



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Милена Мишић

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

Докторска дисертација

Ментор: Проф. др Дејан Баскић

Крагујевац, 2018

САДРЖАЈ

1	УВОД.....	1
1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.2	Коагулаза негативне стафилококе.....	6
1.3	Метицилин резистентне стафилококе и метицилин сензитивне стафилококе ...	6
1.4	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10
1.5	<i>Enterococcus spp.</i>	13
1.6	<i>Streptococcus agalactiae</i>	14
1.7	<i>Streptococcus pyogenes</i>	16
1.8	Макролиди	18
1.9	Линкозамиди.....	20
1.10	Сложени механизми резистенције MLS антибиотика.....	22
1.10.1	Модификација рибозома	22
1.10.2	Активно избацивање антибиотика	25
1.10.3	Модификација антибиотика.....	26
1.11	D-тест.....	27
2	ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА.....	30
2.1	Циљеви истраживања	30
2.2	Хипотезе истраживања	30
3	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	31
3.1	План истраживања	31
3.2	Узорковање и примарна изолација.....	31
3.3	Бактеријски сојеви	33
3.4	Методe анализе бактеријских сојева	33

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

4.5	Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала.....	59
4.5.1	Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала код <i>S. aureus</i>	60
4.5.2	Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала код KNS изолата	62
4.5.3	Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала код изолата <i>Enterococcus</i> spp. и <i>S. agalactiae</i>	64
4.5.4	Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала код изолата <i>S. pneumoniae</i> и <i>S. pyogenes</i>	66
4.6	Учесталост MLS фенотипова резистенције по пореклу материјала	68
4.6.1	Учесталост MLS фенотипова резистенције по пореклу материјала код стафилокока.....	70
4.6.2	Учесталост MLS фенотипова резистенције по пореклу материјала код ентерокока и стрептокока	71
4.7	Учесталост MLS гена резистенције код Грам-позитивних кока	73
4.7.1	Учесталост MLS гена резистенције код изолата стафилокока.....	74
4.7.1.1	Учесталост MLS гена резистенције код различитих врста стафилокока	76
4.7.1.2	Учесталост MLS гена резистенције код различитих фенотипова стафилокока.....	77
4.7.1.3	Учесталост MLS гена резистенције према пореклу изолата код стафилокока.....	79
4.7.2	Учесталост MLS гена резистенције код ентерокока и β -хемолитичких стрептокока	80
4.7.2.1	Учесталост MLS гена резистенције код ентерокока и β -хемолитичких стрептокока.....	81
4.7.2.2	Учесталост MLS гена резистенције према фенотипу код ентерокока и β -хемолитичких стрептокока	82
4.7.2.3	Учесталост MLS гена резистенције према пореклу изолата ентерокока и β -хемолитичких стрептокока.....	85

4.8	Ваљаност D-теста	85
5	ДИСКУСИЈА	87
6	Закључци	106
7	Литература.....	109

ПОПИС СЛИКА

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

ПОПИС ГРАФИКОНА

Графикон 1. Осетљивост на еритромицин код Грам-позитивних кока	48
Графикон 2. Учесталост MLS фенотипова резистенције код <i>S. aureus</i>	50
Графикон 3. Учесталост MLS фенотипова резистенције код KNS изолата	51
Графикон 4. Учесталост MLS фенотипова резистенције код ентерокока	52
Графикон 5. Учесталост MLS фенотипова резистенције код стрептокока	53
Графикон 6. Учесталост MLS фенотипова резистенције код Грам-позитивних кока...54	
Графикон 7. Учесталост осетљивости на еритромицин и клиндамицин (Er/Kli S) код Грам-позитивних кока	55
Графикон 8. Учесталост cMLSb фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока...56	
Графикон 9. Учесталост M/MSb фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока ..57	
Графикон 10. Учесталост iMLSb фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока .58	
Графикон 11. Учесталост LSa/b фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока ...59	
Графикон 12. Учесталост MLS фенотипова по врсти материјала код Грам-позитивних кока.....	60
Графикон 13. Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала код MRSA и MSSA изолата	62
Графикон 14. Учесталост MLS фенотипова резистенције према врсти материјала код MRKNS и MSKNS изолата	64
Графикон 15. Учесталост MLS фенотипова резистенције према врсти материјала код изолата <i>Enterococcus</i> spp. и <i>S. agalactiae</i>	66
Графикон 16. Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала код изолата <i>S. pneumoniae</i> и <i>S. pyogenes</i>	68
Графикон 17. Учесталост MLS фенотипова по пореклу материјала код Грам-позитивних кока	69
Графикон 18. Учесталост MLS фенотипова резистенције према врсти материјала код MRSA, MSSA, MRKNS и MSKNS	71
Графикон 19. Учесталост MLS фенотипова резистенције по пореклу материјала	73
Графикон 20. Учесталост MLS гена резистенције код Грам-позитивних кока са једним од четири MLS фенотипа резистенције	74
Графикон 21. Учесталост MLS гена међу изолатима стафилокока који су показивали један од четири MLS фенотипа резистенције	75

Графикон 22. Учесталост MLS гена резистенције и њихових комбинација код стафилокока.....	75
Графикон 23. Преваленција и експресија MLS гена и њихових комбинација код различитих фенотипова стафилокока	79
Графикон 24. Учесталост MLS гена резистенције међу изолатима ентерокока и стрептокока који су показивали један од три MLS фенотипа резистенције	80
Графикон 25. Учесталост MLS гена резистенције и њихових комбинација код ентерокока и β -хемолитичких стрептокока.....	81
Графикон 26. Преваленција и експресија MLS гена резистенције и њихових комбинација код различитих фенотипова ентерокока и β -хемолитичких стрептокока .	84

ПОПИС ТАБЕЛА

Табела 1. PCR прајмери коришћени за умножавање гена резистенције код Грам-позитивних кока и услови умножавања код извођења PCR реакције	43
Табела 2. Учесталост резистенције на антибиотике код Грам-позитивних кока	46
Табела 3. Учесталост MLS фенотипова резистенције код Грам-позитивних кока	49
Табела 4. Учесталост MLS фенотипова по врсти материјала код Грам-позитивних кока	59
Табела 5. Учесталост фенотипова резистенције по врсти материјала код MRSA и MSSA изолата.....	61
Табела 6. Учесталост фенотипова резистенције по врсти материјала код MRKNS и MSKNS изолата.....	63
Табела 7. Учесталост фенотипова резистенције по врсти материјала код изолата <i>Enterococcus</i> spp. и <i>S. agalactiae</i>	65
Табела 8. Учесталост фенотипова резистенције по врсти материјала код изолата <i>S. pneumoniae</i> и <i>S. pyogenes</i>	67
Табела 9. Учесталост MLS фенотипова по пореклу материјала код Грам-позитивних кока.....	69
Табела 10. Учесталост фенотипова резистенције по пореклу материјала код стафилокока.....	70
Табела 11. Учесталост фенотипова резистенције по пореклу материјала код ентерокока и стрептокока.....	72
Табела 12. Учесталост MLS гена резистенције и њихових комбинација код различитих врста стафилокока.....	76
Табела 13. Учесталост MLS гена и њихових комбинација код различитих фенотипова стафилокока.....	77
Табела 14. Учесталост MLS гена резистенције према пореклу изолата стафилокока...	79
Табела 15. Учесталост MLS гена резистенције и њихових комбинација код ентерокока и β -хемолитичких стрептокока.....	82
Табела 16. Преваленција MLS гена резистенције и њихових комбинација код различитих фенотипова резистенције ентерокока и β -хемолитичких стрептокока.....	83
Табела 17. Учесталост MLS гена резистенције према пореклу ентерокока и β -хемолитичких стрептокока (амбулантни према болничким)	85
Табела 18. Број изолата коришћених за утврђивање ваљаности D-теста.....	86
Табела 19. Резултати теста ваљаности D-теста.....	86

ПОПИС ОЗНАКА И СКРАЋЕНИЦА

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

	Acquired MRSA)
HIV	вирус хумане имунодефицијенције (енгл. human immunodeficiency virus)
iMLSb	индуцибилна макролид-линкозамид-стрептограмин Б резистентност
iRNK	информациона рибонуклеинска киселина
IU	међународна јединица (енгл. International Unit)
Kli	клиндамицин
KNS	коагулаза негативни <i>Staphylococcus</i> (енгл. coagulase negative staphylococci)
<i>lnu</i>	ген за ензим линкозамид нуклеотидилтрансферазу (претходно <i>lin</i>)
LSA	линкозамид-стрептограмин А
LSa/b	линкозамид-стрептограмин А/Б резистентност
LSAP	линкозамид-стрептограмин А-плеуромутилин
M/MSb	макролид/макролид-стрептограмин Б резистентност
MIC	минимална инхибиторна концентрација (енгл. minimal inhibitory concentration)
MLS	макролид-линкозамид-стрептограмин
MLSb	макролид-линкозамид-стрептограмин Б
MRKNS	метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок (енгл. methicillin resistant coagulase negative staphylococci)
MRSA	метицилин резистентни <i>S. aureus</i> (енгл. methicillin resistant <i>S. aureus</i>)
MSKNS	метицилин сензитивни коагулаза негативан стафилокок (енгл. methicillin sensitive coagulase negative staphylococci)
MSSA	метицилин сензитивни <i>S. aureus</i> (енгл. methicillin sensitive <i>S. aureus</i>)
NIDR	Национални регистар заразних обољења (енгл. The National Infectious Disease Register)
NIPA	Национални информациони програм за антибиотике (енгл. National information program on antibiotics)
ORF	отворени оквир читања (енгл. open reading frame)
PBP2a	пеницилин везујући протеин 2a (енгл. Penicillin binding protein 2a)
PBPs	пеницилин везујући протеини (енгл. Penicillin binding proteins)
PCR	реакција ланчаног умножавања (енгл. polimerase chain reaction)
PCV	пнеумококна коњугована вакцина (енгл. Pneumomoccal Conjugate

	Vaccine)
PFGE	електрофореза у пулсирајућем електричном пољу (енгл. pulsed-field gel electrophoresis)
PTC	пептидилтрансфераза центар 50S подјединице рибозома
QC	контрола квалитета (енгл. Quality control)
Q-D	квинпристин-далфопристин (енгл. quinupristin dalfopristin)
RNK	рибонуклеинска киселина
rRNK	рибозомска рибонуклеинска киселина
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAD	Сједињене америчке државе
SaG	<i>Staphylococcus aureus</i> endo-beta-N-acetylglukozamidaze
SB	<i>Streptococcus agalactiae</i>
SCCmec	стафилококна хромозомска касета mec (енгл. Staphylococcal cassette chromosome mec)
Scvs	варијанте малих колонија <i>S. aureus</i> (енгл. Small colony variants of <i>S. aureus</i>)
Spa	стафилококни протеин А (енгл. Staphylococcal protein A)
SPn	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SPy	<i>Streptococcus pyogenes</i>
TNaza	термонуклеаза
tRNK	транспортна рибонуклеинска киселина
TSS	токсични шок синдром (енгл. toxic shock syndrom)
VISA	ванкомицин интермедијарно-резистентни <i>S. aureus</i>
VREF	ванкомицин - резистентни <i>Enterococcus faecium</i>
VRSA	ванкомицин резистентни <i>S. aureus</i>

1 УВОД

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

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

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

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

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

1.1 *Staphylococcus aureus*

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

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

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

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

генома [26, 27]. Геноми *S. aureus* су величине приближно 2,9 мегабазних парова (Mbp), са релативно ниским садржајем G+C [25].

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

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

фаринкс и, нешто ређе, гастроинтестинални тракт, вагину и аксиле [38]. Ван Белкам и сар. су предложили само два типа носног клицоноштва *S. aureus*: перзистентни и други [39]. У студијама израђеним у САД-у, преваленција назалног клицоноштва са бактеријом *S. aureus* је била процењена на око 30% и нађена је највише код деце између 6 и 7 година [40]. Назално клицоноштво *S. aureus*, посебно перзистентно назално клицоноштво, идентификовано је као фактор ризика за развој инфекције у различитом окружењу. То је главни фактор ризика код одређених група пацијената, као што су пацијенти подвргнути некој хируршкој интервенцији или хемодијализи и пацијенти са интраваскуларним уређајима и HIV инфекцијом [41].

1.2 Коагулаза негативне стафилококе

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

1.3 Метицилин резистентне стафилококе и метицилин сензитивне стафилококе

Непосредно након открића, пеницилин је био лек избора за лечење стафилококних инфекција. Појава резистентности на пеницилин код стафилокока је настала ширењем гена који кодирају продукцију бета лактамаза путем плаزمида. Сада је преко 80% изолата стафилокока резистентно на пеницилин [8] због продукције бета-лактамаза,

које се везују за антибиотик и уништавају га отварајући му бета-лактамски прстен [7]. Полусинтетски пеницилини, пеницилиназа резистентни пеницилини, оксацилин и метицилин су постали лекови избора за лечење инфекција изазваних пеницилин резистентним стафилококом [8]. Типични сојеви стафилокока имају четири пеницилин везујућа протеина (PBP). Ови протеини су ензими који катализују транспептидазну реакцију која је неопходна за синтезу ћелијског зида. Антибиотска активност оксацилина је заснована на способности лека да формира ковалентну везу са пеницилин везујућим протеинима на активном месту и инхибира реакцију транспептидације [9]. Метицилин резистентни *S. aureus* (MRSA) је био први пут откривен 1962. године и од онда је постао главни нозокомијални патоген широм света. Каснији тип резистенције је настао због присуства промењеног PBP познатог као PBP2a (или PBP2). PBP2 је кодиран од стране *mecA* гена, који је смештен на мобилном елементу, стафилококној хромозомској касети *mec* (*Scsmec*), која је хоризонтално преносива међу различитим врстама стафилокока [42]. PBP2 има низак афинитет за све бета-лактамске антибиотике, он наставља да функционише дозвољавајући бактерији да расте и дели се [8]. Стафилококе могу експримовати и другачији механизам резистенције на терапију у односу на класични механизам. Откриће и карактеризација варијанти малих колонија *S. aureus* (*Scvs*) је обезбедила нови поглед у разумевању патогенезе повезане са стафилококним обољењима [43]. Варијанте малих колонија *S. aureus* се све више јављају у рекурентним и перзистентним инфекцијама [43, 44]. *Scvs* су стекле способност преживљавања пошто могу да се сакрију унутар ћелије домаћина, која их штити од одбране домаћина и смањује њихову изложеност антибиотцима [45]. Кашњење тачне идентификације и теста осетљивости због све сложенијих процедура у лабораторијама може довести до грешака у дијагностици и погрешних терапија [45]. Фенотипска детекција MRSA је одувек проблематична још од њеног првог појављивања 1962. године [46]. Фенотипска експресија *mecA* гена може бити хетеротипска или хомотипска и због тога детекција метицилин резистенције може захтевати индукцију PBP2a у случају хетеротипске експресије [47]. Промене услова раста као што су температура и концентрација соли, значајно утичу на експресију резистенције [47]. Диск дифузиона метода остаје најшире примењена у рутинском раду клиничких лабораторија, међутим постоје и неки комерцијални системи за детекцију метицилин резистенције. Код диск дифузионих тестова хиперпродуктори пеницилиназе могу показати мале метицилин, оксацилин или цефокситин зоне инхибиције док прави метицилин/оксацилин/цефокситин резистентни изолати не

показују зону инхибиције [9]. Детекција *mecA* гена или његовог продукта, пеницилин везујућег протеина (PBP2a), се сматра златним стандардом за потврду MRSA изолата [46]. *mecA* ген је регулисан репресором MecI и метицилин-резистентним регулаторним протеином, MecR1. У одсуству бета-лактамског антибиотика, MecI потискује транскрипцију *mecA*, *mecR1* и *mecI*. У присуству бета-лактамских антибиотика, MecR1 се аутокаталитички поцепа и домен MecR1 који је металопротеаза постаје активан. Ова металопротеаза цепа MecI, дозвољавајући транскрипцију *mecA* гену продукцију PBP2a [48].

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

зато није директно повезан са могућим повећањем вируленције MRSA изолата. Међутим, неке епидемиолошке студије, укључујући мета-анализе, су откриле повећан морбидитет и/или морталитет од нозокомијалних MRSA изолата [65, 66]. Насупрот томе, друге студије су показале да нема повећања у морталитету због нозокомијалних MRSA бактеријемија или пнеумонија у поређењу са инфекцијама MSSA сојевима [67, 68]. Међутим, према недавно изведеној мета-анализи, колонизација MRSA сојем је повезана са 4 пута већим ризиком од инфекције у поређењу са колонизацијом MSSA сојем [69]. Исходи инфекција са MRSA сојевима су лошији због тежине болести, неадекватне или неефикасне терапије и продуженог болничког лечења [70, 69, 71]. Иако питање да ли је MRSA вирулентнији од MSSA остаје нерешено, јасно је да су инфекције MRSA сојевима повезане са већим трошковима и ограниченом могућношћу лечења [67, 72, 73].

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

Подаци генотипизације из великих међународних студија су показали да је неколико клонова MRSA одговорно за ширење обољења у различитим деловима света [77]. Праћење географске дистрибуције епидемијских клонова може допринети разумевању због чега се неки клонови MRSA могу проширити по целом свету, док су други ограничени на једну земљу, град или болницу [78]. Ако се нађу неки клинички

специфични сојеви стафилокока, било би важно идентификовати их фенотипски и генотипски да би се детектовале особине које их издвајају у посебну групу [10]. Клицоноштво у носу изгледа да има централну улогу у епидемиологији и патогенези инфекција са *S. aureus* [41]. Показано је да у већини случајева да је извор *S. aureus* који је изазвао бактеријемiju пацијентов нос и да колонизација MRSA изолатима доводи до аутоинфекције у већем проценту него колонизација са MSSA [79]. Уколико су предње носнице биле колонизоване са MRSA сојем, бактерије су присутне и у грлу, тако да и грло мора бити укључено у скринингу на клицоноштво [29]. Недавни подаци сугеришу да су ректум и ране такође важна места за колонизацију и да ова места морају бити испитана као део протокола за праћење MRSA сојева. Једна студија је показала да је метицилин резистенција међу изолатима *S. aureus* достигла веома високу стопу, у неким болницама у Индији чак преко 70% [80]. Ширење MRSA сојева међу пацијентима у здравственим установама такође захтева ефикасну деколонизацију [29].

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

1.4 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae изазива тешке инвазивне инфекције као што је менингитис, бактеријемija и пнеумоније, као и неинвазивне инфекције као што су синуситис и акутне упале средњег уха широм света [84]. Пнеумооки су такође и нормални становници слузокожа назофарингеалних мембрана код здраве деце и одраслих [85].

Иако се пнеумококна коњугована вакцина (PCV) све чешће користи, пнеумококне инфекције изазване не-вакциналним серотиповима и све већа резистенција *S. pneumoniae* на антибиотике постале су главни проблем јавног здравља [86, 87, 88].

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

Пнеумокок је важан људски патоген који изазива велики број различитих инфекција. Он може изазвати инфекцију слузокожа као што су синуситис и акутна упала средњег уха и тешке инвазивне инфекције као што је септикемија, менингитис, пнеумонија, артритис, перикардитис и перитонитис [85]. Инвазивно пнеумококно обољење је

најчешће код деце млађе од 2 године, старијих од 65 година и имунокомпромитованих индивидуа. Сваке године, милион деце млађе од 5 година умре од пнеумококног обољења, углавном у Африци и земљама Азије [101]. Пре 2000. године инфекције бактеријом *S. pneumoniae* годишње су биле узрок инвазивних обољења у просечно 60.000 случајева, укључујући 3300 случајева менингитиса у САД-у. Инциденција инфекција стерилних места варира од 21 до 33 случаја на 100.000 становника. Међутим, од увођења пнеумококне 7-валентне коњуговане вакцине (PCV7) 2000. године, инциденција инвазивних пнеумококних обољења била је 13 случајева на 100.000 становника у САД-у [102, 103]. У развијеним земљама, од 1995. до 2006. године, морталитет због инвазивних пнеумококних обољења кретао се од 5% до 30%, зависно од година старости, генетске предиспозиције, географске локације и основног здравственог стања, мада морталитет може бити висок и до 50%, као што је у Африци [92, 102, 104, 105, 106, 107]. У Европи, готово све северне земље имају опсежне системе надзора инвазивних пнеумококних обољења. 2007. године, пријављена инциденција за инвазивна пнеумококна обољења била је 21 случај/100.000 становника у Норвешкој и 16/100.000 у Шведској [108].

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

течности, између 2002. и 2006. године [117]. Пропорција пеницилин- и еритромицин-резистентних пнеумококних сојева који изазивају АОМ процењена на глобалном нивоу је између 30% и 70% [118].

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

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

1.5 *Enterococcus spp.*

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

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

1.6 *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae (група Б стрептокока) је главни узрочник инвазивне инфекције код новорођенчади и трудних жена. Такође се све чешће јавља као значајан узрочник инфекција код одраслих, посебно међу имунокомпромитованим пацијентима [145, 146]. *S. agalactiae* је одговорна за акутна и хронична обољења, као што су инфекције респираторног тракта, ендокардитиси, сепсе, менингитиси, пијелонефритиси и неуролошки проблеми [147]. Пеницилин Г и ампицилин су терапија избора за инфекције узроковане бактеријама *S. agalactiae*. Међутим, у случају толеранције на пеницилине или недостатка клиничког одговора, клиндамицин и макролиди су алтернативни антибиотици [148]. *S. agalactiae* (група Б стрептокок, GBS) је водећи

узрочник неонаталних инфекција код људи. Важан је узрочник обољевања трудних жена и старијих са неком примарном болешћу као што је *diabetes mellitus* или се налазе на имуносупресивној терапији [149, 150, 151]. Овај микроорганизам представља део нормалне флоре дигестивног и гениталног тракта и колонизује генитални тракт 10-40% трудних жена [152]. Код одраслих и трудних жена, GBS може изазвати уринарну инфекцију, хориоамнионитис, ендометритис, пнеумонију, инфекције коже и меког ткива [151, 152]. Код новорођенчади GBS је изазивач неонаталне сепсе, пнеумоније и менингитиса [153, 154, 155]. Трансмисија бактерија са мајке на дете се дешава асцендентно из гениталног тракта мајке на амнионску течност или при порођају [156]. Инфекције новорођенчади GBS бактеријама су класификоване на: обољења са раним почетком, када се дешавају у периоду од рођења до 6. дана (70-80% случајева) и обољења са касним почетком, када се дешавају у периоду после 7. и пре 90. дана од рођења. Ове инфекције настају трансмисијом бактерија од мајке или бабице на дете [157, 158, 159]. За лечење инфекција изазваних GBS-ом, пеницилин и ампицилин су лекови првог избора, а као алтернативни сматрају се цефалоспорини и ванкомицин [160, 161]. Ниједан случај резистенције на пеницилин досада није пријављен. Међутим, пријављени су случајеви GBS сојева са интермедијарном осетљивошћу, односно, повећаним вредностима минималне инхибиторне концентрације (MIC) за пеницилин [162, 163, 164]. Поред макролида и линкозамида постоје и други антибиотици који се користе као замена за пеницилине код пацијента преосетљивих на пеницилин, један од њих је ванкомицин [165, 166, 167]. Механизам резистенције на еритромицин код GBS-а је углавном модификација рибозома, кодирана *erm* генима (*ermB*, *ermA/ermTR*), која доводи до унакрсне резистенције на макролиде, линкозамиде и стрепторамине групе Б (MLSb) или активна ефлуks пумпа, кодирана *mefA* геном, која изазива резистенцију на 14-члане и 15-члане макролиде [168, 169, 170]. Резистенција на еритромицин настала посредством *erm* гена може бити индуцибилна (iMLSb) или конститутивна (cMLSb) [171, 172]. Резистенција на клиндамицин код GBS-а је мање учестала и настаје као последица модификације антибиотика од стране бактеријског ензима кодираног *lnuB* генима [173]. Мултиплекс PCR се може употребити за детекцију главних гена резистенције на еритромицин и клиндамицин код GBS сојева [170, 174].

1.7 *Streptococcus pyogenes*

Билрот је 1874. године први пут открио стрептококе код пацијента са инфекцијом коже, а 1879. године Пастер је пронашао ове бактерије у крви пацијенткиње са пуерпералном сепсом. Фејлаизен је 1883. године објавио рад о клиничком значају бактерија које формирају ланце код људи, а Розенбак је први пут 1884. године употребио име *Streptococcus pyogenes*. *S. pyogenes* је Грам-позитивна кока, која је 1933. године сврстана у Лансфилдову групу А стрептокока (GAS) [175]. Појединачна бактеријска ћелија је сферног облика, величине од 0,5-1 μm , непокретна је и обично се налази у паровима или дужим и краћим ланцима. То је факултативно анаеробни микроорганизам, каталаза и оксидаза негативан [176]. Лансфилдова класификациона шема је издвојила ове стрептококе на основу њиховог групног А угљеног хидрата, сачињеног од N-acetilglukozamina повезаног са мрежом полимера рамнозе [175]. На крвном агару, колоније формирају велику зону бета-хемолизе, која настаје услед продукције стрептолизина-О који врши комплетну лизу еритроцита [177].

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

репликације (eagle effect), што представља парадоксално смањење деловања пеницилина при високој концентрацији [182].

Постоје велике географске и временске варијације у учесталости макролид-резистентног *S. pyogenes*. Опадање резистентности на макролиде код *S. pyogenes* се повезује са контролисаном и смањеном употребом макролида у популацији, мада и природна флукуација макролид резистентних клонова игра важну улогу у укупној преваленцији тих сојева. Разлике пронађене међу GAS изолатима из узорка једног пацијента покренуле су питање да ли је проучавање бактерије на основу једне колоније у микробиолошкој лабораторији довело да потцењивања стопе резистенције на макролиде међу стрептококама групе А. 321 изолат GAS-а из брисева 35 пацијената са фарингитисом прегледан је у једној болници, ради утврђивања потенцијалних разлика у профилу резистенције на антибиотике и *emm* типу [183]. Од тога је по 10 изолата узето из једног узорка. Сви изолати из узорка једног пацијента су имала исти профил резистенције на антибиотике и припадали су истом *emm* типу, чиме је утврђено да је лабораторијска анализа једне колоније изолата дала поуздану стопу макролид-резистенције међу стрептококама групе А [183].

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

1.8 Макролиди

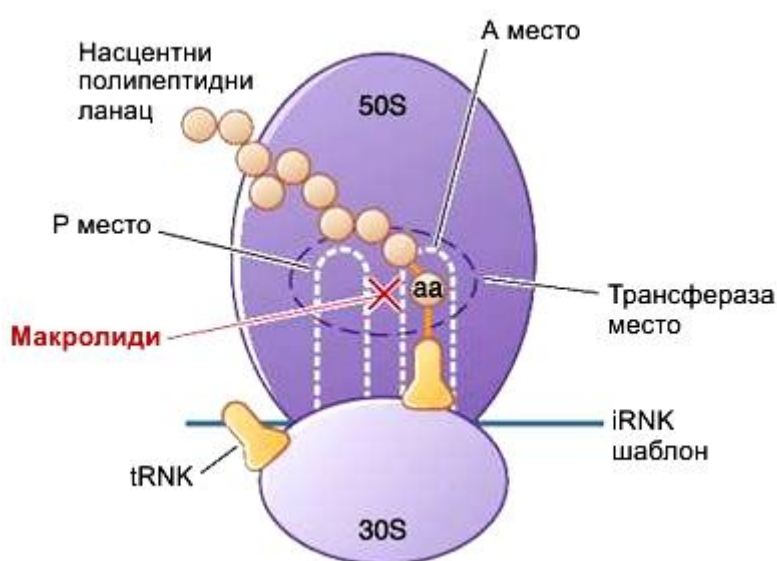
Макролиди су позната класа антибиотика често препоручивана за лечење неспецифичних инфекција респираторног тракта стечених у заједници. Бројни антибиотици са различитим спектром деловања су синтетисани хемијском модификацијом структурног језгра макролида, тј. макроцикличног лактамског прстена. Иако структурно разноврсни, макролиди деле заједничку способност везивања за 50S под-јединицу бактеријског рибозома на месту пептидилтрансфераза центра или ефлукс пумпе. Новији макролиди, а посебно азитромицин са својим широким спектром деловања, проширили су терапеутску примену ове класе антибиотика [188].

