dfrK* [257]. Ипак, *lsaA* ген који води порекло из бактерија рода *Enterococcus* spp. досад није идентификован код бактерија врсте *S. aureus* [139].

У нашој студији је M/MSb фенотип резистенције код изолата стафилокока углавном био детерминисан *msrA/B* генима (95,6%), док је LSa/b фенотип углавном био детерминисан *lnuA* геном (56,3%). *ermC* (29,4%) и *ermA* (25,5%) ген су у нашој студији били најпревалентнији појединачни гени који су детерминисали iMLSb фенотип. У другим студијама, учесталост *ermC* и *ermA* гена се разликовала од наше [299, 300, 320, 326, 327]. Међутим, код нас је *ermC* био најчешћи ген (28,9%) код изолата стафилокока са cMLSb фенотипом резистенције, слично резултатима објављеним у студији изведеној у Бразилу [328]. У нашој студији је cMLSb фенотип био карактеристичан по присутности великог броја комбинација гена: *ermB+lsaA*, *ermC+msrA/B* и *ermB+msrA/B*. Овај тренд је био посебно карактеристичан за MRSA и MRKNS сојеве, код којих ове комбинације гена доминантно детерминишу cMLSb фенотип. У складу са овом опсервацијом је и податак да смо код једног MRKNS соја пронашли комбинацију чак четири гена (*ermB+lnuA+lnuB+lsaA*). Хосеини и сар. су имали сличне резултате у својој студији [329]. Сароу и сар. су у студији изведеној у Грчкој први идентификовали комбинацију *lsaE+lnuB* код метицилин сензитивног *S. aureus* који је показивао LSa/b фенотип резистенције [330, 331]. Ова *lsaE+lnuB* комбинација гена је већ описана код *S. agalactiae* [332] и *E. faecalis* [333], што говори о могућем пореклу те комбинације.

*S. pneumoniae*, бактерија која је позната и као пнеумокок, водећи је узрочник амбулатних пнеумонија широм света и један је од главних убица деце старости до 5 година. Друга обољења изазвана овом бактеријом укључују честе благе инфекције као што је упала средњег уха, али такође укључује и инвазивна обољења као што је менингитис. Међу бактеријским узрочницима менингитиса *S. pneumoniae* се повезује са највишом стопом смртности и великим неуролошким секвелама после излечења. Пнеумококне инфекције су углавном карактеристичне за популацију најстаријих и најмлађих [334]. Према једној процени инфекције *S. pneumoniae* су у свету изазвале 826.000 смртних случајева код деце старости између 1 и 59 месеци [101]. Пнеумококе се често налазе код асимптоматских

назофарингеалних клицоноша, чија преваленција варира зависно од година старости и посматраног региона. Асимптоматско клицоноштво је одговорно углавном за ширење бактерије унутар група, какве су нпр. вртићи или старачки домови. Резистенција на  $\beta$ -лактамске антибиотике код клиничких изолата *S. pneumoniae* се ствара углавном тачкастом мутацијом гена који кодирају пеницилин-везујуће протеине (РВР), једне од суштинских компоненти ћелијског зида. Велики број вишеструких мутација код различитих РВР доводи до повећања минималне инхибиторне концентрације за пеницилин и друге  $\beta$ -лактамске антибиотике. Потребно је одређеном методологијом одвојити сојеве са градуалним повећањем резистенције на пеницилине и окарактерисати их као "не-сензитивне" (NS) и резистентне сојеве (R), који имају други механизам резистенције. Извештаји из различитих извора су неконзистентни што се тиче обележавања ових сојева и раздвајања два различита механизма резистенције. Резистенција на пеницилин је код *S. pneumoniae* у периоду између 2002. до 2006. године у Финској порасла од 8 на 16%, а на еритромицин од 16 на 28%, на територији где до 1992. године готово да није било изолата *S. pneumoniae* резистентних на антибиотике [117].

У нашој студији смо имали мали проценат (9,4%) изолата *S. pneumoniae* резистентних на пеницилин. Према извештају Светске здравствене организације из 2013. године, забележена резистенција "не-сензитивних" сојева *S. pneumoniae* на пеницилин се кретала од 3 до 16% у Афици, од 0 до 48% у Америци, од 13 до 34% у источно-медитеранској регији, од 0 до 61% у Европи, од 47 до 48% у југоисточно азијској регији и од 17 до 64% у западно-пацифичкој регији [276]. *S. pneumoniae* је у нашој студији показао 100% осетљивост на ципрофлоксацин, што је у складу са резултатима других аутора, који су забележили ниску резистенцију ове бактерије на флуороквинолоне [335, 336]. Наши изолати *S. pneumoniae* су 100% били осетљиви на линезолид и ванкомицин. Ипак, у неким радовима [119, 120, 337, 338] био је забележен велики проценат изолата *S. pneumoniae* резистентних на пеницилин и појава резистенције на ванкомицин. У нашој студији смо имали високу резистенцију на еритромицин (65,6%) међу изолатима *S. pneumoniae*, што се поклапа са подацима за Сингапур, неке делове пацифичке Азије, јужне Африке и Пенсилваније [200, 338, 339], али не и са подацима за земље Европе, САД, Израел, Канаду, Русију и Латинску Америку [340, 341, 342]. Резистенција на клиндамицин код наших изолата *S. pneumoniae* (35,9%) је била много нижа од оне у Латинској Америци и Јужној Кореји [200], али је била значајно виша од оне у Италији,



Канади, САД, Израелу и Русији [338, 341]. Код изолата *S. pneumoniae* cMLSb је код нас био доминантан фенотип MLS резистенције (35,9%), што је сагласно са резултатима аутора из Индије, Русије и Италије [218, 341, 342], као и са резултатима других аутора из Србије [343, 344, 345].

*S. pyogenes* најчешће изазива инфекције горњих респираторних путева. Он је стриктно патоген за људе и изазива велики број различитих обољења као што су: фарингитис, инфекције коже и меког ткива, импетиго, бактеријемije, некротизирајући фасциитис, дубоке инфекције меког ткива, целулитис, пнумоније, токсичном шоку-сличан синдром, шарлах, реуматску грозницу и постстрептококни гломерулонефритис [346]. Код изолата бета-хемолитичких стрептокока имали смо детектовану 100% осетљивост на пеницилин и ванкомицин, што се подудара са резултатима објављеним у великом броју других радова [347, 348]. Иако је пеницилин лек избора у терапији фарингитиса изазваних *S. pyogenes* бактеријом, макролиди се често препоручују као замена у случају преосетљивости пацијената на пеницилине. 43,9% изолата *S. pyogenes* је у нашој студији било резистентно на еритромицин, што је у сагласности са резултатима из других студија [349, 350, 351]. Стопа резистенције на макролиде код *S. pyogenes* је у свету некада била ниска, међутим, очигледан је њен пораст што је видљиво у резултатима студија из различитих земаља: Финске, Италије, Кореје, Шпаније и Тајланда [351, 352, 353, 354]. Од увођења нових макролида у терапијске сврхе, дошло је до великог пораста резистенције код стрептокока, што је вероватно повезано са њиховом претераном употребом. Према студији урађеној у Србији од стране Павловићке и сар. макролид резистенција код изолата *S. pyogenes* била је мања од 10% [355]. Таква стопа макролид резистенције постоји и у другим европским земљама из нашег окружења: Француској [356], Аустрији и Мађарској [357]. Нешто већа стопа макролид резистенције код *S. pyogenes* забележена је у Немачкој [358], Грчкој [359] и Шпанији [360]. За разлику од земаља са европског и америчког континента, у земљама Азије, посебно у Кини, резистенција на еритромицин код *S. pyogenes* је јако висока и креће се између 78% и 94%, вероватно као последица повећане и неадекватне употребе макролида [361, 362, 363]. Инциденција резистенције на макролиде је високо варијабилна и зависи од географског региона, односно, употребе макролида у том региону и типа инфекције [364, 365]. Из ових разлога, праћење учесталости резистенције на макролиде и различитих механизма резистенције на локалном нивоу је од суштинске важности за утврђивање емпиријске терапије. Резистенција на клиндамицин код *S. pyogenes* у нашем

истраживању је била мања него у неким деловима Кине, Латвије и Азије, али значајно већа у односу на Канаду, Мексико и неке европске земље [358, 361, 366, 367]. Највећи проценат наших изолата *S. pyogenes* је имао M/MSb фенотип резистенције (18,9%), што је у сагласности са резултатима аутора који су пратили дистрибуцију MLS фенотипова резистенције код *S. pyogenes* на територији Србије [343, 355]. Сагласни нашим резултатима су и резултати студије изведене у Италији, на изолатима *S. pyogenes* [368]. У складу са нашим резултатима, где је M/MSb фенотип доминантан и само мали проценат изолата је имао MLSb фенотип резистенције код стрептокока групе А, били су и резултати аутора из Грчке [359], Аустрије и Мађарске [357], Немачке [358], Шпаније [360] и Аргентине [369].

*S. agalactiae* се данас сматра водећим узрочником септикемија и менингитиса код новорођенчади и трудница, а повезује се са маститисом крава [370]. Изолати *S. agalactiae* су у нашој студији показали изузетно високу резистенцију на гентамицин, док је у другим регионима света забележена знатно нижа резистенција на гентамицин међу изолатима стрептокока [371]. У нашој студији, највећу резистенцију на ципрофлоксацин после стафилокока показали су изолати *S. agalactiae*, затим су следили изолати *S. pyogenes*, док су најмању резистенцију показали изолати ентерокока. Код других аутора резистенција на флуороквинолоне је била значајно нижа [372, 373]. Приближно трећина (31,3%) наших изолата *S. agalactiae* је била резистентна на еритромицин, а сличне резултате су имали Кампел и други аутори [199, 374], док је на Тајвану и у Луизијани тај проценат био знатно већи [375, 376]. У нашој студији је резистенција на клиндамицин код *S. agalactiae* била много нижа (20,7%) од оне у Тајвану [375] и Јужној Кореји [377], али виша од оне у европским земљама [373, 378], земљама латинске Америке [379] и Израелу [218]. У нашој студији је најчешћи MLS фенотип резистенције код изолата *S. agalactiae* био cMLSb (14,7%), слично као и у неким земљама Азије, Европе и Латинске Америке [218, 373, 379, 380]. LSa/b фенотип је описан у другим студијама као редак фенотип [141, 169, 261, 379, 381, 382, 383] међу изолатима *S. agalactiae*, а сагласно са тим и ми смо у нашој студији имали 9 изолата (6%) *S. agalactiae* са овим фенотипом.

Грам-позитивне коке рода *Enterococcus* spp. су нормални становници црева људи и чине од 0,1 до 1% гастроинтестиналне бактеријске флоре. Годинама се повећавала важност ентерокока као патогених бактерија изазивача болничких инфекција као што су ендокардитис и бактеријемije [384]. Ентерококе су познате и по брзом развијању резистенције на антибиотике [385]. Убрзо након почетка коришћења пеницилина,

појавили су се клонови ентерокока резистентни на пеницилин, и одмах затим потреба за другим антибиотцима који су коришћени за лечење инфекција изазваних тим клоновима. Данас ентерококе показују висок степен резистенције на хлорамфеникол, еритромицин, клиндамицин, тетрациклин, аминогликозиде, пеницилине, флуороквинолоне и ванкомицин. Ентерококе поседују урођену резистенцију на неке антибиотике. Ове бактерије су урођено мање осетљиве на пеницилине и цефалоспорине у односу на друге стрептококе. Уз то, ентерококе су резистентне на клиндамицин и на аминогликозиде, односно постигнуте концентрације аминогликозида у серуму уобичајеним дозирањем. Када се апликују сами, аминогликозиди не могу да прођу кроз ћелијски зид ентерокока. Међутим, када се дају заједно са антибиотцима који делују на синтезу ћелијског зида, као што су ампицилин или ванкомицин, деловање аминогликозида се повећава [385]. Стечена резистенција ентерокока на гликопептиде, која је први пут забележена 1986. године, постала је важан проблем у болницама. Учесталост гликопептид-резистентних ентерокока је пратила много учесталију употребу ванкомицина у лечењу MRSA сојева почетком 1980-тих. Процент резистентних ентерокока на ванкомицин у јединицама интензивне неге у САД-у се повећао од 0,3%, 1989. године до 24%, 1998. године [386]. Амбулантни сојеви ентерокока резистентног на ванкомицин су били много мање забележени у САД-у него у Европи, могуће због тога што у Европским земљама храна за животиње садржи ванкомицин [386].

Учесталост резистенције на пеницилин код изолата *Enterococcus* spp. у нашој студији (2,9%) слична је резултатима добијеним у другим студијама [387, 388]. Резистенцију на ванкомицин од 0,6% смо забележили и код наших изолата ентерокока, док резистентне сојеве на линезолид нисмо пронашли, али су били пријављени у радовима неких других аутора [131, 387]. Резистенцију од 22,2% на ципрофлоксацин смо у нашој студији имали код изолата ентерокока, а само нешто мало нижу резистенцију на флуороквинолоне су имали El-Kersh и сар. [387]. У нашој студији је код изолата *Enterococcus* spp. више од 80% било резистентно на еритромицин, што је слично резултатима других аутора [388, 389]. Високи степен резистенције на клиндамицин који смо имали у нашој студији код изолата ентерокока (96,7%) је очекиван, због урођене резистенције на клиндамицин кодиране *lsaA* геном, који је део генома бактерије *E. faecalis* [219]. У нашој студији је cMLSb фенотип резистенције био најучесталији (78,4%), затим је следио LSa/b (18,4%) фенотип, који је код других врста био ређе заступљен или није уопште био детектован.

У нашој студији је код ентерокока проценат изолата осетљивих на еритромицин и клиндамицин био само 0,8%. Мин и сар. су имали резултате који су се битно разликовали од наших, од 241 еритромицин резистентног соја ентерокока, 39% је код њих показивало сMLSb фенотип резистенције, а осталих 61% iMLSb [390]. Рејес и сар. су у свом истраживању дошли до резултата сличних нашим и сви њихови изолати ентерокока који су били резистентни на еритромицин су носили *ermB* ген, док ниједан њихов изолат није поседовао *mefA/E* ген [389].

Када посматрамо ентерококе и стрептококе заједно у нашој студији, најзаступљенији фенотип резистенције код њих је био сMLSb. Ми смо имали велики број изолата осетљивих на макролиде и линкозамиде. Наши MLS фенотипови резистенције су углавном настали посредством појединачног гена, а то су најчешће били *lsaA* (42,0%) и *ermB* (34,8%) ген. Међутим, ови фенотипови су такође били детерминисани и комбинацијама два или више гена резистенције, а најчешће детектоване комбинације гена биле су *lnuA+lsaA* (5,2%) и *ermB+lsaA* (4,5%). Шмиц и сар. су дошли до сличних резултата у својој студији [391] анализом 75 еритромицин резистентних изолата *E. faecium*. Код ових аутора *ermB* је био најчесталији, док је *ermA* ген био идентификован код малог процента изолата (4%). Исти аутори су имали и комбинацију *ermA* и *ermB* гена резистенције код 3% изолата. У нашој студији смо *ermA* ген идентификовали код само два изолата (4,9%) *S. agalactiae*, док *ermC* ген нисмо идентификовали ни код једног изолата ентерокока и β-хемолитичког стрептокока [391]. *ermB* ген је у нашој студији био најчесталији међу изолатима *S. pyogenes* (45,5%), а сличне резултате су имали и други аутори [350]. По Робертсу, гени који кодирају Erm метилазе се могу разликовати међусобно и могу се хоризонтално преносити на друге Грам-позитивне бактерије. До 2012. године било је познато 34 *erm* гена и сви осим два су били идентификовани код Грам-позитивних бактерија [392]. Најраспрострањеније класе *erm* гена међу Грам-позитивним кокама су *ermA*, *ermB* и *ermC* [393]. Постоје разлике између сваке класе *erm* гена и односе се на врсту бактерија где се најчешће ти гени идентификују и на MLSb фенотип резистенције који они детерминишу. Сваки *erm* ген је доминантно повезан са једним или два рода бактерија, али није ограничен само на њих [392, 393]. *ermA* ген се често повезује са *Staphylococcus* spp., али је детектован код још 4 рода Грам-позитивних кока, укључујући род *Streptococcus* и *Enterococcus*. *ermB* ген углавном детерминише MLSb фенотип резистенције код стрептокока, али је откривен код још 17 родова Грам-позитивних бактерија [392]. Најраспрострањенији и клинички јако важан MLSb ген

резистенције код Грам-позитивних кока је *ermC*, који је идентификован код још најмање 13 родова Грам-позитивних бактерија и углавном детерминише MLSb резистенцију код стафилокока [392]. Чак и када је Egm метилација усаглашена са резистенцијом на MLSb антибиотике, експресија *erm* гена зависи од присуства индуктора, а то су најчешће 14-члани и 15-члани макролиди, као што су еритромицин и азитромицин. Отуд, изолати који показују iMLSb резистенцију могу бити осетљиви на 16-члане макролиде све док не буду индуковани неким другим једињењем. Међутим, Мин и сар. су открили нове варијанте *ermB* гена код изолата ентерокока. Они су доказали да када користимо дискове импрегниране високом дозом антибиотика (еритромицин - 40 µg и јозамицин - 100 µg) а не уобичајеном (еритромицин - 15 µg и клиндамицин - 2 µg), и када уместо клиндамицин диска поставимо диск импрегниран 16-чланим макролидом као што је јозамицин, можемо добити iMLSb фенотип резистенције. У том обрнутом iMLSb фенотипу резистенције, зона инхибиције око еритромицин диска је заравњена према јозамицин диску, и за разлику од ситуације када еритромицин представља индуктор, овде је снажнији индуктор 16-члани макролид. Када су коришћени дискови са мањим или уобичајеним дозама антибиотика, сви изолати са iMLSb фенотипом су показивали лажни cMLSb фенотип резистенције [390].

Катаја и сар. у Финској [216] су анализирали 45 еритромицин резистентних изолата *S. pyogenes*, и сви њихови изолати са M/MSb фенотипом резистенције су поседовали *mefA* ген, док је један изолат, који је показивао MLSb фенотип резистенције, имао *ermTR*. Пораст процента M фенотипова резистенције и смањење процента MLSb фенотипова код стрептокока повезан је са порастом употребе дугоделујућих макролида након 2001. године, који имају високи потенцијал селекције *ermB* гена [394, 395].

У нашој студији су *lnuA* (6,7%), *lnuB* (3,3%) и *lsaA* (50%) гени били у највећем проценту заступљени код изолата ентерокока, док као појединачни гени нису били идентификовани код изолата *S. pyogenes*. *lsaC* ген није идентификован ни код једног изолата у нашој студији. У студији Паулине и сар. 75% изолата *S. agalactiae* је имало *lsaC* ген и показивало LSAP (линкозамид-стрептограмин групе А-плеуромутилин) фенотип, 18% је имало комбинацију *lnuB+lsaE* гена и показивало LSAP фенотип, што су први случајеви LSAP фенотипа описани међу *S. agalactiae* у САД [396]. Боздоган и сар. су описали ген резистенције *lnuB* који детерминише резистенцију на линкозамиде аденилацијом хидроксил групе на линкомицину и клиндамицину, њиховом инактивацијом код *E. faecium* [227]. Код неких аутора је *lnuB* ген био идентификован

код чак 15 линкозамид резистентних изолата *E. faecium* [397]. У нашој студији су комбинације два или више гена резистенције биле једнако заступљене код све три групе бактерија, док је комбинација четири гена MLS резистенције (*ermA+ermB+lnuB+lsaA*) неочекивано идентификована код изолата *S. pyogenes*. Интересантно је да смо код изолата *S. pyogenes*, код којих нисмо идентификовали ниједан сој са LСа/b фенотипом резистенције, идентификовали гене који детерминишу тај фенотип, али у комбинацији са *erm* генима.

Највећи број ентерокока и стрептокока са LСа/b фенотипом резистенције су у нашој студији углавном имали *lsaA* ген (67,3%), други по учесталости био је *lnuA* (9,6%), док је само неколико ентерокока поседовало *lnuB* ген (3,8%). Ови резултати су такође били конзистентни са резултатима других аутора [332, 333].

У нашој студији су *ermB* (33,3%) и *ermA* (22,2%) гени били једини који су, као појединачни гени, детерминисали iMLSb фенотип код ентерокока и стрептокока. У складу са резултатима наше студије, где је *ermB* најчешће као појединачни ген кодирао cMLSb фенотип (65,4%) код изолата ентерокока и β-хемолитичких стрептокока, Кампело и сар. [199] су анализом 300 изолата *S. agalactiae* утврдили да 21% изолата показује cMLSb фенотип резистенције и сви осим једног изолата поседују *ermB* ген. cMLSb фенотип резистенције је у нашој студији код ентерокока и β-хемолитичких стрептокока, слично стафилококама, био карактеристичан по присуству великог броја комбинација гена резистенције. Најчешћа комбинација гена код тих изолата била је *ermB+lsaA*. Овај тренд је неочекивано највише био заступљен код изолата *S. pyogenes* и *S. agalactiae*, док је мањи број комбинација гена био присутан код ентерокока. У складу са овом опсервацијом, код једног соја *S. pyogenes* детектовали смо комбинацију од чак четири гена (*ermA+ermB+lnuB+lsaA*).

Најучесталији MLS фенотип резистенције међу амбулантним и болничким изолатима ентерокока и β-хемолитичких стрептокока у нашој студији је био cMLSb. Није постојала статистички значајна разлика у учесталости са различитим MLS фенотиповима резистенције између амбулантних и болничких изолата ентерокока и β-хемолитичких стрептокока. *ermB* и *lsaA* ген су у нашој студији били статистички значајно чешћи код амбулантних у односу на болничке сојеве ( $p < 0,05$ ). Остали гени резистенције су били приближно једнако заступљени и код амбулантних и болничких изолата ентерокока и β-хемолитичких стрептокока ( $p > 0,05$ ).

D-тест је према нашим резултатима показао 100% сензитивности у детекцији индуцибилне клиндамицин резистенције на тестираних 94 соја Грам-позитивних кока, док је специфичност теста била само 65,38%. У нашој студији је индуцибилна клиндамицин резистенција детектована код 18 изолата, што PCR тестом није потврђено и није идентификован ниједан *erm* ген код тих сојева. Позитивна предиктивна вредност од 70% нам указује на тачност позитивног резултата D-теста на индуцибилну клиндамицин резистенцију. Није било лажно негативних резултата и негативна предиктивна вредност теста је била 100%. То значи да негативне налазе D-теста на iMLSb фенотип резистенције код Грам-позитивних кока можемо издавати без претходне потврде PCR тестом, док позитивне налазе на iMLSb фенотип морамо претходно потврдити PCR тестом на *erm* гене. Према овим налазима само би 70% од изолата са позитивним D-тестом било заиста позитивно. Према другим ауторима, D-тест је показивао исту осетљивост као и у нашој студији (приближно 100%), при чему су они користили растојање између дискова од 12 mm. Фибелкорн и сар. су сугерисали да на осетљивост D-теста битно утиче растојање између дискова еритромицина и клиндамицина. Такође, према истим ауторима, осетљивост D-теста је зависила и од врсте испитиваних бактерија [193]. Код других аутора, осетљивост D-теста са 15-20 mm растојања између дискова еритромицина и клиндамицина, била је 100% у поређењу са PCR анализом *erm* гена [239, 240].

На појаву ниске специфичности D-теста утицала је чињеница да су неки изолати у студији показивали неслагања између фенотипа и генотипа резистенције. У нашем случају, имали смо изолате са идентификованим *msrA/B*, *lnuA* и *lsaA* геном, који су показивали осетљивост на еритромицин и клиндамицин. Змантар и сар. [319] и Кутињо и сар. [313] су се такође сретали са овом појавом у својим истраживањима и они су овај феномен објашњавали тиме да се он јавља због проблема у нисходној регулацији гена или због мутације у региону промотера идентификованог гена резистенције. Насупрот томе, Мартин и сар. [398] су показали да такви сојеви који носе гене резистенције, а не показују ни један фенотип резистенције, могу показати фенотипску резистенцију уколико се субкултивишу на чврстој подлози са растућим градијентом одговарајућег антибиотика. Такође, у нашој студији имамо изолате који су показивали један од фенотипова MLS резистенције, али нису имали идентификован ни један ген резистенције. Кутињо и други аутори, који су се такође сретали са таквим појавама у

својим истраживањима, претпоставили су да ти сојеви носе неке друге варијанте *erm*, *mef*, *lnu* или *lsa* гена [313, 398, 399, 400], које нису биле укључене у нашој студији.

iMLSb је у нашој студији био најчешћи фенотип резистенције међу стафилококама. Најчешће изоловани гени MLS резистенције међу стафилококама били су *msrA/B* и *ermC*. M/MSb (*msrA/B*), LSa/b (*lnuA*) и iMLSb (*ermA/C*) фенотип су били доминантно детерминисани појединачним генима резистенције. cMLSb фенотип је углавном био детерминисан *ermC* и комбинацијом гена (*ermC+msrA/B* и *msrA/B+lsaA*). M/MSb фенотип и *msrA/B* ген који детерминише овај фенотип су били значајно заступљенији код стафилокока болничког порекла.

cMLSb је био најчешћи фенотип резистенције међу ентерококама и β-хемолитичким стрептококама. Најчешће изоловани гени MLS резистенције међу ентерококама и β-хемолитичким стрептококама су били *lsaA* и *ermB*. LSa/b (*lsaA*) и iMLSb (*ermB/A*) фенотип су били доминантно детерминисани појединачним генима резистенције. cMLSb фенотип је углавном био детерминисан *ermB* и комбинацијом гена (*ermB+lsaA*). *ermB* и *lsaA* ген су били значајно заступљенији код ентерокока и β-хемолитичких стрептокока амбулантног порекла.

Комбинације два или више гена MLS резистенције су били заступљенији код изолата стафилокока него код ентерокока и стрептокока.

Резистенција на антибиотике код ентерокока и стафилокока је важна зато што *S. epidermidis* и ентерококе припадају групи бактерија које повремено изазивају тешке инфекције и зато што као представници нормалне флоре могу довести до ширења гена резистенције на патогене бактерије преносом са једне на другу врсту (*interspecies*), посебно ако постоји селективни притисак антибиотика. С обзиром на величину популације нормалне флоре могуће је да се развију варијанте бактерија резистентне на већи број антибиотика. Прегледом литературе и према резултатима наше студије можемо рећи да MLS антибиотици нису лек избора за лечење инфекција изазваних ентерококама и коагулаза негативним стафилококама. Међутим, према досадашњим истраживањима, значај ове две групе бактерија у истраживањима везаним за MLS антибиотике се огледа у томе што оне представљају резервоар MLS гена резистенције, које те бактерије хоризонталним путем преносе на патогене Грам-позитивне коке.

Такође, у нашој студији смо идентификовали нови тзв. "keyhole" фенотип дупли диск дифузионом методом код једног изолата MSSA и три изолата ентерокока. У настанку



овог фенотипа код MSSA изолата је посредовао *lnuB* ген, док су три изолата ентерокока са овим фенотипом поседовала *lsaA* ген. Нови "keyhole" фенотип је показивао осетљивост на еритромицин и резистенцију на клиндамицин, са каналом осетљивости између еритромицина и клиндамицина, односно показивао је индуцибилну клиндамицин сензитивност. Разлог појаве овог фенотипа можда лежи у комбинацији гена резистенције или у тачкастој мутацији идентификованих гена. У једном јужнокорејском раду је дупли диск дифузионом методом код 32 изолата *S. agalactiae* откривен нови "keyhole" фенотип. Генетском анализом аутори су установили да су та 32 изолата *S. agalactiae* са *ermB* геном, и да је 29 од њих са *lnuB* геном. Секвенцирањем *ermB* гена утврдили су постојање више тачкастих мутација на *ermB* гену, тако да тај ген није могао да се експримира. Међутим, 3 изолата *S. agalactiae* су била са *ermB* геном и без *lnuB* гена и показивала су нови фенотип. Код ова три изолата нису били идентификовани други гени MLS резистенције, док повезаност фенотипа са генотипом нажалост није установљена [401]. У једној болници у Аргентини, експресијом комбинације MLS гена резистенције уочен је нови MLS фенотип резистенције. Описане су две варијанте новог фенотипа резистенције код MRSA изолата: ELKi фенотип (резистенција на еритромицин и линкомицин и индуцибилна резистенција на клиндамицин и ови су сојеви имали у свом геному комбинацију *ermC+lnuA* гена) и ELiK фенотип (резистенција на еритромицин и индуцибилна резистенција на линкомицин и клиндамицин и ови су сојеви имали само појединачни *ermC* ген) [317]. Новотна и сар. је описала код 15 сојева *S. haemolyticus* чудан фенотип везан за резистенцију на линкомицин-клиндамицин и осетљивост на макролиде, међутим генетском анализом нису успели да идентификују ниједан од познатих гена код ових сојева [321].

У нашој студији је забележена јасна разлика у обрасцу MLS осетљивости међу стафилококама и ентерококама/стрептококама и потврђена је неопходност увођења D теста у рутинском тестирању антимикробне осетљивости код изолата стафилокока. Наиме, на први поглед наши резултати без дуплог диск дифузионог теста показују већу преваленцију резистенције на клиндамицин код изолата бактерија *S. pneumoniae* (35,9%) него код изолата *S. aureus* (8,3%). Ипак, у рутинском тестирању можемо превидети сојеве који имају генетски потенцијал да постану резистентни током терапије на клиндамицин (iMLSb), доводећи до потцењивања стопе резистенције на клиндамицин, тако да сви изолати са iMLSb фенотипом могу бити грешком интерпретирани као клиндамицин осетљиви. На пример, у нашој студији имали смо 55,2% стварно (M/MSb

и Et/Cl<sub>i</sub> S) и 36,5% лажно (iMLS<sub>6</sub>) клиндамицин осетљивих изолата *S. aureus*, што представља потцењену стопу резистенције на клиндамицин од 8,3% (cMLS<sub>6</sub> и L<sub>Sa</sub>/b) уместо од 44,8% (iMLS<sub>6</sub> и cMLS<sub>6</sub> и L<sub>Sa</sub>/b) код *S. aureus*. Тако, коришћењем D-теста закључили смо да је права клиндамицин резистенција, укључујући и сојеве са iMLS<sub>6</sub> фенотипом, веома слична код бактерија врсте *S. aureus* и *S. pneumoniae*, 44,8%, односно, 46,9% респективно.

Континуирани пораст резистенције на антибиотике код стрептокока наглашава потребу за успостављањем контролисане употребе антибиотика. Лекари треба да узму у разматрање локалне и регионалне обрасце резистенције онда када морају изабрати адекватну антибиотску терапију. Налази наше студије, уз још неколико других са територије Србије, наглашавају неопходност правилне употребе антибиотика и континуираног праћења стрептококног обрасца резистенције на макролиде путем D-теста. Због тога, даља епидемиолошка истраживања сојева стрептокока по регионима Србије могу обезбедити, не само комплетнију представу о стрептококним инфекцијама у нашој земљи, већ и комплетну фенотипску карактеризацију те популације бактерија.

Наша студија је први покушај обједињавања информација о MLS резистенцији код патогених Грам-позитивних кока у овом региону (Пчињски округ). Наша епидемиолошка студија је настала као производ колекције изолата, њихове анализе и статистичке обраде добијених података, а указала нам је на неопходност улагања нових напора у решавању глобалног проблема антибиотске резистенције. Иако је ово преглед MLS резистенције код Грам-позитивних кока за једногодишњи период на целој територији Пчињског округа, ипак постоје рупе у познавању правог статуса MLS резистенције међу овим бактеријама, посебно у забаченим деловима овог региона. Са увидом у стање ове резистенције, отвара се питање развоја стратегије за спречавање њеног ширења, која подразумева рестриктивно и мудрије коришћење антибиотика као и спречавање ширења мултирезистентних сојева бактерија. Надамо се да ова студија може дати свој допринос у продужавању употребног века актуелних и доступних MLS антибиотика.

## 6 Закључци

На основу добијених резултата, могу се извести следећи закључци:

1. Поређењем учесталости резистенције на антибиотике, утврдили смо да није било резистентних изолата на линезолид међу Грам-позитивним кокама и да је на ванкомицин био резистентан само један изолат ентерокока (0,6%). Такође смо утврдили да је највећа резистентност била на:
  - цефокситин код MRSA и MRKNS (100%);
  - пеницилин, ципрофлоксацин и еритромицин код MRSA и MRKNS изолата;
  - клиндамицин код ентерокока, а затим код *S. pneumoniae*;
  - гентамицин код *S. agalactiae*, а затим код MRSA и MRKNS изолата.
2. У односу на поједине врсте Грам-позитивних кока утврдили смо да је био најучесталији фенотип резистенције код изолата :
  - *S. aureus* и KNS - iMLSb;
  - ентерокока, *S. pneumoniae* и *S. agalactiae* - cMLSb;
  - *S. pyogenes* - M/MSb;
3. У односу на све испитиване Грам-позитивне коке утврдили смо да:
  - cMLSb и LSa/b фенотип су били најучесталији код изолата ентерокока;
  - iMLSb фенотип је био најучесталији код MRSA и MRKNS изолата;
  - M/MSb је био најучесталији код MRKNS изолата, односно KNS изолата;
  - је сензитивност на еритромицин и клиндамицин била најучесталија код изолата *S. agalactiae* и *S. pyogenes*.
4. Поређењем учесталости MLS фенотипова резистенције код изолата Грам-позитивних кока из различитих врста материјала, утврдили смо да:
  - су iMLSb и сензитивност на еритромицин и клиндамицин били најучесталији код изолата из брисева грла и носа и пиокултура;
  - cMLSb и LSa/b су били најучесталији код изолата из гениталних секрета и урина;
  - M/MSb је био најучесталији код изолата из гениталних секрета.

5. Поређењем учесталости MLS фенотипова резистенције код изолата различитог порекла, утврдили смо да је M/MSb фенотип резистенције био значајно учесталији међу болничким изолатима стафилокока.
6. Најчешћи појединачни гени и њихове комбинације детектоване код:
  - стафилокока су *msrA/B*, *ermC* и *ermC+msrA/B*
  - ентерокока и β-хемолитичких стрептокока су *lsaA*, *ermB* и *ermB+lsaA*.
7. Код стафилокока најчешћи појединачни гени који су детерминисали:
  - M/MSb фенотип - *msrA/B* ген
  - LSa/b фенотип - *lnuA* ген
  - iMLSb фенотип - *ermA* и *ermC* ген
  - cMLSb фенотип - *ermC* и комбинације гена.
8. Код ентерокока и β-хемолитичких стрептокока најчешћи појединачни гени који су детерминисали:
  - LSa/b фенотип - *lsaA* ген
  - iMLSb фенотип - *ermB* и *ermA* ген
  - cMLSb фенотип - *ermB* и комбинације гена.
9. Поређењем учесталости гена MLS резистенције између амбулантних и болничких сојева утврдили смо:
  - *ermB* и *lsaA* ген су били статистички значајно учесталији код амбулантних изолата ентерокока и β-хемолитичких стрептокока у односу на болничке
  - *msrA/B* ген је био статистички значајно учесталији код болничких изолата стафилокока у односу на амбулантне.
10. Идентификација iMLSb фенотипа резистенције D-тестом је у поређењу са референтном методом, PCR идентификацијом *erm* гена показала 100% сензитивности и 65,38% специфичности.

## 7 Литература

- [1] Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, et al. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000;37(2):127-37. doi:10.1016/s0732-8893(00)00130-9.
- [2] Donabedian SM, Thal LA, Hershberger E, et al. Molecular Characterization of Gentamicin-Resistant Enterococci in the United States: Evidence of Spread from Animals to Humans through Food. *J Clin Microbiol.* 2003;41(3):1109-13. doi:10.1128/jcm.41.3.1109-1113.2003.
- [3] Hayes JR, English LL, Carter PJ, et al. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species Isolated from Retail Meats. *Appl Environm Microbiol.* 2003;69(12):7153-60. doi:10.1128/aem.69.12.7153-7160.2003.
- [4] Klare I, Konstabel C, Badstübner D, et al. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol.* 2003;88(2-3):269-90. doi:10.1016/s0168-1605(03)00190-9.
- [5] Chancey ST, Zähner D, Stephens DS. Acquired inducible antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria. *Future Microbiol.* 2012;7(8):959-78. doi:10.2217/fmb.12.63.
- [6] Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, et al. *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology.* 9th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
- [7] Baird D. *Staphylococcus* clusters forming Gram positive cocci. In: Cole JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmons A, eds. *Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology.* 14th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier; 1996.
- [8] Winn W, Koneman E, Allen S, et al. eds. *Koneman's Color Atlas And Textbook Of Diagnostic Microbiology.* Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
- [9] Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(6):1000-18. doi:10.1093/jac/dki372.

- 
- [10] van der Mee-Marquet N, Domelier AS, Girard N, Quentin R. Epidemiology and Typing of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bloodstream Infections. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12):5650-7. doi:10.1128/jcm.42.12.5650-5657.2004.
- [11] Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(3):505-20.
- [12] Sharp SE, Searcy C. Comparison of Mannitol Salt Agar and Blood Agar Plates for Identification and Susceptibility Testing of *Staphylococcus aureus* in Specimens from Cystic Fibrosis Patients. *J Clin Microbiol.* 2006;44(12):4545-6. doi:10.1128/jcm.01129-06.
- [13] Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of clinical microbiology*. 7th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1999.
- [14] Sjoquist J, Meloun B, Hjelm H. Protein A Isolated from *Staphylococcus aureus* after Digestion with Lysostaphin. *Eur J Biochem.* 1972;29(3):572-8. doi:10.1111/j.1432-1033.1972.tb02023.x.
- [15] Guss B, Uhlen M, Nilsson B, et al. Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A. *Eur J Biochem.* 1984;138(2):413-20. doi:10.1111/j.1432-1033.1984.tb07931.x.
- [16] Sjö Dahl J. Repetitive Sequences in Protein A from *Staphylococcus aureus*. Arrangement of Five Regions within the Protein, Four being Highly Homologous and Fc-Binding. *Eur J Biochem.* 1977;73(2):343-51. doi:10.1111/j.1432-1033.1977.tb11324.x.
- [17] Uhlén M, Guss B, Nilsson B, et al. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *J Biol Chem.* 1984;259(3):1695-702.
- [18] Frénay HM, Theelen JP, Schouls LM, et al. Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. *J Clin Microbiol.* 1994;32(3):846-7.
- [19] Wright III JS, Novick RP. Virulence Mechanisms in MRSA Pathogenesis. In: MRSA: current perspectives. Fluit AC, Schmitz FJ, eds. Wymondham, Norfolk, England: Caister Academic Press; 2003.
- [20] Hartleib J, Köhler N, Dickinson RB, et al. Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood.* 2000;96(6):2149-56.

- [21] Nguyen T, Ghebrehiwet B, Peerschke EI. Staphylococcus aureus Protein A Recognizes Platelet gC1qR/p33: a Novel Mechanism for Staphylococcal Interactions with Platelets. *Infect Immun.* 2000;68(4):2061-8. doi:10.1128/iai.68.4.2061-2068.2000.
- [22] Cunnion KM, Lee JC, Frank MM. Capsule Production and Growth Phase Influence Binding of Complement to Staphylococcus aureus. *Infect Immun.* 2001;69(11):6796-803. doi:10.1128/iai.69.11.6796-6803.2001.
- [23] Xia G, Kohler T, Peschel A. The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of Staphylococcus aureus. *Int J Med Microbiol.* 2010;300(2-3):148-54. doi:10.1016/j.ijmm.2009.10.001.
- [24] O'Riordan K, Lee JC. Staphylococcus aureus Capsular Polysaccharides. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(1):218-34. doi:10.1128/cmr.17.1.218-234.2004.
- [25] Baba T, Bae T, Schneewind O, et al. Genome Sequence of Staphylococcus aureus Strain Newman and Comparative Analysis of Staphylococcal Genomes: Polymorphism and Evolution of Two Major Pathogenicity Islands. *J Bacteriol.* 2007;190(1):300-10. doi:10.1128/jb.01000-07.
- [26] Trust Sanger Institute. Staphylococcus aureus. <http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/bacteria/staphylococcus-aureus.html>. Приступљено 28. 11. 2017.
- [27] National Center for Biotechnology Information. Genome. Staphylococcus aureus. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/154>. Приступљено 28. 11. 2017.
- [28] Forbes BA, Sahm DF, Alice S, Weissfeld AS. Staphylococcus, Micrococcus and similar organisms. In: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 11th ed. St. Louis, MO: Mosby; 2002.
- [29] Nilsson P, Ripa T. Staphylococcus aureus Throat Colonization Is More Frequent than Colonization in the Anterior Nares. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3334-9. doi:10.1128/jcm.00880-06.
- [30] Cookson BD, Schmitz F, Fluit AC. Introduction. In: MRSA: current perspectives. Fluit AC, Schmitz FJ, eds. Wymondham, Norfolk, England: Caister Academic Press; 2003.
- [31] Tenover FC, Gorwitz RJ. The Epidemiology of Staphylococcus infections. In: Fiscetti VA, et al. eds. Gram-positive pathogens. Washington, DC: ASM Press; 2006.
- [32] Klein E, Smith DL, Laxminarayan R. Hospitalizations and Deaths Caused by Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus, United States, 1999-2005. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(12):1840-6. doi:10.3201/eid1312.070629.

- [33] Corey GR. Staphylococcus aureus bloodstream infections: definitions and treatment. *Clin Infect Dis*. 2009;48(4):S254-9. doi:10.1086/598186.
- [34] National Institute for Health and Welfare (THL). Report 39/2011. Infectious diseases in Finland 2010. <http://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/79985/c22be7c1-5e9a-4b2d-a7f8-7be4c530ffe5.pdf?sequence=1>. Публиковано 22. 12. 2016. Приступљено 28. 11. 2017.
- [35] Schlievert PM, Shands KN, Dan BB, et al. Identification and Characterization of an Exotoxin from Staphylococcus aureus Associated with Toxic-Shock Syndrome. *J Infect Dis*. 1981;143(4):509-16. doi:10.1093/infdis/143.4.509.
- [36] Uchiyama T, Yan XJ, Imanishi K, Yagi J. Bacterial Superantigens-Mechanism of T Cell Activation by the Superantigens and Their Role in the Pathogenesis of Infectious Diseases. *Microbiol Immunol*. 1994;38(4):245-56. doi:10.1111/j.1348-0421.1994.tb01772.x.
- [37] Shands KN, Schmid GP, Dan BB, et al. Toxic-Shock Syndrome in Menstruating Women. *N Engl J Med*. 1980;303(25):1436-42. doi:10.1056/nejm198012183032502.
- [38] Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, et al. The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(12):751-62. doi:10.1016/S1473-3099(05)70295-4.
- [39] van Belkum A, Verkaik NJ, de Vogel CP, et al. Reclassification of Staphylococcus aureus nasal carriage types. *J Infect Dis*. 2009;199(12):1820-6. doi:10.1086/599119.
- [40] Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, et al. Prevalence of Staphylococcus aureus nasal colonization in the United States, 2001-2002. *J Infect Dis*. 2006;193(2):172-9. doi:10.1086/499632.
- [41] Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10(3):505-20.
- [42] Ito T, Katayama Y, Asada K, et al. Structural Comparison of Three Types of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Integrated in the Chromosome in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(5):1323-36. doi:10.1128/aac.45.5.1323-1336.2001.
- [43] Kipp F, Becker K, Peters G, von Eiff C. Evaluation of Different Methods To Detect Methicillin Resistance in Small-Colony Variants of Staphylococcus aureus. *J Clin Microbiol*. 2004;42(3):1277-9. doi:10.1128/jcm.42.3.1277-1279.2004.



- [44] von Eiff C, Becker K, Metze D, et al. Intracellular Persistence of *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants within Keratinocytes: A Cause for Antibiotic Treatment Failure in a Patient with Darier's Disease. *Clin Infect Dis.* 2001;32(11):1643-7. doi:10.1086/320519.
- [45] Proctor RA, Peters G. Small Colony Variants in Staphylococcal Infections: Diagnostic and Therapeutic Implications. *Clin Infect Dis.* 1998;27(3):419-22. doi:10.1086/514706.
- [46] Skov R, Smyth R, Larsen AR, et al. Phenotypic Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* by Disk Diffusion Testing and Etest on Mueller-Hinton Agar. *J Clin Microbiol.* 2006;44(12):4395-9. doi:10.1128/jcm.01411-06.
- [47] Stoakes L, Reyes R, Daniel J, et al. Prospective Comparison of a New Chromogenic Medium, MRSASelect, to CHROMagar MRSA and Mannitol-Salt Medium Supplemented with Oxacillin or Cefoxitin for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2006;44(2):637-9. doi:10.1128/jcm.44.2.637-639.2006.
- [48] Berger-Bächli B, Rohrer S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol.* 2002;178(3):165-71. doi:10.1007/s00203-002-0436-0.
- [49] Ito T, Okuma K, Ma XX, et al. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat.* 2003;6(1):41-52. doi:10.1016/s1368-7646(03)00003-7.
- [50] 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(6):1449-58.
- [51] 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(7):1955-63. doi:10.1128/aac.45.7.1955-1963.2001.
- [52] Musser JM, Kapur V. Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. *J Clin Microbiol.* 1992;30(8):2058-63.

- [53] Robinson DA, Enright MC. Evolution of *Staphylococcus aureus* by Large Chromosomal Replacements. *J Bacteriol.* 2004;186(4):1060-4. doi:10.1128/jb.186.4.1060-1064.2004.
- [54] Berglund C, Ito T, Ikeda M, et al. Novel Type of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain Isolated in Sweden. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(10):3512-6. doi:10.1128/aac.00087-08.
- [55] Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol.* 2008;8(6):747-63. doi:10.1016/j.meegid.2008.07.007.
- [56] Higuchi W, Takano T, Teng LJ, Yamamoto T. Structure and specific detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type VII. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;377(3):752-6. doi:10.1016/j.bbrc.2008.10.009.
- [57] IWG-SCC. Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for Reporting Novel SCC*mec* Elements. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):4961-7. doi:10.1128/aac.00579-09.
- [58] Kondo Y, Ito T, Ma XX et al. Combination of 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(1):264-74. doi:10.1128/aac.00165-06.
- [59] Li S, Skov RL, Han X, et al. Novel Types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Elements Identified in Clonal Complex 398 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(6):3046-50. doi:10.1128/aac.01475-10.
- [60] Oliveira DC, Milheirico C, de Lencastre H. Redefining a Structural Variant of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*, SCC*mec* Type VI. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(10):3457-9. doi:10.1128/aac.00629-06.
- [61] Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Conly JM. Novel Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type, Tentatively Designated Type VIII, Harboring Class A *mec* and Type 4 *ccr* Gene Complexes in a Canadian Epidemic Strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(2):531-40. doi:10.1128/aac.01118-08.
- [62] Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, et al. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(3):222-35. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01573.x.

- 
- [63] Lindsay JA, Holden MT. Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. *Funct Integr Genomics*. 2006;6(3):186-201. doi:10.1007/s10142-005-0019-7.
- [64] Nastaly P, Grinholc M, Bielawski KP. Molecular characteristics of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains for clinical medicine. *Arch Microbiol*. 2010;192(8):603-17. doi:10.1007/s00203-010-0594-4.
- [65] Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, et al. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2003;36(1):53-9. doi:10.1086/345476.
- [66] Melzer M, Eykyn SJ, Gransden WR, Chinn S. Is Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* More Virulent than Methicillin-Susceptible *S. aureus*? A Comparative Cohort Study of British Patients with Nosocomial Infection and Bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2003;37(11):1453-60. doi:10.1086/379321.
- [67] Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, et al. The Impact of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Bacteremia on Patient Outcomes: Mortality, Length of Stay, and Hospital Charges. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2005;26(02):166-74. doi:10.1086/502522.
- [68] Zahar JR, Clec'h C, Tafflet M, et al. Is Methicillin Resistance Associated with a Worse Prognosis in *Staphylococcus aureus* Ventilator-Associated Pneumonia?. *Clin Infect Dis*. 2005;41(9):1224-31. doi:10.1086/496923.
- [69] Safdar N, Bradley EA. The Risk of Infection after Nasal Colonization with *Staphylococcus Aureus*. *Am J Med*. 2008;121(4):310-5. doi:10.1016/j.amjmed.2007.07.034.
- [70] Roghmann MC. Predicting Methicillin Resistance and the Effect of Inadequate Empiric Therapy on Survival in Patients With *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Arch Intern Med*. 2000;160(7):1001-4. doi:10.1001/archinte.160.7.1001.
- [71] Selvey LA, Whitby M, Johnson B. Nosocomial Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Is It Any Worse Than Nosocomial Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Bacteremia?. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2000;21(10):645-8. doi:10.1086/501707.
- [72] Engemann JJ, Carmeli Y, Cosgrove SE, et al. Adverse Clinical and Economic Outcomes Attributable to Methicillin Resistance among Patients with *Staphylococcus aureus* Surgical Site Infection. *Clin Infect Dis*. 2003;36(5):592-8. doi:10.1086/367653.

- [73] Reed SD, Friedman JY, Engemann JJ, et al. Costs and Outcomes Among Hemodialysis-Dependent Patients With Methicillin-Resistant or Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005;26(02):175-83. doi:10.1086/502523.
- [74] Skov R, Smyth R, Clausen M, et al. Evaluation of a cefoxitin 30 µg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(2):204-7. doi:10.1093/jac/dkg325.
- [75] Anand KB, Agrawal P, Kumar S, Kapila K. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. *Indian J Med Microbiol.* 2009;27(1):27-9.
- [76] Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, et al. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 1995;33(11):2864-7.
- [77] Arakere G, Nadig S, Swedberg G, et al. Genotyping of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains from Two Hospitals in Bangalore, South India. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3198-202. doi:10.1128/jcm.43.7.3198-3202.2005.
- [78] Hanssen AM, Fossum A, Mikalsen J, et al. Dissemination of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones in Northern Norway: Sequence Types 8 and 80 Predominate. *J Clin Microbiol.* 2005;43(5):2118-24. doi:10.1128/jcm.43.5.2118-2124.2005.
- [79] Muder RR, Brennen C, Wagener MM, et al. Methicillin-Resistant Staphylococcal Colonization and Infection in a Long-Term Care Facility. *J Ann Intl Med.* 1991;114(2):107-12. doi:10.7326/0003-4819-114-2-1-107.
- [80] Anupurba S, Sen MR, Nath G, et al. Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary referral hospital in eastern Uttar Pradesh. *Indian J Med Microbiol.* 2003;21(1):49-51.
- [81] Leclercq R. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clin Infect Dis.* 2002;34(4):482-92. doi:10.1086/324626.
- [82] Patel M, Waites KB, Moser SA, et al. Prevalence of Inducible Clindamycin Resistance among Community- and Hospital-Associated *Staphylococcus aureus* Isolates. *J Clin Microbiol.* 2006;44(7):2481-4. doi:10.1128/jcm.02582-05.
- [83] Yilmaz G, Aydin K, Iskender S, et al. Detection and prevalence of inducible clindamycin resistance in staphylococci. *J Med Microbiol.* 2007;56(3):342-5. doi:10.1099/jmm.0.46761-0.

