

UNIVERZITET ODBRANE U BEOGRADU  
VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA  
MEDICINSKI FAKULTET

**Ljiljana Petrović Jeremić**

**DOKAZIVANJE I MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA**

*Staphylococcus aureus*

**REZISTENTNIH NA METICILIN**

Doktorska disertacija

**Beograd, 2016**

**PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE:**

**Mentor:** Naučni savetnik dr Zorica Lepšanović, Medicinski fakultet Univerziteta odbrane, Beograd

**Predsednik komisije:** Pk doc. dr Srđan Lazić, Medicinski fakultet Univerziteta odbrane, Beograd

**Član komisije:** Doc. dr Ivana Ćirković, Medicinski fakultet Univeziteta Beograd

## SADRŽAJ

1	U V O D .....	1
1.1	Istorijat i taksonomija <i>Staphylococcus aureus</i> .....	1
1.2	Građa <i>Staphylococcus aureus</i> .....	2
1.3	Genom <i>Staphylococcus aureus</i> .....	3
1.4	Kulturelne osobine <i>Staphylococcus aureus</i> .....	5
1.5	Ekstracelularni produkti <i>Staphylococcus aureus</i> .....	5
1.6	Patogeneza stafilokokne infekcije.....	7
1.7	Kliničke manifestacije infekcija izazvanih <i>Staphylococcus aureus</i> .....	10
1.8	Osetljivost na antibiotika.....	11
1.9	Bolnički sojevi meticilin rezistentnog <i>S. aureus</i> (HA-MRSA).....	23
1.10	Vanbolnički sojevi meticilin rezistentnog <i>S. aureus</i> (CA-MRSA).....	23
1.11	Meticilin rezistentan <i>S. aureus</i> poreklom iz životinja (LA-MRSA).....	27
1.12	Epidemiologija MRSA.....	28
1.13	Molekularna epidemiologija i evolucija MRSA.....	30
2.	H I P O T E Z A.....	34
3.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	34
4.	M A T E R I J A L I M E T O D E.....	35
4.1	PLAN ISTRAŽIVANJA.....	35
4.2	MATERIJAL.....	35
4.2.1	Uzorci za ispitivanje.....	36
4.2.1.1	MRSA izolati iz hospitalizovanih pacijenata.....	36
4.2.1.2	MRSA izolati iz zdravih ljudi.....	37
4.2.1.3	Referentni sojevi.....	37
4.2.2	Hranljive podloge .....	37

4.2.3	Antibiogram diskovi.....	39
4.2.4	E test za cefoksitin.....	39
4.2.5	Slidex MRSA Detekcija.....	40
4.2.6	Reagensi za molekularna ispitivanja.....	40
4.2.7	Oprema.....	44
4.3	METODE.....	44
4.3.1	Izolovanje <i>Staphylococcus aureus</i> .....	44
4.3.2	Identifikacija <i>Staphylococcus aureus</i> .....	44
4.3.3	Identifikacija MRSA.....	45
4.3.4	Molekularne metode .....	47
4.4	Statistička obrada podataka.....	51
5.	REZULTATI .....	52
5.1	Izolacija i identifikacija <i>Staphylococcus aureus</i> .....	52
5.1.1	Izolacija i identifikacija <i>Staphylococcus aureus</i> iz hosp.pacijenata...52	
5.1.2	Izolacija i identifikacija <i>Staphylococcus aureus</i> iz zdravih ljudi.....52	
5.2	Detekcija MRSA primenom fenotipskih metoda.....	53
5.2.1	Detekcija MRSA disk difuzionom metodom.....	53
5.2.2	Detekcija MRSA pomoću hrom agara za MRSA.....	54
5.2.3	Detekcija MRSA pomoću E-testa.....	54
5.2.4	Detekcija MRSA dokazivanjem PVP2a.....	55
5.3	Detekcija MRSA primenom genotipske metode.....	55
5.4	Osetljivost MRSA na druge grupe antibiotika.....	56
5.5	Zastupljenost multirezistentnih MRSA izolata.....	62
5.6	Inducibilna rezistencija.....	63
5.7	SCCmec tipizacija izolata MRSA.....	63
5.7.1	SCCmec tipizacija kod MRSA izolata iz hosp. pacijenata.....	64
5.7.2	SCCmec tipizacija kod MRSA izolata iz zdravih ljudi.....	64
5.8	Detekcija pvl gena.....	67

6.	DISKUSIJA .....	69
7.	ZAKLJUČAK .....	82
8.	REFERENCE .....	84

## **1. UVOD**

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) je jedan od najčešće izolovanih humanih bakterijskih patogena i uzročnik brojnih akutnih i hroničnih infekcija. Neke od njih je teško eradicirati, a česti relapsi i posle adekvatne i prolongirane terapije antibioticima, sugerišu da je *S. aureus* u stanju da razvije specifičan način za prilagođavanje različitim uslovima sredine. Zbog toga je poznat i kao jedan od najznačajnijih i najadaptibilnijih patogena kod čoveka. Na adaptaciju utiču različiti faktori kojima je stafilokok izložen, kao što su selektivni pritisak od strane antimikrobnih lekova, odbrana domaćina ili promene sredine u kojoj se nalazi. U kliničkom smislu, to znači mogući relaps infekcije i posle dužeg asimptomatskog perioda: pacijent može biti dugogodišnji, asimptomatski kliconoša, a genom uzročnika odgovornog za relaps infekcije se razlikuje od onog kojim je prvobitno pacijent bio kolonizovan (Donati i sar. 1999).

*S. aureus* često kolonizuje nazalni vestibulum zdravih ljudi, iako i druge anatomske regije, kao što su grlo, aksile, perineum i genitalni trakt, mogu biti kolonizovane (David i Daum 2010). Smatra se da je u oko 20% populacije zastupljeno perzistentno, a u oko 30% intermitentno kliconoštvo (Gordon i Lowy 2008). Kliconoše imaju veći rizik od infekcija i doprinose njihovom širenju. *S. aureus* se širi direktnim kontaktom, obično koža na kožu (Chambers i DeLeo 2009).

### **1.1 Istorijat i taksonomija *Staphylococcus aureus***

Davne 1880. godine, Aleksandar Ogston, škotski vojni hirurk, ubeđen da postoji jedinstven uzročnik gnojenja rana, posmatrao je pod mikroskopom gnoj uzet od bolesnika sa flegmonom noge, i otkrio grupice i lance loptastih organizama koji su se bojili ljubičasto anilinskom bojom (Ogston 1898). Ispitao je više od 80 apscesa i kod većine dokazao prisustvo koka. Ilustracije njegovih radova pokazuju da je pravio razliku između streptokoka, koje je

nazivao “lančanim mikrokokama” i “grupisanih mikrokokaa” koje naziva stafilokoke. Ukazao je i na postojanje stafilokoknih toksina, smatrajući da se iz žarišta putem krvi raznose po čitavom organizmu i dovode do opštih poremećaja. Za mikroorganizme u vidu grupisanih mikrokokaa, Ogston je prvi predložio generičko ime *Staphylococcus* (Rosenbach 1884). Samo nekoliko godina kasnije, 1884. godine, nemački mikrobiolog Fridrih Rozenbah je napravio prvu klasifikaciju stafilokoka po boji njihovih kolonija na *Staphylococcus aureus* (zlatno žuti pigment) i *Staphylococcus albus* (beli pigment) (Passet 1885). Posle brojnih pokušaja klasifikacije od otkrića stafilokoka do danas, dokazano je da stafilokoke nisu bliske mikrokokama, i da je rod *Staphylococcus* jasno odvojen od roda *Micrococcus*. Na osnovu novog genetskog markera *hsp60* za species identifikaciju, *Staphylococcus* spp. je ostao unutar pet podgrupa: “*aureus* grupa”, “*epidermidis* grupa”, “*haemolyticus* grupa”, “*saprophyticus* grupa” i “*intermedius* grupa” što se u potpunosti slaže sa važećom taksonomijom ove raznolike familije (Bergey 1994).

Međunarodni komitet za sistematiku u bakteriologiji preporučuje *hsp60* gen kao alternativu DNK-DNK hibridizaciji ili 16S rRNK sekvenciranju za taksonomsku klasifikaciju članova roda *Staphylococcus* i *Micrococcus*.

## **1.2 Građa *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* je nesporogena, nepokretna, Gram-pozitivna koka. Grupiše se karakteristično, u nepravilne gomile koje formiraju grupice ili grozdove. Samo neki sojevi mogu imati kapsulu koja pokriva bakterijski zid, polisaharidne je prirode, a ujedno je i faktor virulencije ove bakterije (antifagocitna uloga). Kapsularni polisaharid nazvan je polisaharidni antigen (Sheifer i Kandler 1972). Neki sojevi produkuju drugi tip omotača kao odgovor na nutritivne faktore sredine: to je sluzava ovojnica, građena od monosaharida, proteina i malih peptida, i ima ulogu u adherenciji za ćelije, tkiva i nežive površine. Ćelijski zid *S. aureus* se nalazi sa spoljašnje strane

citoplazmatske membrane i sastoji se od: peptidoglikana, polisaharida, teihoiinske kiseline i proteina; najvažniji je stafilokokni protein A (SpA), koga neki sojevi *S. aureus* proizvode u velikim količinama. Svi delovi ćelijskog zida pokazuju antigensku aktivnost.

Klumping (engl.clumping) faktor je komponenta ćelijskog zida stafilokoka koja direktno reaguje sa fibrinogenom i prevodi ga u fibrin. Prvi ga je opisao Much 1908. godine, i prvobitno je nazvan „vezana koagulaza“ (Much 1908). Blackstock je 1968. god. dokazao da inkapsulirani sojevi, iako poseduju klumping faktor, ne daju pozitivnu reakciju zbog inhibitorne uloge kapsularnog polisaharida. Sojevi koji proizvode klumping faktor češće izazivaju infekcije jer dovode do supresije fagocitoze (Blackstock 1968).

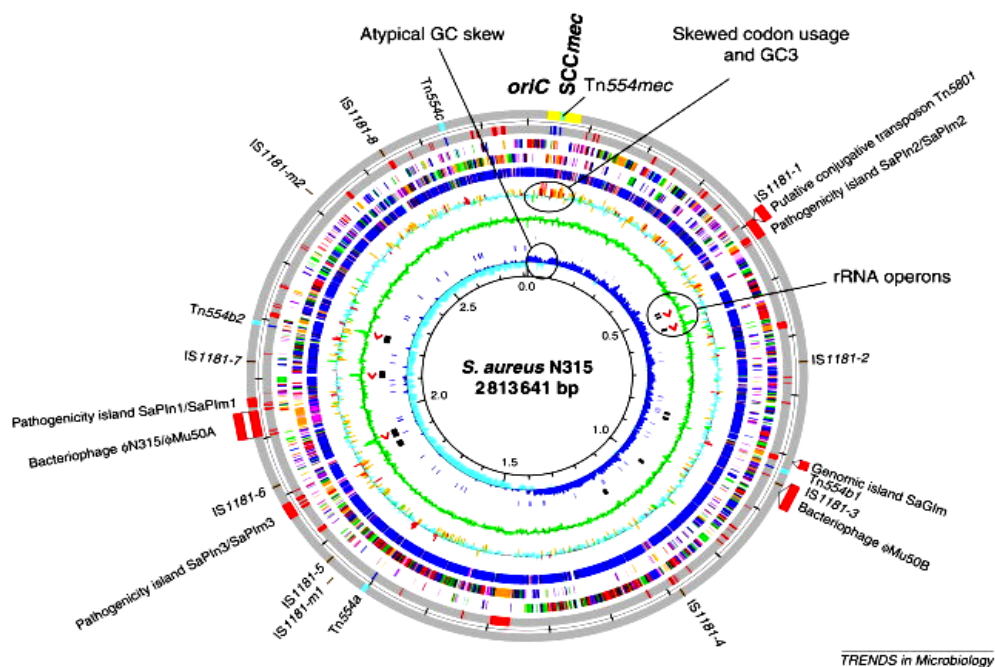
Citoplazmatska membrana je lipoproteinske građe i glavna osmotska selektivna barijera stafilokoka. Učestvuje u kontroli transmembranskog transporta membrana-zavisnih elektrona, u formiranju septuma, razdvajanju replikovanih DNK lanaca i u ćelijskom disanju.

### **1.3 Genom *Staphylococcus aureus***

Genom *S. aureus* sačinjava hromozom, koji je kružni molekul dvolančane DNK, veličine oko  $2,8 \times 10^6$  baznih parova (bp) (Slika 1). Pored toga, u citoplazmi se mogu nalaziti i ekstrahromozomske prstenaste forme dvolančane DNK, plazmidi. Plazmidi mogu nositi različite gene: gene neophodne za sopstvenu replikaciju, za prenošenje genetskog materijala u drugu bakterijsku ćeliju, za rezistenciju na antibiotike, rezistenciju na sredstva za dezinfekciju, sintezu toksina i drugih faktora virulencije. U genomu *S. aureus* mogu se nalaziti i transpozoni, linearni molekuli dvolančane DNK, koji postoje kao integralni deo hromozoma ili plazmida. Transpozoni najčešće nose gene za rezistenciju na antibiotike, a mogu sadržati i druge gene koje sadrže i plazmidi. Slični transpozonomima, ali znatno kraći, su insercioni elementi (IS, insertion sequences), koji sadrže samo gen koji kodira enzim transposazu. Ovaj enzim, čiji gen sadrže i transpozoni, omogućava



insercionim elementima i transpozonima da budu mobilni i premeštaju se unutar genoma bakterije. Pomoću plazmida, ovi genetički elementi lako mogu da pređu iz jedne u drugu bakterijsku ćeliju, tokom procesa koji se naziva konjugacija. Na taj način bakterije između sebe razmenjuju i šire gene za rezistenciju, virulenciju i druge.

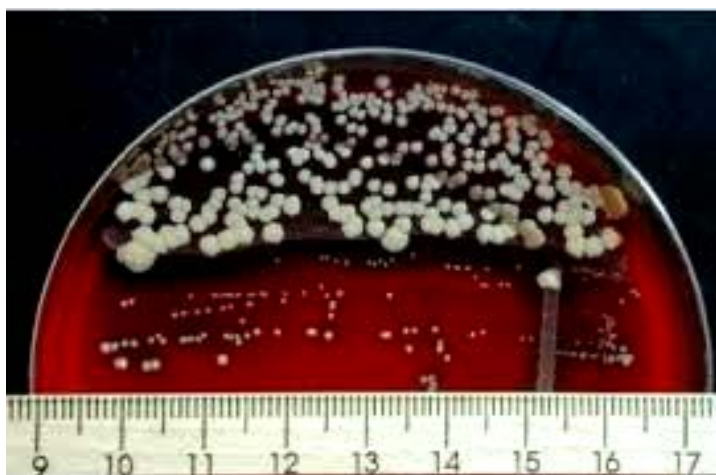


**Slika 1.** Genom *Staphylococcus aureus*. Preuzeto iz: M.Kuroda, T.Ohta, I.Uchiyama, T. Baba, H.Yuzawa et al. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The Lancet 2001; 357:1225-1240

*S. aureus* ima razvijen sistem odbrane integriteta svog genoma: on poseduje 4 tipa restrikciono-modifikacionih sistema koji predstavljaju odbranu od preuzimanja strane i eventualno štetne DNK (npr. bakteriofaga). Tipovi II i IV se sastoje od metiltransferaza, koje modifikacijom specifične DNK sekvence štite sopstvenu DNK od cepanja, a endonukleazi omogućavaju digestiju nezaštićene DNK. Kod tipa I postoji specifična subjedinica HsdS, odgovorna za prepoznavanje ciljne sekvence DNK koja treba da bude metilovana HsdS-om. Prisustvo restrikciono-modifikacionih sistema ograničava preuzimanje strane DNK u prirodnim i u laboratorijskim uslovima (Lazarevic 2011).

#### 1.4 *Kulturelne osobine Staphylococcus aureus*

*S. aureus* raste na većini hranljivih podloga u aerobnim i mikroaerofilnim uslovima na 37°C. Kolonije na čvrstoj podlozi su glatke, okrugle, sjajne, konveksne. Na krvnom agaru može da stvara beta hemolizu, a sojevi sa kapsulom daju sluzav porast. Za razliku od njih, SCV fenotip (engl. small colony variants) se odlikuje manjim kolonijama, smanjenom pigmentacijom i hemolizom (Slika 2).



**Slika 2.** Kolonije *S. aureus* i SCV (small colony variants) fenotip

*S. aureus* je fakultativni anaerob, razgrađuje ugljene hidrate do mlečne kiseline bez gasa. Pokazuje toleranciju na visoke koncentracije NaCl (7,5%)

#### 1.5 *Ekstracelularni produkti Staphylococcus aureus*

Stafilokoke izazivaju heterogena oboljenja posredstvom više od 200 faktora virulencije, među kojima su i faktori invazivnosti - enzimi i toksini (Slika 3). Sinteza toksina kodirana je genima koji se nalaze na hromozomu ili/i plazmidima. Postoje tri grupe toksina koje se razlikuju prema svojoj biološkoj aktivnosti:

**Citotoksini** (oštećuju ćelijsku membranu): hemolizini i leukocidini, koji dovode do lize eritrocita, leukocita, trombocita i oštećenja makrofaga.

**Enterotoksini:** Enterotoksini *S. aureus* pripadaju velikoj porodici stafilokoknih i streptokoknih pirogenih egzotoksina, koji dele zajedničko filogenetsko srodstvo, strukturu, funkciju i sekvencionu homologiju. Ovi toksini uzrokuju toksičnom šoku- slične sindrome, kao i trovanja hranom i neka alergijska i autoimuna oboljenja. U ovu grupu spadaju i dva oblika toksičnog šok sindroma toksina (TSST). Stafilokokni enterotoksini nisu samo moćni gastrointestinalni toksini, već i superantigeni koji stimulišu proliferaciju nespecifičnih T-ćelija (Ortega 2010).

**Eksfolijantini** (poznati i kao epidermolitični toksini) pokazuju jaku proteolitičku aktivnost: kidaju intercelularne veze u površnim slojevima kože, što za posledicu ima ljuštenje epiderma u vidu različitih kožnih promena nazvanih sindrom oparene kože (Staphylococcal Scaled Skin Syndrom-SSSS). Produkuje ih 5-10% sojeva *S. aureus* (Bukowski 2010).

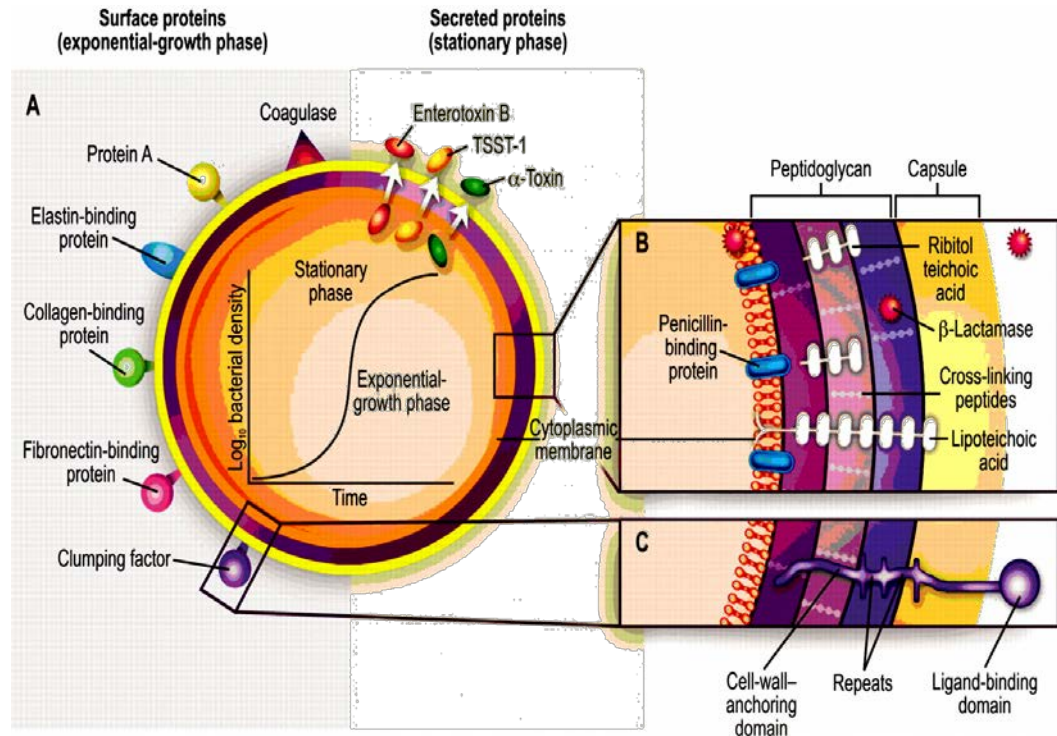
Neki od enzima koji mogu imati ulogu u patogenezi oboljenja izazvanih *S. aureus*, su:

**Hijaluronidaza** je enzim koji razgrađuje hijaluronsku kiselinu, osnovnu supstancu vezivnog tkiva. Frakcije hijaluronidaze I, II i III karakteristične su za stafilokokne infekcije respiratornog trakta, endokarda i infekcije kože i mekih tkiva.

**Lipaza** hidrolizuje estarske veze lipida, pri čemu nastaju alkoholi i kiseline.

**Slobodna koagulaza** stimuliše konverziju fibrinogena u fibrin vezivanjem za protrombin. Lučenje stafilokoagulaze korelira sa virulencijom stafilokoka.

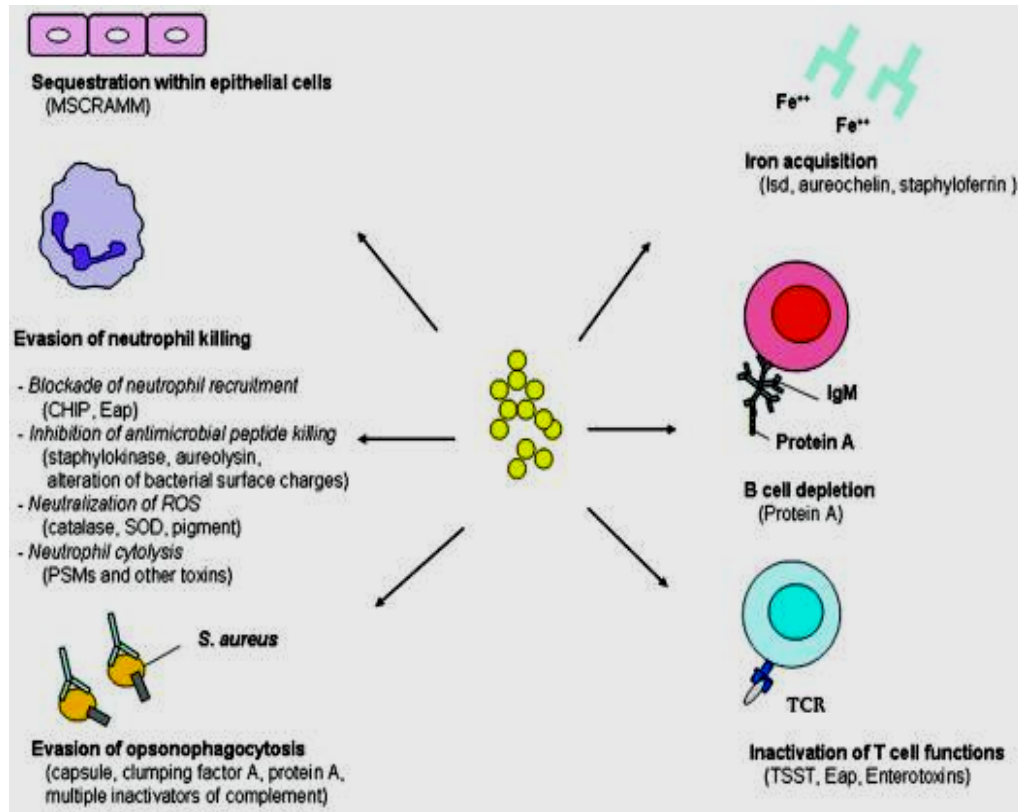
**Stafilokinaza** deluje na plazminogen kojeg aktivira u plazmin, te omogućuje fibrinolitičku aktivnost *S. aureus*.



**Slika 3.** Faktori virulencije kod *Staphylococcus aureus*. Preuzeto iz: Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 1998; 339:520–32.

### 1.6 Patogeneza stafilokokne infekcije

Prvi korak u nastajanju stafilokokne infekcije je kolonizacija *S. aureus* koj započinje adheriranjem ovog patogena za ćelije domaćina. *S. aureus* poseduje specifične površinske proteine (engl. microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules, MSCRAMM) koji omogućuju adheziju za kolagen, fibronektin, ili fibrinogen tkiva domaćina (Slika 4). Smatra se da MSCRAMM proteini imaju ključnu ulogu u endovaskularnim infekcijama, infekcijama kostiju i zglobova, kao i u infekcijama medicinskih implantata. *S. aureus* može da stvara biofilm na mestu infekcije ili na implantatu, i tako uspešno izbegne ćelije odbrane domaćina i antimikrobne lekove. Pored toga, može da egzistira u SCV formi, krijući se unutar ćelija domaćina i ne izazivajući veća oštećenja, a da se kasnije vrati u “divlji tip” koji će izazvati rekurentnu infekciju (Gordon i Lowy 2008).

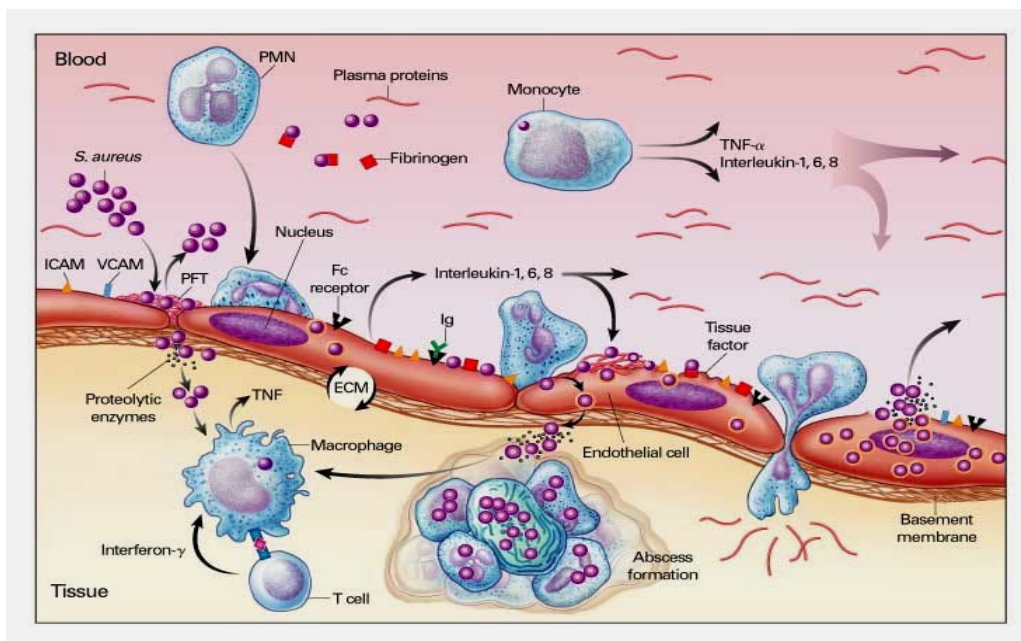


**Slika 4.** Preživljavanje *Staphylococcus aureus* tokom infekcije. Preuzeto iz: Liu GY. Molecular Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Infection Pediatric Research 2009; 65: 71–7.