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

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

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

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



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

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

резистентни сојеви *S. aureus* су потенцијално унакрсно резистентни и на клиндамицин и на стрептограмин групе Б [189].

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

1.9 Линкозамиди

Линкозамиди укључују линкомицин, природни производ неколико актиномицета и клиндамицин полусинтетски дериват добијен хлоринацијом линкомицина. Ови антибиотици делују на Грам-позитивне коке и анаеробе. Линкозамиди се нормално користе за третирање стафилокока и стрептокока и делују ефикасно на *Bacteroides fragilis* и неке друге анаеробе. Они се користе у лечењу токсичног шок синдрома и директно блокирају продукцију М протеина код стрептокока доводећи до јачег инфламаторног одговора. Линкозамиди су класа антибиотика која се најчешће повезује са настанком псеудомембранозног колитиса врстом *Clostridium difficile* [190]. Линкозамиди делују на све Грам-позитивне коке, изузев на *Enterococcus faecalis* [134]. Они инхибирају синтезу протеина блокирјући активност пептидилтрансферазе 50S подјединице бактеријског рибозома [191]. Први откривени линкозамид био је линкомицин, а изолован је из актиномицете *Streptomyces lincolnensis*, нађене у узорку земље из Линколна у Небраски [192]. Жуч је важан пут екскреције линкомицина из организма. Значајна концентрација линкомицина је присутна у већини ткива. Иако, линкомицин дифундује у среброспиналну течност, концентрација линкомицина није довољна за лечење менингитиса. Линкомицин има узак спектар деловања, делује на Грам-позитивне бактерије и оне без ћелијског зида: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Mycoplasma*. Линкомицин се користи за лечење тешких бактеријских инфекција код

људи који су преосетљиви на пеницилине. Линкомицин слабо делује на Грам-негативне бактерије. Линкомицини спречавају репликацију бактерија реметећи синтезу протеина у њима. Они се везују за 23S део 50S подјединице бактеријског рибозома и доводе до прераног одвајања пептидил-tRNK од рибозома. Линкозамиди не ремете синтезу протеина у хуманим ћелијама (као ни у другим еукариотским ћелијама) зато што се хумани рибозоми структурно разликују од бактеријских рибозома.

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



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

Резистенција на макролиде услед метилације рибозома *erm*-кодираним метилазом, такође може довести и до резистенције на клиндамицин. Међутим, пошто клиндамицин не индукује продукцију метилаза, унакрсна резистенција се јавља само уколико се ензим продукује конститутивно [189]. Клиндамицин није супстрат макролид ефлукс пумпе, па сојеви који су резистентни на макролиде, деловањем овог механизма резистенције остају и даље осетљиви на клиндамицин. Клиндамицин као и еритромицин *in vitro* делује на пнеумококе, *S. pyogenes* и вириданс стрептококе. Метицилин осетљиви сојеви *S. aureus* су обично осетљиви, док су метицилин резистентни сојеви стафилокока углавном резистентни на клиндамицин. Клиндамицин је ефикасан лек за лечење кожних и инфекција меких ткива и озбиљних инфекција изазваних стафилококом, као и анаеробним бактеријама. Он одлично продире у сва

ткива (изузев централног нервног система) и акумулира се у апсцесима, полиморфонуклеарним леукоцитима и алвеоларним макрофагима, не показујући потребу за дозним прилагођавањем код бубрежних болесника [193]. Добра орална апсорпција чини га важним у терапији амбулантних пацијената, али је добар и за наставак лечења хоспитализованих пацијената након интравенске терапије. Клиндамицин је такође посебно важан као алтернативни антибиотик код пацијената преосетљивих на пеницилин [194].

1.10 Сложени механизми резистенције MLS антибиотика

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

1. Модификација рибозома: Индуцибилна или конститутивна продукција ензима, метилаза, који модификују место везивања антибиотика на рибозому и на тај начин умањује деловање лека, посредством *ermA*, *ermB* и *ermC* гена.
2. Активно избацивање антибиотика: Ефлукс антибиотика механизмом активне пумпе, кодиране *msrA*, *msrB*, *mefA* или *mefE* геном код стафилокока, односно, групе А стрептокока или *S. pneumoniae*.
3. Модификација антибиотика: Мутације хромозомске које мењају 50S протеин рибозома (нађено код *Bacillus subtilis*, *Campylobacter* spp., *Mycobacterium* spp. и Грам-позитивних кока) [189].

1.10.1 Модификација рибозома

№⁶диметилације специфичног аденина, A2058, који се налази у региону пептидил трансферазе унутар V домена на 23S RNK - компоненти 50S рибозомске подјединице

бактерија, доводи до унакрсне резистенције на макролиде, линкозамиде и стрептограмине групе Б (MLSb) [195, 196].

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

Профил резистенције познат као MLSb фенотип може бити:

- индуцибилан (iMLSb)
- конститутиван (cMLSb).

Гени одговорни за модификацију рибозома код различитих врста бактерија су:

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

Метилација је први механизам резистенције на макролиде и јавља се услед посттранскрипционе модификације 23S rRNK метилтрансферазама [196]. Генерално, гени који кодирају ове метилазе се означавају са *erm* и до сад је описано неколико класа *erm* гена [202]. Пошто се место везивања на 50S рибозомској подјединици за еритромицин преклапа са местом везивања за новије макролиде као и линкозамиде и стрептограмин групе Б, модификација метилацијом смањује везивање и највећег броја макролида, линкозамида и стрептограмина групе Б, стварајући MLSb фенотип резистенције [203]. Експресија MLSb резистенције може бити конститутивна или индуцибилна, стварајући cMLSb, односно, iMLSb фенотип. У случају iMLSb фенотипа, бактерија продукује инактивну iRNK која постаје активна само у присуству макролида

као индуктора. У присуству индуктора (обично еритромицина), настаје прерасподела iRNK, која дозвољава рибозому да преведе секвенцу која кодира метилазу [81]. Насупрот томе, код бактерија које показују cMLSb фенотип резистенције активна iRNK метилаза се продукује у одсуству индуктора. Фенотипски, iMLSb изолати показују смањену зону инхибиције клиндамицина према еритромицин диску у дуплом диск дифузионом тесту, док је уобичајени кружни облик зоне инхибиције присутан око клиндамицина кад је удаљен од диска еритромицина [204]. Многи од *erm* гена су повезани са конјугабилним и неконјугабилним транспонзонима који су често повезани са другим генима резистенције, мада су неки од ових гена нађени и на плазмидима [202, 205]. Ови транспозони, који имају могућност премештања гена резистенције на осетљиве изолате конјугацијом [206, 207], имају велики број могућих домаћина, што објашњава запажање да различите врсте бактерија носе *erm* гене [202].

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

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

1.10.2 Активно избацивање антибиотика

Ген *msrA*, *msrB* и новооткривени *msrC* кодирају АТФ-зависну ефлукс пумпу (ABC), која доводи до резистенције на 14-члане и 15-члане макролиде и стрептограмине Б (MSb фенотип резистенције) [81, 200]. Други механизам, одговоран за резистенцију на 14-члане и 15-члане макролиде и осетљивост на 16-члане макролиде, линкозамиде и стрептограмине групе Б (M/MSb фенотип), настаје акцијом протеина везаних за цитоплазматску мембрану који испумпавају антибиотике изван ћелије, одржавајући интрацелуларну концентрацију антибиотика ниском и спречавајући везивање антибиотика за рибозоме. Ова пумпа, повезана са цитоплазматском мембраном, је кодирана *mef* генима (ефлукс макролидима) [208]. Описано је већ неколико *mef* гена, а најчешћи међу њима је *mefA* ген [209]. *mefE* ген је прво описан код *S. pneumoniae* и он дели 90% ДНК и 91% аминокиселина са *mefA* геном, односно, његовим протеином [210]. Присуство овог гена је такође потврђено у изолатима *S. pyogenes* [211]. Разлика између *mefA* и *mefE* гена је епидемиолошки важна зато што их носе различити генетски елементи, а њихов начин преношења је различит [212, 213]. Код *S. pyogenes* су нађени и други *mef* гени, као што су *mefI*, *mefO* и мозаик структура *mef* гена, код које је 5' регион идентичан оном код *mefA* и 3' регион идентичан оном код *mefE* [211, 214]. *mefA* ген је обично повезан са химеричним елементом, састављеним од транспонзона инсертованог у профаг [215], док су *mefE* гени често повезани са сложеним транспонзонима, у којима се налазе и други гени резистенције [213]. Генетски елементи који носе *mef* гене су већ показали способност хоризонталног преношења унутар врсте *S. pyogenes* [207, 216, 217]. Ген *mefA* код бактерија *S. pyogenes* и ген *mefE* нађен код *S. pneumoniae* и *Enterococcus* spp., доводе до резистенције на 14-члане и 15-члане макролиде и осетљивости на линкозамиде и стрептограмине (M фенотип резистенције) [218]. Бактерије рода *Enterococcus*, према досадашњим истраживањима, могу имати у свом геному и *msrC* ген, који кодира активно избацивање макролида и стрептограмина групе Б [201].

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

1.10.3 Модификација антибиотика

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

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

Овај ензим је одговоран за настанак резистенције на линкозамиде и стрептограмине Б (LSb фенотип резистенције) [220]. Насупрот MLSb фенотипу резистенције, специфична резистенција на линкозамиде настаје ензимском инактивацијом антибиотика. Фосфорилација и нуклеотидилација хидроксил групе на позицији 3 је била запажена код неколико врста стрептомицета [221, 222]. Линкозамид нуклеотидилтрансферазе кодиране *lnu* генима (претходно *lin*) су биле проучаване и код људи и код животињских врста [223, 224, 225, 226]. Код клиничких изолата било је описано 6 *lnu* гена: *lnuA*, *lnuA'*, *lnuB*, *lnuB-like*, *lnuA_{N2}* и *linF* [227, 228, 229, 230, 231]. О-нуклеотидилтрансферазе кодиране овим генима инактивирају аденилацију линкозамида [227, 229]. *lnuA* и *lnuA'* гени су нађени код врсте *S. haemolyticus* и *S. aureus* [228, 229]. *lnuA* и *lnuA'* кодирају два изоензима од 161 аминокиселине, који се разликују у 14 аминокиселина. *lnuA_{N2}* ген, хомологан *lnuA* и *lnuA'* генима (55% идентичности), је нађен код бактерија *Bacteroides* spp. [231]. Овај ген носе мобилни транспозони. *lnuB* ген је описан код врсте *E. faecium* [227]. *lnuB* ген не показују хомологију са другим *lnu* генима и носи га велики конјугабилни плазмид. Недавно су идентификовани *lnuB-like* ген (79% идентичности са *lnuB*) и *linF* ген (34,9% идентичности са *lnuB*) код *Eubacterium*, односно код врсте *Escherichia coli* [230]. Код *E. coli*, *linF* ген даје унакрсну резистенцију на линкомицин и клиндамицин, док код других микроорганизама, *lnu* гени дају резистенцију на линкомицин али не и на клиндамицин. Међутим, клиндамицин у том случају више не делује бактерицидно на осетљиве сојеве [226]. Нови *lnuC* ген даје резистенцију на линкомицин код клиничких сојева *S. agalactiae*.

Иzolована резистенција на линкозамиде која дефинише L фенотип је ретка и описана је код *S. agalactiae*. Недавно су на Новом Зеланду пријављени сојеви *S. agalactiae* интермедијарно осетљиви или резистентни на клиндамицин и линкомицин, а осетљиви на еритромицин [141]. Међутим, ова резистенција на линкозамиде је комбинована са

високом вредношћу MIC-а за далфопристин (4 до 32 $\mu\text{g/ml}$), стрептограмин групе А, што дефинише такозвани LСа фенотип. Биохемијска и генетска основа ове резистенције је за сад непозната.

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

Нови ген, назван *lnuC*, није тако блиско сродан другим *lnu* генима. Масеном спектрофотометријом је доказано да он доводи до резистенције на линкомицин због нуклеотидилације антибиотика. Прецизно место нуклеотидилације линкомицина и клиндамицина није описано. LnuА нуклеотидилтрансфераза модификује хидроксил групу на клиндамицину и линкомицину на позицији 3, односно 4. Насупрот томе, LnuВ модификује хидроксил групу на позицији 3 и на клиндамицину и на линкомицину. *lnuC* ген је посредовао у инактивацији и линкомицина и клиндамицина у Грам-позитивној бактерији и у трансформисаној *E. coli*. Међутим, код *S. agalactiae* је била констатована само резистентност на линкомицин, док је код *E. coli* била констатована резистентност и на линкомицин и на клиндамицин. Разлог за различиту фенотипску експресију гена резистенције остаје неразјашњен. Можда је структурна разлика између два линкозамида повезана са разликама у афинитету клиндамицина и линкомицина за везивање на рибозому код Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија и за LnuС ензим. Клиндамицин можда има већи афинитет за рибозоме Грам-позитивних бактерија него за LnuС ензим. Ген *lnuC* је лоциран на генетском елементу који садржи IS1 транспозаза ген и који је карактеристичан по несавршеним инвертованим понављањима. Структура овог генетског елемента је слична али не и идентична структури транспонзона, а постоје и сличности и разлике између овог генетског елемента и класичних инсерционих секвенци.

1.11 D-тест

Још давне 1969. године примећена је повезаност резистентности на еритромицин и клиндамицин [233]. Касније је показано да се индуцибилна резистенција на клиндамицин може конвертовати у конститутивну [234], а бројни извештаји о неуспеху

терапије инфекција изазваних стафилококама, које показују индуцибилни тип MLS резистенције, потврђују претходне налазе [235, 236].

Клиндамицин осетљив и еритромицин резистентан сој бактерије може развити резистенцију на клиндамицин [81]. Производ *erm* гена је рибозом метилаза чија је експресија нормално минимална. Еритромицин индукује продукцију метилазе, због чега су ти сојеви резистентни на еритромицин, али мутација у региону промотера *erm* гена доводи до продукције метилаза без индуктора [204, 237]. Ови мутанти су конститутивно еритромицин и клиндамицин резистентни, мада се еритромицин резистенција може јавити и захваљујући другим механизмима (тј. ефлукс пумпа и ензимска модификација лека) [238]. D-тест идентификује индуцибилну клиндамицин резистенцију која указује на могућност конвертовања индуцибилне у конститутивну клиндамицин резистенцију [239]. Ниски нивои еритромицина су најефикаснији индуктори индуцибилне MLSb резистенције. Постоје специјални диск дифузиони тестови који детектују, уз помоћ еритромицина као индуктора, сојеве са iMLSb фенотипом резистенције [237]. Ови тестови подразумевају стављање еритромицин диска у непосредној близини диска са клиндамицином или линкомицином. Пошто еритромицин дифундује кроз агар, индукује резистентност на линкозамиде, доводећи до заравњења зоне инхибиције око линкозамида на страни окренутој према диску еритромицина, дајући јој облик великог латиничног слова D (ефекат D-зоне). Јенсен и сар. су сугерисали да је мањи простор између дискова у односу на стандардни, неопходан за добијање индуцибилне резистенције, оптимално растојање између дискова је од 10 до 15 mm; растојање 20 mm између дискова и већа концентрација еритромицина (30 µg) се такође препоручују [193].

Позитивни D-тест указује на присуство *erm* гена који могу довести до конститутивне клиндамицин резистенције и неуспеха у лечењу инфекције клиндамицином [239]. Осетљивост D-теста за детекцију iMLSb сојева који садрже *ermA* или *ermC* ген била је 100% на 15 до 20 mm и 97% на 26 до 28 mm за *S. aureus*, док је за коагулаза негативне стафилококе била 100% на 20 и 26 mm растојања између дискова [193]. Осетљивост D-теста са 15-20 mm растојања између дискова еритромицина и клиндамицина била је 100% у поређењу са анализом реакције ланчаног умножавања (енг. polymerase chain reaction (PCR)) *erm* и *msr* гена [193, 240, 241]. Клинички изолати који показују iMLSb фенотип резистенције имају високу стопу спонтаних мутација, употреба не-индукторских антибиотика као што је клиндамицин могу довести до селекције

конститутивних мутаната са учесталошћу од 10-7 cfu (енг. colony forming units, јединица формираних колонија) [242, 243, 244]. МекГи и други истраживачи су потврдили ову брзу *in vitro* конверзију индуцибилне у конститутивну MLSb резистенцију код стафилокока [242]. Постоје бројни случајеви лоших исхода лечења озбиљних инфекција изазваних сојевима стафилокока са iMLSb фенотипом резистенције клиндамицином или линкомицином [242, 245]. Клиндамицин је био дуго времена коришћен за лечење кожных, инфекција меког ткива и озбиљнијих инфекција, и то све због његове ефикасности против MRSA и MSSA сојева, као и анаеробних бактерија. Индуцибилна клиндамицин резистенција је довела у питање употребу клиндамицина код еритромицин резистентних стафилокока. Међутим, уколико индуцибилна резистенција може бити рутински поуздано откривена код клинички значајних изолата, клиндамицин се може са сигурношћу употребити код пацијената инфицираним сојевима бактерија које показују "праву" клиндамицин осетљивост [242]. CLSI препоручује растојање између дискова од 15 до 26 mm [246].

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

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

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

2 ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

2.1 Циљеви истраживања

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

2.2 Хипотезе истраживања

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

3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1 План истраживања

Истраживање спроведено у оквиру ове студије имало је две фазе:

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

3.2 Узорковање и примарна изолација

Бактерије су биле изоловане из редовног материјала који је упућиван из пријемних амбуланти свих шест општина Пчињског округа у Центар за микробиологију Завода за јавно здравље у Врању, у периоду између новембра 2013. и априла 2014. године. Завод за јавно здравље у Врању налази се на територији Пчињског округа смештеног на југу Србије (Слика 3). Пчињски округ има површину од 3.520 km², приближно 245.000 становника и чини га град Врање и општине Владичин Хан, Сурдулица, Босилеград, Трговиште, Бујановац и Прешево.



Слика 3. Положај Пчињског округа у оквиру територије Републике Србије

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

3.3 Бактеријски сојеви

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

3.4 Методе анализе бактеријских сојева

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

3.4.1 Микробиолошко испитивање

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

3.4.1.1 Идентификација бактерија

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

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

Тест коагулазе у епрувети је вршен тако што је 0,5 ml хумане плазме (растворене физиолошким раствором у односу 1:5) одмеравано у стерилну епрувету. Затим је у епрувету додавано 0,1 ml једнодневне културе стафилококног бујона. Позитивна контрола *S. aureus* ATCC 25923 и позната негативна контрола су постављане истовремено. Епрувете се инкубирају 4 сата на 37°C. Формација угрушка се виде лаганим нагињањем епрувете после 4 сата. Уколико се угрушак није видео после 4 сата, епрувета је даље инкубирана на собној температури и читавана после 18 до 24 сата. Тест је сматран позитивним уколико се могао видети било који степен згрушавања. Тест је сматран негативним уколико није било згрушавања чак ни после 18 до 24 сата инкубације.

На манитол сланом агару ("Charman" подлози), од 18 до 24 сата инкубирали смо суспектне колоније на стафилокок. Посматрали смо присуство жуто пребојених колонија које су указивале на ферментацију манитола и на толеранцију бактерија на 7,5% концентрацију соли. Кремасто/златно жуте, бета-хемолитичке колоније, каталаза позитивне, коагулаза позитивне и манитол ферментујуће су биле идентификоване као *S. aureus*. Кремасто/беле колоније, каталаза позитивне, коагулаза негативне и манитол неферментујуће су биле идентификоване као коагулаза негативне стафилококе.

- *Streptococcus pneumoniae*: Прелиминарна идентификација вршена је према фенотипским карактеристикама колонија примарне културе на крвном агару

(морфологија и α -хемолиза), после инкубације на 35°C, 24 сата. Тест каталазе за *S. pneumoniae* је био негативан. У каталаза тесту, каталаза ензим разлаже водоник пероксид (H₂O₂) који се дода у капима на суспектне колоније, на H₂O и O₂. Код каталаза позитивних колонија кисеоник се ослобађа у виду мехурића. Каталаза тест примарно служи за диференцијацију бактерија рода *Staphylococcus*, које су каталаза позитивне, од бактерија рода *Streptococcus* и *Enterococcus*, које су каталаза негативне. Потврдна идентификација *S. pneumoniae* је вршена тестом осетљивости на оптохин (etilhidrokuprein hidrohlorid) [249].

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

хемолитичких стрептокока рађена је латекс аглутинацијом на плочици (Streptex-Slides® Strepto Plus-bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) [251].

3.4.1.2 *Тестирање антибиотске осетљивости*

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

Употребљавани су следећи антибиотски дискови:

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

Плоче су биле инкубирани на 37°C, 18 до 24 сата. За читавање резултата теста мерили смо пречнике зона инхибиције. Антибиотска активност читавана је као пречник зоне инхибиције у mm. Изолати су били класификовани као осетљиви (S), резистентни (R) и

интермедијарно осетљиви (I), према критеријумима CLSI [28]. За контролу квалитета коришћени су контролни сојеви *S. pneumoniae* ATCC 49619 и *S. agalactiae* ATCC 12403. Контрола квалитета (енг. Quality control (QC)) за еритромицин (Er) и клиндамицин (Kli) дискове била је извршена са *S. aureus* ATCC 25923 према стандардној диск дифузионој QC процедури [255]. Додатно, QC је била вршена са сопственим лабораторијским сојевима *S. aureus*, од којих су једни имали позитиван а други негативан резултат D-теста [255]. Резултати су интерпретирани према CLSI препорукама из 2012. године [256].

3.4.1.3 Метицилин резистенција

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

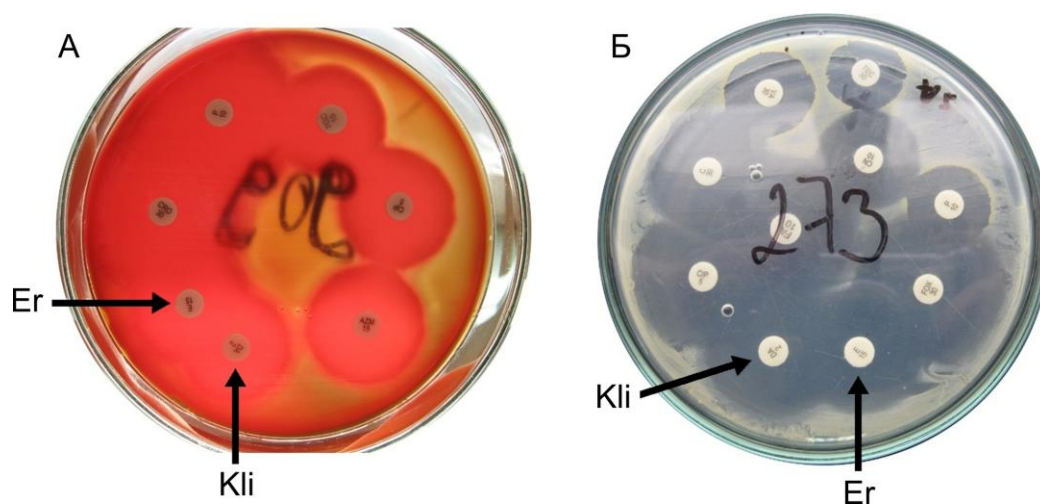
3.4.2 Утврђивање фенотипова MLS резистенције

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

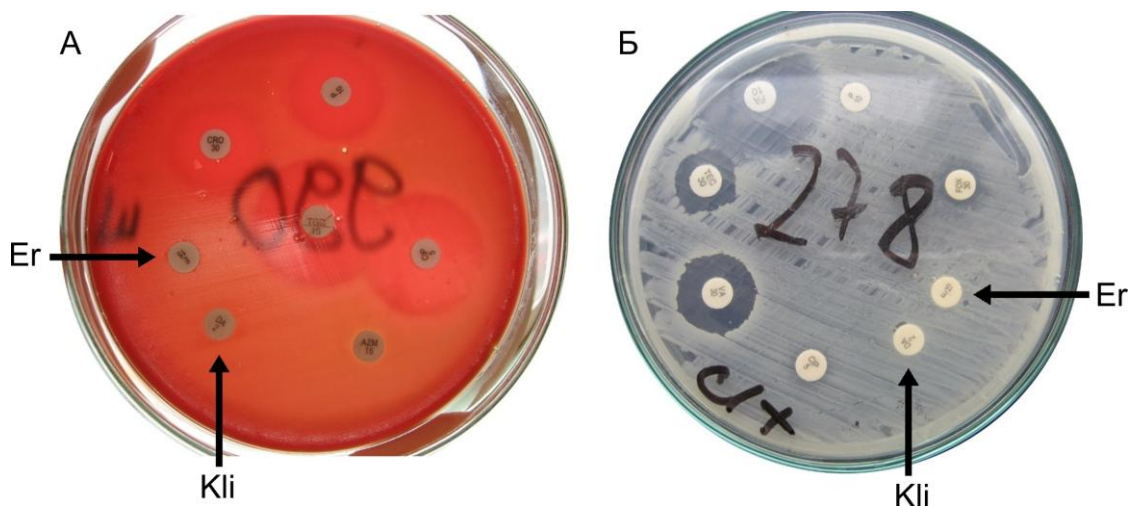
У дупли диск дифузионом тесту (D-тест) смо инокулисали Милер Хинтон и Милер Хинтон са 5% овчијом крви подлоге суспензијом бактерија густине 0,5 МекФарланда. Еритромицин (15µg/ml) диск је стављан на удаљености од 12 mm (ивица од ивице) од клиндамицин (2 µg/ml) диска. После једноноћне инкубације на 37°C,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

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

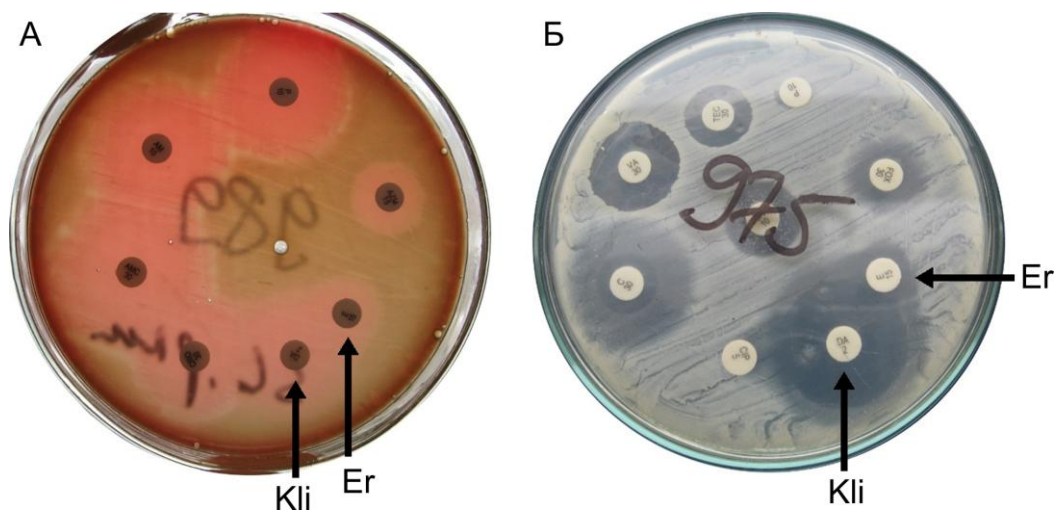
- Er/Kli S - изолат осетљив на еритромицин (пречник зоне инхибиције ≥ 23 mm) и осетљив на клиндамицин (пречник зоне инхибиције > 21 mm) (Слика 4).
- cMLSb - конститутивни MLSb фенотип - изолат резистентан на еритромицин (пречник зоне инхибиције ≤ 13 mm) и резистентан на клиндамицин (пречник зоне инхибиције ≤ 14 mm) (Слика 5).
- M/MSb фенотип - изолат показују резистенцију на еритромицин (пречник зоне инхибиције ≤ 13 mm) и осетљивост на клиндамицин (пречник зоне инхибиције > 21 mm) (Слика 6).
- iMLSb - индуцибилни MLSb фенотип - изолат показује резистенцију на еритромицин (пречник зоне инхибиције ≤ 13 mm) и осетљивост на клиндамицин (пречник зоне инхибиције > 21 mm), зона инхибиције облика слова D око клиндамицина са заравњењем према еритромицин диску (Слика 7).
- L_{Sa/b} - изолат осетљив на еритромицин (пречник зоне инхибиције ≥ 23 mm) и резистентан на клиндамицин (пречник зоне инхибиције ≤ 14 mm) (Слика 8).
- Нови "keyhole" фенотип - изолат осетљив на еритромицин (пречник зоне инхибиције ≥ 23 mm) и резистентан на клиндамицин (пречник зоне инхибиције ≤ 14 mm) са каналом осетљивости између диска еритромицина и клиндамицина указује на нови такозвани "keyhole" фенотип [246, 258] (Слика 9).