- [84] Ruoff KL, Wiley RA, Beighton D. Streptococcus. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. Manual of clinical microbiology. 7th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1999.
- [85] Obaro S, Adegbola R. The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines. *J Med Microbiol.* 2002;51(2):98-104. doi:10.1099/0022-1317-51-2-98.
- [86] Casey JR, Adlowitz DG, Pichichero ME. New Patterns in the Otopathogens Causing Acute Otitis Media Six to Eight Years After Introduction of Pneumococcal Conjugate Vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29(4):304-9. doi:10.1097/inf.0b013e3181c1bc48.
- [87] European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Annual report of the EARS-Net 2009. Stockholm: ECDC; 2010. [https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/1011\\_SUR\\_annual\\_EARS\\_Net\\_2009.pdf](https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/1011_SUR_annual_EARS_Net_2009.pdf). Приступљено 28. 11. 2017.
- [88] Hicks LA, Harrison LH, Flannery B, et al. Incidence of Pneumococcal Disease Due to Non-Pneumococcal Conjugate Vaccine (PCV7) Serotypes in the United States during the Era of Widespread PCV7 Vaccination, 1998-2004. *J Infect Dis.* 2007;196(9):1346-54. doi:10.1086/521626.
- [89] Paton JC, Morona JK. Streptococcus pneumoniae Capsular Polysaccharide. In: Fischetti V, Novick R, Ferretti J, Portnoy D, Rood J, eds. Gram-Positive Pathogens, 2nd ed. Washington, DC: ASM Press; 2006. doi:10.1128/9781555816513.ch20.
- [90] Brueggemann AB, Peto TE, Crook DW, et al. Temporal and Geographic Stability of the Serogroup-Specific Invasive Disease Potential of Streptococcus pneumoniae in Children. *J Infect Dis.* 2004;190(7):1203-11. doi:10.1086/423820.
- [91] Brueggemann AB, Griffiths DT, Meats E, et al. Clonal Relationships between Invasive and Carriage Streptococcus pneumoniae and Serotype- and Clone-Specific Differences in Invasive Disease Potential. *J Infect Dis.* 2003;187(9):1424-32. doi:10.1086/374624.
- [92] Rückinger S, von Kries R, Siedler A, van der Linden M. Association of Serotype of Streptococcus pneumoniae With Risk of Severe and Fatal Outcome. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(2):118-22. doi:10.1097/inf.0b013e318187e215.
- [93] Sandgren A, Sjöström K, Olsson-Liljequist B, et al. Effect of Clonal and Serotype-Specific Properties on the Invasive Capacity of Streptococcus pneumoniae. *J Infect Dis.* 2004;189(5):785-96. doi:10.1086/381686.
- [94] Bergmann S, Hammerschmidt S. Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology.* 2006;152(2):295-303. doi:10.1099/mic.0.28610-0.

- [95] Di Guilmi AM, Dessen A. New approaches towards the identification of antibiotic and vaccine targets in *Streptococcus pneumoniae*. *EMBO Rep.* 2002;3(8):728-34. doi:10.1093/embo-reports/kvf152.
- [96] Jedrzejewski MJ. Unveiling molecular mechanisms of bacterial surface proteins: *Streptococcus pneumoniae* as a model organism for structural studies. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(21):2799-822. doi:10.1007/s00018-007-7125-8.
- [97] Tettelin H, Nelson KE, Paulsen IT, et al. Complete Genome Sequence of a Virulent Isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science.* 2001;293(5529):498-506. doi:10.1126/science.1061217.
- [98] Hiller NL, Janto B, Hogg JS, et al. Comparative Genomic Analyses of Seventeen *Streptococcus pneumoniae* Strains: Insights into the Pneumococcal Supragenome. *J Bacteriol.* 2007;189(22):8186-95. doi:10.1128/jb.00690-07.
- [99] Dopazo J, Mendoza A, Herrero J, et al. Annotated Draft Genomic Sequence from a *Streptococcus pneumoniae* Type 19F Clinical Isolate. *Microb Drug Resist.* 2001;7(2):99-125. doi:10.1089/10766290152044995.
- [100] Hoskins J, Alborn WE, Arnold J, et al. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol.* 2001;183(19):5709-17. doi:10.1128/JB.183.19.5709-5717.2001
- [101] O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet.* 2009;374(9693):893-902. doi:10.1016/s0140-6736(09)61204-6.
- [102] Centers for Disease Control and Prevention. Pneumococcal Disease: Surveillance and Reporting. <https://www.cdc.gov/pneumococcal/surveillance.html>. Ажурирано 06. 09. 2017. Приступљено 28. 11. 2017.
- [103] Pulido M, Sorvillo F. Declining invasive pneumococcal disease mortality in the United States, 1990-2005. *Vaccine.* 2010;28(4):889-92. doi:10.1016/j.vaccine.2009.10.121.
- [104] Boisier P, Maïnassara HB, Sidikou F, et al. Case-fatality ratio of bacterial meningitis in the African meningitis belt: We can do better. *Vaccine.* 2007;25:A24-9. doi:10.1016/j.vaccine.2007.04.036.
- [105] Jansen AG, Rodenburg GD, van der Ende A, et al. Invasive Pneumococcal Disease among Adults: Associations among Serotypes, Disease Characteristics, and Outcome. *Clin Infect Dis.* 2009;49(2):e23-9. doi:10.1086/600045.
- [106] Johnson AP, Waight P, Andrews N, et al. Morbidity and mortality of pneumococcal meningitis and serotypes of causative strains prior to introduction of the 7-valent

- conjugant pneumococcal vaccine in England. *J Infect.* 2007;55(5):394-9. doi:10.1016/j.jinf.2007.07.009.
- [107] Klemets P, Lyytikäinen O, Ruutu P, et al. Invasive pneumococcal infections among persons with and without underlying medical conditions: Implications for prevention strategies. *BMC Infect Dis.* 2008;8(1):96. doi:10.1186/1471-2334-8-96.
- [108] European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2011. Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2011. [https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/1111\\_SUR\\_Annual\\_Epidemiological\\_Report\\_on\\_Communicable\\_Diseases\\_in\\_Europ....pdf](https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/1111_SUR_Annual_Epidemiological_Report_on_Communicable_Diseases_in_Europ....pdf). Публиковано: 10. 11. 2011. Приступљено: 28. 11. 2017.
- [109] Almirall J, Boixeda R, Bolibar I, et al. Differences in the etiology of community-acquired pneumonia according to site of care: A population-based study. *Respir Med.* 2007;101(10):2168-75. doi:10.1016/j.rmed.2007.05.007.
- [110] Crum NF, Wallace MR, Lamb CR, et al. Halting a pneumococcal pneumonia outbreak among United States Marine Corps trainees. *Am J Prev Med.* 2003;25(2):107-11. doi:10.1016/s0749-3797(03)00114-4.
- [111] Gleich S, Morad Y, Echague R, et al. Streptococcus pneumoniae Serotype 4 Outbreak in a Home for the Aged: Report and Review of Recent Outbreaks. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2000;21(11):711-7. doi:10.1086/501717.
- [112] Romney MG, Hull MW, Gustafson R, et al. Large Community Outbreak of Streptococcus pneumoniae Serotype 5 Invasive Infection in an Impoverished, Urban Population. *Clin Infect Dis.* 2008;47(6):768-74. doi:10.1086/591128.
- [113] Lynch JP, Zhanel GG. Streptococcus pneumoniae: epidemiology and risk factors, evolution of antimicrobial resistance, and impact of vaccines. *Curr Opin Pulm Med.* 2010;16(3):217-25 doi:10.1097/mcp.0b013e3283385653.
- [114] van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet.* 2009;374(9700):1543-56. doi:10.1016/s0140-6736(09)61114-4.
- [115] Koskinen H, Rautakorpi UM, Sintonen H, et al. Cost-effectiveness of implementing national guidelines in the treatment of acute otitis media in children. *Int J Technol Assess Health Care.* 2006;22(04):454-9. doi:10.1017/s0266462306051373.
- [116] Niemelä M, Uhari M, Möttönen M, Pokka T. Costs arising from otitis media. *Acta Paediatr.* 1999;88(5):553-6. doi:10.1080/08035259950169585.

- [117] Siira L, Rantala M, Jalava J, et al. Temporal Trends of Antimicrobial Resistance and Clonality of Invasive *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Finland, 2002 to 2006. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(5):2066-73. doi:10.1128/aac.01464-08.
- [118] Leibovitz E, Broides A, Greenberg D, Newman N. Current management of pediatric acute otitis media. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8(2):151-61. doi:10.1586/eri.09.112.
- [119] Ardanuy C, Rolo D, Fenoll A, et al. Emergence of a multidrug-resistant clone (ST320) among invasive serotype 19A pneumococci in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(3):507-10. doi:10.1093/jac/dkp210.
- [120] Liñares J, Ardanuy C, Pallares R, Fenoll A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(5):402-10. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03182.x.
- [121] Bogaert D, de Groot R, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis.* 2004;4(3):144-54. doi:10.1016/s1473-3099(04)00938-7.
- [122] Gray BM, Converse GM, Dillon HC. Epidemiologic Studies of *Streptococcus pneumoniae* in Infants: Acquisition, Carriage, and Infection during the First 24 Months of Life. *J Infect Dis.* 1980;142(6):923-33. doi:10.1093/infdis/142.6.923.
- [123] Syrjänen RK, Kilpi TM, Kajjalainen TH, et al. Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Finnish Children Younger Than 2 Years Old. *J Infect Dis.* 2001;184(4):451-9. doi:10.1086/322048.
- [124] Berkovitch M, Bulkowstein M, Zhovtis D, et al. Colonization rate of bacteria in the throat of healthy infants. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2002;63(1):19-24. doi:10.1016/s0165-5876(01)00635-8.
- [125] Bogaert D, van Belkum A, Sluijter M, et al. Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. *Lancet.* 2004;363(9424):1871-2. doi:10.1016/s0140-6736(04)16357-5.
- [126] Coles CL, Kanungo R, Rahmathullan L, et al. Pneumococcal nasopharyngeal colonization in young South Indian infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2001;20(3):289-95. doi:10.1097/00006454-200103000-00014.
- [127] Tamm E, Naaber P, Maimets M, et al. Antimicrobial susceptibility and serogroup/serotype distribution of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* in healthy Estonian children in 1999-2003. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(8):824-6. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01743.x.



- [128] Syrjänen RK, Auranen KJ, Leino TM, et al. Pneumococcal Acute Otitis Media in Relation to Pneumococcal Nasopharyngeal Carriage. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24(9):801-6. doi:10.1097/01.inf.0000178072.83531.4f.
- [129] Jounio U, Juvonen R, Bloigu A, et al. Pneumococcal carriage is more common in asthmatic than in non-asthmatic young men. *Clin Respir J*. 2010;4(4):222-9. doi:10.1111/j.1752-699x.2009.00179.x.
- [130] Arias CA, Murray BE. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(4):266-78. doi:10.1038/nrmicro2761.
- [131] Cattoir V, Leclercq R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce?. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(4):731-42. doi:10.1093/jac/dks469.
- [132] Eliopoulos GM. Quinupristin-Dalfopristin and Linezolid: Evidence and Opinion. *Clin Infect Dis*. 2003;36(4):473-81. doi:10.1086/367662.
- [133] Novak R, Shlaes DM. The pleuromutilin antibiotics: a new class for human use. *Curr Opin Investig Drugs*. 2010;11(2):182-91.
- [134] Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. An Enterococcus faecalis ABC Homologue (Lsa) Is Required for the Resistance of This Species to Clindamycin and Quinupristin-Dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(6):1845-50. doi:10.1128/aac.46.6.1845-1850.2002.
- [135] Dina J, Malbruny B, Leclercq R. Nonsense Mutations in the lsa-Like Gene in Enterococcus faecalis Isolates Susceptible to Lincosamides and Streptogramins A. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(7):2307-9. doi:10.1128/aac.47.7.2307-2309.2003.
- [136] Singh KV, Murray BE. Differences in the Enterococcus faecalis lsa Locus That Influence Susceptibility to Quinupristin-Dalfopristin and Clindamycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(1):32-9. doi:10.1128/aac.49.1.32-39.2005.
- [137] Kehrenberg C, Ojo KK, Schwarz S. Nucleotide sequence and organization of the multiresistance plasmid pSCFS1 from Staphylococcus sciuri. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(5):936-9. doi:10.1093/jac/dkh457.
- [138] Kehrenberg C, Aarestrup FM, Schwarz S. IS21-558 Insertion Sequences Are Involved in the Mobility of the Multiresistance Gene cfr. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(2):483-7. doi:10.1128/aac.01340-06.
- [139] Wendlandt S, Lozano C, Kadlec K, et al. The enterococcal ABC transporter gene lsa(E) confers combined resistance to lincosamides, pleuromutilins and streptogramin A

- antibiotics in methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(2):473-5. doi:10.1093/jac/dks398.
- [140] Li B, Wendlandt S, Yao J, et al. Detection and new genetic environment of the pleuromutilin-lincosamide-streptogramin A resistance gene *lsa(E)* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of swine origin. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(6):1251-5. doi:10.1093/jac/dkt015.
- [141] Malbruny B, Werno AM, Anderson TP, et al. A new phenotype of resistance to lincosamide and streptogramin A-type antibiotics in *Streptococcus agalactiae* in New Zealand. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(6):1040-4. doi:10.1093/jac/dkh493.
- [142] Malbruny B, Werno AM, Murdoch DR, et al. Cross-Resistance to Lincosamides, Streptogramins A, and Pleuromutilins Due to the *lsa(C)* Gene in *Streptococcus agalactiae* UCN70. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(4):1470-4. doi:10.1128/aac.01068-10.
- [143] Dowzicky M, Talbot GH, Feger C, et al. Characterization of isolates associated with emerging resistance to quinupristin/dalfopristin (Synecid) during a worldwide clinical program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000;37(1):57-62. doi:10.1016/s0732-8893(99)00154-6.
- [144] Isnard C, Malbruny B, Leclercq R, Cattoir V. Genetic Basis for In Vitro and In Vivo Resistance to Lincosamides, Streptogramins A, and Pleuromutilins (LSAP Phenotype) in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(9):4463-9. doi:10.1128/aac.01030-13.
- [145] Farley MM. Group B Streptococcal Disease in Nonpregnant Adults. *Clin Infect Dis.* 2001;33(4):556-61. doi:10.1086/322696.
- [146] Tyrrell GJ, Senzilet LD, Spika JS, et al. Invasive Disease Due to Group B Streptococcal Infection in Adults: Results From a Canadian, Population-Based, Active Laboratory Surveillance Study-1996. *J Infect Dis.* 2000;182(1):168-73. doi:10.1086/315699.
- [147] Edwards MS, Baker CJ. *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus). In: Mandell G, Bennett J, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.* 7th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier; 2010.
- [148] Betriu C, Culebras E, Gomez M, et al. Erythromycin and Clindamycin Resistance and Telithromycin Susceptibility in *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(3):1112-4. doi:10.1128/aac.47.3.1112-1114.2003.

- [149] Arana DM, Rojo-Bezares B, Torres C, Alós JI. First clinical isolate in Europe of clindamycin-resistant group B Streptococcus mediated by the *lnu(B)* gene. *Rev Esp Quimioter.* 2014;27(2):106-9.
- [150] Lämmler C, Schwarz S, Wibawan IWT, et al. Comparison of streptococci of serological group B isolated from healthy carriers and active disease in Chile. *J Med Microbiol.* 1995;42(3):161-4. doi:10.1099/00222615-42-3-161.
- [151] Murayama SY, Seki C, Sakata H, et al. Capsular Type and Antibiotic Resistance in Streptococcus agalactiae Isolates from Patients, Ranging from Newborns to the Elderly, with Invasive Infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2650-3. doi:10.1128/aac.01716-08.
- [152] Manning SD. Molecular epidemiology of Streptococcus Agalactiae (Group B Streptococcus). *Front Bio.* 2003;8(6):s1-18. doi:10.2741/985.
- [153] Larsson C, Lindroth M, Nordin P, et al. Association between low concentrations of antibodies to protein  $\alpha$  and Rib and invasive neonatal group B streptococcal infection. *Arch Dis Child Fetal Neona.* 2006;91(6):F403-8. doi:10.1136/adc.2005.090472.
- [154] Mavenyengwa RT, Moyo SR, Nordbø SA. Streptococcus agalactiae colonization and correlation with HIV-1 and HBV seroprevalence in pregnant women from Zimbabwe. *Euro J Obst Gynaecol Reprod Biol.* 2010;150(1):34-8. doi:10.1016/j.ejogrb.2010.02.021.
- [155] Edmond KM, Kortsalioudaki C, Scott S, et al. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2012;379(9815):547-56. doi:10.1016/s0140-6736(11)61651-6.
- [156] Moyo SR, Maeland JA, Munemo ES. Susceptibility of Zimbabwean Streptococcus agalactiae (group B Streptococcus; GBS) isolates to four different antibiotics. *Cent Afr J Med.* 2001;47(9-10):226-9.
- [157] Madhi SA, Radebe K, Crewe-Brown H, et al. High burden of invasive Streptococcus agalactiae disease in South African infants. *Ann Trop Paediatr.* 2003;23(1):15-23. doi:10.1179/000349803125002814.
- [158] Martins ER, Andreu A, Correia P, et al. Group B Streptococci Causing Neonatal Infections in Barcelona Are a Stable Clonal Population: 18-Year Surveillance. *J Clin Microbiol.* 2011;49(8):2911-8. doi:10.1128/jcm.00271-11.
- [159] Madzivhandila M, Adrian PV, Cutland CL, et al. Serotype Distribution and Invasive Potential of Group B Streptococcus Isolates Causing Disease in Infants and Colonizing

- Maternal-Newborn Dyads. *PLoS One*. 2011;6(3):e17861. doi:10.1371/journal.pone.0017861.
- [160] Mohammed M, Asrat D, Woldeamanuel Y, Demissie A. Prevalence of group B *Streptococcus* colonization among pregnant women attending antenatal clinic of Hawassa Health Center, Hawassa, Ethiopia. *Ethiop J Health Dev*. 2012;26(1):36-42.
- [161] Centers for Disease Control and Prevention. Morbidity and Mortality Weekly Report. Prevention of Perinatal Group B *Streptococcal* Disease: Revised Guidelines from CDC, 2010. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5910a1.htm>. Опубликовано 19. 11. 2010. Приступљено: 28. 11. 2017.
- [162] Rouse DJ, Andrews WW, Lin FC, et al. Antibiotic susceptibility profile of group B *streptococcus* acquired vertically. *Obstet Gynecol*. 1998;92(6):931-4. doi:10.1016/s0029-7844(98)00263-4.
- [163] Simoes JA, Aroutcheva AA, Heimler I, Faro S. Antibiotic Resistance Patterns of Group B *Streptococcal* Clinical Isolates. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2004;12(1):1-8. doi:10.1080/10647440410001722269.
- [164] Kimura K, Suzuki S, Wachino J, et al. First Molecular Characterization of Group B *Streptococci* with Reduced Penicillin Susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(8):2890-7. doi:10.1128/aac.00185-08.
- [165] Fitoussi F, Loukil C, Gros I, et al. Mechanisms of Macrolide Resistance in Clinical Group B *Streptococci* Isolated in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(6):1889-91. doi:10.1128/aac.45.6.1889-1891.2001.
- [166] Back E, O'Grady EJ, Back JD. High Rates of Perinatal Group B *Streptococcus* Clindamycin and Erythromycin Resistance in an Upstate New York Hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(2):739-42. doi:10.1128/aac.05794-11.
- [167] Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Prevention of perinatal group B *streptococcal* disease-revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep*. 2010;59(RR-10):1-36.
- [168] Arpin C, Daube H, Tessier F, Quentin C. Presence of *mefA* and *mefE* Genes in *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(4):944-6.
- [169] Zeng X, Kong F, Wang H, et al. Simultaneous Detection of Nine Antibiotic Resistance-Related Genes in *Streptococcus agalactiae* Using Multiplex PCR and Reverse Line Blot Hybridization Assay. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(1):204-9. doi:10.1128/aac.50.1.204-209.2006.

- [170] Gygax SE, Schuyler JA, Trama JP, et al. Detection of Erythromycin and Clindamycin Resistance Genes in Group B Streptococcal Clinical Isolates and Cervicovaginal-Rectal Swabs. *Microb Drug Resist.* 2007;13(2):119-23. doi:10.1089/mdr.2007.732.
- [171] Quiroga M, Pegels E, Oviedo P, et al. Antibiotic susceptibility patterns and prevalence of group B Streptococcus isolated from pregnant women in Misiones, Argentina. *Braz J Microbiol.* 2008;39(2):245-50. doi:10.1590/s1517-83822008000200009.
- [172] Khan AS, Walsh A, Crowley B. Role of efflux in macrolide resistance in  $\beta$ -haemolytic streptococci of groups A, B, C and G collected in an Irish teaching hospital. *J Med Microbiol.* 2011;60(2):262-4. doi:10.1099/jmm.0.023788-0.
- [173] Heelan JS, Hasenbein ME, McAdam AJ. Resistance of Group B Streptococcus to Selected Antibiotics, Including Erythromycin and Clindamycin. *J Clin Microbiol.* 2004;42(3):1263-4. doi:10.1128/jcm.42.3.1263-1264.2004.
- [174] Gosiewski T, Brzychczy-Włoch M, Heczko PB. The application of multiplex PCR to detect seven different DNA targets in group B streptococci. *Folia Microbial (Praha).* 2012;57(3):163-7. doi:10.1007/s12223-012-0108-7.
- [175] Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med.* 1933;57(4):571-95. doi:10.1084/jem.57.4.571.
- [176] Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Chapter 22: Streptococcus. In: *Medical Microbiology*. 6th ed. Missouri: Mosby, Inc. 2009.
- [177] Oberley TD, Duncan JL. Characteristics of Streptolysin O Action. *Infect Immun.* 1971;4(6):683-7.
- [178] Cunningham MW. Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(3):470-511. doi:10.1128/cmr.13.3.470-511.2000.
- [179] Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis.* 2005;5(11):685-94. doi:10.1016/s1473-3099(05)70267-x.
- [180] Martin JM, Green M. Group A streptococcus. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2006;17(3):140-8. doi:10.1053/j.spid.2006.07.001.
- [181] Sriskandan S, McKee A, Hall L, Cohen J. Comparative effects of clindamycin and ampicillin on superantigenic activity of Streptococcus pyogenes. *J Antimicrob Chemother.* 1997;40(2):275-7. doi:10.1093/jac/40.2.275.
- [182] Bisno AL, Stevens DL. Streptococcal Infections of Skin and Soft Tissues. *N Engl J Med.* 1996;334(4):240-6. doi:10.1056/nejm199601253340407.

- [183] Silva-Costa C, Friães A, Ramirez M, Melo-Cristino J. Differences between Macrolide-Resistant and -Susceptible *Streptococcus pyogenes*: Importance of Clonal Properties in Addition to Antibiotic Consumption. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(11):5661-6. doi:10.1128/aac.01133-12.
- [184] Chambers HF. Penicillins. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier; 2010.
- [185] Ferretti JJ, McShan WM, Ajdic D, et al. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(8):4658-63. doi:10.1073/pnas.071559398.
- [186] Gutmann L, Tomasz A. Penicillin-resistant and penicillin-tolerant mutants of group A *Streptococci*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982;22(1):128-36. doi:10.1128/aac.22.1.128.
- [187] Horn DL, Zabriskie JB, Austrian R, et al. Why Have Group A *Streptococci* Remained Susceptible to Penicillin? Report on a Symposium. *Clin Infect Dis.* 1998;26(6):1341-5. doi:10.1086/516375.
- [188] Retsema J, Fu W. Macrolides: structures and microbial targets. *Int J Antimicrob Agents.* 2001;18(1):S3-10. doi:10.1016/s0924-8579(01)00401-0.
- [189] Henry FC. Protein Synthesis Inhibitors and Miscellaneous Antibacterial Agents. In: Rollins DE, Blumenthal DK, eds. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 12th ed. New York: McGraw-Hill; 2016.
- [190] Gerding DN, Johnson S. Clostridial infections. In: Goldman L, Schafer AI, eds. *Goldman's Cecil Medicine*. 24th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2011.
- [191] Dhawan VK, Thadepalli H. Clindamycin: A Review of Fifteen Years of Experience. *Rev Infect Dis.* 1982;4(6):1133-53. doi:10.1093/clinids/4.6.1133.
- [192] Birkenmeyer RD, Kagan F. Lincomycin. XI. Synthesis and structure of clindamycin, a potent antibacterial agent. *J Med Chem.* 1970;13(4):616-9. doi:10.1021/jm00298a007.
- [193] Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML, Jorgensen JH. Practical Disk Diffusion Method for Detection of Inducible Clindamycin Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative *Staphylococci*. *J Clin Microbiol.* 2003;41(10):4740-4. doi:10.1128/jcm.41.10.4740-4744.2003.
- [194] Angel MR, Balaji V, Prakash J, et al. Prevalence of inducible clindamycin resistance in gram positive organisms in a tertiary care centre. *Indian J Med Microbiol.* 2008;26(3):262-4. doi:10.4103/0255-0857.42041.

- [195] Leclercq R, Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35(7):1267-72. doi:10.1128/aac.35.7.1267.
- [196] Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(3):577-85. doi:10.1128/aac.39.3.577.
- [197] Haznedaroğlu T, Mehmet Kural M, Baylan O, et al. Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of coagulase negative staphylococci and *Staphylococcus aureus*. *Tip Araştırmaları Dergisi.* 2011;9(2):120-7.
- [198] Andrašević AT. Twenty Years of Azithromycin - Sensitivity of Major Pathogens. *Medicus.* 2008;17(2):15-20.
- [199] Campelo FA, Pedrosa AC, Antúnez IÁ, Capuz BL. [Phenotypes and mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides in *Streptococcus agalactiae* isolates with clinical significance in an eight-year period (2002-2010)]. *Rev Esp Quimioter.* 2012;25(1):42-6.
- [200] Felmingham D, Cantón R, Jenkins S. Regional trends in  $\beta$ -lactam, macrolide, fluoroquinolone and telithromycin resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates 2001-2004. *J Infect.* 2007;55(2):111-8. doi:10.1016/j.jinf.2007.04.006.
- [201] DiPersio L, DiPersio J, Frey K, Beach J. Prevalence of the erm(T) Gene in Clinical Isolates of Erythromycin-Resistant Group D *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1567-9. doi:10.1128/aac.01325-07.
- [202] Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, et al. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(12):2823-30.
- [203] Weisblum B. Macrolide resistance. *Drug Resist Updat.* 1998;1(1):29-41. doi:10.1016/s1368-7646(98)80212-4.
- [204] Weisblum B. Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(4):797-805. doi:10.1128/aac.39.4.797.
- [205] Brenciani A, Bacciaglia A, Vecchi M, et al. Genetic elements carrying erm(B) in *Streptococcus pyogenes* and association with tet(M) tetracycline resistance gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1209-16. doi:10.1128/aac.01484-06.
- [206] Giovanetti E, Magi G, Brenciani A, et al. Conjugative transfer of the erm(A) gene from erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* to macrolide-susceptible *S. pyogenes*,

- Enterococcus faecalis* and *Listeria innocua*. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50(2):249-52. doi:10.1093/jac/dkf122.
- [207] Giovanetti E, Brenciani A, Lupidi R, et al. Presence of the tet(O) Gene in Erythromycin- and Tetracycline-Resistant Strains of *Streptococcus pyogenes* and Linkage with either the mef(A) or the erm(A) Gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(9):2844-9. doi:10.1128/aac.47.9.2844-2849.2003.
- [208] Sutcliffe J, Tait-Kamradt A, Wondrack L. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(8):1817-24.
- [209] Clancy J, Petitpas J, Dib-Hajj F, et al. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, mefA, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol.* 1996;22(5):867-79. doi:10.1046/j.1365-2958.1996.01521.x.
- [210] Tait-Kamradt A, Clancy J, Cronan M, et al. mefE is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(10):2251-5.
- [211] Blackman Northwood J, Del Grosso M, Cossins LR, et al. Characterization of Macrolide Efflux Pump mef Subclasses Detected in Clinical Isolates of *Streptococcus pyogenes* Isolated between 1999 and 2005. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(5):1921-5. doi:10.1128/aac.01065-08.
- [212] Del Grosso M, Iannelli F, Messina C, et al. Macrolide Efflux Genes mef(A) and mef(E) Are Carried by Different Genetic Elements in *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):774-8. doi:10.1128/jcm.40.3.774-778.2002.
- [213] Del Grosso M, Camilli R, Barbabella G, et al. Genetic Resistance Elements Carrying mef Subclasses Other than mef(A) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(7):3226-30. doi:10.1128/aac.01713-10.
- [214] Sangvik M, Littauer P, Simonsen GS, et al. mef(A), mef(E) and a new mef allele in macrolide-resistant *Streptococcus* spp. isolates from Norway. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(5):841-6. doi:10.1093/jac/dki327.
- [215] Banks DJ, Porcella SF, Barbian KD, et al. Structure and Distribution of an Unusual Chimeric Genetic Element Encoding Macrolide Resistance in Phylogenetically Diverse Clones of Group A *Streptococcus*. *J Infect Dis.* 2003;188(12):1898-908. doi:10.1086/379897.



- [216] Kataja J, Huovinen P, Skurnik M, Seppälä H. Erythromycin resistance genes in group A streptococci in Finland. The Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(1):48-52.
- [217] Bingen E, Leclercq R, Fitoussi F, et al. Emergence of Group A Streptococcus Strains with Different Mechanisms of Macrolide Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(5):1199-203. doi:10.1128/aac.46.5.1199-1203.2002.
- [218] Megged O, Assous M, Weinberg G, Schlesinger Y. Inducible clindamycin resistance in  $\beta$ -hemolytic streptococci and *Streptococcus pneumoniae*. *Isr Med Assoc J.* 2013;15(1):27-30.
- [219] Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence.* 2012;3(5):421-569. doi:10.4161/viru.21282.
- [220] Sundlov JA, Gulick AM. Insights into Resistance against Lincosamide Antibiotics. *Structure.* 2009;17(12):1549-50. doi:10.1016/j.str.2009.11.001.
- [221] Argoudelis AD, Coats JH, Mizesak SA. Microbial transformation of antibiotics clindamycin ribonucleotides. *J Antibiot.* 1977;30(6):474-87. doi:10.7164/antibiotics.30.474.
- [222] Marshall VP, Liggett WF, Ciadella JI. Enzymic inactivation of lincosaminide and macrolide antibiotics: Divalent metal cation and coenzyme specificities. *J Antibiot.* 1989;42(5):826-30. doi:10.7164/antibiotics.42.826.
- [223] Devriese LA. Two new types of resistance to lincomycin in pathogenic staphylococci from animals. *Ann Microbiol (Paris).* 1980;131B(3):261-6.
- [224] Dutta GN, Devriese LA. Degradation of macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotics by *Lactobacillus* strains from animals. *Ann Microbiol (Paris).* 1981;132A(1):51-7.
- [225] Dutta GN, Devriese LA. Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics and degradation of lincosamide antibiotics in streptococci from bovine mastitis. *J Antimicrob Chemother.* 1982;10(5):403-8. doi:10.1093/jac/10.5.403.
- [226] Leclercq R, Brisson-Noel A, Duval J, Courvalin P. Phenotypic expression and genetic heterogeneity of lincosamide inactivation in *Staphylococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31(12):1887-91. doi:10.1128/aac.31.12.1887.
- [227] Bozdogan B, Berrezouga L, Kuo MS, et al. A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(4):925-9.

- [228] Brisson-Noël A, Courvalin P. Nucleotide sequence of gene *linA* encoding resistance to lincosamides in *Staphylococcus haemolyticus*. *Gene*. 1986;43(3):247-53. doi:10.1016/0378-1119(86)90213-1.
- [229] Brisson-Noël A, Delrieu P, Samain D, Courvalin P. Inactivation of lincosaminide antibiotics in *Staphylococcus*. Identification of lincosaminide O-nucleotidyltransferases and comparison of the corresponding resistance genes. *J Biol Chem*. 1988;263(31):15880-7.
- [230] Heir E, Lindstedt BA, Leegaard TM, et al. Prevalence and characterization of integrons in blood culture Enterobacteriaceae and gastrointestinal *Escherichia coli* in Norway and reporting of a novel class 1 integron-located lincosamide resistance gene. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2004;3:12. doi:10.1186/1476-0711-3-12.
- [231] Wang J, Shoemaker NB, Wang GR, Salyers AA. Characterization of a *Bacteroides mobilizable* transposon, NBU2, which carries a functional lincomycin resistance gene. *J Bacteriol*. 2000;182(12):3559-71.
- [232] de Azavedo JC, McGavin M, Duncan C, et al. Prevalence and Mechanisms of Macrolide Resistance in Invasive and Noninvasive Group B *Streptococcus* Isolates from Ontario, Canada. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(12):3504-8. doi:10.1128/aac.45.12.3504-3508.2001.
- [233] McGehee RFR, Barre FF, Finland M. Resistance of *Staphylococcus aureus* to lincomycin, clindamycin, and erythromycin. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)*. 1968;8:392-7.
- [234] Juyal D, Shamanth AS, Pal S, et al. The Prevalence of Inducible Clindamycin Resistance Among *Staphylococci* in a Tertiary Care Hospital - A Study from the Garhwal Hills of Uttarakhand, India. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(1):61-5. doi:10.7860/jcdr/2012/4877.2671.
- [235] Gadepalli R, Dhawan B, Mohanty S, et al. Inducible clindamycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Indian J Med Res*. 2006;123(4):571-3.
- [236] Mallick SK, Basak S, Bose S. Inducible Clindamycin Resistance In *Staphylococcus Aureus*-A Therapeutic Challenge. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2009;3:1513-8.
- [237] Weisblum B, Demohn V. Erythromycin-inducible resistance in *Staphylococcus aureus*: survey of antibiotic classes involved. *J Bacteriol*. 1969;98(2):447-52.
- [238] Schmitz FJ, Petridou J, Fluit AC, et al. Distribution of Macrolide-Resistance Genes in *Staphylococcus aureus* Blood-Culture Isolates from Fifteen German University

- Hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19(5):385-7. doi:10.1007/s100960050500.
- [239] Levin TP, Suh B, Axelrod P, et al. Potential Clindamycin Resistance in Clindamycin-Susceptible, Erythromycin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Report of a Clinical Failure. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(3):1222-4. doi:10.1128/aac.49.3.1222-1224.2005.
- [240] Steward CD, Raney PM, Morrell AK, et al. Testing for Induction of Clindamycin Resistance in Erythromycin-Resistant Isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(4):1716-21. doi:10.1128/jcm.43.4.1716-1721.2005.
- [241] Jorgensen JH, Crawford SA, McElmeel MI, Fiebelkorn KR. Detection of Inducible Clindamycin Resistance of *Staphylococci* in Conjunction with Performance of Automated Broth Susceptibility Testing. *J Clin Microbiol.* 2004;42(4):1800-2. doi:10.1128/jcm.42.4.1800-1802.2004.
- [242] Pal N, Sharma B, Sharma R, Vyas L. Detection of inducible clindamycin resistance among *Staphylococcal* isolates from different clinical specimens in western India. *J Postgrad Med.* 2010;56(3):182-5. doi:10.4103/0022-3859.68637.
- [243] Goyal R, Singh NP, Manchanda V, Mathur M. Detection of clindamycin susceptibility in macrolide resistant phenotypes of *Staphylococcus aureus*. *Indian J Med Microbiol.* 2004;22(4):251-4.
- [244] O'Sullivan MV, Cai Y, Kong F, et al. Influence of disk separation distance on accuracy of the disk approximation test for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol.* 2006;44(11):4072-6. doi:10.1128/JCM.01632-06.
- [245] Drinkovic D, Fuller ER, Shore KP, et al. Clindamycin treatment of *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(2):315-6. doi:10.1093/jac/48.2.315.
- [246] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth informational supplement. CLSI Document M100-S17. Wayne, PA. 2007;27.
- [247] Deotale V, Mendiratta DK, Raut U, Narang P. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. *Indian J Med Microbiol.* 2010;28(2):124-6. doi:10.4103/0255-0857.62488.
- [248] Ananthanarayan R, Paniker CKJ. *Staphylococcus*. In: Text book of Microbiology. 8th Edn. Hyderabad, India: Universities Press; 2009.

- 
- [249] Nasrin N, Asaduzzaman M, Mowla R, et al. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of optochin resistant *Streptococcus pneumoniae*. *J Pharm Res.* 2012;5(2):939-42.
- [250] Kamlage B. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR, eds. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1996. doi:10.1002/food.19960400226.
- [251] Facklam R. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(4):613-30. doi:10.1128/cmr.15.4.613-630.2002.
- [252] Malhotra-Kumar S, Wang S, Lammens C, et al. Bacitracin-Resistant Clone of *Streptococcus pyogenes* Isolated from Pharyngitis Patients in Belgium. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):5282-4. doi:10.1128/jcm.41.11.5282-5284.2003.
- [253] Mihaila-Amrouche L, Bouvet A, Loubinoux J. Clonal Spread of emm Type 28 Isolates of *Streptococcus pyogenes* That Are Multiresistant to Antibiotics. *J Clin Microbiol.* 2004;42(8):3844-6. doi:10.1128/jcm.42.8.3844-3846.2004.
- [254] Perez-Trallero E, Garcia C, Orden B, et al. Dissemination of emm28 erythromycin-, clindamycin- and bacitracin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23(2):123-6. doi:10.1007/s10096-003-1069-1.
- [255] Gupta V, Datta P, Rani H, Chander J. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus*: a study from North India. *J Postgrad Med.* 2009;55(3):176-9. doi:10.4103/0022-3859.57393.
- [256] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI Document M100-S22, M2-7 and M-7. Wayne, PA. 2012. Guidelines for streptococcus spp,  $\beta$ -hemolytic group 2012.
- [257] Boutiba-Ben Boubaker I, Ben Abbes R, Ben Abdallah H, et al. Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the routine detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(8):762-5.
- [258] Steward CD, Raney PM, Morrell AK, et al. Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(4):1716-21. doi:10.1128/JCM.43.4.1716-1721.2005.
- [259] Rizzotti L, Simeoni D, Coconcelli P, et al. Contribution of enterococci to the spread of antibiotic resistance in the production chain of swine meat commodities. *J Food Prot.* 2005;68(5):955-65.

- [260] Matsuoka M, Jánosi L, Endou K, Nakajima Y. Cloning and sequences of inducible and constitutive macrolide resistance genes in *Staphylococcus aureus* that correspond to an ABC transporter. *FEMS Microbiology Letters*. 1999;181:91-100. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb08830.x.
- [261] Seo YS, Srinivasan U, Oh K-Y, et al. Changing Molecular Epidemiology of Group B *Streptococcus* in Korea. *J Korean Med Sci*. 2010;25(6):817-23. doi:10.3346/jkms.2010.25.6.817.
- [262] Lozano C, Aspiroz C, Sáenz Y, et al. Genetic environment and location of the *lnu(A)* and *lnu(B)* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci of animal and human origin. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(12):2804-8. doi:10.1093/jac/dks320.
- [263] MedCalc. Free statistical calculators: Diagnostic test evaluation calculator. [https://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php). Приступљено 28. 11. 2017.
- [264] Cohen ML. Changing patterns of infectious disease. *Nature*. 2000;406(6797):762-7. doi:10.1038/35021206.
- [265] Moellering RC. Linezolid: the first oxazolidinone antimicrobial. *Ann Intern Med*. 2003;138(2):135-42.
- [266] Tenover FC, Hughes JM. The challenges of emerging infectious diseases. Development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens. *JAMA*. 1996;275(4):300-4.
- [267] Williams JD. Antibiotic resistance in hospital pathogens--acquisition or spread? *Int J Antimicrob Agents*. 2001;18(3):295-8.
- [268] Jones RN. Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years. *Chest*. 2001;119(2 Suppl):397S-404S.
- [269] Lieberman JM. Appropriate antibiotic use and why it is important: the challenges of bacterial resistance. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22(12):1143-51. doi:10.1097/01.inf.0000101851.57263.63.
- [270] Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science*. 1992;257(5073):1050-5.
- [271] Levy SB. Antibiotic resistance: consequences of inaction. *Clin Infect Dis*. 2001;33(Suppl 3):S124-9. doi:10.1086/321837.
- [272] World Health Organization. Antibiotic resistance: Key facts. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>. Ажурирано новембра 2017. Приступљено 28. 11. 2017.

- [273] Centers for Disease Control and Prevention. Facts about Antibiotic Resistance. <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/community/about/fast-facts.html>. Ажурирано 22. 12. 2016. Приступљено 28. 11. 2017.
- [274] Cars O, Mölsted S, Melander A. Variation in antibiotic use in the European Union. *Lancet*. 2001;357(9271):1851-3. doi:10.1016/S0140-6736(00)04972-2.
- [275] Ball P, Vaquero F, Cars O, et al. Antibiotic therapy of community respiratory tract infections: strategies for optimal outcomes and minimized resistance emergence. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49(1):31-40.
- [276] World Health Organization. Antimicrobial resistance global report on surveillance : 2014 summary. WHO/HSE/PED/AIP/2014.2. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112647/1/WHO\\_HSE\\_PED\\_AIP\\_2014.2\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112647/1/WHO_HSE_PED_AIP_2014.2_eng.pdf). Публиковано 2014. Приступљено 28. 11. 2017.
- [277] Normark BH, Normark S. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med*. 2002;252(2):91-106.
- [278] Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*. 1994;264(5157):375-82.
- [279] Hawkey PM. Mechanisms of resistance to antibiotics. *Intensive Care Med*. 2000;26(Suppl 1):S9-13.
- [280] Healy CM, Hulten KG, Palazzi DL, et al. Emergence of new strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. *Clin Infect Dis*. 2004;39(10):1460-6. doi:10.1086/425321.
- [281] World Health Organization. Overcoming antimicrobial resistance. WHO/CDS/2000.2. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66672/1/WHO\\_CDS\\_2000.2.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66672/1/WHO_CDS_2000.2.pdf). Публиковано 2000. Приступљено 28. 11. 2017.
- [282] Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*. 1994;7(1):117-40.
- [283] Huebner J, Goldmann DA. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu Rev Med*. 1999;50:223-36. doi:10.1146/annurev.med.50.1.223.
- [284] Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(4):870-926. doi:10.1128/CMR.00109-13.
- [285] Mokta KK, Verma S, Chauhan D, et al. Inducible Clindamycin Resistance among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* from Sub Himalayan Region of India. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(8):DC20-3. doi:10.7860/JCDR/2015/13846.6382.

- [286] Mahesh CB, Ramakant BK, Jagadeesh VS. The Prevalence of Inducible and Constitutive Clindamycin Resistance Among the Nasal Isolates of Staphylococci. *J Clin Diagn Res.* 2013;7(8):1620-2. doi:10.7860/JCDR/2013/6378.3223.
- [287] Schreckenberger PC, Ilendo E, Ristow KL. Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in a community and a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol.* 2004;42(6):2777-9. doi:10.1128/JCM.42.6.2777-2779.2004.
- [288] Duran N, Ozer B, Duran GG, et al. Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci. *Indian J Med Res.* 2012;135:389-96.
- [289] Lewis JS 2nd, Jorgensen JH. Inducible clindamycin resistance in Staphylococci: should clinicians and microbiologists be concerned? *Clin Infect Dis.* 2005;40(2):280-5. doi:10.1086/426894.
- [290] Castro-Alarcón N, Ribas-Aparicio RM, Silva-Sánchez J, et al. Molecular typing and characterization of macrolide, lincosamide and streptogramin resistance in *Staphylococcus epidermidis* strains isolated in a Mexican hospital. *J Med Microbiol.* 2011;60(Pt 6):730-6. doi:10.1099/jmm.0.027847-0.
- [291] Sasirekha B, Usha MS, Amruta JA, et al. Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance among hospital-associated *Staphylococcus aureus*. *3 Biotech.* 2014;4(1):85-9. doi: 10.1007/s13205-013-0133-5.
- [292] Rahbar M, Mohammad-Zadeh M, Asl HM, et al. Detection prevalence of inducible clindamycin resistance in Coagulase-Negative Staphylococci (CoNS) isolates in an Iranian 1000-bed tertiary Care Hospital Using D Test. *HealthMed.* 2012;6(8):2642-6.
- [293] Kumar S, Umadevi S, Joseph N, et al. Detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci - a study from South India. *Internet J Microbiol.* 2011;9(2).
- [294] Lall M, Sahni AK. Prevalence of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. *Med J Armed Forces India.* 2014;70(1):43-7. doi:10.1016/j.mjafi.2013.01.004.
- [295] Ikeda-Dantsuji Y, Hanaki H, Nakae T, et al. Emergence of Linezolid-Resistant Mutants in a Susceptible-Cell Population of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(5):2466-8. doi:10.1128/aac.01548-10.
- [296] Lim HS, Lee H, Roh KH, et al. Prevalence of Inducible Clindamycin Resistance in Staphylococcal Isolates at a Korean Tertiary Care Hospital. *Yonsei Med J.* 2006;47(4):480-4. doi:10.3349/ymj.2006.47.4.480.

- [297] Dubey D, Rath S, Sahu MC, et al. A report on infection dynamics of inducible clindamycin resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from a teaching hospital in India. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2013;3(2):148-53. doi:10.1016/S2221-1691(13)60040-4.
- [298] Eksi F, Gayyurhan ED, Bayram A, Karşlıgil T. Determination of antimicrobial susceptibility patterns and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* strains recovered from southeastern Turkey. *J Microbiol Immunol Infect.* 2011;44(1):57-62. doi:10.1016/j.jmii.2011.01.011.
- [299] Aktas Z, Arıdoğan A, Kayacan CB, Aydın D. Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in staphylococci isolated in Istanbul, Turkey. *J Microbiol.* 2007;45(4):286-90.
- [300] Moosavian M, Shoja S, Rostami S, et al. Inducible clindamycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to *erm* genes, Iran. *Iran J Microbiol.* 2014;6(6):421-7.
- [301] Hamilton-Miller JM, Shah S. Patterns of phenotypic resistance to the macrolide-lincosamide-ketolide-streptogramin group of antibiotics in staphylococci. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46(6):941-9.
- [302] Bansal N, Chaudhary U, Gupta V. Prevalence of inducible clindamycin resistance in clinical isolates of coagulase negative staphylococci at a tertiary care hospital. *Ann Trop Med Public Health.* 2012;5(5):427-30. doi:10.4103/1755-6783.105124.
- [303] Ajantha GS, Kulkarni RD, Shetty J, et al. Phenotypic detection of inducible clindamycin resistance among *Staphylococcus aureus* isolates by using the lower limit of recommended inter-disk distance. *Indian J Pathol Microbiol.* 2008;51(3):376-8.
- [304] Tekin A, Dal T, Deveci O, et al. Assessment of methicillin and clindamycin resistance patterns in *Staphylococcus aureus* isolated from a tertiary hospital in Turkey. *Infez Med.* 2013;21(2):111-6.
- [305] Fasih N, Irfan S, Zafar A, et al. Inducible clindamycin resistance due to expression of *erm* genes in *Staphylococcus aureus*: report from a tertiary care Hospital Karachi, Pakistan. *J Pak Med Assoc.* 2010;60(9):750-3.
- [306] Fokas S, Fokas S, Tsironi M, et al. Prevalence of inducible clindamycin resistance in macrolide-resistant *Staphylococcus* spp. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(4):337-40. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01101.x.



- [307] Aleksandra AD, Misić MS, Mira ZV, et al. Prevalence of inducible clindamycin resistance among community-associated staphylococcal isolates in central Serbia. *Indian J Med Microbiol.* 2014;32(1):49-52. doi:10.4103/0255-0857.124304.
- [308] Seifi N, Kahani N, Askari E, et al. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from Mashhad, Iran. *Iran J Microbiol.* 2012;4(2):82-6.
- [309] Zachariah R, Basireddy S, Kabra V, et al. Phenotypic characterization of macrolide and lincosamide resistance patterns in clinical isolates of staphylococci. *J NTR Univ Health Sci.* 2016;5(3):187-91. doi:10.4103/2277-8632.191847.
- [310] Lenart-Boroń A, Wolny-Kołodka K, Stec J, Kasprowic A. Phenotypic and Molecular Antibiotic Resistance Determination of Airborne Coagulase Negative *Staphylococcus* spp. Strains from Healthcare Facilities in Southern Poland. *Microb Drug Resist.* 2016;22(7):515-22. doi:10.1089/mdr.2015.0271.
- [311] Goudarzi G, Tahmasbi F, Anbari K, Ghafarzadeh M. Distribution of Genes Encoding Resistance to Macrolides Among *Staphylococci* Isolated From the Nasal Cavity of Hospital Employees in Khorramabad, Iran. *Iran Red Crescent Med J.* 2016;18(2):e25701. doi:10.5812/ircmj.25701.
- [312] Juda M, Chudzik-Rzad B, Malm A. The prevalence of genotypes that determine resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins B compared with spiramycin susceptibility among erythromycin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111(3):155-60. doi:10.1590/0074-02760150356.
- [313] Coutinho Vde L, Paiva RM, Reiter KC, et al. Distribution of *erm* genes and low prevalence of inducible resistance to clindamycin among staphylococci isolates. *Braz J Infect Dis.* 2010;14(6):564-8.
- [314] Kamimiya S, Weisblum B. Induction of *ermSV* by 16-membered-ring macrolide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(3):530-4.
- [315] Deng F, Wang H, Liao Y, et al. Detection and Genetic Environment of Pleuromutilin-Lincosamide-Streptogramin A Resistance Genes in *Staphylococci* Isolated from Pets. *Front Microbiol.* 2017;8:234. doi:10.3389/fmicb.2017.00234.
- [316] Aydeniz Ozansoy F, Cevahir N, Kaleli İ. [Investigation of macrolide, lincosamide and streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples by phenotypical and genotypical methods]. *Mikrobiyol Bul.* 2015;49(1):1-14.
- [317] Faccone D, Togneri AM, Podesta L, et al. MRSA Pediatric clone expressing *ermC* plus *lnuA* genes causing nosocomial transmission and healthcare workers colonization in a

- neonatal intensive care unit. *Infect Genet Evol.* 2014;25:78-80. doi:10.1016/j.meegid.2014.04.005.
- [318] Szczuka E, Makowska N, Bosacka K, et al. Molecular basis of resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins in *Staphylococcus hominis* strains isolated from clinical specimens. *Folia Microbiol (Praha)*. 2016;61:143-147. doi:10.1007/s12223-015-0419-6.
- [319] Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Bakhrouf A. Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Notes*. 2011;4:453. doi:10.1186/1756-0500-4-453.
- [320] Cetin ES, Gunes H, Kaya S, et al. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among clinical staphylococcal isolates in a Turkish university hospital. *J Microbiol Immunol Infect.* 2010;43(6):524-9. doi:10.1016/S1684-1182(10)60081-3.
- [321] Novotna G, Adamkova V, Janata J, et al. Prevalence of resistance mechanisms against macrolides and lincosamides in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the Czech Republic and occurrence of an undefined mechanism of resistance to lincosamides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(8):3586-9. doi:10.1128/AAC.49.8.3586-3589.2005.
- [322] Ojo KK, Striplin MJ, Ulep CC, et al. *Staphylococcus* efflux *msr(A)* gene characterized in *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, and *Pseudomonas* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(3):1089-91. doi:10.1128/AAC.50.3.1089-1091.2006.
- [323] Westh H, Hougaard DM, Vuust J, Rosdahl VT. *erm* genes in erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *APMIS*. 1995;103(3):225-32.
- [324] Bouchami O, Achour W, Ben Hassen A. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates from neutropenic patients in Tunisia. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(1):103-6. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01567.x.
- [325] Lina G, Quaglia A, Reverdy M-E, et al. Distribution of Genes Encoding Resistance to Macrolides, Lincosamides, and Streptogramins among Staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(5):1062-6.