Invazija domaćina, posle kolonizacije, podrazumeva prodor mikroorganizma kroz epitelne ili mukozne površine uz pomoć stafilokokne proteaze, elastaze, lipaze (Slika 5). Kada probije mukoznu ili epitelnu membranu, stafilokok može biti ingestiran i ubijen od strane polimorfonuklearnih fagocita. Fagociti prepoznaju *S. aureus* pomoću receptora za Fc fragment IgG antitela i receptora za C3b sistema komplementa, tako da, ingestiran, unutar polimorfonukleara, biva izložen dejstvu niza baktericidnih mehanizama: kiseli pH, dejstvo vodonik-peroksida, mijeloperoksidaze, produkata metabolizma kiseonika, hidrolitičkih enzima, lizozima. Kada uspe da izbegne sve prepreke domaćinove odbrane, uz pomoć svojih brojnih

ekstracelularnih produkata, toksina i enzima, dovodi do različitih infekcija. Imunosupresija, urođena ili stečena, stvara predispozicije za nastajanje teških ili ponavljanih stafilokoknih infekcija.

U patogenezi stafilokokne infekcije važnu ulogu ima i strano telo, i to sve važniju, obzirom da je upotreba veštačkih proteza i intravaskularnih katetera u porastu. Mnoge od infekcija stranih tela nastaju učešćem *S. aureus* ili meticilin-rezistentnog *S. aureus* (MRSA), a događaju se kratko vreme posle operacije zbog lokalne kontaminacije implantirane proteze. Jednom nastala infekcija ne može se eradicirati samo medikamentozno, čak i u prisustvu antibiotika na koji je bakterija osetljiva. Posle uklanjanja proteze, infekcija se lakše leči antibiotikom, mada reimplantacija protetičkog materijala može biti otežana prethodnom infekcijom. Posle kontakta sa stranim telom (proteзом) *S. aureus* je sposoban da luči ekstracelularnu, gustu supstancu, biofilm, koji onemogućava prilaz fagocitima i obavljanje njihove fagocitne funkcije.



**Slika 5.** Patogeneza stafilokokne invazije tkiva. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 1998; 339:520–32.

### **1.7 Kliničke manifestacije infekcija izazvanih *Staphylococcus aureus***

Infekcije izazvane *S.aureus* se manifestuje na razne načine: kod jednog broja inficiranih osoba infekcija je asimptomatska, dok kod drugih dovodi do različitih lokalnih i sistemskih, kao i toksemičnih oboljenja (Tabela 1).

**Tabela 1.** Kliničke manifestacije infekcija izazvanih *Staphylococcus aureus*

---

**a) Asimptomatska infekcija**

**b) Lokalne infekcije**

*Koža:* folikulitis, karbunkuli, impetigo, hidroadenitis, celulitis, infekcija rane (hirurške i nehirurške), abscesi i dr.

*Duboke infekcije,* često posle traume, hirurških zahvata, insercije stranih tela: burzitis, artritis, osteomijelitis

**c) Infekcije krvotoka** kao posledica gore navedenih infekcija

*Bakteriemija/ sepsa*

sa ili bez metastatskih infekcija

sa ili bez vaskulitisa i koagulopatije

sa ili bez sindroma sepse i multiple disfunkcije organa

**d) Metastatske infekcije:** artritis, osteomijelitis, meningitis, endokarditis, perikarditis, apscesi pluća, piomiozitis i dr.

**e) Toksemična oboljenja:**

Stafilokokno trovanje hranom

Sindrom oparene kože

Toksični šok sindrom

## **1.8 Osetljivost na antibiotike**

Osetljivost, odnosno rezistencija bakterija na antibiotike se ne može direktno meriti, već se na osnovu *in vivo* i *in vitro* paralelizma može samo predvideti.

Sa kliničkog stanovišta, bakterija je osetljiva ako je inhibirana koncentracijama koje se obično postižu u serumu i drugim telesnim tečnostima, posle uobičajene doze leka date na uobičajeni način. Bakterija je rezistentna u slučaju terapijskog neuspeha, bez obzira na dozu i način unošenja leka u organizam. Intermedijarno osetljiva je, ako nije jasno osetljiva ni rezistentna, i uspešnost terapije se ne može predvideti (D Committe de l antibiogramme de la societe francaise de micriobiologie 2003).

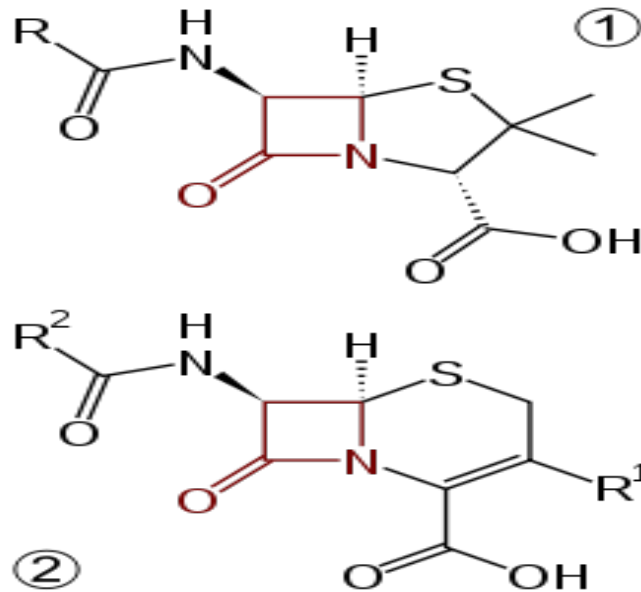
Sa bakteriološkog aspekta, bakterija je osetljiva ako pripada najosetljivijoj subpopulaciji i ne poseduje mehanizme rezistencije, a rezistentna ukoliko poseduje bilo koji mehanizam rezistencije (EUCAST definitive document. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. 1998).

*S. aureus* je prirodno osetljiv na veliki broj antibiotika (Chambers i DeLeo 2009). Rezistenciju na antibiotike najčešće stiče horizontalnim transferom gena, a ponekad i mutacijama na hromozomu. Selektivni pritisak antibiotika olakšava širenje rezistencije. Ova izražena osetljivost *S. aureus* dovela je do otkrića penicilina Aleksandra Fleminga i uvođenja „ere antibiotika“.

### **1.8.1 Beta-laktamski antibiotici**

Beta-laktamski antibiotici (BLA) predstavljaju veliku klasu antibiotika koji u svojoj molekularnoj strukturi sadrže beta-laktamski prsten (Slika 6). Oni su najčešće propisivani antibiotici.





**Slika 6.** Molekularna struktura beta-laktamskih antibiotika (crveno: beta-laktamski prsten): 1. penicilini; 2. cefalosporini

### 1.8.1.1 *Mehanizam dejstva beta-laktamskih antibiotika na Staphylococcus aureus*

Beta-laktamski antibiotici deluju na ćelijski zid *S. aureus*, inhibirajući jednu etapu u njegovoj biosintezi. Rezultat ove inhibicije je usporena ili prekinuta biosinteza ćelijskog zida; istovremeno, ostale metaboličke aktivnosti stafilokoka se normalno odvijaju, tako da ćelija nastavlja da raste, i, usled napona u površinskom sloju, sa dostizanjem kritične tačke, dolazi do lize (Lowy 2003). Prvi korak u delovanju BLA je vezivanje za receptore na spoljašnjoj površini citoplazmatske membrane, tj. za penicilin vezujuće proteine (PVP) (engl. penicillin binding protein, PBP), po hemijskoj strukturi enzime, a sledeći korak je njihova inaktivacija. Različiti beta-laktamski antibiotici imaju različiti afinitet vezivanja za pojedine PVP, što utiče na njihovu aktivnost. Vezivanje za neke od ovih proteina uzrokuje smrt bakterije, dok vezivanje za druge, u manjoj ili većoj meri menja njenu funkcionalnost ili morfologiju. Većina bakterija ima 3-8 različitih PVP, a *S. aureus* ih ima 5. Oni su enzimi koji katalizuju reakcije u završnim fazama peptidoglikanske sinteze: pripajanje peptidoglikana postojećem ćelijskom

zidu, uklanjanje D-alanina sa pentapeptidnog bočnog lanca i raskidanje postojećih peptidnih mostova u procesu uobličavanja peptidoglikana. Prilikom vezivanja BLA za PVP inaktiviraju se inhibitori autolitičkih enzima ćelijskog zida, što dovodi do lize ćelije u izotoničnoj sredini (Mirović 2003).

### **1.8.1.2 Mehanizmi rezistencije *Staphylococcus aureus* na beta-laktamske antibiotike**

*S. aureus* je sposoban da razvije rezistenciju na svaki, do sada poznati antibiotik.

Samo dve godine posle uvođenja penicilina u kliničku praksu, pojavili su se prvi izveštaji o rezistenciji *S. aureus* na ovaj antibiotik. U početku sporadičan, ovaj tip rezistencije posredovan produkcijom hromozomski kodiranih beta-laktamaza, enzima koji hidrolizuju beta-laktamski prsten penicilina, se brzo širio među bolničkim i vanbolničkim sojevima stafilokoka (Lowy 2003) i podstakao proizvodnju prvih penicilina rezistentnih na beta-laktamaze (meticilin, izoksazolil penicilin i nafcilin su napravljeni između 1960. i 1964. god.). Penicilin se terapijski primjenjuje od 40-tih godina, a danas je praktično napušten kao lek izbora za empirijsku terapiju stafilokoknih infekcija, jer je svega oko 5% *S. aureus* osetljivo na ovaj antibiotik (Lowy 1998).

Rezistencija bakterija roda *Staphylococcus* na antistafilokokne beta-laktamaza-rezistentne peniciline istorijski je označena kao rezistencija na meticilin. Odatle i potiču akronimi MRSA za meticilin-rezistentni *S. aureus*, i MRS za meticilin rezistentne stafilokoke uopšte, iako meticilin više nije antibiotik izbora, ni za utvrđivanje ovog tipa rezistencije, ni za lečenje. Ovaj mehanizam rezistencije utvrđuje se, zapravo rezistencijom na cefoksitin (oksacilin). Kod meticilin rezistentnih izolata *S. aureus* svi penicilini, cefemi i drugi beta-laktami (amoksicilin-klavulonska kiselina, ampicilin-sulbaktam, piperacilin-tazobaktam) i karbapenemi, mogu pokazati *in vitro* aktivnost u granicama osetljivosti, ali su klinički neefikasni, pa ove izolate ne treba označavati kao osetljive na ove antibiotike (Mirović 2003).

Stafilokoki osetljivi na penicilin, smatraju se osetljivim i na druge peniciline, kombinacije sa inhibitorima beta-laktamaza, cefeme i karbapeneme. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) i minimalna baktericidna koncentracija (MBK) za ove antibiotike su obično veće od onih za penicilin. U slučaju infekcija uzrokovanih penicilinaza negativnim stafilokokama, lek izbora je penicilin.

Penicilin rezistentni, meticilin osetljivi sojevi su osetljivi na beta-laktamaza-stabilne peniciline (oksacilin, nafcilin, kloksacilin), kombinacije beta-laktam/inhibitor beta-laktamaze, odgovarajuće cefeme i karbapeneme. Meticilin rezistentni stafilokoki rezistentni su na beta-laktamaza stabilne peniciline, kombinacije beta-laktam/inhibitor beta-laktamaze, odgovarajuće cefeme i karbapeneme (Forbes i sar. 2002).

Različiti mehanizmi dovode do rezistencije *S. aureusa* na BLA (Quintilliani i Courvalin 1996):

**1. Produkcija inducibilnog enzima – penicilinaze**, kojeg kodiraju geni koji se najčešće nalaze na plazmidima. Penicilinaze inaktiviraju penicilin, karboksipenicilin i ureidopenicilin. Ovaj enzim ima svoje inhibitore koji ga inaktiviraju, a to su: klavulonska kiselina, sulbaktam, tazobaktam.

**2. Produkcija alternativnog PVP 2a**, čija je sinteza kodirana *mecA* genom koji određuje rezistenciju na meticilin/cefoksitin.

Sintezu PVP2a (78 kD) kodira *mecA* gen koji se nalazi na mobilnom genetskom elementu na hromozomu, a naziva se stafilokokna hromozomska kaset (engl. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*, SCC*mec*) (Berger-Bachi i Rohrer 2002). PVP 2a je strukturno promenjen u odnosu na PVP 2 u meticilin-osetljivih sojeva, zbog čega se na njega ne vežu beta-laktamski antibiotici. Posledica toga je neprekinuta sinteza bakterijskog zida i rezistencija na beta-laktamske antibiotike. Ekspresija *mecA* gena je pod kontrolom regulatornih gena *mecI* i *mecRI*: u odsustvu beta-laktamskog antibiotika, represor MecI sprečava transkripciju i *mecA* i *mecRI-mecI*. U prisustvu beta-laktamskog antibiotika, MecRI se autokatalitički razgrađuje, a metalo-proteaza domen koji se nalazi u citoplazmatskom delu ovog proteina,

postaje aktivan. Metalo-proteaza cepa vezu MecI sa operator regionom *mecA* gena, što omogućuje transkripciju *mecA* i sintezu PVP2a (Berger-Bachi i Rohrer 2002). Postojanje *mecA* gena na hromozomu *S. aureus* poznato je još od 1975. godine (Sjostrom i sar. 1975).

Sojevi *S. aureus* mogu pokazivati smanjenu osetljivost na  $\beta$ -laktamaza-stabilne BLA i zbog hiperprodukcije  $\beta$ -laktamaza (Massida i sar. 1992). Testom disk-difuzije ti se sojevi ne mogu razlikovati od *mecA* pozitivnih MRSA. MIK oksacilina za takve sojeve nikad nisu veće do 12,5  $\mu\text{g/ml}$ , pa se nazivaju granično rezistentnima (engl. borderline oxacillin resistant *S. aureus*, skraćeno BORSA) (Hiramatsu i sar. 1992). Sa kliničkog aspekta je važno razlikovati izolate kod kojih je rezistencija posredovana *mecA* genom jer ovaj tip rezistencije značajno utiče na terapiju. Uloga hiperprodukcije beta-laktamaza u nastajanju granične rezistencije na meticilin nije sasvim jasna, ali zato što i beta-laktamaza stabilni BLA mogu biti polako hidrolizovani većom količinom beta-laktamaza, MIK meticilina dobija graničnu vrednost. BORSA *mecA* negativni sojevi pokazuju smanjenje vrednosti MIK nakon dodavanja inhibitora beta-laktamaze (klavulanska kiselina, sulbaktam), ili nakon uklanjanja beta-laktamaza plazmida. Podaci iz ispitivanja na životinjama pokazuju da su polusintetski penicilinaza rezistentni penicilini efikasniji u lečenju infekcija uzrokovanih BORSA sojevima (Chambers 1997).

### **1.8.1.3 Tipovi meticilinske rezistencije**

Sojevi koji poseduju *mecA* gen mogu ispoljiti homogeni i heterogeni tip rezistencije. Kod homogenog tipa rezistencije, sve ćelije u populaciji ispoljavaju rezistenciju na velike doze beta-laktama u *in vitro* testovima. Većina ćelija u heterogenih sojeva (99,9%) su osetljive na niske koncentracije beta-laktamskih antibiotika, na primer, 1 do 5  $\mu\text{g/ml}$  meticilina, a samo mali deo ćelija (često samo jedna od  $10^6$  ćelija) raste u koncentraciji meticilina od 50  $\mu\text{g/ml}$  ili više. Većina kliničkih izolata ispoljava ovaj heterogeni obrazac rezistencije u rutinskim uslovima rasta.

Heterogeni sojevi mogu ispoljiti homogenost ako se kultiviraju u hipertoničnom medijumu obogaćenom NaCl-om, ili saharozom, ili ako se inkubiraju na temperaturi od 30°C. Ove promene u ekspresiji rezistencije u različitim uslovima kultivisanja su prolazne i potpuno fenotipske. Pasaža heterogenih sojeva u prisustvu beta-laktamskih antibiotika menja fenotipsku rezistenciju selekcijom rezistentnih mutiranih klonova, koji stvaraju homogenu populaciju visoko rezistentnih ćelija koje rastu u koncentracijama meticilina od 50 do 100 µg/ml. Subkultivisanjem u medijumu bez antibiotika udeo visoko rezistentnih ćelija se postepeno smanjuje, a originalni heterogeni obrazac ponovo pojavljuje (Chambers 1997). Kod heterogene ekspresije, MIK se često kreće u okviru graničnih vrednosti (2-4 µg/ml).

Osim ovih tipova, opisan je još jedan tip meticilinske rezistencije: to je granična rezistencija. Granični MRSA sojevi imaju MIK meticilina na granici senzitivnosti (MIK oksacilina je 4-8 µg/ml).

#### ***1.8.1.4 Stafilokokna hromozomska kaseta mec (SCCmec)***

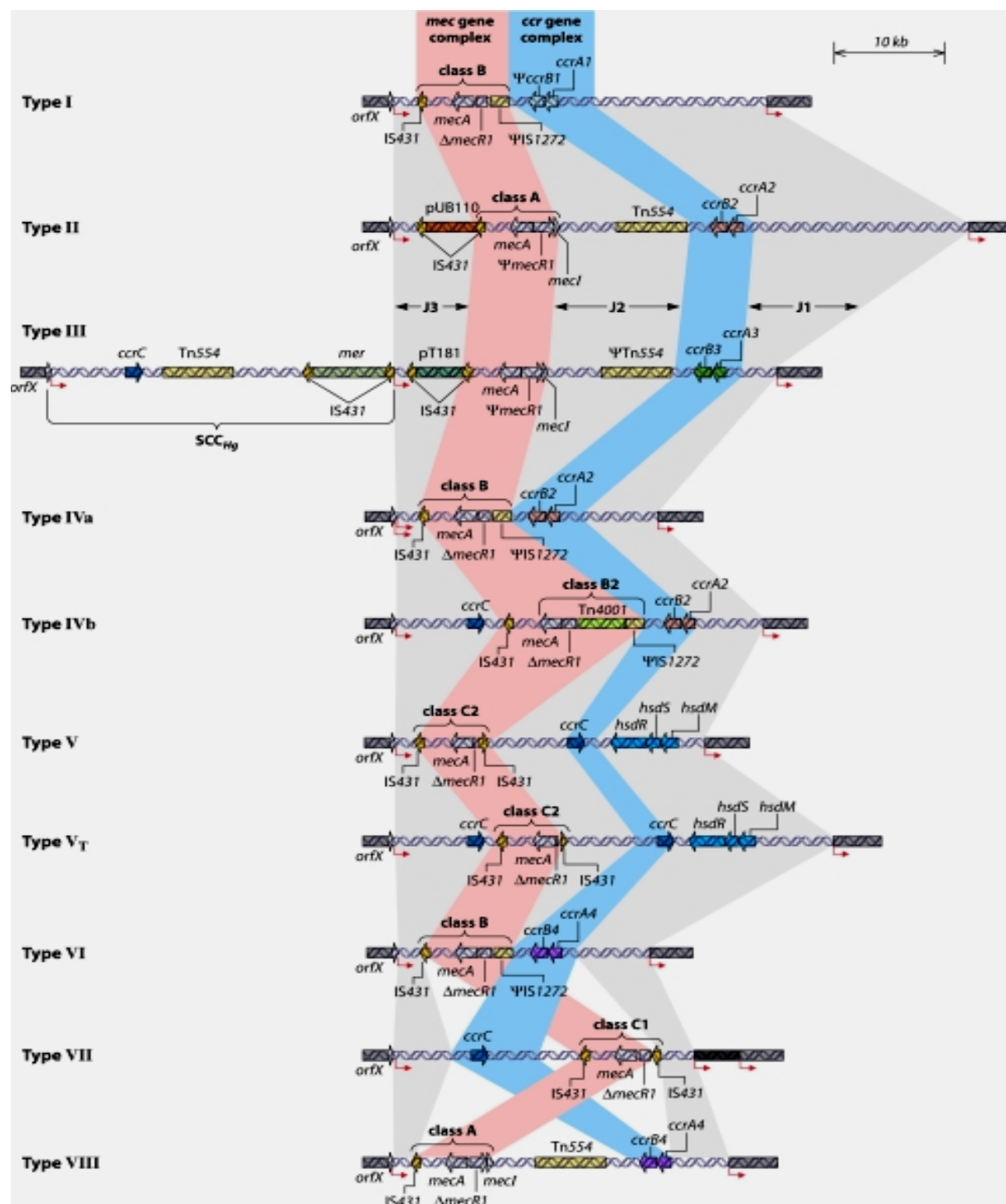
*MecA* gen, veličine 2,1 kb, smešten je na mobilnom genetskom elementu - *SCCmec* elementu. Do sada je poznato jedanaest *SCCmec* tipova čija veličina varira od 20,9 do 66,9 kb (29). *SCCmec* tip I (34,3 kb), tip IV (20,9 do 24,3 kb) i tip V (28 kb) nose samo gene za kodiranje rezistencije na beta-laktamske antibiotike. Pretpostavlja se da su geni za rezistenciju na druge antibiotike smešteni na nekom drugom mestu na hromozomu. *SCCmec* tipovi II i III (53,0 i 66,9 kb) kodiraju i gene za rezistenciju na druge antibiotike koji su smešteni na integrisanim plazmidima (pUB110, pI258, i pT181) i transpozonomima (Tn554 i ΨTn554) (Deurenberg i Stobberingh 2008). Plazmid pUB110 sadrži gen koji kodira rezistenciju na nekoliko aminoglikozida: kanamicin, tobramicin i bleomicin. Na plazmidu pI258 se nalaze geni koji kodiraju beta-laktamaze (penicilinaze) i rezistenciju na teške metale, a plazmid pT181 kodira rezistenciju na tetraciklin. Transpozon Tn554 nosi *ermA* gen koji je odgovoran za nastajanje konstitutivne i

inducibilne rezistencije na makrolide, linkozamide i streptogramin (MLS), dok  $\Psi$ Tn554 kodira rezistenciju na kadmijum. Važnu ulogu u ekspresiji rezistencije na meticilin ima gen *fem* AB (engl. factor essential for the expression of methicillin resistance), jer njegova inaktivacija deluje na smanjenje ekspresije *mecA* gena (Katayama i sar. 2001).

Za integraciju ili eksciziju *SCCmec* elementa na specifičnom mestu u hromozomu, *attB<sub>scc</sub>* (*SCCmec* attachment site), zadužen je enzim *cc* rekombinaza (engl. cassette chromosome recombinase), čiju sintezu regulišu geni smešteni u samom *SCCmec* elementu. Ovi geni označeni su kao: *ccrA1* i *ccrB1* (u *SCCmec* tip I), *ccrA2* i *ccrB2* (u *SCCmec* tip II i IV), *ccrA3* i *ccrB3* (u *SCCmec* tip III) i *ccrC* (u *SCCmec* tip V) (Katayama i sar. 2001).

Šema za klasifikaciju *SCCmec* elementa bazira se na razlikama koje postoje unutar *mec* kompleksa gena i *ccr* kompleksa gena, a predložila ju je međunarodna radna grupa (Slika 7) (International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements 2009).

Osim kod MRSA, *SCCmec* element se može nalaziti i kod koagulaza negativnih stafilokoka (Ma i sar. 2005). Njegovo poreklo nije poznato, ali se pretpostavlja da je *SCCmec* dospelo u *S. aureus* upravo iz koagulaza negativnih stafilokoka i to horizontalnim transferom (Mongkolrattanothai i sar. 2004). Najveća homologija sa *mecA* genom nalazi se u genetskom elementu komensalne bakterije *Staphylococcus sciuri* izolovane iz životinja. PVP kod ove bakterije ima 87,8% sličnosti u redosledu aminokiselina sa PVP2a iz humanih MRSA (Couto i sar. 2003).



**Slika 7.** Šema klasifikacije SCC<sub>mec</sub> tipova na osnovu *ccr* i *mec* kompleksa. Preuzeto iz: David M and Daum R. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. Clin Microbiol Rev 2010; 23 (3): 616-87.

### **1.8.2 Druge grupe antibiotika koje se primenjuju u terapiji MRSA infekcija**

Osim na beta-laktamske antibiotike, *S. aureus* može biti rezistentan i na druge, ne-beta-laktamske antibiotike koji se primenjuju u terapiji stafilokoknih infekcija.

#### **1.8.2.1 Mehanizmi delovanja i rezistencije na aminoglikozide**

Aminoglikozidi se sastoje od tri aminošećera povezana glikozidnim vezama. Dobijaju se od *Micromonasporea* spp. (gentamicin, netilmicin) i *Streptomyces* spp. (streptomycin, neomicin, kanamicin, tobramicin). U bakterijsku ćeliju ulaze putem aktivnog transporta kroz citoplazmatsku membranu. Mesto delovanja svih aminoglikozida je 30S subjedinica ribozoma čime se onemogućava translacija mRNK, time i sinteza proteina, što dovodi do uginuća bakterijske ćelije.

Primarni mehanizam stečene rezistencije na aminoglikozide jesu enzimske modifikacije antibiotika koje sprečavaju njihovo vezivanje za ribosome. Geni koji kodiraju ove enzime se nalaze na plazmidima i transpozonima. Modifikujući enzimi se nalaze samo u citoplazmi u dovoljnim količinama da inaktiviraju antibiotik, tako da se u podlozi u kojoj raste rezistentni soj nalazi nepromenjeni antibiotik. Tri glavne klase enzima koji modifikuju aminoglikozide su: fosfotransferaza (APH), acetil-transferaza (AAC), i adeniltransferaza (ANT) (Mirović 2003).

#### **1.8.2.2 Mehanizmi delovanja i rezistencije na kvinolone**

Kvinoloni se, prema spektru delovanja, dele na dve grupe: kvinolone užeg spektra (prva generacija: cinoksacin, nalidiksna kiselina, oksolinska kiselina) i fluorokvinolone širokog spektra (druga generacija: ciprofloksacin, levofloksacin, norfloksacin, ofloksacin, i treća generacija: moksifloksacin, gatifloksacin, klinafloksacin). Delovanje fluorokvinolona zasniva se na



interakciji sa DNK girazama ili topoizomerazama IV, enzimima koji su neophodni za spiralizaciju i despiralizaciju dvostrukog lanca DNK (Hooper 2000). Fluorokvinoloni selektivno inhibiraju ligaza domen enzima, dok njegov nukleazni domen ostaje intaktan. Enzim nastavlja svoju aktivnost samo kao nukleaza, što za posledicu ima fragmentaciju DNK.