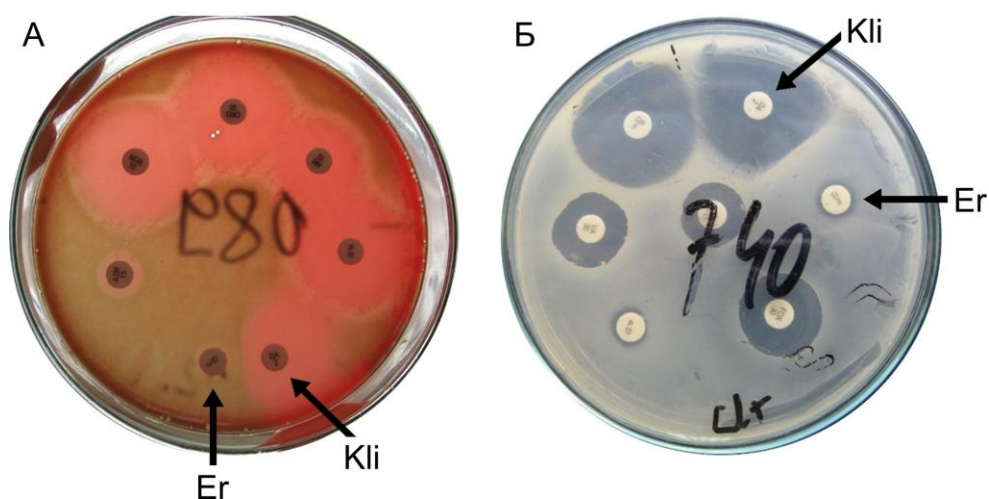
Слика 4. Диск дифузиона метода на Милер-Хинтон агару за израду антибиограма и D-тест (еритромицин и клиндамицин дискови обележени су стрелицама); **А:** Еритромицин осетљиви и клиндамицин осетљиви сој *S. pyogenes* (Er/Kli S); **Б:** Еритромицин осетљиви и клиндамицин осетљиви сој *S. aureus* (Er/Kli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



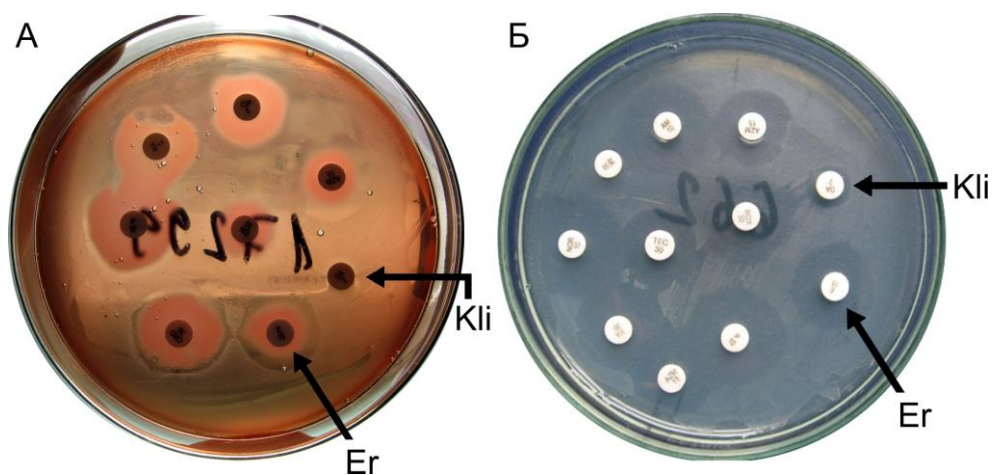
Слика 5. Диск дифузиона метода на Милер-Хинтон агару за израду антибиограма и D-тест (еритромицин и клиндамицин дискови обележени су стрелицама); **А:** Еритромицин резистентни и клиндамицин резистентни сој *S. agalactiae* (сMLSb); **Б:** Еритромицин резистентни и клиндамицин резистентни сој коагулаза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



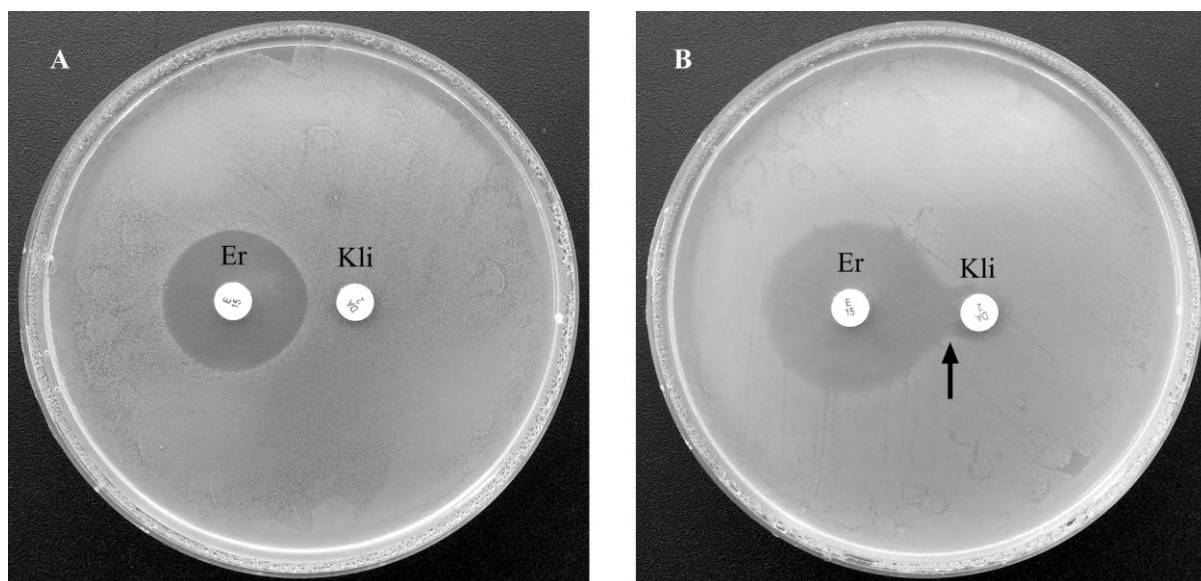
Слика 6. Диск дифузиона метода на Милер-Хинтон агару за израду антибиограма и D-тест (еритромицин и клиндамицин дискови обележени су стрелицама); **А:** Еритромицин резистентни и клиндамицин осетљиви сој *S. pneumoniae* (M/MSb); **Б:** Еритромицин резистентни и клиндамицин осетљиви сој коагулаза негативног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



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



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



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

3.4.3 Идентификација гена MLS резистенције

3.4.3.1 Изолација DNK и PCR прајмери

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

95°C до 100 °C, 10 минута. За то време смо припремили други сет епрувета за микроцентрифугирање од 2 ml и означили их бројевима узорака. После вађења епрувета из термостата, остављене су на собној температури 2 минута, а затим су центрифугиране у микроцентрифуги на највећој брзини 2 минута. Затим је пребачено по 50µl супернатанта из сваке центрифугиране епрувете у други сет означених епрувета. После завршетка екстракције DNK, епрувете за микроцентрифугирање су чуване на -20°C све до започињања термичког циклусног протокола, односно умножавања DNK.

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

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

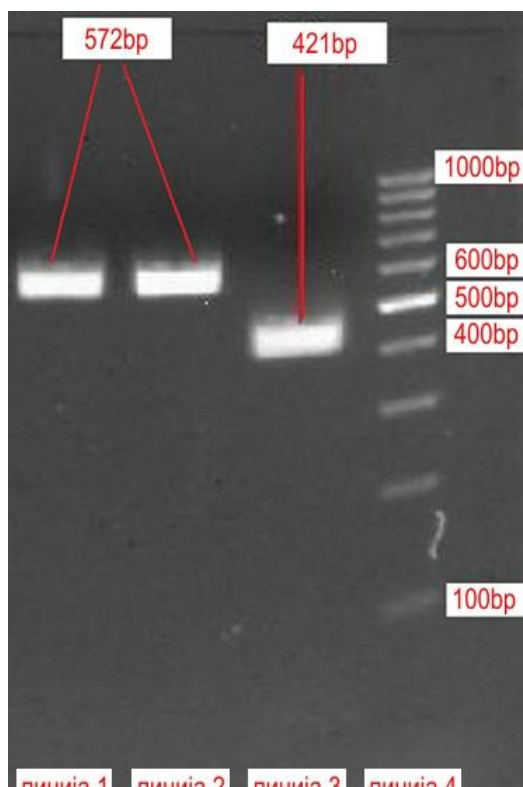
Ген	Секвенца прајмера (5'-3') Величина секвенце Референца	Услови PCR реакције
<i>ermA</i>	F: TCTAAAAAGCATGTAAAAAGAA R: CTTCGATAGTTTATTAATATTAG 421bp [259]	95°C 180s; 40 циклуса (95°C 30s, 52°C 40s, 72°C 120s); 72°C 120s.
<i>ermB</i>	F: GAAAAGTACTCAACCAAATA R: AGTAACGGTACTTAAATTGTTTA 639bp [259]	95°C 180s; 40 циклуса (95°C 30s, 52°C 40s, 72°C 120s); 72°C 120s.
<i>ermC</i>	F: TCAAAAACATAATATAGATAAA R: GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT 572bp [259]	95°C 180s; 40 циклуса (95°C 30s, 52°C 40s, 72°C 120s); 72°C 120s.
<i>msrA</i>	F: GGCACAATAAGAGTGTTTAAAGG R: AAGTTATATCATGAATAGATTGCCTGTT 940bp [260]	95°C 180s; 40 циклуса (94°C 60s, 50°C 60s, 72°C 90s); 72°C 120s.
<i>msrB</i>	F: TATGATATCCATAATAATTATCCAATC R: AAGTTATATCATGAATAGATTGCCTGTT 595bp [260]	95°C 180s; 40 циклуса (94°C 60s, 50°C 60s, 72°C 90s); 72°C 120s.
<i>mefA</i>	F: STATGACAGCCTCAATGCG R: ACCGATTCTATCAGCAAAG 1400bp [261]	95°C 180s; 40 циклуса (95°C 30s, 50°C 40s, 72°C 120s); 72°C 120s.
<i>mefE</i>	F: AAAACTGCAGGCGTTTAAAGATAAGCTGGC R: CCAATGCATCCTGCACCATTTGCTCCTAC 1355bp [210]	95°C 180s; 40 циклуса (95°C 30s, 50°C 40s, 72°C 120s); 72°C 120s.
<i>lnuA</i>	F: GGTGGCTGGGGGGTAGATGTATTAAGTGG R: GCTTCTTTTGAATACATGGTATTTTCGATC 323bp [262]	95°C 180s; 40 циклуса (95°C 30s, 57°C 30s, 72°C 60s); 72°C 120s.
<i>lnuB</i>	F: CСТАССТАТТГТТТГТГГАА R: АТААСГТТАСТСТССТАТТС 925bp [262]	95°C 180s; 40 циклуса (95°C 30s, 54°C 45s, 72°C 120s); 72°C 120s.
<i>lsaA</i>	F: GGCAATCGCTTGTGTTTTAGCG R: GTGAATCCCATGATGTTGATACC 1200bp [136]	95°C 180 s; 40 циклуса (95°C 30s, 55°C 30s, 72°C 120s); 72°C 120s.
<i>lsaC</i>	F: GGSTATGTAACCTGTATTTG R: ACTGACAATTTTCTCCGT 429bp [142]	95°C 180 s; 40 циклуса (95°C 30s, 55°C 30s, 72°C 120s); 72°C 120s.

3.4.3.2 Идентификација гена

Свака реакција била је изведена у коначном волумену од 50 μl и укључивала је 2 μl геномске ДНК, 1 μl (50 nmol/ μl) сваког прајмера (Invitrogen), 25 μL Maxima® Hot Start Green PCR Master Mix (Fermentas) и 21 μl DEPC H₂O. Позитивне и негативне контроле су биле укључене у сваки тест. Умножавање је вршено на SaCycler-96 термосајклеру (Sasace Biotechnologies S.r.l.). Услови под којима су се одвијале реакције ланчаног умножавања приказани су у Табели 1, са временом, температуром и бројем циклуса за сваки прајмер који укључује следеће кораке:

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

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



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

3.5 Статистичка анализа података

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

4 РЕЗУЛТАТИ

4.1 Учесталост резистенције на антибиотике Грам-позитивних кока

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

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

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

^a Метицилин резистентан *S. aureus*

^b Метицилин сензитиван *S. aureus*

^B Коагулаза негативни стафилокок

^r Метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок

^Δ Метицилин сензитивни коагулаза негативни стафилокок

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

стафилококе (MRKNS). Резистентно на цефокситин је било и 32,8% изолата *S. pneumoniae*. Међутим, сви изолати стрептокока су били осетљиви на цефтриаксон.

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

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

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

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

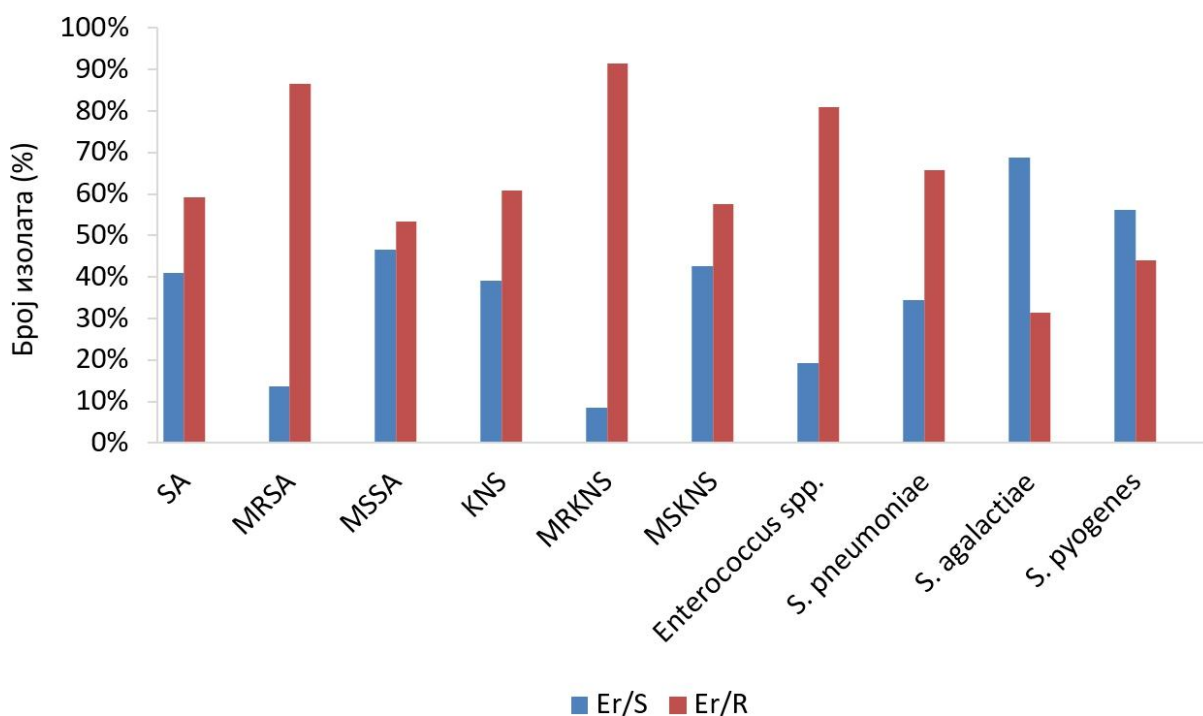
Међу изолатима стафилокока, највећу резистентност на гентамицин су показали изолати MRSA (48,8%) и MRKNS (52,1%), док су изолати MSSA (17,5%) и MSKNS (16,2%) били знатно осетљивији. Међу стрептококама, највећу резистенцију на гентамицин су показали изолати *S. agalactiae* (72,7%), а затим су следили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

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

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

4.2 Учесталост резистенције на еритромицин код Грам-позитивних кока

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



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

4.3 Учесталост MLS фенотипова резистенције код Грам-позитивних кока

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

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

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

^a Метицилин резистентан *S. aureus*

^b Метицилин сензитиван *S. aureus*

^B Коагулаза негативни стафилокок

^r Метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок

^d Метицилин сензитивни коагулаза негативни стафилокок

^b Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

^c Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

^{*} Резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б

³ Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

^u Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

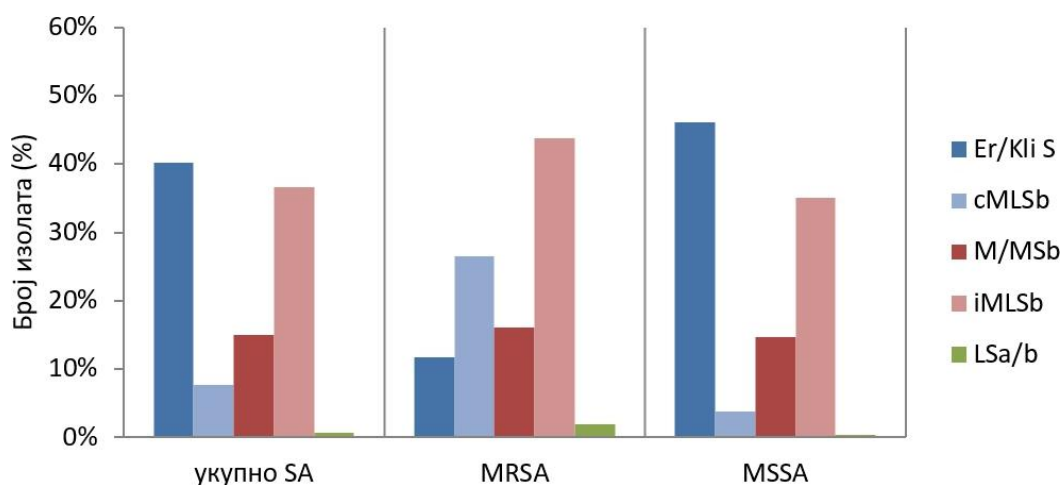
4.3.1 Учесталост MLS фенотипова резистенције код *S. aureus*

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

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

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

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



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

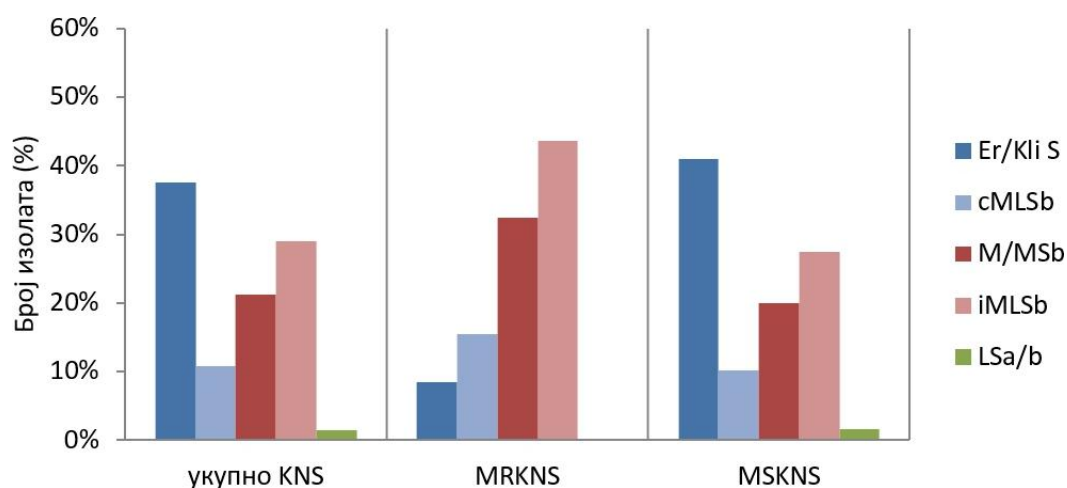
4.3.2 Учесталост MLS фенотипова резистенције код KNS

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

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

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

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

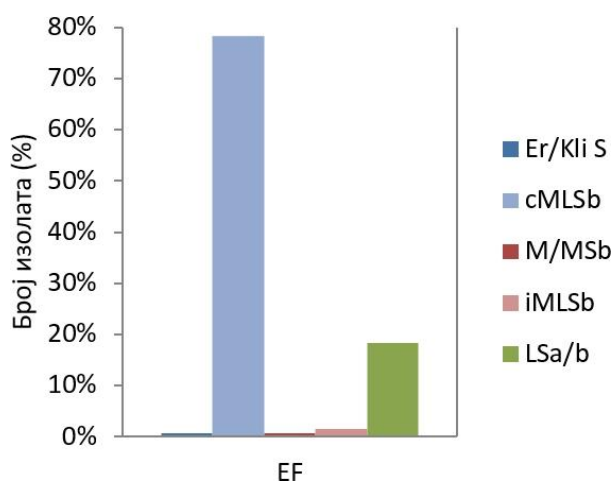


Графикон 3. Учесталост MLS фенотипова резистенције код KNS изолата; KNS - коагулаза негативни стафилокок, MRKNS - метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок, MSKNS - метицилин сензитивни коагулаза негативни стафилокок; Er/Kli S - сензитивни на еритромицин и клиндамицин, cMLSb - конститутивна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

M/MSb - резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б, iMLSb - индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, LSa/b - резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

4.3.3 Учесталост MLS фенотипова резистенције код *Enterococcus spp.*

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



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

4.3.4 Учесталост MLS фенотипова резистенције код стрептокока

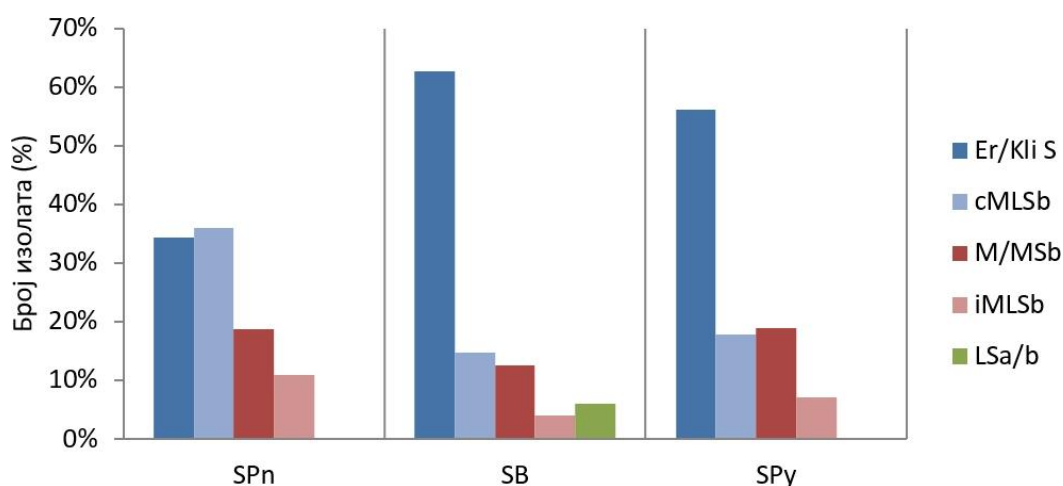
Профил резистенције на MLS антибиотике код различитих врста стрептокока је сличан и ближи је профилу резистенције ентерокока него стафилокока. Слично ентерококама, мада не у тако високом проценту, доминанти фенотип резистенције код стрептокока био је cMLSb, док је iMLSb, насупрот стафилококама, био један од најређе заступљених фенотипова резистенције. *S. pneumoniae* је карактерисала ниска

заступљеност сојева осетљивих на еритромицин и клиндамицин, са друге стране, готово 60% тестираних изолата *S. agalactiae* и *S. pyogenes* је било осетљиво на еритромицин и клиндамицин. Интересантно је да смо нашли код сојева *S. agalactiae*, иако у ниском проценту, L_{Sa/b} фенотип резистенције.