- [326] Ghanbari F, Ghajavand H, Havaei R, et al. Distribution of erm genes among *Staphylococcus aureus* isolates with inducible resistance to clindamycin in Isfahan, Iran. *Adv Biomed Res.* 2016;5:62. doi:10.4103/2277-9175.179184.
- [327] Saderi H, Emadi B, Owlia P. Phenotypic and genotypic study of macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLSB) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *Med Sci Monit.* 2011;17(2):BR48-53.
- [328] Pereira JN, Rabelo MA, Lima JL, et al. Phenotypic and molecular characterization of resistance to macrolides, lincosamides and type B streptogramin of clinical isolates of *Staphylococcus* spp. of a university hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2016;20(3):276-81. doi:10.1016/j.bjid.2016.03.003.
- [329] Hosseini SS, Niakan M, Saderi H, et al. Frequency of genes encoding erythromycin ribosomal methylases among *Staphylococcus aureus* clinical isolates with different D-phenotypes in Tehran, Iran. *Iran J Microbiol.* 2016;8(3):161-7.
- [330] Sarrou S, Liakopoulos A, Chasioti M, et al. Dissemination of Methicillin-Susceptible CC398 *Staphylococcus aureus* strains in a rural Greek area. *PLoS One.* 2015;10(4):e0122761. doi:10.1371/journal.pone.0122761.
- [331] Sarrou S, Liakopoulos A, Tsoumani K, et al. Characterization of a Novel lsa(E)- and lnu(B)-Carrying Structure Located in the Chromosome of a *Staphylococcus aureus* Sequence Type 398 Strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(2):1164-6. doi:10.1128/AAC.01178-15.
- [332] Montilla A, Zavala A, Cáceres Cáceres R, et al. Genetic environment of the lnu(B) gene in a *Streptococcus agalactiae* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(9):5636-7. doi:10.1128/AAC.02630-14.
- [333] Li XS, Dong WC, Wang XM, et al. Presence and genetic environment of pleuromutilin-lincosamide-streptogramin A resistance gene lsa(E) in enterococci of human and swine origin. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(5):1424-6. doi:10.1093/jac/dkt502.
- [334] Fenoll A, Aguilar L, Robledo O, et al. Influence of the beta-lactam resistance phenotype on the cefuroxime versus cefditoren susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* recovered from children with acute otitis media. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(2):323-7. doi:10.1093/jac/dkm209.
- [335] Fuchs PC, Barry AL, Brown SD. Susceptibility of multi-resistant *Streptococcus pneumoniae* to ciprofloxacin, ofloxacin and levofloxacin. *J Antimicrob Chemother.* 1997;39(5):671-2.

- [336] Zhanel GG, Karlowsky JA, Palatnick L, et al. Prevalence of antimicrobial resistance in respiratory tract isolates of *Streptococcus pneumoniae*: results of a Canadian national surveillance study. The Canadian Respiratory Infection Study Group. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(10):2504-9.
- [337] Dagan R, Yagupsky P, Goldbart A, et al. Increasing prevalence of penicillin-resistant pneumococcal infections in children in southern Israel: implications for future immunization policies. *Pediatr Infect Dis J.* 1994; 13(9):782-6.
- [338] Hoban DJ, Doern GV, Fluit AC, et al. Worldwide prevalence of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis.* 2001;32(Suppl 2):S81-93. doi:10.1086/320181.
- [339] Taha N, Araj GF, Wakim RH, et al. Genotypes and serotype distribution of macrolide resistant invasive and non- invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Lebanon. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2012;11:2. doi:10.1186/1476-0711-11-2.
- [340] SENTRY Participants Group (Latin America), Gales A, Sader H, Jones RN. Activities of BMS 284756 (T-3811) against *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, and *Streptococcus pneumoniae* Isolates from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Medical Centers in Latin America (1999). *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(5):1463-6. doi:10.1128/AAC.45.5.1463-1466.2001.
- [341] Reinert RR, Filimonova OY, Al-Lahham A, et al. Mechanisms of Macrolide Resistance among *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Russia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(6):2260-2. doi:10.1128/AAC.01270-07.
- [342] Monaco M, Camilli R, D'Ambrosio F, et al. Evolution of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Italy. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(2):256-9. doi:10.1093/jac/dkh551.
- [343] Gajić I, Mijač V, Opavski N, et al. Distribution of macrolide-resistant genes among isolates of macrolideresistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* in Serbia. *Arch Biol Sci.* 2014;66(1):93-8. doi:10.2298/ABS1401093G.
- [344] Hadnađev M, Gajić I, Mijač V, et al. Phenotypes and genotypes of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Serbia. *Arch Biol Sci.* 2014;66(1):99-105. doi:10.2298/ABS1401099H.
- [345] Gajić I, Opavski N, Mijač V, Ranin L. Macrolide-resistant phenotypes of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Serbia. *Arch Biol Sci.* 2012;64(4):1377-82. doi:10.2298/ABS1204377G.

- [346] Efstratiou A. Group A streptococci in the 1990s. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45(Suppl):3-12.
- [347] Camara M, Dieng A, Boye CS. Antibiotic susceptibility of streptococcus pyogenes isolated from respiratory tract infections in dakar, senegal. *Microbiol Insights.* 2013; 6:71–75. doi:10.4137/MBI.S12996.
- [348] Imöhl M, van der Linden M. Antimicrobial Susceptibility of Invasive Streptococcus pyogenes Isolates in Germany during 2003-2013. *PLoS ONE* 2015; 10(9):e0137313. doi.org/10.1371/journal.pone.0137313.
- [349] Köller T, Manetti AG, Kreikemeyer B, et al. Typing of the pilus-protein-encoding FCT region and biofilm formation as novel parameters in epidemiological investigations of Streptococcus pyogenes isolates from various infection sites. *J Med Microbiol.* 2010;59(Pt 4):442-52. doi:10.1099/jmm.0.013581-0.
- [350] Bae SY, Kim JS, Kwon JA, et al. Phenotypes and genotypes of macrolide-resistant Streptococcus pyogenes isolated in Seoul, Korea. *J Med Microbiol.* 2007;56(Pt 2):229-35. doi:10.1099/jmm.0.46825-0.
- [351] Savoia D, Avanzini C, Bosio K, et al. Macrolide resistance in group A streptococci. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45(1):41-7. doi:10.1093/jac/45.1.41.
- [352] Malbruny B, Nagai K, Coquemont M, et al. Resistance to macrolides in clinical isolates of Streptococcus pyogenes due to ribosomal mutations. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49(6):935-9.
- [353] Catalanotti P, Catania MR, Lucido M, et al. T serotyping and genomic profile of erythromycin-resistant or -sensitive Streptococcus pyogenes isolated in Campania Region, Italy. *J Chemother.* 2005;17(2):131-7. doi:10.1179/joc.2005.17.2.131.
- [354] Shibl AM. Patterns of macrolide resistance determinants among S. pyogenes and S. pneumoniae isolates in Saudi Arabia. *J Int Med Res.* 2005;33(3):349-55. doi:10.1177/147323000503300310.
- [355] Pavlovic L, Grego E, Sipetic-Grujicic S. Prevalence of macrolide resistance in Streptococcus pyogenes collected in Serbia. *Jpn J Infect Dis.* 2010;63(4):275-6.
- [356] Bingen E, Fitoussi F, Doit C, et al. Resistance to macrolides in Streptococcus pyogenes in France in pediatric patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(6):1453-7.
- [357] Gattringer R, Sauermann R, Lagler H, et al. Antimicrobial susceptibility and macrolide resistance genes in Streptococcus pyogenes collected in Austria and Hungary. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;24(3):290-3. doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.01.009.

- [358] Sauermann R, Gattringer R, Graninger W, et al. Phenotypes of macrolide resistance of group A streptococci isolated from outpatients in Bavaria and susceptibility to 16 antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(1):53-7.
- [359] Petinaki E, Kontos F, Pratti A, et al. Clinical isolates of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* in Central Greece. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;21(1):67-70.
- [360] Alós JI, Aracil B, Oteo J, et al. High prevalence of erythromycin-resistant, clindamycin/miocomycin-susceptible (M phenotype) *Streptococcus pyogenes*: results of a Spanish multicentre study in 1998. Spanish Group for the Study of Infection in the Primary Health Care Setting. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45(5):605-9.
- [361] Feng L, Lin H, Ma Y, et al. Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* from Chinese pediatric patients in association with Tn916 transposons family over a 16-year period. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;67(4):369-75. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.03.014.
- [362] Liu X, Shen X, Chang H, et al. High macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* strains isolated from children with pharyngitis in China. *Pediatr Pulmonol.* 2009;44(5):436-41. doi:10.1002/ppul.20976.
- [363] Sasan M-S, Zanjan FR, Birjandi B, et al. Extremely High Prevalence of Erythromycin Resistance of Group A Beta Hemolytic Streptococci in Mashhad (Iran). *Iran J Pediatr.* 2011;21(1):126-127.
- [364] Mazzariol A, Koncan R, Bahar G, Cornaglia G. Susceptibilities of *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* to macrolides and telithromycin: data from an Italian multicenter study. *J Chemother.* 2007;19(5):500-7. doi:10.1179/joc.2007.19.5.500.
- [365] Mazzariol A, Koncan R, Vitali LA, Cornaglia G. Activities of 16-membered ring macrolides and telithromycin against different genotypes of erythromycin-susceptible and erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(6):1171-6. doi:10.1093/jac/dkm089.
- [366] Villaseñor-Sierra A, Katahira E, Jaramillo-Valdivia AN, et al. Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains isolated from invasive and non-invasive infections from Mexico and the USA during 1999-2010. *Int J Infect Dis.* 2012;16(3):e178-81. doi:10.1016/j.ijid.2011.11.005.
- [367] Zavadzka D, Bērziņa D, Drukaļska L, et al. Macrolide resistance in group A beta haemolytic *Streptococcus* isolated from outpatient children in Latvia. *APMIS.* 2010;118(5):366-70. doi:10.1111/j.1600-0463.2010.02607.x.

- [368] Banche G, Roana J, Allizond V, et al. In vitro compared activity of telithromycin and azithromycin against northwest Italian isolates of *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* with different erythromycin susceptibility. *Lett Appl Microbiol.* 2008;47(4):309-14. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02423.x.
- [369] Martínez S, Amoroso AM, Famiglietti A, et al. Genetic and phenotypic characterization of resistance to macrolides in *Streptococcus pyogenes* from Argentina. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;23(1):95-8.
- [370] Barkema HW, Green MJ, Bradley AJ, Zadoks RN. Invited review: The role of contagious disease in udder health. *J Dairy Sci.* 2009;92(10):4717-29. doi:10.3168/jds.2009-2347.
- [371] Hays C, Louis M, Plainvert C, et al. Changing Epidemiology of Group B *Streptococcus* Susceptibility to Fluoroquinolones and Aminoglycosides in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(12):7424-30. doi: 10.1128/AAC.01374-16.
- [372] Simoni S, Vincenzi C, Brenciani A, et al. Molecular Characterization of Italian Isolates of Fluoroquinolone-Resistant *Streptococcus agalactiae* and Relationships with Chloramphenicol Resistance. *Microb Drug Resist.* 2018;24(3):225-31. doi: 10.1089/mdr.2017.0139. Epub 2017 Aug 7.
- [373] Figueira-Coelho J, Ramirez M, Salgado MJ, Melo-Cristino J. *Streptococcus agalactiae* in a large Portuguese teaching hospital: antimicrobial susceptibility, serotype distribution, and clonal analysis of macrolide-resistant isolates. *Microb Drug Resist.* 2004;10(1):31-6. doi:10.1089/107662904323047772.
- [374] Emaneini M, Mirsalehian A, Beigvierdi R, et al. High Incidence of Macrolide and Tetracycline Resistance among *Streptococcus Agalactiae* Strains Isolated from Clinical Samples in Tehran, Iran. *Maedica (Buchar).* 2014;9(2):157-61.
- [375] Hsueh PR, Teng LJ, Lee LN, et al. High incidence of erythromycin resistance among clinical isolates of *Streptococcus agalactiae* in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(11):3205-8. doi:10.1128/AAC.45.11.3205-3208.2001.
- [376] Capraro GA, Rambin ED, Vanchiere JA, et al. High rates of inducible clindamycin resistance among prenatal group B streptococcal isolates in one northwest Louisiana academic medical center. *J Clin Microbiol.* 2013;51(7):2469. doi:10.1128/JCM.00279-13.
- [377] Yook J-H, Kim MY, Kim EJ, et al. Risk Factors Associated with Group B *Streptococcus* Resistant to Clindamycin and Erythromycin in Pregnant Korean Women. *Infect Chemother.* 2013;45(3):299-307. doi:10.3947/ic.2013.45.3.299.

- [378] De Francesco MA, Caracciolo S, Gargiulo F, Manca N. Phenotypes, genotypes, serotypes and molecular epidemiology of erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(8):1741-7. doi:10.1007/s10096-011-1495-4.
- [379] Corrêa AB, Silva LG, Pinto Tde C, et al. The genetic diversity and phenotypic characterisation of *Streptococcus agalactiae* isolates from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(8):1002-6.
- [380] Palmeiro JK, Dalla-Costa LM, Fracalanza SEL, et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of Group B Streptococcal Isolates in Southern Brazil. *J Clin Microbiol*. 2010;48(12):4397-403. doi:10.1128/JCM.00419-10.
- [381] Zhou K, Zhu D, Tao Y, et al. New genetic context of *lnu(B)* composed of two multi-resistance gene clusters in clinical *Streptococcus agalactiae* ST-19 strains. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8(117):1-7. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0563-x>.
- [382] Uh Y, Kim HY, Jang IH, et al. Correlation of Serotypes and Genotypes of Macrolide-Resistant *Streptococcus agalactiae*. *Yonsei Med J*. 2005;46(4):480-3. doi:10.3349/yMJ.2005.46.4.480.
- [383] Díaz LM, Sánchez MJT, Aznar MJ. Prevalence and mechanisms of erythromycin and clindamycin resistance in clinical isolates of beta-haemolytic streptococci of Lancefield groups A, B, C and G in Seville, Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(1):85-7. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01881.x.
- [384] Murray BE, Weinstock GM. Enterococci: new aspects of an old organism. *Proc Assoc Am Physicians*. 1999;111(4):328-34.
- [385] Murray BE. The life and times of the Enterococcus. *Clin Microbiol Rev*. 1990;3(1):46-65.
- [386] Bell J, Turnidge J, Coombs G, O'Brien F. Emergence and epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in Australia. *CDI*. 1998; 22(11):249-52.
- [387] El-Kersh TA, Marie MA, Al-Sheikh YA, et al. Prevalence and risk factors of early fecal carriage of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus* spp and their antimicrobial resistant patterns among healthy neonates born in a hospital setting in central Saudi Arabia. *Saudi Med J*. 2016;37(3):280–287. doi:10.15537/smj.2016.3.13871
- [388] Jia W, Li G, Wang W. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species: a hospital-based study in China. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(3):3424-42. doi:10.3390/ijerph110303424.



- [389] Reyes J, Hidalgo M, Díaz L, et al. Characterization of macrolide resistance in Gram-positive cocci from Colombian hospitals: a countrywide surveillance. *Int J Infect Dis.* 2007;11(4):329-36. doi:10.1016/j.ijid.2006.09.005.
- [390] Min YH, Jeong JH, Choi YJ, et al. Heterogeneity of macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(11):3415-20.
- [391] Schmitz FJ, Sadurski R, Kray A, et al. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45(6):891-4.
- [392] Roberts MC. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;282(2):147-59. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01145.x.
- [393] Canu A, Leclercq R. Macrolides and Lincosamides. In: Mayers DL, editor. *Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance.* NJ, USA: Humana Press; 2009. doi:10.1007/978-1-59745-180-2.
- [394] Silva-Costa C, Ramirez M, Melo-Cristino J. Rapid Inversion of the Prevalences of Macrolide Resistance Phenotypes Paralleled by a Diversification of T and emm Types among *Streptococcus pyogenes* in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(5):2109-11. doi:10.1128/AAC.49.5.2109-2111.2005.
- [395] Van Heirstraeten L, Coenen S, Lammens C, et al. Antimicrobial drug use and macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*, Belgium. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(9):1515-8. doi:10.3201/eid1809.120049.
- [396] Hawkins PA, Law CS, Metcalf BJ, et al. Cross-resistance to lincosamides, streptogramins A and pleuromutilins in *Streptococcus agalactiae* isolates from the USA. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(7):1886-92. doi:10.1093/jac/dkx077.
- [397] Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):836-71. doi:10.1128/CMR.14.4.836-871.2001.
- [398] Martineau F, Picard FJ, Lansac N, et al. Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(2):231-8.
- [399] Abdollahi S, Ramazanzadeh R, Khiabani ZD, et al. Molecular Detection of Inducible Clindamycin Resistance among *Staphylococcal* Strains Isolated from Hospital Patients. *J Ardabil Univ Med Sci.* 2013;13(1):59-68.

- 
- [400] Park AK, Kim H, Jin HJ. Phylogenetic analysis of rRNA methyltransferases, Erm and KsgA, as related to antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Lett.* 2010;309(2):151-62. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02031.x.
- [401] Srinivasan U, Miller B, Debusscher J, et al. Identification of a Novel Keyhole Phenotype in Double-Disk Diffusion Assays of Clindamycin-Resistant Erythromycin-Sensitive Strains of *Streptococcus agalactiae*. *Microb Drug Resist.* 2011;17(1):121-4. doi:10.1089/mdr.2010.0040.

## БИОГРАФИЈА

Др Милена Мишић (рођ. Костић) рођена је 17. јула 1973. године у Лесковцу. Основну школу и гимназију завршила је у Врању (као носилац дипломе "Вук Караџић").

Редовне студије уписала је школске 1992/1993. године на Медицинском факултету у Новом Саду и завршила их у октобру 1999. године са просечном оценом 9,15. Државни испит положила је 28. децембра 2000. године.

Специјалистичке студије из области *Микробиологија са паразитологијом* уписала је 17. априла 2002. године на Медицинском факултету у Нишу и завршила их 9. маја 2008. године са оценом *одличан*.

У Здравственом центру у Врању ради као лекар од 1. децембра 1999. године, а 17. априла 2002. започиње специјалистички стаж из области *Микробиологија са паразитологијом* у Заводу за јавно здравље "Врање" у Врању. Као специјалиста микробиологије са паразитологијом ради у истој установи од 9. маја 2008. године.

Магистарске студије из области *Микробиологија и имунологија* уписала је школске 2000/2001. године на Медицинском факултету у Нишу, а академско звање магистра медицинских наука стиче 12. фебруара 2010. године, одбранивши магистарску тезу под насловом *Повезаност бактеријске вагинозе са преанцерозним променама на грлићу материце*.

На Факултету медицинских наука у Крагујевцу, пријавила је докторску тезу под насловом *Дистрибуција фенотипова и гена резистенције на макролиде и линкозамиде код грам-позитивних кока* 2014. године.

Похађала је 6. летњу школу у организацији ЕСЦМИД-а, "6th ESCMID Summer School", организовану у Суђави у Румунији од 1. до 6. јула 2007. године. Том приликом је изабрана да презентује извештај случаја по сопственом избору.

Служи се компјутерским софтвером у Windows окружњу: MS Office (Word, Excel, Power Point, Front Page), користи интернет (Outlook, Internet Explorer) и софтвер за статистичку анализу података (NCSS – PASS).

Говори енглески језик и објављује радове на том језику.

## БИБЛИОГРАФИЈА

### Радови објављени у целини у интернационалним часописима

1. **Mišić M**, Randelović G, Kocić B, Suvajdžić Lj, Hamzić S, Zvizdić Š, Tomić M. Association between bacterial vaginosis and precancerous changes of the cervix. HealthMED Journal. 2011;5(6) Suppl.1:2088-96.
2. Dimitrijević DP, Radić GP, Jevtić VV, **Mišić M**, Baskić D, Trifunović SR. Stereospecific ligands and their complexes. XX. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl esters of ethylenediamine- N , N '-di- S , S - (2,2'-dibenzyl)acetic acid. J Mol Struct. 2014;1071(1):128-32. doi:10.1016/j.molstruc.2014.05.008
3. Aleksandra AD, **Misic MS**, Mira ZV, Violeta NM, Dragana IT, Zoran BM, Dejan VS, Milanko SD, Dejan BD. Prevalence of inducible clindamycin resistance among community-associated staphylococcal isolates in central Serbia. Indian J Med Microbiol. 2014;32:49-52. doi:10.4103/0255-0857.124304
4. **Mišić M**, Arsović A, Čukić J, Rosić MI, Tošić-Pajić J, Manojlović N, Čekerevac I, Vidanović D, Šekler M, Baskić D. The prevalence of resistance to macrolides and lincosamides among community and hospital acquired Staphylococci and Streptococci isolates in southeast Serbia. Srp Arh Celok Lek 2017. Online First November 17, 2017. doi:10.2298/SARH170407197M
5. **Mišić M**, Čukić J, Vidanović D, Šekler M, Matić S, Vukašinović M, Baskić D. Prevalence of Genotypes That Determine Resistance of Staphylococci to Macrolides and Lincosamides in Serbia. Front. Public Health. 2017;5:200. doi:10.3389/fpubh.2017.00200
6. Stojković DLj, Jevtić VV, Vuković N, Vuković M, Potočnak I, Zelen IR, Zarić MM, **Mišić MM**, Baskić D, Kaluđerović GN, Trifunović SR. Crystal and molecular structure of a new palladium(II) complex. J Struct Chem. 2017;58(3):550-7. doi:10.1134/S0022476617030179
7. Stojković DLj, Jevtić VV, Vuković N, Vukić M, Čanović P, Zarić MM, **Mišić MM**, Radovanović DM, Baskić D, Trifunović SR. Synthesis, characterization, antimicrobial and antitumor reactivity of new palladium(II) complexes with methionine and tryptophane coumarine derivatives. J Mol Struct. 2018;1157:425-33.

### **Радови у целини објављени у националним часописима**

1. **Mišić M**, Milić B, Vasić A, Zdravković D, Tasić A, Miladinović Tasić N, Tasić S. Sarcosporidiosis – Medical Importance and Diagnosis. *Acta Medica Medianae*. 2004;43(3):73-6.
2. **Mišić M**, Ranđelović G, Kocić B, Antić S, Stojanović M, Mladenović V. Complications associated with bacterial vaginosis. *Acta. Fac. Med. Naiss*. 2005;22(4):161-5.
3. **Mišić M**, Miladinović Tasić N, Tasić S. Seroincidence of trichinella infection in the Nisava district. *Acta medica Medianae*. 2006;45(4):23-7.
4. Miladinović Tasić N, Tasić S, **Mišić M**. Trichinosis. *Acta. Fac. Med. Naiss*. 2006;23(4):215-22.
5. Ranđelović G, Kocić B, Stojanović M, **Mišić M**, Mladenović V. Bacteriological findings of the vulvar swab specimens from girls with vulvovaginitis. *Facta universitatis*. 2005;12(3):159-63.

### **Презентације на интернационалним конгресима објављене као сажетци**

1. Ranđelović G, Kocić B, Mladenović Antić S, Stojanović P, Mladenović V, **Mišić M**. Surveillance of antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospital samples. The 3<sup>th</sup> Congress of Macedonian Microbiologists, Ohrid, 2006, p45.
2. Tasić S, Miladinović Tasić N, Zdravković D, Tasić A, **Mišić M**. Prevalence of infection by blastocytis hominis parasite. The 3<sup>th</sup> Macedonian Congress of Preventive Medicine, Ohrid, 2006, p136.
3. **Mišić M**, Tasić S, Miladinović-Tasić N, Tasić A, Zdravković D. The 3<sup>th</sup> Macedonian Congress of Preventive Medicine, Ohrid, 2006, p108.

### **Презентације на интернационалним конгресима објављене у целини**

1. Otašević S, Gabrielli S, Tasić A, Miladinović Tasić N, Kocić B, Radosavljević B, **Mišić M**, Đorđević S, Milovanović S, Ćirić M, Cancrini G. The seroprevalence of human dirofilarioses in Serbia. *Microbiologia Balkanica 2011*. The 7th Balkan Congress of Microbiology & the 8th Congress of Serbian Microbiologists, Belgrade, 2011.

2. **Mišić M**, Arsović A, Zečević M, Ninković V, Ivanović D, Vidanović D, Šekler M, Baskić D. Distribucija fenotipova i gena rezistencije na makrolide i linkozamide kod Gram-pozitivnih koka. Dani mikrobiologa Srbije 2014. Congress of Serbian Microbiologists, Belgrade, 2014.

## ПРИЛОГ

### КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

#### УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број - РБ:

Идентификациони број - ИБР:

Тип документације - ТД: Монографска публикација

Тип записа - ТЗ: Текстуални штампани материјал

Врста рада - ВР: Докторска дисертација

Аутор - АУ: Милена Мишић

Ментор / коментор - МН: др сци. мед. Дејан Баскић, ванредни професор

Наслов рада - НР: Дистрибуција фенотипова и гена резистенције на макролиде и линкозамиде код грам-позитивних кока

Језик публикације - ЈП: српски

Језик извода - ЈИ: српски

Земља публикавања - ЗП: Србија

Уже географско подручје - УГП:

Година - ГО: 2019.

Издавач - ИЗ: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Место и адреса - МС: Светозара Марковића 69, 34000 Крагујевац

Физичи опис рада - ФО:	Дисертација има 145 страна, 7 поглавља, 10 слика, 26 графикана, 19 табела и 401 цитирана библиографска јединица
Научна област - НО:	Медицина
Научна дисциплина - ДИ:	Микробиологија
Предметна одредница / кључне речи - ПО:	Грам-позитивне коке; D-тест; MLS фенотип резистенције; <i>erm</i> ; <i>msrA/B</i> ; <i>lsaA</i> ; <i>lnuA</i> / B ген
УДК	
Чува се - ЧУ:	У библиотеци Универзитета у Крагујевцу, библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу и библиотеци Војно-медицинске академије (ВМА)
Важна напомена - ВН:	
Извод - ИД:	<b>Увод</b> У последњој деценији забележено је повећање резистенције Грам-позитивних кока на антибиотике из групе макролида, линкозамида и стрептограмина А/Б (MLSa/b). Сложени механизми резистенције на MLS антибиотике укључују: модификацију рибозома, активно избацавање антибиотика и модификацију антибиотика. Породица гена одговорних за кодирање ензима који врше метилацију рибозома је означена скраћеницом <i>erm</i> (од енгл. erythromycin resistance methylase) и доводе до појаве унакрсне резистенције на макролиде, линкозамиде и стрептограмине групе Б (MLSb). Профил резистенције познат као MLSb фенотип може бити: индуцибилан (iMLSb) и конститутиван (cMLSb). Сојеви са <i>erm</i> посредованом еритромицин резистенцијом могу се показати осетљивим на клиндамицин у рутинском диск дифузионом тестирању осетљивости.



**Циљ** Утврдити учесталост фенотипова и гена резистенције на MLS антибиотике код Грам-позитивних кока на подручју југоисточне Србије.

**Методe** MLS фенотипови резистенције: конститутивни (сMLSb), индуцибилни (iMLSb), M/MSb и LСа/b, били су утврђени дупли-диск дифузионом методом (D-тестом). Испитано је 2366 клиничких изолата Грам-позитивних кока, сакупљених у току једногодишњег периода у Центру за микробиологију Завода за јавно здравље Врање. Гени који кодирају MLSb резистенцију (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, *msrB*, *mefA/E*, *lnuA*, *lnuB*, *lsaA* и *lsaC*) су идентификовани коришћењем мултиплекс PCR-а.

**Резултати** Највећу учесталост резистенције на еритромицин имали су изолати метицилин-резистентних коагулаза-негативних стафилокока (MRCNS, 91,5%), затим метицилин-резистентних *S. aureus* (MRSA, 86,4%) и ентерокока (80,8%). Нижа, али још увек висока стопа резистенције на еритромицин је била присутна и код других изолата Грам-позитивних кока. Насупрот макролидима, изузев за изолате *Enterococcus* spp. (96,7%), *Streptococcus pneumoniae* (35,9%) и MRSA (28,4%), други изолати Грам-позитивних кока су показали значајно нижу резистенцију на клиндамицин. Открили смо да је iMLSb фенотип најучесталији код стафилокока, код ентерокока и бактерија *S. agalactiae* и *S. pneumoniae* био је доминантан сMLSb фенотип, док је M/MSb фенотип био најчешће присутан код бактерија *S. pyogenes*. Од укупног броја изолата четири соја су показала нови "keyhole" фенотип. Најчешћи појединачни гени и њихове комбинације детектоване код стафилокока су биле *msrA/B*, *ermC* и *ermC+msrA/B*, док су код

ентерокока и  $\beta$ -хемолитичких стрептокока биле *lsaA*, *ermB* и *ermB+lsaA*.

**Закључак** Утврдили смо високу стопу резистенције на еритромицин код Грам-позитивних кока. Метицилин-резистентне стафилококе су биле значајно резистентније на MLS антибиотике у односу на метицилин-сензитивне стафилококе. Најчешће идентификовани ген MLS резистенције међу стафилококама био је *ermC*, док је међу ентерококама и  $\beta$ -хемолитичким стрептококама био *ermB* ген. Утврђена је јасна разлика у обрасцу MLS осетљивости међу стафилококама и ентерококама/стрептококама и потврђена је неопходност увођења D теста у рутинском тестирању антимицробне осетљивости код изолата стафилокока.

Датум прихватања теме од стране ННВ - ДП:

26. 03. 2014. г.

Датум одбране - ДО:

Чланови комисије - КО:

1. Проф. др Бранислава Коцић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник;
2. Проф. др Лазар Ранин, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Медицинска микробиологија, члан;
3. Доц. др Деана Медић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Микробиологија са паразитологијом и имунологијом, члан.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

### UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number - ANO:

Identification number - INO:

Documentation type - DT: Monographic publication

Type of record - TR: Printed textual material

Contents code - CC: PhD thesis

Author - AU: Milena Mišić

Menthor / co-mentor - MN: dr sci. med. Dejan Baskić, associate professor

Title - TI: Distribution of resistance phenotypes and genes to macrolides and lincosamides in gram-positive cocci

Language of text - LT: Serbian

Language of abstract: Serbian

Country of publication - CP: Serbia

Locality of publication - LP: Šumadija

Publication year - PY: 2019

Publisher - PU: Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac

Publication place - PP: Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac

Physical description - PD: Thesis contains 145 pages, 7 chapters, 10 pictures, 26 graphs, 19 tables, and 401 citations

Scientific field - SF: Medicine

Scientific discipline - SD: Microbiology

Subject / key words - SKW: Gram-positive cocci; MLSb resistance phenotypes; D-test; *erm*; *msrA/B*; *lsaA*; *lnuA*/ B genes

UDC

Holding data - HD:

University Library of Kragujevac, The Library of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac and The Library of The Military Medical Academy

Note - N:

Abstract - AB:

**Introduction** The increase of resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin a/b antibiotics (MLSa/b) among Gram-positive cocci has been reported in the last decade. The complex mechanisms of resistance to MLS antibiotics include: modification of ribosome, active efflux of antibiotics and antibiotic inactivation. The gene family called *erm* (erythromycin resistance methylase) that encoding enzymes responsible for ribosome methylation leads to cross-resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin b (MLSb resistance phenotype). The antimicrobial resistance profile known as MLSb resistance phenotype can be either inducible (iMLSb) and constitutive (cMLSb). Macrolide resistant strains carrying *erm* gene can show false sensitivity to clindamycin, using routine antimicrobial susceptibility test.

**Objective** This study investigated the prevalence of MLS resistance phenotypes and genes in Gram-positive cocci in region of the Southeast Serbia.

**Methods** MLS resistance phenotypes: constitutive (cMLSb), inducible (iMLSb), M/MSb, and L/Sa/b, were determined by the double-disk diffusion method. We have analyzed 2366 clinical isolates of Gram-positive cocci, collected during 1-year period at the Center for Microbiology of the Public Health Institute in Vranje, Serbia. The MLS resistance genes (*ermA*, *ermB*, *ermC*,

*msrA*, *msrB*, *mefA/E*, *lnuA*, *lnuB*, *lsaA*, and *lsaC*) were identified by multiplex PCR.

**Results** The highest frequencies of isolates resistant to erythromycin were found among methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCNS, 91.5%), methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA, 86.4%) and Enterococcus strains (80.8%). Lower, but still high resistance rate to erythromycin was found among other Gram-positive cocci. Contrary to macrolides, except for *Enterococcus* spp. (96.7%), *S. pneumoniae* (35.9%), and MRSA (28.4%), other Gram-positive cocci showed significantly lower resistance to clindamycin. We have found that iMLSb is the most prevalent phenotype in staphylococci, the cMLSb is predominantly in enterococci, *S. agalactiae*, and *S. pneumoniae*, whereas the M/MSb phenotype is the most frequent in *S. pyogenes*. LSa/b phenotype was the most common in enterococci and beta haemolytic streptococci, but nearly or totally absented among staphylococci, *S. pneumoniae*, and *S. pyogenes*. The novel keyhole zone phenomenon was detected in four out of total number of clinical isolates. The most prevalent MLS resistance genes and their combinations detected in staphylococci were *msrA/B*, *ermC* and *ermC+msrA/B*, whereas *lsaA*, *ermB* и *ermB+lsaA* were predominantly found in enterococci and beta haemolytic streptococci.

**Conclusion** Generally, high rates of erythromycin resistance in Gram-positive cocci was found. The methicillin-resistant staphylococci were significantly more resistant to MLS antibiotics than methicillin-sensitive staphylococci. The most frequent MLS resistance gen among staphylococci isolates was *ermC*, whereas the *ermB* gen was the most prevalent in enterococci and  $\beta$ -haemolytic streptococci. We have also discovered a clear differences

of MLS resistance pattern in staphylococci and enterococci/streptococci, and confirmed the necessity of routine D-testing of all clinical isolates of staphylococci.

Accepted by the Scientific Board March 26, 2014

on - ASB:

Defended on - DE:

Thesis defended board (Degree /  
name / surname / title / faculty)

- DB:

1. Prof. Branislava Kocić, PhD, MD, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine University of Niš, Serbia, board president;
2. Prof. Lazar Ranin, PhD, MD, Medical Microbiology, Faculty of Medicine University of Belgrade, Serbia, board member;
3. Assistant Prof. Deana Medić, PhD, MD, Department of Microbiology With Parasitology and Immunology, Faculty of Medicine University of Novi Sad, Serbia, board member.

**Образац 1**

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Милена Мишић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

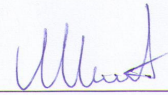
Дистрибуција фенотипова и гена резистенције на макролиде и линкозамиде код грам-позитивних кока

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, \_\_\_\_\_ године,



потпис аутора



**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Милена Мишић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Дистрибуција фенотипова и гена резистенције на макролиде и  
линкозамиде код грам-позитивних кока

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.



припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ године,



\_\_\_\_\_ потпис аутора

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

**РАДОВИ КОЈИ СУ БИЛИ УСЛОВ ЗА ПРИЈАВУ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ  
ДИСЕРТАЦИЈЕ**

1. **Mišić M**, Arsović A, Čukić J, Rosić MI, Tošić-Pajić J, Manojlović N, Čekerevac I, Vidanović D, Šekler M, Baskić D. The prevalence of resistance to macrolides and lincosamides among community and hospital acquired Staphylococci and Streptococci isolates in southeast Serbia. *Srp Arh Celok Lek.* 2018; 146(7-8):384-390. DOI: 10.2298/SARH170407197M. **M23**
2. **Mišić M**, Čukić J, Vidanović D, Šekler M, Matić S, Vukašinović M, Baskić D. Prevalence of Genotypes That Determine Resistance of Staphylococci to Macrolides and Lincosamides in Serbia. *Front. Public Health.* 2017; 5:200. DOI: 10.3389/fpubh.2017.00200. **M22**
3. Aleksandra AD, **Misic MS**, Mira ZV, Violeta NM, Dragana IT, Zoran BM, Dejan VS, Milanko SD, Dejan BD. Prevalence of inducible clindamycin resistance among community-associated staphylococcal isolates in central Serbia. *Indian J Med Microbiol* 2014; 32(1):49-52. DOI: 10.4103/0255-0857.124304. **M23**
4. Dimitrijević DP, Radić GP, Jevtić VV, **Mišić M**, Baskić D, Trifunović SR. Stereospecific ligands and their complexes. XX. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl esters of ethylenediamine-N,N0-di-S,S-(2,20-dibenzyl) acetic acid. *J. Mol. Struct.* 2014; 1071:128–132. DOI: 10.1016/j.molstruc.2014.05.008. **M22**
5. Stojković DLj, Jevtić VV, Vuković N, Vukić M, Čanović P, Zarić MM, **Mišić MM**, Radovanović DM, Baskić D, Trifunović SR. Synthesis, characterization, antimicrobial and antitumor reactivity of new palladium(II) complexes with methionine and tryptophane coumarine derivatives. *J Mol Struct.* 2018; 1157:425-433. DOI: 10.1016/j.molstruc.2017.12.095. **M22**
6. Stojković DLj, Jevtić VV, Vuković N, Vuković M, Potočnak I, Zelen IR, Zarić MM, **Mišić MM**, Baskić D, Kaluđerović GN, Trifunović SR. Crystal and molecular structure of a new palladium(II) complex. *J Struct Chem.* 2017; 58(3):550-557. DOI: 10.1134/S0022476617030179. **M23**
7. **Mišić M**, Randelović G, Kocić B, Suvajdzić Lj, Hamzić S, Zvizdić Š, Tomić M. Association between bacterial vaginosis and precancerous changes of the cervix. *HealthMED Journal.* 2011; 5(6) Suppl.1:2088–2096. **M23**



## ORIGINAL ARTICLE / ОРИГИНАЛНИ РАД

## The prevalence of resistance to macrolides and lincosamides among community- and hospital-acquired staphylococci and streptococci isolates in southeast Serbia

Milena Mišić<sup>1</sup>, Aleksandra Arsović<sup>2</sup>, Jelena Čukić<sup>3</sup>, Milenko I. Rosić<sup>4</sup>, Jelena Tošić-Pajić<sup>5</sup>, Nevena Manojlović<sup>5</sup>, Ivan Čekerevac<sup>6,7</sup>, Dejan Vidanović<sup>8</sup>, Milanko Šekler<sup>8</sup>, Dejan Baskić<sup>3,9</sup>

<sup>1</sup>Vranje Public Health Institute, Department of Microbiology, Vranje, Serbia;

<sup>2</sup>University of Priština, Faculty of Medical Sciences, Institute of Medical Microbiology and Immunology, Kosovska Mitrovica, Serbia;

<sup>3</sup>Public Health Institute, Department of Microbiology, Laboratory for Virology and Immunology, Kragujevac, Serbia;

<sup>4</sup>University Clinic of Cardiovascular Surgery Sremska Kamenica, Institute for Cardiovascular Diseases of Vojvodina, Novi Sad, Serbia;

<sup>5</sup>University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Doctoral Academic Studies, Kragujevac, Serbia;

<sup>6</sup>University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Internal Medicine, Kragujevac, Serbia;

<sup>7</sup>Kragujevac Clinical Centre, Pulmonology Clinic, Kragujevac, Serbia;

<sup>8</sup>Kraljevo Veterinary Specialized Institute, Department of Laboratory Diagnostics, Republic of Serbia National Reference Laboratory for Avian Influenza and Newcastle Disease of Poultry, Kraljevo, Serbia;

<sup>9</sup>University of Kragujevac, Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, Department of Microbiology and Immunology, Kragujevac, Serbia

### SUMMARY

**Introduction/Objective** The increasing resistance to macrolides and lincosamides among staphylococci and streptococci is becoming a global problem. The aim of this study was to investigate the prevalence of macrolide-lincosamide-streptogramin (MLS) resistance phenotypes in staphylococcal and streptococcal isolates in southeast Serbia.

**Methods** The MLS phenotypes were determined by the double-disk diffusion method in 2,121 inpatient and outpatient staphylococcal and streptococcal isolates collected during a one-year period at the Center for Microbiology.

**Results** The methicillin-resistant staphylococci isolates were significantly more resistant to penicillin, erythromycin, clindamycin, gentamicin, and ciprofloxacin (100%, 100%, 29.2%, 65.6%, and 53.1%, respectively) than the methicillin-sensitive ones (93.6%, 64.9%, 12%, 28.9%, and 11.7%, respectively). The inducible clindamycin resistance phenotype was dominant in *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci isolates. *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, and *S. agalactiae* isolates showed very high resistance to erythromycin (77.8%, 46.2%, and 32.4%, respectively). All staphylococci and streptococci isolates were sensitive to vancomycin and linezolid, and all beta-hemolytic streptococci isolates to penicillin and ceftriaxone.

**Conclusion** The phenotypic triage of staphylococci is necessary in order to separate inducible resistant and truly clindamycin-sensitive isolates. Macrolides should not be recommended for empirical therapy of streptococcal infections. Penicillins remain the drug of choice for treatment of streptococcal infections in our local area.

**Keywords:** staphylococci; streptococci; MLS resistance phenotypes; inducible clindamycin resistance

### INTRODUCTION

Inpatient *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, and *Streptococcus pneumoniae* infections was the biggest problem in the pre-antibiotic era [1]. Today, when large number of antibiotics are available, we are once again faced with the problem of treating infections caused by penicillin-resistant pneumococci, methicillin- and vancomycin-resistant strains of *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci (CNS) [1].

*S. aureus* cause a variety of infections, ranging from mild skin infections to fatal bacteremia: osteomyelitis, pneumonia, arthritis,

staphylococcal scalded skin syndrome, endocarditis, myocarditis, pericarditis, and bacteremia [2, 3]. The most common CNS infections are nosocomial bacteremia related to central venous catheter, endocarditis in patients with artificial heart valves, infections from an intravenous catheter insertion site, and postoperative infections in ophthalmic surgery [2]. *S. pneumoniae* bacteria can cause serious invasive infections, such as meningitis, bacteremia, and pneumonia, as well as non-invasive infections such as sinusitis and acute middle ear infections [4]. *S. agalactiae* causes serious infections in newborns and pregnant women, acute and chronic respiratory infections, endocarditis,

Received • Примљено:

April 7, 2017

Revised • Ревизија:

November 5, 2017

Accepted • Прихваћено:

November 7, 2017

Online first: November 17, 2017

Correspondence to:

Dejan BASKIĆ  
Kragujevac Public Health Institute  
Nikole Pašića 1  
34000 Kragujevac, Serbia  
[dejan.baskic@gmail.com](mailto:dejan.baskic@gmail.com)

sepsis, meningitis, and pyelonephritis [5, 6]. *S. pyogenes* causes uncomplicated upper respiratory tract and skin infections, but also severe life-threatening infections, which are very common in developing countries [7].

Macrolide and lincosamide antibiotics are often used for the treatment of staphylococci and streptococci infections. Therapeutic use of macrolide-lincosamide-streptogramin group B (MLSb) antibiotics can cause inducible macrolide-lincosamide-streptogramin group B (iMLSb) resistance and subsequent clinical failure of therapy, especially in staphylococcal infections. The iMLSb resistance phenotype leads to clindamycin treatment failure due to rapid *in vitro* conversion of inducible to constitutive macrolide-lincosamide-streptogramin group B (cMLSb) resistance phenotype.

A simple way to detect iMLSb-resistant strains is the double-disk diffusion method (D-test). Without the D-test, all clinical isolates with iMLSb resistance would be erroneously interpreted as clindamycin-susceptible causing inappropriate antibiotic therapy.

The aim of this study was to determine and compare the prevalence of MLS resistance in staphylococcal and streptococcal isolates from inpatient and outpatient clinical samples in southeast Serbia. To determine observed MLS resistance phenotypes, D-test was used.

## METHODS

We analyzed 2,121 clinical isolates of staphylococci and streptococci, collected during a one-year period (October 2012 to October 2013) at the Center for Microbiology of the Public Health Institute in Vranje, Serbia, including 865 isolates from nasal and throat swabs, 810 from purulent discharge, 442 from genital secretions, and four isolates from the urine. Multiple specimens from the same patient were avoided. The following clinical species were considered: *S. aureus*, CNS, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, and *S. pyogenes*. The local ethics committee approved the study according to the Declaration of Helsinki (No. 01-5072/2013). The authors declare that informed consent was not required.

### Bacterial identification

*S. aureus* was identified using Gram stain, catalase test (positive), the mannitol salt agar (Chapman medium), and the tube coagulase test. The staphylococcal strains, which turn the color of the medium from red to yellow and produce free coagulase were identified as *S. aureus*, else were identified as CNS [2]. *S. pneumoniae* was identified using Gram stain, catalase (negative), and optochin test (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). The slide agglutination test was used as confirmatory identification of *S. pneumoniae* (Slidex pneumo-kit; bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) [8]. *S. agalactiae* was identified using Gram stain, catalase test (negative), CAMP test, and rapid latex agglutination test (Streptex-Slidex® Strepto Plus, bioMérieux) [8]. The identification of *S. pyogenes* was performed us-

ing Gram stain, catalase test (negative), the susceptibility test to bacitracin (0.04 UI, Taxo A, BBL, BD Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA), and rapid latex agglutination test (Streptex-Slidex® Strepto Plus, bioMérieux) [8].

### Antibiotic susceptibility testing

The antibiotic susceptibility test was performed by the standard disk diffusion method using Mueller–Hinton agar according to the Clinical & Laboratory Standards Institute guidelines [9]. The following antibiotic discs were used: erythromycin 15 µg, clindamycin 2 µg, gentamicin 10 µg, ciprofloxacin 5 µg, penicillin G 10 µg, ceftriaxone 30 µg, ceftiofloxacin 30 µg, vancomycin 30 µg, linezolid 30 µg (Bioanalyse®, Ankara, Turkey). Methicillin resistance in staphylococci was determined by the ceftiofloxacin disk diffusion method (30 µg) [9]. Penicillin-susceptible *Staphylococcus* isolates were further tested for beta-lactamase production using a nitrocefin disk test (Bioanalyse®) [2]. Reference strains *S. pneumoniae* ATCC 49619 and *S. agalactiae* ATCC 12403 were used for quality control (QC). QC of erythromycin and clindamycin disks was performed by reference *S. aureus* ATCC 25923 strain according to a standard disk diffusion QC procedure [9]. In addition, QC was also performed with laboratory's own strains of *S. aureus* and *S. pyogenes* which show results of both positive and negative D-test.

### Determination of resistance phenotypes

MLSb resistance phenotypes were determined by the D-test. Erythromycin (15 µg) and clindamycin (2 µg) disks were placed at an edge-to-edge distance of 12 mm on inoculated Mueller–Hinton agar. The following MLS resistance phenotypes were detected: erythromycin-sensitive and clindamycin-sensitive (Er/Cli S), cMLSb which were resistant to erythromycin and clindamycin, iMLSb which were determined by placing erythromycin and clindamycin disks in adjacent positions resulting in a D-shaped zone around the clindamycin disk, susceptible to clindamycin (without blunting zone) and resistant to erythromycin (M/MSb), and resistant to clindamycin and sensitive to erythromycin (LSa/b).

## RESULTS

The overall antimicrobial resistance of the tested isolates is presented in Table 1, except for vancomycin, linezolid, and ceftriaxone, since resistance to vancomycin and linezolid among staphylococci and streptococci, and resistance to ceftriaxone among streptococci were not detected.

Staphylococci showed the highest resistance rate to penicillin, while the lowest showed *S. pyogenes* and *S. agalactiae* isolates (Table 1). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (86.2%, 112/130 community- and 87.5%, 28/32 hospital-acquired) and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCNS) (87.8%, 43/49 community- and 100%, 22/22 hospital-acquired) isolates

showed the highest resistance rate to erythromycin, while *S. agalactiae* showed the lowest resistance. The highest resistance rates to clindamycin were among community-associated strains of *S. pneumoniae* (38.2%, 21/55) and MRSA (29.2%, 38/130), while the lowest were among community-associated strains of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and methicillin-susceptible coagulase-negative *Staphylococcus* (MSCNS). *S. agalactiae* (72.7%, 101/139 community- and 72.7%, 8/11 hospital-associated) and MRSA (65.6%, 21/32 hospital-acquired) isolates showed the highest resistance rate to gentamicin, while MSSA and MSCNS isolates showed the lowest resistance. MRSA (40.8%, 53/130 community- and 53.1%, 17/32 hospital-acquired) and MRCNS (34.7%, 17/49 community- and 40.9%, 9/22 hospital-acquired) isolates showed the highest resistance rate to ciprofloxacin, while *S. pneumoniae* and MSSA isolates showed the lowest resistance rate (Table 1).