DNK giraza je tetramer koji se sastoji od 4 subjedinica A i B (A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) koje su kodirane genima *gyrA* i *gyrB*.

Poznata su tri mehanizma rezistencije na ove antibiotike (Robicsek i sar 2006). Jedan od njih su aktivne efluks pumpe NorA koje smanjuju koncentraciju kvinolona u ćeliji (Tanaka i sar. 2000). Drugi mehanizam je češći kod Gram-negativnih bakterija, a funkcioniše tako što rezistentne bakterije proizvode proteine koji se vežu za DNK giraze i tako ih štite od delovanja kvinolona. Rezistencija može nastati i usled prisustva mutacija u genima za DNK girazu, koje smanjuju afinitet vezivanja kvinolona za ovaj enzim. Mutacije u genima *gyrA* i *gyrB* su najčešće odgovorne za kliničku rezistenciju (Mirović 2003).

### ***1.8.2.3 Mehanizmi delovanja i rezistencije na makrolid-linkozamid-streptogramin grupu***

Prototip klase makrolida je eritromicin. Hemijsku strukturu ovih antibiotika čini makrociklični prsten sa različitim brojem atoma i zamenama u njemu. Eritromicin je prirodni 14-atomni makrolid. Klaritromicin i azitromicin su 14 i 15-atomni polusintetski makrolidi koji imaju širi spektar delovanja, bolju farmakokinetiku i manje neželjenih dejstava od eritromicina. Linkozamidi uključuju linkomicin i klindamicin koji je hemijski modifikovan linkomicin. Streptogramini su prirodni ciklični peptidi i čine jedinstvenu klasu antibiotika u kojoj je svaki član kombinacija dve komponente koje strukturno nisu srodne, ali deluju sinergično na bakterije. Vezuju se reverzibilno na 50S subjedinicu ribozoma i inhibiraju reakciju translokacije pri elongaciji polipeptidnog lanca. Rezistencija na MLSb antibiotike nastaje

zbog sticanja *erm* gena odgovornog za sintezu enzima metilaze koja demetilira specifične rezidue adenina ribozomalne RNK. Metilacija ribozomalne RNK daje ukršenu rezistenciju na MLSb antibiotike, takozvani MLSb fenotip. Ispoljavanje rezistencije može biti inducibilno i konstitutivno. U stafilokoka inducibilni sojevi su rezistentni samo na 14-atomne (eritromicin, roksitromicin) i 15-atomne (azitromicin) makrolide jer su oni efikasni induktori sinteze metilaze (Slika 8). Kod njih je MLSb rezistencija često posredovana malim plazmidima koji nose *ermC* gen (Mirović 2003).



**Slika 8.** Inducibilna rezistencija stafilokoka na MLSb grupu antibiotika

#### **1.8.2.4 Mehanizmi delovanja i rezistencije na tetracikline**

Kada se nađu u bakteriji, tetraciklini se reverzibilno vezuju za 30S subjedinicu ribozoma. Tako blokiraju pristup aminoacil tRNK i sprečavaju njeno vezivanje za kompleks iRNK-ribozom tokom sinteze proteina.

Rezistencija na tetracikline može biti posredovana aktivnim istiskivanjem antibiotika iz ćelije (efluks), promenom ili blokiranjem mesta vezivanja na ribozomu i/ili produkcijom enzima koji modifikuju tetraciklin tako što dodaju acetil grupu na molekul i tako ga inaktiviraju (Mirović 2003).

### **1.8.2.5 Mehanizam delovanja i rezistencije na trimetoprim-sulfametoksazol**

Sulfonamidi su dobijeni iz sulfanilamida koji je hemijski sličan paraaminobenzijskoj kiselini (PABA), a ona je važan faktor u sintezi folne kiseline bakterija.

Trimetoprim je analog pirimidina koji inhibira enzim dihidrofolat reduktazu (DHFR), ometajući metabolizam folne kiseline i sledstvenu sintezu pirimidina u bakterija. Zato što sulfonamidi i trimetoprim blokiraju metabolički put folne kiseline na različitim mestima, deluju sinergistički na širok spektar mikroorganizama. Mutacije na hromozomu u strukturnom genu za DHFR (*folA*) omogućuju nizak nivo rezistencije na trimetoprim. Kombinovani visoki nivo rezistencije na trimetoprim i sulfonamide može da nastane kao posledica hromozomskih mutacija koje dovode do nemogućnosti sinteze timidilata. Ovi *thy* mutanti zahtevaju egzogeni timin ili timidin za sintezu DNK i zato su rezistentni na antagoniste metaboličkog puta folata. Rezistencija *S. aureusa* na sulfonamide zbog prekomerne produkcije PABA uslovljena je hromozomskim mutacijama (Mirović 2003).

### **1.8.2.6 Mehanizam delovanja i rezistencije na fusidinsku kiselinu**

Fusidinska kiselina se dobija iz gljive *Fusidium coccineum*. U kliničkoj praksi se koristi natrijumova so fusidinske kiseline. Antibakterijski efekat postiže se inhibicijom sinteze proteina, ali tačan mehanizam dejstva nije poznat. Rezistencija na ovaj antibiotik može biti posredovana plazmidski i hromozomski. Hromozomske mutacije se javljaju sa učestalošću  $10^{-7}$  i imaju za posledicu promenu na mestu vezivanja. Plazmidaska rezistencija verovatno nastaje zbog smanjene propustljivosti bakterije za antibiotik (Mirović 2003).

### ***1.9 Bolnički sojevi meticilin rezistentnog S. aureus (HA-MRSA)***

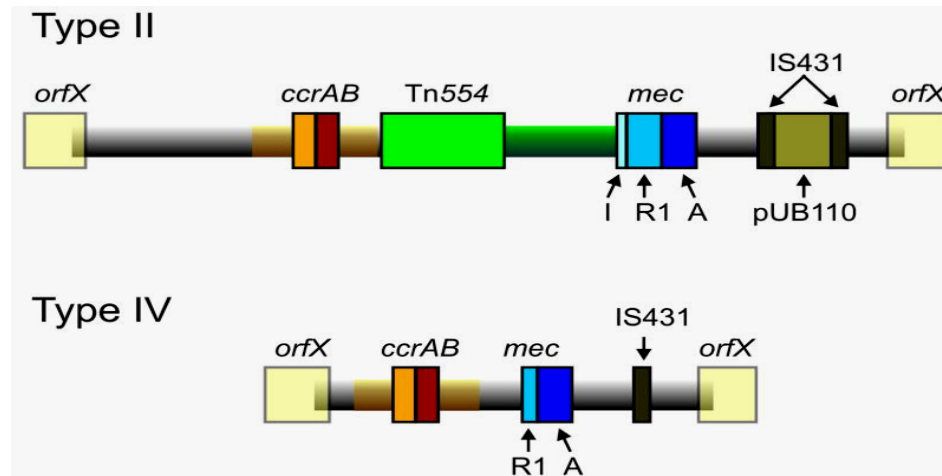
MRSA izolovan iz bolničke sredine (engl. healthcare-associated MRSA, HA-MRSA) predstavlja najveću opasnost od svih nozokomijalnih patogena zbog svoje virulencije, sposobnosti da dovede do najrazličitijih, po život opasnih infekcija, kao i mogućnosti da se prilagodi različitim uslovima sredine. Najčešće izaziva infekcije u, inače, teško obolelih pacijenata: posle velikih operacija, kod pacijenata na dijalizi, kod pacijenata sa kateterom, dekubitusom, kod dijabetičara, obolelih od hronične plućne bolesti. Za 40-70% stafilokoknih infekcija u jedinicama intenzivne nege, odgovoran je upravo HA-MRSA (Moran i sar. 2006), dok se stopa smrtnosti kod bakteremija do kojih dovodi, kreće od 20% do 40%, uprkos brojnim moćnim, novim antibioticima (Franklin 2003). HA-MRSA je zastupljeniji među starijom populacijom sa komorbiditetom, izaziva teže kliničke sindrome i pokazuje veći stepen rezistencije na druge klase antibiotika. Većina MRSA otkrivenih na prijemu u bolnicu, stečena je tokom prethodnog bolničkog lečenja. Stafilokokne kliconoše (pacijenti i zdravstveno osoblje) nose veliki rizik za nastajanje nozokomijalnih infekcija.

Primenom molekularnih metoda u tipizaciji *SCCmec* regiona kod MRSA, pokazano je da su za HA-MRSA karakteristični *SCCmec* tipovi I, II i III. Tip I je identifikovan u prvom MRSA izolovanom 1961. godine u Engleskoj (takozvani „arhaični“ klon), tip II u MRSA soju izolovanom 1982. godine u Japanu („Njujork-Japan klon“), a tip III 1985.godine na Novom Zelandu (Ito i sar.2004) (Slika 8).

### ***1.10 Vanbolnički sojevi meticilin rezistentnog S. aureus (CA-MRSA)***

MRSA izolati su se ranije javljali uglavnom u bolničkoj sredini ili u drugim zdravstvenim ustanovama, ili kod pacijenata koji su češće boravili u tim sredinama. Međutim, od sredine devedesetih godina došlo je do naglog povećanja broja MRSA infekcija među osobama koje nisu imale faktore

rizika za boravak u zdravstvenim ustanovama (David i Daum 2010). Povećanje broja MRSA infekcija bilo je povezano sa pojavom novih sojeva MRSA, tzv. vanbolničkih MRSA (engl. community-associated MRSA, CA-MRSA). Ovi sojevi razlikovali su se od HA-MRSA po tome što su se javljali kod druge grupe pacijenata, izazivali su različite kliničke sindrome, imali drugačiji profil rezistencije i brzo su se širili po celoj populaciji (Naimi i sar. 2003). CA-MRSA javlja se češće u mlađoj populaciji nego HA-MRSA (srednje životno doba je od 23 do 32 godine), kod dece, sportista, vojnika, zatvorenika, zapravo, smatra se da dugotrajan blizak kontakt ima važnu ulogu u prenošenju bolesti (Seybold i sar. 2006). Najčešće izaziva infekcije kože i mekih tkiva poput karbunkula, furunkula, do veoma teških kao što su celulitis i nekrotizirajući fasciitis, sepsa, nekrotizirajuća pneumonija (Naimi i sar. 2003). Osim toga, CA-MRSA se javlja i kao uzročnik infekcija ili komplikacija infektivnih oboljenja u kojima *S. aureus* ili MRSA nisu uobičajeni patogeni, poput piomiozitisa (Fowler i Mackay 2006), purpure fulminans sa sindromom toksičnog šoka (Kravitz 2005), Vaterhouse-Friderichsen sindroma (Adam i sar. 2005). I osetljivost vanbolničkih MRSA na antibiotike je različita u odnosu na osetljivosti tipičnih bolničkih izolata koji su obično multirezistentni. Vanbolnički MRSA su uglavnom manje rezistentni na ne-beta-laktamske antibiotike (Naimi i sar. 2003), mada ima izveštaja i o multirezistentnim izolatima (Mulvey i sar. 2005). Na molekularnom nivou, CA-MRSA izolate odlikuje posedovanje SCC<sub>mec</sub> tipa IV i V ( Ito i sar. 2004) (Slika 9).



**Slika 9.** Poređenje *SCC<sub>mec</sub>* regiona karakterističnog za bolničke i vanbolničke MRSA. Preuzeto iz: Chambres H and Deleo F. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol. 2009;7(9):629-41.

Karakteristika koja se često veže uz CA-MRSA je i prisustvo Panton-Valentine leukocidina (PVL). PVL je citotoksin i kodiran je bakteriofagom *S. aureus* (ΦSa 2) koji je integrisan u bakterijski genom, a na kome se nalaze geni odgovorni za sintezu ovog toksina: *lukS-PV* i *lukF-PV* geni. Meta toksina su ćelije odbrane domaćina - polimorfonuklearni leukociti, makrofagi i monociti, do čije lize dovodi (Genestier i sar. 2005). PVL pozitivni klinički izolati povezani su sa težim CA-MRSA infekcijama, a eksperimentalne studije podržavaju ulogu PVL-a u patogenezi pneumonije (Vardakas i sar. 2009; Loughman 2009). Diep i saradnici (Diep i sar. 2010) su pokazali da MRSA soj USA300 koji proizvodi PVL, izaziva nekrozu, edem i krvarenje na zečijem modelu pneumonije. Osim toga, prečišćeni toksin PVL inokulisan u zečija pluća, mobiliše i lizira neutrofile u plućima, što rezultira inflamacijom i smrću. Labandeir-Rei i saradnici (Labandeira-Rey i sar. 2007) su pokazali da PVL pozitivni sojevi *S. aureus* izazivaju upalu pluća na mišjem modelu, a da prečišćeni toksin izaziva plućne lezije i visoku stopu smrtnosti. PVL toksin stvara pore u neutrofilima povećavajući njihovu propustljivost, te tako dovodi do njihovog propadanja. Hongo (Hongo i sar. 2009) je istraživao litičku aktivnost dva stafilokokna toksina -

fenol rastvorljivog modulin  $\alpha_3$  (PSM $\alpha_3$ ) i PVL na ljudskom i mišjem modelu. Oba proteina izazivaju lizu neutrofila, koja je izraženija kada su i PSM $\alpha_3$  i PVL prisutni, što ukazuje na sinergistički efekat ova dva egzotoksina (Hongo i sar. 2009) Međutim, Bubeck Bardenburg i saradnici (Bubeck Wardenburg i sar. 2007) izveštavaju da PVL ne doprinosi nastajanju stafilokokne infekcije u nekih vrsta miševa.

CA-MRSA produkuju i druge faktore virulencije, uključujući  $\alpha$ ,  $\delta$  i  $\gamma$  hemolizine. Bubeck Bardenburg i saradnici (Bubeck Wardenburg i sar. 2007) su pokazali da alfa hemolizin izaziva oštećenje pluća na mišjem modelu stafilokokne pneumonije. Dakle, virulentnost CA-MRSA potencijalno uključuje nekoliko toksina i ne može se pripisati samo jednom toksinu kao što je PVL (Adam i sar. 2005).

Lučenje PVL, kao i drugih stafilokoknih egzotoksina, regulišu regulatorni proteini Agr (Accessory gene regulator). Agr je kod *S. aureus* centralni regulatorni sistem koji se sastoji od pet gena (*hld*, *agrB*, *agrD*, *agrC* i *agrA*). Oni kontrolišu gensku ekspresiju faktora virulencije uključujući alfa, beta i delta-hemolizine. Agr reaguje na bakterijsku gustinu menjajući nivo transkripcije dva divergentna operona kontrolisana promotorima P2 i P3, tako da ima ključnu ulogu u ekspresiji gena odgovornih za lučenje egzotoksina (Pichon i Felden 2005). Postoje 4 različita *agr* tipa- I, II, III i IV (Adhikari i sar. 2007). Gotovo svi CA-MRSA sojevi poseduju *agr* I genotip. HA-MRSA su mešavina *agr* I i II genotipa. Ovaj regulatorni gen verovatno ima ključnu ulogu u CA-MRSA-indukovanoj leukopeniji i parenhimskoj nekrozi (Diep i Otto 2008). Sojevi koji poseduju *agr* I izazivaju invazivne infekcije, posebno bakterijemiju, dok sojevi *agr* II i III češće uzrokuju neinvazivne infekcije.

Vandenesch i saradnici (Vandenesch i sar. 2003) su u svom istraživanju našli značajnu povezanost između tipa IV SCC*mec* i PVL kod CA-MRSA i predložili PVL kao genetski marker za CA-MRSA. Slične rezultate su dobili i autori iz SAD (Shuklai sar. 2004), dok grupa autora iz Australije nije našla povezanost CA-MRSA SCC*mec* tipa IV sa PVL (O'Brien i sar. 2004).

Epidemiološka i biohemijska istraživanja ukazuju na ulogu PVL u patogenezi CA-MRSA infekcije, ali da li ovaj toksin ima uticaja na kliničku sliku, težinu i ishod bolesti, još uvek nije dovoljno jasno. U poređenju sa PVL negativnim, PVL pozitivni sojevi potiču iz vanbolničke sredine sa mnogo većom verovatnoćom: češće se izoluju kod pacijenata koji nisu imali kontakt sa bolničkom sredinom. Takođe, rekurentne stafilokokne infekcije su češće zastupljene kod bolesnika sa PVL pozitivnim nalazom (Shallcross i sar. 2013).

### ***1.11 Meticilin rezistentan S. aureus poreklom iz životinja (LA-MRSA)***

Novi sojevi MRSA pojavili su se 2003. godine u Holandiji, a izolovani su iz ljudi koji su radili na farmama svinja i goveda (Voss i sar. 2005). Zbog toga su dobili naziv MRSA koji potiču iz životinja (livestock-associated MRSA, LA-MRSA). Pokazano je da svi ti sojevi pripadaju istom tipu sekvence na osnovu MLST analize: MLST 398 (Huijsdens i sar. 2006), a tek 2011. godine otkriveno je da oni nose novi tip *mec* gena, *mecC*, koji je smešten na *SCCmec* elementu označenom kao *SCCmec* tip XI. Zbog izrazito divergentnih sekvenci, on nije mogao biti detektovan rutinskim molekularnim metodama koje se koriste za identifikaciju *mecA* (Monecke i sar. 2013). Ljudi koji su dosta u kontaktu sa svinjama i teladi vrlo često nose LA-MRSA, a prevalenca u jednom ispitivanju je iznosila 25-35% (Van den Broek i sar. 2008). Time je pokazano da je MRSA patogen i za životinje, ne samo za ljude: preko kontaminiranog mesa ova bakterija ulazi u lanac ishrane i može se preneti na ljude. Nakon Holandije, MLST 398 se pojavio i u brojnim drugim zemljama Evrope, Severne Amerike i Azije. Opisane su invazivne infekcije i prve epidemije izazvane ovim patogenom (Wulf i sar. 2008).



### 1.12 Epidemiologija MRSA

Dve godine nakon uvođenja meticilina u terapiju, među izolatima *S. aureus* pojavili su se sojevi rezistentni na ovaj antibiotik. Prvi rezistentni izolat na celbenin, kakav je bio izvorni naziv meticilina, otkriven je u jugoistočnoj Engleskoj. Poticao je iz bolničke sredine, a opisan je u radu iz 1961. godine (Jevons 1961). Prva MRSA epidemija opisana je 1963. godine (Stewart i Holt 1963).

Gen odgovoran za rezistenciju, *mecA* gen, identifikovan je tek nakon dvadeset godina, ali je već tada bilo jasno da je za rezistenciju bio odgovoran mehanizam koji se razlikuje od rezistencije uslovljene penicilinazom, jer nije dolazilo do inaktivacije leka.

Nekoliko SCC*mec* elementa sa genima koji kodiraju biosintetičke enzime za kapsularne polisaharide su opisani u MSSA, *S. epidermidis* i *S. hominis*. Ovi elementi imaju mnoge zajedničke karakteristike sa SCC*mec*, ali im nedostaje *mecA* gen. Paralelnom analizom genoma *S. aureus* i ostalih stafilokoknih vrsta (Hanssen i sar. 2004) došlo se do argumenata koji govore o koagulaza negativnom stafilokoku (KNS) kao izvoru gena rezistencije za *S. aureus* i druge Gram-pozitivne mikroorganizme (John i sar. 1993; McDonnel i sar. 1983 ). Neki autori smatraju da se transfer *mecA* desio iz KNS u *S. aureus* (Archer i sar. 1994). Wajlder i saradnici (Wielder i sar. 1995) su izvestili o mogućem horizontalnom *in vivo* transferu *mecA* u *S. aureus* uz prisustvo meticilin-rezistentnog izolata KNS za vreme antibiotske terapije, gde je *de novo* nastao MRSA soj. Postojanje homologa SCC*mec* genu kod komensalne stafilokokne vrste potvrđuje tvrdnju o rezervoaru gena za rezistenciju kod drugih stafilokoknih vrsta (Mongkolrattanothai i sar. 2006). Smatra se da je horizontalnim transferom SCC*mec* tipa IV, koji se često nalazi kod zdravih ljudi, došlo do konverzije kolonizirajućeg *S. aureus* u MRSA.

Tokom 60-tih godina MRSA se proširio po drugim evropskim državama, a tokom sedamdesetih godina širom sveta.

U ispitivanju realizovanom između 1997. i 1999. godine u bolnicama, prevalenca MRSA u Australiji je bila 23%, u Japanu 67%, u Latinskoj

Americi 35%, u Južnoj Americi 40%, u SAD 32%, a u Evropi 26% (Diekema i sar. 2001). Velika razlika je postojala u prevalenci MRSA u bolnicama unutar Evrope: najniža je bila u severnim zemljama i iznosila je samo 1%, dok je u južnim zemljama Evrope prevalenca bila i preko 45% (Tiemersma i sar. 2004). Početkom dvehiljaditih godina, prevalenca u bolnicama nekih azijskih država (Tajvan, Kina, Japan, Južna Koreja) bila je 70-80% (Chuang i sar. 2013). Podaci EARSSNet-a, mreže koja je zadužena za nadzor i praćenje antibiotske rezistencije u Evropi, iz 2014. godine govore da pojava MRSA pokazuje trend opadanja: u Irskoj je, na primer, zabeležen najniži procenat MRSA-19,5%, od kada je, 1999. godine, uveden nadzor, a ova mreža je objavila i podatak da je u 2014. godini udeo invazivnih MRSA izolata od 2006. godine smanjen za 63%.

O značaju ovog patogena govore i podaci Centra za prevenciju i kontrolu bolesti u Atlanti (Center for Disease Control and Prevention- CDC ), da je u Americi 2005. godine umrlo više ljudi od infekcije MRSA nego od AIDS (Klevens i sar. 2007). U početku se MRSA javljao samo u velikim bolnicama i dovodio do značajnog morbiditeta i mortaliteta, ali se danas sve češće javlja kao uzročnik infekcije i kolonizacije i u manjim bolnicama kao i u vanbolničkoj sredini.

Prvi slučaj CA-MRSA infekcije zabeležen je 1993. godine u zapadnoj Australiji kod pacijenta Aboridžina koji je živeo u izdvojenoj zajednici (Udo i sar. 1993). Sojevi CA-MRSA izolovani su iz zdravih osoba koje su imale infekcije kože i mekih tkiva, ali nisu imali neki od faktora rizika za MRSA infekciju. Tokom devedesetih godina nekoliko CA-MRSA klonova se raširilo po svetu, a povećana prevalenca zabeležena je početkom 2000-tih godina. U meta analizi prevalencije i faktora rizika, Salgado i saradnici (2003) su zaključili da većina osoba sa CA-MRSA ima bar jedan faktor rizika za MRSA i da je prevalenca CA-MRSA među osobama bez faktora rizika bila 0,24%. Ubrzo nakon toga, CA-MRSA je počela da zamenjuje HA-MRSA u ustanovama za negu bolesnika. Ovaj trend je bio izražen u SAD i na Tajvanu, gde je zabeležena i visoka prevalenca. Tako je na urgentnim

odeljenjima u 11 gradova u SAD 78% izolata bilo MRSA, od kojih je 98% pripadalo CA-MRSA klonu USA300 (Moran i sar. 2006). Pored toga, CA-MRSA je, bar delimično, odgovoran za povećanu prevalencu MRSA u onim državama koje su tradicionalno imale nisku prevalencu HA-MRSA, kao što su Danska, Norveška i Holandija (Larsen i sar. 2008). Ujedno, u ovim državama je zabeležen diverzitet prisutnih MRSA klonova (Bartels i sar. 2007).

### ***1.13 Molekularna epidemiologija i evolucija MRSA***

Analiza sojeva bakterija primenom metoda za molekularnu tipizaciju dovela je do razvoja nove discipline, molekularne epidemiologije. Ona je dala veliki doprinos u praćenju izvora i puteva prenosa patogene bakterije tokom bolničkih epidemija. Isto tako, postala je i nezamenjivi saveznik kliničkim i molekularnim mikrobiolozima u ispitivanju populacione strukture patogenih mikroorganizama u njihovom prirodnom okruženju.

Za tipizaciju *S. aureus* primenjuje se nekoliko molekularnih tehnika. Najbolje razlikovanje sojeva kod ispitivanja epidemija u bolnicama i prenošenje sojeva između bolnica, postizalo se primenom elektroforeze u pulsirajućem polju (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE), kojom se detektuju razlike između sojeva koje nastaju u kraćem vremenskom periodu (Deurenberg i sar. 2008). Od tehnika koje se baziraju na sekvenci nukleotida, za ispitivanje *S. aureus* najčešće se primenjuju tipizacija na osnovu sekvence više lokusa (multilocus sequence typing, MLST), sekvenciranje ponavljajućih regiona proteina A *S. aureus* (*spa* tipizacija). MLST se bazira na sekvenciranju unutrašnjeg fragmenta sedam gena koji se nazivaju „housekeeping“ geni, a idealna je za globalna epidemiološka ispitivanja i ispitivanje molekularne evolucije *S. aureus*. Na osnovu MLST analize, izolati koji potiču iz istog klona dobijaju identičan broj za tip sekvence (sequence type, ST), a izolati sa sličnim ST se grupišu u klonalne komplekse

(clonal complex, CC). *SpaA* tipizacijom se sekvencira jedan lokus - polimorfni region gena za površinski protein A, koji je i faktor virulencije *S. aureus*. Ova metoda pogodna je i za praćenje molekularne evolucije hospitalnih MRSA. Metoda koja se specifično primenjuje samo za tipizaciju MRSA i doprinosi ispitivanju molekularne epidemiologije i evolucije ovog patogena, je *SCCmec* tipizacija. Bazira se na metodi lančane reakcije polimeraze (engl. polymerase chain reaction, PCR), a najčešće se primenjuje PCR umnožavanje pomoću nekoliko prajmera istovremeno, tzv. „multiplex“ PCR (Lina i sar. 1999; Milheiriço i sar. 2007). Prajmeri su specifični za gene unutar *mec* kompleksa i za različite *ccr* gene (Boye i sar. 2007).