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

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

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

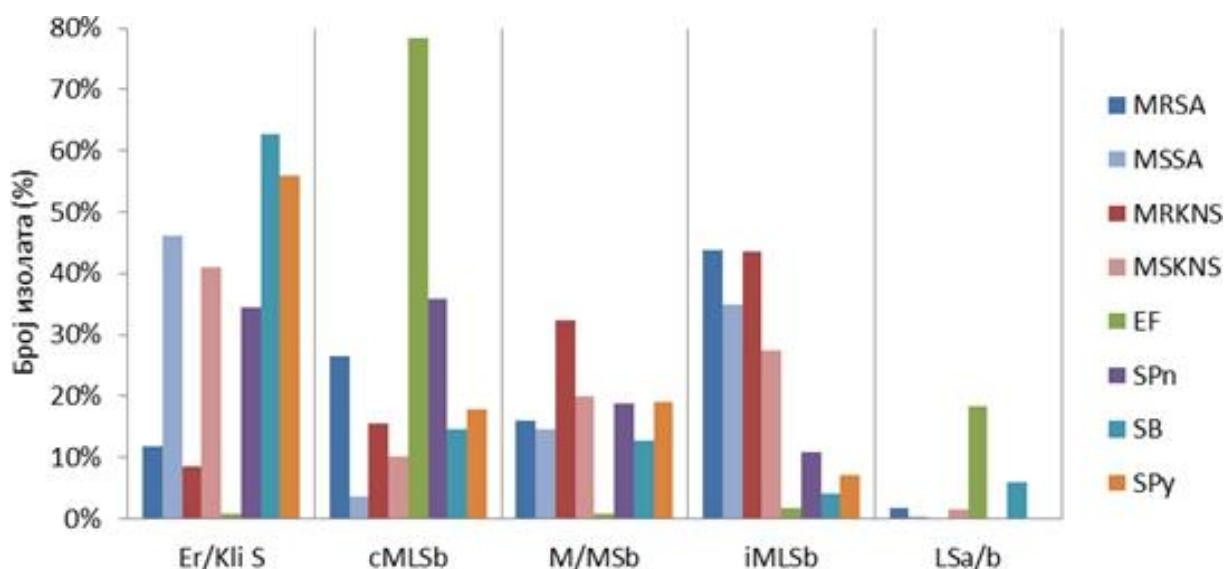


Графикон 5. Учесталост MLS фенотипова резистенције код стрептокока; SPn - *S. pneumoniae*; SB - *S. agalactiae*; SPy - *S. pyogenes*; Er/Kli S - сензитивни на еритромицин и клиндамицин, cMLSb - конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б, M/MSb - резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине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

линкозамиде-стрептограмине групе Б, L_{Sa/b} - резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

4.4 Поређење учесталости MLS фенотипова резистенције код Грам-позитивних кока

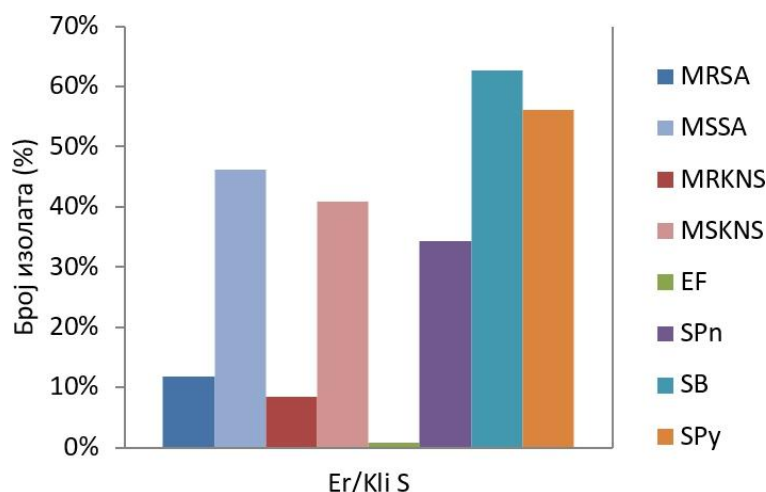
Упоредном анализом учесталости MLS фенотипова резистенције код Грам-позитивних кока, утврдили смо да су cMLSb и L_{Sa/b} фенотип најзаступљенији код изолата *Enterococcus* spp, а iMLSb фенотип међу изолатима MRSA и MRKNS, док је M/MSb фенотип био најзаступљенији код MRKNS изолата. Са друге стране, осетљивост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



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

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

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

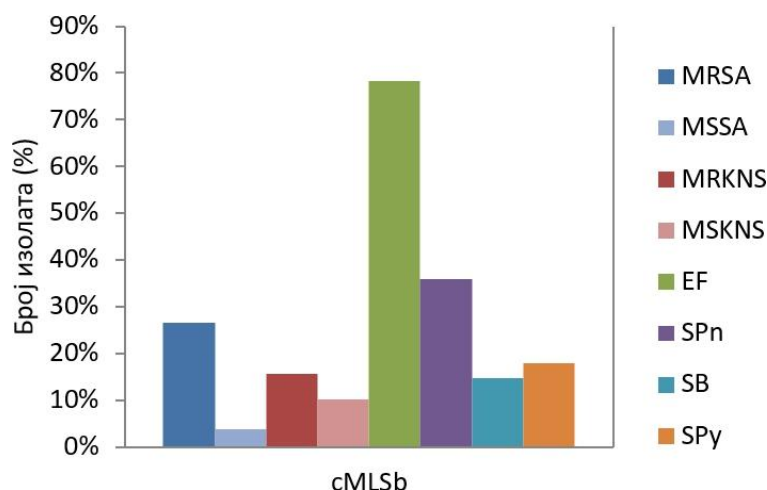


Графикон 7. Учесталост осетљивости на еритромицин и клиндамицин (Er/Kli S) код Грам-позитивних кока; MRSA - метицилин резистентан *S. aureus*, MSSA - метицилин сензитиван *S. aureus*, MRKNS - метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок, MSKNS - метицилин сензитивни коагулаза негативни стафилокок,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

4.4.2 Поређење учесталости cMLSb фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока

Поређењем учесталости cMLS фенотипа резистенције код различитих врста Грам-позитивних кока, утврдили смо да је овај фенотип био статистички значајно најзаступљенији код изолата *Enterococcus* spp. ($p < 0,001$). Мању заступљеност смо

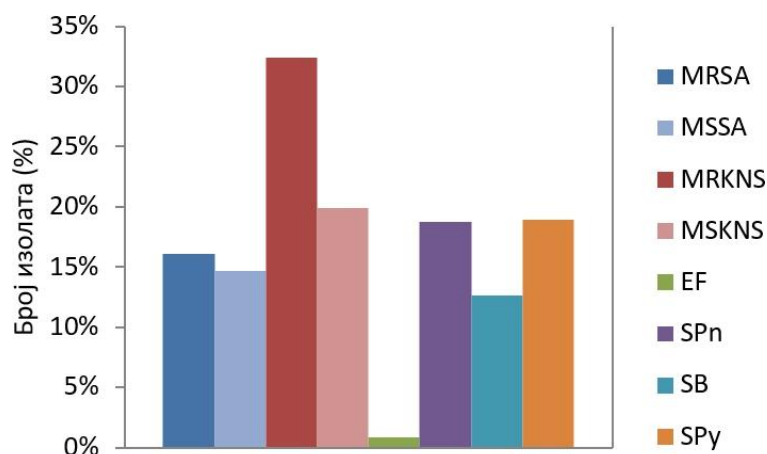
добили код изолата *S. pneumoniae* и MRSA ($p > 0,05$), а најмању код MSSA изолата ($p < 0,05$) (Графикон 8).



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

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

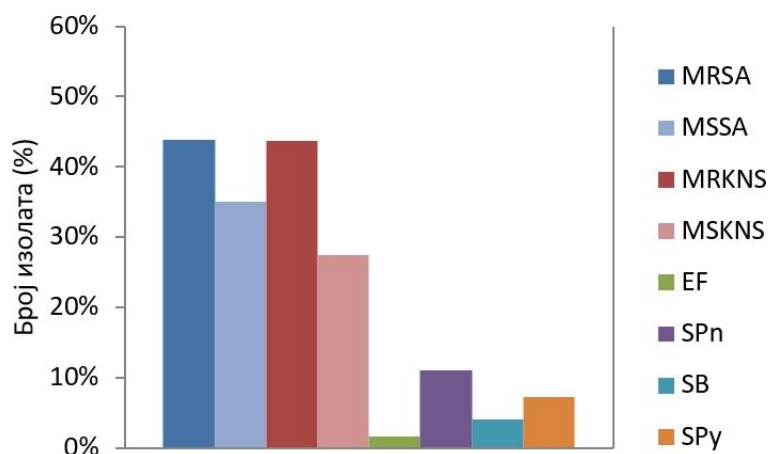
Упоредном анализом учесталости M/MSb фенотипа код различитих врста Грам-позитивних кока, утврдили смо да је овај фенотип најучесталији код изолата MRKNS ($p < 0,05$). Затим по заступљености следе изолати MSKNS, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, MRSA, MSSA и *S. agalactiae* са приближно једнаком учесталошћу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



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

4.4.4 Поређење учесталости iMLSb фенотипа резистенције код Грам-позитивних кока

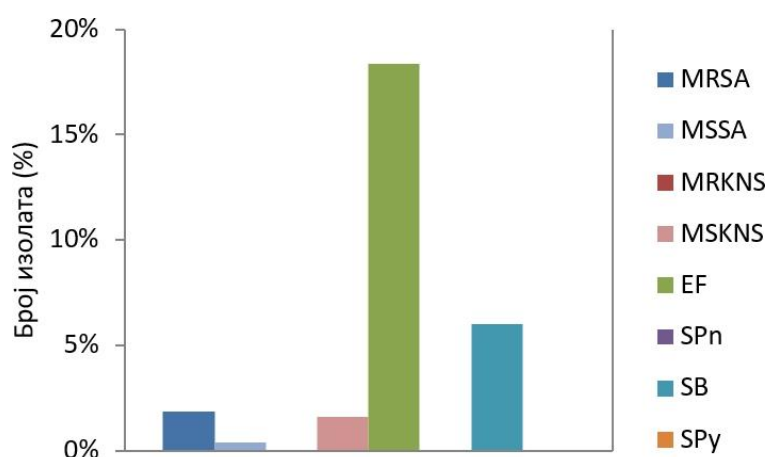
Поређењем учесталости iMLSb фенотипа код различитих врста Грам-позитивних кока, утврдили смо да је овај фенотип био најзаступљенији код изолата MRSA и MRKNS, са статистички значајном разликом у односу на све остале врсте ($p < 0,05$). Затим су по заступљености следили изолати MSSA и MSKNS ($p < 0,05$),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



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

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

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



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

4.5 Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала

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

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

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

^a Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

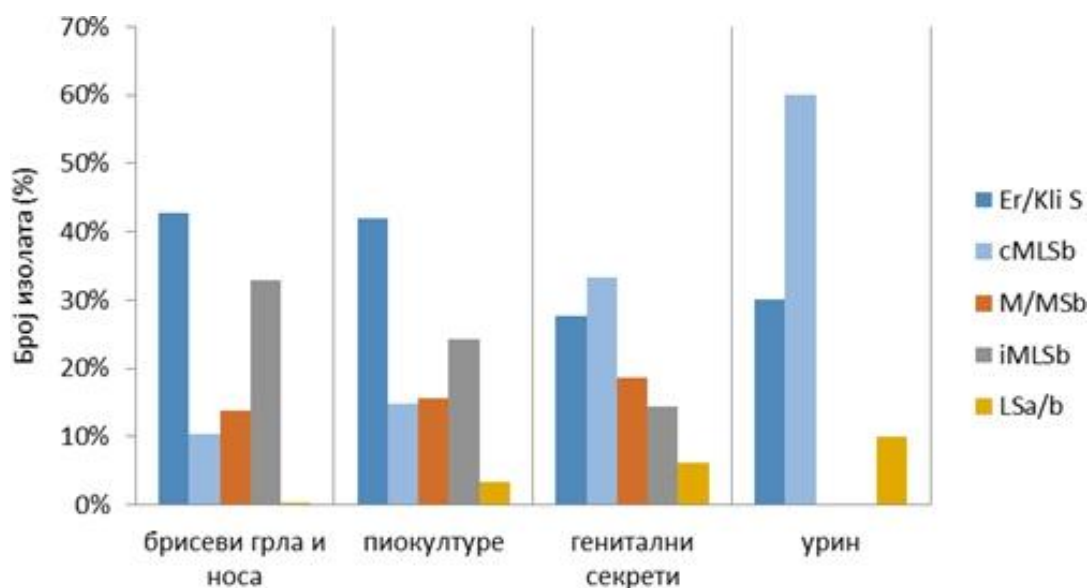
^b Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

^B Резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б

^Г Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

^Д Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

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



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

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

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

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

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

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

^a Метицилин сензитиван *S. aureus*

^b Метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок

^в Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

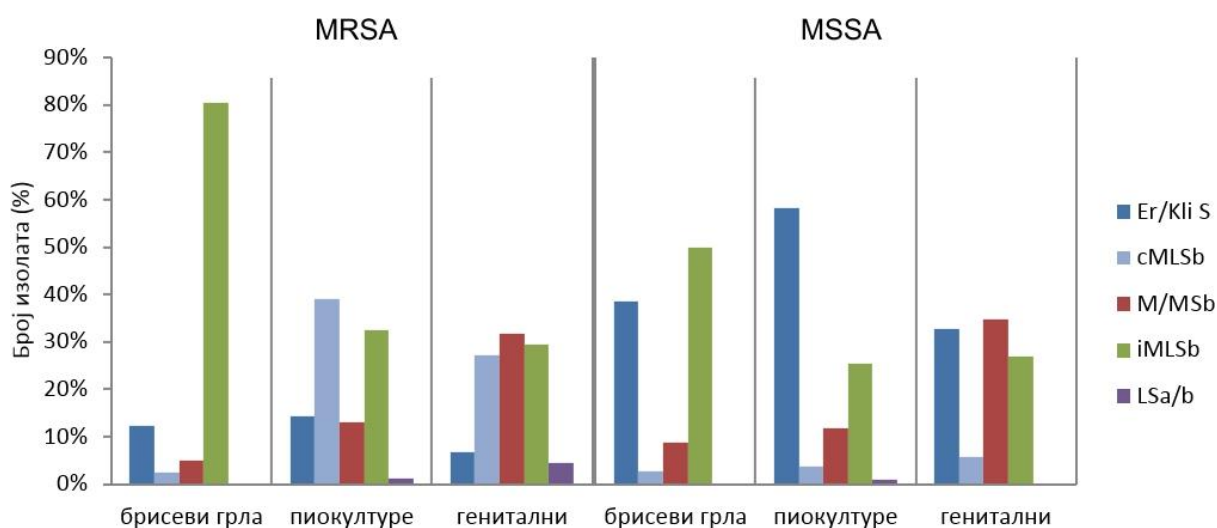
^г Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

^д Резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б

^h Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

^e Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

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



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

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

4.5.2 Учесталост MLS фенотипова резистенције по врсти материјала код KNS изолата

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

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

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

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

^a Метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок

^b Метицилин сензитивни коагулаза негативни стафилокок

[†] Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

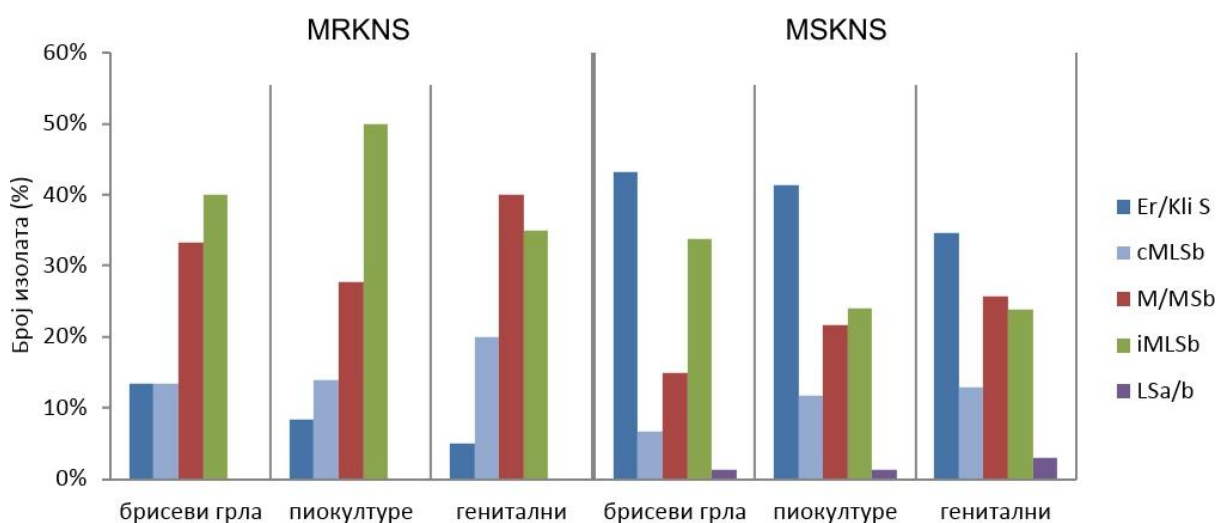
[‡] Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

[§] Резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б

[¶] Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

[¶] Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

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



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

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

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

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

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

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

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

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

^a Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

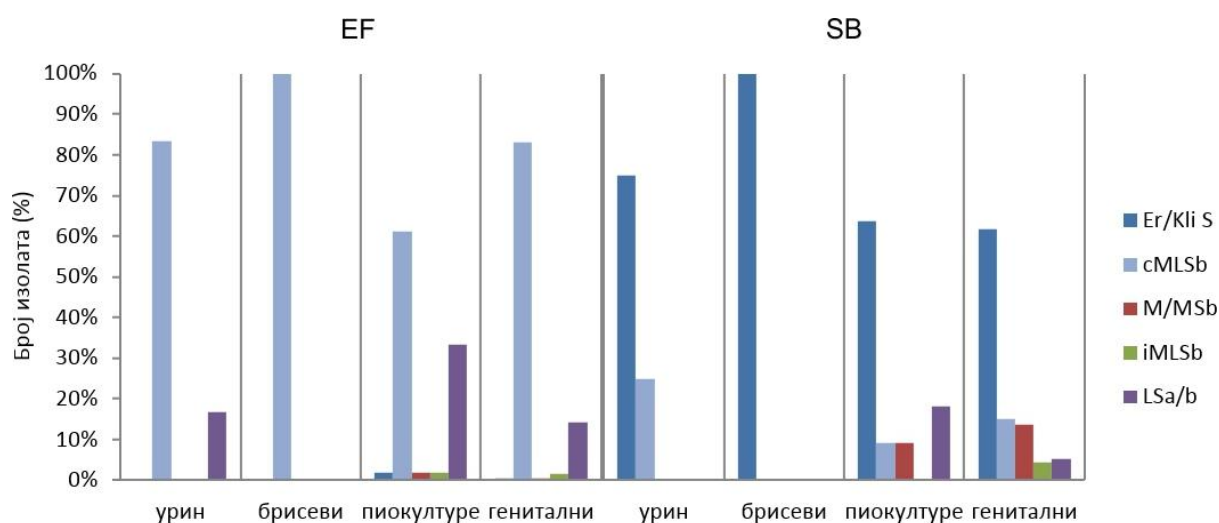
^b Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

^c Резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б

^d Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

^e Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

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



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

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

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

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

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

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

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

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

^a Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

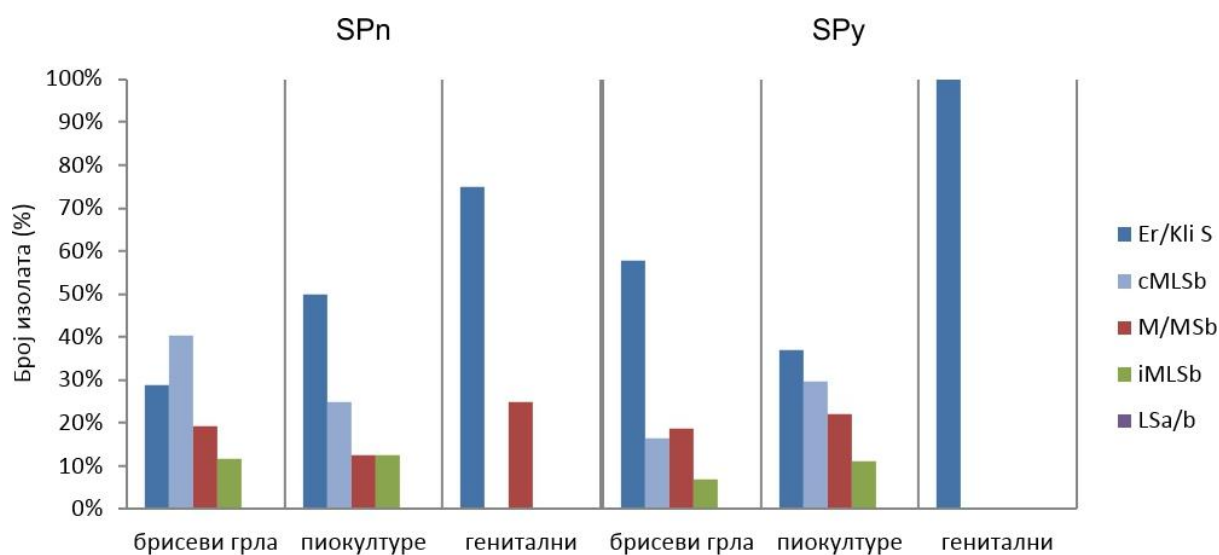
^b Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

^B Резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б

^г Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

^д Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

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



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

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

4.6 Учесталост MLS фенотипова резистенције по пореклу материјала

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

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

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

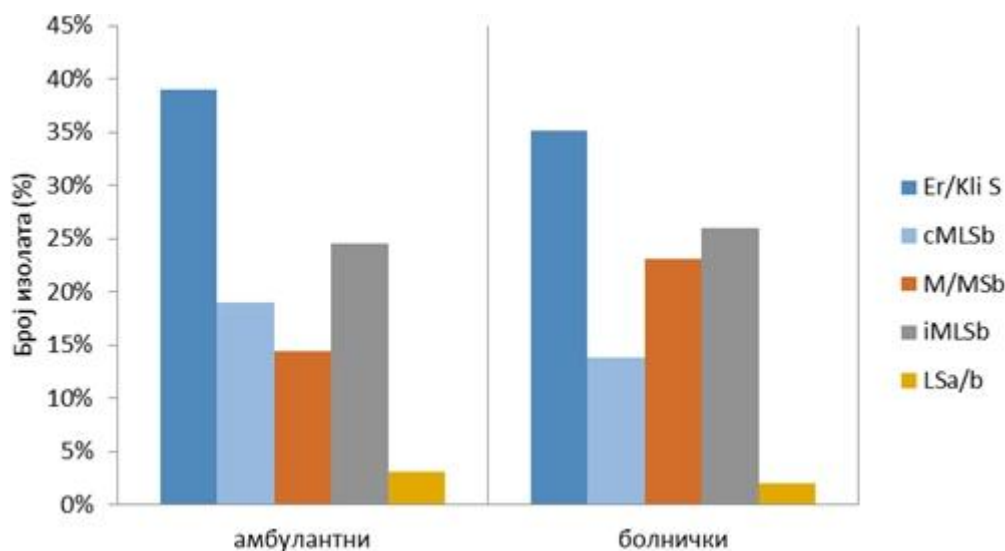
^a Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

^b Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

^в Резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б

^г Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

^д Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б



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

4.6.1 Учесталост MLS фенотипова резистенције по пореклу материјала код стафилокока

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

Табела 10. Учесталост фенотипова резистенције по пореклу материјала код стафилокока

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

^a Метицилин резистентан *S. aureus*

^б Метицилин сензитиван *S. aureus*

^в Метицилин резистентни коагулаза негативни стафилокок

^г Метицилин сензитивни коагулаза негативни стафилокок

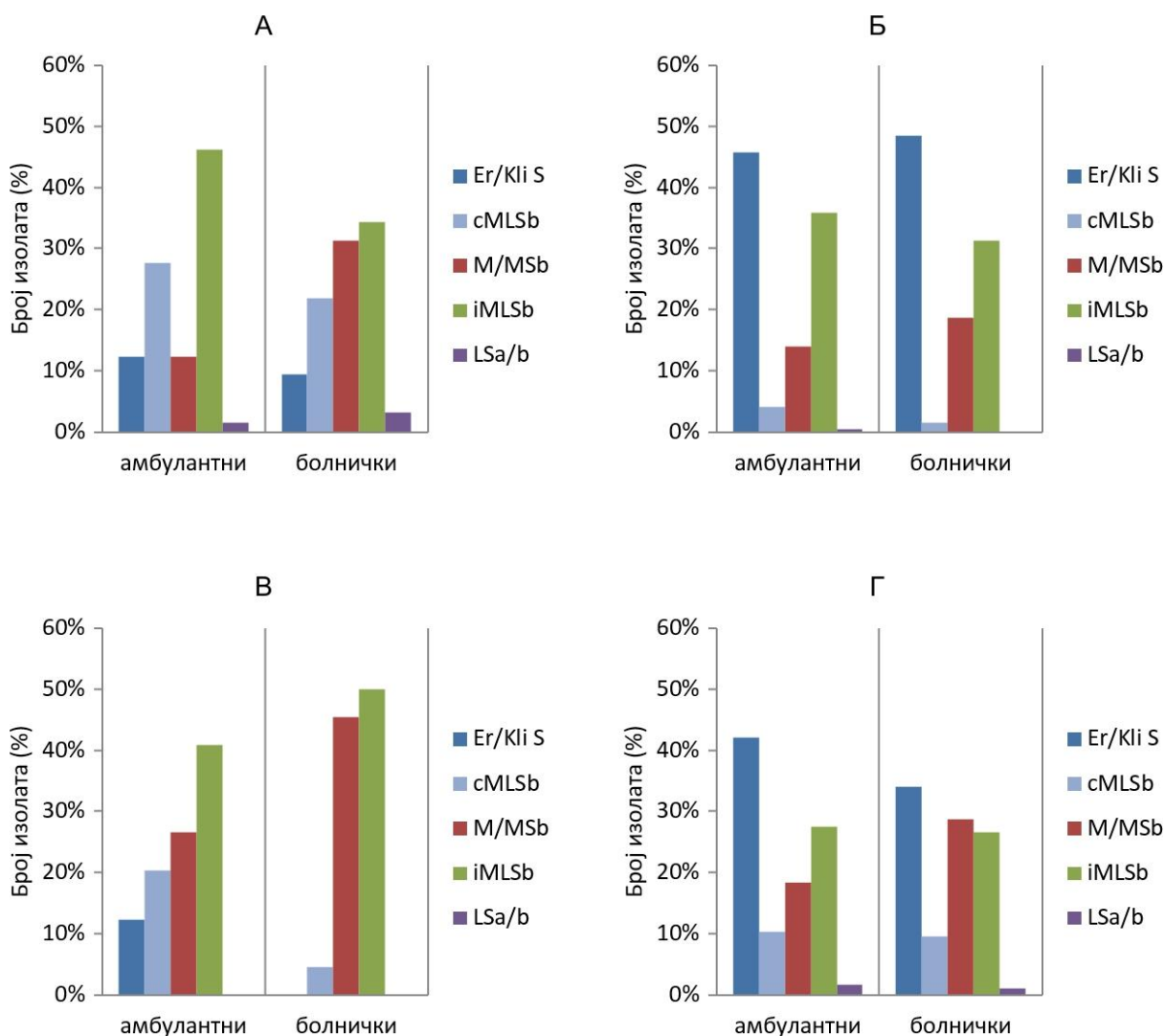
^д Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

^б Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

^с Резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б

^ж Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

^з Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б



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

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

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

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

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

^a Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

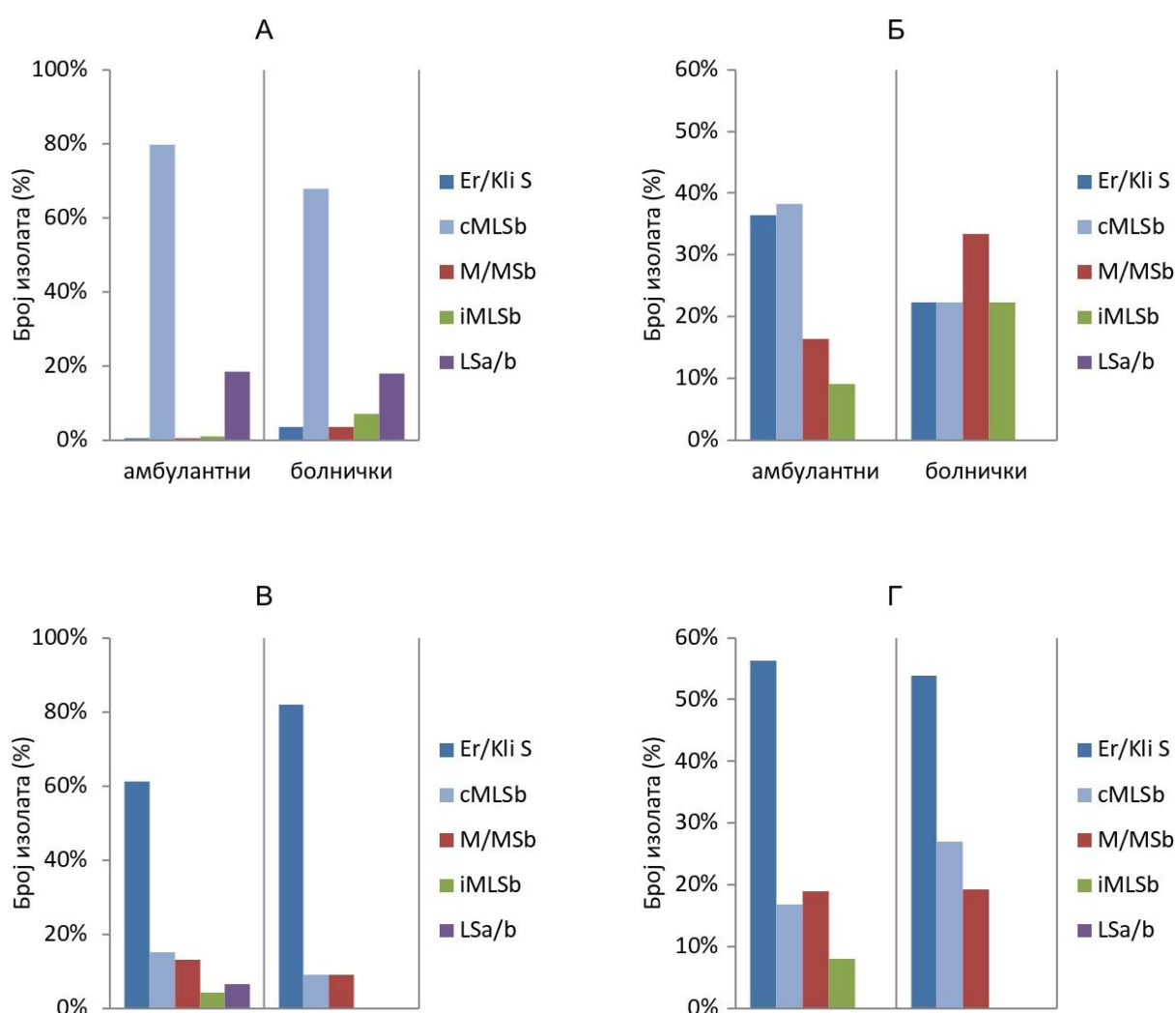
^b Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

^c Резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б

^d Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

^e Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

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

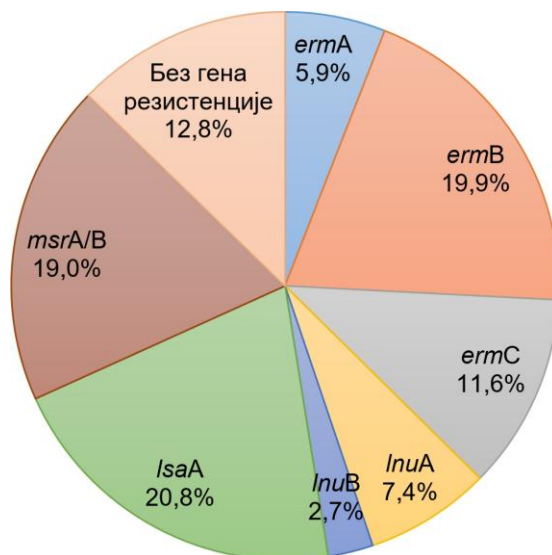


Графикон 19. Учесталост MLS фенотипова резистенције по пореклу материјала; **А:** *Enterococcus* spp.; **Б:** *S. pneumoniae*; **В:** *S. agalactiae*; **Г:** *S. pyogenes*; Er/Kli S - сензитивни на еритромицин и клиндамицин, cMLSb - конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе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

4.7 Учесталост MLS гена резистенције код Грам-позитивних кока

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

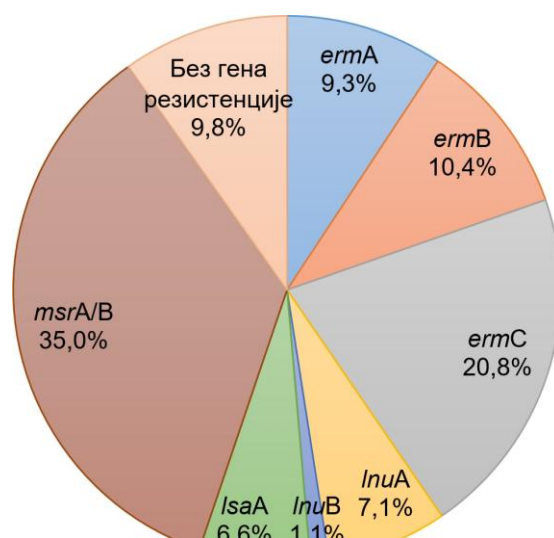
трећем месту по учесталости био је *msrA/B* ген. Код 12,8% изолата Грам-позитивних кока који су показивали iMLSb, M/MSb или L_{Sa/b} фенотип резистенције, нисмо идентификовали MLS гене резистенције (Графикон 20).