A comparison between hospital- and community-associated isolates showed significantly ( $p < 0.05$ ) higher resistance rate to gentamicin in hospital-associated *S. aureus*, MSSA, and MRSA isolates than in community-associated ones (Table 1). MRSA compared to MSSA hospital- and community-acquired isolates showed significantly ( $p < 0.05$ ) higher resistance rate to all observed antibiotics. CNS isolates showed significantly ( $p < 0.05$ ) higher resistance rate to ceftioxin and erythromycin in hospital- than in community-associated isolates. MRCNS compared to MSCNS community-acquired isolates showed significantly ( $p < 0.05$ ) higher resistance rate to penicillin and gentamicin. MRCNS compared to MSCNS community- and hospital-acquired isolates showed significantly ( $p < 0.05$ ) higher resistance to ceftioxin, erythromycin, and ciprofloxacin. A comparison between *S. pneumoniae* isolates showed significantly ( $p < 0.05$ ) higher resistance rate to ceftioxin in hospital- than in community-associated iso-

lates. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between *S. pneumoniae* and *S. agalactiae* to penicillin, clindamycin, gentamicin, and ciprofloxacin (in community-acquired isolates), and to erythromycin (in community- and hospital-acquired isolates); between *S. pneumoniae* and *S. pyogenes* to penicillin, erythromycin, and clindamycin (in community-acquired isolates); between *S. agalactiae* and *S. pyogenes* to penicillin, gentamicin, and ciprofloxacin (in community-acquired isolates) (Table 1).

The iMLSb was the most prevalent phenotype among methicillin-resistant and methicillin-susceptible staphylococci except among hospital-acquired MSCNS strains, where M/MSb resistance phenotype was dominant (Table 2). The cMLSb phenotype was the most prevalent in MRSA strains (27.7%, 36/130 from outpatient and 21.9%, 7/32 inpatient specimens). LSa/b phenotype was the rarest among all of MLS resistance phenotypes and most common in MRSA strains from inpatient samples and in MSCNS and MSSA strains from outpatient samples.

A comparison between inpatient and outpatient isolates showed a significant ( $p < 0.05$ ) difference in MRSA and MSCNS isolates with M/MSb phenotype (Table 2). A comparison between MRSA and MSSA isolates showed a significant ( $p < 0.05$ ) difference among community-acquired isolates in the frequency of Er/Cli S, cMLSb, and iMLSb phenotypes, and among hospital-acquired isolates in the frequency of Er/Cli S and cMLSb phenotypes. A comparison between MRCNS and MSCNS isolates showed a significant ( $p < 0.05$ ) difference among community-acquired isolates in the prevalence of Er/Cli S, and among hospital-acquired isolates in the prevalence of Er/Cli S and iMLSb phenotypes (Table 2).

The cMLSb was the most prevalent phenotype among *S. pneumoniae* from outpatient isolates, among *S. agalactiae* from inpatient and outpatient isolates, and among *S. pyogenes* from inpatient isolates (Table 3). The M/MSb

**Table 1.** Antimicrobial resistance rates among community- and hospital-acquired staphylococci and streptococci isolates

Bacteria	Ceftioxin		Penicillin		Erythromycin		Clindamycin		Gentamicin		Ciprofloxacin	
	Comm. n/N (%)	Hosp. n/N (%)	Comm. n/N (%)	Hosp. n/N (%)	Comm. n/N (%)	Hosp. n/N (%)	Comm. n/N (%)	Hosp. n/N (%)	Comm. n/N (%)	Hosp. n/N (%)	Comm. n/N (%)	Hosp. n/N (%)
<i>S. aureus</i>	130/784 (16.6)	32/160 (20)	723/784 (92.2)	142/160 (88.8)	464/784 (59.2)	94/160 (58.8)	68/784 (8.7)	10/160 (6.3)	159/784 (20.3)	56/160 (35)	96/784 (12.2)	23/160 (14.4)
MRSA	130/130 (100)	32/32 (100)	130/130 (100)	32/32 (100)	112/130 (86.2)	28/32 (87.5)	38/130 (29.2)	8/32 (25)	58/130 (44.6)	21/32 (65.6)	53/130 (40.8)	17/32 (53.1)
MSSA	0/654 (0)	0/128 (0)	593/654 (90.7)	110/128 (85.9)	352/654 (53.8)	66/128 (51.6)	30/654 (4.6)	2/128 (1.6)	100/654 (15.3)	37/128 (28.9)	40/654 (6.1)	5/128 (3.9)
CNS	49/583 (8.4)	22/116 (19)	527/583 (90.4)	110/116 (94.8)	343/583 (58.8)	83/116 (71.6)	74/583 (12.7)	11/116 (9.5)	112/583 (19.2)	29/116 (25)	58/583 (9.9)	19/116 (16.4)
MRCNS	49/49 (100)	22/22 (100)	49/49 (100)	22/22 (100)	43/49 (87.8)	22/22 (100)	10/49 (20.4)	1/22 (4.5)	28/49 (57.1)	9/22 (40.9)	17/49 (34.7)	9/22 (40.9)
MSCNS	0/534 (0)	0/94 (0)	478/534 (89.5)	88/94 (93.6)	300/534 (56.2)	61/94 (64.9)	64/534 (12)	10/94 (10.6)	82/534 (15.4)	20/94 (21.3)	41/534 (7.7)	11/94 (11.7)
<i>S. pneumoniae</i>	14/55 (25.5)	7/9 (77.8)	5/55 (9.1)	1/9 (11.1)	35/55 (63.6)	7/9 (77.8)	21/55 (38.2)	2/9 (22.2)	24/55 (43.6)	3/9 (33.3)	0/55 (0)	0/9 (0)
<i>S. agalactiae</i>	-	-	0/139 (0)	0/11 (0)	45/139 (32.4)	2/11 (18.2)	30/139 (21.6)	1/11 (9.1)	101/139 (72.7)	8/11 (72.7)	45/139 (32.4)	4/11 (36.4)
<i>S. pyogenes</i>	-	-	0/238 (0)	0/26 (0)	104/238 (43.7)	12/26 (46.2)	40/238 (16.8)	7/26 (26.9)	79/238 (33.2)	10/26 (38.5)	51/238 (21.4)	6/26 (23.1)

MRSA – methicillin-resistant *S. aureus*; MSSA – methicillin-susceptible *S. aureus*; CNS – coagulase-negative staphylococci; MRCNS – methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci; MSCNS – methicillin-susceptible coagulase-negative staphylococci

**Table 2.** The frequency of macrolide-lincosamide-streptogramin resistance phenotypes among community- and hospital-acquired staphylococci isolates

Phenotypes	MRSA			MSSA			MRCNS			MSCNS		
	Comm. n (%)	Hosp. n (%)	p	Comm. n (%)	Hosp. n (%)	p	Comm. n (%)	Hosp. n (%)	p	Comm. n (%)	Hosp. n (%)	p
Er/Cli S	16 (12.3)	3 (9.4)	0.768	299 (45.7)	62 (48.4)	0.628	6 (12.2)	0 (0)	0.167	225 (42.1)	32 (34)	0.172
cMLSb	36 (27.7)	7 (21.9)	0.656	27 (4.1)	2 (1.6)	0.205	10 (20.4)	1 (4.5)	0.154	55 (10.3)	9 (9.6)	1.00
M/MSb	16 (12.3)	10 (31.3)	0.014	91 (13.9)	24 (18.8)	0.172	13 (26.5)	10 (45.5)	0.169	98 (18.4)	27 (28.7)	0.024
iMLSb	60 (46.2)	11 (34.4)	0.242	234 (35.8)	40 (31.3)	0.362	20 (40.8)	11 (50)	0.605	147 (27.5)	25 (26.6)	0.900
LSa/b	2 (1.5)	1 (3.1)	0.485	3 (0.5)	0 (0)	1.00	0 (0)	0 (0)	1.00	9 (1.7)	1 (1.1)	1.00
Total	130 (100)	32 (100)		654 (100)	128 (100)		49 (100)	22 (100)		534 (100)	94 (100)	

MRSA – methicillin-resistant *S. aureus*; MSSA – methicillin-susceptible *S. aureus*; MRCNS – methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci; MSCNS – methicillin-susceptible coagulase-negative staphylococci; Er/Cli S – susceptibility to erythromycin and clindamycin; cMLSb – constitutive resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B; M/MSb – resistance to macrolide/macrolide-streptogramin B; iMLSb – inducible resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B; LSa/b – resistance to lincosamide-streptogramin A / streptogramin B

**Table 3.** The frequency of macrolide-lincosamide-streptogramin resistance phenotypes among community- and hospital-acquired streptococci isolates

Phenotypes	<i>S. pneumoniae</i>			<i>S. agalactiae</i>			<i>S. pyogenes</i>		
	Comm. n (%)	Hosp. n (%)	p	Comm. n (%)	Hosp. n (%)	p	Comm. n (%)	Hosp. n (%)	p
Er/Cli S	20 (36.4)	2 (22.2)	0.706	85 (61.2)	9 (81.8)	0.211	134 (56.3)	14 (53.8)	0.837
cMLSb	21 (38.2)	2 (22.2)	0.469	21 (15.1)	1 (9.1)	1.00	40 (16.8)	7 (26.9)	0.276
M/MSb	9 (16.4)	3 (33.3)	0.351	18 (12.9)	1 (9.1)	1.00	45 (18.9)	5 (19.2)	1.00
iMLSb	5 (9.1)	2 (22.2)	0.253	6 (4.3)	0 (0)	1.00	19 (8)	0 (0)	0.232
LSa/b	0 (0)	0 (0)	1.00	9 (6.5)	0 (0)	1.00	0 (0)	0 (0)	1.00
Total	55 (100)	9 (100)		139 (100)	11 (100)		238 (100)	26 (100)	

Er/Cli S – susceptibility to erythromycin and clindamycin; cMLSb – constitutive resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B; M/MSb – resistance to macrolide/macrolide-streptogramin B; iMLSb – inducible resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B; LSa/b – resistance to lincosamide-streptogramin A / streptogramin B

was the most prevalent phenotype among *S. pneumoniae* from inpatient isolates, and among *S. pyogenes* from outpatient isolates.

There was no significant ( $p > 0.05$ ) difference between community- and hospital-acquired streptococci isolates in the frequency of MLS resistance phenotypes (Table 3). A comparison between *S. pneumoniae* and *S. agalactiae* showed a significant ( $p < 0.05$ ) difference among community-acquired isolates in the frequency of Er/Cli S and cMLSb phenotypes, and among hospital-acquired isolates in the frequency of Er/Cli S. A comparison between *S. pneumoniae* and *S. pyogenes* showed a significant ( $p < 0.05$ ) difference among community-acquired isolates in the frequency of Er/Cli S and cMLSb phenotypes (Table 3).

## DISCUSSION

Development of antimicrobial resistance in staphylococci and streptococci includes the emergence of multidrug-resistant bacteria. Initially, MRSA strains mainly caused hospital infections [10]. However, since about a decade ago, the number of community-acquired MRSA strains has significantly increased in a number of countries [10].

All of our staphylococcal and streptococcal isolates were susceptible to vancomycin and linezolid, and all of beta-hemolytic streptococcal isolates were susceptible to penicillin and ceftriaxone, similar to other researchers [11, 12, 13].

In our study, 20% (32/160) of hospital-associated and 16.6% (130/784) of community-associated *S. aureus* isolates were resistant to methicillin, with no significant

difference in prevalence between hospital and community MRSA strains. The prevalence of hospital-associated MRSA strains in Belgium, Bulgaria, and France based on 2015 surveillance data were similar to ours, whereas those in Romania, Malta, Portugal, Cyprus, and Greece were much higher (over 30%) [3]. Regarding coagulase-negative staphylococci, we found 8.4% (49/583) of community-acquired and 19% (22/116) of hospital-acquired MRCNS isolates, whereas other authors found higher percentage (62.2%) of MRCNS isolates among hospital strains [14].

In our study, all of MRSA and MRCNS isolates were resistant to penicillin, which was in accordance with a global report of antimicrobial susceptibility testing [10]. More than half of *Staphylococcus* isolates in our study were resistant to erythromycin, similar to global macrolide resistance rate in staphylococci [15]. We found that more than 85% of MRSA and MRCNS isolates showed significantly higher resistance to erythromycin than the MSSA and MSCNS isolates (about 55%). Similar data have been reported in other regions of Serbia and Greece [14, 16]. We found high prevalence of resistance to clindamycin, gentamicin, and ciprofloxacin among community- and hospital-associated MRSA and MRCNS isolates, and low among MSSA and MSCNS isolates, similar to other studies [11, 17]. We did not find a significant difference between community- and hospital-acquired *S. aureus* isolates in resistance to all antimicrobial agents, except to gentamicin (for both MRSA and MSSA isolates). In addition, among our CNS isolates, there were significantly more inpatient isolates resistant to cefoxitin and erythromycin than outpatient isolates. Both hospital- and community-acquired MRSA showed

higher resistance rates to all tested antimicrobial agents than MSSA isolates, and MRCNS showed higher resistance rates to all antibiotics than MSCNS isolates (except inpatient isolates to clindamycin), similar to a study conducted by Kim et al. [17]. However, Považan et al. [14] found extremely higher resistance rates to clindamycin, gentamicin, and ciprofloxacin among their hospital-acquired MRCNS strains (more than 70%) in relation to ours.

Generally, the iMLSb was the most frequent phenotype among methicillin-resistant (about 40%) and methicillin-susceptible staphylococci (about 30%) except outpatient MSCNS isolates, where the M/MSb phenotype was dominant (28.7%), similar to studies from different geographic locations [11, 18]. In Europe, there was a high prevalence (more than 80%) of the cMLSb phenotype in MRSA, whereas the iMLSb was dominant in MSSA isolates [15, 16]. In our study, there were no significant differences of prevalence of MLS phenotypes between inpatient and outpatient staphylococci isolates, except for M/MSb phenotype, which was significantly more prevalent in inpatient than in outpatient MRSA, and MSCNS isolates. Among all of MLS phenotypes, the rarest LSa/b was found in MRSA, MSSA, and MSCNS isolates, as well as in France and the Czech Republic [19, 20]. One of MSSA isolates was different from other LSa/b phenotypes by channel of sensitivity between clindamycin and erythromycin disc, and it looked like a “keyhole.” In South Korea, similar novel phenotype has been described in 46 of *S. agalactiae* isolates [5].

There were no significant differences between our community- and hospital-associated *S. pneumoniae* isolates in their resistance to antibiotics. Only a small percentage of our *S. pneumoniae* isolates showed resistance to penicillin (9.1%, 5/5 community- and 11.1%, 1/9 hospital-acquired), while Mladenović-Antić et al. [21] discovered higher resistance to penicillin (27%) in hospital-acquired pneumococci isolates in the first decade of this century in the Nišava region, Serbia. In our region, we discovered a very high resistance rate to erythromycin in *S. pneumoniae* (63.6%, 35/55 community- and 77.8%, 7/9 hospital-acquired isolates), which was in accordance with findings by Dinić et al. [22] (78.4% and 65.6%, respectively). However, Hadnadev et al. [23] and Mijač et al. [4] found lower rate of resistance to erythromycin in *S. pneumoniae* (36% and 45%, respectively) in their studies in Serbia. Some parts of Malta and Romania had similar prevalence rate of macrolide resistance among *S. pneumoniae* in 2012 and 2015 to our findings. Wide inter-country variations in the emergence of macrolide-resistant *S. pneumoniae* were recorded across Europe, with prevalence ranging from 0% to 74% in a period from 2012 to 2015 [3]. Also, a very high resistance rate to clindamycin among our community-associated strains of *S. pneumoniae* (38.2%, 21/55) was detected, while neither one of our *S. pneumoniae* isolates showed resistance to ciprofloxacin, which was similar to other researches from Serbia [22, 24].

In our region, cMLSb phenotype was the most prevalent (38.2%) of all *S. pneumoniae* isolates from outpatient samples, whereas the M/MSb (33.3%) was dominant among hospital-acquired isolates. Different from our findings, authors from the Nišava district and central and

northern parts of Serbia found that the dominant MLS resistance phenotype was cMLSb among hospital isolates of *S. pneumoniae*, but authors from Italy yielded results similar to our findings [22, 23, 25, 26].

There have been no *S. agalactiae* isolates resistant to penicillin and ceftriaxone in Italy either [13]. Our *S. agalactiae* isolates showed relatively high resistance rates to erythromycin (32.4%, 45/139 community- and 18.2%, 2/11 hospital-acquired) and clindamycin (21.6%, 30/139 community- and 9.1%, 1/11 hospital-acquired). In Italy, the same resistance to erythromycin (19%) was observed among *S. agalactiae* isolates as was the case in Spain, but the resistance to clindamycin was significantly higher (53%) [6, 13]. There was a similarity between our region and regions of the United States regarding resistance rate to erythromycin among *S. agalactiae* isolates (ranged from 38% to 41.9%) [27]. In our area, very high resistance rates to gentamicin (about 70%) and ciprofloxacin (about 30%) among both community- and hospital-associated *S. agalactiae* isolates were found.

The cMLSb resistance phenotype was dominant among *S. agalactiae* community-acquired strains, whereas the same proportions of cMLSb and M/MSb were found as the commonest resistance phenotype among hospital-acquired *S. agalactiae* isolates, consistent with other studies [13, 27]. We detected a small percentage of rare LSa/b resistance phenotype (6.5%, 9/139) among community-acquired *S. agalactiae* isolates, similar to another study [13]. Resistance rate to macrolides and lincosamides in *S. agalactiae* has been steadily increasing, although it varies greatly between regions [13].

We did not find a strain resistant to penicillin among *S. pyogenes* isolates, so it remains the first-line antibiotic in the treatment of *S. pyogenes* infections [28]. Very high resistance rates to erythromycin among our *S. pyogenes* (43.7%, 104/238 community- and 46.2%, 12/26 hospital-acquired) isolates were found, while the reported resistance rate to erythromycin among community-acquired *S. pyogenes* isolates in Serbia from 2004 to 2009 was only 19% [4]. Resistance rates to erythromycin, clindamycin, gentamicin, and ciprofloxacin among our *S. pyogenes* isolates were higher than in other parts of Serbia and some European countries [7, 29]. The very high resistance to erythromycin among our *S. pyogenes* isolates can be explained by uncontrolled and excessive consumption of total macrolides and long-acting macrolides (i.e. azithromycin) and other antibiotics in Southeast Serbia.

Dominance of the M/MSb phenotype among community-acquired *S. pyogenes* isolates observed in our study corresponds well with the results of many other studies [25, 28, 29]. In addition, cMLSb was the most common resistance phenotype among our hospital-associated *S. pyogenes* isolates. However, MLS phenotype is increasingly reported in Europe [7].

In general, the resistance rates to macrolides and lincosamides showed wide variations in bacterial species and geographical region. These variations were mostly developed because of differences in antimicrobial use, infection prevention, and infection control practices in different



regions. Monitoring the frequency of staphylococcal and streptococcal resistance to macrolides and lincosamides and various mechanisms of resistance at the local level is essential for determining empirical therapy. Physicians should consider local and regional resistance patterns when they choose an appropriate medication for the treatment of both inpatient and outpatient staphylococcal and streptococcal infections.

## CONCLUSION

This study is the first extensive report on macrolide and lincosamide resistance of common hospital- and community-associated staphylococcal and streptococcal isolates in Southeast Serbia. Our results indicated that there was a significant prevalence of the iMLSb resistance phenotype in all inpatient and outpatient staphylococcal isolates, and phenotypic triaging of all staphylococci is necessary in order to distinguish inducible resistance and truly clindamycin-susceptible isolates. The methicillin-resistant inpatient and outpatient staphylococci isolates were significantly

more resistant to penicillin, erythromycin, clindamycin, gentamicin, and ciprofloxacin than methicillin-sensitive ones. Our findings also indicate a very high resistance to macrolides in both inpatient and outpatient *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, and *S. agalactiae* isolates, which reached 77.8%, 46.2%, and 32.4%, respectively, so these antibiotics should not be recommended for empirical therapy of infection caused by these bacteria. Penicillins remain the drugs of choice for treatment of streptococcal infections in our local area. Because of constant changes of resistance rates to antibiotics, survey of the antibiotic usage and development of resistance is recommended.

## ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by the Ministry of Science and Technology of the Republic of Serbia under grant No. III41010.

The findings in this study will also be a part of the doctoral thesis approved by the Senate of the University of Kragujevac.

## REFERENCES

- Lieberman JM. Appropriate antibiotic use and why it is important: the challenges of bacterial resistance. *Pediatr Infect Dis J*. 2003; 22(12):1143–51.
- Forbes BA, Sahm DF, Alice WS. *Staphylococcus, Micrococcus, and similar organisms in Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 11th Ed. St. Louis: Mosby; 2002; 285–92.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2017.
- Mijac V, Opavski N, Markovic M, Gajic I, Vasiljevic Z, Sipetic T, et al. Trends in macrolide resistance of respiratory tract pathogens in the paediatric population in Serbia from 2004 to 2009. *Epidemiol Infect*. 2015; 143(3):648–52.
- Srinivasan U, Miller B, Debusscher J, Marrs CF, Zhang L, Seo YS, et al. Identification of a novel keyhole phenotype in double-disk diffusion assays of clindamycin-resistant erythromycin-sensitive strains of *Streptococcus agalactiae*. *Microb Drug Resist*. 2011; 17(1):121–4.
- Betriu C, Culebras E, Gómez M, Rodríguez-Avil I, Sánchez BA, Agreda MC, et al. Erythromycin and clindamycin resistance and telithromycin susceptibility in *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(3):1112–4.
- Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Beekmann SE, Riahi F, Garcia-de-Lomas J, et al. Increasing telithromycin resistance among *Streptococcus pyogenes* in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 61(3):603–11.
- Ruoff KL, Whaley RA, Beighton D. *Streptococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. *Manual of clinical microbiology*. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology; 1999. p. 283–696.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S22, M2-7 and M-7. Wayne: Guidelines for *Streptococcus* spp,  $\beta$ -hemolytic group; 2012.
- WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2014.
- Aleksandra AD, Misić MS, Mira ZV, Violeta NM, Dragana IT, Zoran BM, et al. Prevalence of inducible clindamycin resistance among community-associated staphylococcal isolates in central Serbia. *Indian J Med Microbiol*. 2014; 32(1):49–52.
- Gajić I, Mijač V, Ranin L, Anđelković D, Radičević M, Opavski N. Invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Serbia: antimicrobial susceptibility and serotypes. *Srp Arh Celok Lek*. 2013; 141(1-2):48–53.
- Piccinelli G, Fernandes P, Bonfanti C, Caccuri F, Caruso A, De Francesco MA. In vitro activity of solithromycin against erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(3):1693–8.
- Považan A, Vukelić A, Karucin T, Hadnađev M, Milošević V, Gusman V. Non-susceptibility trends among methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. *Arch Biol Sci*. 2014; 66:79–86.
- Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clin Infect Dis*. 2001; 32:S114–32.
- Fokas S, Fokas S, Tsironi M, Kalkani M, Dionysopoulou M. Prevalence of inducible clindamycin resistance in macrolide-resistant *Staphylococcus* spp. *Clin Microbiol Infect*. 2005; 11(4):337–40.
- Kim HB, Jang HC, Nam HJ, Lee YS, Kim BS, Park WB, et al. In vitro activities of 28 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates from tertiary-care hospitals in Korea: a nationwide survey. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(4):1124–7.
- Hamilton-Miller JM, Shah S. Patterns of phenotypic resistance to the macrolide-lincosamide-ketolide-streptogramin group of antibiotics in staphylococci. *J Antimicrob Chemother*. 2000; 46(6):941–9.
- Tessé S, Trueba F, Berthet N, Hot C, Chesneau O. Resistance genes underlying the LSA phenotype of staphylococcal isolates from France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(9):4543–6.
- Novotna G, Adamkova V, Janata J, Melter O, Spizek J. Prevalence of resistance mechanisms against macrolides and lincosamides in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the Czech Republic and occurrence of an undefined mechanism of resistance to lincosamides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(8):3586–9.
- Mladenovic-Antic S, Kocic B, Stojanovic P, Ivic S, Mladenovic V. P743 antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains to penicillin and ceftriaxone, isolated in the Niš district, Romania during 1999–2006. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; 29:S183.
- Dinic M, Mladenovic-Antic S, Kocić B, Stankovic-Djordjevic D, Vrbic M, Bogdanovic M. Susceptibility of respiratory isolates of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children hospitalized in the Clinical center Nis. *Med Pregl*. 2016; 69(3-4):110–4.



23. Hadnadev M, Gajić I, Mijač V, Kurucin T, Považan A, Vulin A, et al. Phenotypes and genotypes of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Serbia. Arch Biol Sci. 2014; 66:99–105.
24. Gajić I, Opavski N, Mijač V, Ranin L. Macrolide-resistant phenotypes of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Serbia. Arch Biol Sci. 2012; 64:1377–82.
25. Gajić I, Mijač V, Opavski N, Stanojević M, Lazarević I, Šmitran A, et al. Distribution of macrolide-resistant genes among isolates of macrolide resistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* in Serbia. Arch Biol Sci. 2014; 66:93–8.
26. Monaco M, Camilli R, D'Ambrosio F, Del Grosso M, Pantosti A. Evolution of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Italy. J Antimicrob Chemother. 2005; 55(2):256–9.
27. Borchardt SM, DeBusscher JH, Tallman PA, Manning SD, Marrs CF, Kurzynski TA, et al. Frequency of antimicrobial resistance among invasive and colonizing Group B streptococcal isolates. BMC Infect Dis. 2006; 6:57.
28. Pavlovic L, Grego E, Sipetic-Grujicic S. Prevalence of Macrolide Resistance in *Streptococcus pyogenes* Collected in Serbia. Jpn J Infect Dis. 2010; 63(4):275–6.
29. Opavski N, Gajic I, Borek AL, Obszańska K, Stanojevic M, Lazarevic I, et al. Molecular characterization of macrolide resistant *Streptococcus pyogenes* isolates from pharyngitis patients in Serbia. Infect Genet Evol. 2015; 33:246–52.

## Учесталост резистенције на макролиде и линкозамиде код амбулантних и болничких изолата стафилокока и стрептокока у југоисточној Србији

Милена Мишић<sup>1</sup>, Александра Арсовић<sup>2</sup>, Јелена Чукић<sup>3</sup>, Миленко И. Росић<sup>4</sup>, Јелена Тошић-Пајић<sup>5</sup>, Невена Манојловић<sup>5</sup>, Иван Чекеревац<sup>6,7</sup>, Дејан Видановић<sup>8</sup>, Миланко Шеклер<sup>8</sup>, Дејан Баскић<sup>3,9</sup>

<sup>1</sup>Завод за јавно здравље Врање, Одељење микробиологије, Врање, Србија;

<sup>2</sup>Универзитет у Приштини, Факултет медицинских наука, Институт за медицинску микробиологију и имунологију, Косовска Митровица, Србија;

<sup>3</sup>Институт за јавно здравље, Одсек за микробиологију, Лабораторија за вирусологију и имунологију, Крагујевац, Србија;

<sup>4</sup>Универзитетска клиника за кардиоваскуларну хирургију Сремска Каменица, Институт за кардиоваскуларне болести Војводине, Нови Сад, Србија;

<sup>5</sup>Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука, докторске академске студије, Крагујевац, Србија;

<sup>6</sup>Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука, Одељење интерне медицине, Крагујевац, Србија;

<sup>7</sup>Клинички центар Крагујевац, Клиника за пулмологију, Крагујевац, Србија;

<sup>8</sup>Специјализовани ветеринарски институт Краљево, Одељење за лабораторијску дијагностику, Национална референтна лабораторија за птичји грип и Њукасл болест живине Републике Србије, Краљево, Србија;

<sup>9</sup>Универзитет у Крагујевцу, Центар за молекуларну медицину и испитивање стем ћелија, Факултет медицинских наука, Одељење за микробиологију и имунологију, Крагујевац, Србија

### САЖЕТАК

**Увод/Циљ** Растућа резистенција на макролиде и линкозамиде код стафилокока и стрептокока је постала глобални проблем.

Циљ ове студије је био да истражи учесталост макролид-линкозамид-стрептограмин (МЛС) фенотипова резистенције код изолата стафилокока и стрептокока у југоисточној Србији.

**Метод** МЛС фенотипови били су утврђени дифузионом методом дуплог диска на 2.121 болничком и амбулантном изолату стафилокока и стрептокока прикупљеном током једногодишњег периода у Центру за микробиологију.

**Резултати** Изолати стафилокока резистентних на метицилин били су резистентнији на пеницилин, еритромицин, клиндамицин, гентамицин и цiproфлоксацин (100%, 100%, 29,2%, 65,6% и 53,1%, редом) него осетљиви на метицилин (93,6%,

64,9%, 12%, 28,9% и 11,7%, редом). Индуцибилни фенотип резистентан на клиндамицин је био доминантан код изолата *S. aureus* и стафилокока негативних на коагулазу. Изолати *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* и *S. agalactiae* показали су веома високу резистенцију на еритромицин (77,8%, 46,2% и 32,4%, редом). Сви изолати стафилокока и стрептокока били су осетљиви на ванкомицин и линезолид, а сви изолати бета-хемолитичких стрептокока на пеницилин и цефтриаксон.

**Закључак** Фенотипска тријажа стафилокока је неопходна да би се одвојили индуцибилно резистентни од изолата стварно осетљивих на клиндамицин. Макролиди се не препоручују за емпиријску терапију стрептококних инфекција. Пеницилин остаје лек избора за третман стафилококних инфекција у нашем округу.

**Кључне речи:** стафилококе; стрептококе; МЛС фенотипови резистенције; индуцибилна резистенција на клиндамицин



# Prevalence of Genotypes That Determine Resistance of Staphylococci to Macrolides and Lincosamides in Serbia

Milena Mišić<sup>1</sup>, Jelena Čukić<sup>2</sup>, Dejan Vidanović<sup>3</sup>, Milanko Šekler<sup>3</sup>, Sanja Matic<sup>4</sup>, Mihailo Vukašinović<sup>4</sup> and Dejan Baskić<sup>2,5\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Public Health Institute Vranje, Vranje, Serbia, <sup>2</sup> Department of Clinical Microbiology, Laboratory for Virology, Serology, Immunology and Molecular Diagnostics, Public Health Institute Kragujevac, Kragujevac, Serbia, <sup>3</sup> Department of Laboratory Diagnostics, National Reference Laboratory for Avian Influenza and Newcastle Disease of Poultry Republic of Serbia, Veterinary Specialized Institute Kraljevo, Kraljevo, Serbia, <sup>4</sup> Faculty of Medical Sciences, Doctoral Studies, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia, <sup>5</sup> Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Roza Adany,  
University of Debrecen, Hungary

### Reviewed by:

Aleksandra Kovačević,  
Military Medical Academy, Serbia  
Mariela Deliverska,  
Medical University, Sofia, Bulgaria

### \*Correspondence:

Dejan Baskić  
dejan.baskic@gmail.com

### Specialty section:

This article was submitted  
to Health Economics,  
a section of the journal  
Frontiers in Public Health

**Received:** 15 June 2017

**Accepted:** 24 July 2017

**Published:** 28 August 2017

### Citation:

Mišić M, Čukić J, Vidanović D, Šekler M, Matic S, Vukašinović M and Baskić D (2017) Prevalence of Genotypes That Determine Resistance of Staphylococci to Macrolides and Lincosamides in Serbia. *Front. Public Health* 5:200. doi: 10.3389/fpubh.2017.00200

Macrolides, lincosamides, and streptogramins (MLS) resistance genes are responsible for resistance to these antibiotics in *Staphylococcus* infections. The purpose of the study was to analyze the distribution of the MLS resistance genes in community- and hospital-acquired *Staphylococcus* isolates. The MLS resistance phenotypes [constitutive resistance to macrolide–lincosamide–streptogramin B (cMLSb), inducible resistance to macrolide–lincosamide–streptogramin B (iMLSb), resistance to macrolide/macrolide–streptogramin B (M/MSb), and resistance to lincosamide–streptogramin A/streptogramin B (LSa/b)] were determined by double-disc diffusion method. The presence of the MLS resistance genes (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA/B*, *InuA*, *InuB*, and *IsaA*) were determined by end-point polymerase chain reaction in 179 isolates of staphylococci collected during 1-year period at the Center for Microbiology of Public Health Institute in Vranje. The most frequent MLS phenotype among staphylococcal isolates, both community-acquired and hospital-acquired, was iMLSb (33.4%). The second most frequent was M/MSb (17.6%) with statistically significantly higher number of hospital-acquired staphylococcal isolates ( $p < 0.05$ ). MLS resistance was mostly determined by the presence of *msrA/B* (35.0%) and *ermC* (20.8%) genes. Examined phenotypes were mostly determined by the presence of one gene, especially by *msrA/B* (26.3%) and *ermC* (14.5%), but 15.6% was determined by a combination of two or more genes. M/MSb phenotype was the most frequently encoded by *msrA/B* (95.6%) gene, LSa/b phenotype by *InuA* (56.3%) gene, and iMLSb phenotype by *ermC* (29.4%) and *ermA* (25.5%) genes. Although cMLSb phenotype was mostly determined by the presence of *ermC* (28.9%), combinations of two or more genes have been present too. This pattern was particularly recorded in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (58.3%) and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCNS) (90.9%) isolates with cMLSb phenotype. The *msrA/B* gene and M/MSb phenotype were statistically significantly higher in hospital-acquired than community-acquired staphylococci strains ( $p < 0.05$ ). There are

no statistically significant differences between staphylococci harboring the rest of MLS resistance genes acquired in community and hospital settings ( $p > 0.05$ ). The prevalence of iMLSb phenotypes may change over time, so it is necessary to perform periodic survey of MLS resistance phenotypes, particularly where the D-test is not performed routinely.

**Keywords:** staphylococci, MLS resistance, resistance phenotypes, *erm* genes, polymerase chain reaction genotyping, hospital-acquired infection, community-acquired infection

## INTRODUCTION

The *Staphylococcus* spp. includes at least 40 species, some of them may cause a wide variety of diseases in humans and animals, while some of them are generally non-pathogenic and considered to be commensal. *Staphylococcus aureus* is one of the most important bacteria that cause skin and soft tissue infections and number of serious other medical problems in human. Today, coagulase-negative staphylococci (CNS), as opportunists, become one of a major cause of hospital acquired infection (1).

Since *Staphylococcus* spp. has become resistant to many important antibiotics, the possibility that “older” compounds such as erythromycin and clindamycin still have ability to maintain the efficiency is very important to keep new resistance from developing. Over the past decade, an excessive and inappropriate use of antibiotics for human and animal treatment, as well as, animal feed supplements for growth promotion, has led to an increase in a number of staphylococci acquiring cross-resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins (MLS) antibiotics.

The mechanisms of resistance to MLS antibiotics are mainly related to the inhibition of protein synthesis. This can be mediated by several mechanisms: (a) ribosomal binding site modification (by methylation or mutation in the 23S rRNA gene) encoded by *erm* genes (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermY*, and *ermF*), (b) active efflux mediated by *msrA/B* gene, and (c) enzymatic modification of antibiotics (2).

The dimethylation of adenine A2058, at the N6 position which is located in the region of the peptidyl transferase loop in domain V of 23S rRNA in the 50S ribosomal subunit of bacteria, leads to cross-resistance between macrolides, lincosamides, and streptogramin group B (MLSb) (2). The family of genes responsible for this methylation is named *erm* (erythromycin ribosomal methylase) and now there are 21 different classes of identified *erm* genes (3). Since the erythromycin binding site on the 50S ribosome subunit overlaps the binding site of the newer MLSb, the modification by methylase(s) reduces the binding of all three classes of antibiotics, causing MLSb resistance phenotype (4).

The expression of *erm* genes is manifested as either constitutive or inducible macrolides, lincosamides, and streptogramin B phenotype [constitutive resistance to macrolide–lincosamide–streptogramin B (cMLSb) or inducible resistance to macrolide–lincosamide–streptogramin B (iMLSb)]. In iMLSb phenotype, the bacteria produce inactive methylase mRNA, which becomes active only in the presence of a macrolide as an inducer. In the presence of inducer (erythromycin) a rearrangement of the mRNA occurs, allowing the methylase-coding sequence translation (5). In contrast, in bacteria showing cMLSb resistance phenotype, active methylase mRNA is produced in the absence of an inducer.

The active efflux of antibiotics is the second important mechanism of resistance in staphylococci. The *msrA*, *msrB*, and newly discovered *msrC* gene encode the ATP-dependent efflux pump (ABC), which determines resistance to 14-membered and 15-membered macrolides and streptogramin type B in *Staphylococcus* spp. (MSb resistance phenotype) (6). An active efflux ABC transporter-like transmembrane protein is encoded by *lsa* genes: *lsaA* and *lsaC*. It belongs to mechanism of resistance mediated by active efflux of antibiotics, causing the resistance to lincosamides and streptogramin type A phenotype (7).

In contrast to MLSb resistance phenotype, specific resistance to lincosamides and streptogramin type B (LSb) is mediated by enzymatic inactivation of the antibiotic. The most important enzymes that modify antibiotics are lincosamide nucleotidyl transferases encoded by *lnu* genes (formerly *lin*): *lnuA* and *lnuB* genes. In staphylococci, these enzymes are responsible for resistance to lincosamides and streptogramin type B phenotype (8).

Macrolides, lincosamides, and streptogramins resistance genes are responsible for resistance to MLS in community- and hospital-acquired *Staphylococcus* infections. Therefore, the purpose of the study was to analyze the distribution of the MLS resistance genes in *Staphylococcus* isolates and their distribution among community- and hospital-acquired isolates.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial Strains

A total of 1,643 staphylococcus isolates collected during 1-year period at the Center for Microbiology of Public Health Institute in Vranje were obtained from various clinical specimens including nasal and throat swabs, purulent discharge, and genital secretions, originating from both outpatient and inpatient populations. Multiple specimens from the same patient were avoided. The presence of the MLS resistance genes: *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA/B*, *lnuA*, *lnuB*, and *lsaA* was determined in 179 staphylococcal isolates

**Abbreviations:** MLS, macrolides, lincosamides, and streptogramins; Er/Cl<sub>i</sub> S, susceptibility to erythromycin and clindamycin; cMLSb, constitutive resistance to macrolide–lincosamide–streptogramin B; M/MSb, resistance to macrolide/macrolide–streptogramin B; iMLSb, inducible resistance to macrolide–lincosamide–streptogramin B; LSA/b, resistance to lincosamide–streptogramin A/streptogramin B; MSSA, methicillin-sensitive *S. aureus*; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*; MSCNS, methicillin-sensitive coagulase-negative staphylococci; MRCNS, methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci; PCR, polymerase chain reaction; CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute.

by end-point polymerase chain reaction (PCR). The bacterial DNA extraction and amplification of the specific resistance genes were performed at the Center for Microbiology Institute of Public Health in Kragujevac, Serbia.

The local ethics committee approved the study according to the Declaration of Helsinki (No. 01-5072/2013). The authors declare that informed consent was not required.

## Isolation and Identification

Isolation and identification of bacterial strains were performed using routine microbiological tests. The strains were identified to the species or genus level by the conventional microbiological methods.

## Determination of Resistance Phenotypes

All recovered isolates were tested by the double-disc diffusion method. The MLS resistance phenotypes: cMLSb, iMLSb, resistance to macrolide/macrolide–streptogramin B (M/MSb), and resistance to lincosamide–streptogramin A/streptogramin B (LSa/b) were determined by double-disc diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute recommendations (9). Erythromycin (15 µg) and clindamycin (2 µg) disks were placed at an edge-to-edge distance of 12 mm on inoculated Mueller–Hinton agar. Resistance to erythromycin and clindamycin indicates a constitutive MLSb resistance (cMLSb). The clindamycin diffusion zone which was blunted proximal to the erythromycin disk or showing D shape was considered as inducible type of resistance (iMLSb phenotype). Susceptibility to clindamycin and resistance to erythromycin defined the M/MSb phenotype. The isolates resistant to clindamycin and sensitive to erythromycin were defined as LSa/b phenotype.

## Isolation of Bacterial DNA

Bacterial DNA were extracted by PrepMan Ultra sample Preparation Reagent (Applied Biosystems, Inc.), according to the manufacturer's guidelines. All extracted DNA samples were stored at –70°C prior to further analysis.

## Identification of Genes by Multiplex PCR

The sequences of the primers are presented in **Table 1**. PCR conditions for the primer sets have been as previously described by Rizzotti et al., Matsuoka et al., Lozano et al., and Singh and Murray in their studies (10–13). The final volume of each PCR reaction was 50 µl and contained 2 µl of genomic DNA, 1 µl of each primer (Invitrogen), 25 µl of Maxima® Hot Start Green PCR Master Mix (Fermentas), and 21 µl of DEPC H<sub>2</sub>O. Positive and negative controls were included in each assay. The reactions were performed using the Sa Cyler-96 thermocycler (Sacace Biotechnologies S.r.l. Como, Italy), whereas the PCR products were detected by gel electrophoresis on the E-Gel iBase (Invitrogen) in 2% (w/v) agarose gel (E-Gel® 2%, Invitrogen) and visualized on the Gel Doc XR System, including an ultraviolet light transilluminator (Bio-Rad) (14).

## Statistics

Fisher's exact test is used to compare two proportions at a significance level of  $p < 0.05$ . The results of the experiments are presented in tables and figures.

## RESULTS

Among 1,643 examined isolates of staphylococci, 944 were identified as *S. aureus*. The rest of 699 isolates were characterized as CNS. Those isolates were further characterized by double-disc diffusion method to determine the MLS resistance phenotype. However, the largest number of staphylococcal isolates showed sensitivity to both macrolide and lincosamide (39.1%). Among staphylococcal isolates the most common resistance phenotype was iMLSb (33.4%), the second most prevalent was M/MSb (17.6%). cMLSb phenotype was detected in only 8.9% of staphylococcal isolates, and the rarest detected resistance phenotype was LSa/b (1%).

Distribution of MLS resistance phenotypes by origin of the staphylococcal isolate (community acquired versus nosocomial) is presented in **Table 2**. The most frequent MLS phenotype among staphylococci isolates, both community-acquired and hospital-acquired, was iMLSb. There were no statistically significant differences between community- and hospital-acquired staphylococci isolates showing iMLSb, cMLSb, LSa/b phenotype, and sensitivity to both erythromycin and clindamycin ( $p > 0.05$ ). However, there was statistically significantly higher number of hospital-acquired staphylococcal isolates showing M/MSb phenotype ( $p < 0.05$ ) (**Table 2**).

One hundred and 79 strains of staphylococcus isolates showing different MLS phenotypes were selected for further analysis. End-point PCR was performed to detect clinically relevant MLS resistance genes. The most commonly detected MLS resistance genes among staphylococci isolates were *msrA/B*, followed by *erm* genes: *ermC*, *ermB*, and *ermA*. In 9.8% of staphylococcal

**TABLE 1** | Primer sequences and PCR fragment size of tested MLS resistance genes.

Gene	Primers sequence (5'–3')	PCR fragment size (bp)	Reference
<i>ermA</i>	F: TCTAAAAAGCATGTAAGAA	645	(10)
	R: CTTCGATAGTTTATTAATATTAG		
<i>ermB</i>	F: GAAAAGTACTCAACCAATA	639	(10)
	R: AGTAACGGTACTTAAATTGTTTA		
<i>ermC</i>	F: TCAAACATAATATAGATAAA	642	(10)
	R: GCTAATATTGTTAAATCGTCAAT		
<i>msrA</i>	F: GGCACAATAAGAGTGTTTAAAGG	940	(11)
	R: AAGTTATATCATGAATAGATTGTCCTGTT		
<i>msrB</i>	F: TATGATATCCATAATAATTCCAATC	595	(11)
	R: AAGTTATATCATGAATAGATTGTCCTGTT		
<i>lnuA</i>	F: GGTGGCTGGGGGGTAGATGTATTAACCTGG	323	(12)
	R: GCTTCTTTTGAATAACATGGTATTTTCGATC		
<i>lnuB</i>	F: CCTACCTATTGTTTGTGGAA	925	(12)
	R: ATAACGTTACTCTCCTATTC		
<i>lsaA</i>	F: GGCAATCGCTTGTGTTTATAGCG	1,200	(13)
	R: GTGAATCCCATGATGTTGATACC		

MLS, macrolides, lincosamides, and streptogramins; PCR, polymerase chain reaction.

isolates showing iMLSb, M/MSb, or LSA/b resistance phenotype, MLS resistance genes have not been found.

The observed MLS phenotypes of resistance were the most frequently determined by a single gene, and those genes mostly were *msrA/B* and *ermC*. However, these phenotypes were also

determined by combinations of two or more resistance genes and the most common detected gene combinations were *ermC* + *msrA/B*, *ermB* + *lsaA*, and *ermB* + *msrA/B*.

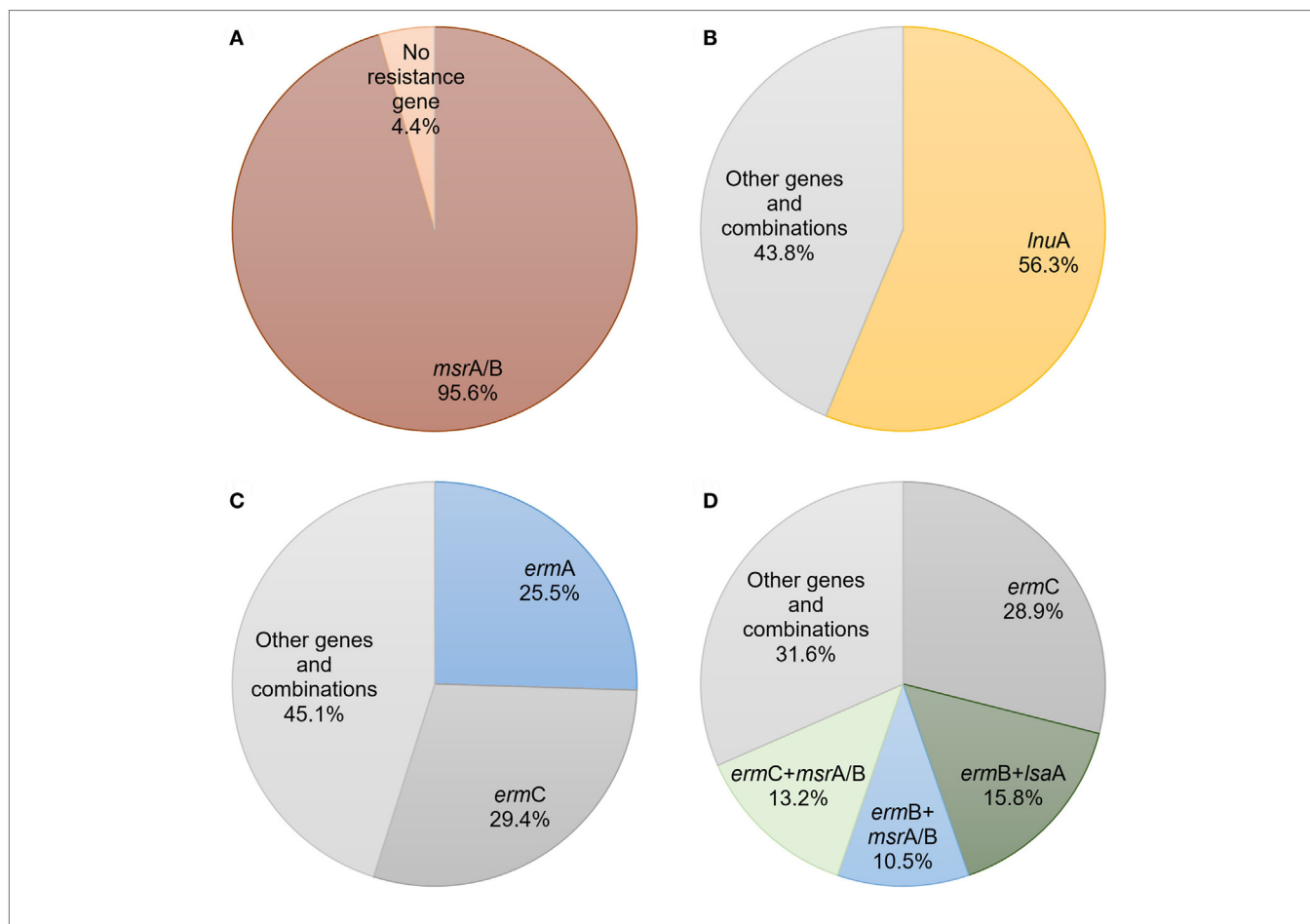
*ermA* and *ermC* genes were the most common in methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) isolates, while *ermB* gene was the most frequent among methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCNS). The greatest presence of *lnuA* genes was detected in methicillin-sensitive coagulase-negative staphylococci (MSCNS), whereas *lsaA* gene was, as a single case, detected only in *S. aureus* isolates. The highest percentage of *msrA/B* gene was identified in MSCNS. The combinations of two or more resistance genes were the most common in methicillin-resistant staphylococci isolates (Table S1 in Supplementary Material).

M/MSb resistance phenotype was mostly determined by *msrA/B* (95.6%) (Figure 1A), while LSA/b phenotype was mostly determined by *lnuA* gene (56.3%) (Figure 1B). *ermC* (29.4%) and *ermA* (25.5%) were the most prevalent genes determined as a single gene iMLSb phenotype (Figure 1C). However, *ermC* (28.9%) was the most common gene in staphylococcal isolates with cMLSb-resistant phenotype. This phenotype was also characterized by the presence of great number of combinations with two or more resistance genes. The most common gene combinations in these

**TABLE 2** | Distribution of MLS resistance phenotypes by origin of the staphylococcal isolate (community-acquired versus hospital-acquired); *p*-value < 0.05 is considered as statistically significant.