Primenom molekularnih metoda pokazano je da je širom sveta raširen samo ograničen broj MRSA klonova, a svaki od njih ima specifičnu genetičku pozadinu i *SCCmec* tip. Na osnovu tih podataka predložena je tzv. multiklonalna teorija po kojoj je *SCCmec* element unesen nekoliko puta u različite linije *S. aureus*. Ova teorija potvrđena je ispitivanjem Enright i sar. koji su ispitali 359 sojeva MRSA i 553 MSSA iz 20 zemalja u periodu od 1961 do 1999. godine, primenom MLST i *SCCmec* tipizacije (Enright i sar. 2002). Među MRSA izolatima našli su samo pet klonalnih kompleksa (CC), a neki MRSA izolati koji su imali isti tip sekvence (ST) sadržali su različite *SCCmec* elemente. Svi glavni HA-MRSA klonovi (grupa sojeva iz više od jedne zemlje, koji su imali identičan ST i *SCCmec* tip) pripadali su kompleksima CC5, CC8, CC22, CC30 ili CC45. Navedeni CC bili su rasprostranjeni i pre pojave rezistencije na meticilin, što ukazuje da su epidemiološki superiorni klonovi prethodili poprimanju rezistencije, i da adaptacije i inovacije koje klonove *S. aureus* čine uspešnim, mogu takođe favorizovati njihovu adaptaciju na selektivni pritisak antibiotika (Oliveira i sar. 2002). Ono što je išlo u prilog multiklonalnoj teoriji je činjenica da su se različiti *SCCmec* tipovi nalazili u različitim linijama *S. aureus*. Molekularna analiza MSSA pokazala je da je soj ST8-MSSA, koji je pripadao CC8, potencijalni prethodnik prvog soja MRSA, čija je molekularna oznaka ST250-MRSA-I. Ova dva soja razlikuju se samo u jednom nukleotidu.

Sojevi MSSA koji su povezani sa ST8 su glavni uzročnici infekcija širom sveta. Tokom vremena ST8 je stekao i druge SCC*mec* tipove: I, II i IV.

Sojevi Iberijskog (Iberian) klona, raširenog po Evropi, se takođe samo u jednoj tačkastoj mutaciji razlikuju od ST250, a i sojevi Brazilsko/Mađarskog (Brazilian/Hungarian) klona su povezani sa CC8. MRSA sojevi koji su pripadali ostalim klonalnim kompleksima vodili su poreklo od epidemijskih linija MSSA koje su poprimile SCC*mec* element.

Mnogi faktori utiču na transfer SCC*mec* elementa: njegova veličina, restrikciono-modifikacioni sistem *S. aureus*, redosled nukleotida na mestu integracije, genetička pozadina koja utiče na stabilnost ugrađenog elementa, i drugi (Deurenberg i Stobbering 2008). Isto tako, mnogi faktori utiču na promenu učestalosti glavnih HA-MRSA klonova u nekoj državi, regionu ili bolnici. Jedan od primera je zamena soja ST247-MRSA-I sojem ST36-MRSA-II između 1998 i 2002. god. u jednoj bolnici u Španiji (Perez-Roth i sar. 2004.). Do najveće promene došlo je širenjem CA-MRSA klonova po okolini i bolnicama.

Sojevi CA-MRSA pokazivali su veću klonalnu raznovrsnost nego HA-MRSA, što je sugerisalo da više linija *S. aureus* ima sposobnost da postanu CA-MRSA (Enright i sar. 2002). Prvi opisani slučajevi infekcija izazvanih sojevima CA-MRSA u SAD bili su uzrokovani USA400 sojevima, koji se još označavaju MW2. Ovi sojevi su vrlo bliski klonu WA-1, koji je PVL negativan i raširen CA-MRSA klon u Australiji, kao i MSSA476 soju u Velikoj Britaniji. USA400 (ST1) je potisnut, a zamenio ga je USA300 (ST8) soj, koji je i dalje najčešći uzročnik CA-MRSA infekcija u SAD, a prisutan je i u Kanadi. Detektovan je i u Australiji, Danskoj i Kolumbiji, a izaziva infekcije i u zdravstvenim ustanovama. Van SAD, CA-MRSA infekcije izazivaju i sojevi koji nisu bliski sa USA300: ST80, dominantni klon u Evropi, ST59 na Tajvanu i ST30 u Istočnoj Australiji. Ovo ukazuje da su CA-MRSA sojevi evoluirali u različitim geografskim područjima. Postoji i značajna raznovrsnost CA-MRSA sojeva od zemlje do zemlje (Oliveira i sar. 2002).

Prema definiciji Centra za prevenciju i kontrolu bolesti iz Atlante, SAD, (Centers for Disease Control and Prevention 2005), vanbolničke MRSA predstavljaju sojevi izolovani iz bolesnika koji nisu hospitalizovani, ili iz hospitalizovanih bolesnika unutar 48 sati od prijema u bolnicu. Osim toga, ovoj grupi MRSA ne pripadaju izolati iz bolesnika koji su imali prethodno dokazanu MRSA kolonizaciju, boravak u bolnici ili operaciju unutar poslednje godine, boravak u ustanovama za produženu negu, dijaliziraju se, imaju trajni kateter ili medicinski implantat koje narušava integritet kože. Kada su se pojavili, CA-MRSA sojevi su se lako razlikovali od HA-MRSA, na osnovu navedene definicije i odsustva rezistencije na ne-beta-laktamske antibiotike. *SCCmec* elementi tipa IV i V, koji se nalaze kod CA-MRSA sojeva, su manji, a samim tim i pokretljiviji, pa se efikasnije prenose i šire po populaciji bakterija *S. aureus*. Bakterije sa manjim genomom troše manje resursa na replikaciju. Time stižu prednost u odnosu na sojeve MRSA koji imaju veći genom, što doprinosi njihovom rasprostiranju u vanbolničkoj sredini.

*SCCmec* elementi tipa II i III, karakteristični za HA-MRSA, veći su od tipova IV i V jer sadrže i gene za rezistenciju na druge grupe antibiotika. Pretpostavlja se da ovako veliki elementi usporavaju rast i smanjuju „fitness“ HA-MRSA, a da je selektivni pritisak antibiotika taj koji doprinosi njihovom održanju u bolničkoj sredini ( Jacobs 2014).

Međutim, geni za rezistenciju na ne-beta-laktamske antibiotike mogu se integrisati i u druge delove genoma van *SCCmec*. Tokom godina koevolucije, kao i pod selektivnim pritiskom antibiotika kako u bolničkoj, tako i u vanbolničkoj sredini, sojevi CA-MRSA su poprimili gene za rezistenciju na ne-beta-laktamske antibiotike, pa su razlike između njih i HA-MRSA postajale sve manje. To je dovelo do zabune u klasifikaciji, jer ove dve grupe MRSA više nije bilo moguće razlikovati na osnovu navedenih kriterijuma. CA-MRSA i HA-MRSA se danas mogu identifikovati i međusobno razlikovati samo primenom molekularnih metoda, i to *SCCmec* tipizacijom, *spa* tipizacijom ili primenom MLST.

## 2. HIPOTEZA

Među MRSA izolatima iz hospitalizovanih pacijenata prisutni su SCC*mec* tipovi IV i V koji su karakteristični za CA-MRSA izolate i češće su zastupljeni od SCC*mec* tipova I, II i III, karakterističnih za HA-MRSA.

## 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Izolovati i identifikovati *S. aureus* iz uzoraka koji potiču od hospitalizovanih pacijenata i od kliconoša;
2. Ispitati osetljivost na meticilin izolata *S. aureus* standardnim metodama;
3. Kod svih izolata *S. aureus* koji su fenotipski rezistentni na meticilin, utvrditi prisustvo *mecA* gena PCR metodom;
4. Kod izolata MRSA ispitati osetljivost na druge grupe antibiotika;
5. Izvršiti SCC*mec* tipizaciju izolata MRSA PCR metodom;
6. Utvrditi učestalost genotipova SCC*mec* tip IV i SCC*mec* tip V među izolatima MRSA koji potiču od hospitalizovanih pacijenata i od kliconoša;
7. Utvrditi da li postoji statistički značajna razlika u prisustvu genotipova SCC*mec* tip IV i SCC*mec* tip V između izolata MRSA koji potiču od hospitalizovanih pacijenata i od kliconoša;
8. Utvrditi da li postoji statistički značajna razlika u prisustvu rezistencije na druge grupe antibiotike između CA-MRSA i HA-MRSA.

## **4. MATERIJAL I METODE**

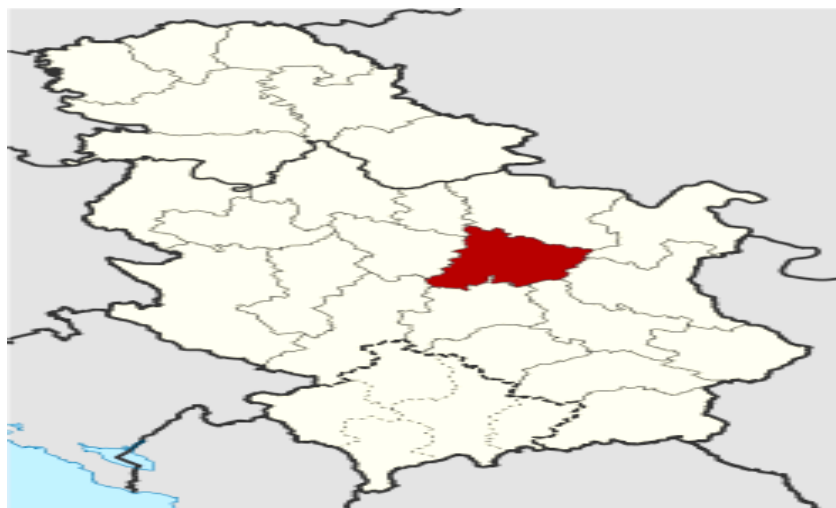
### **4.1 PLAN ISTRAŽIVANJA**

Istraživanje je sprovedeno u dve faze:

- izolovanje i identifikovanje MRSA iz uzoraka poreklom od hospitalizovanih pacijenata i od kliconoša
- molekularna ispitivanja sa ciljem potvrde prisustva *mecA* gena i SCC tipiziranja MRSA izolata koji potiču od hospitalizovanih pacijenata i od kliconoša iz vanbolničke sredine.

### **4.2 MATERIJAL**

Pomoravski okrug se nalazi u centralnoj Srbiji. Prostire se na površini od 2614 m<sup>2</sup>, a čini ga 6 opština (Jagodina, Čuprija, Paraćin, Despotovac, Svilajnac, Rekovac) sa 245000 stanovnika (Slika 10).



**Slika 10.** Položaj Pomoravskog okruga



#### 4.2.1 Uzorci za ispitivanje

##### 4.2.1.1 MRSA izolati iz hospitalizovanih pacijenata

Opšta bolnica u Čupriji je najveća bolnica u Pomoravskom okrugu, ima 500 postelja, a godišnje leči oko 19000 pacijenata i obavi 344000 specijalističkih pregleda.

U toku dvogodišnjeg perioda, od 1.1.2011. do 31.12.2012. godine sa različitih odeljenja ove bolnice, u laboratoriji za kliničku mikrobiologiju Zavoda za javno zdravlje u Čupriji, identifikovano je 168 bolničkih izolata *S. aureus* od kojih je 77 bilo rezistentno na meticilin, a za ispitivanje u ovom radu je odabrano 50 izolata. Distribucija izolata po odeljenjima i materijalima prikazana je na tabeli 2.

**Tabela 2.** Distribucija MRSA izolata iz hospitalizovanih pacijenata, po odeljenjima i materijalima

<i>Odeljenje</i>	<i>VRSTA MATERIJALA</i>						<i>Ukupno</i>
	<i>Bris rane</i>	<i>Bris uva</i>	<i>Hemo-kultura</i>	<i>Sputum</i>	<i>Aspirat</i>	<i>Periton. tečnost</i>	
Ortopedija	11						11
Plas.hirurgija	8						8
Neurohirurgija	8		1				9
Centar za produž. negu	5						5
Nefrologija	2					1	3
Grudno				2	1		3
JIN			1		2		3
Infektivno			1				1
ORL		4					4
Vaskularna hirurgija	3						3
<b>Ukupno</b>	<b>37</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>50</b>

#### **4.2.1.2 MRSA izolati iz zdravih ljudi**

U istom periodu, u laboratoriju za kliničku mikrobiologiju Zavoda za javno zdravlje u Čupriji, pristiglo je oko 52910 briseva grla i nosa iz čitavog Pomoravskog okruga, poreklom od zdravih, radno sposobnih ljudi od 16 do 60 godina, koji zbog prirode posla podležu zdravstvenom nadzoru. Od ukupno 52 izolovana *S. aureus* rezistentna na meticilin, 50 je korišćeno za istraživanje.

Stafilokokne i MRSA kliconoše pripadale su starosnoj dobi od 16 – 36 godina. Jedan od ispitanika pozitivan na prisustvo MRSA, lečen je antibioticima pre manje od 6 meseci, a jedna ispitanica je operisana u toku poslednje godine. Njihovi uzorci isključeni su iz daljih ispitivanja. Ostali su negirali da su uzimali antibiotike u prethodnih 6 meseci, da su imali operaciju ili bili hospitalizovani u poslednjih godinu dana.

Svi identifikovani izolati čuvani su zamrznuti u Miler Hinton bujonu (Torlak, Srbija) na -20°C. Rekultivisani su na krvnom agaru pre svakog eksperimenta.

#### **4.2.1.3 Referentni sojevi**

Korišćena su dva referentna soja (MicroBioLogics, SAD):

- ATCC 33591 meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*;
- ATCC 2593 meticilin senzitivni *Staphylococcus aureus*.

#### **4.2.2 Hranljive podloge**

Tokom istraživanja korišćene su komercijalne, spremne za upotrebu, hranljive podloge kao što su chromID *S. aureus* agar (SAID) i chromID MRSA agar (bio-Merieux, Francuska), kao i hranljive podloge (Torlak, Srbija) spravljene u Zavodu za javno zdravlje u Čuprij

*KRVNI AGAR*

pepton-1	15,0 g
mesni ekstrakt	3,0 g
natrijum hlorid	5,0 g
kalijum hidrogen fosfat	0,3 g
agar	18,0 g
sterilna defibrinisana krv	5-10 ml

41,3 g praha se doda u 1 l destilovane vode i ostavi da stoji 15 minuta. Podloga se zagreje do ključanja da se potpuno rastvori i sterilise u autoklavu 15 minuta na 121°C, ohladi na 50°C, a zatim se doda, pod aseptičnim uslovima, 5-10 ml sterilne defibrinisanе krvi, dobro promeša i razlije pod sterilnim uslovima u Petri ploče.

*MILER HINTON AGAR*

kazein hidrolizat	17,5 g
mesni ekstarkt	2,0 g
skrob	1,5 g
agar	17,0 g

38g praha se doda u 1 l destilovane vode i ostavi da stoji 15 minuta. Podloga se zatim zagreje do ključanja da se potpuno rastvori i sterilise u autoklavu 15 minuta na 121°C, ohladi na 50°C i sterilno razlije u Petri šolje.

*MOŽDANO SRČANO INFUZIONI BUJON*

Partikule srčano moždanog tkiva	17,5 g
triptoza	10.1 g
glukoza	2,0 g
natrijum hlorid	5,0 g
dinatrijum hidrogen fosfat	2,5 g

37g praha se rastvori u 1l dejonizovane vode i ostavi da stoji 10 minuta. Zagreje se do potpunog rastvaranja, sterilise u autoklavu 15 minuta na 121°C, ohladi i pod sterilnim uslovima razlije u epruvete.

*CHROM ID S. aureus AGAR* (bioMerieux, France)

Biljni i mesni peptoni	20,1g
Tris	0,65g
Hromogena mešavina	0,53g
Selektivna mešavina	4,1g
Agar	14g
Destilovana voda	1 l

*CHROM ID MRSA AGAR* (bioMerieux, France)

Biljni i mesni peptoni	20,1g
Tris	0,65g
Hromogena mešavina	0,4g
Selektivna mešavina	4,1g
Agar	14g
Destilovana voda	1 l

**4.2.3 Antibiogram diskovi**

Antibiogram diskovi korišćeni u ovom ispitivanju bili su BBL (Bioanalyse, Turska) diskovi: penicilina (10U), gentamicina (120 $\mu$ g), amikacina (30 $\mu$ g), eritromicina (15 $\mu$ g), klindamicina (2 $\mu$ g), tetraciklina (30 $\mu$ g), ciprofloksacina (5 $\mu$ g), sulfometoksazol-trimetoprima (1,25 $\mu$ g+23,75 $\mu$ g) i fusidinske kiseline (10 $\mu$ g).

**4.2.4 E test za cefoksitin**

E test (bio-Merieux, Francuska) je, spremna za upotrebu, tračica za određivanje preciznih MIK vrednosti antimikrobnih lekova širokog spektra. Ova tračica sadrži unapred formulisane gradijente antibiotika.

#### **4.2.5 Slidex MRSA Detekcija**

MRSA Slidex (bio-Merieux, Francuska) je brzi lateks-aglutinacioni test za detekciju MRSA otkrivanjem PVP2a. Lateks čestice senzibilisane monoklonskim antitelima koja su usmerena protiv PVP2a specifično reaguju sa MRSA i dovode do aglutinacije koja je vidljiva golim okom. MSSA ne aglutiniraju lateks čestice. Kit za detekciju MRSA sadrži:

- senzibilisane lateks čestice
- lateks kontrolni reagens
- ekstrakcioni reagens 1
- ekstrakcioni reagens 2
- pločice za aglutinaciju

#### **4.2.6 Reagensi za molekularna ispitivanja**

**Kit za izolaciju DNK** (B-DNA Sorb, Sacace, Italia), pomoću kojeg je izolovana DNK iz bakterijskih ćelija i korišćena kao uzorak u PCR reakciji.

Komponente kita:

- Rastvor za liziranje ćelija
- Sorbet
- Rastvor za ispiranje 1
- Rastvor za ispiranje 2
- DNK rastvarač

**Taq DNK polimeraza** (Taq F DNA Polymerase 10000 U, QIAGEN, Germany), koja je korišćena za PCR umnožavanje.

**0,5 M EDTA pH 8,0**

Priprema se tako što se rastvori 18,6 g EDTA (dinatrijum etilen diamin tetraacetat x 2H<sub>2</sub>O) u 80 ml destilovane vode. Podesi se pH na 8,0 pomoću NaOH. Volumen se dopuni do 100 ml. Steriliše se autoklaviranjem.

Čuva se na sobnoj temperaturi ili na 4°C.

**1 M Tris HCl pH 8,0**

Priprema se tako što se rastvori se 12,1 g Tris baze u 80 ml destilovane vode. Podesi se pH pomoću koncentrovane HCl. Volumen se dopuni do 100 ml. Steriliše se autoklaviranjem.

Čuva se na sobnoj temperaturi ili na 4°C.

**Pufer za elektroforezu, 5 x TBE**

Priprema se tako što se 54 g Tris baze i 27,5 g borne kiseline rastvori u oko 700 ml destilovane vode. Doda se 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 i dopuni destilovanom vodom do 1000 ml. Steriliše se autoklaviranjem.

Čuva se na sobnoj temperaturi ili na 4°C.

**Pufer za punjenje uzorka za elektroforezu, 10 x koncentrovan**

Priprema se tako što se u 10 ml destilovane vode se rastvori: 25 g bromfenol plavo, 25 g ksilen cijanol i 2,5 g Fikol 400.

Čuva se na sobnoj temperaturi.

**Agaroz** (ICN Biomedicals, Ohio, SAD), za pripremu gela za elektroforezu.

Gel se priprema na sledeći način:

U zavisnosti od veličine DNK fragmenata koji se razdvajaju, gel se pravi od različite koncentracije agaroze. Potrebna količina agaroze doda se u izmereni volumen pufera za elektroforezu (0,5 X TBE). Zagreva se na magnetnoj mešalici do kuvanja. Ohladi se do oko 50°C. Doda se etidijum bromid, 10 mg/ml, do finalne koncentracije od 0,5 µg/ml. Izlije se u kalup u kojeg je

umetnut češalj. Postepeno se hladi na sobnoj temperaturi, tokom 30-45 min. Kada se gel formira, izvadi se češalj i gel stavi u kadu za elektroforezu. Sipa se pufer za elektroforezu (0,5 X TBE), tako da potpuno prekrije gel. Uzorci se pomešaju sa puferom za punjenje (1 X finalno) i nanose u rupice na gelu.

**Marker molekulske težine DNK.** Za određivanje veličine umnoženih fragmenata DNK na gelu agaroze, korišćen je DNK standard 50 bp “DNA ladder” (Sigma, SAD), koji je sadržao fragmente od 50 bp do 3147 bp.

**Prajmeri** (Invitrogen, SAD), oligonukleotidi specifičnog redosleda nukleotida, korišćeni su za PCR umnožavanje. Redosled nukleotida prajmera korišćenih u ovom radu prikazan je na tabeli 3.

Tabela 3. Prajmeri i uslovi umnožavanja kod PCR reakcije

Prajmer	Redosled nuklotida (5'→3')	Uslovi PCR reakcije				Gen	Veličina fragmen- ta	Referenca
		denatu- racija <sup>a</sup>	vezivanje prajmera	polimeri- zacija <sup>b</sup>	Broj ciklusa			
MecA P4 MecA P7	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG CCACTTCATATCTTGTAACG	94°C 30 sec	57°C 30 sec	72°C 60 sec	35	<i>mecA</i>	162 bp	Oliveira i sar., 2002.
Luk-PV-1 Luk-PV-2	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC	94°C 30 sec	55°C 30 sec	72°C 60 sec	32	<i>luk- PV</i>	433 bp	Lina G i sar., 1999.
MecI P2 MecI P3	ATCAAGACTTGCATTTCAGGC GCGGTTTCAATTCACCTTGTC	94°C 30 sec	53°C 30 sec	72°C 60 sec	34	<i>mecI</i>	209 bp	Milheiriço i sar., 2007.
CcrB2 F2 CcrB2 R2	AGTTTCTCAGAATTCGAACG CCGATATAGAAWGGGTTAGC	94°C 30 sec	53°C 30 sec	72°C 60 sec	30	<i>ccrB2</i>	311 bp	Milheiriço i sar., 2007.
CcrC F2 CcrC R2	GTACTCGTTACAATGTTTGG ATAATGGCTTCATGCTTACC	94°C 30 sec	53°C 30 sec	72°C 60 sec	30	<i>ccrC</i>	449 bp	Milheiriço i sar., 2007.
Dcs F2 Dcs R1	CATCCTATGATAGCTTGTC CTAAATCATAGCCATGACCG	94°C 30 sec	53°C 30 sec	72°C 60 sec	30	<i>dcs</i>	342 bp	Milheiriço i sar., 2007.

<sup>a</sup> Početna denaturacija se odvijala na 95°C i trajala je 5 minuta

<sup>b</sup> Završna polimerizacija je trajala 5 minuta



#### **4.2.7 Oprema**

U toku istraživanja korišćena je standardna laboratorijska oprema. Za molekularna ispitivanja korišćeni su :

- PCR aparat, thermocycler Perkin Elmer
- centrifuga Eppendorf
- vorteks, IKA-Combimag
- setovi automatskih pipeta Eppendorf Research (0,5 – 20 µl, 200 – 1000 µl), Gilson (20 – 200 µl)
- aparat za elektroforezu, Pharmacia LKB
- transiluminator, Macro Vue, LKB

### **4.3 METODE**

#### **4.3.1 Izolovanje *Staphylococcus aureus***

Materijal uzet od hospitalizovanih pacijenata i od zdravih ljudi je primarno zasejavan na krvni agar (bio-Merieux, Francuska) i u Miler-Hinton bujon (Torlak, Beograd), podlogu za obogaćenje rasta. Inkubirano je na 37°C pod aerobnim uslovima tokom 24 časa. Belo-žute, konveksne, sjajne kolonije, sa beta ili gama hemolizom su dalje ispitivane navedenim metodama za identifikaciju.

#### **4.3.2 Identifikacija *Staphylococcus aureus***

Za identifikaciju *S. aureus* korišćeni su:

1. Test koagulaze u epruveti sa plazmom kunića (Torlak, Beograd), pri čemu kultura *S. aureus* sa 0,5 ml plazme posle inkubacije na 37°C daje čvrst koagulum. Test je očitavan posle 4 sata i posle 24 sata.

2. ChromID *S. aureus* (bio-Merieux, Francuska), na koji se presejavaju kolonije porasle na krvnom agaru, sumnjive na *S. aureus*. Posle inkubacije od 24 h na 37°C, kolonije *S. aureus* su zeleno obojene.

### **4.3.3 Identifikacija MRSA**

**4.3.3.1 Disk difuzioni metod (DD):** Na Miler Hinton (MH) agar (Torlak, Beograd) nanošena je suspenzija 24-časovne kulture *S. aureus* gustine 0.5 McFarlanda, i posle 15 minuta stavljan je disk cefoksitina (30µg) (BBL, Engleska), posle čega je sledila inkubacija 18-24 h na 35-37°C u aerobnim uslovima. Za MRSA je smatran soj čija je zona inhibicije oko cefoksitina iznosila  $\leq 21$ mm. Karakteristike sojeva kao što su: smanjena zona inhibicije oko diska cefoksitina, porast kolonija različite veličine i broja unutar zone inhibicije ili postojanje koncentričnih prstenova i porast oko diska, ukazivale su da se radi o heterogenom tipu rezistencije, pa su takvi sojevi ponovo testirani na Miler Hinton agaru sa dodatkom 4% NaCl-a i inkubirani na 30°C punih 24 sata (rezistentne subpopulacije heterorezistentnih MRSA rastu sporije i treba im puno vreme inkubacije (Brown, 2001) posle čega je stvarna rezistencija *S. aureus* bila jasno vidljiva.

**4.3.3.2 ChromID MRSA agar:** (bioMerieux, Francuska) na kome su, istovremeno, kada i na krvnom agaru zasejavani svi brisevi pristigli u laboratoriju. Posle inkubacije na 37°C pod aerobnim uslovima u trajanju od 24 sata, kolonije meticilin rezistentnog *S. aureus* postale su zeleno obojene.

**4.3.3.3 E test:** Minimalne inhibitorne koncentracije za cefoksitin za sve izolate *S. aureus* određivane su E testom (bio-Merieux, Francuska). Na zasejani MH agar stavljana je E test traka sa graduisano nanešenim antibiotikom, koji u toku 24-časovne inkubacije na 35-37°C polako difunduje

u podlogu (Slika 11). Vrednost MIK cefoksitina ( $\mu\text{g/ml}$ ) se čita na skali (traci E testa) na mestu ukrštanja elipsaste zone inhibicije i za MRSA iznosi  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$  (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011)



**Slika 11.** E-test kod meticilin rezistentnog *Staphylococcus aureus* (MIK=32  $\mu\text{g/ml}$ ). Preuzeto iz: [www.biomerieux-culturemedia.com](http://www.biomerieux-culturemedia.com)

**4.3.3.4 Slidex MRSA detekcija:** rađeno po uputstvu proizvođača: Svi sojevi *S. aureus* su ispitani na prisustvo produkta *mecA* gena, penicilin vezujućeg proteina (PVP2a) pomoću lateks aglutinacionog testa (Slidex MRSA Detection) (bioMerieux, Francuska). Kolonije 24-časovne kulture *S. aureus* suspendovane su u 0,9% fiziološkom rastvoru, grejane 5 minuta do ključanja, i centrifugirane posle hlađenja. Sediment je mešan na pločici sa lateks česticama iz Slidex reagensa koja su obložena antitelima, a vidljiva aglutinacija u roku od 30 sekundi označavala je postojanje PVP2a, tj. da je izolat MRSA.