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

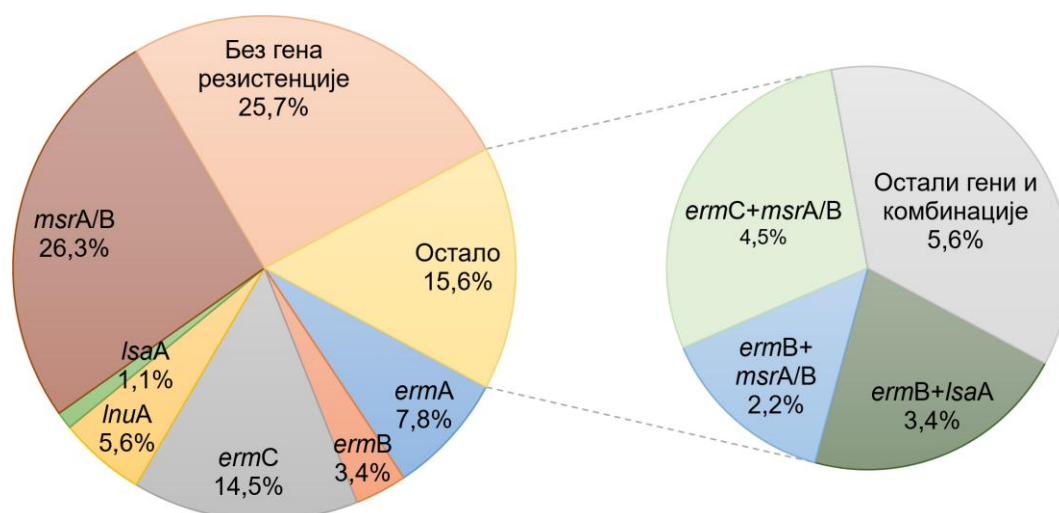
4.7.1 Учесталост MLS гена резистенције код изолата стафилокока

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



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

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



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

4.7.1.1 Учесталост *MLS* гена резистенције код различитих врста стафилокока

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

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

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

^a Метицилин-сензитиван *S. aureus*

^b Метицилин-резистентан *S. aureus*

в Метицилин-сензитиван коагулаза-негативан стафилокок
г Метицилин-резистентан коагулаза-негативан стафилокок

4.7.1.2 Учесталост *MLS* гена резистенције код различитих фенотипова стафилокока

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

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

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

^a Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

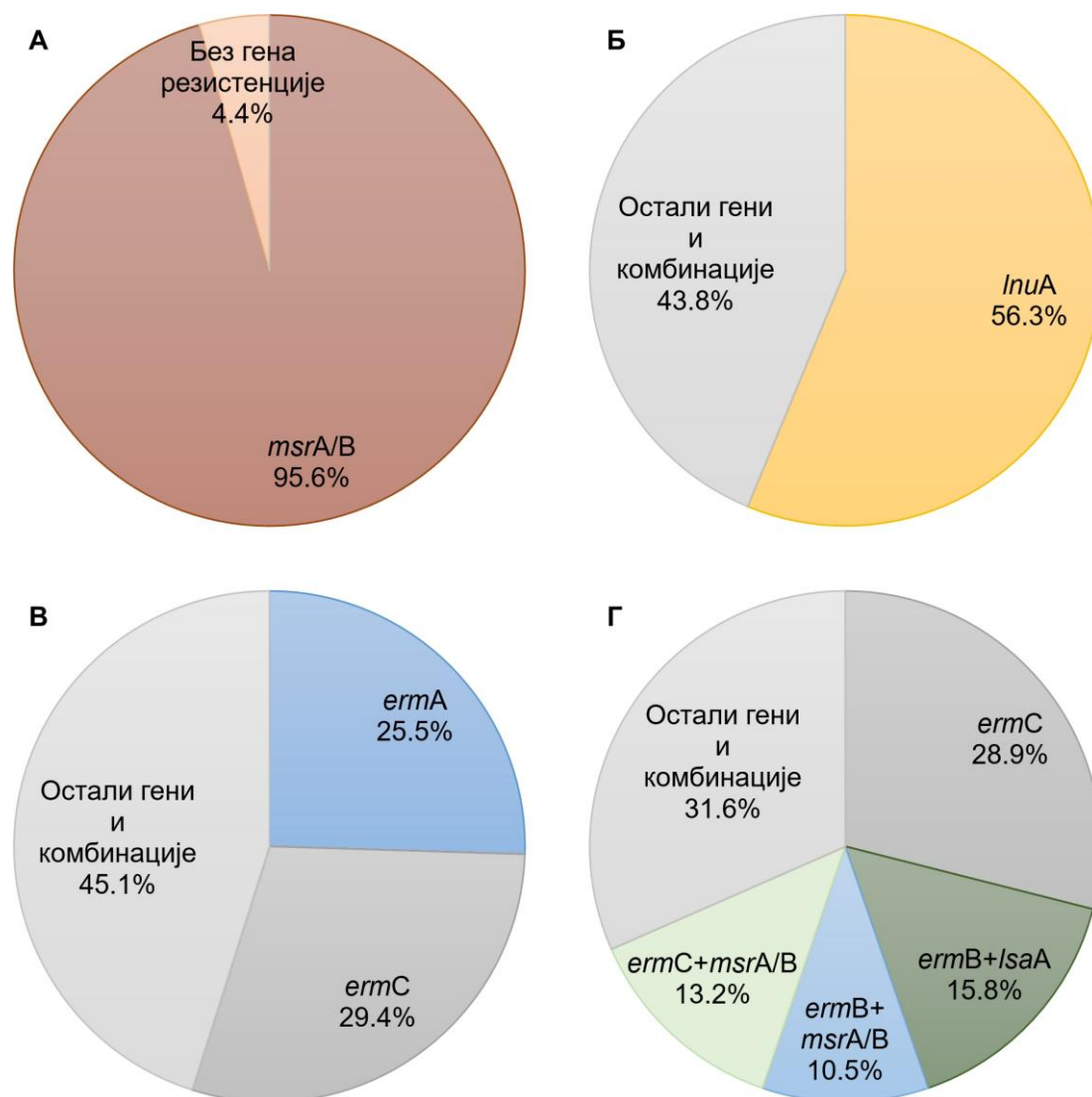
^b Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

^B Резистенција на макролиде/макролиде-стрептограмине групе Б

^c Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

^d Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

M/MSb фенотип резистенције је углавном био детерминисан *msrA/B* (95,6%) (Графикон 23А), а LSa/b претежно *lnuA* геном (56,3%) (Графикон 23Б). *ermC* (29,4%) и *ermA* (25,5%) су били најчесталији појединачни гени који су детерминисали iMLSb фенотип резистенције (Графикон 23В). *ermC* (28,9%) је био најчешћи ген код изолата стафилокока са cMLSb фенотипом резистенције, који је био карактеристичан по великом броју комбинација два или више гена резистенције, а најчешће комбинације гена биле су *ermB+lsaA* (15,8%), *ermC+msrA/B* (13,2%) и *ermB+msrA/B* (10,5%) (Графикон 23Г). Овај тренд је био посебно заступљен код MRSA (58,3%) и MRKNS (90,9%) сојева, односно комбинације гена су доминантно детерминисале cMLSb фенотип код метицилин-резистентних врста стафилокока. У складу са овом опсервацијом, код једног MRKNS соја детектована је комбинација чак четири гена резистенције (*ermB+lnuA+lnuB+lsaA*) (Табела 12).



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

4.7.1.3 Учесталост MLS гена резистенције према пореклу изолата код стафилокока

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

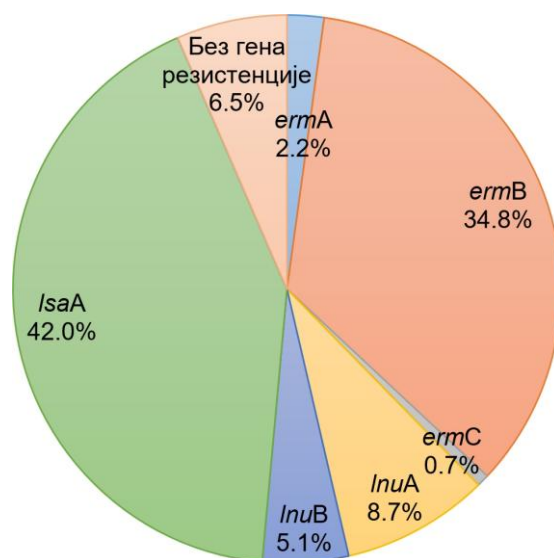
Табела 14. Учесталост MLS гена резистенције према пореклу изолата стафилокока

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

^a Све р-вредности мање од 0,05 сматране су статистички значајним

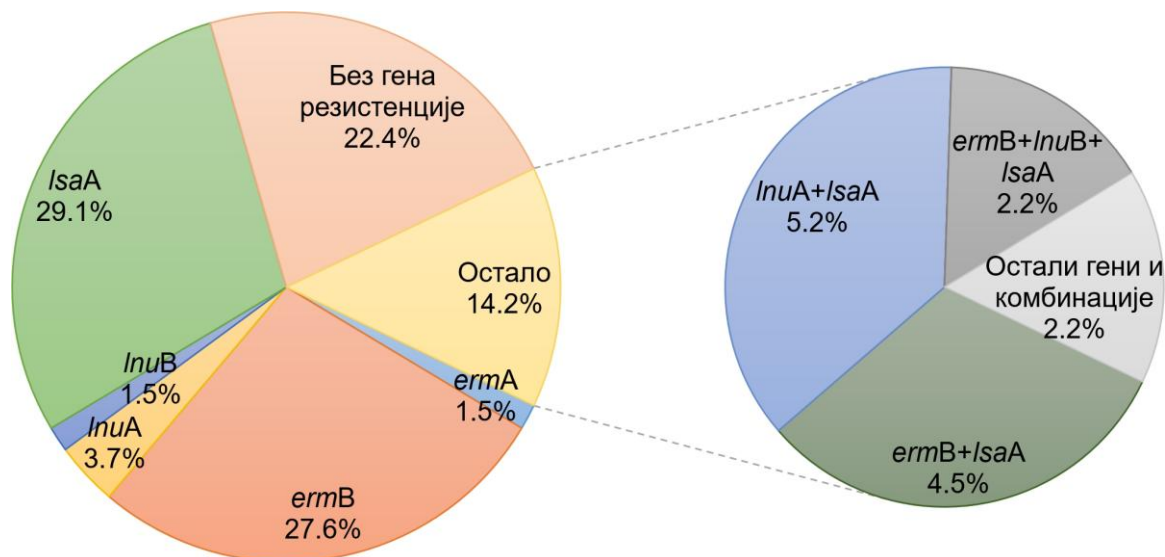
4.7.2 Учесталост MLS гена резистенције код ентерокока и β-хемолитичких стрептокока

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



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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

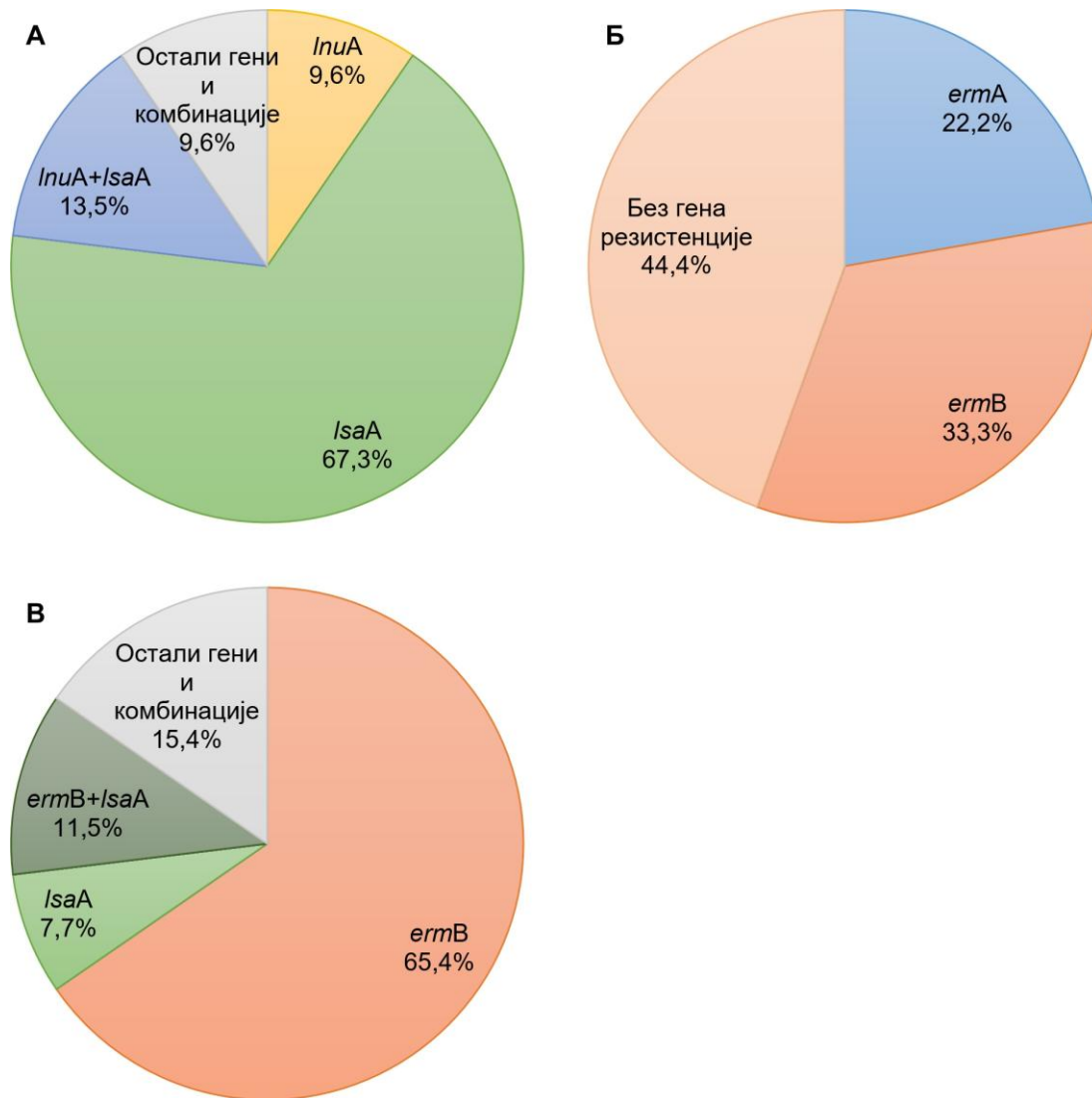
^a Сензитивни на еритромицин и клиндамицин

^b Конститутивна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

^b Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

^c Резистенција на линкозамиде-стрептограмине групе А/стрептограмине групе Б

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



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

4.7.2.3 Учесталост *MLS* гена резистенције према пореклу изолата ентерокока и β -хемолитичких стрептокока

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

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

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

^a Све p-вредности мање од 0,05 сматране су статистички значајним

4.8 Ваљаност D-теста

Да бисмо утврдили ваљаност D-теста, упоредили смо резултате које смо добили D-тестом (користили смо га за детектовање *iMLSb* фенотипа резистенције) са

результатима које смо добили PCR анализом (користили смо је за идентификовање *erm* гена, који детерминишу iMLSb фенотип) (Табела 18).

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

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

^a Индуцибилна резистенција на макролиде-линкозамиде-стрептограмине групе Б

^b Реакција ланчаног умножавања

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

Табела 19. Резултати теста ваљаности D-теста

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

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

5 ДИСКУСИЈА

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

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

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

Код свих популација организама могу се јавити појединачне јединке са неком другачијом особином од других чланова популације. У случају популације бактерија, особина резистенције на антибиотике се може јавити код неких јединки бактерија из те популације. Сваки пут кад се користи одређени антибиотик, јединка која је носилац те специфичне особине отпорности на тај антибиотик се бројчано повећава и на крају почиње да доминира над остатком бактеријске популације. Развој резистенције на антибиотике је природни феномен и саставни је део еволутивног процеса сваког микроорганизама. Међутим, он је значајно убрзан широко распрострањеном употребом антибиотика код људи и животиња [276]. Бактерије могу поседовати природну резистенцију на неке антибиотике, нпр. бактерије *Mycoplasma* spp. су урођено резистентне на β -лактамске антибиотике јер немају пептидогликански ћелијски зид на чију синтезу ови антибиотици делују, или могу поседовати "стечену резистенцију", односно могу се генетски променити и тако постати резистентне на антибиотике [277]. Бактерија може стећи гене резистенције спонтаном мутацијом или пак хоризонталним трансфером гена, који представља размену генетског материјала између бактерија истих или различитих врста. Гени који детерминишу резистенцију на антибиотике се налазе у нашој животној средини, а ту су се налазили и милионима година пре открића антибиотика [278]. По једној теорији, присуство гена резистенције у животној средини се објашњава присуством тих гена код бактерија и гљива које производе антибиотике, а имају у свом геному сопствене гене резистенције на антибиотике које производе друге бактерије и гљиве [279]. По другој теорији, извор гена резистенције се налази

међу нашим генима који кодирају шећерну киназу и ацетилтрансферазу и могу еволуирати и модификовати антибиотик, као што је у случају резистенције на аминогликозиде [278].

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

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

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

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

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

Америци, од 10 до 53% у источно-медитеранској регији, од 0,3 до 60% у Европи, од 10 до 26% у југоисточној азијској регији и од 4 до 84% у западно пацифичкој регији [276].

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

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

У нашој студији је највећи број изолата стафилокока био сензитиван на еритромицин и клиндамицин, а најзаступљенији фенотип резистенције међу њима био је iMLSb. На другом месту по учесталости код MSSA, MRKNS и MSKNS изолата био је M/MSb

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

У оквиру наше студије смо молекуларном анализом идентификовали *msrA* ген, који кодира активну ефлукс пумпу код стафилокока, као најфреквентнији (35%) MLS ген резистенције. Више од половине наших изолата стафилокока резистентних на макролиде су носили *msrA* ген као појединачни или у комбинацији са *erm* генима. Друге студије су имале сличне резултате нашим [310, 311]. У нашој студији је *ermC* ген био најчешћи од свих *erm* гена, како код изолата врсте *S. aureus*, тако исто и код коагулаза-негативних стафилокока са cMLSb или iMLSb фенотипом резистенције. Сличне податке су објавили и Цад и сар. [312]. Ниску фреквенцију *ermB* гена код стафилокока коју смо имали у нашој студији, имали су и Котино и сар. [313]. У

литератури, *ermA* и *ermC* ген доминантно детерминишу MLSb резистенцију код стафилокока и те гене индукују 14-члани макролиди (еритромицин) и линкозамид (целестицетин), али не и 16-члани макролид и линкомицин [314]. У нашој студији је само мали број изолата стафилокока са *lnuA* и *lsaA* генима имало ретки L_{Sa}/b фенотип резистенције, што је у сагласности са резултатима из студија Лозана и Денга [262, 315]. Најчешће детектоване комбинације гена код стафилокока у нашој студији биле су *ermC*+*msrA*/B, *ermB*+*lsaA* и *ermB*+*msrA*/B. Као што је и очекивано, идентификовали смо највећи број комбинација гена резистенције код метицилин-резистентних изолата стафилокока. Комбинације гена резистенције које су посебно забележене међу изолатима стафилокока и то нарочито метицилин резистентним стафилококама, постоје и у студијама других аутора [316]. Такође, истовремено присуство два или више MLS гена резистенције у истом изолату стафилокока код MRSA и MRKNS изолата болничког порекла било је забележено у Аргентини, САД и Пољској [240, 317, 318]. Насупрот нашим очекивањима није постојала значајна разлика у учесталости изолата стафилокока са комбинацијом MLS гена између болничких и амбулантних сојева ($p > 0,05$). Код 9,8% наших изолата са iMLSb, M/MSb или L_{Sa}/b фенотипом резистенције нисмо идентификовали ниједан MLS ген резистенције. Са сличним дискрепанцама између фенотипа и генотипа резистенције су се сретали и у другим студијама [299, 300].

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

није уопште детектован код стафилокока [355]. *InuA* ген смо најчешће (12%) идентификовали код MSKNS изолата, а готово идентичне резултате су добили и Лина и сар. у својој студији [325]. Ми смо по први пут детектовали *lsaA* ген (2 изолата, тј. 1,1%) као појединачни ген код изолата *S. aureus*. *lsaA* ген код ентерокока кодира протеин сличан ABC транспортерима, који избацују лекове који припадају MLS групи антибиотика из бактеријске ћелије [135]. *lsaA* ген као урођени ген врсте *Enterococcus faecalis* је показао високи степен сличности новом гену који кодира ABC транспортер (*lsaE* ген који је већ идентификован код стафилокока). Преношење гена резистенције са ентерокока на *S. aureus* је већ обрађено у литератури, и то гена резистенције на тетрациклин *tetL* и триметоприм *dfrK* [257]. Ипак, *lsaA* ген који води порекло из бактерија рода *Enterococcus* spp. досад није идентификован код бактерија врсте *S. aureus* [139].

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

S. pneumoniae, бактерија која је позната и као пнеумокок, водећи је узрочник амбулатних пнеумонија широм света и један је од главних убица деце старости до 5 година. Друга обољења изазвана овом бактеријом укључују честе благе инфекције као што је упала средњег уха, али такође укључује и инвазивна обољења као што је

менингитис. Међу бактеријским узрочницима менингитиса *S. pneumoniae* се повезује са највишом стопом смртности и великим неуролошким секвелама после излечења. Пнеумококне инфекције су углавном карактеристичне за популацију најстаријих и најмлађих [334]. Према једној процени инфекције *S. pneumoniae* су у свету изазвале 826.000 смртних случајева код деце старости између 1 и 59 месеци [101]. Пнеумококе се често налазе код асимптоматских назофарингеалних клицоноша, чија преваленција варира зависно од година старости и посматраног региона. Асимптоматско клицоноштво је одговорно углавном за ширење бактерије унутар група, какве су нпр. вртићи или старачки домови. Резистенција на β-лактамске антибиотике код клиничких изолата *S. pneumoniae* се ствара углавном тачкастом мутацијом гена који кодирају пеницилин-везујуће протеине (PBP), једне од суштинских компоненти ћелијског зида. Велики број вишеструких мутација код различитих PBP доводи до повећања минималне инхибиторне концентрације за пеницилин и друге β-лактамске антибиотике. Потребно је одређеном методологијом одвојити сојеве са градуалним повећањем резистенције на пеницилине и окарактерисати их као "не-сензитивне" (NS) и резистентне сојеве (R), који имају други механизам резистенције. Извештаји из различитих извора су неконзистентни што се тиче обележавања ових сојева и раздвајања два различита механизма резистенције. Резистенција на пеницилин је код *S. pneumoniae* у периоду између 2002. до 2006. године у Финској порасла од 8 на 16%, а на еритромицин од 16 на 28%, на територији где до 1992. године готово да није било изолата *S. pneumoniae* резистентних на антибиотике [210].

У нашој студији смо имали мали проценат (9,8%) изолата *S. pneumoniae* резистентних на пеницилин. Према извештају Светске здравствене организације из 2013. године, забележена резистенција "не-сензитивних" сојева *S. pneumoniae* на пеницилин се кретала од 3 до 16% у Афици, од 0 до 48% у Америци, од 13 до 34% у источно-медитеранској регији, од 0 до 61% у Европи, од 47 до 48% у југоисточно азијској регији и од 17 до 64% у западно-пацифичкој регији [276]. Наши изолати *S. pneumoniae* су 100% били осетљиви на линезолид и ванкомицин. Сличне резултате нашим имали су и други аутори [330, 331]. Ипак, у неким радовима [330, 335] био је забележен велики проценат изолата *S. pneumoniae* резистентних на пеницилин и појава резистенције на ванкомицин. *S. pneumoniae* је у нашој студији показао 100% осетљивост на ципрофлоксацин, што је у складу са резултатима других аутора, који су забележили ниску резистенцију ове бактерије на флуороквинолоне [336, 337]. У нашој

студији смо имали високу резистенцију на еритромицин (65,6%) међу изолатима *S. pneumoniae*, што се поклапа са подацима за Сингапур, неке делове пацифичке Азије, јужне Африке и Пенсилваније [200, 338, 339], али не и са подацима за земље Европе, САД, Израел, Канаду, Русију и Латинску Америку [340, 341, 342]. Резистенција на клиндамицин код наших изолата *S. pneumoniae* (35,9%) је била много нижа од оне у Латинској Америци и Јужној Кореји [200], али је била значајно виша од оне у Италији, Канади, САД, Израелу и Русији [338, 341]. Код изолата *S. pneumoniae* cMLSb је код нас био доминантан фенотип MLS резистенције (35,9%), што је сагласно са резултатима аутора из Индије, Русије и Италије [218, 341, 342], као и са резултатима других аутора из Србије [343, 344, 345].