	Staphylococcus spp., n (%)		
	Community-acquired	Hospital-acquired	<i>p</i> -Value
Er/Cli S	546 (39.9)	97 (35.1)	0.16
cMLSb	128 (9.3)	19 (6.8)	0.20
M/MSb	218 (15.9)	71 (25.7)	0.0001
iMLSb	461 (33.7)	87 (31.5)	0.52
LSa/b	14 (1.0)	2 (0.7)	1.0
Total	1,367 (100.0)	276 (100.0)	

*Er/Cli S*, susceptibility to erythromycin and clindamycin; *cMLSb*, constitutive resistance to macrolide–lincosamide–streptogramin B; *M/MSb*, resistance to macrolide/macrolide–streptogramin B; *iMLSb*, inducible resistance to macrolide–lincosamide–streptogramin B; *LSa/b*, resistance to lincosamide–streptogramin A/streptogramin B.



**FIGURE 1** | The prevalence and expression of macrolides, lincosamides, and streptogramins resistance genes and their combinations among different phenotypes of staphylococcal isolates: (A) resistance to macrolide/macrolide–streptogramin B; (B) resistance to lincosamide–streptogramin A/streptogramin B; (C) inducible resistance to macrolide–lincosamide–streptogramin B; (D) constitutive resistance to macrolide–lincosamide–streptogramin B.



isolates were *ermB* + *lsaA* (15.8%), *ermC* + *msrA/B* (13.2%), and *ermB* + *msrA/B* (10.5%) (Figure 1D) (Table S2 in Supplementary Material). This trend was especially observed in methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) (58.3%) and MRCNS (90.9%) strains. Combinations of genes predominantly determined cMLSb phenotype in methicillin-resistant staphylococci. In accordance with this observation, in one MRCNS strain the combination of four genes (*ermB* + *lnuA* + *lnuB* + *lsaA*) has been detected.

Distribution of MLS resistance genes and their combinations by origin of the staphylococcal isolate are shown in Table 3. The *msrA/B* gene was statistically significantly more common in hospital-acquired staphylococci isolates than in community-acquired staphylococci strains ( $p < 0.05$ ). There are no statistically significant differences between percentage of staphylococci harboring the rest of MLS resistance genes acquired in community and hospital settings ( $p > 0.05$ ).

## DISCUSSION

Soon after penicillin was introduced, *S. aureus* strains resistant to penicillin had been found. These penicillin-resistant *S. aureus* strains first became prevalent in health-care settings but then, these strains have also been spread into the community. Rapidly after introduction of newer antibiotics such as methicillin, erythromycin, and clindamycin, *S. aureus* and some other staphylococci species have become resistant to those and other antibiotics. Finally, multidrug-resistant *Staphylococcus* strains have evolved, often causing infections with a fatal outcome (15). Multidrug-resistant *S. aureus* and CNS have become a common cause of both hospital- and community-acquired infection. The necessity in phenotypic and genotypic tests for discovering

resistance in clinically relevant staphylococci has become clearer with the occurrence of strains having borderline minimum inhibitory concentrations of antibiotics. Identifying MLS resistance phenotype is very important, because iMLSb phenotype under intensive antibiotic selective pressure converts into cMLSb phenotype and may lead to treatment failure in patients with serious staphylococcal infection (16).

In our study, the greatest number of staphylococcal isolates showed sensitivity to both macrolide and lincosamide and the most frequent phenotype of resistance was iMLSb, while cMLSb phenotype was almost the rarest MLS resistance phenotype. This pattern of MLS resistance was the same among community- and hospital-associated staphylococcal isolates. Different distribution of MLS resistance phenotype among methicillin-resistant staphylococci isolates in India has been reported by Zachariah et al. (16). They found that the most prevalent phenotype was M/MSb, and the second most prevalent phenotype was iMLSb. In contrast, Hamilton-Miller and Shah, Fokas et al. have found that iMLSb phenotype was more prevalent in relation to the other phenotypes (17, 18), data similar to our study. The distribution of MLS resistance phenotypes may vary depending on geographic area and even the type of patient. This difference occurs because of various prescription and consumption rates of macrolides and lincosamides in different geographical regions and even institutions in the same region because of different origins of the isolates (hospital- versus community-acquired) (19). In our study, we found that M/MSb phenotype was significantly higher in inpatient than outpatient isolates ( $p < 0.05$ ). Similarly, we have detected that *msrA* gene determining M/MSb phenotype more frequently in hospital-acquired than in community-acquired staphylococcal isolates ( $p < 0.05$ ). This finding suggests importance of phenotypic differentiation of truly clindamycin sensitive from false clindamycin-sensitive staphylococci (iMLSb), especially for staphylococci isolates from hospital environments. In contrast, Lall and Sahni suggested a higher prevalence of iMLSb in health care-associated *Staphylococcus* than community associated (86.5 versus 13.4%, respectively) (20). Yet, the implication of their study is the same as ours.

The molecular analysis identified the *msrA* gene, encoding active efflux pumps in staphylococci bacterial cells, as the most frequent MLS resistance gene. More than half of the macrolide-resistant isolates of staphylococci harbored the *msrA* gene either alone or in combination with *erm* genes. Recent studies demonstrated similar results (21, 22). The *ermC* gene was the most common among all *erm* genes in both *S. aureus* and CNS exhibiting cMLSb or iMLSb phenotype. Similar data were reported by Juda et al. (23). In Brazil, Coutinho et al. (24) reported low frequency of the *ermB* gene, data which did not differ from our study. However, there was only a small number of staphylococcal isolates with the unusual LSa/b phenotype harboring *lnuA* and *lsaA* genes, in this study. These results are in line with the studies of Singh and Murray and Deng et al. (13, 25). The most common detected gene combinations in our study were *ermC* + *msrA/B*, *ermB* + *lsaA*, and *ermB* + *msrA/B*. As expected, we identified the greatest number of resistance gene combinations in methicillin-resistant staphylococci isolates. Likewise,

**TABLE 3** | Distribution of macrolides, lincosamides, and streptogramins resistance genes by origin of the staphylococcal isolate (community-acquired versus hospital-acquired);  $p$ -value  $< 0.05$  is considered as statistically significant.

	<i>Staphylococcus</i> spp., n (%)		
	Community-acquired	Hospital-acquired	$p$ -Value
<i>ermA</i>	13 (8.6)	1 (3.4)	0.47
<i>ermB</i>	4 (2.6)	2 (6.9)	0.25
<i>ermC</i>	24 (16.0)	2 (6.9)	0.26
<i>lnuA</i>	7 (4.6)	3 (10.3)	0.21
<i>lsaA</i>	2 (1.3)	0	1.00
<i>msrA/B</i>	34 (22.6)	13 (44.8)	0.02
<i>ermA</i> + <i>ermC</i>	1 (0.6)	0	1.00
<i>ermA</i> + <i>msrA/B</i>	2 (1.3)	0	1.0
<i>ermB</i> + <i>ermC</i>	1 (0.6)	0	1.0
<i>ermB</i> + <i>lsaA</i>	5 (3.3)	1 (3.4)	1.0
<i>ermB</i> + <i>msrA/B</i>	4 (2.6)	0	1.0
<i>ermC</i> + <i>lsaA</i>	1 (0.6)	0	1.0
<i>ermC</i> + <i>msrA/B</i>	7 (4.6)	1 (3.4)	1.0
<i>lnuA</i> + <i>lnuB</i>	1 (0.6)	0	1.0
<i>msrA/B</i> + <i>lsaA</i>	1 (0.6)	0	1.0
<i>ermB</i> + <i>msrA/B</i> + <i>lsaA</i>	0	1 (3.4)	0.16
<i>ermC</i> + <i>msrA/B</i> + <i>lnuA</i>	1 (0.6)	0	1.0
<i>ermB</i> + <i>lnuA</i> + <i>lnuB</i> + <i>lsaA</i>	1 (0.6)	0	1.0
No resistance gene	41 (27.3)	5 (17.2)	0.35
Total	150 (100)	29 (100)	

the simultaneous presence of two or more MLS resistance genes in the same staphylococcal isolate has been reported previously for hospital-acquired MRSA and MRCNS isolates in Argentina, USA, and Poland, respectively (26–28). We proposed that the majority of isolates with simultaneous presence of two or more MLS resistance genes would have been found among strains isolated from inpatients. Regardless of our expectation, there were no significant differences in number of staphylococcal isolates with MLS gene combinations between hospital- and community-acquired strains ( $p > 0.05$ ). 9.8% of our isolates showing iMLSb, M/MSb, or LSA/b resistance phenotype had no MLS resistance gene. Similar finding has been reported in other studies (19, 29).

In the present study, the highest percentage of *msrA/B* gene was identified in MSCNS. Macrolide resistance due to *msrA* was more prevalent in CNS than in *S. aureus*. Similar data were observed in one study (30), whereas in other studies, the presence of *msrA/B* genes has been reported in different rates (31–33). In our study, *ermA* and *ermC* genes were most common in MSSA isolates. In contrast, Westh et al. (34) detected that *ermA* gene is most common in MRSA isolates, whereas *ermC* gene was mostly found among their MRCNS isolates. We found *ermB* gene mostly among MRCNS, whereas in the study conducted by Bouchami et al. *ermB* has not been detected in staphylococci (35). In our study, *lnuA* gene was the most commonly detected in MSCNS and similar, almost the same, results were found in study by Lina et al. (36). For the first time, we detected *lsaA* gene as a single gene in *S. aureus* isolates. *lsaA* gene in enterococci encodes a protein, similar to ABC transporters, which export antimicrobials belonging to the MLS family (37). The *lsaA* gene as an intrinsic gene of *Enterococcus faecalis* showed a high degree of similarity to a novel gene encoding the ABC transporter (*lsaE* gene), which has been already detected in staphylococci. Transfer of resistance from enterococci to *S. aureus* has also been reported to occur for the tetracycline resistance gene *tetL* and the trimethoprim resistance gene *dfpK* (38). Yet, the *lsaA* gene, originating from *Enterococcus* spp. (39), has never been reported before for *S. aureus*.

In our study, M/MSb resistance phenotype in staphylococci isolates was mostly determined by *msrA/B*, while LSA/b phenotype was mostly determined by *lnuA* gene. *ermC* and *ermA* were the most prevalent single genes determining iMLSb phenotype. In other studies, the presence of *ermC* and *ermA* genes has been reported with different rates (19, 29, 33, 40, 41). However, *ermC* gene was the most common gene in staphylococcal isolates with cMLSb-resistant phenotype. This result is in accordance to the previous report (42). cMLSb phenotype was also characterized by the presence of great number of gene combinations: *ermB* + *lsaA*, *ermC* + *msrA/B*, and *ermB* + *msrA/B*. This trend was particularly observed in MRSA and MRCNS strains, where these combinations of genes predominantly determined cMLSb phenotype. In accordance with this observation, in one MRCNS strain the combination of four genes (*ermB* + *lnuA* + *lnuB* + *lsaA*) has been detected. Hosseini et al. have come across pattern of similar kind (43).

After all, according to all investigated staphylococci, the iMLSb was the most frequently occurring phenotype. The most frequently isolated MLS resistance genes among staphylococci were *msrA/B* and *ermC*. M/MSb (*msrA/B*), LSA/b (*lnuA*), and

iMLSb (*ermA/C*) were dominantly determined with a single gene. cMLSb phenotype was mostly determined by *ermC* and combinations of genes (*ermC* + *msrA/B* and *msrA/B* + *lsaA*). The M/MSb phenotype and *msrA/B* gene that determine this phenotype were significantly more frequent in staphylococci acquired in hospital than in community. Based on these results, clindamycin can be used for empiric antimicrobial therapy for infections such as skin and soft tissue infections in inpatients, before the individual's laboratory results of *in vitro* antibiotic susceptibility testing are available.

However, the iMLSb phenotype was the most common in our study, either among community- or hospital-acquired *Staphylococcus* isolates. Therefore, the big concern remains for patients with severe staphylococcal infection treated with clindamycin, they could be at risk of unsuccessful treatment and poor outcome if staphylococcal isolates showed inducible clindamycin resistance (44). The simple test like D-test on staphylococcal strains can separate the isolates with genetic mechanism for the development of clindamycin resistance during therapy from those that are truly susceptible to clindamycin. If we do not perform routinely D-test, all strains of staphylococci including those with iMLSb resistance phenotype will be reported as clindamycin sensitive. On the contrary, if all erythromycin-resistant staphylococcal strains are declared as a resistant to clindamycin, a safe and effective antibiotic will be omitted from the treatment in patients infected with isolates carrying an active efflux mechanism that confers only resistance to macrolides (35). In our study, we reported that 56.7% actually (M/MSb and susceptibility to erythromycin and clindamycin) and 33.4% falsely (iMLSb) clindamycin-sensitive *Staphylococcus* spp. strains have led to such a small percentage of clindamycin resistance 9.9% (cMLSb and LSA/b) instead of 49.0% (iMLSb and cMLSb and LSA/b) among staphylococcal isolates. Therefore, it is necessary to monitor the prevalence of iMLS phenotype, especially in areas where the occurrence of methicillin-resistant staphylococcal strains resulted in empirical use of macrolides and lincosamides for the treatment of staphylococcal infections. The prevalence of iMLSb phenotypes may change over time, so it is necessary to perform sporadically survey of MLS resistance phenotypes, particularly where the D-test is not performed routinely.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MM contributed to the conception, design, and drafting of the study, data acquisition and processing, and writing of the manuscript. JČ contributed to the conception of the study, data acquisition, and corrected the manuscript. DV contributed to the design of the study, data analysis and interpretation, and corrected the manuscript. MŠ contributed to the conception of the study, data analysis and interpretation, and corrected the manuscript. SM contributed to the conception of the study, data analysis and interpretation, and drafting of the study. MV contributed to the conception and design of the study, data analysis and interpretation, and corrected the manuscript. DB contributed to the conception and design of the study, guided in data acquisition, analysis, and interpretation, and corrected the manuscript.

## FUNDING

This study was supported by the Ministry of Science and Technology of the Republic of Serbia under Grant Number III41010.

## REFERENCES

- Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* (2014) 27:870–926. doi:10.1128/CMR.00109-13
- Leclercq R, Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother* (1991) 35:1267–72. doi:10.1128/AAC.35.7.1273
- Roberts MC, 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.
- Li L, Feng W, Zhang Z, Xue H, Zhao X. Macrolide-lincosamide-streptogramin resistance phenotypes and genotypes of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine mastitis. *BMC Vet Res* (2015) 11:168. doi:10.1186/s12917-015-0492-8
- Schwendener S, Vincent Perreten V. New MLSB resistance gene erm(43) in *Staphylococcus lentus*. *Antimicrob Agents Chemother* (2012) 56:4746–52. doi:10.1128/AAC.00627-12
- Duran N, Ozer B, Duran GG, Onlen Y, Demir C. Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci. *Indian J Med Res* (2012) 135:389–96.
- Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. *Virulence* (2012) 3:421–33. doi:10.4161/viru.21282
- Sundlov JA, Gulick AM. Insights into resistance against lincosamide antibiotics. *Structure* (2009) 17:1549–50. doi:10.1016/j.str.2009.11.001
- CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 21th Informational Supplement M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (2011).
- Rizzotti L, Simeoni D, Cocconcelli P, Gazzola S, Dellaglio F, Torriani S. Contribution of enterococci to the spread of antibiotic resistance in the production chain of swine meat commodities. *J Food Prot* (2005) 68:955–65. doi:10.4315/0362-028X-68.5.955
- Matsuoka M, Jánosi L, Endou K, Nakajima Y. Cloning and sequences of inducible and constitutive macrolide resistance genes in *Staphylococcus aureus* that correspond to an ABC transporter. *FEMS Microbiol Lett* (1999) 181:91–100. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb08830.x
- Lozano C, Aspiroz C, Sáenz Y, Ruiz-García M, Royo-García G, Gómez-Sanz E, et al. Genetic environment and location of the lnu(A) and lnu(B) genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci of animal and human origin. *J Antimicrob Chemother* (2012) 67:2804–8. doi:10.1093/jac/dks320
- Singh KV, Murray BE. Differences in the *Enterococcus faecalis* lsa locus that influence susceptibility to quinupristin-dalfopristin and clindamycin. *Antimicrob Agents Chemother* (2005) 49:32–9. doi:10.1128/AAC.49.1.32-39.2005
- Wen D, Zhang C. Universal multiplex PCR: a novel method of simultaneous amplification of multiple DNA fragments. *Plant Methods* (2012) 8:32. doi:10.1186/1746-4811-8-32
- Healy CM, Hulten KG, Palazzi DL, Campbell JR, Baker CJ. Emergence of new strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. *Clin Infect Dis* (2004) 39:1460–6. doi:10.1086/425321
- Zachariah R, Basireddy S, Kabra V, Singh M, Ali S, Sardar A. Phenotypic characterization of macrolide and lincosamide resistance patterns in clinical isolates of staphylococci. *J Dr NTR Univ Health Sci* (2016) 5:187–91. doi:10.4103/2277-8632.191847
- Hamilton-Miller JMT, Shah S. Patterns of phenotypic resistance to the macrolide-lincosamide-ketolide-streptogramin group of antibiotics in staphylococci. *J Antimicrob Chemother* (2000) 46:941–9. doi:10.1093/jac/46.6.941
- Fokas S, Fokas S, Tsironi M, Kalkani M, Dionysopoulou M. Prevalence of inducible clindamycin resistance in macrolide-resistant *Staphylococcus* spp. *Clin Microbiol Infect* (2005) 11:337–40. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01101.x
- Aktas Z, Aridogan A, Kayacan CB, Aydin D. Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in *Staphylococcus* isolated in Istanbul, Turkey. *J Microbiol* (2007) 45:286–90.
- Lall M, Sahni AK. Prevalence of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. *Med J Armed Forces India* (2014) 70:43–7. doi:10.1016/j.mjafi.2013.01.004
- Lenart-Boroń A, Wolny-Koładka K, Stec J, Kasprovic A. Phenotypic and molecular antibiotic resistance determination of airborne coagulase negative *Staphylococcus* spp. strains from healthcare facilities in Southern Poland. *Microb Drug Resist* (2016) 22:515–22. doi:10.1089/mdr.2015.0271
- Goudarzi G, Farzad Tahmasbi F, Anbari K, Ghafarzadeh M. Distribution of genes encoding resistance to macrolides among staphylococci isolated from the nasal cavity of hospital Employees in Khorramabad, Iran. *Iran Red Crescent Med J* (2016) 18:e25701. doi:10.5812/ircmj.25701
- Juda M, Chudzik-Rzad B, Malm A. The prevalence of genotypes that determine resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins B compared with spiramycin susceptibility among erythromycin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2016) 111:155–60. doi:10.1590/0074-02760150356
- Coutinho VL, Paiva RM, Reiter KC, de-Paris F, Barth AL, Machado AB. Distribution of erm genes and low prevalence of inducible resistance to clindamycin among staphylococci isolates. *Braz J Infect Dis* (2010) 14:564–8. doi:10.1016/S1413-8670(10)70113-6
- Deng F, Wang H, Liao Y, Li J, Fessler AT, Geovana BM, et al. Detection and genetic environment of pleuromutilin-lincosamide-streptogramin a resistance genes in staphylococci isolated from pets. *Front Microbiol* (2017) 8:234. doi:10.3389/fmicb.2017.00234
- Faccione D, Togneri AM, Podesta L, Perez M, Gagetti P, Sanchez S, et al. MRSA pediatric clone expressing ermC plus lnuA genes causing nosocomial transmission and healthcare workers colonization in a neonatal intensive care unit. *Infect Genet Evol* (2014) 25:78–80. doi:10.1016/j.meegid.2014.04.005
- Szczuka E, Makowska N, Bosacka K, Słotwińska A, Kaznowski A. Molecular basis of resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins in *Staphylococcus hominis* strains isolated from clinical specimens. *Folia Microbiol (Praha)* (2016) 61:143–7. doi:10.1007/s12223-015-0419-6
- Steward CD, Raney PM, Morrell AK, Williams PP, McDougal LK, Jevitt L, et al. Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* (2005) 43:1716–21. doi:10.1128/JCM.43.4.1716-1721.2005
- Moosavian M, Shoja S, Rostami S, Torabipour M, Farshadzadeh Z. Inducible clindamycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to erm genes, Iran. *Iran J Microbiol* (2014) 6:421–7.
- Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Bakhrouf A. Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Notes* (2011) 4:453. doi:10.1186/1756-0500-4-453
- Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML, Jorgensen JH. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* (2003) 41:4740–4. doi:10.1128/JCM.41.10.4740-4744.2003
- Novotna G, Adamkova V, Janata J, Melter O, Spizek J. Prevalence of resistance mechanisms against macrolides and lincosamides in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the Czech Republic and occurrence of an undefined mechanism of resistance to lincosamides. *Antimicrob Agents Chemother* (2005) 49:3586–9. doi:10.1128/AAC.49.8.3586-3589.2005
- Cetin ES, Gunes H, Kaya S, Aridogan BC, Demirci M. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among clinical staphylococcal isolates in a Turkish university hospital. *J Microbiol Immunol Infect* (2010) 43:524–9. doi:10.1016/S1684-1182(10)60081-3

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2017.00200/full#supplementary-material>.



34. Westh H, Hougaard DM, Vuust J, Rosdahl VT. erm genes in erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *APMIS* (1995) 103:225–32. doi:10.1111/j.1699-0463.1995.tb01099.x
35. Bouchami O, Achour W, Hassen AB. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates from neutropenic patients in Tunisia. *Clin Microbiol Infect* (2007) 13:103–6. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01567.x
36. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* (1999) 43:1062–6.
37. Dina J, Malbruny B, Leclercq R. Nonsense mutations in the lsa-like gene in *Enterococcus faecalis* isolates susceptible to lincosamides and streptogramins A. *Antimicrob Agents Chemother* (2003) 47:2307–9. doi:10.1128/AAC.47.7.2307-2309.2003
38. Lopez M, Kadlec K, Schwarz S, Torres C. First detection of the staphylococcal trimethoprim resistance gene dfrK and the dfrK-carrying transposon Tn559 in enterococci. *Microb Drug Resist* (2012) 18:13–8. doi:10.1089/mdr.2011.0073
39. Wendlandt S, Lozano C, Kadlec K, Gomez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C, et al. The enterococcal ABC transporter gene lsa(E) confers combined resistance to lincosamides, pleuromutilins and streptogramin A antibiotics in methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* (2013) 68:473–5. doi:10.1093/jac/dks398
40. Ghanbari F, Ghajavand H, Havaei R, Jami MS, Khademi F, Heydari L, et al. Distribution of erm genes among *Staphylococcus aureus* isolates with inducible resistance to clindamycin in Isfahan, Iran. *Adv Biomed Res* (2016) 5:62. doi:10.4103/2277-9175.179184
41. Sadari H, Emadi B, Owlia P. Phenotypic and genotypic study of macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLSB) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *Med Sci Monit* (2011) 17:48–53. doi:10.12659/MSM.881386
42. Pereira JN, Rabelo MA, Lima JL, Neto AM, Lopes AC, Maciel MA. Phenotypic and molecular characterization of resistance to macrolides, lincosamides and type B streptogramin of clinical isolates of *Staphylococcus* spp. of a university hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. *Braz J Infect Dis* (2016) 20:276–81. doi:10.1016/j.bjid.2016.03.003
43. Hosseini SS, Niakan M, Sadari H, Motallebi M, Taherikalani M, Asadollahi K, et al. Frequency of genes encoding erythromycin ribosomal methylases among *Staphylococcus aureus* clinical isolates with different D-phenotypes in Tehran, Iran. *Iran J Microbiol* (2016) 8:161–7.
44. Prabhu K, Rao S, Rao V. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. *J Lab Physicians* (2011) 3:25–7. doi:10.4103/0974-2727.78558

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Mišić, Čukić, Vidanović, Šekler, Matić, Vukašinović and Baskić. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Prevalence of inducible clindamycin resistance among community-associated staphylococcal isolates in central Serbia

AD Aleksandra, MS Mistic, ZV Mira, NM Violeta, IT Dragana, BM Zoran, VS Dejan, SD Milanko, \*BD Dejan,

### Abstract

The emergence of resistance to most antimicrobial agents in staphylococci indicates the need for new effective agents in the treatment of staphylococcal infections. Clindamycin is considered to be one safe, effective and less costly agent. We analysed 482 staphylococcal isolates. Detection of inducible clindamycin resistance was performed by the D-test, while the presence of methylases genes: *erm* (A), *erm* (B) and *erm* (C), as well as, macrolide efflux gene *mef* was determined by polymerase chain reaction. Inducible clindamycin resistance phenotype was significantly higher in *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) strains than in coagulase-negative staphylococci (CNS). Among analysed *S. aureus* isolates, the predominance of the *erm* (C) gene, followed by the *erm* (A) gene were detected. These results indicate that the D-test should be routinely performed on each staphylococcal isolates.

**Key words:** Coagulase-negative staphylococci, inducible clindamycin resistance, *Staphylococcus aureus*

### Introduction

The increasing prevalence of resistance to most antimicrobial agents in staphylococci, especially spread of resistant strains in the community, signify the need for new effective agents to treat staphylococcal infections. Widespread use of macrolide–lincosamide–streptogramin (MLS) antibiotics, has led to an increase in a number of staphylococci acquiring cross-resistance to MLS antibiotics.<sup>[1]</sup> This cross-resistance to MLS antibiotic (MLS resistance) in staphylococci, is generally attributable to one of two mechanisms.

First is an active efflux, due to energy-dependent pump, which expels antimicrobial agents from the bacterial cell. Efflux mechanism is encoded by *mrs* (A) gene and confers

resistance to macrolides and type B streptogramin, but clindamycin remains active (MS<sub>B</sub> resistance). Second mechanism is modification of the drug-binding site on the bacterial ribosome, mediated by ribosomal methylases, which leads to the reduced binding of MLS antibiotics. Ribosomal methylases are encoded by *erm* genes (*erm* (A) or *erm* (C) in staphylococci) and results in resistance to macrolides, lincosamides and type B streptogramin (MLS<sub>B</sub> resistance).<sup>[2,3]</sup>

Phenotypic expression of this resistance can be constitutive (cMLS<sub>B</sub> resistance phenotype) and inducible (iMLS<sub>B</sub> resistance phenotype). In inducible expression, the bacteria produce inactive methylase mRNA that is unable to translate in to ribosomal methylase, but becomes active only in the presence of a strong inducer, such as erythromycin. By contrast, in constitutive expression, active methylase mRNA is produced in continuity, and in the absence of an inducer. *In vitro*, staphylococcal isolates with cMLS<sub>B</sub> phenotypes are resistant to all MLS<sub>B</sub> antibiotics, whereas those with iMLS<sub>B</sub> phenotypes demonstrate resistance to macrolides, while appearing susceptible to lincosamides and type B streptogramin.<sup>[3,4]</sup>

To detect iMLS<sub>B</sub> resistant strains, there are special disk-approximation test that involve the placement of an erythromycin disk in close proximity to a disk containing clindamycin. As the erythromycin diffuse through the agar, resistance to the clindamycin is induced, giving a D shape to the zone of clindamycin disk.<sup>[4]</sup>

Published data of inducible clindamycin resistance among pathogen staphylococcal isolates in Serbia, to the best of our knowledge, are missing. Because of that, the present study was aimed, to investigate MS<sub>B</sub> and MLS<sub>B</sub> resistance and to record the current trend in regard to the prevalence and distribution of inducible

\*Corresponding author (email: <dejan.baskic@gmail.com>)  
 Department of Microbiology, Institute of Medical Microbiology and Immunology (ADA), University of Pristina, Kosovska Mitrovica, Public Health Institute (ZVM, NMV, ITD, BDD), Kragujevac, Institute of Medical Statistics and Informatics (BZM), University of Belgrade, Veterinary Specialized Institute Kraljevo (VSD, SDM), Kraljevo, Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research (BDD), University of Kragujevac, Kragujevac, Public Health Institute Vranje, Serbia (MSM)  
 Received: 06-02-2013  
 Accepted: 16-09-2013

Access this article online	
Quick Response Code:	Website: www.ijmm.org
	DOI: 10.4103/0255-0857.124304

clindamycin resistance among community-associated (CA) *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and coagulase-negative staphylococci (CNS) in region of central Serbia.

## Materials and Methods

### Bacterial isolates

We analysed 482 staphylococcal isolates, collected from the Public Health Institute, Kragujevac. The Public Health Institute in Kragujevac provides microbiology laboratory services to primary health care centre (e.g. general practitioner, preventative care) in an outpatient setting. Staphylococcal isolates were labelled as community-associated staphylococcal isolates if the source patient had none of the following risk factors: a history of hospitalisation or surgery within one year prior to the date of specimen collection, haemodialysis and residence in long-term care facility. Staphylococcal isolates were collected from different patient samples (pus, wound swab, aspirates, eye swab, sputum, nasal and throat swab). Strains were identified using conventional bacteriological methods, and their susceptibility testing was first performed by the standard disk diffusion method on Mueller–Hinton agar (MHA), according to the standards of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).<sup>[5]</sup> Each erythromycin-resistant clindamycin susceptible isolates were further tested for inducible resistance with D-test, as described in the CLSI recommendations. Isolates with the MS<sub>B</sub> resistance, demonstrated circular clindamycin zone, while isolates with the iMLS<sub>B</sub> phenotype, demonstrated a flattening of the clindamycin zone. Isolates resistant to both erythromycin and clindamycin confers to cMLS<sub>B</sub> resistance phenotype.

### Detection of resistance genes

Polymerase chain reaction (PCR) was performed on 20 *S. aureus* strains displaying MLS<sub>B</sub> resistance phenotype. Genomic DNA was extracted from staphylococcal overnight cultures using a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) following protocol for isolation of genomic DNA from Gram-positive bacteria. Presence of erythromycin resistance methylase *erm* genes *erm* (A), *erm* (B) and *erm* (C), as well as macrolide efflux gene *mef* was determined by PCR using the primer pairs as described by Lim *et al.*,<sup>[6]</sup> All primers were synthesised by Invitrogen. Each reaction was carried out in a final volume of 50 µl using 2 µl of template, 1 µl of each primer (100 µM), 25 µl of Maxima<sup>®</sup> Hot Start Green PCR Master Mix (Fermentas) and 21 µl of PCR grade water. PCR conditions consisted of a denaturation step (4 min at 94°C), followed by 35 cycles at 94°C for 30 s of denaturation, 30 s of annealing at 52°C, 1 min of elongation at 72°C and a final extension step (5 min at 72°C). Amplified products were detected by gel electrophoresis on E-Gel iBase (Invitrogen) in 2% (w/v) agarose gels (E-Gel<sup>®</sup> 2%, Invitrogen) and visualised in Gel

Doc XR system (Bio-Rad). The size of the PCR products was determined by comparison with a 100-1000 bp molecular weight marker O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas). Positive control strains used in this study were: *Escherichia coli* NM522 (*ermA*), *Bacillus subtilis* 168 (*ermB*), *Bacillus subtilis* BD170 (*ermC*), *Streptococcus pyogenes* 02C1064 (*mef*).

Data were analysed using Chi-squared test ( $\chi^2$ ) and the probability level of 0.05 was considered to be statistically significant.

## Results

Our study included 482 staphylococcal isolates, of which 395 (82%) were *S. aureus* and 87 (18%) were CNS. Of the 482 staphylococcal isolates, 191 (40%) were resistant to erythromycin (ERY-R).

In order to accurate insight into the possibility of misinterpretation of staphylococcal resistance to clindamycin, we performed D-test and found that majority of ERY-R *S. aureus* isolates, display iMLS<sub>B</sub> phenotypes, while most of ERY-R CNS, show MS<sub>B</sub> phenotypes [Table 1]. Truly susceptible isolates (MS<sub>B</sub> phenotype) were significantly higher in CNS strains than in *S. aureus* strains ( $\chi^2 = 13.19$ ;  $P < 0.001$ ). Falsely susceptible isolates (iMLS<sub>B</sub> phenotype) were significantly higher in *S. aureus* strains than in CNS strains ( $\chi^2 = 16.52$ ;  $P < 0.001$ ). However, no statistically significant difference of truly resistant isolates (cMLS<sub>B</sub> phenotype) was observed between *S. aureus* and CNS isolates ( $\chi^2 = 0.20$ ;  $P = 0.655$ ).

The predominant genes associated with macrolide resistance among *S. aureus* were the *erm* (C) and the *erm* (A), which were detected in 55% (11/20) and 40% (8/20) of the isolates, respectively [Table 2]. The *erm* (C) determinant was found in six (60%) cMLS<sub>B</sub> *S. aureus* isolates and one of these strains also contained *erm* (A). Similarly, half of iMLS<sub>B</sub> strains harboured *erm* (C) gene. The distribution of *erm* (A) gene in cMLS<sub>B</sub>

**Table 1: Distribution of the MS<sub>B</sub>, iMLS<sub>B</sub> and cMLS<sub>B</sub> resistance phenotypes among erythromycin resistant *S. aureus* and CNS isolates**

	n (%)		
	ERY-R; <i>S. aureus</i>	ERY-R; CNS	Total
MS <sub>B</sub>	31 (24)	32 (52)	63 (33)
iMLS <sub>B</sub>	64 (50)	11 (18)	75 (39)
cMLS <sub>B</sub>	34 (26)	19 (30)	53 (28)
Total	129 (100)	62 (100)	191 (100)

\*ERY-R: Erythromycin resistant, MS<sub>B</sub>: Macrolides and type B streptogramin resistance, iMLS<sub>B</sub>: Inducible macrolides, lincosamides and type B streptogramin resistance, cMLS<sub>B</sub>: Constitutive macrolides, lincosamides and type B streptogramin resistance, CNS: Coagulase-negative staphylococci

**Table 2: Distribution of the *erm* and *mef* genes among 20 MLS<sub>B</sub> *S. aureus* isolates**

	n (%)		Total
	cMLS <sub>B</sub> <i>S. aureus</i>	iMLS <sub>B</sub> <i>S. aureus</i>	
<i>erm</i> (A)	3 (30)	4 (40)	7 (35)
<i>erm</i> (B)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>erm</i> (C)	5 (50)	5 (50)	10 (50)
<i>mef</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>erm</i> (A)+ <i>erm</i> (C)	1 (10)	0 (0)	1 (5)
Not detected	1 (10)	1 (10)	2 (10)
Total	10 (100)	10 (100)	20 (100)

iMLS<sub>B</sub>: inducible macrolides, lincosamides and type B streptogramin resistance, cMLS<sub>B</sub>: constitutive macrolides, lincosamides and type B streptogramin resistance, MLS<sub>B</sub>: macrolides, lincosamides and type B streptogramin resistance

and iMLS<sub>B</sub> *S. aureus* isolates was identical since both phenotypes carried this gene in 40% of the cases. Two of the MLS<sub>B</sub> isolates did not harbour any of the resistance genes. Among tested isolates *erm* (B) and *mef* genes were not detected [Figure 1].

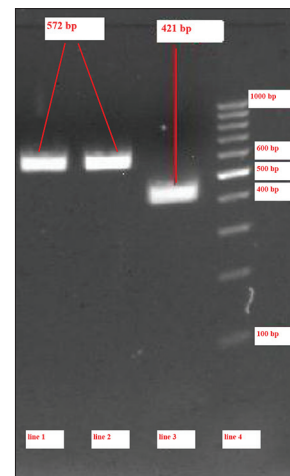
## Discussion

One of the major concerns with regard to the therapeutic use of clindamycin in staphylococcal infection is the possible presence of inducible resistance to clindamycin, and subsequent clinical failure of therapy.<sup>[7]</sup>

Simple laboratory testing, (i.e. erythromycin-clindamycin 'D-zone' test) can separate strains that have the genetic potential to become resistant during therapy from strains that are truly susceptible to clindamycin. Without the double-disk test, all staphylococcal isolates with iMLS<sub>B</sub> would have been mistakenly interpreted as clindamycin-susceptible. On the other side, to categorically consider all erythromycin resistant staphylococci as clindamycin resistant would deny potentially safe and effective therapy for patients infected with isolates that carry only the export mechanism.<sup>[8]</sup>

For instance, in our study we had 24% truthfully (MS<sub>B</sub>) and 50% untruthly (iMLS<sub>B</sub>) clindamycin susceptible *S. aureus* isolates, resulting in an underestimated clindamycin resistance rate of 26% (cMLS<sub>B</sub>) instead of 76% (iMLS<sub>B</sub> and cMLS<sub>B</sub>) among *S. aureus* and similarly, 30% instead 48% among CNS [Table 1].

Also, our results support the fact that *erm* (C) and *erm* (A) genes predominated within erythromycin-resistant *S. aureus* isolates with MLS<sub>B</sub> phenotype.<sup>[9,10]</sup> Yet, whereas, some of previous reports demonstrated prevalence of *erm* (A) genes,<sup>[11]</sup> other, similar to our study, showed that the *erm* (C) gene was more common than *erm* (A) in MLS<sub>B</sub> *S. aureus* strains.<sup>[12]</sup>



**Figure 1:** PCR of *S. aureus* isolates. Lines 1 and 2: Amplified product (572 bp) of *erm* (C) gene. Line 3: Amplified product (421 bp) of *erm* (A) gene. Line 4: Molecular weight marker

For these reasons it is necessary to examine the prevalence of iMLS<sub>B</sub>, especially in a setting where methicillin resistance leads physicians to prescribed different macrolides or lincosamides empirically.<sup>[13]</sup> This prevalence may change over time with the emergence of strains with different sensitivity patterns, so periodic surveys should be performed if testing is not routine.

## References

- Lewis JS 2<sup>nd</sup>, Jorgensen JH. Inducible clindamycin resistance in staphylococci: Should clinicians and microbiologists be concerned? Clin Infect Dis 2005;40:280-5.
- Weisblum B. Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:797-805.
- 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.
- Woods CR. Macrolide inducible resistance to clindamycin and D-test. Pediatr Infect Dis J 2009;28:1115-8.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Nineteenth informational supplement. CLSI Document M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Pennsylvania: Wayne; 2009. p. 59
- Lim JA, Kwon AR, Kim SK, Chong Y, Lee K, Choi EC. Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in Gram-positive cocci isolated in a Korean hospital. J Antimicrob Chemother 2002;49:489-95.
- Siberry GK, Tekle T, Carroll K, Dick J. Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance *in vitro*. Clin Infect Dis 2003;37:1257-60.
- Sanchez ML, Flint KK, Jones RN. Occurrence of macrolide-lincosamide-streptogramin resistances among staphylococcal clinical isolates at a university medical center. Is false susceptibility to new macrolides and clindamycin a contemporary clinical and *in vitro* testing problem? Diagn Microbiol Infect Dis 1993;16:205-13.
- Otsuka T, Zaraket H, Takano T, Saito K, Dohmae S,

- Higuchi W, *et al.* Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes and genotypes among *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Japan. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:325-7.
10. Spiliopoulou I, Petinaki E, Papandreou P, Dimitracopoulos G. *Erm(C)* is the predominant genetic determinant for the expression of resistance to macrolides among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:814-7.
11. Bémer P, Juvin ME, Corvec S, Ros A, Drugeon H. Correlation of agar dilution and VITEK2 system for detection of resistance to macrolides, lincosamides and pristinamycin among *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: Association with genotypes. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:656-61.
12. Gherardi G, De Florio L, Lorino G, Fico L, Dicuonzo G. Macrolide resistance genotypes and phenotypes among erythromycin-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci, Italy. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009;55:62-7.
13. Ochoa TJ, Mohr J, Wanger A, Murphy JR, Heresi GP. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pediatric patients. *Emerg Infect Dis* 2005;11:966-8.

**How to cite this article:** Aleksandra AD, Mistic MS, Mira ZV, Violeta NM, Dragana IT, Zoran BM, Dejan VS, Milanko SD, Dejan BD. Prevalence of inducible clindamycin resistance among community-associated staphylococcal isolates in central Serbia. *Indian J Med Microbiol* 2014;32:49-52.

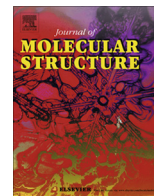
**Source of Support:** This research was supported by the Serbian Ministry of Education and Science, project III 41010-2, **Conflict of Interest:** None declared.





Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Molecular Structure

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/molstruc](http://www.elsevier.com/locate/molstruc)

# Stereospecific ligands and their complexes. XX. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl esters of ethylenediamine-*N,N'*-di-*S,S*-(2,2'-dibenzyl)acetic acid <sup>☆</sup>

Dejana P. Dimitrijević <sup>a</sup>, Gordana P. Radić <sup>b</sup>, Verica V. Jevtić <sup>a</sup>, Milena Mišić <sup>c</sup>, Dejan Baskić <sup>b,d</sup>, Srećko R. Trifunović <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>b</sup> Centre for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>c</sup> Public Health Institute, Vranje, Serbia

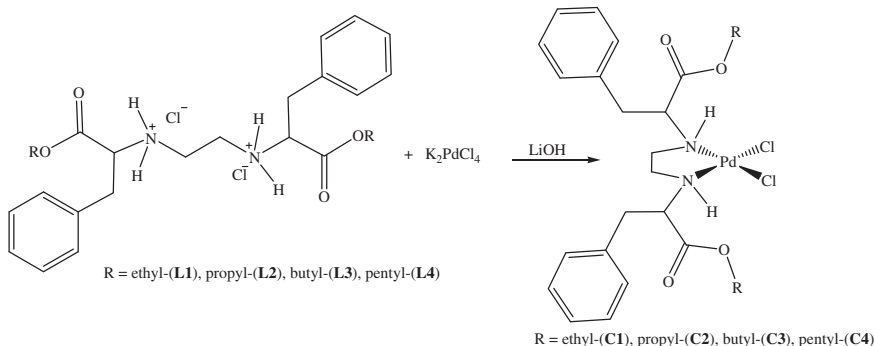
<sup>d</sup> Public Health Institute, Kragujevac, Serbia

## HIGHLIGHTS

- Four new palladium(II) complexes were synthesized.
- Characterized by microanalysis, infrared, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy.
- Antimicrobial activity was tested in relation to 6 species of microorganisms.

## GRAPHICAL ABSTRACT

The complexes have been obtained by direct reaction of dipotassium-tetrachloridopalladate(II) with corresponding esters of ethylenediamine-*N,N'*-di-*S,S*-(2,2'-dibenzyl)-acetic acid.



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 1 April 2014

Received in revised form 5 May 2014

Accepted 5 May 2014

Available online xxx

## Keywords:

Palladium(II) complexes

Infrared spectroscopy

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy

*In vitro* antimicrobial activity

## ABSTRACT

Four new palladium(II) complexes of general formula [PdCl<sub>2</sub>(R<sub>2</sub>-*S,S*-eddba)] (R = ethyl, *n*-propyl, *n*-butyl and *n*-pentyl; *S,S*-eddba = ethylenediamine-*N,N'*-di-*S,S*-(2,2'-dibenzyl)acetate) have been synthesized and characterized by microanalysis, infrared, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy.

*In vitro* antimicrobial activity for ligands **L1–L4** general formula R<sub>2</sub>-*S,S*-eddba and complexes **C1–C4** was investigated.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

<sup>☆</sup> For Part XIX see D. Ilić, V.V. Jevtić, I.D. Radojević, S.M. Vasić, O.D. Stefanović, Lj.R. Čomić, M.M. Vasojević, M.Ž. Jelić, T.V. Koval'chuk, N.V. Loginova, Srećko R. Trifunović, J. Mol. Struct. 1050 (2013) 133–139.

\* Corresponding author. Tel.: +381 34 300263; fax: +381 34 335040.

E-mail address: [srecko@kg.ac.rs](mailto:srecko@kg.ac.rs) (S.R. Trifunović).

## Introduction

Antimicrobials have been used in the infection treatments by different disease-causing microorganisms, including bacteria, mycobacteria, viruses, parasites and fungi. In the vast majority of cases where antimicrobials are used, the microorganisms have found a way to evade or resist the antimicrobial agent [1,2]. Bacterial resistance to antibiotics is a serious threat to the successful treatment of infectious diseases and becomes a major clinical and public health problem, leading to increased morbidity and mortality [3–5]. There have been numerous attempts to synthesize new compounds acting against multi-resistant microorganisms [6]. The synthesis and evaluation of the biological activity of the new metal-based compounds is the field of growing interest [7]. The present study was performed to investigate the antimicrobial effects of newly synthesized ligands and their palladium(II) complexes against six bacterial strains using the CLSI broth microdilution method.

The biological activities of the numerous palladium(II) complexes have been reported [8–10]. Also, the influence of the prepared palladium(II) complexes on the growth and metabolism of various types of microorganisms has been investigated. A lot of papers regarding to anti-viral, antibacterial and antifungal activity of palladium(II) complexes have been reviewed [11].

The aim of this paper is to synthesize new palladium complexes and *in vitro* research their antimicrobial activities.

This study is focused on the antimicrobial activity of four R<sub>2</sub>edda-type ligand precursors: *O,O*-ethyl- (**L1**) *O,O*-dipropyl- (**L2**), *O,O*-dibutyl- (**L3**), *O,O*-dipentyl ethylenediamine-*N,N'*-di-*S,S*-(2,2'-dibenzyl)acetate (**L4**) [12], and the synthesis, characterization and antimicrobial activity their corresponding palladium(II) complexes: dichlorido-(*O,O'*-diethyl-*(S,S)*-ethylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-dibenzyl)-acetate)-palladium(II) (**C1**), dichlorido-(*O,O'*-dipropyl-*(S,S)*-ethylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-dibenzyl)-acetate)-palladium(II), (**C2**), dichlorido-(*O,O'*-dibutyl-*(S,S)*-ethylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-dibenzyl)-acetate)-palladium(II) (**C3**), dichlorido-(*O,O'*-dipentyl-*(S,S)*-ethylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-dibenzyl)-acetate)-palladium(II) (**C4**).

## Experimental

### Chemistry

#### Reagents and instruments

(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)-butanoic acid, (*H<sub>2</sub>*-*(S,S)*-eddv) and its esters were prepared as already described in literature [12]. K<sub>2</sub>[PdCl<sub>4</sub>] was purchased from Merck and used without further purification. Infrared spectra were recorded by a Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR spectrometer using the KBr pellet technique (4000–400 cm<sup>-1</sup>). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded by a Varian Gemini-2000 (200 MHz) spectrometer in and CDCl<sub>3</sub> using tetramethylsilane as internal standard (Fig. 1). Elemental microanalyses for C, H and N were performed by standard methods by a Vario EL III C, H, N Elemental Analyzer.

#### Preparation of dichlorido-(*O,O'*-diethyl-*(S,S)*-ethylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-dibenzyl)-acetate)-palladium(II), [PdCl<sub>2</sub>(det-*S,S*-eddba)]

K<sub>2</sub>[PdCl<sub>4</sub>] (0.100 g, 0.306 mmol) was dissolved in 10 mL of water on a steam bath and *O,O'*-diethyl-*(S,S)*-ethylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-dibenzyl)acetate) dihydrochloride, det-*S,S*-eddba·2HCl, (0.1485 g, 0.306 mmol) was added. The mixture was stirred for 2 h and during this period water solution of LiOH·H<sub>2</sub>O (0.0257 g, 0.612 mmol in 10 mL of water) was introduced (Scheme 1). The complex, [PdCl<sub>2</sub>(det-*S,S*-eddba)] (**C1**) as a yellow precipitate, was filtered, washed with water and air-dried. Yield:

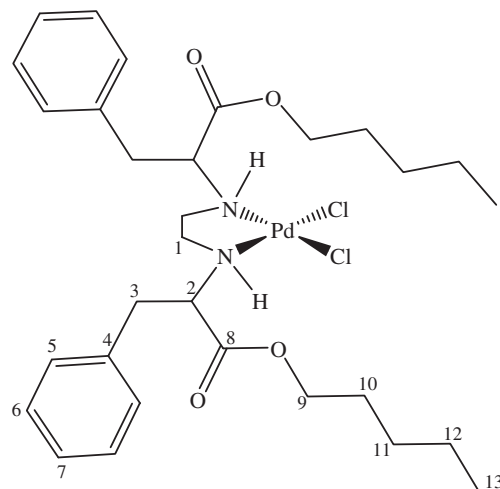


Fig. 1. Numbering of compounds used for NMR data.

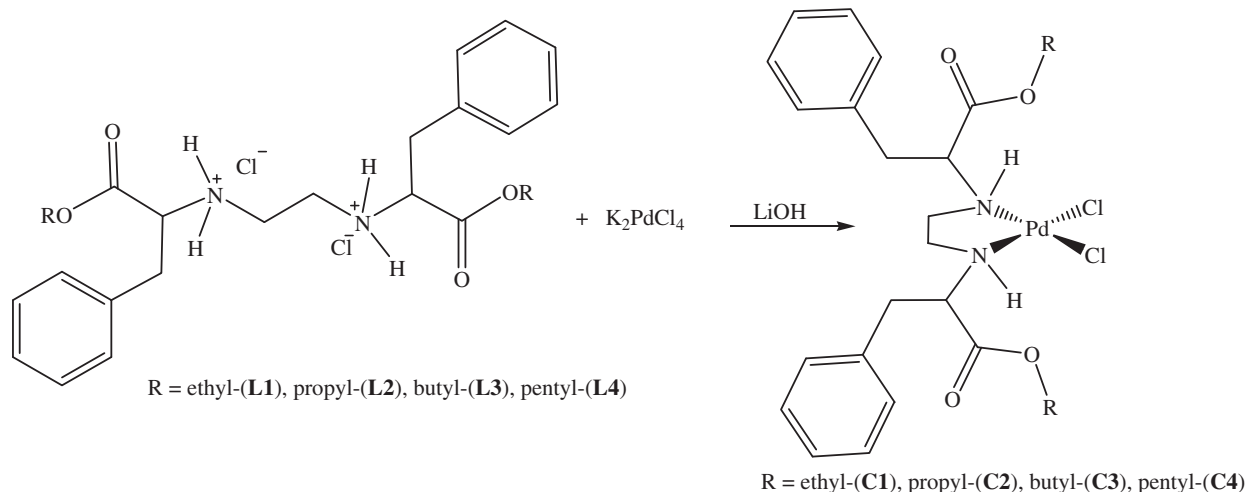
0.12 g (66.48%). Anal. Calc. for C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Pd (M<sub>r</sub> = 589.836) (%): C, 48.87; H, 5.47; N, 4.75. Found (%): C, 48.42; H, 5.51; N, 4.82. Isomer A: <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 1.25 (t, 6H, C<sup>10</sup>H<sub>3</sub>), 2.84 (m, 4H, C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 3.22 (d, 4H, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 4.03 (t, 2H, C<sup>2</sup>H), 4.21 (q, 4H, C<sup>9</sup>H<sub>2</sub>), 6.20–6.40 (broad s, 2H, NH), 7.29 (m, 10H, C<sup>5,6,7</sup>H), <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 13.83 (C<sup>10</sup>H<sub>3</sub>), 35.82 (C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 49.19 (C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 61.66 (C<sup>2</sup>H), 63.45 (C<sup>9</sup>H<sub>2</sub>), 126.74 (C<sup>7</sup>H), 128.29 (C<sup>5</sup>H), 129.46 (C<sup>6</sup>H), 135.69 (C<sup>4</sup>), 168.71 (C<sup>8</sup>OO-Et). Isomer B: <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 1.25 (t, 6H, C<sup>10</sup>H<sub>3</sub>), 2.84 (m, 4H, C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 3.22 (d, 4H, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 4.03 (t, 2H, C<sup>2</sup>H), 4.21 (q, 4H, C<sup>9</sup>H<sub>2</sub>), 6.20–6.40 (broad s, 2H, NH), 7.29 (m, 10H, C<sup>5,6,7</sup>H), <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 14.00 (C<sup>10</sup>H<sub>3</sub>), 37.00 (C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 50.08 (C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 61.80 (C<sup>2</sup>H), 63.59 (C<sup>9</sup>H<sub>2</sub>), 127.37 (C<sup>7</sup>H), 128.94 (C<sup>5</sup>H), 129.91 (C<sup>6</sup>H), 137.00 (C<sup>4</sup>), 170.59 (C<sup>8</sup>OO-Et). IR (cm<sup>-1</sup>): 3130, 2928, 2854, 1734, 1455, 1399, 1384, 1373, 1275, 1215, 1096, 1031, 919, 749, 701.