#### **4.3.3.5 Ispitivanje osetljivosti na druge antibiotike**

Za ispitivanje osetljivosti na druge grupe antibiotike korišćen je, takođe, DD metod: na MH agar nanošena je suspenzija 24-časovne kulture stafilokoka, gustine 0,5 McFarlanda; posle 15 minuta postavljeni su diskovi antibiotika. Antibiogrami su inkubirani 24 sata, aerobno, na 37°C, posle čega su merene zone inhibicije oko antibiogram diskova i interpretirane kao osetljiv-rezistentan u skladu sa standardima CLSI (2013).

#### **4.3.3.6 Inducibilna rezistencija**

Fenomen inducibilne rezistencije ispitivan je i kod bolničkih i kod vanbolničkih MRSA izolata. Na zasejani MH agar diskovi eritromicina i klindamicina postavljeni su na rastojanju od 1,5-2 cm. Ukoliko bi se, posle inkubacije, oko diska klindamicina pojavila „iskrivljena” zona u obliku slova D, bez obzira na njenu veličinu, smatrano je da je soj rezistentan na klindamicin tj. da ispoljava inducibilnu rezistenciju.

#### **4.3.4 Molekularne metode**

PCR metoda primenjena je kod svih izolata MRSA za detekciju *mecA* gena, gena koji kodiraju PVL, kao i za određivanje tipa *SCCmec* elementa (Lina i sar. 1999; Milcherico i sar. 2007; Oliveira i sar. 2002).

##### **4.3.4.1 Izolacija bakterijske DNK**

Jedna kolonija MRSA, ne starija od 24 časova, je prebačena u epruvetu sa 3 ml tečne MH podloge. Ova suspenzija je inkubirana u termostatu na 37°C, preko noći. Jedan mililitar noćne kulture prebačen je u epruvetu i bakterije su sakupljene centrifugiranjem u mini centrifugi (Eppendorf) na 10000 obrtaja 1

minut. DNK je izolovana iz bakterija primenom kita za izolaciju DNK (B-DNA Sorb, Sacace, Italija), prema uputstvu proizvođača. Talog sa bakterijama rastvoren je u 300 µl rastvora za liziranje, inkubiran 5 minuta na 65°C pa centrifugiran 2 minuta na 10000 obrtaja. U supernatant je dodavano po 20 µl SORBENTA i, posle mešanja na vorteksu, inkubirano na sobnoj temperaturi 3 minuta. Posle ponovljenog mešanja i inkubacije na sobnoj temperaturi, u talog dobijen centrifugiranjem u trajanju od pola minuta, dodato je 300 µl rastvora za ispiranje 1. Sledilo je centrifugiranje na 8000 obrtaja, odlivanje supernatanta i ponovno ispiranje taloga, ovoga puta sa 500 µl rastvora za ispiranje 2. Centrifugiranje na 8000 obrtaja u trajanju od 30 sekundi je ponavljeno, supernatant odliven, a talog osušen na 65°C tokom 5 minuta. Posle toga je sledilo rastvaranje sa 50 µl DNK rastvarača, inkubiranje na 65°C tokom 5 minuta, centrifugiranje na 12000 obrtaja jedan minut i prebacivanje supernatanta u nove epruvete. Supernatant je sadržao DNK spremnu za amplifikaciju.

Izolovana DNK je korišćena za PCR odmah, ili je do primene čuvana na –20°C.

#### **4.3.4.2 PCR metoda**

PCR metoda primenjena je za detekciju *mecA* gena i gena koji kodiraju PVL (*luk-PV* geni), kao i za tipizaciju MRSA na osnovu *SCCmec* regiona. Metoda se zasniva na umnožavanju određenog fragmenta gena koji se detektuje, pomoću enzima *Taq* DNK polimeraze. Specifičnost PCR reakcije daju prajmeri, koji se primenjuju u paru. Redosled nukleotida prajmera komplementaran je nukleotidima koji se nalaze na 3' krajevima DNK fragmenta koji se umnožava (jedan prajmer se vezuje za 3' kraj jednog lanca DNK fragmenta, a drugi prajmer za 3' kraj drugog lanca DNK fragmenta). Reakcija umnožavanja odvija se u 30-40 ciklusa koji se ponavljaju, a svaki ciklus se sastoji od tri koraka:

- **denaturacije DNK**, ili razdvajanje dvolančane DNK na pojedinačne lance, koja se odvija na temperaturi od 94°C ili 95°C;
- **vezivanja prajmera** za komplementarni redosled nukleotida, koja se odvija na temperaturi odgovarajućoj za svaki prajmer, a zavisi od baznog sastava i veličine prajmera;
- **polimerizacije**, tokom koje se sintetišu komplementarni lanci DNK fragmenta pomoću *Taq* DNK polimeraze, na optimalnoj temperaturi za ovaj enzim, a to je 72°C.

Nakon PCR reakcije umnoženi fragment DNK se detektuje elektroforezom na gelu agaroze.

#### **4.3.4.3 Detekcija *mecA* i *luk-PV* gena**

Za PCR detekciju *mecA* gena korišćeni su *MecA* P4 i *MecA* P7 prajmeri (Invitrogen, SAD) čiji je redosled nukleotida preuzet iz literature (Oliveira i sar. 2002) i naveden u tabeli 3. Veličina amplifikovanog fragmenta iznosila je 162 bp. Prajmeri pomoću kojih su detektovani geni koji kodiraju PVL, bili su *Luk-PV-1* i *Luk-PV-2* (Tabela 3), a veličina fragmenta koji je amplifikovan pomoću ovih prajmera bila je 433 bp (Deurenberg i sar. 2007).

PCR mešavina pripremljena je za volumen od 25 µl, od komponenti koje su se nalazile u PCR kitu (ThermoScientific, Vilnius, Lithuania). Sadržala je 2,5 µl 10 puta koncentrovanog pufera, 1,5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl 10 mM mešavine nukleotida (dNTP mix), 1U enzima *Taq* polimeraze. Pored toga, u PCR mešavinu dodano je 200 nM finalne koncentracije svakog prajmera i 2,5 µl izolovane bakterijske DNK.

Umnožavanje se odvijalo u PCR aparatu (thermocycler Perkin Elmer), pod uslovima navedenim u tabeli 3, a umnoženi fragmenti detektovani su elektroforezom na gelu agaroze.

#### 4.3.4.4 SCCmec tipizacija izolata MRSA

**Tipizacija je rađena u odvojenim** PCR reakcijama pomoću prajmera specifičnih za: *mecl*, koji predstavlja regulatorni gen unutar *mec* genskog kompleksa; *ccrB* i *ccrC* alotipove koji kodiraju rekombinaze, enzime odgovorne za mobilnost SCCmec regiona; i *dcs* lokus koji se nalazi u J3 regionu SCCmec regiona (Tabela 4) (Milcheirico i sar. 2007). PCR mešavina pripremana je na isti način kao kod detekcije *mecA* i *luk-PV* gena. Uslovi PCR reakcije navedeni su u tabeli 3.

Umnoženi fragmenti detektovani su elektroforezom na gelu agaroze.

Tipovi SCCmec regiona I do V definisani su određenom kombinacijom amplifikovanih fragmenata pojedinih gena (Tabela 4).

**Tabela 4.** PCR amplifikacija pojedinih gena kod tipizacije SCCmec regiona

	Gen				SCCmec tip
	<i>ccrC</i>	<i>ccrB</i>	<i>dcs</i>	<i>mecl</i>	
	–	–	+	–	<b>I</b>
	–	+	+	+	<b>II</b>
<b>PCR</b>	–	–	–	+	<b>III</b>
<b>amplifikacija</b>	–	+	+	–	<b>IV</b>
	–	+	–	–	<b>IVe</b>
	+	–	–	–	<b>V</b>

#### 4.3.4.5 Elektroforeza na gelu agaroze

Nakon PCR reakcije, umnoženi fragment detektovan je elektroforezom na gelu agaroze. Pripreman je 1,5% gel agaroze (agarose electrophoresis grade, ICN Biomedicals, Ohio, SAD) u TBE puferu. Za bojenje DNK korišćen je

etidijum bromid, koji je dodan u gel u koncentraciji 0,5 µg/ml gela. Pre nanošenja u rupice gela, uzorak (3-7 µl) je pomešan sa puferom za nanošenje uzorka u odgovarajućoj srazmeri, tako da je pufer konačno bio 1 x koncentrovan. Na svaki gel, pored uzoraka, stavljen je i marker molekulske težine DNK. Elektroforeza je trajala 40 do 90 minuta, pri konstantnom naponu struje od 5 V/cm. Korišćen je Pharmacia LKB sistem za elektroforezu. Gelovi su posmatrani na transiluminatoru (Macro Vue, LKB) i fotografisani.

#### **4.4 Statistička obrada podataka**

U statističkoj obradi podataka korišćeni su testovi značajnosti razlika: Hi-kvadrat test sa i bez Jatesove korekcije i Fišerov egzaktni test.

Hi-kvadrat test je test kojim se služimo kada želimo da utvrdimo da li neke dobijene vrednosti odstupaju od vrednosti koje bismo očekivali pod određenom hipotezom. Granična vrednost je vrednost testa za koje se nulta hipoteza odbacuje. Značajnost testa je verovatnoća odbacivanja nulte hipoteze kada je istinita. Nulta hipoteza se prihvata za značajnost testa  $P > 0.05$ , što znači da nema statistički značajne razlike među ispitivanim (poređenim) vrednostima.

Za  $P < 0,05$  odbacujemo nultu hipotezu i zaključujemo: postoji statistički značajna razlika među poređenim vrednostima.

Fišerovim egzaktnim testom, takođe, ispitujemo nivo značajnosti razlike između dva skupa nezavisnih podataka

Dizajn ispitivanja: prospektivna kontrolisana studija.



## **5. REZULTATI**

### **5.1 Izolacija i identifikacija *Staphylococcus aureus***

#### **5.1.1 Izolacija i identifikacija *Staphylococcus aureus* iz hospitalizovanih pacijenata**

Tokom 2011. i 2012.godine, iz kliničkih uzoraka pacijenata koji su lečeni u ćuprijskoj Opštoj bolnici, u laboratoriji za kliničku mikrobiologiju Zavoda za javno zdravlje u Ćupriji, primenom klasičnih mikrobioloških metoda, izolovano je i identifikovano 168 *S. aureus*.

Prema definiciji CDC, kliničkim izolatima se smatraju oni koji su izolovani najmanje 48 sati posle prijema u bolnicu, a, da infekcija nije postojala ili nije bila u periodu inkubacije u trenutku prijema bolesnika na lečenje i najviše 48 sati posle izlaska iz bolnice. Svi izolati iz bolnice koji su uzeti u dalji rad ispunjavali su ove uslove.

#### **5.1.2 Izolacija i identifikacija *Staphylococcus aureus* iz zdravih ljudi**

U istom vremenskom periodu, u Laboratoriju za kliničku mikrobiologiju Zavoda za javno zdravlje u Ćupriji pristiglo je 52910 briseva grla i nosa radi kontrolnog pregleda ispitanika koji zbog prirode posla podležu zdravstvenom nadzoru. *S. aureus* izolovan je i identifikovan iz 1362 (2,58%) brisa.

Izolatima od zdravih ljudi smatraju se oni koji su izolovani kod ljudi koji nisu hospitalizovani, ili iz hospitalizovanih pacijenata unutar 48 sati od prijema u bolnicu. Po definiciji su isključeni izolati od ispitanika koji su imali prethodno dokazanu MRSA kolonizaciju, boravak u bolnici unazad godinu dana, koji su boravili u ustanovi hroničnog tipa, bili na dijalizi ili su bili operisani unutar poslednje godine dana. Ne uključuju se ni izolati pacijenata koji imaju trajni kateter ili pomagalo koje narušava integritet kože.

## 5.2 *Detekcija MRSA primenom fenotipskih metoda*

### 5.2.1 *Detekcija MRSA disk difuzionom metodom*

Disk difuzionom metodom pokazano je da je 77 (45,8%) od 168 izolata *S. aureus* od hospitalizovanih pacijenata bilo rezistentno na meticilin. Za dalje ispitivanje odabrano je 50 izolata i oni su predstavljali grupu MRSA izolovanih iz hospitalizovanih pacijenata. Ovi izolati su poticali iz sledećih kliničkih uzoraka: iz briseva rana ukupno 37 (74%) izolata, iz briseva uva 4 (8%), MRSA pozitivnih hemokultura je bilo 3 (6%), iz sputuma je izolovano 2 (4%), iz aspirata 3 (6%), a iz peritonealne tečnosti 1 (2%) meticilin rezistentni *S. aureus*.

Distribucija izolata po odeljenjima je bila: najviše MRSA je izolovano sa Odeljenja za ortopediju 11 (22%), zatim sa Neurohirurgije 9 (18%), sa Odeljenja za plastičnu i rekonstruktivnu hirurgije 8 (16%). Pet (10%) MRSA izolata je došlo sa Odeljenja fizikalne medicine, četiri (8%) izolata sa ORL odeljenja, a po tri (6%) su vodila poreklo sa Nefrologije, Vaskularne hirurgije, Grudnog odeljenja i Jedinice intenzivne nege. Sa Infektivnog odeljenja je izolovan samo jedan (2%) MRSA izolat.

Primenom iste metode rezistencija na meticilin dokazana je i kod 52 (3,8%) od 1362 *S. aureus* izolovana iz zdravih osoba iz vanbolničke sredine. Dva izolata pripadala su osobama koje nisu zadovoljavale sve uslove da se smatraju vanbolničkim, pa je u dalja ispitivanja uključeno preostalih 50 izolata koji su predstavljali grupu MRSA izolovanih iz zdravih ljudi.

Osim disk difuzionom metodom, MRSA su identifikovani i primenom hrom agara, E-testa za cefoksitin, Slidex MRSA detekcija, testa za dokazivanje PVP2a i PCR reakcije.

### 5.2.2 Detekcija MRSA pomoću hrom agara za MRSA

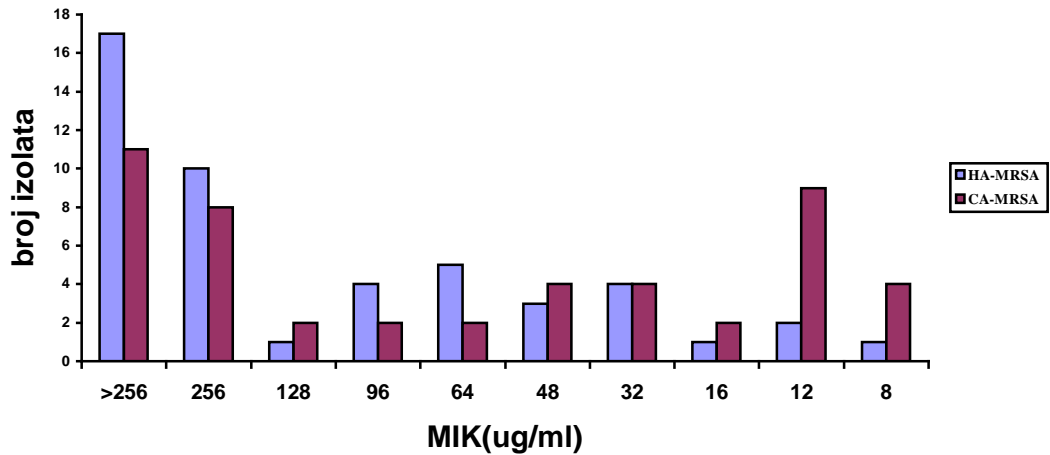
Upotrebom hrom agara za MRSA, svih 50 MRSA izolata iz hospitalizovanih pacijenata i svih 50 MRSA izolata iz zdravih ljudi, porasli su kao kolonije karakteristične zelene boje.

### 5.2.3 Detekcija MRSA pomoću E-testa

Pomoću E-testa za cefoksitin određena je MIK ovog antibiotika kod svih izolata MRSA. Distribucija MIK cefoksitina prikazana je na tabeli 5 i na slici 12. U obe grupe MRSA izolata najzastupljenije vrednosti MIK cefoksitina bile su najveće vrednosti: MIK >256 $\mu$ g/ml i MIK=256  $\mu$ g/ml. Ove vrednosti su bile prisutne kod ukupno 54% izolata iz hospitalizovanih pacijenata i kod 38% izolata iz zdravih ljudi.

**Tabela 5.** Distribucija MIK cefoksitina ( $\mu$ g/ml) kod MRSA izolata iz hospitalizovanih pacijenata i zdravih ljudi

MIK ( $\mu$ g/ml)	Hospitalizovani pacijenti		Zdravi ljudi	
	broj	procenat	broj	procenat
>256	17	34%	11	22%
256	10	20%	8	16%
128	1	2%	2	4%
96	3	6%	2	4%
64	5	10%	2	4%
48	3	6%	4	8%
32	4	8%	4	8%
24	2	4%	/	/
16	2	4%	2	4%
12	2	4%	9	18%
8	1	2%	6	12%



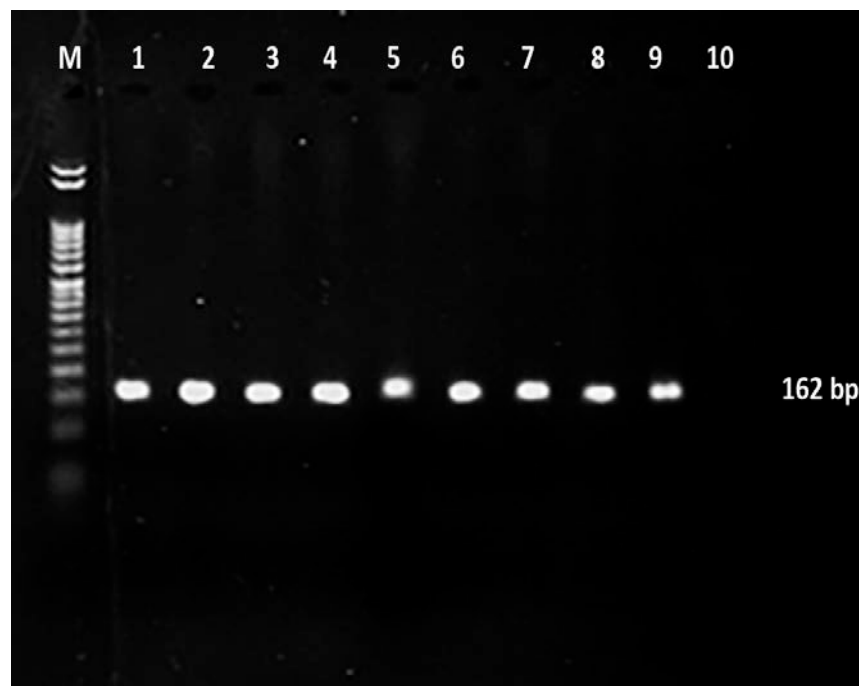
**Slika 12.** Distribucija MIK cefoksitina ( $\mu\text{g/ml}$ ) kod MRSA izolata iz hospitalizovanih pacijenata i zdravih ljudi

#### 5.2.4 Detekcija MRSA dokazivanjem PVP2a

Prisustvo PVP2a na spoljašnjoj površini citoplazmatske membrane *S. aureus* dokazano je pomoću Slidex MRSA detekcija, testa za dokazivanje PVP2a. Reakcija aglutinacije bila je pozitivna kod svih MRSA izolata.

#### 5.3 Detekcija MRSA primenom genotipske metode

Za identifikaciju MRSA primenjena je i molekularna metoda PCR. Pomoću prajmera specifičnih za *mecA* gen, koji kodira PVP2a, amplifikovan je i detektovan DNK fragment veličine 162 bp kod svih 50 MRSA izolata iz hospitalizovanih pacijenata, kao i kod svih 50 MRSA izolata iz zdravih ljudi (Slika 13).



**Slika 13.** PCR detekcija *mecA* gena. Kolona M: marker molekulske težine, 50bp DNA ladder; kolona 1: referentni soj ATCC 33591 meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*; kolone 2-9: *mecA*-pozitivni izolati; kolona 10: referentni soj ATCC 25932 meticilin senzitivni *Staphylococcus aureus*.

#### 5.4 Osetljivost MRSA na druge grupe antibiotika

Svi izolati MRSA testirani su i na druge grupe antibiotika: MLS grupu (eritromocin, klindamicin), aminoglikozide (gentamicin i amikacin), sulfometoksazol-trimetoprim (SXT), ciprofloksacin, tetraciklin i fusidinsku kiselinu (Tabele 6 i 7).

**Tabela 6.** MIK za cefoksitin i rezistencija na ne-BLA kod MRSA izolata iz hospitalizovanih pacijenata

Redni broj	MIK Cef (µg/ml)	Antibiotik							
		Er	Clin	Gen	Ami	Bak	Cip	Tet	Fus
1.	≥256	R	R	R	R	R	R	R	S
2.	64	S	S	S	S	S	R	R	S
3.	≥256	R	R	S	S	R	R	R	S
4.	16	S	S	R	R	R	S	S	S
5.	≥256	R	R	S	S	S	R	S	S
6.	32	S	S	R	S	R	R	S	S
7.	≥256	R	R	S	S	S	S	R	S
8.	32	S	S	R	R	S	S	S	S
9.	8	S	S	R	S	S	S	R	S
10.	≥256	R	R	S	S	R	S	S	S
11.	≥256	R	R	R	S	R	R	R	S
12.	256	R	R	R	R	R	S	S	S
13.	12	R	R	S	S	R	R	S	S
14.	96	S	S	R	R	S	S	S	S
15.	256	R	R	R	R	S	R	S	S
16.	48	S	S	R	R	S	R	R	S
17.	256	R	R	R	S	R	S	S	R
18.	12	S	S	S	S	S	R	R	S
19.	24	S	S	R	R	S	R	R	S
20.	≥256	R	R	R	R	S	R	R	R
21.	96	S	S	S	S	R	R	R	S
22.	≥256	S	S	R	S	S	R	R	S
23.	≥256	R	R	R	R	S	R	R	S
24.	16	R	R	R	R	S	S	S	R
25.	32	R	R	R	R	R	R	S	S
26.	≥256	R	R	R	S	S	S	R	S
27.	48	S	S	S	S	S	R	R	R
28.	32	S	S	S	S	S	S	R	S
29.	64	R	R	S	S	S	R	S	S
30.	64	S	S	R	S	R	S	R	S
31.	256	R	R	R	R	S	S	S	S
32.	256	R	R	S	S	S	R	R	S
33.	≥256	R	R	R	R	S	S	R	S
34.	48	S	S	S	S	S	R	S	R
35.	≥256	R	R	R	S	S	S	S	S
36.	128	S	S	S	S	S	S	R	S
37.	256	S	S	S	S	R	R	R	S
38.	≥256	S	S	S	S	S	R	S	R
39.	256	R	S	R	S	R	S	R	S
40.	64	R	R	S	S	S	S	R	S
41.	64	S	S	S	S	S	R	S	S
42.	96	R	R	S	S	S	R	S	S
43.	256	R	R	S	S	R	R	R	S
44.	24	R	R	S	S	R	R	S	S
45.	≥256	R	R	R	S	S	R	R	S
46.	≥256	R	R	R	S	S	R	R	S
47.	≥256	R	R	R	R	S	R	R	S
48.	≥256	S	S	R	R	S	R	R	S
49.	≥256	R	R	R	R	S	R	S	S
50.	≥256	R	R	R	R	S	S	S	S

**Tabela 7.** MIK za cefoksitin i rezistencija na ne-BLA kod MRSA izolata iz zdravih ljudi

Redni broj	MIK Cef (µg/ml)	Antibiotik							
		Er	Clin	Gen	Ami	Bak	Cip	Tet	Fus
1.	≥256	R	R	S	S	S	R	R	S
2.	≥256	S	S	R	S	S	S	S	S
3.	≥256	S	S	R	R	S	R	S	S
4.	48	S	S	S	S	S	S	S	S
5.	≥256	S	R	R	S	S	S	R	S
6.	≥256	R	R	R	S	S	S	R	S
7.	≥256	R	R	R	R	R	R	R	S
8.	12	S	S	S	S	S	S	S	S
9.	12	S	S	S	S	S	S	R	S
10.	256	R	R	R	R	R	S	R	S
11.	32	S	S	R	S	S	S	S	S
12.	96	R	R	S	S	S	S	S	S
13.	16	S	S	S	S	S	S	S	S
14.	8	S	S	R	S	S	S	S	S
15.	32	R	S	S	R	R	S	R	S
16.	256	R	R	R	S	S	R	R	S
17.	48	R	S	R	S	S	S	R	S
18.	≥256	R	R	R	S	S	R	S	S
19.	8	S	S	S	S	S	S	R	S
20.	12	S	S	S	S	S	S	S	S
21.	12	S	S	S	S	S	S	S	S
22.	12	R	R	S	S	S	S	S	S
23.	16	R	R	R	S	S	S	S	S
24.	256	R	S	S	S	S	S	R	S
25.	256	R	R	S	S	S	R	R	S
26.	24	S	S	S	S	S	S	S	S
27.	256	R	R	S	R	S	R	R	R
28.	256	R	R	R	S	R	S	R	R
29.	6	R	R	R	S	S	S	S	S
30.	256	R	R	R	S	S	S	R	R
31.	≥256	R	R	R	S	S	S	S	S
32.	≥256	R	R	R	R	S	R	R	R
33.	≥256	R	R	S	S	S	S	S	S
34.	12	S	S	S	S	S	S	S	S
35.	8	R	R	S	S	S	S	S	S
36.	12	S	S	S	S	S	S	S	S
37.	256	R	R	R	S	S	S	R	S
38.	48	S	S	S	S	S	S	R	S
39.	48	R	S	S	S	S	S	S	S
40.	96	S	S	R	R	S	S	S	S
41.	≥256	R	R	S	R	R	S	R	S
42.	64	R	R	R	S	S	S	S	S
43.	64	S	R	R	S	S	R	S	S
44.	12	S	R	R	S	S	S	R	S
45.	≥256	S	R	S	S	R	R	R	S
46.	≥256	R	R	R	R	S	R	R	S
47.	32	R	R	R	R	S	R	R	S
48.	64	R	R	R	S	S	R	R	S
49.	≥256	R	R	R	R	S	R	R	S
50.	12	S	S	R	S	S	R	R	S

#### 5.4.1 Zastupljenost rezistencije na pojedine antibiotike kod MRSA izolata iz hospitalizovanih pacijenata i zdravih ljudi

Rezistencija na antibiotike iz grupe makrolida, linkozamida i streptogramina, tj. MLS rezistencija, ovde je prikazana rezistencijom na klindamicin i eritromicin, koji su se dugo koristili, i koriste se još uvek, u terapiji stafilokoknih infekcija. Na tabeli 8 pokazana je zastupljenost rezistentnih i osetljivih MRSA izolata na eritromicin i klindamicin kod obe grupe ispitanika.