S. pyogenes најчешће изазива инфекције горњих респираторних путева. Он је стриктно патоген за људе и изазива велики број различитих обољења као што су: фарингитис, инфекције коже и меког ткива, импетиго, бактеријемije, некротизирајући фасциитис, дубоке инфекције меког ткива, целулитис, пнеумоније, токсичном шоку-сличан синдром, шарлах, реуматску грозницу и постстрептококни гломерулонефритис [346]. Код изолата бета-хемолитичких стрептокока имали смо детектовану 100% осетљивост на пеницилин и ванкомицин, што се подудара са резултатима објављеним у великом броју других радова [347, 348]. Иако је пеницилин лек избора у терапији фарингитиса изазваних *S. pyogenes* бактеријом, макролиди се често препоручују као замена у случају преосетљивости пацијената на пеницилине. 43,9% изолата *S. pyogenes* је у нашој студији било резистентно на еритромицин, што је у сагласности са резултатима из других студија [199, 349, 350]. Стопа резистенције на макролиде код *S. pyogenes* је у свету некада била ниска, међутим, очигледан је њен пораст што је видљиво у резултатима студија из различитих земаља: Финске, Италије, Кореје, Шпаније и Тајланда [351, 352, 353, 354]. Од увођења нових макролида у терапијске сврхе, дошло је до великог пораста резистенције код стрептокока, што је вероватно повезано са њиховом претераном употребом. Према студији урађеној у Србији од стране Павловићке и сар. макролид резистенција код изолата *S. pyogenes* била је мања од 10% [355]. Таква стопа макролид резистенције постоји и у другим европским земљама из нашег окружења: Француској [356], Аустрији и Мађарској [357]. Нешто већа стопа макролид резистенције код *S. pyogenes* забележена је у Немачкој [258], Грчкој [259] и Шпанији [360]. За разлику од земаља са европског и америчког континента, у земљама Азије, посебно у Кини, резистенција на еритромицин код *S. pyogenes* је јако висока и

креће се између 78% и 94%, вероватно као последица повећане и неадекватне употребе макролида [361, 362, 363]. Инциденција резистенције на макролиде је високо варијабилна и зависи од географског региона, односно, употребе макролида у том региону и типа инфекције [364, 365]. Из ових разлога, праћење учесталости резистенције на макролиде и различитих механизма резистенције на локалном нивоу је од суштинске важности за утврђивање емпиријске терапије. Резистенција на клиндамицин код *S. pyogenes* у нашем истраживању је била мања него у неким деловима Кине, Латвије и Азије, али значајно већа у односу на Канаду, Мексико и неке европске земље [358, 361, 366, 367]. У нашој студији је код ентерокока проценат изолата осетљивих на еритромицин и клиндамицин био само 0,8%, док је код стафилокока тај проценат био већи од 50%. Највећи проценат наших изолата *S. pyogenes* је имао M/MSb фенотип резистенције (18,9%), што је у сагласности са резултатима аутора који су пратили дистрибуцију MLS фенотипова резистенције код *S. pyogenes* на територији Србије [343, 355]. Сагласни нашим резултатима су и резултати студије изведене у Италији, на изолатима *S. pyogenes*. [369]. У складу са нашим резултатима, где је M/MSb фенотип доминантан и само мали проценат изолата је имао MLSb фенотип резистенције код стрептокока групе А, били су и резултати аутора из Грчке [368], Аустрије и Мађарске [357], Немачке [358], Шпаније [360] и Аргентине [369].

S. agalactiae се данас сматра водећим узрочником септикемија и менингитиса код новорођенчади и трудница, а повезује се са маститисом крава [370]. Изолати *S. agalactiae* су у нашој студији показали изузетно високу резистенцију на гентамицин, док је у другим регионима света забележена знатно нижа резистенција на гентамицин међу изолатима стрептокока [371, 372]. У нашој студији, највећу резистенцију на ципрофлоксацин после стафилокока показали су изолати *S. agalactiae*, затим су следили изолати *S. pyogenes*, док су најмању резистенцију показали изолати ентерокока. Код других аутора резистенција на флуороквинолоне је била значајно нижа [361, 373, 358]. Приближно трећина (31,3%) наших изолата *S. agalactiae* је била резистентна на еритромицин, а сличне резултате су имали Кампел и други аутори [199, 374], док је на Тајвану и у Луизијани тај проценат био знатно већи [375, 376]. У нашој студији је резистенција на клиндамицин код *S. agalactiae* била много нижа (20,7%) од оне у Тајвану, Јужној Кореји и Ирану, али знатно виша од оне у европским земљама, земљама латинске Америке и Израелу [218, 374, 375, 377, 378, 379]. У нашој студији је

најчешћи MLS фенотип резистенције код изолата *S. agalactiae* био cMLSb (14,7%), слично као и у неким земљама Азије, Латинске Америке и Европе [377, 379, 380]. LСа/b фенотип је описан у другим студијама као редак фенотип [141, 169, 261, 377, 381, 382, 383] међу изолатима *S. agalactiae*, а сагласно са тим и ми смо у нашој студији имали 9 изолата (6%) *S. agalactiae* са овим фенотипом.

Грам-позитивне коке рода *Enterococcus* spp. су нормални становници црева људи и чине од 0,1 до 1% гастроинтестиналне бактеријске флоре. Годинама се повећавала важност ентерокока као патогених бактерија изазивача болничких инфекција као што су ендокардитис и бактеријемije [384]. Ентерококе су познате и по брзом развијању резистенције на антибиотике [385]. Убрзо након почетка коришћења пеницилина, појавили су се клонови ентерокока резистентни на пеницилин, и одмах затим потреба за другим антибиотцима који су коришћени за лечење инфекција изазваних тим клоновима. Данас ентерококе показују висок степен резистенције на хлорамфеникол, еритромицин, клиндамицин, тетрациклине, аминогликозиде, пеницилине, флуороквинолоне и ванкомицин. Ентерококе поседују урођену резистенцију на неке антибиотике. Ове бактерије су урођено мање осетљиве на пеницилине и цефалоспорине у односу на друге стрептококе. Уз то, ентерококе су резистентне на клиндамицин и на аминогликозиде, односно постигнуте концентрације аминогликозида у серуму уобичајеним дозирањем. Када се апликују сами, аминогликозиди не могу да прођу кроз ћелијски зид ентерокока. Међутим, када се дају заједно са антибиотцима који делују на синтезу ћелијског зида, као што су ампицилин или ванкомицин, деловање аминогликозида се повећава [386]. Стечена резистенција ентерокока на гликопептиде, која је први пут забележена 1986. године, постала је важан проблем у болницама. Учесталост гликопептид-резистентних ентерокока је пратила много учесталију употребу ванкомицина у лечењу MRSA сојева почетком 1980-тих. Процент резистентних ентерокока на ванкомицин у јединицама интензивне неге у САД-у се повећао од 0,3%, 1989. године до 24%, 1998. године [386]. Амбулантни сојеви ентерокока резистентног на ванкомицин су били много мање забележени у САД-у него у Европи, могуће због тога што у Европским земљама храна за животиње садржи ванкомицин [386].

Учесталост резистенције на пеницилин код изолата *Enterococcus* spp. у нашој студији (2,9%) слична је резултатима добијеним у другим студијама [377, 380, 387]. Резистенцију на ванкомицин од 0,6% смо забележили и код наших изолата ентерокока,

док резистентне сојење на линезолид нисмо пронашли, али су били пријављени у радовима неких других аутора [347, 348]. Резистенцију од 22,2% на ципрофлоксацин смо у нашој студији имали код изолата ентерокока, а нижу резистенција на флуороквинолоне су имали El-Kersh и сар. [372]. У нашој студији је код изолата *Enterococcus* spp. више од 80% било резистентно на еритромицин, што је слично резултатима других аутора [388, 389]. Високи степен резистенције на клиндамицин који смо имали у нашој студији код изолата ентерокока (96,7%) је очекиван, због урођене резистенције на клиндамицин кодиране *lsaA* геном, који је део генома бактерије *E. faecalis* [219]. У нашој студији је сMLSb фенотип резистенције био најчесталији (78,4%), затим је следио LSa/b (18,4%) фенотип, који је код других врста био ређе заступљен или није уопште био детектован. Мин и сар. су имали резултате сличне нашим и од 241 еритромицин резистентног соја ентерокока, 39% је имало сMLSb фенотип, а 61% је имало iMLSb фенотип [390]. Рејес и сар. су у свом истраживању дошли до резултата сличних нашим и сви њихови изолати ентерокока који су били резистентни на еритромицин су носили *ermB* ген, док ниједан њихов изолат није поседовао *mefA/E* ген [389].

Када посматрамо ентерококе и стрептококе заједно у нашој студији, најзаступљенији фенотип резистенције код њих је био сMLSb. Ми смо имали велики број изолата осетљивих на макролиде и линкозамиде. Наши MLS фенотипови резистенције су углавном настали посредством појединачног гена, а то су најчешће били *lsaA* (42,0%) и *ermB* (34,8%) ген. Међутим, ови фенотипови су такође били детерминисани и комбинацијама два или више гена резистенције, а најчешће детектоване комбинације гена биле су *lnuA+lsaA* (5,2%) и *ermB+lsaA* (4,5%). Шмиц и сар. су дошли до сличних резултата у својој студији [391] анализом 75 еритромицин резистентних изолата *E. faecium*. Код ових аутора *ermB* је био најчесталији, док је *ermA* ген био идентификован код малог процента изолата (4%). Исти аутори су имали и комбинацију *ermA* и *ermB* гена резистенције код 3% изолата. У нашој студији смо *ermA* ген идентификовали код само два изолата (4,9%) *S. agalactiae*, док *ermC* ген нисмо идентификовали ни код једног изолата ентерокока и β-хемолитичког стрептокока. *ermB* ген је у нашој студији био најчесталији међу изолатима *S. pyogenes* (45,5%), а сличне резултате су имали и други аутори [238, 391]. По Робертсу, гени који кодирају Erm метилазе се могу разликовати међусобно и могу се хоризонтално преносити на друге Грам-позитивне бактерије. До 2012. године било је познато 34 *erm* гена и сви

осим два су били идентификовани код Грам-позитивних бактерија [392]. Најраспрострањеније класе *erm* гена међу Грам-позитивним кокама су *ermA*, *ermB* и *ermC* [393]. Постоје разлике између сваке класе *erm* гена и односе се на врсту бактерија где се најчешће ти гени идентификују и на MLSb фенотип резистенције који они детерминишу. Сваки *erm* ген је доминантно повезан са једним или два рода бактерија, али није ограничен само на њих [392, 393]. *ermA* ген се често повезује са *Staphylococcus* spp., али је детектован код још 4 рода Грам-позитивних кока, укључујући род *Streptococcus* и *Enterococcus*. *ermB* ген углавном детерминише MLSb фенотип резистенције код стрептокока, али је откривен код још 17 родова Грам-позитивних бактерија [392]. Најраспрострањенији и клинички јако важан MLSb ген резистенције код Грам-позитивних кока је *ermC*, који је идентификован код још најмање 13 родова Грам-позитивних бактерија и углавном детерминише MLSb резистенцију код стафилокока [392]. Чак и када је Erm метилација усаглашена са резистенцијом на MLSb антибиотике, експресија *erm* гена зависи од присуства индуктора, а то су најчешће 14-члани и 15-члани макролиди, као што су еритромицин и азитромицин. Отуд, изолати који показују iMLSb резистенцију могу бити осетљиви на 16-члане макролиде све док не буду индуковани неким другим једињењем. Међутим, Мин и сар. су открили нове варијанте *ermB* гена код изолата ентерокока. Они су доказали да када користимо дискове импрегниране високом дозом антибиотика (еритромицин - 40 µg и јозамицин - 100 µg) а не уобичајеном (еритромицин - 15 µg и клиндамицин - 2 µg), и када уместо клиндамицин диска поставимо диск импрегниран 16-чланим макролидом као што је јозамицин, можемо добити iMLSb фенотип резистенције. У том обрнутом iMLSb фенотипу резистенције, зона инхибиције око еритромицин диска је заравњена према јозамицин диску, и за разлику од ситуације када еритромицин представља индуктор, овде је снажнији индуктор 16-члани макролид. Када су коришћени дискови са мањим или уобичајеним дозама антибиотика, сви изолати са iMLSb фенотипом су показивали лажни cMLSb фенотип резистенције [390].

Kataја и сар. у Финској [216] су анализирали 45 еритромицин резистентних изолата *S. pyogenes*, и сви њихови изолати са M/MSb фенотипом резистенције су поседовали *mefA* ген, док је један изолат, који је показивао MLSb фенотип резистенције, имао *ermTR*. Пораст процента M фенотипова резистенције и смањење процента MLSb фенотипова

код стрептокока повезан је са порастом употребе дугоделујућих макролида након 2001. године, који имају високи потенцијал селекције *ermB* гена [394, 395].

У нашој студији су *lnuA* (6,7%), *lnuB* (3,3%) и *lsaA* (50%) гени били у највећем проценту заступљени код изолата ентерокока, док као појединачни гени нису били идентификовани код изолата *S. pyogenes*. *lsaC* ген није идентификован ни код једног изолата у нашој студији. У студији Паулине и сар. 75% изолата *S. agalactiae* је имало *lsaC* ген и показивало LSAP (линкозамид-стрептограмин групе А-плеуромутилини) фенотип, 18% је имало комбинацију *lnuB+lsaE* гена и показивало LSAP фенотип, што су први случајеви LSAP фенотипа описани међу *S. agalactiae* у САД [396]. Боздоган и сар. су описали ген резистенције *lnuB* који детерминише резистенцију на линкозамиде нуклеотидилацијом рибозомских елемената код *E. faecium* [227]. Код неких аутора је *lnuB* ген био идентификован код чак 15 линкозамид резистентних изолата *E. faecium* [397]. У нашој студији су комбинације два или више гена резистенције биле једнако заступљене код све три групе бактерија, док је комбинација четири гена MLS резистенције (*ermA+ermB+lnuB+lsaA*) неочекивано идентификована код изолата *S. pyogenes*. Интересантно је да смо код изолата *S. pyogenes*, код којих нисмо идентификовали ниједан сој са LSa/b фенотипом резистенције, идентификовали гене који детерминишу тај фенотип, али у комбинацији са *erm* генима.

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

У нашој студији су *ermB* (33,3%) и *ermA* (22,2%) гени били једини који су, као појединачни гени, детерминисали iMLSb фенотип код ентерокока и стрептокока. У складу са резултатима наше студије, где је *ermB* најчешће као појединачни ген кодирао cMLSb фенотип (65,4%) код изолата ентерокока и β-хемолитичких стрептокока, Јенсен и сар. [335] су анализом 113 еритромицин резистентних изолата ентерокока хуманог и анималног порекла идентификовали 88% изолата са *ermB* геном. cMLSb фенотип резистенције је у нашој студији код ентерокока и β-хемолитичких стрептокока, слично стафилококама, био карактеристичан по присуству великог броја комбинација гена резистенције. Најчешћа комбинација гена код тих изолата била је *ermB+lsaA*. Овај тренд је неочекивано највише био заступљен код изолата *S. pyogenes*

и *S. agalactiae*, док је мањи број комбинација гена био присутан код ентерокока. У складу са овом опсервацијом, код једног соја *S. pyogenes* детектовали смо комбинацију од чак четири гена (*ermA+ermB+lnuB+lsaA*).

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

D-тест је према нашим резултатима показао 100% сензитивности у детекцији индуцибилне клиндамицин резистенције на тестираних 94 соја Грам-позитивних кока, док је специфичност теста била само 65,38%. У нашој студији је индуцибилна клиндамицин резистенција детектована код 18 изолата, што PCR тестом није потврђено и није идентификован ниједан *erm* ген код тих сојева. Позитивна предиктивна вредност од 70% нам указује на тачност позитивног резултата D-теста на индуцибилну клиндамицин резистенцију. Није било лажно негативних резултата и негативна предиктивна вредност теста је била 100%. То значи да негативне налазе D-теста на iMLSb фенотип резистенције код Грам-позитивних кока можемо издавати без претходне потврде PCR тестом, док позитивне налазе на iMLSb фенотип морамо претходно потврдити PCR тестом на *erm* гене. Према овим налазима само би 70% од изолата са позитивним D-тестом било заиста позитивно. Према другим ауторима, D-тест је показивао исту осетљивост као и у нашој студији (приближно 100%), при чему су они користили растојање између дискова од 12 mm. Јенсен и сар. су сугерисали да на осетљивост D-теста битно утиче растојање између дискова еритромицина и клиндамицина. Такође, према истим ауторима, осетљивост D-теста је зависила и од врсте испитиваних бактерија [192]. Код других аутора, осетљивост D-теста са 15-20 mm растојања између дискова еритромицина и клиндамицина, била је 100% у поређењу са PCR анализом *erm* гена [239, 240].

На појаву ниске специфичности D-теста утицала је чињеница да су неки изолати у студији показивали неслагања између фенотипа и генотипа резистенције. У нашем

случају, имали смо изолате са идентификованим *msrA/B*, *lnuA* и *lsaA* геном, који су показивали осетљивост на еритромицин и клиндамицин. Змантар и сар. [319] и Кутињо и сар. [313] су се такође сретали са овом појавом у својим истраживањима и они су овај феномен објашњавали тиме да се он јавља због проблема у нисходној регулацији гена или због мутације у региону промотера идентификованог гена резистенције. Насупрот томе, Мартин и сар. [398] су показали да такви сојеви који носе гене резистенције, а не показују ни један фенотип резистенције, могу показати фенотипску резистенцију уколико се субкултивишу на чврстој подлози са растућим градијентом одговарајућег антибиотика. Такође, у нашој студији имамо изолате који су показивали један од фенотипова MLS резистенције, али нису имали идентификован ни један ген резистенције. Кутињо и други аутори, који су се такође сретали са таквим појавама у својим истраживањима, претпоставили су да ти сојеви носе неке друге варијанте *erm*, *mef*, *lnu* или *lsa* гена [313, 398, 399, 400], које нису биле укључене у нашој студији.

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

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

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

Резистенција на антибиотике код ентерокока и стафилокока је важна зато што *S. epidermidis* и ентерококе припадају групи бактерија које повремено изазивају тешке инфекције и зато што као представници нормалне флоре могу довести до ширења гена

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

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

међутим генетском анализом нису успели да идентификују ниједан од познатих гена код ових сојева [321].

У нашој студији је забележена јасна разлика у обрасцу MLS осетљивости међу стафилококама и ентерококама/стрептококама и потврђена је неопходност увођења D теста у рутинском тестирању антимикуробне осетљивости код изолата стафилокока. Наиме, на први поглед наши резултати без дуплог диск дифузионог теста показују већу преваленцију резистенције на клиндамицин код изолата бактерија *S. pneumoniae* (35,9%) него код изолата *S. aureus* (8,3%). Ипак, у рутинском тестирању можемо превидети сојеве који имају генетски потенцијал да постану резистентни током терапије на клиндамицин (iMLSb), доводећи до потцењивања стопе резистенције на клиндамицин, тако да сви изолати са iMLSb фенотипом могу бити грешком интерпретирани као клиндамицин осетљиви. На пример, у нашој студији имали смо 55,2% стварно (M/MSb и Et/Cl_i S) и 36,5% лажно (iMLSb) клиндамицин осетљивих изолата *S. aureus*, што представља потцењену стопу резистенције на клиндамицин од 8,3% (cMLSb и L_{Sa/b}) уместо од 44,8% (iMLSb и cMLSb и L_{Sa/b}) код *S. aureus*. Тако, коришћењем D-теста закључили смо да је права клиндамицин резистенција, укључујући и сојеве са iMLSB фенотипом, веома слична код бактерија врсте *S. aureus* и *S. pneumoniae*, 44,8%, односно, 46,9% респективно.

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

Наша студија је први покушај обједињавања информација о MLS резистенцији код патогених Грам-позитивних кока у овом региону (Пчињски округ). Наша епидемиолошка студија је настала као производ колекције изолата, њихове анализе и статистичке обраде добијених података, а указала нам је на неопходност улагања нових напора у решавању глобалног проблема антибиотске резистенције. Иако је ово преглед

MLS резистенције код Грам-позитивних кока за једногодишњи период на целој територији Пчињског округа, ипак постоје рупе у познавању правог статуса MLS резистенције међу овим бактеријама, посебно у забаченим деловима овог региона. Са увидом у стање ове резистенције, отвара се питање развоја стратегије за спречавање њеног ширења, која подразумева рестриктивно и мудрије коришћење антибиотика као и спречавање ширења мултирезистентних сојева бактерија. Надамо се да ова студија може дати свој скроман допринос у продужавању употребног века актуелних и доступних MLS антибиотика.

6 Закључци

На основу добијених резултата, могу се извести следећи закључци:

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

-
- M/MSb је био најучесталији код MRKNS изолата, односно KNS изолата;
 - је сензитивност на еритромицин и клиндамицин била најучесталија код изолата *S. agalactiae* и *S. pyogenes*.
4. Поређењем учесталости MLS фенотипова резистенције код изолата Грам-позитивних кока из различитих врста материјала, утврдили смо да:
- су iMLSb и сензитивност на еритромицин и клиндамицин били најучесталији код изолата из брисева грла и носа и пиокултура;
 - cMLSb и LSa/b су били најучесталији код изолата из гениталних секрета и урина;
 - M/MSb је био најучесталији код изолата из гениталних секрета.
5. Поређењем учесталости MLS фенотипова резистенције код изолата различитог порекла, утврдили смо да је M/MSb фенотип резистенције био значајно учесталији међу болничким изолатима стафилокока.
6. Најчешћи појединачни гени и њихове комбинације детектоване код:
- стафилокока су *msrA/B*, *ermC* и *ermC+msrA/B*
 - ентерокока и β-хемолитичких стрептокока су *lsaA*, *ermB* и *ermB+lsaA*.
7. Код стафилокока најчешћи појединачни гени који су детерминисали:
- M/MSb фенотип - *msrA/B* ген
 - LSa/b фенотип - *lnuA* ген
 - iMLSb фенотип - *ermA* и *ermC* ген
 - cMLSb фенотип - *ermC* и комбинације гена.
8. Код ентерокока и β-хемолитичких стрептокока најчешћи појединачни гени који су детерминисали:
- LSa/b фенотип - *lsaA* ген
 - iMLSb фенотип - *ermB* и *ermA* ген
 - cMLSb фенотип - *ermB* и комбинације гена.
9. Поређењем учесталости гена MLS резистенције између амбулантних и болничких сојева утврдили смо:
- *ermB* и *lsaA* ген су били статистички значајно учесталији код амбулантних изолата ентерокока и β-хемолитичких стрептокока у односу на болничке
 - *msrA/B* ген је био статистички значајно учесталији код болничких изолата стафилокока у односу на амбулантне.
-

10. Идентификација iMLSb фенотипа резистенције D-тестом је у поређењу са референтном методом, PCR идентификацијом *erm* гена показала 100% сензитивности и 65,38% специфичности.

7 Литература

- [1] Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000;37(2):127-37. doi:10.1016/s0732-8893(00)00130-9.
- [2] Donabedian SM, Thal LA, Hershberger E, et al. Molecular Characterization of Gentamicin-Resistant Enterococci in the United States: Evidence of Spread from Animals to Humans through Food. *J Clin Microbiol.* 2003;41(3):1109-13. doi:10.1128/jcm.41.3.1109-1113.2003.
- [3] Hayes JR, English LL, Carter PJ, et al. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species Isolated from Retail Meats. *Appl Environm Microbiol.* 2003;69(12):7153-60. doi:10.1128/aem.69.12.7153-7160.2003.
- [4] Klare I, Konstabel C, Badstübner D, Werner G, Witte W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol.* 2003;88(2-3):269-90. doi:10.1016/s0168-1605(03)00190-9.
- [5] Chancey ST, Zähler D, Stephens DS. Acquired inducible antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria. *Future Microbiol.* 2012;7(8):959-78. doi:10.2217/fmb.12.63.
- [6] Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology.* 9th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
- [7] Baird D. *Staphylococcus* clusters forming Gram positive cocci. In: Cole JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmons A, eds. *Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology.* 14th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier; 1996.
- [8] Winn W, Koneman E, Allen S, et al. eds. *Koneman's Color Atlas And Textbook Of Diagnostic Microbiology.* Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
- [9] Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(6):1000-18. doi:10.1093/jac/dki372.
- [10] van der Mee-Marquet N, Domelier AS, Girard N, Quentin R. Epidemiology and Typing of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bloodstream Infections. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12):5650-7. doi:10.1128/jcm.42.12.5650-5657.2004.