#### Preparation of dichlorido-(*O,O'*-dipropyl-*(S,S)*-ethylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-dibenzyl)-acetate)-palladium(II), [PdCl<sub>2</sub>(dpr-*S,S*-eddba)]

The complex, [PdCl<sub>2</sub>(dpr-*S,S*-eddba)], (**C2**) was prepared as described in Section 2.1.2. using *O,O'*-dipropyl-*(S,S)*-ethylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-dibenzyl)acetate) dihydrochloride, dpr-*S,S*-eddba·2HCl, (0.1573 g, 0.306 mmol) instead of det-*S,S*-eddba·2HCl (Scheme 1). Yield: 0.14 g (74.04%). Anal. Calc. for C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Pd (M<sub>r</sub> = 617.888) (%): C, 50.54; H, 5.87; N, 4.53. Found (%): C, 50.51; H, 5.94; N, 4.48. Isomer A: <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 0.88 (t, 6H, C<sup>11</sup>H<sub>3</sub>), 1.61 (m, 4H, C<sup>10</sup>H<sub>2</sub>), 2.94 (m, 4H, C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 3.26 (d, 4H, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 3.90 (t, 2H, C<sup>2</sup>H), 4.18 (t, 4H, C<sup>9</sup>H<sub>2</sub>), 6.25–6.50 (broad s, 2H, NH), 7.31 (m, 10H, C<sup>5,6,7</sup>H), <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 10.17 (C<sup>11</sup>H<sub>3</sub>), 21.63 (C<sup>10</sup>H<sub>2</sub>), 35.80 (C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 49.32 (C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 63.45 (C<sup>2</sup>H), 67.27 (C<sup>9</sup>H<sub>2</sub>), 126.71 (C<sup>7</sup>H), 128.26 (C<sup>5</sup>H), 129.14 (C<sup>6</sup>H), 135.62 (C<sup>4</sup>), 168.83 (C<sup>8</sup>OO-Pr). Isomer B: <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 0.88 (t, 6H, C<sup>11</sup>H<sub>3</sub>), 1.61 (m, 4H, C<sup>10</sup>H<sub>2</sub>), 2.94 (m, 4H, C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 3.26 (d, 4H, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 3.90 (t, 2H, C<sup>2</sup>H), 4.18 (t, 4H, C<sup>9</sup>H<sub>2</sub>), 6.25–6.50 (broad s, 2H, NH), 7.31 (m, 10H, C<sup>5,6,7</sup>H), <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 10.33 (C<sup>11</sup>H<sub>3</sub>), 21.84 (C<sup>10</sup>H<sub>2</sub>), 36.91 (C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 49.79 (C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 63.49 (C<sup>2</sup>H), 67.49 (C<sup>9</sup>H<sub>2</sub>), 127.45 (C<sup>7</sup>H), 129.03 (C<sup>5</sup>H), 129.94 (C<sup>6</sup>H), 137.06 (C<sup>4</sup>), 170.70 (C<sup>8</sup>OO-Pr). IR (cm<sup>-1</sup>): 3127, 2967, 2935, 2894, 1736, 1456, 1397, 1385, 1337, 1274, 1219, 1099, 1057, 909, 747, 700.

#### Preparation of dichlorido-(*O,O'*-dibutyl-*(S,S)*-ethylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-dibenzyl)-acetate)-palladium(II), [PdCl<sub>2</sub>(dbu-*S,S*-eddba)]

The complex, [PdCl<sub>2</sub>(dbu-*S,S*-eddba)], (**C3**) was prepared as described in Section 2.1.2. using *O,O'*-dibutyl-*(S,S)*-ethylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-dibenzyl)acetate) dihydrochloride, dbu-*S,S*-eddba·2HCl, (0.185 g, 0.306 mmol) instead of det-*S,S*-eddba·2HCl (Scheme 1). Yield: 0.14 g (74.04%).



**Scheme 1.** The preparation of the [PdCl<sub>2</sub>(R<sub>2</sub>-S,S-eddba)].

mine-*N,N'*-di-(2,2'-dibenzyl)acetate) dihydrochloride, dbu-*S,S*-edd-ba-2HCl, (0.1657 g, 0.306 mmol) instead of det-*S,S*-eddba-2HCl (Scheme 1). Yield: 0.14 g (73.33%). *Anal. Calc.* for C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Pd (*M<sub>r</sub>* = 645.94) (%): C, 52.06; H, 6.24; N, 4.34. Found (%): C, 52.31; H, 6.12; N, 4.41. Isomer A: <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 0.89 (t, 6H, C<sup>12</sup>H<sub>3</sub>), 1.23 (m, 4H, C<sup>11</sup>H<sub>2</sub>), 1.67 (m, 4H, C<sup>10</sup>H<sub>2</sub>), 2.83 (m, 4H, C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 3.33 (d, 4H, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 3.97 (t, 2H, C<sup>2</sup>H), 4.34 (t, 4H, C<sup>9</sup>H<sub>2</sub>), 6.25–6.45 (broad s, 2H, NH), 7.29 (m, 10H, C<sup>5,6,7</sup>H), <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 12.88 (C<sup>12</sup>H<sub>3</sub>), 19.27 (C<sup>11</sup>H<sub>3</sub>), 29.47 (C<sup>10</sup>H<sub>2</sub>), 34.48 (C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 47.66 (C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 61.27 (C<sup>2</sup>H), 68.93 (C<sup>9</sup>H<sub>2</sub>), 126.45 (C<sup>7</sup>H), 127.96 (C<sup>5</sup>H), 129.54 (C<sup>6</sup>H), 136.74 (C<sup>4</sup>), 169.44 (C<sup>8</sup>OO-Bu). Isomer B: <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 0.89 (t, 6H, C<sup>12</sup>H<sub>3</sub>), 1.23 (m, 4H, C<sup>11</sup>H<sub>2</sub>), 1.67 (m, 4H, C<sup>10</sup>H<sub>2</sub>), 2.83 (m, 4H, C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 3.33 (d, 4H, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 3.97 (t, 2H, C<sup>2</sup>H), 4.34 (t, 4H, C<sup>9</sup>H<sub>2</sub>), 6.25–6.45 (broad s, 2H, NH), 7.29 (m, 10H, C<sup>5,6,7</sup>H), <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 12.92 (C<sup>12</sup>H<sub>3</sub>), 19.44 (C<sup>11</sup>H<sub>3</sub>), 29.68 (C<sup>10</sup>H<sub>2</sub>), 34.98 (C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 48.26 (C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 61.87 (C<sup>2</sup>H), 68.97 (C<sup>9</sup>H<sub>2</sub>), 126.65 (C<sup>7</sup>H), 127.97 (C<sup>5</sup>H), 129.88 (C<sup>6</sup>H), 137.84 (C<sup>4</sup>), 170.41 (C<sup>8</sup>OO-Bu). IR (cm<sup>-1</sup>): 3120, 2959, 2932, 2873, 1736, 1456, 1397, 1385, 1345, 1273, 1216, 1187, 1080, 1031, 940, 746, 700.

*Preparation of dichlorido-(O,O'-dipentyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-(2,2'-dibenzyl)-acetate)-palladium(II), [PdCl<sub>2</sub>(dpe-S,S-eddba)]*

The complex, [PdCl<sub>2</sub>(dpe-S,S-eddba)], (C4) was prepared as described in Section 2.1.2. using *O,O'*-dipentyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-dibenzyl)acetate) dihydrochloride, dpe-*S,S*-eddba-2HCl, (0.1743 g, 0.306 mmol) instead of det-*S,S*-eddba-2HCl (Scheme 1). Yield: 0.14 g (69.24%). *Anal. Calc.* for C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Pd (*M<sub>r</sub>* = 673.992) (%): C, 53.46; H, 6.58; N, 4.16. Found (%): C, 53.98; H, 6.35; N, 4.38. Isomer A: <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 0.93 (t, 6H, C<sup>13</sup>H<sub>3</sub>), 1.23 (m, 4H, C<sup>12</sup>H<sub>2</sub>), 1.34 (m, 4H, C<sup>11</sup>H<sub>2</sub>), 1.56 (m, 4H, C<sup>10</sup>H<sub>2</sub>), 2.77 (m, 4H, C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 3.09 (d, 4H, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 4.01 (t, 2H, C<sup>2</sup>H), 4.45 (t, 4H, C<sup>9</sup>H<sub>2</sub>), 6.25–6.50 (broad s, 2H, NH), 7.34 (m, 10H, C<sup>5,6,7</sup>H), <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 11.23 (C<sup>13</sup>H<sub>3</sub>), 18.89 (C<sup>12</sup>H<sub>2</sub>), 26.76 (C<sup>11</sup>H<sub>3</sub>), 31.11 (C<sup>10</sup>H<sub>2</sub>), 35.78 (C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 48.23 (C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 62.12 (C<sup>2</sup>H), 69.34 (C<sup>9</sup>H<sub>2</sub>), 126.23 (C<sup>7</sup>H), 127.12 (C<sup>5</sup>H), 129.18 (C<sup>6</sup>H), 136.44 (C<sup>4</sup>), 169.28 (C<sup>8</sup>OO-Pe). Isomer B: <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 0.93 (t, 6H, C<sup>13</sup>H<sub>3</sub>), 1.23 (m, 4H, C<sup>12</sup>H<sub>2</sub>), 1.34 (m, 4H, C<sup>11</sup>H<sub>2</sub>), 1.56 (m, 4H, C<sup>10</sup>H<sub>2</sub>), 2.77 (m, 4H, C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 3.09 (d, 4H, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 4.01 (t, 2H, C<sup>2</sup>H), 4.45 (t, 4H, C<sup>9</sup>H<sub>2</sub>), 6.25–6.50 (broad s, 2H, NH), 7.34 (m, 10H, C<sup>5,6,7</sup>H), <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 11.28 (C<sup>13</sup>H<sub>3</sub>), 18.94 (C<sup>12</sup>H<sub>2</sub>), 26.97 (C<sup>11</sup>H<sub>3</sub>), 31.18 (C<sup>10</sup>H<sub>2</sub>), 35.99 (C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 48.44 (C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 62.68 (C<sup>2</sup>H), 69.87 (C<sup>9</sup>H<sub>2</sub>), 126.56 (C<sup>7</sup>H), 127.32 (C<sup>5</sup>H), 129.55 (C<sup>6</sup>H), 136.89 (C<sup>4</sup>), 171.06 (C<sup>8</sup>OO-Pe). IR

(cm<sup>-1</sup>): 3118, 2956, 2931, 2871, 1736, 1456, 1397, 1356, 1228, 1200, 1083, 1032, 960, 743, 699.

*In vitro antimicrobial assay*

*Test substances*

The ligands and corresponding Pd(II) complexes were tested for their *in vitro* antimicrobial activity. Each tested substance (1 mg) was dissolved in 50 μL DMSO (Dimethyl Sulfoxide: SIGMA D-8779) and then diluted with 450 μL of normal saline to the final concentration of stock solution at 2000 μg/mL (10% DMSO).

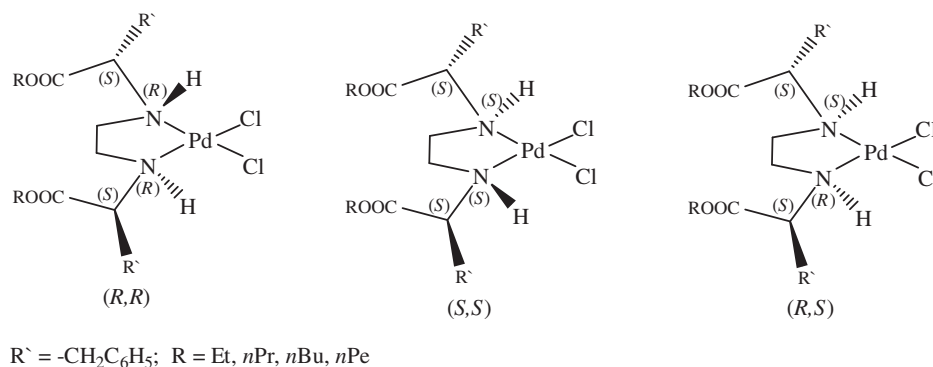
*Test microorganisms*

Antimicrobial activity was tested against 6 pathogenic bacterial strains including five standard strains: *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and a clinical isolate of *Proteus vulgaris*. The tested bacterial strains were provided from the collection held in the Center for Microbiology, Public Health Institute Vranje.

*Microdilution method*

Antimicrobial activity was tested using the broth microdilution method according to the CLSI Standards [13] and minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined. Direct colony suspensions were prepared using overnight broth cultures and suspensions were adjusted to 0.5 McFarland turbidity standard (1 × 10<sup>8</sup> CFU/mL). A twofold serial dilution of tested compounds was prepared in a 96 well microtiter plate (range 1000–7.81 μg/mL) in inoculated nutrient broth adjusted to the final concentration of 5.0 × 10<sup>5</sup> CFU/mL for each bacterial strain. The plates were covered with a plastic lid and incubated at 37 °C for 18–24 h. Ceftriaxone and vancomycin (Galenika AD, Belgrade) served as a positive control, while the solvent was used as a negative control. MIC was defined as the lowest concentration of tested compounds inhibiting the visible growth of each tested organism. To determine MBC, the broth was taken from all the wells without visible growth as well as from the wells with the highest concentration of substances still showing visible growth and inoculating onto Mueller–Hinton agar plates (Torlak, Beograd). At the end of the incubation period (24 h/37 °C) the lowest concentration with no growth (no colony) was defined as the minimum bactericidal concentration.





**Fig. 2.** Diastereoisomers of palladium(II) complexes C1–C4.

**Table 1**  
Antibacterial activity of tested ligands and corresponding palladium(II) complexes ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Species	L1		C1		L2		C2		L3		C3		L4		C4	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	500	>1000	250	>1000	1000	>1000	250	>1000	1000	>1000	250	>1000	500	>1000	250	1000
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1000	>1000	500	500	1000	1000	1000	1000	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	1000	>1000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	250	>1000	500	500	1000	>1000	250	500	1000	>1000	250	500	1000	1000	1000	>1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1000	>1000	500	1000	1000	>1000	1000	>1000	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	1000	>1000
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1000	1000	500	1000	1000	>1000	1000	>1000	1000	>1000	500	1000	1000	>1000	125	500
<i>Proteus vulgaris</i> , clinical strain	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

## Results and discussion

### Synthesis and characterization

The neutral palladium(II) complexes **C1–C4** were prepared by using appropriate modifications of known methods [7,14,15]. The content of isolated complexes was confirmed by elemental analysis and coordination mode of ligands to the palladium(II) ion was predicted on the basis of their infrared and NMR ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ ) spectra.

Absorption bands for secondary amino groups in infrared spectra of **C1–C4** were found at 3130, 3127, 3120, 3118  $\text{cm}^{-1}$ , respectively. In the same region of IR spectra of free ligand precursors only bands for secondary ammonium groups can be observed (**L1–L4**:  $\nu(\text{R}_2\text{NH}_2^+)$  at 3469, 3436, 3434, 3436  $\text{cm}^{-1}$ ) [12]. Based on these facts, it can be concluded that ligands were coordinated to the central metal ion *via* nitrogen atoms. All other specific bonds were found at similar positions for corresponding ligand precursor and complexes, thus indicating that no other atom was coordinated to the palladium center [12]. The following bands were found for complexes **C1–C4**:  $\nu(\text{C}=\text{O})$  at 1734, 1736, 1736, 1736,  $\nu(\text{C}-\text{O})$  at 1215, 1219, 1216, 1200  $\text{cm}^{-1}$  and  $\nu(\text{CH}_3)$  at 2928, 2935, 2932, 2931  $\text{cm}^{-1}$ , respectively.

The expected signals were found in  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra. In the  $^1\text{H}$  NMR spectra of complexes the broad signals of hydrogen atoms belonging to secondary amino groups occur between 6.20 and 6.50 ppm. The signals of  $\text{CH}_2$  protons of the ethylenediamine bridge showed coordination induced shifts in spectra of **C1–C4** (up to 0.9 ppm) giving a clear indication of nitrogen coordination. Signals for all methyl protons were found within the range of 0.88–1.25 ppm for all complexes.

In  $^{13}\text{C}$  NMR spectra two sets of signals were found for all complexes indicating the formation one of three possible diastereoisomers. Coordination of ligands [12] to the palladium(II) ion induced formation of two extra chiral centers of ligating N atoms. So, three diastereoisomers should be expected for  $[\text{PdCl}_2(\text{R}_2\text{-S,S-eddba})]$  ( $\text{R} = \text{ethyl, } n\text{-propyl, } n\text{-butyl and } n\text{-pentyl}$ ;  $(R,R)$ ,  $(R,S=S,R)$  and

**Table 2**  
Antibacterial activity of antibiotics ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Species	Vancomycin		Ceftriaxone	
	MIC	MBC	MIC	MBS
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	15.625	62.5	500	>1000
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	125	125	15.625	15.625
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<15.625	<15.625	15.625	31.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	125	1000	500	>1000
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	62.25	250	15.625	500
<i>Proteus vulgaris</i> , clinical strain	1000	>1000	15.625	125

( $S,S$ ) (Fig. 2) and only ( $R,S$ ) diastereoisomer should give rise to two sets of signals since the ester branches are inequivalent (other two diastereoisomers ( $R,R$ ) and ( $S,S$ ) will give rise to (due to  $C_2$  symmetry) one set of resonances). The ester carbon atom resonances were found as expected, at around 170 ppm for all complexes verifying that oxygen is not a ligating atom.

### Microbiology

The results of the antimicrobial activity of the ligands and their palladium(II) complexes against all tested bacterial strains are shown in Tables 1 and 2. Broth microdilution assay showed that the tested compounds were moderately active against gram-positive bacteria, whereas they have weak activity against gram negative bacteria. Antibacterial activity against Gram(+) bacteria was in the following range of concentrations: MIC/MBC = 125–1000/500–1000  $\mu\text{g/mL}$ , while the referent antibiotic vancomycin had an effect at MIC/MBC = 15.625–62.25/15.625–250  $\mu\text{g/mL}$ . Palladium(II) complexes showed the highest activity against *Bacillus cereus* ATCC 10876 (MIC/MBC = 250/1000  $\mu\text{g/mL}$ ). *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (**C4** complex: MIC/MBC = 125/500  $\mu\text{g/mL}$ ) was particularly susceptible. Gram (–) bacteria were more resistant where only

**C1** complex showed some antibacterial effects with MIC/MBC = 500–1000 µg/mL, whereas the referent antibiotic ceftriaxone showed effects at MIC/MBC = 15.625–500/15.625–1000 µg/mL. The lowest susceptibility showed *Proteus vulgaris* (clinical strain), where the tested compounds at the highest tested concentration (1000 µg/mL) showed no microbiostatic/microbicidal effects. It is important to note that the complexes showed more inhibitory effects than the ligands.

Numerous studies have demonstrated the antimicrobial effects of Pd(II) complexes [16–19]. In their study Gulcan and coworkers showed antibacterial activity of Pd(II) complexes with MICs values between 80 and 160 µg/mL greater than those in our study. Similarly to our study their Pd(II) complexes were more effective against gram positive than gram negative bacteria [17]. Recent research confirmed that Pd(II) complexes showed more activity than free ligands [20].

## Conclusions

The palladium(II) complexes of R<sub>2</sub>-S,S-eddba esters were synthesized and characterized.

The antibacterial activity results show that all of the ligands and their corresponding complexes have low to moderate activity against gram-positive bacteria, while having weak activity against gram-negative bacteria. Generally, the antibacterial activities of all of the complexes are greater than those of the ligands. All the tested compounds show significantly lower activity than the standard antibiotics.

## Acknowledgements

The authors are grateful to the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia for financial support (Projects No. OI172016 and III41010).

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.05.008>.

## References

- [1] T.M. Powledge, PLoS Biol. 2 (2) (2004) e53, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0020053>.
- [2] CDC. Reported Tuberculosis in the United States, 2008. (<<http://www.cdc.gov/tb>>).
- [3] R.C. Moellering, J.R. Graybill, J.E. McGowan, L. Corey, Am. J. Med. 120 (2007) S4–25; quiz S26–8.
- [4] B. Spellberg, R. Gvidos, D. Gilbert, J. Bradley, H.W. Boucher, W.M. Scheld, J.G. Bartlett, J. Edwards, Clin. Infect. Dis. 46 (2008) 155–164.
- [5] S.S. Taiwo, World J Clin Infect Dis 1 (1) (2011) 11–16.
- [6] T.P.T. Cushnie, A.J. Lamb, Int. J. Antimicrob. Agents 26 (2005) 343–356.
- [7] G.P. Vasić, V.V. Glodović, I.D. Radojević, O.D. Stefanović, Lj.R. Čomić, V.M. Đinović, S.R. Trifunović, Inorg. Chim. Acta 363 (2010) 3606–3610.
- [8] B.T. Khan, J. Bhatt, K. Najmoddin, S. Shamsuddin, K. Annapoorna, J. Inorg. Biochem. 44 (1991) 55–63.
- [9] C. Navarro-Eanninger, J.M. Pérez, F. Zamora, V.M. Gonzáles, J.M. Masaguer, C. Alonso, J. Inorg. Biochem. 52 (1993) 37–49.
- [10] I. Brudzinska, Y. Mikata, M. Obata, C. Ohtsuki, S. Yano, Bioorg. Med. Chem. Lett. 14 (2004) 2533–2536.
- [11] A. Garoufis, S.K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 1384–1397.
- [12] D.P. Dimitrijević, V.V. Glodović, G.P. Radić, S. García-Granda, L. Menéndez-Taboada, M. Milovanović, V. Volarević, N. Arsenijević, G.A. Bogdanović, S.R. Trifunović, Inorg. Chim. Acta 402 (2013) 83–89.
- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th informational supplement (M100-S20). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- [14] J.M. Vujić, M. Cvijović, G.N. Kaluderović, M. Milovanović, B.B. Zmejkovski, V. Volarević, N. Arsenijević, T.J. Sabo, S.R. Trifunović, Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 3601–3606.
- [15] G.P. Vasić, V.V. Glodović, I.D. Radojević, O.D. Stefanović, Lj.R. Čomić, V.M. Đinović, S.R. Trifunović, Inorg. Chim. Acta 391 (2012) 44–49.
- [16] A. Bansal, R. Singh, R.V. Singh, Metal Based Drugs 7 (4) (2000) 211–218.
- [17] M. Gulcan, M. Sonmez, I. Berber, Turk. J. Chem. 36 (2012) 189–200.
- [18] S.S. Konstantinović, B.C. Radovanović, S.P. Sovilj, S. Stanojević, J. Serb. Chem. Soc. 73 (1) (2008) 7–13.
- [19] S. Chandra, M. Tyagi, S. Agrawal, J. Saudi Chem. Soc. 15 (2011) 49–54.
- [20] K.S. Prasad, L.S. Kumar, H.D. Revanasiddappa, B. Vijay, B. Jayalakshmi, Chem. Sci. J., Volume 2011: CSJ-28.



# Synthesis, characterization, antimicrobial and antitumor reactivity of new palladium(II) complexes with methionine and tryptophane coumarine derivatives

Danijela Lj Stojković<sup>a</sup>, Verica V. Jevtić<sup>b</sup>, Nenad Vuković<sup>b</sup>, Milena Vukić<sup>b</sup>, Petar Čanović<sup>c</sup>, Milan M. Zarić<sup>c</sup>, Milena M. Mišić<sup>d</sup>, Dragče M. Radovanović<sup>e</sup>, Dejan Baskić<sup>f,g</sup>, Srećko R. Trifunović<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> University of Kragujevac, Faculty of Agronomy, Cara Dušana 34, 32000 Čačak, Serbia

<sup>b</sup> University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>c</sup> University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Biochemistry, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>d</sup> Public Health Institute, J.J. Lunge 1, 17500 Vranje, Serbia

<sup>e</sup> University of Kragujevac, Department of Surgery, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>f</sup> University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Centre for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>g</sup> Public Health Institute, Nikole Pašića 1, 34000 Kragujevac, Serbia

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 13 July 2017

Received in revised form

23 December 2017

Accepted 26 December 2017

Available online 27 December 2017

### Keywords:

Coumarine-derived ligands

Palladium(II) complexes

Cytotoxicity

Antimicrobial activity

## ABSTRACT

In reaction of 3-acetyl-4-hydroxy coumarine with methionine methyl ester hydrochloride and tryptophane methyl ester hydrochloride the corresponding enamine ligands were obtained. Palladium (II) complexes were prepared in reaction of potassium-tetrachloridopalladate (II) and corresponding enamine. All compounds were characterized by microanalysis, infrared, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *In vitro* antitumor activity of the mentioned ligands and corresponding palladium (II) complexes, as well as me-Gly and me-Val ligands and [Pd (me-Gly)Cl] and [Pd (me-Val)<sub>2</sub>] complexes was determined by MTT assay against two leukemia cell lines (JVM-13 and MOLT-4) and against primary leukemic cells isolated from chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients. Antimicrobial activity of the tested compound was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC) against three reference bacterial strains: *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and one clinical isolate of yeast: *Candida* spp.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Coumarine and their derivatives represent very important class of the natural compounds that exhibit a wide spectrum of biological activity such as cytotoxic activity against several human tumor cell lines [1,2] as well as spasmolytic, antiarrhythmic, cardiotonic and photodynamic [3] and antioxidant [4] activity. They are also used in flavoring food and in cosmetic products as fragrances [5–7]. Anti-coagulant [8,9] and antitumor activity [2,10–12] of the metal complexes was investigated.

Although palladium (II) complexes have structural analogy with

platinum (II) complexes, those complexes generally showed lower antitumor activity than cisplatin due to the fact that palladium (II) complexes are more labile in comparison to the corresponding platinum (II) complexes [13]. However, some of palladium (II) complexes exerted higher antitumor activity in comparison with cisplatin and carboplatin [14].

Moreover, the emergence and spread of antibiotic resistance in bacteria lead to the increased need for new antibacterial agents. There are numerous attempts to synthesize new compounds that might be active against multiresistant microorganisms. A large number of newly synthesized metal complexes have been studied for their antimicrobial activity. The synthesis of metal complexes with organic bioactive ligands is becoming increasingly important field in science research [15–17]. The experimental analyses so far have suggested that antimicrobial activities of organic ligands and

\* Corresponding author.

E-mail address: [srecko@kg.ac.rs](mailto:srecko@kg.ac.rs) (S.R. Trifunović).

their metal complexes are strongly dependent on the central metal ion [15]. The cellular components and palladium complex create new formation which favors the palladium (II) complex permeation through the lipid layer of the microorganisms. Oxidation processes may also be involved in antimicrobial activity of palladium (II) complexes against different microorganisms. The final targets and the mechanisms through which palladium complexes act against microorganisms remain unknown [18]. However, palladium complexes were found to possess a remarkable antibacterial activity against gram positive and gram negative bacteria [19].

Herein we described the synthesis, characterization, antimicrobial and antitumor activity of the new coumarin derivatives with methionine methyl ester hydrochloride and tryptophan methyl ester hydrochloride as well as their palladium (II) complexes. This paper also reports the antimicrobial and antitumor activity of the previously prepared coumarin derivatives with glycine methyl ester and valine methyl ester and their palladium (II) complexes [20,21].

## 2. Experimental

### 2.1. Materials and methods

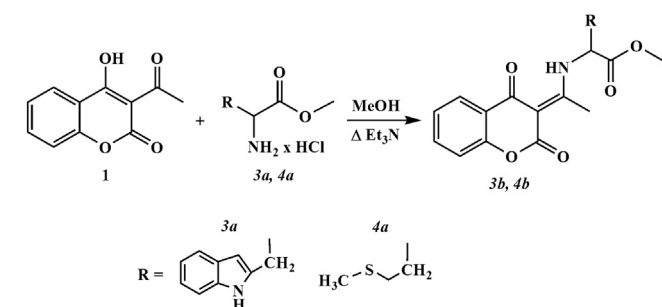
#### 2.1.1. Chemistry

Methyl esters hydrochlorides of *S*-Glycine, *S*-Valine, *S*-Methionine and *S*-Tryptophane, triethylamine, methanol, ethanol, toluene, acetone and potassium-tetrachloridopalladate (II) were obtained from Sigma Aldrich, Germany. Compound 3-acetyl-4-hydroxycoumarin was synthesized by the previously described procedure [22].

**2.1.1.1. Synthesis of enamines 3b and 4b.** A mixture of 3-acetyl-4-hydroxy coumarin (0.5 g, 0.00245 mol), hydrochlorides of methyl ester of tryptophan (3a) or methionine (4a) (0.00245 mol) and trimethylamine (0.202 g, 0.002 mol) in methanol (50 mL) was refluxed for 2 h (Scheme 1.) [1,2]. The progress of the reactions was monitored by TLC (toluene: acetone = 8: 2). After the completion of the reactions, the evaporation of solvent to the half of volume and addition of 5 mL of water, the obtained white crystals were filtered, dried and recrystallized from 96% ethanol.

**2.1.1.2. Methyl 2-(1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)-3-(1H-indol-3-yl)propanoate 3b.** Chemical Formula: C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, MW: 404.41, Elemental Analysis: Calc. C, 68.31; H, 4.98; N, 6.93; found C, 68.55; H, 5.03; N, 6.96. M. p. 186. Yield: 0.84 g (85%), R<sub>f</sub> = 0.46.

IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 3420 (NH), 3051 (=CH), 2997 (CH), 1738 (C=O from COOCH<sub>3</sub>), 1693 (C=O from 2,4-dioxochroman part), 1615, 1578, 1484 and 1438 (C=C), 1221 ( $\nu_{as}$ C-O-C from COOCH<sub>3</sub>), 1094 ( $\nu_{s}$ C-O-C from COOCH<sub>3</sub>).



**Scheme 1.** Transformation of 3-acetyl-4-hydroxy coumarin 1 to enamines 3b and 4b.

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 2.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C-1'), 3.43 (m, 1H, C-1''), 3.77 (s, 3H, CH<sub>3</sub> from COOCH<sub>3</sub>), 4.79 (m, 2H, C-2''), 7.09 (m, 1H, C-6'''), 7.09 (m, 1H, C-5'''), 7.11 (s, 1H, C-2'''), 7.21 (m, 1H, C-6), 7.31 (m, 1H, C-4'''), 7.32 (m, 1H, C-5), 7.51 (m, 1H, C-7), 7.53 (m, 1H, C-7'''), 8.03 (d, 1H, C-8, *J* = 7.7 Hz), 8.73 (s, 1H, NH), 14.81 (s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 18.3 (CH<sub>3</sub>-C-1'), 29.4 (C-2''), 53.1 (CH<sub>3</sub> from COOCH<sub>3</sub>), 57.9 (C-1''), 97.4 (C-3), 108.3 (C-7'''), 111.3 (C-8), 116.4 (C-5'''), 117.7 (C-3'''), 119.6 (C-4), 122.2 (C-6'''), 123.1 (C-5), 123.5 (C-6), 124.4 (C-9'''), 125.9 (C-10), 126.9 (C-2'''), 133.7 (C-7), 133.9 (C-8'''), 153.4 (C-9), 159.4 (C-2), 176.4 (C-1'), 181.1 (C-4).

**2.1.1.3. Methyl 2-(1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)-4-(methylthio)butanoate 4b.** Chemical Formula: C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>S, MW: 349.40, Elemental Analysis: Calc. C, 58.44; H, 5.48; N, 4.01; found C, 58.39; H, 5.55; N, 4.11. M. p. 99. Yield: 0.69 g (81%), R<sub>f</sub> = 0.53.

IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 3418 (NH), 3080 (=CH), 2994 and 2921 (CH), 1739 (C=O from COOCH<sub>3</sub>), 1705 (C=O from 2,4-dioxochroman part), 1612, 1571, 1486 and 1469 (C=C), 1163 ( $\nu_{as}$ C-O from COOCH<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 2.11 (s, 3H, S-CH<sub>3</sub>), 2.31 (m, 2H, C-2''-H), 2.65 (m, 2H, C-3'''), 2.74 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C-1'), 3.84 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.86 (m, 1H, C-1''-H, <sup>3</sup>*J* = 6.1 Hz), 7.21 (m, 2H, C-H-6, C-H-7), 7.54 (dd, 1H, <sup>3</sup>*J*<sub>H-8, H-7</sub> = 7.89 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>H-8, H-6</sub> = 2.14 Hz, C-H-8), 8.05 (dd, 1H, <sup>3</sup>*J*<sub>H-5, H-6</sub> = 6.23 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>H-5, H-7</sub> = 1.91 Hz, C-H-5), 14.73 (br s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 15.0 (S-CH<sub>3</sub>), 18.7 (C-1'-CH<sub>3</sub>), 29.6 (C-3'''), 31.4 (C-2''), 52.3 (CH<sub>3</sub> from COOCH<sub>3</sub>), 55.0 (C-1''), 97.4 (C-3), 116.3 (C-8), 117.7 (C-5), 123.4 (C-6), 133.8 (C-10), 153.3 (C-7), 159.2 (C-9), 162.2 (C-2), 169.2 (C-1'), 176.9 (C-4).

**2.1.1.4. Synthesis of palladium(II) complexes 3c and 4c.** Potassium-tetrachloridopalladate (II) (0.05 g, 1.53·10<sup>-4</sup> mol) was dissolved in 10.0 mL of water on steam bath and the same amount of the corresponding enamine (3b or 4b) (1.53·10<sup>-4</sup> mol) dissolved in methanol (10.0 mL) was added (Scheme 2.) [1]. The mixture was stirred for 3 h and the yellow precipitate was obtained. The precipitate was filtered off.

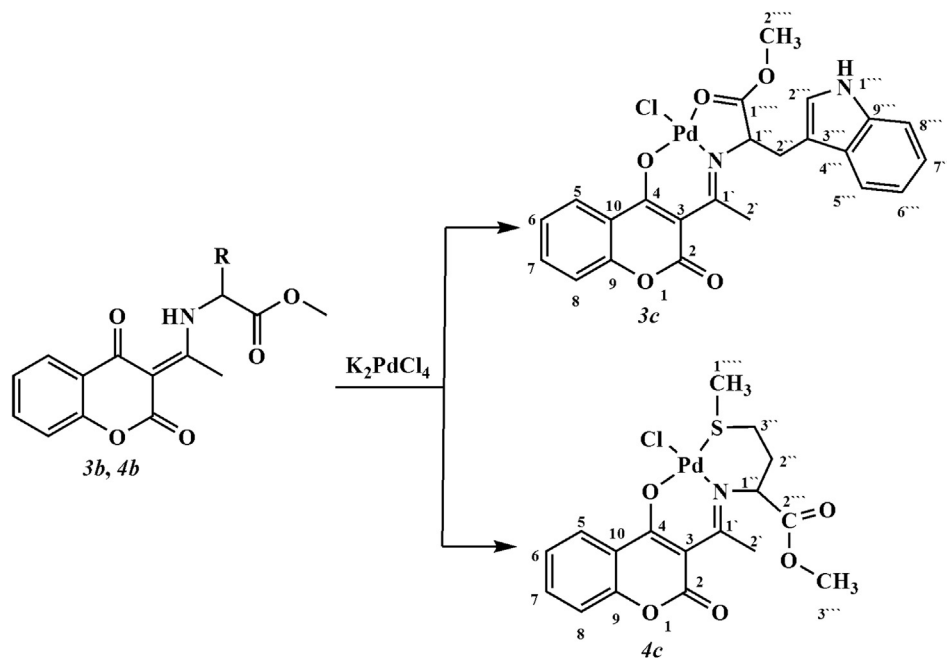
**2.1.1.5. The preparation of the chlorido-(methyl 2-(1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)-3-(1H-indol-3-yl)propanoate palladium(II) complex 3c.** Chemical Formula: C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Pd, MW: 564.288, Elemental Analysis: Calcd: C, 48.95; H, 3.75; N, 4.96, found C, 48.81; H, 3.80; N, 4.94. Yield: 0.027 g (31.39%).

IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 3421 (NH), 2953, 2925, 2852 (CH), 1737 (C=O from COOCH<sub>3</sub>), 1697 (C=O from 2,4-dioxochroman part), 1604 (C=N), 1572, 1486, 1466 and 1437 (C=C), 1213 ( $\nu_{as}$ C-O-C from COOCH<sub>3</sub>), 1060 ( $\nu_{s}$ C-O-C from COOCH<sub>3</sub>), 526 (Pd-O), 469 (Pd-N).

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm: 2.44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C-2'), 3.24 (m, 2H, C-1''), 3.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub> from COOCH<sub>3</sub>), 7.01 (m, 1H, C-7'''), 7.01 (m, 1H, C-6'''), 7.05 (m, 1H, C-5'''), 7.40 (m, 1H, C-4'''), 8.67 (s, 1H, NH), 7.18 (s, 1H, C-2'''), 5.24 (m, 2H, C-2''), 7.32 (m, 1H, C-5), 7.28 (m, 1H, C-6), 7.90 (m, 1H, C-7), 7.99 (d, 1H, C-8, *J* = 7.7 Hz).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm: 18.65 (CH<sub>3</sub>-C-1'), 28.64 (C-2''), 53.2 (C-1''), 57.25 (CH<sub>3</sub> from CH<sub>3</sub>OOC), 96.5 (C-3), 107.2 (C-3'''), 111.6 (C-7'''), 116.2 (C-8), 117.8 (C-10), 119.9 (C-5'''), 120.15 (C-4), 121.2 (C-6'''), 123.7 (C-5), 124.6 (C-6), 125.8 (C-9'''), 126.95 (C-7), 133.3 (C-2'''), 136.03 (C-8'''), 153.05 (C-9), 158.3 (C-2), 163.31 (C-1'), 176.2 (C-4).

**2.1.1.6. The preparation of the chlorido-(methyl 2-(1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)-4-(methylthio)butanoate) palladium(II) complex 4c.** Chemical Formula: C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>ClNSO<sub>5</sub>Pd, MW: 490.234, Elemental Analysis: Calcd: C, 41.65; H, 3.70; N, 2.86, S, 6.53; found C, 41.59; H, 3.74; N, 2.80, S, 6.51. Yield: 0.029 g (38.67%).



Scheme 2. Synthesis of palladium (II) complexes of 4-hydroxy-coumarins **3c** and **4c**.

IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 3139 (=CH), 2934 and 2852 (CH), 1738 (C=O from COOCH<sub>3</sub>), 1693 (C=O from 2,4-dioxochroman part), 1601 (C=N), 1566, 1485 and 1421 (C=C), 1207 (C–O–C from COOCH<sub>3</sub>), 528 (Pd–O), 467 (Pd–N).

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm: 2.34 (s, 3H, S–CH<sub>3</sub>), 2.43 (m, 2H, C-2''), 2.48 (m, 2H, C-3''), 2.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>–C-1), 3.42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>OOC), 3.81 (m, 1H, C-1''–H, <sup>3</sup>*J* = 6.1 Hz), 7.34 (m, 2H, C–H-6, C–H-7), 7.68 (dd, 1H, <sup>3</sup>*J*<sub>H-8, H-7</sub> = 7.89 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>H-8, H-6</sub> = 2.14 Hz, C–H-8), 7.88 (dd, 1H, <sup>3</sup>*J*<sub>H-5, H-6</sub> = 6.23 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>H-5, H-7</sub> = 1.91 Hz, C–H-5).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm: 17.74 (S–CH<sub>3</sub>), 20.1 (CH<sub>3</sub>–C-1'), 21.6 (C-3''), 28.8 (C-2''), 53.2 (CH<sub>3</sub> from COOCH<sub>3</sub>), 60.0 (C-1''), 109.6 (C-3), 116.1 (C-8), 117.9 (C-5), 123.9 (C-6), 125.9 (C-7'''), 134.2 (C-10), 153.5 (C-7), 161.5 (C-9), 169.9 (C-2), 173.5 (C-1'), 173.7 (C-4).

Elemental microanalyses for C, H and N were performed by standard methods by a Vario EL III C, H, N Elemental Analyzer. The melting point of the ligand was determined by using Kofler-hot stage apparatus and is uncorrected. Infrared spectra were run on Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR spectrometer by using the KBr pellet technique (4000–400  $\text{cm}^{-1}$ ). The NMR spectra were recorded on a Varian Gemini 200 spectrometer (Varian, Palo Alto, CA); <sup>1</sup>H NMR at 200 MHz and <sup>13</sup>C NMR at 50 MHz, solvents CDCl<sub>3</sub> and DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS internal standard. Chemical shifts were given in  $\delta$  (ppm) and coupling constants (*J*) in hertz (Hz) (abbreviations: s-singlet, d-doublet, dd-doublet of doublet, m-multiplet, br-broadened s-singlet). Analytical TLC was performed on silica gel (Silica gel 60, layer 0.20 mm, Alugram Sil G, Mashery-Nagel, Germany). The visualization of TLC plates was performed by using UV lamp at 254 nm and 365 nm (VL-4. LC, 365/254, VilberLourmat, France).

## 2.1.2. Biological evaluation

Previously synthesized ligands and their complexes me-Val (**1b**), [Pd (me-Val)<sub>2</sub>] (**1c**), me-Gly (**2b**) and [Pd (me-Gly)]Cl<sub>2</sub> (**2c**) [20,21], as well as newly prepared me-Trp (**3b**), [Pd (me-Trp)]Cl<sub>2</sub> (**3c**), me-Met (**4b**) and [Pd (me-Met)]Cl<sub>2</sub> (**4c**) were evaluated for their antimicrobial and cytotoxic activities.

### 2.1.2.1. Cytotoxic activity

**2.1.2.1.1. Preparation of drug solution.** Tested palladium complexes **1c**, **2c**, **3c** and **4c** as well as ligand precursors **1b**, **2b**, **3b** and **4b** were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Fisher Scientific, United Kingdom) at the concentration of 20 mM, filtered through a 0.22 mm millipore filter prior to their utilization, and diluted by a culture medium to different concentrations, so the final concentration of DMSO in culture medium never surpassed 0.5% (v/v).

**2.1.2.1.2. Cell lines.** Human leukemia cell lines JVM 13 (ATCC<sup>®</sup> CRL-3003<sup>™</sup>) and MOLT-4 (ATCC<sup>®</sup> CRL-1582<sup>™</sup>) were a generous donation by professor Sonja Denčić, Department of Biochemistry, Belgrade University School of Medicine, Serbia. These cell lines were maintained in a medium consisting of RPMI-1640, 2 mM L-glutamine, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin and 100 IU penicillin, supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS).

**2.1.2.1.3. Patients.** The local Ethics Committee approved the research and the written informed consent was obtained from all subjects according to the Declaration of Helsinki. Peripheral blood samples from 5 chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients were included in the study. CLL was diagnosed by establishing the clinical criteria and it was confirmed by immunophenotypic analysis for the expression of CD5, CD19 and monoclonal immunoglobulin in accordance with updated NCI Working Group Guidelines [23]. There were no patients positive for parameters of systemic inflammation and diseases that might have influenced the cell viability.

**2.1.2.1.4. Cell preparation.** The blood samples from every patient were obtained in the morning and collected in silicone coated blood collection tubes (Terumo). All samples that contained about 9 mL of peripheral blood were centrifuged at 400  $\times$  g for 10 min to separate plasma and cells. Afterward, peripheral blood polymorphonuclear and mononuclear leukocytes were separated by single step continuous density-gradient centrifugation with Histopaque 1077 (Sigma, Germany). The separated mononuclear cells were washed three times with culture medium RPMI 1640 and resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% autologous serum, 100 IU/mL penicillin G and 100 mg/mL streptomycin. The monocytes were eliminated by adhesion on plastic Petri dishes [24].



**2.1.2.1.5. MTT assay.** Palladium complexes **1c**, **2c**, **3c** and **4c** as well as their corresponding ligand precursors **1b**, **2b**, **3b** and **4b** were examined for their effect on viability of two diverse leukemic cell lines (JVM-13 and MOLT-4) and lymphocytes isolated from five CLL patients (CLL cells). The viability of cultivated cells was measured by assaying the reduction of MTT to formazan [25]. Briefly, the examined cells were maintained in cell culture medium containing increasing concentrations of palladium complexes and ligand precursors (10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M and 250  $\mu$ M) or maintained in the cell culture medium that contained none of the tested substances, but contained the appropriate amount of DMSO (control). After 24 and 48 h of maintaining cells in the atmosphere that contained 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C, the 96 well plates were centrifuged for 5 min at 400  $\times$  g, the culture medium was removed, and MTT solution (5 mg/mL) was added to the cells. After additional 4 h of incubation, the microtiter plates were centrifuged again for 5 min at 400  $\times$  g, the cell culture medium with MTT solution was removed and DMSO (150  $\mu$ L/well) was added to each well to dissolve the crystals of formazan. The microtiter plates were shaken for 10 min and later, the absorbance was measured at 595 nm with a multi-plate reader (Zenyth 3100, Anthos Labtec Instruments, Austria). The results were presented as relative to the control value (untreated cells). The IC<sub>50</sub> values were determined using Microsoft Office Excel 2010.

### 2.1.2.2. Antimicrobial activities

**2.1.2.2.1. Preparation of drug solution.** Tested palladium complexes **1c**, **2c**, **3c** and **4c** and ligand precursors **1b**, **2b**, **3b** and **4b** were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), and then diluted with normal saline solution to achieve a final DMSO concentration of 10% prior to testing. The following steps are required to prepare concentrated stock solutions: 1 mg of the test substance was dissolved in 50  $\mu$ L of DMSO, then 450  $\mu$ L of normal saline was added, yielding a final concentration of 2000  $\mu$ g/mL. A commercial antibiotics, vancomycin and ceftriaxone (Galenika a. d., Belgrade) were dissolved in sterile physiological solution (Torlak, Belgrade).

**2.1.2.2.2. Microorganisms.** The antimicrobial screening of all test compounds was carried out against three reference strains of bacteria (American Type Culture Collection [ATCC]) (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) and a clinical strain of yeast *Candida albicans*.

**2.1.2.2.3. Preparation of bacterial and fungal inocula (McFarland 0.5).** The bacterial and fungal inocula were prepared to match McFarland 0.5 turbidity standard by the direct colony suspension method. The colonies were directly taken from the plate and were suspended in 5 mL of sterile saline (0.85% NaCl). The suspension was adjusted to match the 0.5 McFarland turbidity standard (0.5 mL of 1:17% w/v of BaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O + 99.5 mL of 1% w/v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) by performing visual comparisons and by using a spectrophotometer. The spectrophotometer was set at a wavelength of 620 nm for bacteria and 513 nm for yeast to get an absorbance of 0.08–0.1 for bacteria and between 0.09 and 0.13 for yeast. This results in a suspension containing approximately 1–1.5  $\times$  10<sup>8</sup> CFU per ml for bacteria and 0.5–2.5  $\times$  10<sup>4</sup> yeasts per milliliters. A hundred microliters of each inoculum was then resuspended in 2000  $\mu$ L of normal saline, the resulting concentration of bacteria was 5  $\times$  10<sup>6</sup> CFU/mL and 10<sup>3</sup> CFU/mL of yeast. A portion (10  $\mu$ L - 5  $\times$  10<sup>4</sup> bacteria or 10 yeast cells) of each strain was inoculated into each well of a 96-well microplate. The final concentration of bacteria in each well was 5  $\times$  10<sup>5</sup> CFU/mL and 10<sup>2</sup> CFU/mL of yeast [26].

**2.1.2.2.4. Broth microdilution method.** Antimicrobial activities of ligands and their palladium (II) complexes were determined by the broth microdilution method and expressed as the minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal bactericidal/microbicidal

concentration (MBC/MMC).

Each well of “U”-bottom microtiter plate (Spektr, Čačak) was filled with 100  $\mu$ L of nutrient broth. Then, 100  $\mu$ L of the 2000  $\mu$ g/mL stock solution of test substances was placed into the first well (well A) of each column of the microtiter plate. Double serial dilutions were made from rows A to H. The concentration of the resulting solutions was 1000  $\mu$ g/mL in the first row of wells to 15.625  $\mu$ g/mL in the second to last row of wells. Ten microliters of test bacterial and yeast suspension were inoculated into each well of the plate, resulting in a final inoculum of 0.5  $\times$  10<sup>4</sup> bacteria per ml and 10<sup>2</sup> yeasts per mL. The inoculated microtiter plates with bacterial inocula were incubated at 37 °C for 24 h, and yeast inoculum at 37 °C for 48 h.

MIC<sub>90</sub> is defined as the lowest concentration of the test substances inhibiting visible growth of bacteria and yeast (e.g. no turbidity), and MIC<sub>50</sub> is defined as the highest concentration with visible growth of bacteria and yeast (e.g. the lowest turbidity). Standard commercial antibiotics, vancomycin and ceftriaxone were used as positive controls. In addition, bacterial and yeast growth in the presence of 5% DMSO was used as a control. The concentration of DMSO was additionally decreased because of the twofold serial dilution assay. Also, the test for bacterial and fungal contamination and the nutritive properties test or fertility test were carried out within each test.