Zastupljenost rezistentnih MRSA izolata iz hospitalizovanih pacijenata u odnosu na izolate iz zdravih ljudi je bila slična kod eritromicina (60% / 58%), a ista kod klindamicina (58% / 58%), što je pokazano i statističkom analizom ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 8.** Rezistencija na eritromicin i klindamicin MRSA izolata iz hospitalizovanih pacijenata i zdravih ljudi

Izolati MRSA	ERITOMICIN		KLINDAMICIN	
	pacijenti	zdravi ljudi	pacijenti	zdravi ljudi
Rezistentan	30 (60%)	29 (58%)	29 (58%)	29 (58%)
Osetljiv	20 (40%)	21 (42%)	21 (42%)	21 (42%)
<i>P</i>	> 0.05		> 0.05	

Aminoglikozidi se široko koriste u lečenju infekcija izazvanih Gram-negativnim bakterijama, ali pokazuju i izraženo antistafilokokno dejstvo. Rezistencija na gentamicin bila je visoka u obe ispitivane grupe i iznosila je 58% kod MRSA izolata iz pacijenata i 54% kod zdravih ljudi ( $P > 0,05$ ) (Tabela 9). Na drugi aminoglikozidni antibiotik, amikacin, rezistencija je bila



nešto niža u obe grupe i iznosila je 36% kod MRSA izolata iz pacijenata i 22% kod zdravih ljudi ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 9.** Rezistencija na gentamicin i amikacin MRSA izolata iz hospitalizovanih pacijenata i zdravih ljudi

Izolati MRSA	GENTAMICIN		AMIKACIN	
	pacijenti	zdravi ljudi	pacijenti	zdravi ljudi
Rezistentan	29 (58%)	27 (54%)	18 (36%)	11 (22%)
Osetljiv	21 (42%)	23 (46%)	32 (64%)	39 (78%)
<i>P</i>	> 0.05		> 0.05	

Stafilokoke su konstitutivno rezistentne na I generaciju kvinolona, ali su, bar inicijalno, osetljive na fluorokvinolone. Podaci iz ovog rada govore da u obe grupe ispitivanih stafilokoka postoji visok stepen rezistencije na ciprofloksacin, ali da između MRSA izolata iz hospitalizovanih pacijenata i zdravih ljudi postoji statistički značajna razlika ( $P < 0,05$ ). Tetraciklin pripada grupi „starih“ antibiotika, ali još uvek pokazuje zadovoljavajuću osetljivost prema stafilokokama (Tabela 10). Među izolatima iz pacijenata 56% ih je bilo rezistentno na ovaj antibiotik, a iz zdravih ljudi 52% ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 10.** Rezistencija na ciprofloksacin i tetraciklin MRSA izolata iz hospitalizovanih pacijenata i zdravih ljudi

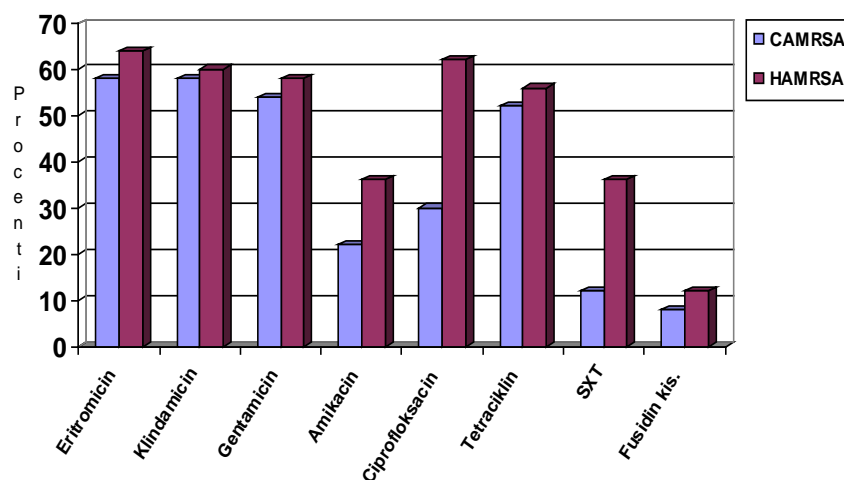
Izolati MRSA	CIPROFLOKSACIN		TETRACIKLIN	
	pacijenti	zdravi ljudi	pacijenti	zdravi ljudi
Rezistentan	31 (62%)	15 (30%)	28 (56%)	26 (52%)
Osetljiv	19 (38%)	35 (70%)	22 (44%)	24 (48%)
<i>P</i>	< 0.05		>0.05	

Kao alternativna terapija stafilkoknih infekcija se mogu koristiti, takođe, „stari“ antibiotici sulfometoksazol-trimetoprim (SXT) i fusidinska kiselina (Tabela 11). Za razliku od fusidinske kiseline prema kojoj bolnički sojevi MRSA i sojevi izolovani od zdravih kliconoša, nisu pokazivali razliku u rezistenciji (12% prema 8%,  $P > 0,05$ ), prema sulfometoksazol-trimetoprimu (SXT), veći je procenat bolničkih MRSA izolata (32%) koji su bili rezistentni na ovaj antibiotik nego vanbolničkih (12%) ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 11.** Rezistencija na SXT i fusidinsku kiselinu MRSA izolata iz hospitalizovanih pacijenata i zdravih ljudi

Izolati MRSA	SXT		FUSIDINSKA KISELINA	
	pacijenti	zdravi ljudi	pacijenti	zdravi ljudi
Rezistentan	16 (32%)	6 (12%)	6 (12%)	4 (8%)
Osetljiv	34 (68%)	44 (88%)	44 (88%)	46 (92%)
<i>P</i>	< 0.05		> 0.05	

Grafički prikaz učestalosti rezistencije svih ispitivanih izolata MRSA na druge grupe antibiotika dat je na slici 14.



**Slika 14.** Učestalost rezistencije na druge grupe antibiotika MRSA izolata iz hospitalizovanih pacijenata i zdravih ljudi

### 5.5 Zastupljenost multirezistentnih MRSA izolata

Svi izolati MRSA iz hospitalizovanih pacijenata bili su rezistentni najmanje na jedan ne-beta-laktamski antibiotik: tri (6%) izolata od 50 bila su rezistentna na jedan, sedam (14%) izolata je bilo rezistentno na dva antibiotika, 14 (28%) na tri antibiotika, a preostalih 26 izolata ili 52% je bilo multirezistentno, tj. pokazivalo je rezistenciju na 4 ili više antibiotika (Tabela 12).

Antimikrobna rezistencija kod izolata poreklom od zdravih ljudi izgledala je ovako: osam (16%) izolata od 50 bilo je senzitivno na sve testirane ne-beta-laktamske antibiotike, sedam izolata (14%) je bilo rezistentno na 1 antibiotik, 6 izolata (12%) na 2 antibiotika, a na 3 antimikrobna agensa rezistenciju je pokazalo 10 izolata ili 20%. Multirezistencija je u ovoj grupi bila zastupljena kod 19 (38%) MRSA.

Rezistencija ispitivanih MRSA izolata na različiti broj ne-beta-laktamskih antibiotika prikazana je na tabeli 12.

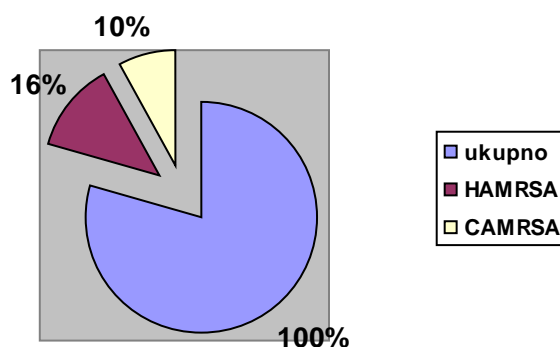
**Tabela 12.** Rezistencija MRSA izolata iz hospitalizovanih pacijenata i zdravih ljudi na ne-beta-laktamske antibiotike

Broj antibiotika	Poreklo izolata		P
	pacijenti	zdravi ljudi	
0	0	8 (16%)	> 0,5
1	3 (6%)	7 (14%)	> 0,5
2	7 (14%)	6 (12%)	> 0,5
3	14 (28%)	10 (20%)	> 0,5
<b>4*</b>	<b>26 (52%)</b>	<b>19 (38%)</b>	<b>&lt; 0,01</b>
Ukupno	50 (100%)	50 (100%)	

\* Multirezistentni izolati

## 5.6 Inducibilna rezistencija

Istovremeno sa testiranjem osetljivosti MRSA na antibiotike, ispitivan je i fenomen inducibilne rezistencije na MLS grupu antibiotika. Ovaj fenomen bio je zastupljen među bolničkim izolatima kod 16% izolata, a među vanbolničkim izolatima kod 10% (Slika 15).



**Slika 15.** Zastupljenost fenomena inducibilne rezistencije na MLS antibiotike kod bolničkih i vanbolničkih MRSA izolata

## 5.7 SCCmec tipizacija izolata MRSA

Kod svih MRSA izolata rađena je SCCmec tipizacija primenom PCR metode. Umnožavanje je rađeno u odvojenim PCR reakcijama za svaki par prajmera. SCCmec tip I su sadržali oni izolati kod kojih je PCR reakcija bila pozitivna samo sa prajmerima specifičnim za *dcs* gen. Kod SCCmec tipa II, PCR reakcija je bila pozitivna za *dcs*, *ccrB* i *mecl* gene, a kod SCCmec tipa III samo za *mecl* gen. Izolati kod kojih je PCR reakcija bila pozitivna za *dcs* i *ccrB*, ili samo za *ccrB*, sadržali su SCCmec tip IV (ili varijantu IVe). SCCmec tip V detektovan je pomoću prajmera specifičnih za *ccrC* gen.

### **5.7.1 *SCCmec tipizacija kod MRSA izolata iz hospitalizovanih pacijenata***

U grupi izolata koji potiču od hospitalizovanih pacijenata, *SCCmec* tipovi I-III, koji su karakteristični za HA-MRSA, nađeni su u 12 (24%) od 50 izolata: sedam (14%) je imalo *SCCmec* I, četiri (8%) izolata *SCCmec* III, a samo jedan (2%) izolat *SCCmec* II (Tabele 13 i 15). Ostalih 38 (76%) izolata imalo je *SCCmec* tipove koji su karakteristični za vanbolničke MRSA: kod 3 (6%) izolata je detektovan *SCCmec* tip IV, a čak kod 35 (70%) *SCCmec* tip V.

### **5.7.2 *SCCmec tipizacija kod MRSA izolata iz zdravih ljudi***

Analiza MRSA izolata poreklom od zdravih ljudi pokazala je da većina (83,3%) poseduje *SCCmec* tipove IV ili V, koji su karakteristični za CA-MRSA. Tip V ovog regiona bio je dvostruko učestaliji (56,2%) u odnosu na tip IV (27,1%). *SCCmec* tip I je nađen kod jednog (2,1%), tip II kod dva (4,1%), a tip III kod 5 (10,5%) izolata. Kod dva izolata nije dobijena pozitivna PCR reakcija ni sa jednim parom prajmera koji su korišćeni za tipizaciju *SCCmec* regiona, pa su ovi izolati ostali su netipizirani.

*SCCmec* tipizacija kao i prisustvo *luk-S* i *luk-F* gena kod MRSA poreklom od zdravih kliconoša, prikazano je na tabelama 14 i 15.

**Tabela 13.** Detekcija *mecA* i *luk-PV* gena i tipizacija SCC*mec* regiona MRSA izolata iz hospitalizovanih pacijenata

Redni broj	PCR detekcija					Luk-PV	SCC <i>mec</i> tip
	<i>mecA</i>	<i>ccrC</i>	<i>ccrB</i>	<i>dcs</i>	<i>mecI</i>		
1.	+	-	-	-	+	-	III
2.	+	-	-	-	+	-	III
3.	+	+	-	-	-	-	V
4.	+	+	-	-	-	-	V
5.	+	-	-	+	-	-	I
6.	+	+	-	-	-	-	V
7.	+	-	-	+	-	-	I
8.	+	-	-	+	-	-	I
9.	+	+	-	-	-	-	V
10.	+	+	-	-	-	-	V
11.	+	-	-	+	-	-	I
12.	+	-	-	-	+	-	III
13.	+	+	-	-	-	-	V
14.	+	-	-	+	-	-	I
15.	+	+	-	-	-	-	V
16.	+	+	-	-	-	-	V
17.	+	-	+	+	+	-	II
18.	+	+	-	-	-	-	V
19.	+	+	-	-	-	-	V
20.	+	+	-	-	-	-	V
21.	+	+	-	-	-	-	V
22.	+	+	-	-	-	-	V
23.	+	+	-	-	-	-	V
24.	+	-	-	+	-	-	I
25.	+	-	+	-	-	-	IVe
26.	+	+	-	-	-	-	V
27.	+	+	-	-	-	-	V
28.	+	-	+	-	-	-	IVe
29.	+	-	+	-	-	-	IVe
30.	+	-	-	+	-	-	I
31.	+	+	-	-	-	-	V
32.	+	+	-	-	-	-	V
33.	+	+	-	-	-	-	V
34.	+	+	-	-	-	-	V
35.	+	+	-	-	-	-	V
36.	+	+	-	-	-	-	V
37.	+	+	-	-	-	-	V
38.	+	+	-	-	-	-	V
39.	+	+	-	-	-	-	V
40.	+	+	-	-	-	-	V
41.	+	+	-	-	-	-	V
42.	+	+	-	-	-	-	V
43.	+	+	-	-	-	-	V
44.	+	+	-	-	-	-	V
45.	+	+	-	-	-	-	V
46.	+	+	-	-	-	-	V
47.	+	-	-	-	+	-	III
48.	+	+	-	-	-	-	V
49.	+	+	-	-	-	-	V
50.	+	+	-	-	-	-	V

**Tabela 14.** Detekcija *mecA* i *luk-PV* gena i tipizacija SCC*mec* regiona kod MRSA izolata iz zdravih ljudi

Redni broj	PCR detekcija					Luk-PV	SCC <i>mec</i> tip
	<i>mecA</i>	<i>ccrC</i>	<i>ccrB</i>	<i>dcs</i>	<i>mecI</i>		
1.	+	+	-	-	-	-	V
2.	+	+	-	-	-	-	V
3.	+	-	-	-	+	-	III
4.	+	-	+	-	-	-	IVe
5.	+	-	+	+	-	-	IV
6.	+	-	+	+	-	+	IV
7.	+	+	-	-	-	-	V
8.	+	-	+	-	-	-	IVe
9.	+	-	+	-	-	-	IVe
10.	+	+	-	-	-	-	V
11.	+	+	-	-	-	-	V
12.	+	-	+	+	-	-	IV
13.	+	-	+	+	-	-	IV
14.	+	+	-	-	-	-	V
15.	+	+	-	-	-	-	V
16.	+	+	-	-	-	-	V
17.	+	+	-	-	-	-	V
18.	+	-	-	+	-	-	I
19.	+	+	-	-	-	-	V
20.	+	+	-	-	-	-	V
21.	+	-	+	+	-	-	IV
22.	+	+	-	-	-	-	V
23.	+	+	-	-	-	+	V
24.	+	+	-	-	-	-	V
25.	+	+	-	-	-	-	V
26.	+	+	-	-	-	-	V
27.	+	+	-	-	-	-	V
28.	+	+	-	-	-	-	V
29.	+	-	+	-	-	-	IVe
30.	+	-	-	-	+	-	III
31.	+	-	-	-	+	-	III
32.	+	-	-	+	-	-	I
33.	+	-	-	-	+	-	III
34.	+	+	-	-	-	-	V
35.	+	-	-	-	+	-	III
36.	+	-	+	-	-	-	IVe
37.	+	-	+	+	-	-	IV
38.	+	-	+	-	-	-	IVe
38.	+	-	+	-	-	-	IVe
39.	+	-	+	+	+	-	II
40.	+	+	-	-	-	-	V
41.	+	+	-	-	-	-	V
42.	+	-	-	-	-	-	netipiz.
43.	+	+	-	-	-	-	V
44.	+	+	-	-	-	-	V
45.	+	-	+	-	-	-	IV
46.	+	+	-	-	-	-	V
47.	+	-	-	-	-	-	netipiz.
48.	+	+	-	-	-	-	V
49.	+	+	-	-	-	-	V
50.	+	+	-	-	-	-	V

**Tabela 15.** SCCmec tipizacija MRSA izolata iz hospitalizovanih i zdravih osoba

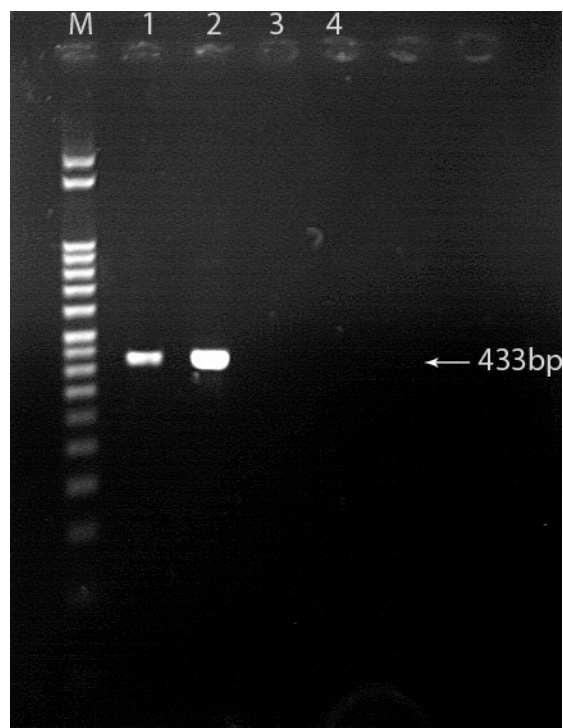
Poreklo izolata	SCCmec tipovi (%)								Ukupno no
	HA-MRSA tipovi				CA-MRSA tipovi				
	I	II	III	ukupno I-III	IV	V	ukupno IV-V	netipizirani	
<b>Hospitalizovani pacijenti</b>	7 (14)	1 (2)	4 (8)	12 (24)	3 (6)	35 (70)	38 (76)	0	50 (100)
<b>Zdravi ljudi</b>	2 (4)	1 (2)	5 (10)	8 (16)	13 (26)	27 (54)	40 (80)	2 (4)	50 (100)
<i>P</i>							< 0.05		

### 5.8 Detekcija *pvl* gena

Svi MRSA izolati (n=100) ispitani su PCR metodom pomoću prajmera specifičnih za gene koji kodiraju PVL. Među MRSA izolatima iz zdravih ljudi, *pvl* gen je detektovan kod dva (4%) (Slika 16). Jedan od pozitivnih izolata je sadržao SCCmec tip IV, karakterističan za CA-MRSA na molekularnom nivou, i bio je rezistentan na klindamicin, eritromicin, gentamicin i tetraciklin. Drugi *pvl* pozitivan izolat sadržao je SCCmec tip V, isto karakterističan za CA-MRSA. Osim rezistencije na klindamicin, eritromicin i gentamicin, ovaj izolat je pokazivao i fenomen pozitivne inducibilne rezistencije.

U grupi MRSA koji su poticali iz hospitalizovanih pacijenata, *pvl* gen nije detektovan ni kod jednog izolata.





**Slika 16.** PCR detekcija *pvl* gena. Kolona M: marker molekulske težine, 50bp DNA ladder; kolone 1, 2: *pvl*-pozitivni izolati 33 i 13; kolona 3: referentni soj ATCC 33591 meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*; kolona 4: referentni soj ATCC 25932 meticilin senzitivni *Staphylococcus aureus*.

## 6. DISKUSIJA

*Staphylococcus aureus* je još od svog otkrića, krajem 19. veka, bio poznat kao patogen koji može izazvati najrazličitija oboljenja, počev od infekcija kože do teških, po život opasnih bakteriemija, endokarditisa, sepse. Stopa smrtnosti obolelih do otkrića penicilina bila je čak 80%. Samo par godina penicilin je mogao biti lek izbora, jer su 1942. godine zabeleženi prvi slučajevi rezistencije *S. aureus* na ovaj lek, najpre u bolnicama, a potom i van njih. Rezistencija je bila rezultat pojave plazmida odgovornog za sintezu hidrolitičkog enzima koji je mogao da razgradi beta-laktamsko jezgro penicilina. Do 1960. godine, više od 80% svih *S. aureus* postalo je neosetljivo na penicilin (Deuerenberg i sar. 2007). U međuvremenu, otkriveni su novi antimikrobni lekovi: penicilinaza-rezistentni penicilini (meticilin, izoksazolil penicilin, nafcilin), kombinacije sa inhibitorima beta-laktamaza, cefemi, karbapenemi, ali je njihova efikasnost tokom, relativno kratkog, 60-godišnjeg perioda stalno slabila. Rezistencija se razvijala najpre u bolnicama kao mestima najvećeg selektivnog pritiska od strane antimikrobnih lekova, odakle su rezistentni sojevi, modifikovani i prilagođeni, našli put do vanbolničke sredine (Chambers i DeLeo 2009).

Ispitivanje rezistencije na meticilin kod izolata *S. aureus* iz bolničke sredine, kao i izolata poreklom od zdravih ljudi u ovom radu, vršeno je na više načina: DD metodom sa diskom cefoksitina, E testom za cefoksitin, pomoću hrom agara, produkcijom PBP2a i PCR metodom. Dobijeni rezultati se nisu razlikovali: pokazali su da se rezistencija stafilokoka na meticilin u bolničkoj sredini javljala značajno češće i da je bila zastupljena sa 45,8%, u odnosu na 3,8% kod zdravih ljudi.

U našoj zemlji u različitim bolničkim centrima, različita je zastupljenost MRSA izolata. U Kliničkom centru u Nišu, na odeljenjima nefrologije i hirurgije, MRSA je, prema podacima iz 2008. godine, bio zastupljen sa 53,77% (nefrologija), odnosno sa 67,79% (hirurgija) (Orlović i sar. 2008). U Kliničkom centru Srbije je 2006. godine prevalenca MRSA iznosila čak 81%,

a na Ortopedskoj klinici na Banjici u Beogradu iz briseva rana izolovano je 41% MRSA (Mirović i sar. 2006). U Opštoj bolnici u Čupriji, prema podacima iz 2005/2006. godine MRSA je bio zastupljen sa 57,4% (Petrović Jeremic 2009). Prema izveštaju o rezistenciji invazivnih izolata bakterija na antimikrobna sredstva referentne laboratorije za praćenje rezistencije bakterija na antimikrobne lekove Instituta za javno zdravlje Vojvodine, koji je obuhvatio period od 01.07.2012-30.06.2013, Srbija se nalazila među evropskim zemljama sa najvišim procentom rezistentnih izolata za mnoge vrste bakterija, pa, i za *S. aureus* čija je rezistencija na meticilin u proseku bila prisutna kod 46,7% izolata (65,3% u Kliničkom centru Srbije, 60% u Kliničkom centru Kragujevac, 50% na Univerzitetnoj Dečijoj klinici u Beogradu, 18,4% u Institutu za javno zdravlje Vojvodine).

Ćirković i sar. (Cirkovic i sar. 2013) navode slične podatke: u prvoj polovini 2008. godine učestalost MRSA u Srbiji, u zavisnosti od bolnice, kretala se od 0,6%-78,3%. I u drugim zemljama zabeležene su varijacije u prisustvu MRSA među bolnicama: najviše u Nemačkoj (17%), najmanje u Sloveniji (3%) (Tiemersma i sar. 2004). Velike su varijacije u prevalenci MRSA u različitim evropskim zemljama: prema podacima EARSS-a (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) sakupljenim od 2004-2010.godine, udeo MRSA se kretao od manje od 1% u skandinavskim zemljama i Holandiji, do više od 50% u Španiji (Budimir i sar. 2012). Infekcijama izazvanim MRSA izolatima pripisuje se oko 5400 dodatnih smrti i 1 050 000 dana hospitalizacije više, pa je smanjenje broja MRSA infekcija jedan od glavnih prioriteta zdravstvenog sistema u svakoj zemlji, što je dovelo do velikog preokreta u MRSA epidemiologiji: prema podacima iz EARSNet-a (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) značajan pad procenta MRSA-bakterijemija je uočen u sledećim zemljama: Austriji, Poljskoj, Latviji, Rumunij, Italiji, Francuskoj i Velikoj Britaniji (Budimir i sar. 2012). Koliko striktno pridržavanje mera za suzbijanje i kontrolu infekcija u bolnicama, kao i kontrolisano propisivanje antibiotika može biti delotvorno, govori podatak da je procenat MRSA bakterijemija u Danskoj sa

20% krajem 60-ih godina, pao na manje od 1% krajem 80-ih i 90-ih godina prošlog veka (Faria i sar. 2005).

U Hrvatskoj je 2001. godine prevalenca MRSA izolata iz hemokultura i likvora iznosila 32%. Posle 2008. godine nastupio je pad procenta invazivnih izolata MRSA, koji se nastavio i u 2010. i 2011. godini kada je iznosio 14% (Budimir i sar. 2012). Nasuprot tome, u Kliničkom centru Srbije je u periodu 2008-2010. godine zabeležen porast MRSA iz hemokultura (Mioljević i sar. 2011).

Istraživanja su pokazala da je kolonizacija pacijenata sojevima MRSA, koja je bila prisutna kod prijema u bolnicu, faktor rizika za kasniji nastanak kliničke infekcije ovim patogenom. Rizik od kliničke infekcije kod MRSA kliconoša se kreće od 8,5% do 33% (Bolm i sar. 2013). U jednoj singapurskoj bolnici je ustanovljeno da pacijenti kolonizovani sojevima MRSA 10,2 puta češće umiru tokom hospitalizacije; 4,6 puta duže ostaju u bolnici, a troškovi njihovog lečenja su 4 puta veći (Bolm i sar. 2013).

*S. aureus*, kao i MRSA, najčešće kolonizuje sluzokožu nosa, kako bolesnika i zdravstvenih radnika u bolničkoj sredini, tako i zdravih ljudi u opštoj populaciji. Zastupljenost kliconoštva bakterijom *S. aureus* u ovom radu iznosila je 2,58%, što ne odstupa značajno od vrednosti dobijenih sličnim istraživanjima u našoj zemlji, koje se kreću od 2 do nešto više od 5% (Dinić i sar. 2013; Obradović i sar. 2009). U svetu je prevalenca stafilokoknog kliconoštva raznolika među zdravim ljudima i varira u zavisnosti od geografskog područja, godina ispitivanja, kao i ispitivane populacije: kreće se od 6,3% (Pathak i sar. 2010), do preko 12% (Sharma i sar. 2014), pa čak i više od 50% (Chatterjee i sar. 2009). Među kliconošama, takođe vrlo različit je i procenat nosilaca MRSA: u ovom istraživanju MRSA je bio zabeležen u 3,8% od ukupno 1362 kliconoše (52/1362), dok je taj procenat u odnosu na ukupni broj ispitanika od 52919 iznosio 0,01%. Posle sličnih ispitivanja u našoj zemlji, objavljeni su sledeći podaci: u Beogradu je 2008. godine, među zdravim, zaposlenim ljudima MRSA bio zastupljen sa 0,2%, a među zdravim, zaposlenim kliconošama sa 3,68% (Obradović i sar. 2009). Prema podacima

iz 2007. godine učestalost MRSA među studentima Medicinskog fakulteta iznosila je 0,37% (Ćirković i sar. 2013), a među zdravstvenim radnicima Kliničkog centra Srbije 5,7% (Ćirković i sar. 2014). Podaci iz Niša, iz 2012. godine, su, kada se upoređuje zastupljenost MRSA u zdravoj populaciji vrlo slični: prevalenca MRSA među zdravim ljudima iznosila je 0,21%, ali je među kliconošama bila veća: 8,96% (Dinić i sar. 2013).