-
- [11] Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(3):505-20.
- [12] Sharp SE, Searcy C. Comparison of Mannitol Salt Agar and Blood Agar Plates for Identification and Susceptibility Testing of *Staphylococcus aureus* in Specimens from Cystic Fibrosis Patients. *J Clin Microbiol.* 2006;44(12):4545-6. doi:10.1128/jcm.01129-06.
- [13] Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of clinical microbiology*. 7th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1999.
- [14] Sjoquist J, Meloun B, Hjelm H. Protein A Isolated from *Staphylococcus aureus* after Digestion with Lysostaphin. *Eur J Biochem.* 1972;29(3):572-8. doi:10.1111/j.1432-1033.1972.tb02023.x.
- [15] Guss B, Uhlen M, Nilsson B, Lindberg M, Sjoquist J, Sjodahl J. Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A. *Eur J Biochem.* 1984;138(2):413-20. doi:10.1111/j.1432-1033.1984.tb07931.x.
- [16] Sjödahl J. Repetitive Sequences in Protein A from *Staphylococcus aureus*. Arrangement of Five Regions within the Protein, Four being Highly Homologous and Fc-Binding. *Eur J Biochem.* 1977;73(2):343-51. doi:10.1111/j.1432-1033.1977.tb11324.x.
- [17] Uhlén M, Guss B, Nilsson B, Gatenbeck S, Philipson L, Lindberg M. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *J Biol Chem.* 1984;259(3):1695-702.
- [18] Frénay HM, Theelen JP, Schouls LM, et al. Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. *J Clin Microbiol.* 1994;32(3):846-7.
- [19] Wright III JS, Novick RP. Virulence Mechanisms in MRSA Pathogenesis. In: MRSA: current perspectives. Fluit AC, Schmitz FJ, eds. Wymondham, Norfolk, England: Caister Academic Press; 2003.
- [20] Hartleib J, Köhler N, Dickinson RB, et al. Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood.* 2000;96(6):2149-56.
- [21] Nguyen T, Ghebrehiwet B, Peerschke EI. *Staphylococcus aureus* Protein A Recognizes Platelet gC1qR/p33: a Novel Mechanism for Staphylococcal Interactions
-

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

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

-
- [44] von Eiff C, Becker K, Metze D, et al. Intracellular Persistence of *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants within Keratinocytes: A Cause for Antibiotic Treatment Failure in a Patient with Darier's Disease. *Clin Infect Dis.* 2001;32(11):1643-7. doi:10.1086/320519.
- [45] Proctor RA, Peters G. Small Colony Variants in Staphylococcal Infections: Diagnostic and Therapeutic Implications. *Clin Infect Dis.* 1998;27(3):419-22. doi:10.1086/514706.
- [46] Skov R, Smyth R, Larsen AR, et al. Phenotypic Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* by Disk Diffusion Testing and Etest on Mueller-Hinton Agar. *J Clin Microbiol.* 2006;44(12):4395-9. doi:10.1128/jcm.01411-06.
- [47] Stoakes L, Reyes R, Daniel J, et al. Prospective Comparison of a New Chromogenic Medium, MRSASelect, to CHROMagar MRSA and Mannitol-Salt Medium Supplemented with Oxacillin or Cefoxitin for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2006;44(2):637-9. doi:10.1128/jcm.44.2.637-639.2006.
- [48] Berger-Bächli B, Rohrer S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol.* 2002;178(3):165-71. doi:10.1007/s00203-002-0436-0.
- [49] Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat.* 2003;6(1):41-52. doi:10.1016/s1368-7646(03)00003-7.
- [50] Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(6):1449-58.
- [51] Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. Genetic Organization of the Chromosome Region Surrounding *mecA* in Clinical Staphylococcal Strains: Role of IS431-Mediated *mecI* Deletion in Expression of Resistance in *mecA*-Carrying, Low-Level Methicillin-Resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(7):1955-63. doi:10.1128/aac.45.7.1955-1963.2001.
- [52] Musser JM, Kapur V. Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. *J Clin Microbiol.* 1992;30(8):2058-63.
-

-
- [53] Robinson DA, Enright MC. Evolution of *Staphylococcus aureus* by Large Chromosomal Replacements. *J Bacteriol.* 2004;186(4):1060-4. doi:10.1128/jb.186.4.1060-1064.2004.
- [54] Berglund C, Ito T, Ikeda M, Ma XX, Soderquist B, Hiramatsu K. Novel Type of Staphylococcal Cassette Chromosome mec in a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain Isolated in Sweden. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(10):3512-6. doi:10.1128/aac.00087-08.
- [55] Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol.* 2008;8(6):747-63. doi:10.1016/j.meegid.2008.07.007.
- [56] Higuchi W, Takano T, Teng LJ, Yamamoto T. Structure and specific detection of staphylococcal cassette chromosome mec type VII. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;377(3):752-6. doi:10.1016/j.bbrc.2008.10.009.
- [57] IWG-SCC. Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec): Guidelines for Reporting Novel SCCmec Elements. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):4961-7. doi:10.1128/aac.00579-09.
- [58] Kondo Y, Ito T, Ma XX et al. Combination of Multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome mec Type Assignment: Rapid Identification System for mec, ccr, and Major Differences in Junkyard Regions. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(1):264-74. doi:10.1128/aac.00165-06.
- [59] Li S, Skov RL, Han X, et al. Novel Types of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Elements Identified in Clonal Complex 398 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(6):3046-50. doi:10.1128/aac.01475-10.
- [60] Oliveira DC, Milheirico C, de Lencastre H. Redefining a Structural Variant of Staphylococcal Cassette Chromosome mec, SCCmec Type VI. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(10):3457-9. doi:10.1128/aac.00629-06.
- [61] Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Conly JM. Novel Staphylococcal Cassette Chromosome mec Type, Tentatively Designated Type VIII, Harboring Class A mec and Type 4 ccr Gene Complexes in a Canadian Epidemic Strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(2):531-40. doi:10.1128/aac.01118-08.
- [62] Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(3):222-35. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01573.x.
-

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

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

-
- [83] Yilmaz G, Aydin K, Iskender S, Caylan R, Koksal I. Detection and prevalence of inducible clindamycin resistance in staphylococci. *J Med Microbiol.* 2007;56(3):342-5. doi:10.1099/jmm.0.46761-0.
- [84] Ruoff KL, Wiley RA, Beighton D. Streptococcus. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of clinical microbiology.* 7th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1999.
- [85] Obaro S, Adegbola R. The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines. *J Med Microbiol.* 2002;51(2):98-104. doi:10.1099/0022-1317-51-2-98.
- [86] Casey JR, Adlowitz DG, Pichichero ME. New Patterns in the Otopathogens Causing Acute Otitis Media Six to Eight Years After Introduction of Pneumococcal Conjugate Vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29(4):304-9. doi:10.1097/inf.0b013e3181c1bc48.
- [87] European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Annual report of the EARS-Net 2009. Stockholm: ECDC; 2010. https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/1011_SUR_annual_EARS_Net_2009.pdf. Приступљено 28. 11. 2017.
- [88] Hicks LA, Harrison LH, Flannery B, et al. Incidence of Pneumococcal Disease Due to Non-Pneumococcal Conjugate Vaccine (PCV7) Serotypes in the United States during the Era of Widespread PCV7 Vaccination, 1998-2004. *J Infect Dis.* 2007;196(9):1346-54. doi:10.1086/521626.
- [89] Paton JC, Morona JK. Streptococcus pneumoniae Capsular Polysaccharide. In: Fischetti V, Novick R, Ferretti J, Portnoy D, Rood J, eds. *Gram-Positive Pathogens,* 2nd ed. Washington, DC: ASM Press; 2006. doi:10.1128/9781555816513.ch20.
- [90] Brueggemann AB, Peto TE, Crook DW, Butler JC, Kristinsson KG, Spratt BG. Temporal and Geographic Stability of the Serogroup-Specific Invasive Disease Potential of Streptococcus pneumoniae in Children. *J Infect Dis.* 2004;190(7):1203-11. doi:10.1086/423820.
- [91] Brueggemann AB, Griffiths DT, Meats E, Peto T, Crook DW, Spratt BG. Clonal Relationships between Invasive and Carriage Streptococcus pneumoniae and Serotype- and Clone-Specific Differences in Invasive Disease Potential. *J Infect Dis.* 2003;187(9):1424-32. doi:10.1086/374624.
- [92] Rückinger S, von Kries R, Siedler A, van der Linden M. Association of Serotype of Streptococcus pneumoniae With Risk of Severe and Fatal Outcome. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(2):118-22. doi:10.1097/inf.0b013e318187e215.
-

-
- [93] Sandgren A, Sjöström K, Olsson-Liljequist B, et al. Effect of Clonal and Serotype-Specific Properties on the Invasive Capacity of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*. 2004;189(5):785-96. doi:10.1086/381686.
- [94] Bergmann S, Hammerschmidt S. Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology*. 2006;152(2):295-303. doi:10.1099/mic.0.28610-0.
- [95] Di Guilmi AM, Dessen A. New approaches towards the identification of antibiotic and vaccine targets in *Streptococcus pneumoniae*. *EMBO Rep*. 2002;3(8):728-34. doi:10.1093/embo-reports/kvf152.
- [96] Jedrzejewski MJ. Unveiling molecular mechanisms of bacterial surface proteins: *Streptococcus pneumoniae* as a model organism for structural studies. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(21):2799-822. doi:10.1007/s00018-007-7125-8.
- [97] Tettelin H, Nelson KE, Paulsen IT, et al. Complete Genome Sequence of a Virulent Isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science*. 2001;293(5529):498-506. doi:10.1126/science.1061217.
- [98] Hiller NL, Janto B, Hogg JS, et al. Comparative Genomic Analyses of Seventeen *Streptococcus pneumoniae* Strains: Insights into the Pneumococcal Supragenome. *J Bacteriol*. 2007;189(22):8186-95. doi:10.1128/jb.00690-07.
- [99] Dopazo J, Mendoza A, Herrero J, et al. Annotated Draft Genomic Sequence from a *Streptococcus pneumoniae* Type 19F Clinical Isolate. *Microb Drug Resist*. 2001;7(2):99-125. doi:10.1089/10766290152044995.
- [100] Hoskins J, Alborn WE, Arnold J, et al. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol*. 2001;183(19):5709-17. doi:10.1128/JB.183.19.5709-5717.2001
- [101] O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009;374(9693):893-902. doi:10.1016/s0140-6736(09)61204-6.
- [102] Centers for Disease Control and Prevention. Pneumococcal Disease: Surveillance and Reporting. <https://www.cdc.gov/pneumococcal/surveillance.html>. Ажурирано 06. 09. 2017. Приступљено 28. 11. 2017.
- [103] Pulido M, Sorvillo F. Declining invasive pneumococcal disease mortality in the United States, 1990-2005. *Vaccine*. 2010;28(4):889-92. doi:10.1016/j.vaccine.2009.10.121.
-

-
- [104] Boisier P, Maïnassara HB, Sidikou F, Djibo S, Kairo KK, Chanteau S. Case-fatality ratio of bacterial meningitis in the African meningitis belt: We can do better. *Vaccine*. 2007;25:A24-9. doi:10.1016/j.vaccine.2007.04.036.
- [105] Jansen AG, Rodenburg GD, van der Ende A, et al. Invasive Pneumococcal Disease among Adults: Associations among Serotypes, Disease Characteristics, and Outcome. *Clin Infect Dis*. 2009;49(2):e23-9. doi:10.1086/600045.
- [106] Johnson AP, Waight P, Andrews N, Pebody R, George RC, Miller E. Morbidity and mortality of pneumococcal meningitis and serotypes of causative strains prior to introduction of the 7-valent conjugant pneumococcal vaccine in England. *J Infect*. 2007;55(5):394-9. doi:10.1016/j.jinf.2007.07.009.
- [107] Klemets P, Lyytikäinen O, Ruutu P, Ollgren J, Nuorti JP. Invasive pneumococcal infections among persons with and without underlying medical conditions: Implications for prevention strategies. *BMC Infect Dis*. 2008;8(1):96. doi:10.1186/1471-2334-8-96.
- [108] European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2011. Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2011. https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/1111_SUR_Annual_Epidemiological_Report_on_Communicable_Diseases_in_Europ....pdf. Публиковано: 10. 11. 2011. Приступљено: 28. 11. 2017.
- [109] Almirall J, Boixeda R, Bolívar I, et al. Differences in the etiology of community-acquired pneumonia according to site of care: A population-based study. *Respir Med*. 2007;101(10):2168-75. doi:10.1016/j.rmed.2007.05.007.
- [110] Crum NF, Wallace MR, Lamb CR, et al. Halting a pneumococcal pneumonia outbreak among United States Marine Corps trainees. *Am J Prev Med*. 2003;25(2):107-11. doi:10.1016/s0749-3797(03)00114-4.
- [111] Gleich S, Morad Y, Echague R, et al. Streptococcus pneumoniae Serotype 4 Outbreak in a Home for the Aged: Report and Review of Recent Outbreaks. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2000;21(11):711-7. doi:10.1086/501717.
- [112] Romney MG, Hull MW, Gustafson R, et al. Large Community Outbreak of Streptococcus pneumoniae Serotype 5 Invasive Infection in an Impoverished, Urban Population. *Clin Infect Dis*. 2008;47(6):768-74. doi:10.1086/591128.
-

-
- [113] Lynch JP, Zhanel GG. Streptococcus pneumoniae: epidemiology and risk factors, evolution of antimicrobial resistance, and impact of vaccines. *Curr Opin Pulm Med*. 2010;16(3):217-25 doi:10.1097/mcp.0b013e3283385653.
- [114] van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*. 2009;374(9700):1543-56. doi:10.1016/s0140-6736(09)61114-4.
- [115] Koskinen H, Rautakorpi UM, Sintonen H, et al. Cost-effectiveness of implementing national guidelines in the treatment of acute otitis media in children. *Int J Technol Assess Health Care*. 2006;22(04):454-9. doi:10.1017/s0266462306051373.
- [116] Niemelä M, Uhari M, Möttönen M, Pokka T. Costs arising from otitis media. *Acta Paediatr*. 1999;88(5):553-6. doi:10.1080/08035259950169585.
- [117] Siira L, Rantala M, Jalava J, et al. Temporal Trends of Antimicrobial Resistance and Clonality of Invasive Streptococcus pneumoniae Isolates in Finland, 2002 to 2006. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(5):2066-73. doi:10.1128/aac.01464-08.
- [118] Leibovitz E, Broides A, Greenberg D, Newman N. Current management of pediatric acute otitis media. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010;8(2):151-61. doi:10.1586/eri.09.112.
- [119] Ardanuy C, Rolo D, Fenoll A, Tarrago D, Calatayud L, Linares J. Emergence of a multidrug-resistant clone (ST320) among invasive serotype 19A pneumococci in Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64(3):507-10. doi:10.1093/jac/dkp210.
- [120] Liñares J, Ardanuy C, Pallares R, Fenoll A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in Streptococcus pneumoniae over a 30-year period. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(5):402-10. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03182.x.
- [121] Bogaert D, de Groot R, Hermans PW. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*. 2004;4(3):144-54. doi:10.1016/s1473-3099(04)00938-7.
- [122] Gray BM, Converse GM, Dillon HC. Epidemiologic Studies of Streptococcus pneumoniae in Infants: Acquisition, Carriage, and Infection during the First 24 Months of Life. *J Infect Dis*. 1980;142(6):923-33. doi:10.1093/infdis/142.6.923.
- [123] Syrjänen RK, Kilpi TM, Kaijalainen TH, Herva EE, Takala AK. Nasopharyngeal Carriage of Streptococcus pneumoniae in Finnish Children Younger Than 2 Years Old. *J Infect Dis*. 2001;184(4):451-9. doi:10.1086/322048.
- [124] Berkovitch M, Bulkowstein M, Zhovtis D, et al. Colonization rate of bacteria in the throat of healthy infants. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2002;63(1):19-24. doi:10.1016/s0165-5876(01)00635-8.
-

-
- [125] Bogaert D, van Belkum A, Sluijter M, et al. Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. *Lancet*. 2004;363(9424):1871-2. doi:10.1016/s0140-6736(04)16357-5.
- [126] Coles CL, Kanungo R, Rahmathullan L, et al. Pneumococcal nasopharyngeal colonization in young South Indian infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2001;20(3):289-95. doi:10.1097/00006454-200103000-00014.
- [127] Tamm E, Naaber P, Maimets M, Oona M, Kõljalg S, Lutsar I. Antimicrobial susceptibility and serogroup/serotype distribution of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* in healthy Estonian children in 1999-2003. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(8):824-6. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01743.x.
- [128] Syrjänen RK, Auranen KJ, Leino TM, Kilpi TM, Mäkelä PH. Pneumococcal Acute Otitis Media in Relation to Pneumococcal Nasopharyngeal Carriage. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24(9):801-6. doi:10.1097/01.inf.0000178072.83531.4f.
- [129] Jounio U, Juvonen R, Bloigu A, et al. Pneumococcal carriage is more common in asthmatic than in non-asthmatic young men. *Clin Respir J*. 2010;4(4):222-9. doi:10.1111/j.1752-699x.2009.00179.x.
- [130] Arias CA, Murray BE. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(4):266-78. doi:10.1038/nrmicro2761.
- [131] Cattoir V, Leclercq R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce?. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(4):731-42. doi:10.1093/jac/dks469.
- [132] Eliopoulos GM. Quinupristin-Dalfopristin and Linezolid: Evidence and Opinion. *Clin Infect Dis*. 2003;36(4):473-81. doi:10.1086/367662.
- [133] Novak R, Shlaes DM. The pleuromutilin antibiotics: a new class for human use. *Curr Opin Investig Drugs*. 2010;11(2):182-91.
- [134] Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. An Enterococcus faecalis ABC Homologue (Lsa) Is Required for the Resistance of This Species to Clindamycin and Quinupristin-Dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(6):1845-50. doi:10.1128/aac.46.6.1845-1850.2002.
- [135] Dina J, Malbruny B, Leclercq R. Nonsense Mutations in the lsa-Like Gene in Enterococcus faecalis Isolates Susceptible to Lincosamides and Streptogramins A. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(7):2307-9. doi:10.1128/aac.47.7.2307-2309.2003.
-

-
- [136] Singh KV, Murray BE. Differences in the *Enterococcus faecalis* *Isa* Locus That Influence Susceptibility to Quinupristin-Dalfopristin and Clindamycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(1):32-9. doi:10.1128/aac.49.1.32-39.2005.
- [137] Kehrenberg C, Ojo KK, Schwarz S. Nucleotide sequence and organization of the multiresistance plasmid pSCFS1 from *Staphylococcus sciuri*. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(5):936-9. doi:10.1093/jac/dkh457.
- [138] Kehrenberg C, Aarestrup FM, Schwarz S. IS21-558 Insertion Sequences Are Involved in the Mobility of the Multiresistance Gene *cfr*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(2):483-7. doi:10.1128/aac.01340-06.
- [139] Wendlandt S, Lozano C, Kadlec K, et al. The enterococcal ABC transporter gene *Isa(E)* confers combined resistance to lincosamides, pleuromutilins and streptogramin A antibiotics in methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(2):473-5. doi:10.1093/jac/dks398.
- [140] Li B, Wendlandt S, Yao J, et al. Detection and new genetic environment of the pleuromutilin-lincosamide-streptogramin A resistance gene *Isa(E)* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of swine origin. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(6):1251-5. doi:10.1093/jac/dkt015.
- [141] Malbruny B, Werno AM, Anderson TP, Murdoch DR, Leclercq R. A new phenotype of resistance to lincosamide and streptogramin A-type antibiotics in *Streptococcus agalactiae* in New Zealand. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(6):1040-4. doi:10.1093/jac/dkh493.
- [142] Malbruny B, Werno AM, Murdoch DR, Leclercq R, Cattoir V. Cross-Resistance to Lincosamides, Streptogramins A, and Pleuromutilins Due to the *Isa(C)* Gene in *Streptococcus agalactiae* UCN70. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(4):1470-4. doi:10.1128/aac.01068-10.
- [143] Dowzicky M, Talbot GH, Feger C, Prokocimer P, Etienne J, Leclercq R. Characterization of isolates associated with emerging resistance to quinupristin/dalfopristin (Synercid) during a worldwide clinical program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000;37(1):57-62. doi:10.1016/s0732-8893(99)00154-6.
- [144] Isnard C, Malbruny B, Leclercq R, Cattoir V. Genetic Basis for In Vitro and In Vivo Resistance to Lincosamides, Streptogramins A, and Pleuromutilins (LSAP Phenotype) in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(9):4463-9. doi:10.1128/aac.01030-13.
-

-
- [145] Farley MM. Group B Streptococcal Disease in Nonpregnant Adults. *Clin Infect Dis.* 2001;33(4):556-61. doi:10.1086/322696.
- [146] Tyrrell GJ, Senzilet LD, Spika JS, et al. Invasive Disease Due to Group B Streptococcal Infection in Adults: Results From a Canadian, Population-Based, Active Laboratory Surveillance Study-1996. *J Infect Dis.* 2000;182(1):168-73. doi:10.1086/315699.
- [147] Edwards MS, Baker CJ. *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus). In: Mandell G, Bennett J, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.* 7th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier; 2010.
- [148] Betriu C, Culebras E, Gomez M, et al. Erythromycin and Clindamycin Resistance and Telithromycin Susceptibility in *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(3):1112-4. doi:10.1128/aac.47.3.1112-1114.2003.
- [149] Arana DM, Rojo-Bezares B, Torres C, Alós JI. First clinical isolate in Europe of clindamycin-resistant group B *Streptococcus* mediated by the *lnu(B)* gene. *Rev Esp Quimioter.* 2014;27(2):106-9.
- [150] Lämmle C, Schwarz S, Wibawan IWT, Ott E, Bopp V, Martinez-Tagle A. Comparison of streptococci of serological group B isolated from healthy carriers and active disease in Chile. *J Med Microbiol.* 1995;42(3):161-4. doi:10.1099/00222615-42-3-161.
- [151] Murayama SY, Seki C, Sakata H, et al. Capsular Type and Antibiotic Resistance in *Streptococcus agalactiae* Isolates from Patients, Ranging from Newborns to the Elderly, with Invasive Infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2650-3. doi:10.1128/aac.01716-08.
- [152] Manning SD. Molecular epidemiology of *Streptococcus Agalactiae* (Group B Streptococcus). *Front Bio.* 2003;8(6):s1-18. doi:10.2741/985.
- [153] Larsson C, Lindroth M, Nordin P, Stalhammar-Carlemalm M, Lindahl G, Krantz I. Association between low concentrations of antibodies to protein α and Rib and invasive neonatal group B streptococcal infection. *Arch Dis Child Fetal Neona.* 2006;91(6):F403-8. doi:10.1136/adc.2005.090472.
- [154] Mavenyengwa RT, Moyo SR, Nordbø SA. *Streptococcus agalactiae* colonization and correlation with HIV-1 and HBV seroprevalence in pregnant women from Zimbabwe. *Euro J Obst Gynaecol Reprod Biol.* 2010;150(1):34-8. doi:10.1016/j.ejogrb.2010.02.021.
-

-
- [155] Edmond KM, Kortsalioudaki C, Scott S, et al. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2012;379(9815):547-56. doi:10.1016/s0140-6736(11)61651-6.
- [156] Moyo SR, Maeland JA, Munemo ES. Susceptibility of Zimbabwean *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*; GBS) isolates to four different antibiotics. *Cent Afr J Med*. 2001;47(9-10):226-9.
- [157] Madhi SA, Radebe K, Crewe-Brown H, et al. High burden of invasive *Streptococcus agalactiae* disease in South African infants. *Ann Trop Paediatr*. 2003;23(1):15-23. doi:10.1179/000349803125002814.
- [158] Martins ER, Andreu A, Correia P, et al. Group B Streptococci Causing Neonatal Infections in Barcelona Are a Stable Clonal Population: 18-Year Surveillance. *J Clin Microbiol*. 2011;49(8):2911-8. doi:10.1128/jcm.00271-11.
- [159] Madzivhandila M, Adrian PV, Cutland CL, Kuwanda L, Schrag SJ, Madhi SA. Serotype Distribution and Invasive Potential of Group B *Streptococcus* Isolates Causing Disease in Infants and Colonizing Maternal-Newborn Dyads. *PLoS One*. 2011;6(3):e17861. doi:10.1371/journal.pone.0017861.
- [160] Mohammed M, Asrat D, Woldeamanuel Y, Demissie A. Prevalence of group B *Streptococcus* colonization among pregnant women attending antenatal clinic of Hawassa Health Center, Hawassa, Ethiopia. *Ethiop J Health Dev*. 2012;26(1):36-42.
- [161] Centers for Disease Control and Prevention. Morbidity and Mortality Weekly Report. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease: Revised Guidelines from CDC, 2010. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5910a1.htm>. Публиковано 19. 11. 2010. Приступљено: 28. 11. 2017.
- [162] Rouse DJ, Andrews WW, Lin FC, Mott CW, Ware JC, Philips JB. Antibiotic susceptibility profile of group B streptococcus acquired vertically. *Obstet Gynecol*. 1998;92(6):931-4. doi:10.1016/s0029-7844(98)00263-4.
- [163] Simoes JA, Aroutcheva AA, Heimler I, Faro S. Antibiotic Resistance Patterns of Group B Streptococcal Clinical Isolates. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2004;12(1):1-8. doi:10.1080/10647440410001722269.
- [164] Kimura K, Suzuki S, Wachino J, et al. First Molecular Characterization of Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(8):2890-7. doi:10.1128/aac.00185-08.
-

-
- [165] Fitoussi F, Loukil C, Gros I, et al. Mechanisms of Macrolide Resistance in Clinical Group B Streptococci Isolated in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(6):1889-91. doi:10.1128/aac.45.6.1889-1891.2001.
- [166] Back E, O'Grady EJ, Back JD. High Rates of Perinatal Group B Streptococcus Clindamycin and Erythromycin Resistance in an Upstate New York Hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(2):739-42. doi:10.1128/aac.05794-11.
- [167] Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep.* 2010;59(RR-10):1-36.
- [168] Arpin C, Daube H, Tessier F, Quentin C. Presence of *mefA* and *mefE* Genes in *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(4):944-6.
- [169] Zeng X, Kong F, Wang H, Darbar A, Gilbert LG. Simultaneous Detection of Nine Antibiotic Resistance-Related Genes in *Streptococcus agalactiae* Using Multiplex PCR and Reverse Line Blot Hybridization Assay. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(1):204-9. doi:10.1128/aac.50.1.204-209.2006.
- [170] Gygax SE, Schuyler JA, Trama JP, Mordechai E, Adelson ME. Detection of Erythromycin and Clindamycin Resistance Genes in Group B Streptococcal Clinical Isolates and Cervicovaginal-Rectal Swabs. *Microb Drug Resist.* 2007;13(2):119-23. doi:10.1089/mdr.2007.732.
- [171] Quiroga M, Pegels E, Oviedo P, Pereyra E, Vergara M. Antibiotic susceptibility patterns and prevalence of group B Streptococcus isolated from pregnant women in Misiones, Argentina. *Braz J Microbiol.* 2008;39(2):245-50. doi:10.1590/s1517-83822008000200009.
- [172] Khan AS, Walsh A, Crowley B. Role of efflux in macrolide resistance in β -haemolytic streptococci of groups A, B, C and G collected in an Irish teaching hospital. *J Med Microbiol.* 2011;60(2):262-4. doi:10.1099/jmm.0.023788-0.
- [173] Heelan JS, Hasenbein ME, McAdam AJ. Resistance of Group B Streptococcus to Selected Antibiotics, Including Erythromycin and Clindamycin. *J Clin Microbiol.* 2004;42(3):1263-4. doi:10.1128/jcm.42.3.1263-1264.2004.
- [174] Gosiewski T, Brzychczy-Włoch M, Heczko PB. The application of multiplex PCR to detect seven different DNA targets in group B streptococci. *Folia Microbial (Praha).* 2012;57(3):163-7. doi:10.1007/s12223-012-0108-7.
- [175] Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med.* 1933;57(4):571-95. doi:10.1084/jem.57.4.571.
-

-
- [176] Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Chapter 22: Streptococcus. In: Medical Microbiology. 6th ed. Missouri: Mosby, Inc. 2009.
- [177] Oberley TD, Duncan JL. Characteristics of Streptolysin O Action. *Infect Immun.* 1971;4(6):683-7.
- [178] Cunningham MW. Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(3):470-511. doi:10.1128/cmr.13.3.470-511.2000.
- [179] Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis.* 2005;5(11):685-94. doi:10.1016/s1473-3099(05)70267-x.
- [180] Martin JM, Green M. Group A streptococcus. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2006;17(3):140-8. doi:10.1053/j.spid.2006.07.001.
- [181] Sriskandan S, McKee A, Hall L, Cohen J. Comparative effects of clindamycin and ampicillin on superantigenic activity of *Streptococcus pyogenes*. *J Antimicrob Chemother.* 1997;40(2):275-7. doi:10.1093/jac/40.2.275.
- [182] Bisno AL, Stevens DL. Streptococcal Infections of Skin and Soft Tissues. *N Engl J Med.* 1996;334(4):240-6. doi:10.1056/nejm199601253340407.
- [183] Silva-Costa C, Friães A, Ramirez M, Melo-Cristino J. Differences between Macrolide-Resistant and -Susceptible *Streptococcus pyogenes*: Importance of Clonal Properties in Addition to Antibiotic Consumption. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(11):5661-6. doi:10.1128/aac.01133-12.
- [184] Chambers HF. Penicillins. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.* 7th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier; 2010.
- [185] Ferretti JJ, McShan WM, Ajdic D, et al. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(8):4658-63. doi:10.1073/pnas.071559398.
- [186] Gutmann L, Tomasz A. Penicillin-resistant and penicillin-tolerant mutants of group A Streptococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982;22(1):128-36. doi:10.1128/aac.22.1.128.
- [187] Horn DL, Zabriskie JB, Austrian R, et al. Why Have Group A Streptococci Remained Susceptible to Penicillin? Report on a Symposium. *Clin Infect Dis.* 1998;26(6):1341-5. doi:10.1086/516375.
- [188] Retsema J, Fu W. Macrolides: structures and microbial targets. *Int J Antimicrob Agents.* 2001;18(1):S3-10. doi:10.1016/s0924-8579(01)00401-0.
-