After incubation, 10  $\mu$ L of the dilution of the each well with no visible growth was spread onto a nutrient agar (Torlak, Belgrade, Serbia) plates and allowed growth at 37 °C overnight to determine minimal bactericidal/microbicidal concentration (MBC/MMC) of test compounds. The lowest test compound concentration on the agar plate, with no visible bacterial growth observed (zero colony), was defined as MBC/MMC [26].

**2.1.2.2.5. Statistical analysis.** Each experiment was done in triplicate and conducted on every sample. Every value was presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using commercial version of SPSS 20.0 for Windows. The data distributions were evaluated for normality using the Shapiro-Wilk test. Depending on the data distribution, the statistical assessment was executed by one-way ANOVA or Student's t-test for paired observations and only *p* values less than 0.05 were considered significant.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Chemistry

The obtained ligands are soluble in methanol, while their complexes are soluble only in dimethyl sulfoxide.

The ligands **3b** and **4b** as well as corresponding palladium complexes **3c** and **4c** were synthesized as depicted in Schemes 1 and 2. The treatment of equimolar amounts of 3-acetyl-4-hydroxy coumarine **1** and methyl esters as hydrochlorides (**3a** or **4a**) in the presence of triethylamine in refluxing methanol yielded ligands **3b** and **4b**. Palladium (II) complexes of ligand **3c** and **4c** were synthesized by mixing corresponding enamines (**3b** or **4b**) and potassium tetrachloridopalladate (II) in 1:1 M ratio in water/methanol (1:1, v/v) solution at room temperature for 3 h.

The structures of compound **3b** or **4b** were confirmed by spectroscopic methods (IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and MS) as well as by elemental analysis. The IR spectra of enamines (**3b** or **4b**) showed characteristic bands for NH group (3420 cm<sup>-1</sup> for **3b**; 3418 cm<sup>-1</sup> for **4b**). Stretching vibrations of carbonyl group from COOCH<sub>3</sub> from corresponding enamines (**3b** or **4b**) were observed at 1738 and 1739 cm<sup>-1</sup>, respectively, while carbonyl groups from 2,4-dioxochroman part showed absorptions at 1693 and 1705 cm<sup>-1</sup>, respectively. In the <sup>1</sup>H NMR spectrum of ligands **3b** and **4b**, the

signals of methyl protons from carbon attached to C-1' in a form of singlet appeared at 2.29 and 2.74 ppm, respectively, while the singlets from COOCH<sub>3</sub> were observed at 3.77 and 3.84 ppm, respectively. Enamino NH protons of ligands **3b** and **4b** were observed as broadened singlets at 14.81 ppm and 14.73 ppm, respectively.

In the <sup>13</sup>C NMR spectra of ligands **3b** and **4b**, C-1' carbons showed resonances at 176.1 ppm and 169.2 ppm, respectively, whereas methyl carbon attached to C-1' were noted at 18.35 ppm and 18.70 ppm, respectively. The C-2 carbons in ligands **3b** and **4b** were observed at 159.4 ppm and 162.2 ppm, respectively, while C-4 carbons were noted at 176.2 ppm and 176.9 ppm, respectively.

Spectral analysis showed significant difference compared to the results gained from ligand analysis. In this regard, IR spectra of complexes (**3c** and **4c**) showed absence of NH group signal, and instead characteristic bands of C=N group (1604 cm<sup>-1</sup>, 1601 cm<sup>-1</sup> respectively) were identified. Therefore, during the formation of palladium (II) complexes enamino form of ligand transferred to imine form. Despite this, Pd–O (526 cm<sup>-1</sup> and 528 cm<sup>-1</sup> respectively) and Pd–N (469 cm<sup>-1</sup> and 467 cm<sup>-1</sup> respectively) bands were observed. Also, the bands observed at 1697 cm<sup>-1</sup> and 1693 cm<sup>-1</sup> (**3c** and **4c** respectively) were dissimilar to the ones observed in ligand corresponds to 2,4-dioxochroman part.

In the <sup>1</sup>H NMR spectrum of corresponding palladium (II) complexes **3c** and **4c**, the broadened singlet signals of NH were not found in contrast to the ligand. The signals of methyl protons from carbon attached to C-1' showed resonance at 2.3 ppm, 2.44 ppm

and 2.43 ppm respectively which is for **4c** complexes 0.4 and 0.31 ppm lower than in corresponding ligands, while in the case of **3c** complex situation is reversed and signal of methyl protons from carbon attached to C-1' in spectrum of complex show increased resonance for 0.15 ppm. Noticed were also the lower signals corresponding to singlets from COOCH<sub>3</sub> which in spectrum of complexes appeared at 3.37 ppm and 3.42 ppm (**3c** and **4c** respectively). Out of all of this data, confirmed was that in the formation of palladium (II) complexes involved were oxygen from C-4' belonging to coumarine part and nitrogen from imino group.

The <sup>13</sup>C NMR spectrum of palladium (II) complexes **3c** and **4c** showed significant difference considering spectrums of ligands. As for the **3c** complex, corresponding carbons were also noted showing the lower resonance with the exception of methyl carbon attached to C-1' showing the increased resonance for 0.35 ppm. The mentioned carbons in the example of **4c** complex in spectrum showed the increased resonance for carbons marked as C-1', methyl carbon attached to C-1' and C-2, while in the case of carbon at position 4, the resonance was decreased.

### 3.2. Biological evaluation

#### 3.2.1. Cytotoxic activity

In order to determine whether palladium complexes **1c**, **2c**, **3c** and **4c** and their respective ligands **1b**, **2b**, **3b** and **4b** demonstrated cytotoxic effects toward cancer cells, three types of human leukemia cells (JVM-13, MOLT-4 and CLL cells) had been treated with

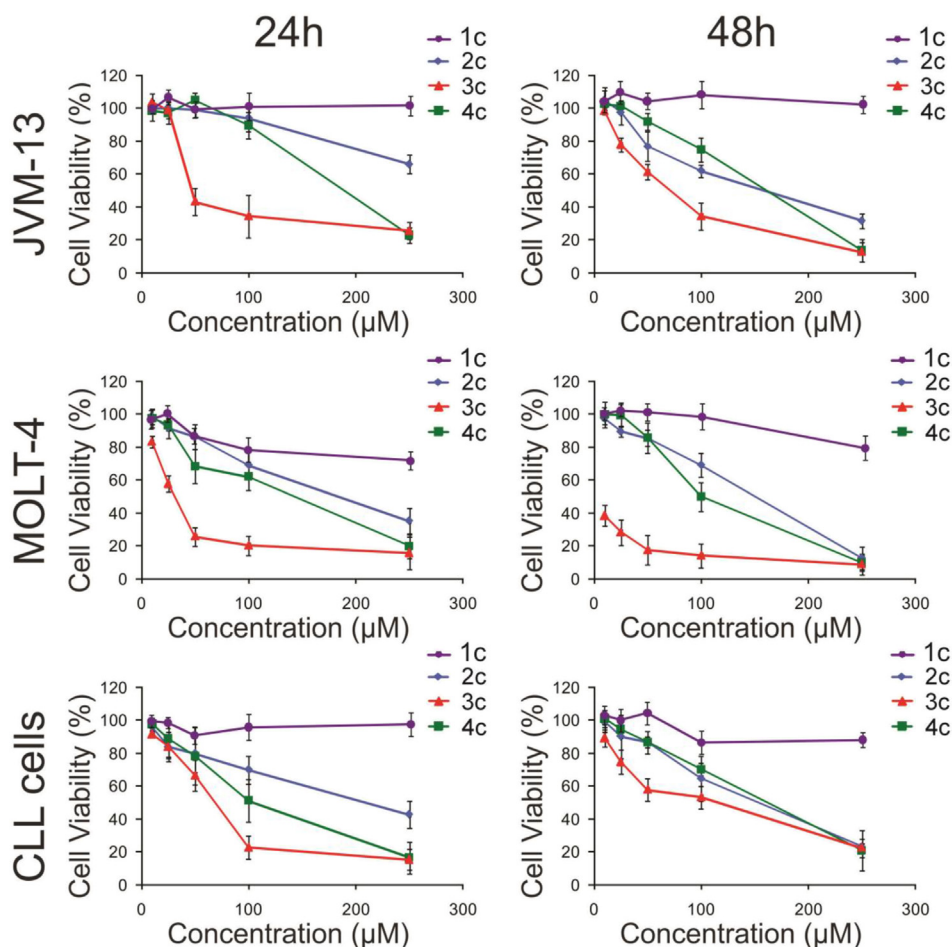


Fig. 1. JVM-13, MOLT-4 and CLL cells isolated from five CLL patients were incubated for 24 and 48 h with increasing concentrations of palladium complexes **1c**, **2c**, **3c** and **4c**.

various concentrations of palladium complexes or ligands for 24 and 48 h and the resulting number of remaining viable cells was assessed. The viability of examined human cancer cells observed 24 h and 48 h after treatment with increasing concentrations of selected palladium complexes is presented in Fig. 1. The cytotoxic effects of palladium complexes and ligands are also presented as IC<sub>50</sub> values and are shown in Table 1.

Tested palladium complex **1c** had very little effect on viability of examined leukemic cells after 24 and 48 h with IC<sub>50</sub> values over 450 μM (Table 1). The treatment of all three types of tumor cells for 24 h and 48 h with complexes **2c**, **3c** and **4c** reduced the viability of cancer cells in a dose-dependent manner, as shown by the results of MTT assay (Fig. 1.). Only palladium complexes **2c** and **3c** demonstrated time-dependent cytotoxic action toward MOLT-4 and JVM-13 cells, respectively (24 h vs. 48 h, *p* < .05). All other investigated complexes exhibited no time-dependent cytotoxic effect on tumor cells.

The MTT assay results showed that palladium complex **3c** exhibited the highest cytotoxicity against JVM-13, MOLT-4 and CLL cells compared to the other tested compounds after 24 and 48 h of treatment (Fig. 1). After 48 h of incubation, the IC<sub>50</sub> values for complex **3c** were 73.3 ± 12.7 μM, 5.6 ± 3.4 μM and 76.7 ± 18.1 μM for JVM-13, MOLT-4 and CLL cells, respectively. Alternatively, the respective ligand **3b** exhibited low toxicity against all three types of tumor cells with IC<sub>50</sub> values of 442.7 ± 77.6 μM, 286.3 ± 65.2 μM and 423.9 ± 68.2 μM for JVM-13, MOLT-4 and CLL cells, respectively (Table 1).

Conversely, the IC<sub>50</sub> values for palladium complexes **2c** and **4c** were significantly lower than for complex **3c**, but there were no significant difference in cytotoxic effects between complex **2c** and **4c** toward examined cancer cells (**2c** vs. **4c**, *p* > .05). Also, the

corresponding ligand **2b** showed the lowest cytotoxicity after 48 h treatment to all three types of investigated tumor cells with IC<sub>50</sub> values of over 500 μM for all three types of examined leukemic cells.

Furthermore, the incubation of all three types of tumor cells with palladium ligands for 24 and 48 h had no effect on viability of these cells at concentrations lower than 250 μM compared to the untreated cells. The only exception is ligand **3b** that decreased viability of MOLT-4 cells to 88.4 ± 7.6% and 83.4 ± 8.5% in concentration of 100 μM after 24 h and 48 h incubation, respectively.

In general, the investigated palladium (II) complex **3c** showed high potency as an antitumor agent against all three types of tumor cells (JVM-13, MOLT-4 and CLL cells) after 48 h of incubation. The cytotoxicity of studied complex after 48 h of incubation was the highest against MOLT-4 cells with IC<sub>50</sub> = 5.6 ± 3.4 μM. Also, all palladium (II) complexes showed more potent cytotoxic activity than its corresponding ligands, which had no cytotoxic effect on the examined tumor cells.

### 3.2.2. Antimicrobial activity

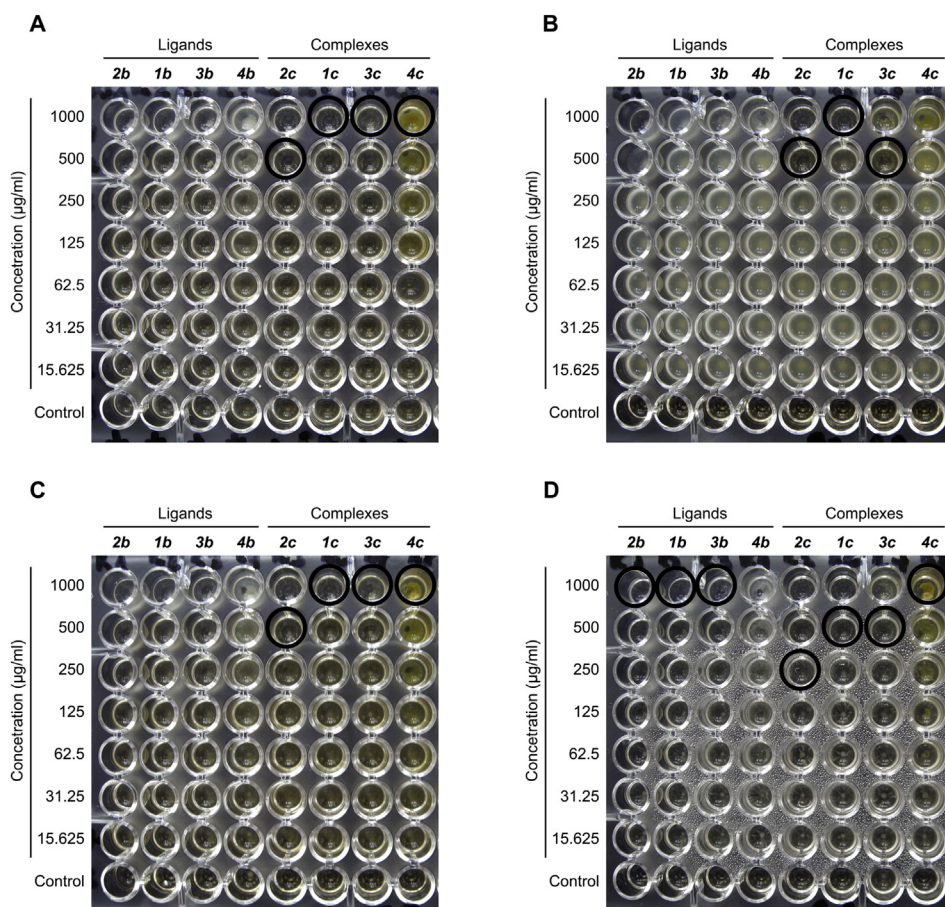
The results of *in vitro* testing of the antimicrobial activities of the ligands and their corresponding palladium (II) complexes (Fig. 2) are shown as MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>, MBC and MMC in μg/mL in Table 2. All the MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>, MBC and MMC values of commercial antibiotics are listed in Table 3. The final DMSO concentration below 5% had no activity against bacteria and yeast.

The intensity of antimicrobial action of ligands and their corresponding palladium (II) complexes varied depending on the species of microorganism. However, these tested substances showed significantly lower antimicrobial activity compared to commercial antibiotics. Antibiotics, vancomycin and ceftriaxone

**Table 1**  
IC<sub>50</sub> (μM) values determined by MTT assay for investigated palladium complexes (**1c**, **2c**, **3c** and **4c**) and their corresponding ligands (**1b**, **2b**, **3b** and **4b**), after 24 h and 48 h treatment of JVM-13, MOLT-4 and CLL cells.

IC <sub>50</sub> (μM)	JVM-13	
	24h	48h
<b>1c</b>	>500	>500
<b>2c</b>	369.8 ± 27.6	126.4 ± 12.9
<b>3c</b>	47.2 ± 11.3	73.3 ± 12.7
<b>4c</b>	161.3 ± 22.1	138.8 ± 16.5
<b>1b</b>	>500	>500
<b>2b</b>	>500	>500
<b>3b</b>	481.9 ± 97.2	442.7 ± 77.6
<b>4b</b>	>500	>500
	MOLT-4	
	24h	48h
<b>1c</b>	>500	420.7 ± 35.8
<b>2c</b>	187.8 ± 22.4	128.4 ± 13.1
<b>3c</b>	32.9 ± 9.2	5.6 ± 3.4
<b>4c</b>	145.5 ± 11.2	112.7 ± 13.5
<b>1b</b>	>500	453.0 ± 62.5
<b>2b</b>	>500	>500
<b>3b</b>	288.7 ± 57.1	286.3 ± 65.2
<b>4b</b>	447.3 ± 69.7	448.7 ± 53.1
	CLL cells	
	24h	48h
<b>1c</b>	>500	>500
<b>2c</b>	207.7 ± 18.6	138.4 ± 19.6
<b>3c</b>	78.3 ± 14.8	76.7 ± 18.1
<b>4c</b>	107.1 ± 17.6	113.5 ± 20.3
<b>1b</b>	>500	>500
<b>2b</b>	>500	>500
<b>3b</b>	463.8 ± 86.4	423.9 ± 68.2
<b>4b</b>	>500	>500





**Fig. 2.** *In vitro* antibacterial and antifungal activity of the palladium (II) complexes and their corresponding ligands. **A)** *Staphylococcus aureus*; **B)** *Pseudomonas aeruginosa*; **C)** *Enterococcus faecalis*; **D)** *Candida albicans*.

**Table 2**  
The antibacterial and antifungal activities of newly synthesized compounds.

Species Compounds	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Candida albicans</i> , clinical strain
<b>1b</b>	<sup>1</sup> MIC <sub>50</sub> 1000 ± 0.0 <sup>2</sup> MIC <sub>90</sub> >10 <sup>3</sup> <sup>3</sup> MBC/MMC >10 <sup>3</sup>	1000 ± 0.0 >10 <sup>3</sup> >10 <sup>3</sup>	1000 ± 0.0 >10 <sup>3</sup> >10 <sup>3</sup>	500 ± 0.0 833.3 ± 288.7 >10 <sup>3</sup>
<b>2b</b>	<sup>1</sup> MIC <sub>50</sub> 1000 ± 0.0 <sup>2</sup> MIC <sub>90</sub> >10 <sup>3</sup> <sup>3</sup> MBC/MMC >10 <sup>3</sup>	833.3 ± 288.7 >10 <sup>3</sup> >10 <sup>3</sup>	1000 ± 0.0 >10 <sup>3</sup> >10 <sup>3</sup>	500 ± 0.0 833.3 ± 288.7 >10 <sup>3</sup>
<b>3b</b>	<sup>1</sup> MIC <sub>50</sub> 833.3 ± 288.7 <sup>2</sup> MIC <sub>90</sub> >10 <sup>3</sup> <sup>3</sup> MBC/MMC >10 <sup>3</sup>	1000 ± 0.0 >10 <sup>3</sup> >10 <sup>3</sup>	1000 ± 0.0 >10 <sup>3</sup> >10 <sup>3</sup>	1000 ± 0.0 >10 <sup>3</sup> >10 <sup>3</sup>
<b>4b</b>	<sup>1</sup> MIC <sub>50</sub> 833.3 ± 288.7 <sup>2</sup> MIC <sub>90</sub> >10 <sup>3</sup> <sup>3</sup> MBC/MMC >10 <sup>3</sup>	1000 ± 0.0 >10 <sup>3</sup> >10 <sup>3</sup>	1000 ± 0.0 >10 <sup>3</sup> >10 <sup>3</sup>	666.7 ± 288.7 1000 ± 0.0 >10 <sup>3</sup>
<b>1c</b>	<sup>1</sup> MIC <sub>50</sub> 333.3 ± 144.3 <sup>2</sup> MIC <sub>90</sub> 666.7 ± 288.7 <sup>3</sup> MBC/MMC 833.3 ± 288.7	416.7 ± 144.3 833.3 ± 288.7 >10 <sup>3</sup>	416.7 ± 144.3 833.3 ± 288.7 1000 ± 0.0	208.3 ± 72.2 416.7 ± 144.3 666.7 ± 288.7
<b>2c</b>	<sup>1</sup> MIC <sub>50</sub> 208.3 ± 72.2 <sup>2</sup> MIC <sub>90</sub> 416.7 ± 144.3 <sup>3</sup> MBC/MMC 666.7 ± 288.7	166.7 ± 72.2 333.3 ± 144.3 500 ± 0.0	208.3 ± 72.2 416.7 ± 144.3 833.3 ± 288.7	166.7 ± 72.2 208.3 ± 72.2 333.3 ± 144.3
<b>3c</b>	<sup>1</sup> MIC <sub>50</sub> 416.7 ± 144.3 <sup>2</sup> MIC <sub>90</sub> 833.3 ± 288.7 <sup>3</sup> MBC/MMC >10 <sup>3</sup>	>10 <sup>3</sup> >10 <sup>3</sup> >10 <sup>3</sup>	416.7 ± 144.3 833.3 ± 288.7 >10 <sup>3</sup>	666.7 ± 288.7 1000 ± 0.0 >10 <sup>3</sup>
<b>4c</b>	<sup>1</sup> MIC <sub>50</sub> 333.3 ± 144.3 <sup>2</sup> MIC <sub>90</sub> 666.7 ± 288.7 <sup>3</sup> MBC/MMC 1000 ± 0.0	208.3 ± 72.2 416.7 ± 144.3 500 ± 0.0	666.7 ± 288.7 833.3 ± 288.7 1000 ± 0.0	166.7 ± 72.2 416.7 ± 144.3 1000 ± 0.0

MIC, minimum inhibitory concentration (µg/mL).

MBC/MMC, minimum bactericidal concentration/minimum microbicidal concentration (µg/mL).

<sup>1</sup>MIC<sub>50</sub>, <sup>2</sup>MIC<sub>90</sub> and <sup>3</sup>MBC/MMC values are means of three measurements (Mean value ± SD).

**Table 3**  
The antibacterial and antifungal activities of standard antibiotics, vancomycin and ceftriaxone.

Species	Vancomycin			Ceftriaxone		
	<sup>1</sup> MIC <sub>50</sub>	<sup>2</sup> MIC <sub>90</sub>	<sup>3</sup> MBC/MMC	<sup>1</sup> MIC <sub>50</sub>	<sup>2</sup> MIC <sub>90</sub>	<sup>3</sup> MBC/MMC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<15.625	<15.625	<15.625	<15.625	<15.625	15.625
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>1000	>1000	>1000	26.0 ± 9.0	52.1 ± 18.0	62.5 ± 0.0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	20.8 ± 9.0	41.7 ± 18.0	62.5 ± 0.0	416.7 ± 144.3	500 ± 0.0	833.3 ± 288.7
<i>Candida albicans</i> , clinical strain	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

MIC, minimum inhibitory concentration (µg/mL).

MBC/MMC, minimum bactericidal concentration/minimum microbicidal concentration (µg/mL).

<sup>1</sup>MIC<sub>50</sub>, <sup>2</sup>MIC<sub>90</sub> and <sup>3</sup>MBC/MMC values are means of three measurements (Mean value ± SD).

showed no activity against *C. albicans*, as was expected. Observed MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values of ligands were in the range of 500 µg/mL to 1000 µg/mL and 833.3 µg/mL to >1000 µg/mL, respectively. MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values of complexes were in the range of 166.7 µg/mL to 666.7 µg/mL and 208.3 µg/mL to >1000 µg/mL, respectively, depending on the species of microorganism and the tested compound.

The highest antimicrobial activity was found in **2c**, where the lowest MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> was 166.7 µg/mL and 208.3 µg/mL, respectively and MMC was 500 µg/mL against *C. albicans*. Antimicrobial activity of complexes, such as **2c** and **4c** was greater against gram negative than gram positive bacteria (MIC<sub>50</sub> was 166.7 µg/mL and 208.3 µg/mL, respectively) and MBC/MMC values were 500 µg/mL, whereas **1c** complex was less active against *Pseudomonas aeruginosa*, but more active against staphylococci and enterococci. Also, our results suggest that **2c** was more efficient against gram positive bacteria than **4c** and **1c**. However, complex **3c** was less active than **2c**, **4c** and **1c** complexes, especially against gram positive cocci and yeast. Ligands were only active against *C. albicans*.

Palladium complex **3c** exhibited similar antimicrobial effect as the ligand and its Cu(II), Ni(II), Mn(II) and Fe(II) complexes in the study by Al-Shaalan [27]. These compounds were found to have higher activity against gram positive cocci and *Candida albicans*, while for gram negative bacteria, the activity was only exhibited for 100% concentration [15,27]. In accordance with our results for **3c** and **1c** complexes, recent studies of newly synthesized ligands and their corresponding palladium (II) complexes have shown that the complexes presented antimicrobial activity against gram positive, but were not effective against gram negative bacteria [28]. However, our results for **2c** and **4c** complexes did not accord with that previous studies [15,27,28]. The two of palladium (II) complexes exhibited higher antibacterial activity against gram positive bacteria, while the other two palladium (II) complexes showed higher antibacterial activity against gram negative bacteria in our study, which means that the organic ligand, plays important role in the mode of antimicrobial action. The cell wall is different in Gram-positive and Gram-negative bacteria, meaning that bacterial cell wall was not the target for the attack of palladium (II) complexes.

The present study demonstrates that palladium (II) complexes have greater antimicrobial activity than their corresponding ligands being in accordance with some previous studies [29,30]. The ligands and their palladium (II) complex were generally shown to have stronger antifungal activity than antibacterial activity. Also, the tested complexes **3c** and **1c** were more active against gram positive than gram negative bacteria, while **2c** and **4c** complexes, have higher antibacterial activity against gram negative bacteria.

#### 4. Conclusion

Two novel enamines of methyl esters of methionine or tryptophane, as well as its corresponding Pd(II) complexes were prepared and structurally characterized by using NMR and IR spectroscopy.

On the basis of results of microanalysis, as well as deep spectroscopic studies, we conclude that ligand was tridentate coordinated (via two oxygens (hydroxyl group from coumarine part and carbonyl group from ester moiety) and nitrogen from imino group) to the Pd(II) ion. The newly synthesized palladium (II) complexes show anticancer activity against different types of leukemia cells. Moreover, it is very important to delineate that their respective ligands had almost no effect in tested concentrations on viability of cancer cells *in vitro*. The precise mechanism of action of investigated palladium (II) complexes is still not fully understood. However, our results showed that all examined complexes, especially complex **3c** significantly decreased viability of cancer cells, which implies that it might have an important role as promising anti-cancer agent.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia for financial support (Projects No. OI172016 and III41010).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.12.095>.

#### References

- [1] T.K. Joanna, H. Elzbieta, K. Hanna, W. Irena, M. Dorota, Synthesis and pharmacological activity of *O*-aminoalkyl derivatives of 7-hydroxycoumarin, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 2252.
- [2] L.W. Wattenberg, L.K.T. Low, A.V. Fladmoe, Inhibition of chemical carcinogen-induced neoplasia by coumarins and  $\alpha$ -angelicalactone, *Canc. Res.* 39 (1979) 1651.
- [3] I. Manolov, I. Kostova, T. Netzeva, S. Konstantinov, M. Karaivanova, Cytotoxic activity of cerium complexes with coumarin derivatives. Molecular modeling of the ligands, *Archiv. Pharm. Med. Chem.* 333 (2000) 93–98.
- [4] B.G. Lake, Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment, *Food Chem. Toxicol.* 37 (1999) 423.
- [5] P. Manojkumar, T.K. Ravi, G. Subbuethtiar, Synthesis of coumarin heterocyclic derivatives with antioxidant activity and *in vitro* cytotoxic activity against tumour cells, *Acta Pharm.* 59 (2009) 159–170.
- [6] a) K. Irena, Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents, *Curr. Med. Chem. Anti Canc. Agents* 5 (2005) 29–46;  
b) Y. Al-Majedy, A. Al-Amiery, A.A. Kadhum, A.B. Mohamad, Antioxidant activity of coumarins, *Sys. Rev. Pharm.* 8 (2017) 24–30.
- [7] S.A. Mayekar, A.C. Chaskar, V.V. Mulwad, Facile synthesis of coumarinyl isothiocyanate from amino coumarin, *Synth. Commun.* 40 (2010) 46–51.
- [8] D. Jiang, R. Deng, J. Wu, Synthesis and properties of lanthanide compounds of 3-sulfo-4-hydroxycoumarin, *Wuji Huaxue* 5 (1989) 21–28.
- [9] R. Deng, J. Wu, L. Long, Lanthanide complexes of bis(4-hydroxy-3-coumarinyl) acetic acid and their anticoagulant action, *Bull. Soc. Chim. Belg.* 101 (1992) 439–443.
- [10] I. Kostova, I. Manolov, T. Netzeva, S. Konstantinov, M. Karaivanova, Synthesis, physicochemical characterisation and cytotoxic screening of new complexes of cerium, lanthanum and neodymium with Warfarin and Coumachlor sodium salts, *Eur. J. Med. Chem.* 34 (1999) 63–68.
- [11] I. Kostova, I. Manolov, T. Netzeva, M. Karaivanova, Synthesis, physicochemical characterization, and cytotoxic screening of new zirconium complexes with

- coumarin derivatives, *Archiv. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 334 (2001) 157–162.
- [12] M. Karaivanova, I. Manolov, M.L. Ninassyan, N.D. Danchev, S.M. Samurova, Metal-complexes of warfarin sodium, *Die Pharmazie* 49 (1994) 856–857.
- [13] E.R. Jamieson, S.J. Lippard, Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2467–2498.
- [14] E. Budzisz, B.K. Keppler, G. Giester, M. Wozniczka, A. Kufelnicki, B. Nawrot, Synthesis, crystal structure and biological characterization of a novel palladium(II) complex with a coumarin-derived ligand, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2004) 4412–4419;  
E. Budzisz, U. Krajewska, M. Rozalski, Cytotoxic and proapoptotic effects of new Pd(II) and Pt(II)-complexes with 3-ethanimidoyl-2-methoxy-2H-1,2-benzoxaphosphinin-4-ol-2-oxide, *Pol. J. Pharmacol.* 56(2004) 473–478.
- [15] S.J. Sabounchei, P. Shahriary, N-containing Ag(I) and Hg(II) complexes: a new class of antibiotics, *curr. Top Med. Chem.* 13 (24) (2013) 3026–3039.
- [16] O.A. Ali, Synthesis, spectroscopic, fluorescence properties and biological evaluation of novel Pd(II) and Cd(II) complexes of NOON tetradentate schiff bases, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 121 (2014) 188–195.
- [17] C. Anitha, C.D. Sheela, P. Tharmaraj, S. Sumathi, Spectroscopic studies and biological evaluation of some transition metal complexes of azo Schiff-base ligand derived from (1-phenyl-2,3-dimethyl-4-aminopyrazol-5-one) and 5-((4-chlorophenyl)diazonyl)-2-hydroxybenzaldehyde, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* 96 (2012) 493–500.
- [18] C. Melber, D. Keller, I. Mangelsdorf, Palladium-environmental Health Criteria Series No. 226, World Health Organisation, 2002.
- [19] C. Rîmbu, R. Danac, A. Pui, Antibacterial activity of Pd(II) complexes with salicylaldehyde-amino acids Schiff bases ligands, *Chem. Pharmaceut. Bull.* 62 (1) (2014) 12–15.
- [20] D.Lj Stojković, A. Bacchi, D. Capucci, M.R. Milenković, B. Čobeljić, S.R. Trifunović, V. Andelković, V.V. Jevtić, N. Vuković, M. Vukić, D. Sladić, Synthesis and characterization of palladium(II) complexes with glycine coumarin derivatives, *J. Serb. Chem. Soc.* 81 (0) (2017) 1–11.
- [21] D.Lj Stojković, V.V. Jevtić, N. Vuković, M. Vuković, I. Potočňák, I.R. Zelen, M.M. Zarić, M.M. Mišić, D. Baskić, G.N. Kaluderović, S.R. Trifunović, Crystal and molecular structure of a new palladium(II) complex, *J. Struct. Chem.* 58 (No. 3) (2017) 550–557.
- [22] S. Sukdolak, N. Vuković, S. Solujić, N. Manojlović, Lj Krstić, Hantzsch reaction of 3-(2-bromoacetyl)-4-hydroxy-chromen-2-one. Synthesis of 3-(thiazol-4-yl)-4-hydroxycoumarines, *J. Heterocycl. Chem.* 41 (2004) 593–596.
- [23] M. Hallek, B.D. Cheson, D. Catovsky, F. Caligaris-Cappio, G. Dighiero, H. Döhner, P. Hillmen, M.J. Keating, E. Montserrat, K.R. Rai, T.J. Kipps, Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the international workshop on chronic lymphocytic leukemia updating the national cancer institute-working group 1996 guidelines, *Blood* 111 (2008) 5446–5456.
- [24] L. Kennedy, J. Reynolds, Protocol for the removal of adherent macrophages, in: *Lefkowitzl. Immunology Methods Manual*, Academic Press, San Diego, California, USA, 1997, pp. 2091–2097.
- [25] T.J. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [26] Clinical and Laboratory Standard Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Approved Standard, M100–S23, 23<sup>th</sup> ed., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2013.
- [27] N.H. Al-Shaalan, Synthesis, characterization and biological activities of Cu(II), Co(II), Mn(II), Fe(II), and UO<sub>2</sub>(VI) complexes with a new schiff base hydrazone: O-Hydroxyacetophenone-7-chloro-4-quinoline Hydrazone, *Molecules* 16 (10) (2011) 8629–8645.
- [28] G.D. de Souza, M.A. Rodrigues, P.P. Silva, E.C. Pereira-Maia, F.V. Botelho, T.A. de Campos, E.D.F. Franca, K.J. de Almeida, W. Guerra, A new complex of palladium(II) with 2-furoic hydrazide: synthesis, characterization, theoretical calculations and biological studies, *Croat. Chem. Acta* 86 (2) (2013) 201–206.
- [29] M.K. Samota, G. Seth, Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of palladium(II) and platinum(II) complexes with 2-substituted benzoxazole ligands, *Heteroat. Chem.* 21 (1) (2010) 44–50.
- [30] G.P. Radić, V.V. Glodović, Z.R. Ratković, S.B. Novaković, S. Garcia-Granda, L. Roces, L. Menéndez-Taboada, I. Radojević, O.D. Stefanović, LjR. Comić, S.R. Trifunović, Synthesis, characterization and antimicrobial activity of novel platinum(IV) and palladium(II) complexes with *meso*-1,2-diphenyl-ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propanoic acid - crystal structure of H<sub>2</sub>-1,2-dpheddp·2HCl·H<sub>2</sub>O, *J. Mol. Struct.* 1029 (2012) 180–186.

## CRYSTAL AND MOLECULAR STRUCTURE OF A NEW PALLADIUM(II) COMPLEX WITH A COUMARIN-VALINE DERIVATE

D. Lj. Stojković<sup>1</sup>, V. V. Jevtić<sup>1\*</sup>, N. Vuković<sup>1</sup>,  
M. Vukić<sup>1</sup>, I. Potočňák<sup>2</sup>, I. R. Zelen<sup>3</sup>,  
M. M. Zarić<sup>3</sup>, M. M. Mišić<sup>4</sup>, D. Baskić<sup>5,6</sup>,  
G. N. Kaluđerović<sup>7</sup>, and S. R. Trifunović<sup>1</sup>

UDC 548.73:547.13:546.98

The new coumarine derivate with methyl ester of 2-((Z)-1(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)-3-methylbutanoic acid and the corresponding palladium(II) complex are synthesized and characterized by microanalysis, infrared, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. The proposed structure of the ligand was confirmed based on the X-ray structural study.

DOI: 10.1134/S0022476617030179

**Keywords:** coumarine-derived ligand, palladium(II) complex, crystal structure.

### INTRODUCTION

Coumarins and their derivatives are widely spread in nature, especially in the world of plants, although they are also found in the metabolites of microorganisms and animals [1]. Coumarine derivatives have spasmolytic, antiarrhythmic, cardiotonic, and photodynamic properties [2], as well as antioxidant [3] and antitumor activity [4]. Metal complexes with coumarine derivatives are also used in significant anticoagulant [5, 6] and antitumor activity [2, 7] investigations. Some researchers showed that cerium(III), zirconium(IV), copper(II), zinc(II), bismuth(III), and cadmium(II) were significantly cytotoxic *in vitro* [8, 9].

The initial results of antitumor testing of palladium complexes, due to their structural analogy with platinum(II) complexes, were not very encouraging. The palladium(II) complexes generally showed a lower antitumor activity than cisplatin. This could be explained due to a more labile nature of the palladium(II) complexes in comparison to the corresponding platinum(II) complexes [10]. However, some palladium(II) complexes exerted a higher antitumor activity in comparison to cisplatin and carboplatin. Budzisz et al. found that the palladium(II) complex with 4-hydroxy-3-(1-iminoethyl)-2H-chromen-2-one was 7800 times more active than carboplatin [11].

The rapid emergence of pan-resistant bacterial strains is a major medical problem throughout the world. Some resistant strains have developed mechanisms of resistance to all existing antibiotics. The great number of newly synthesized

---

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; \*glodjovicv@yahoo.com. <sup>2</sup>Institute of Chemistry, P. J. Šafárik University in Košice, Košice, Slovakia. <sup>3</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia. <sup>4</sup>Public Health Institute, Vranje, Serbia. <sup>5</sup>Centre for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia. <sup>6</sup>Public Health Institute, Kragujevac, Serbia. <sup>7</sup>Department of Bioorganic Chemistry, Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle (Saale), Germany. The text was submitted by the authors in English. *Zhurnal Strukturnoi Khimii*, Vol. 58, No. 3, pp. 578-585, March-April, 2017. Original article submitted December 15, 2015; revised April 11, 2016.

ligands and their metal(II) complexes have been screened for their antimicrobial activities. The antibacterial screening has demonstrated that copper(II) and silver(I) complexes have the greatest and broad activities among the investigated complexes [12-14]. A wide range of biochemical processes may be responsible for the action mechanism of free ligands and their metal(II) complexes against different microorganisms [15].

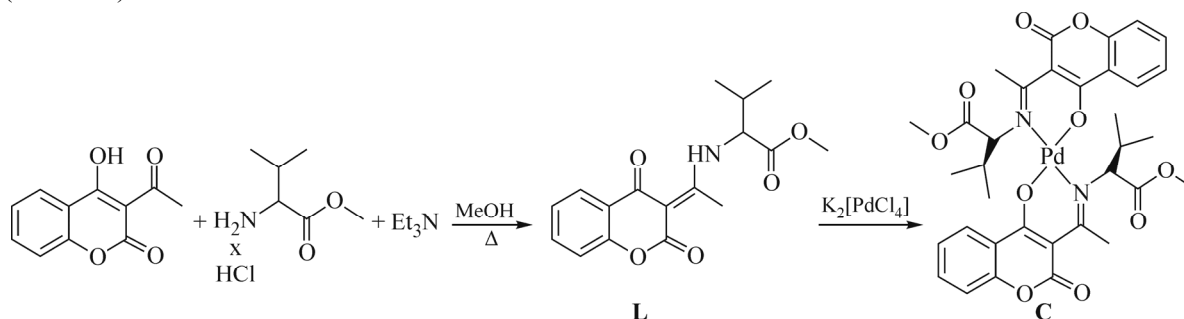
Herein we described the synthesis and characterization of the new coumarine derivate with methyl ester of amino acid *S*-valine, methyl 2-(1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)-3-methylbutanoate and the corresponding palladium(II) complex. The crystal structure of methyl 2-(1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)-3-methylbutanoate is also described.

## EXPERIMENTAL

**Materials and methods.** *S*-Valine methyl ester hydrochloride, triethylamine, methanol, ethanol, toluene, acetone and potassium tetrachloridopaladate(II) were obtained from Sigma Aldrich, Germany. The 3-acetyl 4-hydroxy-coumarine compound was synthesized by the previously described procedure [11].

Elemental microanalyses for C, H, and N were performed by the standard methods on a Vario EL III C, H, N Elemental Analyzer. The melting point of the ligand was determined using a Kofler-hot stage apparatus and was uncorrected. Infrared spectra were measured on a Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR spectrometer by the KBr pellet technique (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ). The NMR spectra were recorded on a Varian Gemini 200 spectrometer (Varian, Palo Alto, CA);  $^1\text{H}$  NMR at 200 MHz and  $^{13}\text{C}$  NMR at 50 MHz, solvent DMSO- $d_6$ , TMS internal standard. The chemical shifts were given in  $\delta$  (ppm) and coupling constants ( $J$ ) in Herz (Hz) (abbreviations: s – singlet, d – doublet, dd – doublet of doublet, m – multiplet, br s – broadend singlet). Mass spectra were recorded on a 5973 mass spectrometer (Agilent, Santa Clara, CA) (MS quadruple temperature 150°C; mass scan range, 40-600 amu at 70 eV). Analytical TLC was performed on silicagel (Silica gel 60, layer 0.20 mm, Alugram Sil G, Mashery-Nagel, Germany). The visualization of TLC plates was performed using an UV lamp at 254 nm and 365 nm (VL-4.LC, 365/254, Vilber Lourmat, France).

**Synthesis of methyl 2-(1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)-3-methylbutanoate, L.** A mixture of 3-acetyl 4-hydroxy coumarine (0.400 g, 0.002 mol), *S*-valine methyl ester hydrochloride (0.335 g, 0.002 mol), and trimethylamine (0.202 g, 0.002 mol) in methanol (50 ml) was refluxed for 2 h. The progress of the reaction was monitored by TLC (toluene:acetone = 8:2). After the completion of the reaction the solvent was evaporated to half of its volume. Upon the addition of 5 ml of water, the obtained white crystals were filtered, dried, and recrystallized from 96% ethanol. Yield: 0.53 g (83%) (Scheme 1).



Scheme 1. Preparation of methyl 2-(1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)-3-methylbutanoate **L** and bis(methyl 2-(1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)-3-methylbutanoate)-palladium(II) complex **C**

Chemical formula:  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ , MW: 317.34, Elemental analysis: calcd: C 64.34, H 6.03, N 4.41, found C 64.34, H 6.03, N 4.41. M.p. 182-184°C. IR (KBr)  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 3467 and 3210 (NH), 3030 (=CH), 2969 and 2850 (CH), 1743 (C=O from  $\text{COOCH}_3$ ), 1706 (C=O from 2,4-dioxochroman part), 1609, 1571, 1487 and 1467 (C=C), 1138 (C–O–C from  $\text{COOCH}_3$ ).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 200 MHz):  $\delta$  (ppm) 1.69 (6H, d,  $^3J_{\text{H}^3'', \text{H}^2''}; \text{H}^4'', \text{H}^2'' = 6.3$  Hz,  $\text{CH}^{3''}$ ;  $\text{CH}^{4''}$ ), 1.97 (1H, m,  $\text{CH}^{2''}$ ), 2.70 (3H, s,  $\text{C}^1\text{CH}_3$ ), 3.84 (3H, s,  $\text{COOCH}_3$ ), 4.62 (1H, m, C– $\text{H}^{1''}$ ), 7.25 (2H, m,  $\text{CH}^6$ ,  $\text{CH}^7$ ), 7.53 (1H, dd,

$^3J_{H^8, H^7} = 7.96$  Hz,  $^4J_{H^8, H^6} = 2.71$  Hz, CH<sup>8</sup>), 8.07 (1H, dd,  $^3J_{H^5, H^6} = 8.14$  Hz,  $^4J_{H^5, H^7} = 1.99$  Hz, C–H<sup>5</sup>), 12.62 (0.18 H, bs, NH) and 14.74 (0.82H, bs, NH) from two isomers. <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 50 MHz): δ (ppm) 18.70 (C<sup>1'</sup>CH<sub>3</sub>), 18.92 (C<sup>3''</sup>, C<sup>4''</sup>), 42.35 (C<sup>2''</sup>), 52.48 (C<sup>1''</sup>), 53.10 (COOCH<sub>3</sub>), 98.87 (C<sup>3</sup>), 116.46 (C<sup>8</sup>), 123.51 (C<sup>6</sup>), 126.05 (C<sup>5</sup>), 128.95 (C<sup>10</sup>), 133.94 (C<sup>7</sup>), 153.09 (C<sup>9</sup>), 165.94 (C<sup>2</sup>), 170.59 (CH<sub>3</sub>OOC), 176.01 (C<sup>1'</sup>) and 182.64 (C<sup>4</sup>).

**Synthesis of palladium(II) complexes, C.** Potassium tetrachloridopalladate(II) (0.0500 g,  $1.53 \cdot 10^{-4}$  mol) was dissolved in 10 ml of water on a steam bath and the double amount of methyl 2-(1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)-3-methylbutanoate (0.0971 g,  $3 \cdot 10^{-4}$  mol) dissolved in methanol (10 ml) was added. The mixture was stirred for 3 h and the yellow precipitate was obtained. The precipitate was filtered off. Yield: 0.056 g (49.6%) (Scheme 1).

Chemical formula: C<sub>34</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>Pd, MW: 739.05, Elemental analysis: Calcd: C 55.25, H 4.91, N 3.79, found C 55.89, H 4.82, N 3.68. IR (KBr) ν, cm<sup>-1</sup>: 3011 (=CH), 2958, 2925 and 2851 (CH), 1742 (C=O from COOCH<sub>3</sub>), 1708 (C=O from coumarine), 1606 (C=N), 1570, 1543 and 1486 (C=C), 1138 (C–O–C from COOCH<sub>3</sub>), 526 (Pd–O), 463 (Pd–N). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 200 MHz): δ (ppm) 1.60 (6H, d,  $^3J_{H^{3''}, H^{2''}}; H^{4''}, H^{2''}} = 6.01$  Hz, CH<sup>3''</sup>; CH<sup>4''</sup>), 2.35 (1H, m, CH<sup>2''</sup>), 2.62 (3H, s, C<sup>1'</sup>CH<sub>3</sub>), 3.76 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 4.91 (1H, m, CH<sup>1''</sup>), 7.30 (2H, m, CH<sup>6</sup>, CH<sup>7</sup>), 7.66 (1H, m, CH<sup>8</sup>), 7.99 (1H, dd,  $^3J_{H^5, H^6} = 8.00$  Hz,  $^4J_{H^5, H^7} = 2.00$  Hz, CH<sup>5</sup>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 50 MHz): δ (ppm) 17.42 (C<sup>1'</sup>CH<sub>3</sub>), 18.75 (C<sup>3''</sup>, C<sup>4''</sup>), 31.13 (C<sup>2''</sup>), 52.67 (C<sup>1''</sup>), 53.17 (COOCH<sub>3</sub>), 96.78 (C<sup>3</sup>), 116.36 (C<sup>8</sup>), 120.28 (C<sup>6</sup>), 123.80 (C<sup>5</sup>), 125.76 (C<sup>10</sup>), 134.30 (C<sup>7</sup>), 152.87 (C<sup>9</sup>), 161.72 (C<sup>2</sup>), 169.87 (CH<sub>3</sub>OOC), 177.08 (C<sup>1'</sup>) and 180.60 (C<sup>4</sup>).

**X-ray data collection and structure refinement.** A summary of the X-ray diffraction experiment and structure refinement for **L** is given in Table 1. The data collection for **L** was performed on an Oxford Diffraction Xcalibur 2 diffractometer equipped with a Sapphire2 CCD detector with graphite-monochromatized MoK<sub>α</sub> radiation (λ = 0.71073 Å). CrysAlis CCD [16] was used for data collection while CrysAlis RED [16] was used for cell refinement, data reduction, and absorption correction. The structure was solved by SUPERFLIP [17] and subsequent Fourier syntheses using SHELXL2013

**TABLE 1.** Crystal Data and Structure Refinement of 2-(1-(2,4-Dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)-3-methylbutanoate **L**

Compound	<b>L</b>
Empirical formula	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>5</sub>
Formula weight	317.33
Temperature, K	173(2)
Wavelength, Å	0.71073
Crystal system; space group	Monoclinic; <i>P</i> 2 <sub>1</sub>
Unit cell dimensions: <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , Å; β, deg.	5.1467(2), 12.9904(5), 11.8223(5); 96.644(4)
Volume, Å <sup>3</sup>	785.10(5)
<i>Z</i> ; <i>D</i> <sub>c</sub> , g·cm <sup>-3</sup>	2; 1.342
Absorption coefficient, mm <sup>-1</sup>	0.099
<i>F</i> (000)	336
Crystal shape; color	Prism; colorless
Crystal size; mm	0.406×0.189×0.091
θ range for data collection, deg.	3.136–26.493
Index ranges	−6 ≤ <i>h</i> ≤ 6, −16 ≤ <i>k</i> ≤ 16, −14 ≤ <i>l</i> ≤ 14
Reflections collected / independent	6596 / 3260 [ <i>R</i> (int) = 0.0240]
Data / restraints / parameters	3260 / 1 / 213
Goodness-of-fit on <i>F</i> <sup>2</sup>	1.015
Final <i>R</i> indices [ <i>I</i> > 2σ( <i>I</i> )]	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0385, <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.0773
<i>R</i> indices (all data)	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0528, <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.0842
Absolute structure parameter	0.6(5)
Extinction coefficient	0.013(4)
Largest diff. peak and hole, e/Å <sup>3</sup>	0.151 and −0.144



[18], implemented in the WinGX program suit [19]. Anisotropic displacement parameters were refined for all non-hydrogen atoms. The hydrogen atoms of aromatic carbon atoms, methyl, methine, and amine groups were placed in the calculated positions and refined riding on their parent C or N atoms with C–H or N–H distances of 0.95 Å, 0.98 Å, 1.00 Å, and 0.88 Å, respectively with  $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2$ ,  $U_{\text{eq}}(\text{C},\text{N})$ . The analysis of bond distances and angles was performed using SHELXL2013; DIAMOND [20] was used for molecular graphics.

**Computational study.** Geometry optimizations were performed with the Gaussian 09 package [21]. All structures were optimized using the B3LYP functional. The SDD basis set for all atoms was employed in the calculations. All systems were optimized without symmetry restrictions. The resulting geometries were characterized as equilibrium structures by the analysis of the force constants of normal vibrations. Supplementary data associated with the quantum chemical calculations can be obtained from the authors upon request.

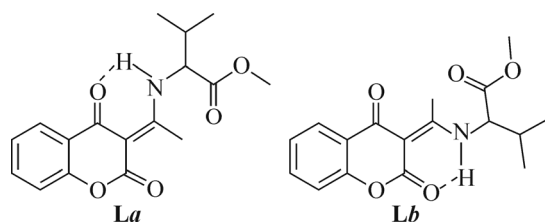
## RESULTS AND DISCUSSION

**Chemistry.** The ligand **L** as well as the corresponding palladium(II) complex **C** were synthesized as depicted in Scheme 1. The treatment of equimolar amounts of 3-acetyl 4-hydroxy coumarine and *S*-valine methyl ester hydrochloride in the presence of triethylamine in refluxing methanol yielded the ligand **L**. The palladium(II) complex **C** was synthesized by mixing **L** and potassium tetrachloridopalladate(II) in a 2:1 molar ratio in a water/methanol (1:1, v/v) solution at room temperature for 3 h.