Istraživanjem zastupljenosti MRSA u zdravoj populaciji i među kliconošama u različitim zemljama dobijeni su različiti podaci. U Hrvatskoj je 2011. godine zabeleženo samo 0,012% MRSA kliconoša kod zdravih ljudi različitog životnog doba (Budimir i sar. 2012). Procenat MRSA među studentima Medicinskog fakulteta u Japanu iznosila je 0% (Higuchi i sar. 2007), u Francuskoj 0.8% (Berthelot i sar. 2004), u SAD 1,53% (Bischoff i sar. 2004), u Turskoj 10% (Guclu i sar.2007), a u Indiji 5% (Chatterjee i sar. 2009).

Kolonizacija sojevima MRSA u opštoj populaciji u svetu, prema podacima iz 2005. godine, kretala se u rasponu od 0 do 9,2% (Chatterjee i sar. 2009). Zabeležene razlike u zastupljenosti broja zdravih ljudi kolonizovanih MRSA uzrokovane su brojnim razlozima: različitom prokuženošću ovim patogenom u različitim delovima sveta, različitom populacijom koja je obuhvaćena ispitivanjem, različitim trajanjem ispitivanja, kao i razlikama u metodologiji izolovanja i identifikovanja meticilin rezistentnog *S. aureus*.

Za sve izolate *S. aureus* u ovom radu određen je MIK cefoksitina pomoću E testa. Najzastupljenija vrednost MIK-a u obe ispitivane grupe bila je i najveća vrednost: 54% bolničkih i čak 38% vanbolničkih izolata MRSA imalo je MIK  $\geq 256\mu\text{g/ml}$ . Najniža vrednost MIK-a od  $8\mu\text{g/ml}$  bila je, očekivano, značajno manje zastupljena među bolničkim MRSA izolatima (2%) u odnosu na MRSA izolate iz opšte populacije (8%).

Osim po osetljivosti na beta-laktamske antibiotike, MRSA izolati iz vanbolničke sredine su se od onih koji potiču iz bolnice razlikovali i po osetljivosti na druge grupe antibiotika. U istraživanju koje je od 2004-2006. godine sprovedeno u Opštoj bolnici u Čupriji, zabeleženo je da su ambulantni

MRSA izolati u odnosu na bolničke u značajno većem procentu bili osetljivi na antibiotike iz MLS grupe: eritromocin i klindamicin, kao i na aminoglikozidni antibiotik gentamicin, a kada je reč o osetljivosti na hinolone, sulfonamide i fusidinsku kiselinu, razlike u osetljivosti između ove dve ispitivane grupe nije bilo (Petrović Jeremić 2008). Prema podacima iz ovog rada koji se odnose na isto okruženje 6 godina kasnije, između izolatima MRSA poreklom od zdravih ljudi i MRSA iz bolničke sredine nije bilo značajne razlike u rezistenciji prema eritromicinu (58% prema 60%), klindamicinu (58% prema 58%), gentamicinu (54% prema 58%), amikacinu (22% prema 36%), tetraciklinu (52% prema 56%) i fusidinskoj kiselini (8% prema 12%). MRSA izolovani iz pacijenata su značajno češće bili rezistentni na ciprofloksacin u odnosu na MRSA poreklom od zdravih kliconoša (62% prema 30%), kao i na SXT (32% prema 12%). Mogući razlog ovakvih rezultata je to, što se kliničar, dok čeka antibiogram, najčešće odluči za antibiotik iz grupe fluorohinolona kao što je ciprofloksacin, iako je poznato da na ove antibiotike mikroorganizmi mogu razviti rezistenciju u toku terapije. Uočava se porast rezistencije na makrolidne antibiotike i gentamicin u grupi vanbolničkih, i na ciprofloksacin u grupi bolničkih izolata MRSA, ali i veći procenat rezistentnih sojeva na sve antibiotike u obe ispitivane grupe u odnosu na prethodni period (2004-2006), i to je činjenica koja treba da nas zabrine.

Budući da stafilokno nazalno kliconoštvo predstavlja mogući izvor infekcije ovim mikroorganizmom, rezultate ispitivanja njegove osetljivosti na druge antibiotike treba uzeti u obzir pre započinjanja empirijske terapije, a svaka bolnica kao i lokalno područje bi trebalo da ima neku vrstu lokalnog priručnika-vodiča kroz rezistenciju.

U poređenju sa ispitivanjem osetljivosti na ne-beta-laktamske antibiotike MRSA izolovanih od zdravih ljudi i školske dece, koje su objavili Dinić i sar. 2013. godine (47,16% MRSA je rezistentno na eritromicin, 34,1% na klindamicin, 17,7% na gentamicin, 17,7% na SXT, 28,4% na tetraciklin, 3,2% na fusidinsku kiselinu) (Obradović i sar. 2009), u Pomoravskom okrugu

cirkulišu sojevi MRSA koji pokazuju veći nivo rezistencije na druge grupe antibiotika, tj. sojevi koje je teže lečiti. U prilog ovoj tvrdnji ide podatak da je 40% MRSA izolovanih iz zdravih ljudi multirezistentno tj, rezistentno na više od 3 antibiotika. Mogući razlog tome je nekontrolisana i nepravilna upotreba antibiotika i samomedikacija. Osim toga, dominantan SCC*mec* tip među našim izolatima iz vanbolničke sredine je tip V, zastupljen sa 54% (27/50) u odnosu na SCC*mec* tip IV (26%) (13/50) koji je karakterističan po retkoj pojavi multirezistencije na antibiotike (108). Neki američki autori, upravo sojevima MRSA koji nose SCC*mec* tip IV, pripisuju čak smanjenje multiple rezistencije u bolnicama u kojima se on pojavljuje kao uzročnik infekcije (Sun i sar. 2013).

U drugim delovima sveta, osetljivost vanbolničkih MRSA na druge klase antibiotika je različita: skrining zdravih MRSA kliconoša u Delhiju je pokazao u 60% izolata rezistenciju na gentamicin, u 40% na amikacin, a u čak 70% na ciprofloksacin (Sharma i sar. 2014), dok je među studentima kolonizovanim MRSA u Kini, rezistencija na eritromicin iznosila 90,2%, na tetraciklin 93,5%, na gentamicin 13,6%, a na SXT samo 9,1% (Sun i sar. 2013). Nasuprot ovim, u SAD rezultati su sledeći: MRSA izolovani među zdravom školskom decom pokazuju rezistenciju prema klindamicinu u 9,2%, prema tetraciklinu u 5,6%, prema SXT u 1,4%, ali prema fluorohinolonskom antibiotiku levofloksacinu 40,1% (Shapiro i sar. 2009).

Često i nekritično propisivanje sistemskih antibiotika je predispozicija za nastanak sve zastupljenije antibiotske rezistencije u bolnicama, pa je tako i pojava i širenje multirezistentnih MRSA sojeva veliki izazov u kontroli bolničke infekcije. Rezultati testiranja bolničkih MRSA u ovom radu zabrinjavaju, pre svega, zbog izrazite multirezistencije (52%), kao i činjenice da je MRSA u velikom procentu rezistentan na najčešće raspoložive antibiotike, fluorohinolone, na primer, kojima se najčešće pribegava u izboru empirijske terapije (62%). Prema izveštaju o rezistenciji invazivnih izolata bakterija na antimikrobna sredstva referentne laboratorije za praćenje rezistencije bakterija na antimikrobne lekove Instituta za javno zdravlje

Vojvodine (2012-2013), 41% bolničkih MRSA izolata u Srbiji ispoljava rezistenciju na ciprofloksacin. Visok procenat rezistencije na ovaj antibiotik od čak 80-95% pokazuju, prema podacima iz 2002.godine, i bolnički sojevi MRSA u Japanu (Yamaguchi i Ohno 2005) ili u SAD-u gde se kretao oko 35% (Hoban i sar. 2003). U turskim bolnicama gde je MRSA tokom 2002. godine bio zastupljen sa 16-59%, zabeležen je visok stepen rezistencije na ne-beta-laktamske antibiotike: 88,1% na fluorohinolone, 60-70% na makrolide, čak 90,1% na gentamicin. Nizak stepen rezistencije, turski MRSA izolati pokazali su, kao i kod nas, na SXT (29,9%) (Savas i sar. 2005). Ispitivanje prevalence i profila rezistencije MRSA u Indiji 2008. godine, pokazalo je da je između 40% i 50% bolničkih sojeva rezistentno na eritromicin i gentamicin, a manje od 30% na ciprofloksacin i amikacin (Pai i sar. 2010), a u isto vreme, slično ispitivanje u Kini, da je oko 88% MRSA u bolnici rezistentno na klindamicin, 97,2% na eritromicin, 91,6% na gentamicin, ali samo 10,3% na SXT (Sun i sar. 2013).

Nasuprot tome, u pojedinim bolnicama zabeleženo je smanjenje rezistencije MRSA izolata na pojedine antibiotike. U nekoliko francuskih bolnica posle petogodišnjeg, kontrolisanog, smanjenog propisivanja aminoglikozida, došlo je do povećanog procenta gentamicin senzitivnih MRSA (GS-MRSA) sojeva sa 46,8% na 94,4%, iako se ova pojava ne može objasniti samo smanjenom upotrebom aminoglikozidnih antibiotika. Ipak, porast GS-MRSA i smanjenje GR-MRSA (gentamicin rezistentni MRSA) sojeva pruža priliku za kontrolisano ponovno uvođenje aminoglikozida u terapiju MRSA infekcije i manje oslanjanje na glikopeptidne antibiotike (Lelièvre i sar. 1999).

U literaturi nailazimo na preporuku "oživljavanja,, starijih antibiotika: SXT, fusidinske kiseline i tetraciklina u terapiji vanbolničkih MRSA infekcija (Sabol 2006), ali i težih, bolničkih, kao što je endokarditis, kada se preporučuje intravenska primena sulfometoksazol-trimetoprima (Abrahamian i sar. 2007). Rezultati iz ovog rada idu u prilog ovakvim preporukama.

Klindamicin je sa uspehom korišćen u terapiji infekcija mekih tkiva i kostiju, ali i upale pluća, kod odraslih i kod dece. Predstavljao je dobar izbor za



početnu, empirijsku terapiju kako zbog efikasnosti, tako i zbog mogućnosti oralne i parenteralne primene. Ipak, zabrinutost zbog moguće pojave rezistencije na klindamicin u toku terapije, obeshrabrila je kliničare da propisuju ovaj lek. Upotreba ovog antibiotika, kada je već dokazana rezistencija na eritromicin, može dovesti do indukcije unakrsne rezistencije među antibioticima iz grupe makrolida, linkozamida i streptogramina (MLS grupa) (Bueno i sar. 2005): prilikom standardnog testiranja osetljivosti, eritromicin rezistentan MRSA može imati zonu inhibicije oko klindamicina na osnovu koje ćemo zaključiti da je (lažno) osetljiv na ovaj lek. Jednostavan laboratorijski test (D test) pomaže otkrivanje inducibilne rezistencije MRSA i sprečava terapijski neuspeh (Lewis i Jorgenssen 2005). Prema dobijenim podacima, u ovom radu fenomen inducibilne rezistencije nešto je češći među bolničkim MRSA gde je zastupljen sa 16% u odnosu na MRSA sojeve iz zdravih ljudi gde se nalazi u 10%. Stopa inducibilne rezistencije kod MRSA je različita širom sveta: u Americi se javlja u 75% bolničkih MRSA naspram 20% vanbolničkih (Patel i sar. 2006), u Indiji, je taj odnos 40,9% prema 23,3% (Lall i sar. 2014).

Iako je od početka poznat kao nozokomijalni patogen, MRSA je danas sve češći uzročnik i vanbolničkih infekcija. Posebno zabrinjavaju izveštaji da su CA-MRSA sve prisutniji u bolnicama (Seybold i sar. 2006), gde u nekim delovima sveta postaju dominantni uzročnici bolničkih infekcija (Hetem i sar. 2012). CA-MRSA „ulazi“ u bolnicu, uglavnom, sa kliconošama koji treba da se hospitalizuju, ili sa zdravstvenim radnicima (Popovich i sar. 2008). Sve je teže razlikovati CA-MRSA i HA-MRSA na osnovu epidemioloških kriterijuma, pa je mogućnost pogrešne klasifikacije sve realnija. CA-MRSA se od HA-MRSA mogu danas sa sigurnošću razlikovati samo primenom molekularnih metoda, kao što su elektroforeza u pulsirajućem polju (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE), tipizacija na osnovu sekvence više lokusa (multilocus sequence typing, MLST), SCC*mec* tipizacija, sekvenciranje

ponavljajućih regiona proteina A *S. aureus* (*spa* tipizacija), ili na osnovu prisustva PVL gena.

U ovom radu za molekularnu karakterizaciju MRSA primenjena je *SCCmec* tipizacija i detekcija PVL gena. *SCCmec* tipizacija je pokazala da su MRSA izolati iz bolničkih materijala u čak 76% (38/50) sadržali *SCCmec* karakterističan za CA-MRSA: od ukupno 50 MRSA izolata iz hospitalizovanih pacijenata, kod 3 (6%) je bio prisutan *SCCmec* tip IV, a kod 35 (70%) *SCCmec* tip V. Samo 24% bolničkih izolata je imalo *SCCmec* tipove I, II ili III, karakteristične za HA-MRSA. Istraživanje rađeno nekoliko godina ranije (2008) u Kliničkom centru Srbije pokazalo je sasvim drugačije rezultate: dominantan genotip MRSA među bolesnicima bio je MRSA *SCCmec* tip I (86,9%) (Ćirković i sar. 2015). I među MRSA izolovanim od zdravih kliconoša nađeni su različiti genotipovi: *SCCmec* tipovi I, II ili III bili su prisutni kod 8 (16%) od ukupno 50 izolata, ali većina ovih izolata, 80% (40/50) imala je *SCCmec* tipove IV ili V koji su karakteristični za CA-MRSA.

Između MRSA izolovanih iz zdravih ljudi i iz bolnice nije bilo statistički značajne razlike u zastupljenosti *SCCmec* IV i V: među izolatima iz bolnice tipovi IV i V su bili zastupljeni sa 76%, nasuprot 80% koliko ih je otkriveno kod stafilokoka poreklom od zdravih ljudi. Kod zdravih ljudi, tip V je bio dva puta češći (54%) u odnosu na tip IV (26%), što je, možda, razlog neobično visokoj rezistenciji na veći broj antibiotika među CA-MRSA izolatima u ovom radu. Naime, poznato je da MRSA *SCCmecV*, u poređenju sa drugim CA-MRSA sojevima, nose brojne faktore virulencije, pa, i veći broj gena povezanih sa rezistencijom na antibiotike.

Istraživanja koja dolaze iz drugih delova sveta donose slične rezultate: u Grčkoj je dvogodišnje istraživanje (2005-2007) pokazalo da je oko 40% bolničkih infekcija uzrokovano CA-MRSA sojevima, a *SCCmec* tipizacijom pokazano je da oni sadrže tip IV ovog genetičkog elementa (Skov i Jensen

2009). U Danskoj postoje indirektni dokazi da je čak 72% infekcija u bolnici uzrokovano sojevima koji nose *SCCmec* tip IV ili *SCCmec* koji ne pripada tipovima I-VI (neobjavljeni podaci) (Skov i Jensen 2009). Prema podacima iz 2012. godine, u Irskoj su MRSA *SCCmec* IV i IVa gotovo u potpunosti zamenili mesta sa MRSA *SCCmec* II i III kao uzročnicima bolničkih infekcija (Brennan i sar. 2012).

Da bi ispitali da li su *SCCmec* IV i prisustvo PVL gena nedvosmisleni markeri vanbolničkih MRSA, švajcarski epidemiolozi sa Univerzitetske bolnice u Bazelu su 4 godine analizirali MRSA isolate iz ove ustanove, i zaključili da su *SCCmec* tip IV i IVa najzastupljeniji i prisutni i kod bolničkih i kod vanbolničkih MRSA izolata, što ograničava njegovu upotrebu kao markera za CA-MRSA (Stranden i sar. 2009).

Najupadljivija promena opisana je u SAD gde se oko 2000. godine kao važan uzročnik vanbolničkih infekcija pojavio CA-MRSA (*SCCmec* IV - poznat kao USA300), da bi kroz 3-4 godine postao vodeći uzročnik bolničkih infekcija (Otter i French 2006; Nimmo i sar. 2006). U jednoj čikaškoj bolnici je utvrđeno da je kroz sedmogodišnji period procenat pozitivnih hemokultura iz kojih je izolovan CA-MRSA porastao sa 24% na 49% (Patel i sar. 2007). Koliko je definicija bolničkih MRSA postala nejasna govori i podatak iz 2013. godine, objavljen posle jednogodišnjeg ispitivanja bolničkih infekcija uzrokovanih MRSA u Kini, kada je utvrđeno da je gotovo petina bolničkih izolata MRSA nosila *SCCmec* tipove V (13,1%) i IV (5,6%) (Sun i sar. 2013). Samo 5 klonalnih kompleksa MRSA (određenih MLST metodom) cirkuliše bolnicama širom sveta (Gomes i sar. 2006). Retrospektivna studija je pokazala da MSSA iz 1960. godine pripadaju istim klonalnim kompleksima kao MRSA koje danas cirkulišu i izazivaju epidemije. To je ukazalo da su se MSSA linije već sadržale gene koji su ih činili superiornima u izazivanju infekcija i epidemija u odnosu na druge klonalne komplekse, i pre nego što su stekli gene za rezistenciju na meticilin. Najzastupljeniji klonovi koji kruže u vanbolničkoj sredini su ST1 i ST8, uglavnom u SAD i Kanadi, ST80 u Evropi, ST59 u Aziji i Australiji i ST30 u SAD, Evropi, zapadnom Pacifiku,

Japanu i drugim državama širom sveta. Balkan je označen kao rezervoar za klon ST152 (“Balkanski klon”) koji je izolovan kod imigranata iz bivše Jugoslavije (Ćirković i sar. 2013.). U Srbiji je dokazano prisustvo ST80 i ST152, ali oni nisu bili dominantni (Ćirković i sar. 2013).

Uprkos brojnim mikrobiološkim i epidemiološkim karakteristikama, nijedna nije dovoljno specifična da jasno definiše CA-MRSA, što pravi sve veći problem i dovodi u zabludu obzirom na rastući broj CA-MRSA infekcija (Petrović Jeremić 2008; Sun i sar. 2013). Definisanje CA-MRSA se dodatno komplikuje prirodom stafilkoknog/MRSA kliconoštva. Ovaj patogen može ulaziti u bolnicu tokom dužeg perioda, a da ne dovede do infekcije, što znači da se MRSA stečena u vanbolničkoj sredini “tiho” unosi u bolnicu, uzrokuje infekciju koja se klasifikuje kao bolnička, i obrnuto (Otter i French 2006).

Smatra se da zloupotreba antibiotika (nekritično propisivanje, loša komplijansa, samomedikacija) u terapiji bolničkih, ali i ambulantnih infekcija dovodi do selekcije multirezistentnih stafilokoka koje, uglavnom, zdravstveni radnici- kliconoše prenose i u bolnicu, i izvan nje, pa je zbog “mešanja” bolničkih i vanbolničkih meticilin rezistentnih stafilokoka i njihovog otežanog razlikovanja teško definisati tipičnog pacijenta sa rizikom od MRSA infekcije (Skov i Jensen 2009; Manian i Griesnauer 2008).

Karakteristika koja se često veže za MRSA je i prisustvo PVL. Svi MRSA izolati u ovom radu su PCR metodom ispitani na prisustvo *lukS-PV* i *lukF-PV* gena koji kodiraju sintezu PVL. PVL geni su detektovani u samo 2 izolata (4%), oba iz zdravih osoba. Jedan PVL pozitivan MRSA sadržao je *SCCmec* tip IV, a drugi *SCCmec* tip V. Prevalenca PVL pozitivnih MRSA među kliconošama u Pomoravskom okrugu je niska, a ovaj rezultat je u skladu sa drugim ispitivanjima u našoj zemlji. Među MRSA izolatima iz hospitalizovanih pacijenata nije bilo PVL pozitivnih izolata.

Ćirković i saradnici su objavili podatak da je 2013. godine u Srbiji bilo prisutno 2,5% PVL pozitivnih CA-MRSA izolata (Ćirković i sar. 2013), a isti autori su na osnovu istraživanja u studentskoj populaciji iz 2007. godine

(studenti Medicinskog fakulteta u Beogradu), detektovali PVL pozitivne MRSA u 0,37% ispitanih (Ćirković i sar. 2013).

U Hrvatskoj je među CA-MRSA izolatima procenat PVL pozitivnih sojeva u jednom ispitivanju iznosio 3,9% (Budimir i sar. 2014). U Austriji se ovaj procenat kretao između 3 i 7% (Krizwanek i sar. 2007), dok je u Portugalu među zdravom decom kolonizovanom MRSA, PVL gen otkriven kod samo 1% (Gouveia i sar. 2013). U Kanadi je zabeleženo manje od 5% PVL pozitivnih CA-MRSA (Zhang i sar. 2008), nasuprot Kine, gde ih je u zdravoj populaciji studenata otkriveno 45,5% (Sun i sar. 2013). Koliko je prisustvo PVL među CA-MRSA izolatima varijabilna karakteristika vidi se iz podataka da se prevalenca PVL u Danskoj kretala od 17-100% (Dinić i sar. 2013), kao i u zaključku jednog od istraživanja na drugom kraju sveta, Japanu, da u vanbolničkoj populaciji pretežno kruži PVL negativan soj koji nosi SCC*mec* tip II i koji bi mogao biti neki novi japanski domaći klon (Kikuta i sar. 2011). Među MRSA izolovanim iz pacijenata u ovom radu nije bilo PVL pozitivnih, iako je većina bolničkih sojeva (38/50) imala genotip CA-MRSA, a samo među njima su nosila SCC*mec* tip IV, koji se tradicionalno povezuje sa prisustvom PVL gena.

Generalno, smatra se da je prisustvo *luk-S* i *luk-F* gena koji kodiraju sintezu PVL proteina, karakteristika koja se najčešće povezuje sa CA-MRSA, čijim je genetskim markerom smatraju neki autori. Uloga PVL u patogenezi invazivnih stafilokoknih infekcija je kontroverzna, ali, po nekim autorima, ona može zavistiti od mesta infekcije: posebno tešku kliničku sliku imaju infekcije pluća i kostiju, koje su izazvane PVL pozitivnim MRSA sojevima (Ritz i Curtis 2012).

Učestalost PVL pozitivnih bolničkih izolata MRSA je različita u različitim delovima sveta: prema nekim autorima, u Engleskoj ona je iznosila samo 0,8% (Renwick i sar. 2008). Kanadski autori su 2006. godine objavili rad o PCR-u kao metodi za istovremeno i brzo dokazivanje *mecA* gena i *luk-F* i *luk-S* gena, kada su utvrdili da je oko 25% kliničkih izolata MRSA bilo PVL pozitivno (McClure i sar. 2006). U Kini se procenat PVL pozitivnih MRSA

izolata iz bolnica kreće od 14,9-17,8% (Zhang i sar. 2008; Sun i sar. 2013). Istraživanje u Univerzitetskoj bolnici u Tajvanu iz 2005. godine obuhvatalo je i hospitalizovane i ambulantne pacijente kod kojih je otkriveno čak 23,3% PVL pozitivnih MRSA izolata. Većina njih (95,2%) pripadala je SCC*mec* tipu V (Takano i sar. 2007).

Visoka prevalenca CA-MRSA i visoki procenat rezistencije na druge grupe antistafilokoknih antibiotika, koji su nađen u ovom radu kako među bolničkim, tako i među vanbolničkim izolatima MRSA, ukazuju da je ovaj patogen prisutan u regionu Pomoravlje već više godina. CA-MRSA se prilagodio na bolničku sredinu, stekao gene za rezistenciju na više antibiotika, a da mu se pri tome nije smanjila adaptivna vrednost, i postao je duplo češći u bolnicama nego HA-MRSA. Procenat multirezistentnih izolata je sličan za oba tipa MRSA (CA- i HA-) bez obzira da li su izolovani iz hospitalizovanih pacijenata ili iz zdravih ljudi, što ukazuje da selektivni pritisak antibiotika ima vodeću ulogu u održavanju rezistencije i multirezistencije. MRSA SCC*mec* tip V je najčešći genotip, time i najuspešniji klon. Njegova učestalost od 70% u bolnicama u odnosu na 54% u vanbolničkoj sredini ovog regiona, može ukazivati na klonalno širenje barem u nekim odeljenjima bolnica. Jedan od najvažnijih spoljašnjih faktora koji utiču na klonalno širenje može biti neadekvatna primena higijenskih mera.

Do smanjenja incidence infekcija uzrokovanih sojevima MRSA može doći samo primenom mera za kontrolu njihovog širenja, kako u bolničkoj, tako i u vanbolničkoj sredini. A ove mere mogu biti efikasne samo ako im prethodi brza detekcija rezistencije i gena za virulenciju, kao i brza tipizacija MRSA primenom molekularnih metoda.

## **ZAKLJUČAK**

1. Primenom klasičnih i molekularnih metoda za identifikaciju MRSA pokazano je da kod svih izolata kod kojih je rezistencija na meticilin dokazana DD metodom, potvrđena je i primenom E testa za cefoksitin, hrom agara za MRSA, testa za produkciju PBP2a (Slidex MRSA Detection) i PCR detekcije *mecA* gena.

2. Učestalost MRSA među izolatima *S. aureus* iz pacijenata ćuprijske bolnice iznosila je 45,8%, dok je među zdravim ljudima učestalost bila 3,8%.

3. Osim na beta-laktame, izolati MRSA bili su rezistentni i na druge grupe antibiotika. Statistički značajna razlika postojala je samo kod dva antibiotika: na ciprofloksacin je bilo rezistentno 62% izolata iz pacijenata i 30% iz zdravih ljudi, a na STX/T 32% iz pacijenata i 12% iz zdravih ljudi.

4. Svi MRSA izolati iz hospitalizovanih pacijenata bili su rezistentni na barem jedan ne beta-laktamski antibiotik, a 52% izolata je bilo multirezistentno.