The structure of the compound **L** was confirmed by spectroscopic methods (IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, and MS) as well as by elemental analysis. The IR spectra showed characteristic bands at  $3467\text{ cm}^{-1}$  and  $3210\text{ cm}^{-1}$  for the NH group,  $1743\text{ cm}^{-1}$  for the carbonyl group from  $\text{COOCH}_3$  and  $1706\text{ cm}^{-1}$  for the carbonyl group from the 2,4-dioxochroman part. In the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of the ligand **L**, the signals of 2,4-dioxochroman protons (four aromatic protons) appeared at 7.25 ppm (multiplets from CH6 and CH7), 7.53 ppm (doublet of doublet from CH8), and 8.07 ppm (doublet of doublet from CH5), respectively. Methyl protons from the carbon atom attached to C1' in a form of a singlet showed a resonance at 2.70 ppm, while the singlet from  $\text{COOCH}_3$  was observed at 3.87 ppm. Proton magnetic resonance of the NH group at 12.62 ppm and 14.74 ppm, indicated that the compound **L** exists in a  $\text{CHCl}_3$  solution in two forms. Based on the ratio of integrals (0.82:0.18), a more stable isomer **La** (the structure with a hydrogen bond between the NH proton and the C4 carbonyl group) showed a resonance of the NH proton at 14.74 ppm in contrast to the isomer **Lb** (the structure with a hydrogen bond between the NH proton and the C2 carbonyl group) (Fig. 1).

In the  $^{13}\text{C}$  NMR spectra, C1' carbon atom was observed at 176.01 ppm, whereas the methyl carbon atom attached to C1' was noted at 18.70 ppm. Two carbonyl groups from the 2,4-dioxochroman moiety, lactone and ketone, were noticed at 165.94 ppm and 182.64 ppm, respectively. Six aromatic carbon atoms showed resonances at 116.46 ppm (C8), 123.51 ppm (C6), 126.05 ppm (C5), 128.95 ppm (C10), 133.94 ppm (C7), and 153.09 ppm (C9), while the C3 carbon atom was observed at 98.87 ppm. Carbonyl from the methyl ester group, as well as the carbon atom from the position C1'', appeared at chemical shifts at 170.59 ppm and 52.48 ppm, respectively. The base peak in MS spectra at  $258\text{ m/z}$  corresponds to the  $\text{M}^+ - \text{COOCH}_3$  fragment ion.

The IR spectral data of the obtained palladium(II) complex **C** exhibited significant differences in comparison to the ligand **L**. The observed stretching vibration of the enamino NH group in the ligand **L** was not present in the complex **C**. Also,



**Fig. 1.** Structure of **La** and **Lb** isomers.

**TABLE 2.** Characteristic Group in the IR Spectra and Their Wavenumbers

Compound	$\nu$ , $\text{cm}^{-1}$				
	NH	C=O	C=N	Pd-O	Pd-N
<b>L</b>	3467 and 3210	1706	/	/	/
<b>C</b>	/	1708	1606	526	463

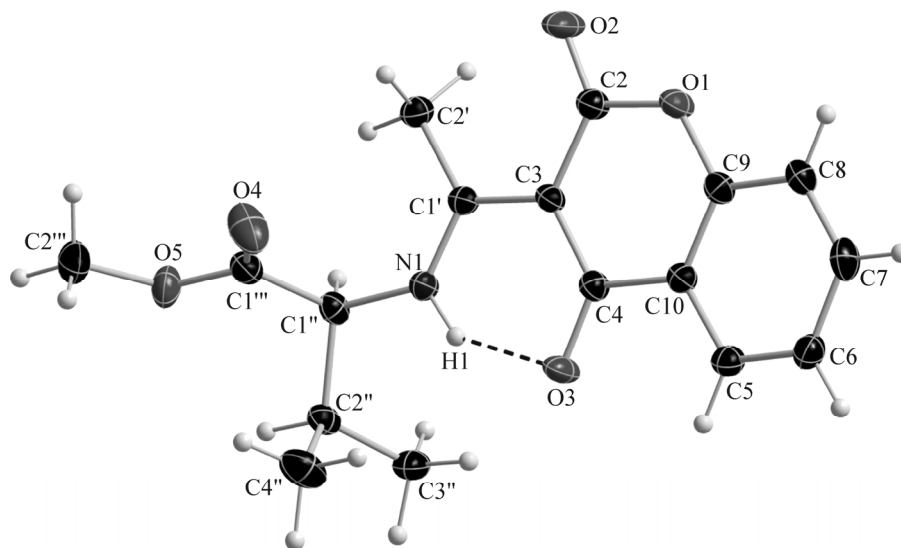
the bands at  $1606\text{ cm}^{-1}$  and  $463\text{ cm}^{-1}$  belonging to the C=N and Pd-N groups, respectively, indicate that the nitrogen atom is involved in the coordination (Table 2). The presence of a Pd-O band at  $526\text{ cm}^{-1}$  and the identified coumarin lactone band at  $1708\text{ cm}^{-1}$  indicated that the formation of the Pd complex caused a transformation of the enamine ligand into the imino form.

The  $^1\text{H}$  NMR spectra of the palladium(II) complex **C** show no broadened singlets at 14.74 ppm and 12.62 ppm from the NH group of the enamine ligand part. The protons from the methyl group attached to C-1' show a resonance at 2.62 ppm, being 0.08 ppm lower than that in the ligand **L**. However, multiplets from CH<sub>2</sub> protons from C-1'' and CH protons from C-2'' were observed at higher frequencies (4.91 ppm and 2.35 ppm, respectively) (Table 3).

**Structure description.** The crystal structure of **L** (Fig. 2) indicates that the compound occurs in a keto-amine tautomeric form in the solid state, stabilized by an intramolecular N1-H1...O3=C4 hydrogen bond, confirming the dominance of the more stable **L<sub>a</sub>** isomer in the solution, and conjugated by a double-bond system. Considering the O3=C4-C3=C1'-N1-H1 fragment, we can observe the equalization of the C3-C4 (1.434(4) Å) and C3=C1' (1.437(4) Å) bond lengths although the bonds are formally single and double, respectively. The exocyclic C3=C1' double bond has an *E*

**TABLE 3.** Differences of Characteristic Chemical Shifts in the Ligand **L** and the Corresponding Palladium(II) Complex **C**

Compound		$\delta$ , ppm
<b>L</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	<b>C</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	
2.70 (s, 3H, CH <sub>3</sub> C1')	2.62 (s, 3H, CH <sub>3</sub> C1')	-0.08
4.62 (m, 2H, CH <sub>2</sub> C2'')	4.91 (m, 2H, CH <sub>2</sub> C2'')	0.29
1.97 (m, 1H, CHC1'')	2.35 (m, 1H, CHC1'')	0.38
14.74 and 12.62 (br s, 1H, NH)	/	/

**Fig. 2.** Crystal structure of **L** (displacement ellipsoids are drawn at 40% probability, intramolecular hydrogen bond is shown as dashed line).



**TABLE 4.** Hydrogen Bonds for **L** (Å) and Angles (deg)

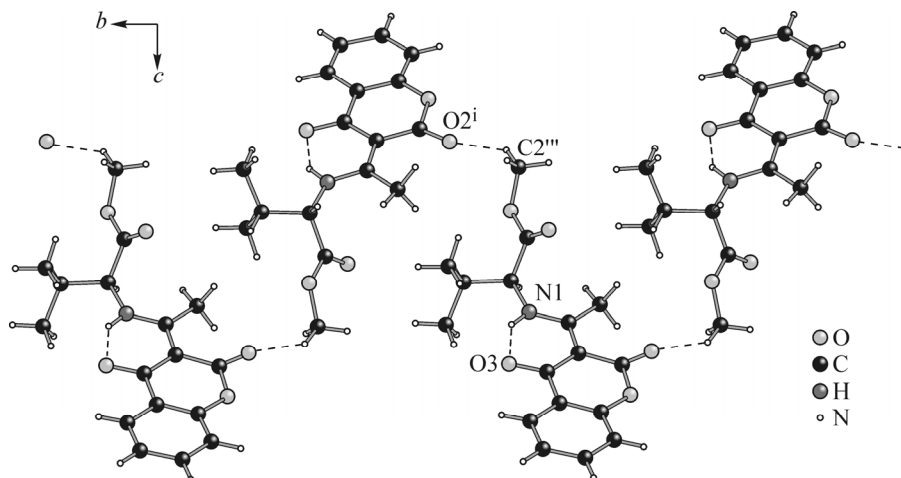
D–H...A	$d(\text{D–H})$	$d(\text{H...A})$	$d(\text{D...A})$	$\angle(\text{DHA})$
N1–H1...O3	0.88	1.77	2.529(3)	142.9
C2'''–H2B...O2 <sup>i</sup>	0.98	2.52	3.394(4)	148.0
C3''–H3''B...O3 <sup>ii</sup>	0.98	2.41	3.325(4)	154.6

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms: <sup>i</sup>  $-x-1, y+1/2, -z$ ; <sup>ii</sup>  $x-1, y, z$ .

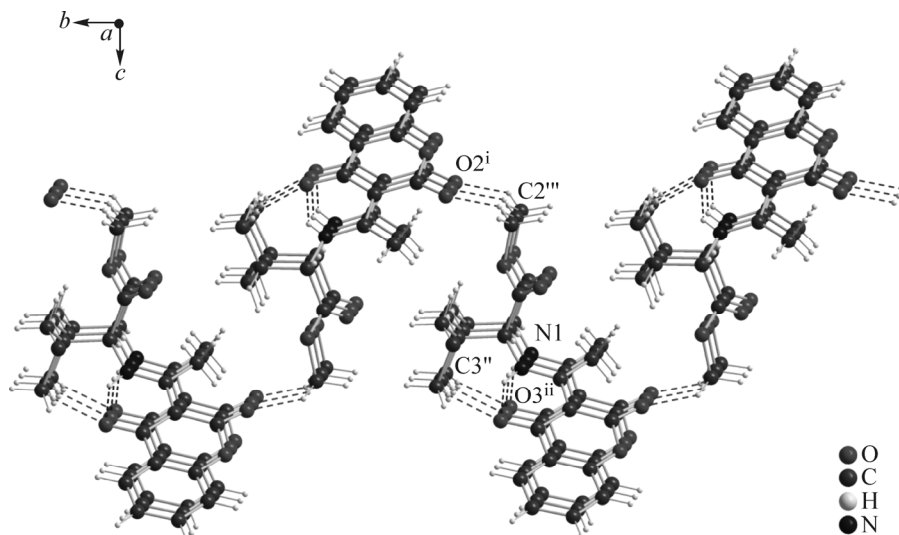
geometry, obviously due to the effect of the above mentioned hydrogen bond. We also observed the elongation and shortening of the C4=O3 (1.259(3) Å) and C1'–N1 (1.321(3) Å) bonds, respectively. The same bond lengths (within  $3\sigma$ ) were observed in the related 3-[(1-benzylamino)ethylidene]-2*H*-chromene-2,4(3*H*)-dione compound [23]. However, in the similar 3-(1-((2-hydroxyphenyl)amino)ethylidene)-2*H*-chromene-2,4(3*H*)-dione compound [24] the equivalence of the C3–C4 (1.437(3) Å) and C3=C1' (1.429(3) Å) bond lengths was not fully achieved although all the other above discussed bond lengths are equal (within  $3\sigma$ ) to the corresponding bonds in **L**. The  $\pi$ -electron delocalization effect in **L** is strong due to the planarity and aromatic character of the coumarin part of the molecule (the largest deviation from the mean plane being 0.029(2) Å for the O2 atom). Moreover, due to the  $\pi$ -electron delocalization, not only the coumarin-ring system is essentially planar but an atomic ensemble involving coumarin rings along with the C2''–C1''–N1–C1'–C2' fragment is also essentially planar, as indicated by the maximum deviation of 0.114(3) Å at the C1'' atom. All the other bond lengths and angles in the molecule of **L** are within normal ranges [25].

The **L** molecule itself is stabilized by the intramolecular N1–H1...O3 hydrogen bond forming a cyclic *S*<sub>6</sub> motif [26] (Table 4). The molecular packing is governed by intermolecular C–H...O hydrogen bonds and  $\pi$ – $\pi$  stacking interactions. The C2'''–H2B...O2<sup>i</sup> hydrogen bond producing a C10 chain motif [26] links the molecules to form an infinite *zig-zag* chain along the *b* axis (Fig. 3) being further tied to the neighboring chain by the C3''–H3''B...O3<sup>ii</sup> hydrogen bond (producing a C9 chain motif [26]) to form a wave-like plane in the *ab* plane (Fig. 4). The next stabilization of the so formed plane comes from face to face  $\pi$ – $\pi$  interactions [27] between the phenyl and pyran-2,4-dione rings from coumarin rings in two adjacent chains, as evidenced by distances between the ring centroids (Cg) (3.716(2) Å) and by the angle between the phenyl ring normal and the vector connecting ring centroids (23.2°). Finally, the structure is also stabilized by C–H...Cg ( $\pi$  ring) interactions involving C2'–H2'B and the pyran-2,4-dione ring (with a H2'B...Cg distance of 2.77 Å and C2'–H2'B...Cg angle of 125°).

**Quantum chemical calculations.** Structural isomers **La** and **Lb** were investigated by DFT calculations. **La** appears to be energetically more favorable being 1.93 kcal/mol more energetically stable than **Lb**. The results are within the error of



**Fig. 3.** Part of the chain formed in the structure of **L** (intramolecular and intermolecular hydrogen bonds are shown as dashed lines). [Symmetry code: (i) =  $-x-1, y+1/2, -z$ ].



**Fig. 4.** Part of the wave-like plane formed in the structure of **L** (intramolecular and inter-molecular hydrogen bonds are shown as dashed lines). [Symmetry codes: (i) =  $-x-1, y+1/2, -z$ ; (ii) =  $x-1, y, z$ ].

DFT calculations, but are in accordance to the finding from NMR spectroscopy stating that the **La** isomer is found much more abundant than **Lb**. In the reaction of the ligand precursor methyl-2-(1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)-3-methylbutanoate with  $K_2[PdCl_4]$  two isomers might be obtained: *cis* and *trans* arranged  $k^2$ -N,O ligands. In order to determine which of the two isomers is formed, chemical calculations were employed.

The structures were fully optimized without any symmetry constraints and were found to represent the equilibrium structures. The calculated results for the *bis*(methyl-2-(1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)-3-methylbutanoate)palladium(II) complex showed that the *trans* isomer appeared to be structurally and synthetically feasible. The energy differences between *trans*- and *cis*-*bis*(methyl-2-(1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)-3-methylbutanoate)palladium(II) isomers is 11.2 kcal/mol. DFT calculations are in agreement with the results of the NMR spectroscopy (within the sensitivity limits of the NMR spectroscopy) where the presence of only one isomer is observed. Thus, the DFT calculations indicate that the isolated isomer could be assigned to *trans*-*bis*(methyl-2-(1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)-3-methylbutanoate)palladium(II).

## CONCLUSIONS

Methyl 2-(1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)-3-methylbutanoate crystallized in the monoclinic crystal system with the  $P2_1$  space group. The crystal structure is dominantly stabilized by the intramolecular N–H...O3=C4 hydrogen bond. Based on the DFT calculation, the *trans* geometry to the corresponding Pd(II) complex with methyl 2-(1-(2,4-dioxochroman-3-ylidene)ethylamino)-3-methylbutanoate can be assigned.

The authors are grateful for financial support from the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Grant Nos. OI172016 and III41010). This work was further supported by the Slovak Research and Development Agency under contract No. SK-SRB-2013-0004, and by the grant VEGA 1/0598/14.

CCDC 1062329 contains the supplementary crystallographic data for **L**. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>, or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223-336-033; or e-mail: [deposit@ccdc.cam.ac.uk](mailto:deposit@ccdc.cam.ac.uk).

## REFERENCES

1. F. M. Dean, *Naturally Occurring Oxygen Ring Compounds*, Butterwords, London (1963).

2. I. Manolov, I. Kostova, T. Netzeva, S. Konstantinov, and M. Karaivanova, *Arch. Pharm.*, **333**, 93-98 (2000).
3. B. G. Lake, *Food Chem. Toxicol.*, **37**, 423 (1999).
4. L. W. Wattenberg, L. K. T. Low, and A. V. Fladmoe, *Cancer Res.*, **39**, 1651 (1979).
5. D. Jiang, R. Deng, and J. Wu, *Wuji Huaxue*, **5**, 21-28 (1989).
6. R. Deng, J. Wu, and L. Long, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **101**, 439-443 (1992).
7. I. Kostova, I. Manolov, T. Netzeva, S. Konstantinov, and M. Karaivanova, *Eur. J. Med. Chem.*, **34**, 63-68 (1999).
8. I. Kostova, I. Manolov, T. Netzeva, and M. Karaivanova, *Arch. Pharm.*, **334**, 157-162 (2001).
9. M. Karaivanova, I. Manolov, M. L. Ninassyan, N. D. Danchev, and S. M. Samurova, *Pharmazie*, **49**, 856/857 (1994).
10. E. R. Jamieson and S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, **99**, 2467-2498 (1999).
11. E. Budzisz, B. K. Keppler, G. Giester, M. Wozniczka, A. Kufelnicki, and B. Nawrot, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 4412-4419 (2004); E. Budzisz, U. Krajewska, and M. Rozalski, *Pol. J. Pharmacol.*, **56**, 473-478 (2004).
12. E. E. Mohamed, A. T. Abedel Karim, Y. H. Elmalik, A. E. Mohamed, and M. S. Aljahdali, *Eur. J. Chem.*, **5**, No. 2, 252-259 (2014).
13. A. P. Mishra, R. K. Mishra, and S. P. Shrivastava, *J. Serb. Chem. Soc.*, **74**, No. 5, 523-535 (2009).
14. A. Tavmanb, S. Ikiz, A. F. Bagcigil, N. Y. Özgür, and S. Ak, *J. Serb. Chem. Soc.*, **74**, No. 5, 537-548 (2009).
15. N. Raman, A. Sakthivel, and R. Jeyamurugan, *J. Chil. Chem. Soc.*, **54**, No. 4, 354-357 (2009).
16. *CrysAlis CCD, CCD Data Collection GUI*, Oxford Diffraction, Oxford, UK (2007).
17. L. Palatinus and G. Chapuis, *J. Appl. Crystallogr.*, **40**, 786-790 (2007).
18. G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr.*, **C71**, 3-8 (2015).
19. L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.*, **32**, 837/838 (1999).
20. K. Brandenburg, *DIAMOND (Version 3.2i)*, Crystal Impact GbR, Bonn, Germany (2012).
21. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, *Gaussian 09, Revision D.01*, Gaussian, Inc., Wallingford CT (2009).
22. M. Malecka and E. Budzisz, *Acta Crystallogr.*, **E62**, o5058-o5060 (2006).
23. A. Brahmia, T. Ben Ayed, and R. Ben Hassen, *Acta Crystallogr.*, **E69**, o1296 (2013).
24. F. H. Allen, *Acta Crystallogr.*, **B58**, 380-388 (2002).
25. J. Bernstein, R. E. Davis, L. Shimoni, and N. L. Chang, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **34**, 1555-1573 (1995).
26. C. J. Janiak, *Chem. Soc. Dalton Trans.*, 3885-3896 (2000).

# Association between bacterial Vaginosis and precancerous changes of the Cervix

Milena Misić<sup>1</sup>, Gordana Randelović<sup>2</sup>, Branislava Kocić<sup>2</sup>, Ljiljana Suvajdzic<sup>3</sup>, Sadeta Hamzić<sup>4</sup>, Sukrija Zvizdic<sup>4</sup>, Marko Tomic<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Center for Microbiology, Department of Public Health Vranje, Vranje, Serbia,

<sup>2</sup> Institute of Public Health Nis, Center for Microbiology, University of Nis, Medical Faculty, Nis, Serbia,

<sup>3</sup> Department of Pharmacy, Medical faculty University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia,

<sup>4</sup> Department of Microbiology and Parasitology, Medical Faculty University of Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina,

<sup>5</sup> Medical faculty University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia.

## Abstract

**Introduction:** The majority of studies published so far on bacterial vaginosis (BV) have not been consistent in associating BV and cervical dysplasia. The aim of this study was to determine the correlation between BV and cervical intraepithelial neoplasia (CIN), and between BV and degree of severity of these changes on the uterine cervix.

**Materials and Methods:** The study included sexually active women who were referred by gynecologists to colposcopic examination. Based on histopathological results, the examinees were divided into three groups: 41 women with confirmed CIN changes; 30 women without precancerous and cancerous changes in the cervix and 29 women with histopathologically confirmed invasive cervical cancer. Microbiological testing of samples from the genital tract included direct microscopic smears, wet and stained, and inoculation of culture medium, testing for *Chlamydia trachomatis* and genital mycoplasmas.

**Results:** BV was present among 18 (43.9%) women with cervical intraepithelial neoplasia and 13 (44.8%) women with invasive cancer, which in both cases meant statistically significantly higher frequency compared to women without precancerous and cancerous cervical changes, who had confirmed bacterial vaginosis in 3 (10.0%) cases ( $p = 0.003$ ). The risk of finding the precancerous changes on the cervix was 8.36 (1.89 to 37.04)

times higher in patients with BV than in women without that infection.

**Conclusion:** BV was significantly more common in women with the finding of precancerous changes in the cervix, and was not associated with severity of histopathological changes in the cervix.

**Key words:** Bacterial vaginosis; Precancerous changes; Cervical intraepithelial neoplasia

## Introduction

Bacterial vaginosis (BV) is a non-inflammatory, infectious syndrome described in the vaginal pathology. Clinically, it is polymicrobial, primarily anaerobic infection with subacute course, which is followed by homogenous secretions adherent to vagina, odor and poor leukorrhea. Dysuria may be present and external vaginal itching or redness may be seen. Many women with bacterial vaginosis do not have any signs or symptoms [1].

Microbiologically, BV is defined as a *disruption* in the balance of bacterial morphotypes, overgrowth of a large number of anaerobic and microaerophilic bacteria, Gram-positive cocci, *Mycoplasma* spp. and reduction in the number of *Lactobacillus* spp. In women with BV, *lactobacilli* are absent or severely reduced, while concentrations of other bacteria are generally increased 100- to 10000-fold over normal levels [2-6].

The human papillomavirus (HPV) is the major etiologic agent in the development of cervical cancer, while BV and other genital infections are considered to increase the risk of cervical cancer [7-9]. The majority of infected *women* are found to heal *spontaneously* with no ill effects, probably due to a competent immune response. However, if woman develops persistent infection, the cervix is prone to the transformation of cells and development of precancerous changes [10].

The majority of studies published so far on bacterial vaginosis (BV) have not been consistent in associating BV and cervical dysplasia. Marrazzo et al., as well as many other researchers, found that BV causes inflammatory changes of the cervix and that chronic inflammation of the cervix with BV may be considered as one of the mechanisms for the development of malignant changes in the cervix [11-14]. Co-factors that are also associated with an increased risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical cancer are smoking, poor nutritional status, hormonal factors (age of women at first childbirth), use of hormonal contraception, having sex at an early age (less than 16 years) and a large number of sexual partners, race, multiple births, low socioeconomic status. Older women have increased risk of CIN and cervical cancer, as well as women with sexually transmitted infection (STI), such as infection with bacteria *Chlamydia trachomatis* (*C.trachomatis*) and protozoa *Trichomonas vaginalis* (*T.vaginalis*) [7, 15, 16].

The aim of this study was to determine the correlation between BV and CIN, and between BV and degree of severity of these changes on the uterine cervix.

#### *Materials and Methods:*

The study enrolled sexually active women who were primarily examined by gynecologists and then referred to colposcopic examination from May 2005 to January 2007 for a biopsy and further histopathological examination. *Ethical approval was obtained* from the local *ethics committee*. Written, informed consent was taken from the patients for participation in the study.

Based on histopathological results (results of biopsy), the participants were divided into three groups:

- The target group: 41 women with histologically confirmed CIN 1, CIN 2 and CIN 3.
- The negative control group: 30 women without precancerous and cancerous cervical changes.
- The positive control group: 29 women with histologically confirmed invasive cervical cancer.

Samples were taken from women examined by speculum for microbiological examination:

- Two high vaginal swabs were taken from each woman for bacteriological examination;
- Vaginal swab from the posterior vaginal fornix which was immediately after taking suspended in 1 ml of normal saline solution and incubated at 37°C in order to identify the protozoa *T. vaginalis* by using the wet mount technique;
- Two cervical swabs for bacteriological examination;
- *Endocervical swab* for detection of genital mycoplasmas was collected using a *Dacron endocervical swab*;
- Endocervical swab for detection of *C.trachomatis* was collected using a *Dacron endocervical swab* [17].

Microbiological testing of samples from the genital tract included direct swabs for wet and stained smears for microscopy, and inoculation of culture medium, testing for *C. trachomatis* and genital mycoplasmas.

The wet preparation method was used for the diagnosis of trichomoniasis, bacterial vaginosis, and candidiasis in women. BV diagnosis was based on the presence of the "clue cells", which are vaginal epithelial cells covered with numerous tiny rods and coccobacilli. If the swabs from women with bacterial vaginosis are positive for *Mobiluncus* spp., the abundance of highly motile bacteria can be observed on the microscopic preparation.

*Gram-stained vaginal smears were used for the direct cytobacteriological examination.* Gram-stained vaginal smear enables observing the epithelial cells, and at the same time provides the insight into the number and presence of leukocytes and

microbial flora. "Clue cells" in the Gram-stained vaginal smear are covered by masses of Gram-labile and Gram-negative bacilli and coccobacilli. BV was diagnosed also by using the Nugent score, a semi quantitative scoring system to evaluate bacterial morphotypes on the direct Gram stain of vaginal fluid [17]. The increased number of *polymorphonuclear leukocytes* (PMN) in the DMP indicates the presence of inflammatory reaction.

Different microbiological culture media were used for the inoculation of vaginal and cervical swabs. For the isolation of aerobic Gram-positive bacteria (Columbia agar), differential medium for isolation of *Enterobacteriaceae* (Mac Conkey), a selective medium for the isolation of *Gardnerella vaginalis* (Blood agar: a selective medium with 5% Human Blood), enriched medium for the selective isolation of *Neisseria gonorrhoeae* (Thayer Martin Medium with selective supplements) and medium for the isolation of yeasts of the genus *Candida* (Sabouraud's Dextrose Agar). Medium (Mac Conkey agar) for *Enterobacteriaceae* was incubated at 37°C and examined after 24 hours. Other culture media were incubated in an atmosphere of high relative humidity and a CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere for 48 hours. Microorganisms cultivated from positive culture media were identified by using standard microbiological methods [17].

Confirmation of BV diagnosis was done by the growth of *G.vaginalis* in pure culture or by its presence in relatively large numbers compared to the other bacteria on the selective medium with 5% Human Blood. Colonies of *G.vaginalis* are easy to isolate on the solid medium. They are round, transparent, smaller than 0.5 mm in diameter, surrounded by discrete weak  $\beta$ -hemolysis. On the Gram-stained smear using a plate culture of *G.vaginalis*, we observed Gram-negative or Gram-labile short rods [17].

Diagnosis of genital mycoplasmas was performed with the commercially available Mycoplasma IST 2 Kit (bioMérieux, France), by means of which the genital Mycoplasma were identified and quantified; simultaneously antibiotic susceptibility tests were performed.

*C. trachomatis* infection was diagnosed by direct immunofluorescence using commercial Fluorotect Chlamydia test (Omega Diagnostics Ltd, Scotland, United Kingdom). In women with histopathologically verified invasive cancer, testing for

*C.trachomatis* was not performed, due to inability to get adequate samples for testing (presence of blood on the swab).

Biopsy samples were taken from colposcopically suspect changes of the cervix (white-colored after the application of acetic acid, mosaic, irregular vascularization) with a Q-tip or hook; the depth of biopsy specimens was about 3mm. The cervical biopsy results were reported as without precancerous and cancerous changes in the cervix, as CIN 1= mild dysplasia; CIN 2 = moderate dysplasia; CIN 3= severe dysplasia or ICC = invasive cervical cancer [18].

The participants completed a questionnaire prepared for the research purposes. A questionnaire was a series of questions posed to women to obtain statistically useful information about sexual behavior and socio-demographic data (date of birth, age of first sexual intercourse, number of sexual partners, frequency of sexual activity, presence of sexually transmitted diseases, number of childbirths, age of first childbirth, use of hormonal contraceptives and hormonal drugs, data on vaginal washing practices, kinds of lower genital tract symptoms, education level, nationality, smoking status).

Quantitative statistical analysis was performed using SPSS version 10.0 and the *StatCalc* function of *Epi Info software package version 6<sup>th</sup>*.

The *Student t-test* was used to compare the mean values of numerical symbols; comparison of the frequency of the descriptive characteristics among groups was performed using Mantel-Haenszel Chi square test, and in cases where expected frequencies were less than five - Fisher's exact probability test for testing the zero hypothesis. The assessment of correlation between each individual risk factor and the finding of precancerous changes in the cervix was carried out using a logistic regression analysis. As the threshold value for declaring statistical significance was estimated error of less than 5% ( $p < 0.05$ ) in all analyses. The results of statistical analysis are shown in tables.

## Results

On average, women in the group with invasive cervical cancer were  $50.28 \pm 9.17$  years old, and they were significantly older than women in the test group with precancerous changes in the cer-



vix ( $43.95 \pm 9.27$  years old and  $p$ -value = 0.019), and they also were older than women without precancerous and cancerous changes on the cervix ( $41.97 \pm 10.89$  years old and  $p$  value = 0.007) (Table 1). The difference in age between women with precancerous changes in the cervix and women without precancerous and cancerous changes in the cervix was not statistically significant.

Bacterial vaginosis was found in 18 (43.9%) women with precancerous changes in the cervix and 13 (44.8%) women with invasive cervical cancer, which in both cases meant that the frequencies of women with BV was significantly higher in both groups compared to the group of women without

precancerous and cancerous changes in the cervix, where BV was confirmed only in 3 (10.0%) cases ( $p = 0.003$ ) (Table 2). It is very important that BV in our research was not proven as a co-infection with other tested infectious agents in combination.

*C. trachomatis* was confirmed in 24 (58.5%) cases in the test group, while the percentages of females with this infection was significantly lower in women without precancerous and cancerous changes in the cervix (30.0% and  $p = 0.029$ ). The frequencies of infection with other bacteria did not differ significantly among the groups ( $p > 0.05$ ) (Table 3).

In women with precancerous changes of the cervix, yeasts of the genus *Candida* were not found.

Table 1. Age of patients by groups

Variables	Examinees			Comparison between groups
	with CIN (I)	with Ca (II)	without CIN and Ca (III)	
A	43.95	50.28	41.97	I vs II: $p$ -value = 0.019 II vs III: $p$ -value = 0.007
SD	9.27	9.17	10.89	
Min	26.00	31.00	23.00	
Max	63.00	63.00	63.00	

A: arithmetic mean; SD: standard deviation; Min: minimal value; Max: maximal value; CIN: cervical intraepithelial neoplasia; Ca: invasive cervical cancer

Table 2. Association between bacterial vaginosis and CIN

BV	Examinees			Comparison between groups
	with CIN (I)	with Ca (II)	without CIN and Ca (III)	
BV present no. (%)	18 (43.9%)	13 (44.8%)	3 (10.0%)	I vs III: $p$ -value = 0.003 II vs III: $p$ -value = 0.003
BV absent no. (%)	23 (56.1%)	16 (55.2%)	27 (90.0%)	

CIN: cervical intraepithelial neoplasia; Ca: invasive cervical cancer; BV: bacterial vaginosis

Table 3. Association between other bacteria and CIN

Findings	Examinees			Comparison between groups
	with CIN (I)	with Ca (II)	without CIN and Ca (III)	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	24 (58.5%)	...	9 (30.0%)	I vs III: $p$ -value = 0.029
<i>Mycoplasma hominis</i>	6 (14.6%)	4 (13.8%)	3 (10.0%)	n.s.
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	1 (2.4%)	1 (3.4%)	2 (6.7%)	n.s.
<i>Streptococcus agalactiae</i>	6 (14.6%)	6 (20.7%)	5 (16.7%)	n.s.
<i>Escherichia coli</i>	5 (12.2%)	3 (10.3%)	3 (10.0%)	n.s.

CIN: cervical intraepithelial neoplasia; Ca: invasive cervical cancer; n.s.: statistically not significant difference

Table 4. Association between *Candida* spp. and *Trichomonas vaginalis* and CIN

Finding	Examinees			Comparison between groups
	with CIN	with Ca	without CIN and Ca	
<i>Candida</i> spp.	-	1 (3.4%)	3 (10.0%)	n.s.
<i>Trichomonas vaginalis</i>	2 (4.9%)	2 (6.9%)	-	n.s.

CIN: cervical intraepithelial neoplasia; Ca: invasive cervical cancer; n.s.: statistically not significant difference

The frequencies of infection caused by the protozoa *Trichomonas vaginalis* did not differ significantly between the groups ( $p > 0.05$ ) (Table 4).

Eight (53.3%) women had bacterial vaginosis among 15 women with CIN 1; seven (50.0%) had bacterial vaginosis among 14 women with CIN 2; and three (25.0%) had bacterial vaginosis among 12 women with CIN 3. The incidence of bacterial vaginosis did not differ significantly between the groups with various severity of cervical dysplasia ( $p > 0.05$ ) (Table 5).

Table 5. Association between bacterial vaginosis and severity of CIN

CIN	BV	
	BV present no. (%)	BV absent no. (%)
low-grade	8 (53.3%)	7 (46.7%)
moderate-grade	7 (50.0%)	7 (50.0%)
high-grade	3 (25.0%)	9 (75.0%)
Comparison between CIN 1, CIN 2 and CIN 3	n.s.	

CIN: cervical intraepithelial neoplasia; BV: bacterial vaginosis; n.s.: statistically not significant difference; CIN 1: low grade CIN; CIN 2: moderate grade CIN; CIN 3: high grade CIN

The assessment of association between bacterial vaginosis and other risk factors for the development of precancerous changes in the cervix was carried out by logistic regression analysis. It was found that the risk of the development of precancerous changes in the cervix was 7.04 (1.84 to 26.95) times higher in women with bacterial vaginosis than in women without BV ( $p = 0.004$ ). Univariate logistic regression analysis confirmed that BV is statistically significant predictor of precancerous changes of the cervix (Table 6).

Table 6. Assessment of association between bacterial vaginosis and CIN

Microbiological results	OR	Limits of 95% CI		p value
		The upper	The lower	
BV present	7.040	1.838	26.955	0.004
BV absent	0.142	0.037	0.544	0.004

CIN: cervical intraepithelial neoplasia; OR: odds ratio; CI: confidence interval; BV: bacterial vaginosis

Univariate logistic regression analysis revealed also a significant relationship between the development of precancerous changes in the cervix and other possible factors such as the following: the presence of *Chlamydia trachomatis*, a positive family history of cancer, irregular visits to gynecologist, having six or more than six sexual partners in patient's lifetimes, having sex seven and more times per week, being 26 or older at the first childbirth, the use of contraceptive pills, having a low educational level, and smoking 11–20 cigarettes per day.

Multivariate analysis identified the four risk factors which significantly influence the development of precancerous changes in the cervix: bacterial vaginosis, irregular visits to gynecologist, use of contraceptive pills and having low education level (Table 7). The final multivariate logistic regression model showed that, if the other risk factors that contribute to development of CIN can be controlled, BV increases the risk for development of precancerous changes in the cervix about 8.36 times (1.89 to 37.04).

The model that includes as independent variables the listed risk factors and the regression constant explains the change of risk for development of CIN in our sample by 49.2% (The model was assessed by coefficient of determination,  $R^2 = 0.492$ ).

The frequencies of irregular visits to gynecologist, use of contraceptive pills and having low education level did not differ significantly among



Table 7. Assessment of impact of BV and other risk factors on CIN development

Risk factors	OR	Limits of 95% CI		Test and p-value
		The upper	The lower	
BV	8.360	1.887	37.042	0.005
Irregular visits to gynecologist	3.380	1.032	12.256	0.048
Using oral contraceptives	19.476	2.048	185.242	0.010
Low level of education	11.089	1.181	104.100	0.035
The regression constant	0.205			0.004

CIN: cervical intraepithelial neoplasia; OR: odds ratio; CI: confidence interval; BV: bacterial vaginosis

the groups in women with BV ( $p > 0.05$ ). The compared frequencies of the listed factors among women with bacterial vaginosis and without it did not significantly differ in study groups. This result showed that irregular visits to gynecologist, use of contraceptive pills and low education level influence the development of precancerous changes in the cervix apart from bacterial vaginosis.

## Discussion

In 1863, the great pathologist Rudolf Virchow formulated the hypothesis that transformation of cells occurs in areas affected with chronic infection. He explained this as a consequence of *tissue injury*, inflammation and increased cell proliferation during chronic infection [19, 20]. Schwebke et al. in their study by univariate analysis pointed out a significant linkage between BV and cervicitis and between the use of metronidazole gel and resolution of cervicitis [21]. *Plasma cell endometritis* in women with symptomatic bacterial vaginosis is very common, and it is not associated with vaginal and cervical infections by other bacteria. These results suggest a possible link between BV and non-chlamydial and non-gonococcal infection of the upper genital tract in women [22]. BV causes cervical *inflammatory epithelial changes*, and cervical chronic inflammation in women with BV could be considered as a possible mechanism that causes potentially malignant cellular changes anywhere on the cervix [11, 12, 14]. By *univariate analysis*, Lehtovirt et al. revealed that BV was significantly associated with increased risk of developing CIN [9].

In our study, bacterial vaginosis was found in 18 (43.9%) women with CIN and in 13 (44.8%)

with invasive cervical cancer, which in both cases was statistically significantly higher compared to the group of examinees without precancerous and cancerous changes of cervical biopsy specimen, in which bacterial vaginosis was confirmed only in 3 (10.0%) cases ( $p = 0.003$ ). The risk for development of CIN was 7.04 (1.84 to 26.95) times higher in women with bacterial vaginosis than in women without BV ( $p = 0.004$ ). Univariate logistic regression analysis showed that BV is a statistically significant predictor for the precancerous changes in the cervix. The model for a *multivariate* regression separated BV as cofactor that increases the risk for development of precancerous changes in the cervix about 8.36 times (1.89 to 37.04) and three other factors as factors that significantly influence the development of CIN.

Our results are quite compatible with the results of Clomp et al. who found a correlation between cytologically diagnosed *G.vaginalis* infection and CIN [23]. They collected data from 800,498 Dutch asymptomatic women, participating in the Dutch national screening program. Clomp et al. showed that the prevalence of (pre) cancerous changes of cytologically diagnosed *G.vaginalis* infection was 0.6 per thousand women. The risk of (pre)cancerous changes was significantly higher in women with cytologically diagnosed *G.vaginalis* infection than in women with normal vaginal flora (Odds ratio (OR), 10.3, 95% confidence interval, 6.6 to 16.1).

Uthayakumar et al. found in their retrospective study performed in England that women with BV were at increased risk of CIN [24]. *Diagnosis of bacterial vaginosis* was based on the presence of the "clue cells" in the direct *Gram stain* preparation of vaginal fluid taken from the upper part of the vagina, *positive amine test*, *pH* over 4.5, presence of *characteristics vaginal discharge*. Our results

are also consistent with the findings of Nam et al. who found that the incidence of CIN was significantly higher in the BV-present group ( $p = 0.043$ ), however, no statistically significant relationship between BV and CIN was demonstrated by multivariate analysis ( $p=0.081$ ) [25].

A retrospective, longitudinal, cohort study was performed as a part of the Dutch Cervical Screening Program, involving the population of 100,605 women, each of whom had 2 smears taken over a period of 12 years [26]. The dysbacteriotic cohort was significantly more likely to have low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) and high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) in their follow-up smear (OR, 1.85; 95% confidence interval [95% CI], 1.28-2.67 and OR, 2.00; 95% CI, 1.31-3.05, respectively) compared to women in the control group. The results obtained in this study are consistent with our results. In addition, Schiff et al. found similar results to ours: an association between the presence of the "clue cells" in vaginal *wet mount* and precancerous changes of the cervix [27].

We found the negative correlation between bacterial vaginosis and degree of cervical dysplasia in our study. Of 15 women with 8 (53.3%) had bacterial vaginosis and CIN 1, of 14 women 7 (50.0%) had BV and CIN 2, and of 12 women 3 (25, 0%) had BV and CIN 3. Nam et al. [25]. in their study found no correlation between BV and severity of precancerous changes of the cervix; this result is consistent with our results. Peters et al. also found in their work that BV has no effect on the severity of CIN, or on the mitotic index in cervical intraepithelial neoplasia [28]. Neuer et al. also did not find statistically significant difference between bacterial vaginosis and the grade of cervical dysplasia in their study [29].

Zbroch et al. found in their study that CIN 1 is more common in women with BV and in women with *Chlamydia trachomatis* infection than in women without these infections [30]. Discacciati et al. found that BV was similarly present among women of both their study groups: in 18% of women with SIL and in 12% of women without SIL. Their results were also similar when the grade of SIL was taken into consideration. BV was detected in 16% of women with low-grade SIL, and in 33% women with high-grade SIL when compared to the controls (12%) [8].

Platz-Christensen et al. investigated the relationship between the presence of clue cells in Papanicolaou-stained vaginal smears and CIN. They examined a total of 6.150 specimens and discovered that any grade CIN was more common among women with BV ( $p < 0.001$ ). The relative risk of having CIN 3/carcinoma *in situ* was 5.0 for the confidence interval in 95% of women with BV. Their conclusion was that BV can be associated with the development of CIN, ie. BV infection may be an independent factor or cofactor for HPV in the development of cervical precancerous changes [31]. However, not all scientists accept this correlation as statistically significant.

Peters et al. did not reveal a significantly higher prevalence of bacterial vaginosis in women with dysplasia in the cervix [28]. Boyle et al. showed that women with BV were not found to have CIN more frequently than women with normal vaginal flora, and the quantities of nitrosamines produced by women with BV did not differ significantly from women without BV [32]. Frege et al. found the opposite conclusion to ours in their study. In their investigation diagnosis of BV is based on four criteria: presence of clue cells, pH 4.5, positive amine test and increased vaginal discharge. The results of their study demonstrated that there is no significant correlation between CIN and BV ( $P < 0.00005$ ) [33].

Numerous studies were conducted to evaluate the correlation between bacterial vaginosis and CIN, however, their results were not consistent because the methods of investigation varied from study to study. Sensitivities and specificities vary for different diagnostic tests for bacterial vaginosis depending on several different diagnostic criteria which must be taken into account when comparing the results of various studies. Taking into consideration that there are many risk factors, it is necessary to examine all of them, especially the infection with HPV. Our study has potential limitations that must be considered in interpretation of results: lack of validation of interview data; our study did not involve the entire female population but only the patients referred to colposcopic examination for sampling material for pathohistological examination; a limitation of this study is also the small sample size. We reminded the study subjects at several points in the interview about the confidential nature of all data collected so as to

increase the likelihood of accurate responses about sexual behavior. We must bear in mind that the diagnosis of HPV infection has not been made. However, all mentioned limitations of this study leave room for further study, by using a larger sample and tests with high sensitivity and specificity.

In conclusion, based on the obtained results, we found that bacterial vaginosis was significantly more frequent in women with CIN and in women with invasive cervical cancer. We did not confirm neither correlation between BV and the severity of precancerous changes in the cervix, nor significant effect of BV on development of precancerous changes in the cervix *apart from other confirmed risk factors*.

### Acknowledgment

*This work was supported by the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia, Grant Number 46012.*

### References

1. Koumans EH, Kendrick JS. Preventing Adverse Sequelae of Bacterial Vaginosis. *Sex Transm Dis* 2001; 28(5): 292-297.
2. Burton JP, Reid G. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. *J Infect Dis* 2002; 186: 1770-1780.
3. Coolen MJ, Post LE, Davis CC, Forney LJ. Characterization of microbial communities found in the human vagina by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 8729-8737.
4. Devillard E, Burton JP, Reid G. Complexity of vaginal micro-flora as analyzed by PCR denaturing gradient gel electrophoresis in a patient with recurrent bacterial vaginosis. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2005; 13: 25-31.
5. Verstraelen H, Verhelst R, Claeys G, Temmerman M, Vanechoutte M. Culture-independent analysis of vaginal microflora: the unrecognized association of *Atopobium vaginae* with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 1130-1132.
6. Zariffard MR, Saifuddin M, Sha BE, Spear GT. Detection of bacterial vaginosis-related organisms by real-time PCR for lactobacilli, *Gardnerella vaginalis* and *Mycoplasma hominis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 34: 277-281.
7. Boyle DCM, Smith JR. Infection and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 1999; 9: 177-186.
8. Discacciati MG, Simoes JA, Lopes ES, Silva SM, Montemor EBL, Rabelo-Santos SH, Westin MCA. Is bacterial vaginosis associated with squamous intraepithelial lesion of the uterine cervix? *Diagn. Cytopathol* 2006; 34:323-325.
9. Lehtovirta P, Paavonen J, Heikinheimo O. Risk factors, diagnosis and prognosis of cervical intraepithelial neoplasia among HIV-infected women. *Int J STD AIDS* 2008; 19 Suppl 1: 37-41.
10. Sharma A, Rajappa M, Saxena A, Sharma M. Cytokine profile in Indian women with cervical intraepithelial neoplasia and cancer cervix. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 17 Suppl 4: 879-885.
11. Marrazzo JM, Wiesenfeld HC, Murray PJ, Busse B, Meyn L, Krohn M, Hillier SL. Risk Factors for Cervicitis among Women with Bacterial Vaginosis. *J Infect Dis* 2006; 193 Suppl 5: 617-624.
12. Berhane T, Halliday GM, Cooke B, Barnetson RS. Inflammation is associated with progression of actinic keratoses to squamous cell carcinomas in humans. *Br J Dermatol* 2002; 146: 810-815.
13. Jaiswal M, LaRusso NF, Gores GJ. Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G626-634.
14. Behbakht K, Friedman J, Heimler I, Aroutcheva A, Simoes J, Faro S. Role of the vaginal microbiological ecosystem and cytokine profile in the promotion of cervical dysplasia: a case-control study. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2002; 10 Suppl 4: 181-186.
15. Program for Appropriate Technology in Health. *Planning Appropriate Cervical Cancer Control Programs*. Seattle: PATH. 1997.
16. Bourne PA. Sociodemographic correlates of age at sexual debut among women of the reproductive years in a middle-income developing nation. *HealthMED* 2011; 5(1): 3-16.
17. Randelovic G. *Mikrobioloska dijagnoza infekcija genitalnih puteva zena, 1st edition*. Nis: Studentski kulturni centar 2001; 26-73p.

18. Solomon D, Kurman R, Davey D, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *Jama* 2002; 287 Suppl 16: 2114-2119.
19. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 539-545.
20. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-867.
21. Schwebke JR, Weiss HL. Interrelationships of bacterial vaginosis and cervical inflammation. *Sex Transm Dis* 2002; 29 Suppl 1: 59-64.
22. Korn AP, Bolan G, Padian N, Ohm-Smith M, Schachter J, Landers DV. Plasma cell endometritis in women with symptomatic bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol* 1995; 85 Suppl 3: 387-390.
23. Klomp JM, Boon ME, Van Haaften M, Heintz AP. Cytologically diagnosed *Gardnerella vaginalis* infection and cervical (pre)neoplasia as established in population-based cervical screening. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199: 480.
24. Uthayakumar S, Boyle DC, Barton SE, Nayagam AT, Smith JR. Bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia: cause or coincidence? *J Obstet Gynaecol* 1998; 18: 572-574.
25. Nam KH, Kim YT, Kim SR, Kim SW, Kim JW, Lee MK, Nam EJ, Jung YW. Association between bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. *J Gynecol Oncol* 2009; 20 Suppl 1: 39-43.
26. Engberts MK, Verbruggen BS, Boon ME, van Haaften M, Heintz AP. *Candida* and dysbacteriosis: a cytologic, population-based study of 100,605 asymptomatic women concerning cervical carcinogenesis. *Cancer* 2007; 111 Suppl 5: 269-274.
27. Schiff M, Becker TM, Masuk M, van Asselt-King L, Wheeler CM, Altobelli KK, North CQ, Nahmias AJ. Risk Factors for Cervical Intraepithelial Neoplasia in Southwestern American Indian Women. *Am J Epidemiol* 2000; 152: 716-726.
28. Peters N, Van Leeuwen AM, Pieters WJ, Hollema H, Quint WGV, Burger MPM. Bacterial vaginosis is not important in the etiology of cervical neoplasia: a survey on women with dyskaryotic smears. *Sex Transm Dis* 1995; 22: 296-302.
29. Neuer A, Menton M. [Bacteriological findings in patients with cervical intra-epithelial neoplasia]. *Zentralbl Gynakol* 1995; 117 Suppl 8: 435-438.
30. Zbroch T, Knapp P, Błońska E, Kobylec M, Knapp P. [Life style, *Chlamydia trachomatis* infection, bacterial vaginosis and their impact on the frequency of cervical lesions]. *Ginekol Pol* 2004; 75 Suppl 7: 538-544.
31. Platz-Christensen JJ, Sundstrom E, Larsson PG. Bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1994; 73: 586-588.
32. Boyle DC, Barton SE, Uthayakumar S, Hay PE, Pollock JW, Steer PJ, Smith JR. Is bacterial vaginosis associated with cervical intraepithelial neoplasia? *Int J Gynecol Cancer* 2003; 13 Suppl 2: 159-163.
33. Frega A, Stentella P, Spera G, Pace S, Cipriano L, Di Ruzza D, Villani C, Pachi A. Cervical intraepithelial neoplasia and bacterial vaginosis: correlation or risk factor? *Eur J Gynaecol Oncol* 1997; 18 Suppl 1: 76-77.

Corresponding author

Milena Mistic,

Department of Public Health Vranje,

Center for Microbiology,

Serbia,

E-mail: milena.s.mistic@gmail.com