Kod MRSA izolovanih iz zdravih ljudi, 16% izolata je bilo osetljivo na sve ne beta-laktamske antibiotike, a 40% izolata multirezistentno.

5. SCC*mec* tipizacijom pokazano je da su kod MRSA izolata iz hospitalizovanih pacijenata, SCC*mec* tipovi karakteristični za HA-MRSA bili prisutni kod 12 (24%) izolata, a preostalih 38 (76%) izolata sadržali su

SCC*mec* tipove karakteristične za CA-MRSA: tri (6%) izolata tip IV i 35 (70%) izolata tip V.

Kod MRSA izolovanih iz zdravih ljudi CA-MRSA genotipovi su nađeni kod 40 (80%) izolata, što ukazuje da su oni podjednako bili zastupljeni i u bolničkoj i u vanbolničkoj sredini.

6. Najzastupljeniji genotip, a time i najuspešniji klon, bio je CA-MRSA SCC*mec* tip V. Njegova veća prevalenca među hospitalizovanim pacijentima u odnosu na zdrave osobe (70% prema 54%) može da ukaže na intrahospitalno prenošenje na barem nekim odeljenjima bolnice.

7. Zastupljenost multirezistentnih izolata kod HA-MRSA i CA-MRSA bila je sledeća:

U grupi hospitalizovanih pacijenata 50% genotipski potvrđenih HA-MRSA izolata i 53% CA-MRSA izolata bili su multirezistentni.

U grupi zdravih ljudi, isti procenat (37,5%) multirezistentnih sojeva je bilo i kod HA-MRSA i kod CA-MRSA.

Slična zastupljenost HA- i CA-MRSA genotipova u određenom okruženju ukazuje da je selektivni pritisak antibiotika vodeći faktor koji dovodi do rezistencije na antibiotike.

Svih osam izolata osetljivih na sve ne beta-laktamske antibiotike sadržali su SCC*mec* tipove karakteristične za CA-MRSA.

8. Geni za PVL su detektovani kod samo dva (4%) izolata iz zdravih ljudi i oba su sadržala SCC*mec* tipove karakteristične za CA-MRSA.

9. Visoka prevalenca CA-MRSA i visok nivo rezistencije kod izolata MRSA iz bolnice i iz zdravih ljudi, ukazuje da je ovaj patogen prisutan u regionu Pomoravlje već više godina.



## REFERENCE

*Abrahamian FM, Moran GJ.* MRSA infections. *N Engl J Med* 2007; 357(20): 2090

*Adem PV, Montgomery CP, Husain AN, Koogler TK, Arandjelovich V, Humilier M, et al.* *Staphylococcus aureus* sepsis and the Waterhouse-Friderichsen syndrome in children. *N Engl J Med* 2005; 353: 1245–45.

*Adhikari RP, Arvidson S, Novick RP.* A nonsense mutation in *agrA* accounts for the defect in *agr* expression and the avirulence of *Staphylococcus aureus* 8325-4 *traP::kan*. *Infect Immun* 2007; 75: 4534-40.

*Agota A.* Alexandar Ogston and the Army Medical Services formation in the Royal American Army medical corps 1 July 1898 . *Scot Med J* 1998; 43(5): 156-7.

*Archer GL, Niemeyer DM, Thanassi JA, Pucci MJ.* Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin-resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 447-54.

*Bartels MD, Boye K, Rhod Larsen A, Skov RHW.* Rapid increase of genetically diverse methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Copenhagen, Denmark. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 1533-40.

*Bazer V, Coombs G, Slickers P, Yiegler A and Ehricht R.* Bengal Bay Clone. *Clin Microbiol* 2012 Mar; 50(3): 841–7.

*Berger-Bachi B, Rohrer S.* Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol* 2002; 178: 165-71.

Bergey-s Manual of determinative Bacteriology 9-th ed. (Bergey, Williams, Kreig, Smith, Holth ) The Williams & Wilkins Co. Baltimore, 1994.

*Berthelot P, Grattard F, Fascia P, Martin I, Mallaval FO, Ros A, et al.* Is nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* more prevalent among student healthcare workers? *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25: 364-5.

*Bischoff WE, Wallis ML, Tucker KB, Reboussin BA, Sherertz RJ.* *Staphylococcus aureus* nasal carriage in a student community: prevalence, clonal relationships, and risk factors. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25: 485-91.

*Blackstok R, Hayde R, Kelly F.* Inhibition of Fibrinogen Reaction by Polysaccharide of Encapsulated *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1968; 96: 799-803.

*Blot S, Vandewoude K, Colardyn F.* *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 1998; 339(27):2025-6; discussion 2026-7.

*Bolm M, Lover A, Salmon S, Tambyjah P, Fisher D.* Progression from MRSA colonization to infections. *BMC Infect Dis* 2013; 13: 491-7.

*Boye K, Bartels MD, Andersen IS, Moller JA, Westh H.* A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec types I-V. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:725-7.

*Brennan G, Shore A, Corcoran S, Tecklenberg S, Coleman D, O Connel B.* Emergence of Hospital and Community-Associated Panton Valentine Leukocidin-Positive Methicillin resistant *S.aureus* Genotype STT772-MRSA-V in Ireland and detailed investigation of an STT772-MRSA-V cluster in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 2012; 50(3): 841-7.

*Brown DF.* Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci. *Antimicrob Chemother* 2001; 48(Suppl 1): 65-70.

*Bubeck Wardenburg J, Bae T, Otto M, Deleo FR, Schneewind O.* Poring over pores:  $\alpha$ -hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nat Med* 2007; 13: 1405-6.

*Bubeck Wardenburg J, Patel RJ, Schneewind O.* Surface proteins and exotoxins are required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infect Immun* 2007; 75: 1040-4.

*Budimir A, Bošnjak Z, Kalenić S.* MRSA u Hrvatskoj. *Croatian Journal of Infection* 2012; 32(2): 59–66.

*Budimir A, Tićac B, Rukavina T, Farkaš M, Deurenberg R, Rijnders M, Kalenić S.* First report of PVL-positive SCCmec type V MRSA in Croatia. <https://bib.irb.hr/>

*Bukowski M, Wladyka B, Dubin G.* Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins* 2010; (2): 1148-65.

*Centers for Disease Control and Prevention.* Community associated MRSA information for clinicians. *Infection control topics*. [cited 2005 February 3]. Available from:[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar\\_mrsa\\_ca\\_clinicians.html](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_mrsa_ca_clinicians.html)

*Chambers H, DeLeo F.* Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7(9): 629-41.

*Chambers H.* Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews* 1997;10(6): 781–91.

*Chatterjee S, Ray P, Aggarwal A.* A community-based study on nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *Indian J Med Res* 2009; 6: 742-8.

*Chatterjee SS, Ray P, Agrawal A, Das A, Sharma M.* A community-based study on nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *Ind J Med Res* 2009; 130 (6):742-8.

Chavez-Bueno S, Bozdogan B, Katz K, Bowlware K, Cushion N, Cavuoti D, et al. Inducible Clindamycin resistance and molecular epidemiologic trends of pediatric CAMRSA in Dallas-Texas. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(6):2283-8.

Chuang Y-Y, Huang Y-C. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Asia. *Lancet Infect. Dis.* 2013; 13: 698-708.

Ćirković I, Stepanović S, Svabić Vlahović M, Djukić S, Larsen A.R. Genotypic and phenotypic characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Serbia. 23. ECCMID Berlin, Germany, 23-27 April, 2013.

Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved standard 11th ed. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.

Couto I, Wu SW, Tomasz A, Lencastre HD. Development of methicillin-resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of the *mecA* homologue native to the species. *J Bacteriol* 2003; 185: 645-53.

Ćirković I, Sørup M., Radenković D, Svabić-Vlahović M., Larsen AR. National surveillance reveals findings of Pantón-Valentine leukocidin positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Serbia. *J Med Microbiol* 2013;62: 342-4.

Ćirković I, Stepanović S., Skov R., Trajković, J, Grgurević A., Larsen AR. Carriage and genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among patients and healthcare workers in Serbian university hospital. *PLoS ONE* 2015;10: 1-11

Ćirković I, Đukić S, Vuković D, Stevanović G, Vlahović Švabić M, Stepanović S. Nazalno kliconoštvo MRSA kod studenata Medicinskog fakulteta u Beogradu. *Srp Arh Celok Lek* 2013; 141(5-6): 349-53.

Ćirković I, Đukić S, Carević B, Mazić N, Mioljević V, Stepanović S. MRSA nasal carriage among hospitalized patients and health workers in the Clinical center of Serbia. *Arch Biol Csi66* 2014; (1): 87-92.

D Committee de l antibiogramme de la societe francaise de micribiologie. Report 2003. <[http:// www.asm.asso.fr](http://www.asm.asso.fr)>

David M and Daum R. Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23 (3): 616-87.

Deurenberg RH, Stobbering EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 2008; 8: 747-63.

Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AC, Bruggeman CA, Stobberingh EE et al. The molecular evolution of MRSA. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(3): 222-35.

Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M. 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 (2 Suppl ): 114-32.

Diep BA, Chan L, Tattevin P, Kajikawa O, Martin TR, Basuino L et al. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *PNAS* 2010; 107: 5587-92.

*Diep BA, Otto M.* The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends Microbiol* 2008; 16: 361-9.

*Dinić M, Vuković S, Kocić B, Stanković Đorđević D, Bogdanović M.* Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* in Healthy Adults and in School Children. *Scientific Journal of the Faculty of Medicine in Niš* 2013; 30(1): 31-6.

*Donati L, Quadri P, Reiner M.* Reactivation of osteomyelitis caused by *Staphylococcus aureus* after 50 years. *J Am Geriatr Soc* 1999; 47(8): 1035–7.

*Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG.* The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 7687-92.

EUCAST. EUCAST definitive document. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Terminology. January, 1998.

*Faria N, Oliveira D, Westh H, Monnet D, Larsen AR, Skov R.* Epidemiology of Emerging Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a Nationwide Study in a Country with Low Prevalence of MRSA Infection. *J Clin Microbiol* 2005; 43(4): 1836-42.

*Forbes AB, Sahm FD, Wesselfeld SA.* Bailey and Scots Diagnostics Microbiology, 11-th edition. St.Louis; 2002, pp 1069.

*Fowler A, Mackay A.* Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pyomyositis in an intravenous drug user. *J Med Microbiol* 2006; 55: 123–5.

*Genestier A, Michallet M, Prevost, G, Bellot, G, Chalabreysse, Peyrol S et al. Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. J Clin Invest 2005; 115: 3117–27.*

*Gomes R, Westh H, de Lencastre H. Origins and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clonal lineages. 2006; Antimicrob. Agents. Chemother. 50: 3237-44.*

*Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. Clin Infect Dis 2008; 46: S350-9.*

*Gouveia K, Friães A, Cassiano-Neves M, Melo-Cristino J, Ramirez M. MRSA and PVL positive Staphylococcus aureus are rarely found in community-acquired osteoarticular infections in children in Portugal, a country with high MRSA Prevalence. Online Int J Microbiol Res 2013; 1(2): 20-24.*

*Guclu E, Yavuz T, Tokmak A, Behcet M, Karali E, Ozturk O, et al. Nasal carriage of pathogenic bacteria in medical students: effects of clinic exposure on prevalence and antibiotic susceptibility. Eur Arch Otorhinolaryngol 2007; 264: 85-8.*

*Hanssen AM, Kjeldsen G, Sollid JU. Local variants of Staphylococcal cassette chromosome mec in sporadic methicillin-resistant Staphylococcus aureus and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer ? Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 285-96.*

*Hetem D, Westh H, Boye K, Jarl v JO, Bonten M, Bootsma M.* Nosocomial transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Danish Hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2012; 4: 1-6.

*Higuchi W, Isobe H, Iwao Y, Dohmae S, Saito K, Takano T, et al.* Extensive multidrug resistance of coagulase-negative staphylococci in medical students. *J Infect Chemother.* 2007; 13: 63-6.

*Hiramatsu K, Kihara H, Yokota.* Analysis of borderline-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 1992; 36: 445-53.

*Huisjdens XW, VAN Dijke BJ, Spalburg E, VAN Santen-Verheuvcl MG, Heck MF et al.* Community acquired MRSA and pig farming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006; 5: 26.

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

*Hongo I, Baba T, Oishi K, Morimoto J, Ito T, Hiramitsu K.* Phenol-soluble modulins alpha 3 enhances the human neutrophil lysis mediated by Pantone-Valentine leukocidin. *J Infect Dis* 2009; 200: 715-23.

*Hooper DC.* Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 2000; 31 (Suppl 2): 24-28.

*Wilson WR.* Identification of aerobic and facultative anaerobic bacteria. In: Washington JA II (ed.), *Laboratory procedures in clinical microbiology*, New York; 1985: 31-250.



*Ito T, Ma X, Hiramatsu K.* Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(7): 2637-51.

*Jacobs A.* HA-MRSA: status and trends. *Radiol Technol* 2014; 85(6): 623-55.

*Jevons M P.* Celbenin- resistant staphylococci. *Br Med J* 1961; 1: 124–5.

*John JF, Grieshop LM, Atkins LM, Platt CG.* Widespread colonisation of personnel at a Veterans Affairs medical center by methicillin-resistant, coagulase-negative *Staphylococcus*. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 380-8.

*Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K.* Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1955-63.

*Kikuta H, Shibata M, Nakata S, Yamanaka T, Sakata H, Akizawa K, et al.* Predominant Dissemination of PVL-Negative CC89 MRSA with SCC*mec* Type II in Children with Impetigo in Japan. *Int J Pediatr* 2011; 1-8.

*Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S. et al.* Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA* 2007; 298: 1763-71.

*Kravitz GR, Dries DJ, Peterson ML, Schlievert PM.* Purpura fulminans due to *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 941–7.

*Krizwanek K, Luger C, Sammer B, Stumvoll S, Stammler M, Sagel U, et al.* PVL positive MRSA in Austria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26(12): 931-5.

*Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Boss M, Benito Y, et al.* *Staphylococcus aureus* Panton Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* 2007; 315: 1130-3.

*Lall M, Col L, Brig S.* Prevalence of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. *Med J Armed Forces India* 2014; 70(1): 43–7.

*Larsen AR, Bocher S, Stegger M, Goering R, Pallesen LV, Skov R.* Epidemiology of European community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal complex 80 type IV strains isolated in Denmark from 1993 to 2004. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 62-8.

*Lazarevic V, Beaume M, Corvaglia A, Hernandez D, Schrenzel J, François P.* Epidemiology and Virulence Insights From MRSA and MSSA Genome Analysis *Future Microbiol.* 2011; 6(5): 513-32.

*Lelièvre H, Lina G, Jones M, Olive C, Forey F, Roussel- Delvalez M, et al.* Emergence and Spread in French Hospitals of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with Increasing Susceptibility to Gentamicin and Other Antibiotics. *J Clin Microbiol* 1999; 37(11): 3452–7.

*Lewis J, Jorgensen J.* Inducible resistance in staphylococci: should clinicians and microbiologist be concerned ? *Clin Infect Dis* 2005; 40(7): 280-5.

Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis 1999; 29: 1128-32.

Liu GY. Molecular pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. Infect Pediatr Res 2009; 65: 71-7.

Loughman JA, Fritz SA, Storch GA, Hunstad DA. Virulence gene expression in human community-acquired *Staphylococcus aureus* infection. J Infect Dis 2009; 199: 294-301.

Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest 2003; 111: 1265-73.

Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 1998; 339(8): 520-32.

Ma XX, Galiana A, Pedreira W, Mowszowitz M, Christophersen I, Machiavello S et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Uruguay. Emerg Infect Dis 2005; 11: 973-6.

Manian FA, Griesnauer S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is replacing traditional health care-associated MRSA strains in surgical-site infections among inpatients. Clin Infect Dis 2008; 47(3): 434-5.

Massida O, Montanari MP, Valardo PE. Evidence for a methicillin-hydrolysing beta-lactamase in *Staphylococcus aureus* strains using polymerase chain reaction FEMS Microbiol Lett 1992; 71(3): 223-7.

McClure JA, Conly JM, Lau Novel V. Multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from -resistant staphylococci. J Clin Microbiol 2006; 44: 1141-4.

McDonnel RW, Sweeney HM, Cohen SH. Conjugational transfer of gentamicin resistance plasmids intra- and interspecifically in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 23: 151-60.

Milheiro C, Oliveira DC, de Lancastre H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(9): 3374-7.

Mioljević V, Palibrk I, Varagić Z, Ostojić S, Jovanović S, Stojakov D, et al. Uzročnici bolničkih infekcija na Klinici za digestivne bolesti KC Srbije 2008-2010. *Med. Čas* 2011; 5(Suppl 1): 29-30.

Mirović V, Tomanović B, Kocić B, Jovanović B, Ninković V. The problem of MRSA in Serbia. Proceeding of the National Workshop on antibiotic susceptibility testing 2006, October 23-24, Belgrade, Serbia

Mirović V. Antibiotici i osnovni principi njihove kliničke primene. Beograd, Čigoja štampa; 2003.

Monecke S, Gavier-Widen D, Mattsson R, Rangstrup-Christensen L, Lazarus A et al. Detection of *mecC* positive *Staphylococcus aureus* (CC-130-MRSA-XI) in diseased European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in Sweden. *Plos One* 2013; 8(6): 1-6.

Monecke S, Beier V, Coombs G, Slickers P, Ziegler A, Ehrlich R. Genome sequencing and molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* ST772-MRSA-V. "Bengal Bay Clone". *BMC Res Notes* 2013; 6: 548-54.

Mongkolrattanothai K, Boyle S, Murphy TV, Daum RS. Novel non-*mecA*-containing staphylococcal chromosomal cassette composite island containing *pbp4* and *tagF* genes in a commensal staphylococcal species: a possible

reservoir for antibiotic resistance islands in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:1823-36.

Moran G, Krishnadasan A, Gorwitz R, Fosheim G, McDougal L, Carey R, Talan D. Methicillin resistant *S.aureus* infections among patients in the emergency department. N Engl J Med 2006; 355(7): 666-74.

Much H. Über eine Vorstufe des Fibrinfermentes in Kulturen von *Staphylococcus aureus*. Biochem Z 1908; 14: 143-55.

Mulvey MR, MacDougall L, Cholin B, Horsman G, Vydik M, Woods S. Community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Canada. Emerg Infect Dis 2005; 11: 844-50.

Naimi ST, Le Dell HK, Como-Sabetti K, Borchardt MS, Boxrud JD, Etienne J. Comparison of community – and health care associated methicillin resistant *S. aureus* Infection. JAMA 2003; 290(22): 2976-84.

Nimmo GR, Coombs G, Pearson J, O'Brien F, Christiansen K, Douglas J, et al. MRSA in the Australian community: an evolving epidemic. Med J Aust 2006; (7): 374-5.

Obradović B, Kovačević L, Miloradović M, Kljajić D, Relić T. Presence of Methicillin-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* in the Population of Healthy People Zdravstvena zaštita 2009;(2): 27-31.

O'Brien FG, Lim TT, Chong F, Coombs GW, Enright MC, Robinson DA et al. Diversity among community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. J Clin Microbiol 2004; 42(7): 3185-90.

*Oliveira DC, de Lencastre H.* Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(7): 2155-61.

*Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H.* Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:180-9.

*Orlović J, Dinić M, Kocić B.* Zastupljenost MRSA izolovanog iz bolničkog materijala. *Acta Medica Medianae* 2008; 47(2): 10-14.

*Ortega E, Abriouel H, Lucas R, Galves A.* Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity and correlation to antibiotic resistance. *Toxins (Basel)* 2010; 2(8): 2117-31.

*Otter JA, French GL.* Nosocomial transmission of CA-MRSA: an emerging threat. *Lancet Infect Dis* 2006; 6(12):753-5.

*Pai V, Rao V, Rao S.* Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[MRSA] Isolates at a Tertiary Care Hospital in Mangalore, South India. *J Lab Physicians* 2010; 2(2): 82-4.

*Passet J.* Über Microorganismen der eiterigen Zellgewebsentzündung des Menschen. *Fortsch Med* 1885; 3: 33-34.

*Patel M, Kumar RA, Stamm AM, Hoesley CJ, Moser SA, Waites KB.* USA300 genotype community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of surgical site infections. *J Clin Microbiol* 2007; 45(10): 3431-33.

Patel M, Waites K, Moser S, Cloud G, Hoesley C. Prevalence of Inducible Clindamycin Resistance among Community- and Hospital-Associated *Staphylococcus aureus* Isolates J Clin Microbiol 2006; 44(7): 2481–84.

Pathak A, Marothi Y, Iyer RV, Singh B, Sharma M, Ericsson B. et al. Nasal carriage and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* in healthy preschool children in Ujjan, India. BMC Pediatrics 2010; 10: 100-08.

Perez-Roth E, Lorenzo-Diaz F, Batista N, Moreno A, Mendez-Alvarez S. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital. J Clin Microbiol 2004;42:4649-56.

Petrović-Jeremić Lj. Osetljivost meticilin rezistentnih sojeva *S. aureus* u bolničkoj i vanbolničkoj sredini na druge grupe antibiotika. PONS 2009; (16): 18-26.

Petrović-Jeremić Lj. Zastupljenost pojedinih mehanizama rezistencije na beta-laktamske antibiotike u bolničkim i vanbolničkim izolata MRSA (magistarski rad). Beograd: Vojnomedicinska akademija; 2008.

Pichon C, Felden B. Small RNA genes expressed from *Staphylococcus aureus* genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 14249-54.

Popovich KJ, Weinstein RA, Hota B. Are community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains replacing traditional nosocomial MRSA strains? Clin Infect Dis 2008; 46: 787–94.

Quintilliani R, Courvalin P. Mechanisms to resistance of antimicrobial agents. In: Murray P.R ed. Manual of clinical microbiology. ASM Press Washington, 1996; pp. 1308-24.

*Renwick L, Hardie A, Girvan EK, Smith M, Leadbetter G, Claas E, et al.* Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Panton-Valentine leukocidin directly from clinical samples and the development of a multiplex assay using real-time polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27(9): 791-6.

*Ritz N, Curtis N.* The role of Panton-Valentine leukocidine in *Staphylococcus aureus* infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 2012 ; 31: 514-8.

*Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC.* The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 2006; 6(10): 629–40.

*Rosenbach FJ.* Microorganismen bei den Wund-infections-krankheiten des Menschen. Wiesbaden, J.F.Bergman, 1884.

*Sabol K.* Community associated methicillin resistant *S.aureus*: new bug, old drugs. *Ann Pharmacother* 2006; 40(6): 1125-33.

*Salgado CD, Farr BM, Calfee DP.* Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 131-9.

*Savas L, Duran N, Onlen Y, Savas N, Erayaman M.* Prospective analysis of antibiotic susceptibility patterns of MRSA in Turkish University Hospital. *Turk J Med* 2005; 35: 323-7.

*Seybold U, Kourbatova EV, Johnson JG, Halvosa SJ, Wang YF, King MD, et al.* Emergence of CAMRSA USA300 genotyp as a major cause of health care-associated blood stream infections. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 647-56.



*Shallcross L, Fragaszy E, Hayward A.* The role of the Pantone-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* Jan 2013; 13(1): 43-54.

*Shapiro A, Raman S, Johnson M.* CA-MRSA infections in North Carolina children: prevalence, antibiotic sensitivities and risk factors. *N C Med J* 2009; 70(2):102-7.

*Sharma Y, Jain S, Harshvardhan S and Govil V.* Staphylococcus aureus: Screening for Nasal Carriers in a Community Setting with Special Reference to MRSA. *Scientifica* Volume 2014 (2014), pp. 5.

*Sheifer K, Kandler O.* Peptidoglycan types of bacterial cell and taxonomic implications. *Bacterial Rev* 1972; 36: 407-77.

*Shukla, S.K, Stemper ME, Reed KD.* Molecular characteristics of nosocomial and Native American community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones from rural Wisconsin. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8): 3752-7.

*Sjostrom JE, Lofdahl S, Phillipson L.* Transformation reveals a chromosomal locus of the gene(s) for methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1975; 123: 905-15.

*Skov RL, Jensen KS.* Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of hospital-acquired infections. *J Hosp Infect* 2009; 73(4): 364-70.

*Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Disease. In: *Todar K*, editor. *Textbook of Bacteriology*, Wisconsin; 2005.

*Stewart GT, Holt RJ.* Evolution of natural resistance to the newer penicillins. *Br Med J* 1963; 1: 308-11.

Stranden A, Frei R, Adler H, Fluckiger U, Widmer A. Emergence of SCCmec type IV as the most common type of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital. *Infection* 2009; 37(1): 44-8.

Sun DD, MaoXX, Hu J, Tian Y. Epidemiological and molecular characterization of community and hospital acquired *Staphylococcus aureus* strains prevailing in Shenyjang. *Bras J Infect Dis* 2013; (6): 682-90.

Takano T, Saito K, Teng LJ, Yamamoto T. Spread of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals in Taipei, Taiwan in 2005, and comparison of its drug resistance with previous hospital-acquired MRSA. *Microbiol Immunol* 2007; 51: 627-32.

Tanaka M, Wang T, Onodera Y, Uchida Y, Sato K. Mechanism of quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Chemother* 2000; 6(3): 131-9.

Tiemersma E, Bronzwaer S, Lytikainen O, Brunisma N, Degener JE, Schrijnemakers P, et al. Resistance of *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2000 *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1627-34.

Udo EE, Pearman JW, Grubb WB. Genetic analysis of community isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J Hosp Infect* 1993; 25: 97-108.

Van den Broek IV, Van Cleef BA, Haenen A, Broens EM, Van der Wolf PJ et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in people living and working in pig farms. *Epidemiol Infect* 2009; 137:700-8.

Van Duijkeren E, Wolfhagen M, Box A, Heck M, WannetW et al. Human-to-dog transmission of MRSA. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 2235-7.

*Vandenesch F, Naimi T, Etienne T.* Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(8): 978-84.

*Vardakas KZ, Matthaiou DK, Falagas ME.* Comparison of community-acquired pneumonia to methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* producing the Panton-Valentine leukocidin. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13: 1476-85.

*Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klassen C, Wulf M.* Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1965-6.

*Wielders CL, Vriens MR, Brisse S, de Graaf-miltenburg LA, Troelstra A, Schmitz FJ, et al.* In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus* [corrected]. *Lancet* 2001; 357: 1674-5.

*Wulf MW, Markenstein A, VAN DER Linden FT, Voss A, Klassen C et al.* First outbreak of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch hospital. *Euro Surveill* 2008; 13(9): pii=8051.

*Yamaguchi K, Ohno A.* Investigation of the susceptibility trends in Japan to fluoroquinolones and other antimicrobial agents in a nationwide collection of clinical isolates: a longitudinal analysis from 1994 to 2002. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52(2): 135-43.

*Zhang K, McClure J, Elsayed S, Tan J, Conly J.* Coexistence of Panton-Valentine leukocidin-positive and -negative community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA400 sibling strains in a large Canadian health-care region. *J Infect Dis* 2008; 197(2): 195-204.