-
- [189] Henry FC. Protein Synthesis Inhibitors and Miscellaneous Antibacterial Agents. In: Rollins DE, Blumenthal DK, eds. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th ed. New York: McGraw-Hill; 2016.
- [190] Gerding DN, Johnson S. Clostridial infections. In: Goldman L, Schafer AI, eds. Goldman's Cecil Medicine. 24th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2011.
- [191] Dhawan VK, Thadepalli H. Clindamycin: A Review of Fifteen Years of Experience. *Rev Infect Dis.* 1982;4(6):1133-53. doi:10.1093/clinids/4.6.1133.
- [192] Birkenmeyer RD, Kagan F. Lincomycin. XI. Synthesis and structure of clindamycin, a potent antibacterial agent. *J Med Chem.* 1970;13(4):616-9. doi:10.1021/jm00298a007.
- [193] Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML, Jorgensen JH. Practical Disk Diffusion Method for Detection of Inducible Clindamycin Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci. *J Clin Microbiol.* 2003;41(10):4740-4. doi:10.1128/jcm.41.10.4740-4744.2003.
- [194] Angel MR, Balaji V, Prakash J, Brahmadathan KN, Mathews MS. Prevalence of inducible clindamycin resistance in gram positive organisms in a tertiary care centre. *Indian J Med Microbiol.* 2008;26(3):262-4. doi:10.4103/0255-0857.42041.
- [195] Leclercq R, Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35(7):1267-72. doi:10.1128/aac.35.7.1267.
- [196] Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(3):577-85. doi:10.1128/aac.39.3.577.
- [197] Haznedaroğlu T, Mehmet Kural M, Baylan O, Özyurt M, Ardiç N. Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of coagulase negative staphylococci and *Staphylococcus aureus*. *Tıp Araştırmaları Dergisi.* 2011;9(2):120-7.
- [198] Andrašević AT. Twenty Years of Azithromycin - Sensitivity of Major Pathogens. *Medicus.* 2008;17(2):15-20.
- [199] Campelo FA, Pedrosa AC, Antúnez IÁ, Capuz BL. [Phenotypes and mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides in *Streptococcus agalactiae* isolates with clinical significance in an eight-year period (2002-2010)]. *Rev Esp Quimioter.* 2012;25(1):42-6.
-

-
- [200] Felmingham D, Cantón R, Jenkins S. Regional trends in β -lactam, macrolide, fluoroquinolone and telithromycin resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates 2001-2004. *J Infect.* 2007;55(2):111-8. doi:10.1016/j.jinf.2007.04.006.
- [201] DiPersio L, DiPersio J, Frey K, Beach J. Prevalence of the erm(T) Gene in Clinical Isolates of Erythromycin-Resistant Group D *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1567-9. doi:10.1128/aac.01325-07.
- [202] Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(12):2823-30.
- [203] Weisblum B. Macrolide resistance. *Drug Resist Updat.* 1998;1(1):29-41. doi:10.1016/s1368-7646(98)80212-4.
- [204] Weisblum B. Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(4):797-805. doi:10.1128/aac.39.4.797.
- [205] Brenciani A, Bacciaglia A, Vecchi M, Vitali LA, Varaldo PE, Giovanetti E. Genetic elements carrying erm(B) in *Streptococcus pyogenes* and association with tet(M) tetracycline resistance gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1209-16. doi:10.1128/aac.01484-06.
- [206] Giovanetti E, Magi G, Brenciani A, et al. Conjugative transfer of the erm(A) gene from erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* to macrolide-susceptible *S. pyogenes*, *Enterococcus faecalis* and *Listeria innocua*. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50(2):249-52. doi:10.1093/jac/dkf122.
- [207] Giovanetti E, Brenciani A, Lupidi R, Roberts M, Varaldo P. Presence of the tet(O) Gene in Erythromycin- and Tetracycline-Resistant Strains of *Streptococcus pyogenes* and Linkage with either the mef(A) or the erm(A) Gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(9):2844-9. doi:10.1128/aac.47.9.2844-2849.2003.
- [208] Sutcliffe J, Tait-Kamradt A, Wondrack L. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(8):1817-24.
- [209] Clancy J, Petitpas J, Dib-Hajj F, et al. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, mefA, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol.* 1996;22(5):867-79. doi:10.1046/j.1365-2958.1996.01521.x.
-

-
- [210] Tait-Kamradt A, Clancy J, Cronan M, et al. *mefE* is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(10):2251-5.
- [211] Blackman Northwood J, Del Grosso M, Cossins LR, et al. Characterization of Macrolide Efflux Pump *mef* Subclasses Detected in Clinical Isolates of *Streptococcus pyogenes* Isolated between 1999 and 2005. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(5):1921-5. doi:10.1128/aac.01065-08.
- [212] Del Grosso M, Iannelli F, Messina C, et al. Macrolide Efflux Genes *mef(A)* and *mef(E)* Are Carried by Different Genetic Elements in *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):774-8. doi:10.1128/jcm.40.3.774-778.2002.
- [213] Del Grosso M, Camilli R, Barbabella G, Blackman Northwood J, Farrell DJ, Pantosti A. Genetic Resistance Elements Carrying *mef* Subclasses Other than *mef(A)* in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(7):3226-30. doi:10.1128/aac.01713-10.
- [214] Sangvik M, Littauer P, Simonsen GS, Sundsfjord A, Dahl KH. *mef(A)*, *mef(E)* and a new *mef* allele in macrolide-resistant *Streptococcus* spp. isolates from Norway. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(5):841-6. doi:10.1093/jac/dki327.
- [215] Banks DJ, Porcella SF, Barbian KD, Martin JM, Musser JM. Structure and Distribution of an Unusual Chimeric Genetic Element Encoding Macrolide Resistance in Phylogenetically Diverse Clones of Group A *Streptococcus*. *J Infect Dis.* 2003;188(12):1898-908. doi:10.1086/379897.
- [216] Kataja J, Huovinen P, Skurnik M, Seppälä H. Erythromycin resistance genes in group A streptococci in Finland. The Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(1):48-52.
- [217] Bingen E, Leclercq R, Fitoussi F, et al. Emergence of Group A *Streptococcus* Strains with Different Mechanisms of Macrolide Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(5):1199-203. doi:10.1128/aac.46.5.1199-1203.2002.
- [218] Megged O, Assous M, Weinberg G, Schlesinger Y. Inducible clindamycin resistance in β -hemolytic streptococci and *Streptococcus pneumoniae*. *Isr Med Assoc J.* 2013;15(1):27-30.
- [219] Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence.* 2012;3(5):421-569. doi:10.4161/viru.21282.
- [220] Sundlov JA, Gulick AM. Insights into Resistance against Lincosamide Antibiotics. *Structure.* 2009;17(12):1549-50. doi:10.1016/j.str.2009.11.001.
-

-
- [221] Argoudelis AD, Coats JH, Mizsak SA. Microbial transformation of antibiotics clindamycin ribonucleotides. *J Antibiot.* 1977;30(6):474-87. doi:10.7164/antibiotics.30.474.
- [222] Marshall VP, Liggett WF, Ciadella JI. Enzymic inactivation of lincosaminide and macrolide antibiotics: Divalent metal cation and coenzyme specificities. *J Antibiot.* 1989;42(5):826-30. doi:10.7164/antibiotics.42.826.
- [223] Devriese LA. Two new types of resistance to lincomycin in pathogenic staphylococci from animals. *Ann Microbiol (Paris).* 1980;131B(3):261-6.
- [224] Dutta GN, Devriese LA. Degradation of macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotics by *Lactobacillus* strains from animals. *Ann Microbiol (Paris).* 1981;132A(1):51-7.
- [225] Dutta GN, Devriese LA. Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics and degradation of lincosamide antibiotics in streptococci from bovine mastitis. *J Antimicrob Chemother.* 1982;10(5):403-8. doi:10.1093/jac/10.5.403.
- [226] Leclercq R, Brisson-Noel A, Duval J, Courvalin P. Phenotypic expression and genetic heterogeneity of lincosamide inactivation in *Staphylococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31(12):1887-91. doi:10.1128/aac.31.12.1887.
- [227] Bozdogan B, Berrezouga L, Kuo MS, et al. A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(4):925-9.
- [228] Brisson-Noël A, Courvalin P. Nucleotide sequence of gene *linA* encoding resistance to lincosamides in *Staphylococcus haemolyticus*. *Gene.* 1986;43(3):247-53. doi:10.1016/0378-1119(86)90213-1.
- [229] Brisson-Noël A, Delrieu P, Samain D, Courvalin P. Inactivation of lincosaminide antibiotics in *Staphylococcus*. Identification of lincosaminide O-nucleotidyltransferases and comparison of the corresponding resistance genes. *J Biol Chem.* 1988;263(31):15880-7.
- [230] Heir E, Lindstedt BA, Leegaard TM, Gjernes E, Kapperud G. Prevalence and characterization of integrons in blood culture Enterobacteriaceae and gastrointestinal *Escherichia coli* in Norway and reporting of a novel class 1 integron-located lincosamide resistance gene. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2004;3:12. doi:10.1186/1476-0711-3-12.
-

-
- [231] Wang J, Shoemaker NB, Wang GR, Salyers AA. Characterization of a *Bacteroides* mobilizable transposon, NBU2, which carries a functional lincomycin resistance gene. *J Bacteriol.* 2000;182(12):3559-71.
- [232] de Azavedo JC, McGavin M, Duncan C, Low DE, McGeer A. Prevalence and Mechanisms of Macrolide Resistance in Invasive and Noninvasive Group B *Streptococcus* Isolates from Ontario, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(12):3504-8. doi:10.1128/aac.45.12.3504-3508.2001.
- [233] McGehee RF R, Barre FF, Finland M. Resistance of *Staphylococcus aureus* to lincomycin, clindamycin, and erythromycin. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda).* 1968;8:392-7.
- [234] Juyal D, Shamanth AS, Pal S, Sharma MK, Prakash R, Sharma N. The Prevalence of Inducible Clindamycin Resistance Among *Staphylococci* in a Tertiary Care Hospital - A Study from the Garhwal Hills of Uttarakhand, India. *J Clin Diagn Res.* 2013;7(1):61-5. doi:10.7860/jcdr/2012/4877.2671.
- [235] Gadepalli R, Dhawan B, Mohanty S, Kapil A, Das BK, Chaudhry R. Inducible clindamycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Indian J Med Res.* 2006;123(4):571-3.
- [236] Mallick SK, Basak S, Bose S. Inducible Clindamycin Resistance In *Staphylococcus Aureus*-A Therapeutic Challenge. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2009;3:1513-8.
- [237] Weisblum B, Demohn V. Erythromycin-inducible resistance in *Staphylococcus aureus*: survey of antibiotic classes involved. *J Bacteriol.* 1969;98(2):447-52.
- [238] Schmitz FJ, Petridou J, Fluit AC, Hadding U, Peters G, von Eiff C. Distribution of Macrolide-Resistance Genes in *Staphylococcus aureus* Blood-Culture Isolates from Fifteen German University Hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19(5):385-7. doi:10.1007/s100960050500.
- [239] Levin TP, Suh B, Axelrod P, Truant AL, Fekete T. Potential Clindamycin Resistance in Clindamycin-Susceptible, Erythromycin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Report of a Clinical Failure. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(3):1222-4. doi:10.1128/aac.49.3.1222-1224.2005.
- [240] Steward CD, Raney PM, Morrell AK, et al. Testing for Induction of Clindamycin Resistance in Erythromycin-Resistant Isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(4):1716-21. doi:10.1128/jcm.43.4.1716-1721.2005.
-

-
- [241] Jorgensen JH, Crawford SA, McElmeel MI, Fiebelkorn KR. Detection of Inducible Clindamycin Resistance of Staphylococci in Conjunction with Performance of Automated Broth Susceptibility Testing. *J Clin Microbiol.* 2004;42(4):1800-2. doi:10.1128/jcm.42.4.1800-1802.2004.
- [242] Pal N, Sharma B, Sharma R, Vyas L. Detection of inducible clindamycin resistance among Staphylococcal isolates from different clinical specimens in western India. *J Postgrad Med.* 2010;56(3):182-5. doi:10.4103/0022-3859.68637.
- [243] Goyal R, Singh NP, Manchanda V, Mathur M. Detection of clindamycin susceptibility in macrolide resistant phenotypes of *Staphylococcus aureus*. *Indian J Med Microbiol.* 2004;22(4):251-4.
- [244] O'Sullivan MV, Cai Y, Kong F, Zeng X, Gilbert GL. Influence of disk separation distance on accuracy of the disk approximation test for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol.* 2006;44(11):4072-6. doi:10.1128/JCM.01632-06.
- [245] Drinkovic D, Fuller ER, Shore KP, Holland DJ, Ellis-Pegler R. Clindamycin treatment of *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(2):315-6. doi:10.1093/jac/48.2.315.
- [246] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth informational supplement. CLSI Document M100-S17. Wayne, PA. 2007;27.
- [247] Deotale V, Mendiratta DK, Raut U, Narang P. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. *Indian J Med Microbiol.* 2010;28(2):124-6. doi:10.4103/0255-0857.62488.
- [248] Ananthanarayan R, Paniker CKJ. *Staphylococcus*. In: Text book of Microbiology. 8th Edn. Hyderabad, India: Universities Press; 2009.
- [249] Nasrin N, Asaduzzaman M, Mowla R, Al-Hasan Imam KM, Azad Chowdhury AK. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of optochin resistant *Streptococcus pneumoniae*. *J Pharm Res.* 2012;5(2):939-42.
- [250] Kamlage B. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR, eds. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1996. doi:10.1002/food.19960400226.
- [251] Facklam R. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(4):613-30. doi:10.1128/cmr.15.4.613-630.2002.
-

-
- [252] Malhotra-Kumar S, Wang S, Lammens C, Chapelle S, Goossens H. Bacitracin-Resistant Clone of *Streptococcus pyogenes* Isolated from Pharyngitis Patients in Belgium. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):5282-4. doi:10.1128/jcm.41.11.5282-5284.2003.
- [253] Mihaila-Amrouche L, Bouvet A, Loubinoux J. Clonal Spread of emm Type 28 Isolates of *Streptococcus pyogenes* That Are Multiresistant to Antibiotics. *J Clin Microbiol.* 2004;42(8):3844-6. doi:10.1128/jcm.42.8.3844-3846.2004.
- [254] Perez-Trallero E, Garcia C, Orden B, Marimon JM, Montes M. Dissemination of emm28 erythromycin-, clindamycin- and bacitracin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23(2):123-6. doi:10.1007/s10096-003-1069-1.
- [255] Gupta V, Datta P, Rani H, Chander J. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus*: a study from North India. *J Postgrad Med.* 2009;55(3):176-9. doi:10.4103/0022-3859.57393.
- [256] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI Document M100-S22, M2-7 and M-7. Wayne, PA. 2012. Guidelines for streptococcus spp, β -hemolytic group 2012.
- [257] Boutiba-Ben Boubaker I, Ben Abbes R, Ben Abdallah H, et al. Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the routine detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(8):762-5.
- [258] Steward CD, Raney PM, Morrell AK, et al. Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(4):1716-21. doi:10.1128/JCM.43.4.1716-1721.2005.
- [259] Rizzotti L, Simeoni D, Cocconcelli P, Gazzola S, Dellaglio F, Torriani S. Contribution of enterococci to the spread of antibiotic resistance in the production chain of swine meat commodities. *J Food Prot.* 2005;68(5):955-65.
- [260] Matsuoka M, János L, Endou K, Nakajima Y. Cloning and sequences of inducible and constitutive macrolide resistance genes in *Staphylococcus aureus* that correspond to an ABC transporter. *FEMS Microbiology Letters.* 1999;181:91-100. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb08830.x.
- [261] Seo YS, Srinivasan U, Oh K-Y, et al. Changing Molecular Epidemiology of Group B *Streptococcus* in Korea. *J Korean Med Sci.* 2010;25(6):817-23. doi:10.3346/jkms.2010.25.6.817.
-

-
- [262] Lozano C, Aspiroz C, Sáenz Y, et al. Genetic environment and location of the *lnu(A)* and *lnu(B)* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci of animal and human origin. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(12):2804-8. doi:10.1093/jac/dks320.
- [263] MedCalc. Free statistical calculators: Diagnostic test evaluation calculator. https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php. Приступљено 28. 11. 2017.
- [264] Cohen ML. Changing patterns of infectious disease. *Nature.* 2000;406(6797):762-7. doi:10.1038/35021206.
- [265] Moellering RC. Linezolid: the first oxazolidinone antimicrobial. *Ann Intern Med.* 2003;138(2):135-42.
- [266] Tenover FC, Hughes JM. The challenges of emerging infectious diseases. Development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens. *JAMA.* 1996;275(4):300-4.
- [267] Williams JD. Antibiotic resistance in hospital pathogens--acquisition or spread? *Int J Antimicrob Agents.* 2001;18(3):295-8.
- [268] Jones RN. Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years. *Chest.* 2001;119(2 Suppl):397S-404S.
- [269] Lieberman JM. Appropriate antibiotic use and why it is important: the challenges of bacterial resistance. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22(12):1143-51. doi:10.1097/01.inf.0000101851.57263.63.
- [270] Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science.* 1992;257(5073):1050-5.
- [271] Levy SB. Antibiotic resistance: consequences of inaction. *Clin Infect Dis.* 2001;33(Suppl 3):S124-9. doi:10.1086/321837.
- [272] World Health Organization. Antibiotic resistance: Key facts. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>. Ажурирано новембра 2017. Приступљено 28. 11. 2017.
- [273] Centers for Disease Control and Prevention. Facts about Antibiotic Resistance. <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/community/about/fast-facts.html>. Ажурирано 22. 12. 2016. Приступљено 28. 11. 2017.
- [274] Cars O, Mölsted S, Melander A. Variation in antibiotic use in the European Union. *Lancet.* 2001;357(9271):1851-3. doi:10.1016/S0140-6736(00)04972-2.
-

-
- [275] Ball P, Vaquero F, Cars O, et al. Antibiotic therapy of community respiratory tract infections: strategies for optimal outcomes and minimized resistance emergence. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49(1):31-40.
- [276] World Health Organization. Antimicrobial resistance global report on surveillance : 2014 summary. WHO/HSE/PED/AIP/2014.2. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112647/1/WHO_HSE_PED_AIP_2014.2_eng.pdf. Публиковано 2014. Приступљено 28. 11. 2017.
- [277] Normark BH, Normark S. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med.* 2002;252(2):91-106.
- [278] Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science.* 1994;264(5157):375-82.
- [279] Hawkey PM. Mechanisms of resistance to antibiotics. *Intensive Care Med.* 2000;26(Suppl 1):S9-13.
- [280] Healy CM, Hulten KG, Palazzi DL, Campbell JR, Baker CJ. Emergence of new strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. *Clin Infect Dis.* 2004;39(10):1460-6. doi:10.1086/425321.
- [281] World Health Organization. Overcoming antimicrobial resistance. WHO/CDS/2000.2. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66672/1/WHO_CDS_2000.2.pdf. Публиковано 2000. Приступљено 28. 11. 2017.
- [282] Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 1994;7(1):117-40.
- [283] Huebner J, Goldmann DA. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu Rev Med.* 1999;50:223-36. doi:10.1146/annurev.med.50.1.223.
- [284] Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(4):870-926. doi:10.1128/CMR.00109-13.
- [285] Mokta KK, Verma S, Chauhan D, et al. Inducible Clindamycin Resistance among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* from Sub Himalayan Region of India. *J Clin Diagn Res.* 2015;9(8):DC20-3. doi:10.7860/JCDR/2015/13846.6382.
- [286] Mahesh CB, Ramakant BK, Jagadeesh VS. The Prevalence of Inducible and Constitutive Clindamycin Resistance Among the Nasal Isolates of *Staphylococci*. *J Clin Diagn Res.* 2013;7(8):1620-2. doi:10.7860/JCDR/2013/6378.3223.
- [287] Schreckenberger PC, Ilendo E, Ristow KL. Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative
-

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

- a teaching hospital in India. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2013;3(2):148-53. doi:10.1016/S2221-1691(13)60040-4.
- [298] Eksi F, Gayyurhan ED, Bayram A, Karsligil T. Determination of antimicrobial susceptibility patterns and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* strains recovered from southeastern Turkey. *J Microbiol Immunol Infect.* 2011;44(1):57-62. doi:10.1016/j.jmii.2011.01.011.
- [299] Aktas Z, Aridogan A, Kayacan CB, Aydin D. Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in staphylococci isolated in Istanbul, Turkey. *J Microbiol.* 2007;45(4):286-90.
- [300] Moosavian M, Shoja S, Rostami S, Torabipour M, Farshadzadeh Z. Inducible clindamycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to erm genes, Iran. *Iran J Microbiol.* 2014;6(6):421-7.
- [301] Hamilton-Miller JM, Shah S. Patterns of phenotypic resistance to the macrolide-lincosamide-ketolide-streptogramin group of antibiotics in staphylococci. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46(6):941-9.
- [302] Bansal N, Chaudhary U, Gupta V. Prevalence of inducible clindamycin resistance in clinical isolates of coagulase negative staphylococci at a tertiary care hospital. *Ann Trop Med Public Health.* 2012;5(5):427-30. doi:10.4103/1755-6783.105124.
- [303] Ajantha GS, Kulkarni RD, Shetty J, Shubhada C, Jain P. Phenotypic detection of inducible clindamycin resistance among *Staphylococcus aureus* isolates by using the lower limit of recommended inter-disk distance. *Indian J Pathol Microbiol.* 2008;51(3):376-8.
- [304] Tekin A, Dal T, Deveci O, Tekin R, Atmaca S, Dayan S. Assessment of methicillin and clindamycin resistance patterns in *Staphylococcus aureus* isolated from a tertiary hospital in Turkey. *Infez Med.* 2013;21(2):111-6.
- [305] Fasih N, Irfan S, Zafar A, Khan E, Hasan R. Inducible clindamycin resistance due to expression of erm genes in *Staphylococcus aureus*: report from a tertiary care Hospital Karachi, Pakistan. *J Pak Med Assoc.* 2010;60(9):750-3.
- [306] Fokas S, Fokas S, Tsironi M, Kalkani M, Dionysopouloy M. Prevalence of inducible clindamycin resistance in macrolide-resistant *Staphylococcus* spp. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(4):337-40. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01101.x.
- [307] Aleksandra AD, Misic MS, Mira ZV, et al. Prevalence of inducible clindamycin resistance among community-associated staphylococcal isolates in central Serbia. *Indian J Med Microbiol.* 2014;32(1):49-52. doi:10.4103/0255-0857.124304.

-
- [308] Seifi N, Kahani N, Askari E, Mahdipour S, Naderi NM. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from Mashhad, Iran. *Iran J Microbiol.* 2012;4(2):82-6.
- [309] Zachariah R, Basireddy S, Kabra V, Singh M, Ali S, Sardar A. Phenotypic characterization of macrolide and lincosamide resistance patterns in clinical isolates of staphylococci. *J NTR Univ Health Sci.* 2016;5(3):187-91. doi:10.4103/2277-8632.191847.
- [310] Lenart-Boroń A, Wolny-Kołodka K, Stec J, Kasprowic A. Phenotypic and Molecular Antibiotic Resistance Determination of Airborne Coagulase Negative *Staphylococcus* spp. Strains from Healthcare Facilities in Southern Poland. *Microb Drug Resist.* 2016;22(7):515-22. doi:10.1089/mdr.2015.0271.
- [311] Goudarzi G, Tahmasbi F, Anbari K, Ghafarzadeh M. Distribution of Genes Encoding Resistance to Macrolides Among *Staphylococci* Isolated From the Nasal Cavity of Hospital Employees in Khorramabad, Iran. *Iran Red Crescent Med J.* 2016;18(2):e25701. doi:10.5812/ircmj.25701.
- [312] Juda M, Chudzik-Rzad B, Malm A. The prevalence of genotypes that determine resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins B compared with spiramycin susceptibility among erythromycin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111(3):155-60. doi:10.1590/0074-02760150356.
- [313] Coutinho Vde L, Paiva RM, Reiter KC, de-Paris F, Barth AL, Machado AB. Distribution of *erm* genes and low prevalence of inducible resistance to clindamycin among staphylococci isolates. *Braz J Infect Dis.* 2010;14(6):564-8.
- [314] Kamimiya S, Weisblum B. Induction of *ermSV* by 16-membered-ring macrolide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(3):530-4.
- [315] Deng F, Wang H, Liao Y, et al. Detection and Genetic Environment of Pleuromutilin-Lincosamide-Streptogramin A Resistance Genes in *Staphylococci* Isolated from Pets. *Front Microbiol.* 2017;8:234. doi:10.3389/fmicb.2017.00234.
- [316] Aydeniz Ozansoy F, Cevahir N, Kaleli İ. [Investigation of macrolide, lincosamide and streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples by phenotypical and genotypical methods]. *Mikrobiyol Bul.* 2015;49(1):1-14.
- [317] Faccione D, Togneri AM, Podesta L, et al. MRSA Pediatric clone expressing *ermC* plus *lnuA* genes causing nosocomial transmission and healthcare workers colonization in a neonatal intensive care unit. *Infect Genet Evol.* 2014;25:78-80. doi:10.1016/j.meegid.2014.04.005.
-

-
- [318] Szczuka E, Makowska N, Bosacka K, Słotwińska A, Kaznowski A. Molecular basis of resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins in *Staphylococcus hominis* strains isolated from clinical specimens. *Folia Microbiol (Praha)*. 2016;61:143-147. doi:10.1007/s12223-015-0419-6.
- [319] Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Bakhrouf A. Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Notes*. 2011;4:453. doi:10.1186/1756-0500-4-453.
- [320] Cetin ES, Gunes H, Kaya S, Aridogan BC, Demirci M. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among clinical staphylococcal isolates in a Turkish university hospital. *J Microbiol Immunol Infect*. 2010;43(6):524-9. doi:10.1016/S1684-1182(10)60081-3.
- [321] Novotna G, Adamkova V, Janata J, Melter O, Spizek J. Prevalence of resistance mechanisms against macrolides and lincosamides in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the Czech Republic and occurrence of an undefined mechanism of resistance to lincosamides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(8):3586-9. doi:10.1128/AAC.49.8.3586-3589.2005.
- [322] Ojo KK, Striplin MJ, Ulep CC, et al. *Staphylococcus* efflux *msr(A)* gene characterized in *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, and *Pseudomonas* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(3):1089-91. doi:10.1128/AAC.50.3.1089-1091.2006.
- [323] Westh H, Hougaard DM, Vuust J, Rosdahl VT. *erm* genes in erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *APMIS*. 1995;103(3):225-32.
- [324] Bouchami O, Achour W, Ben Hassen A. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates from neutropenic patients in Tunisia. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(1):103-6. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01567.x.
- [325] Lina G, Quaglia A, Reverdy M-E, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. Distribution of Genes Encoding Resistance to Macrolides, Lincosamides, and Streptogramins among *Staphylococci*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(5):1062-6.
- [326] Ghanbari F, Ghajavand H, Havaei R, et al. Distribution of *erm* genes among *Staphylococcus aureus* isolates with inducible resistance to clindamycin in Isfahan, Iran. *Adv Biomed Res*. 2016;5:62. doi:10.4103/2277-9175.179184.
-

-
- [327] Sadari H, Emadi B, Owlia P. Phenotypic and genotypic study of macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLSB) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *Med Sci Monit.* 2011;17(2):BR48-53.
- [328] Pereira JN, Rabelo MA, Lima JL, Neto AM, Lopes AC, Maciel MA. Phenotypic and molecular characterization of resistance to macrolides, lincosamides and type B streptogramin of clinical isolates of *Staphylococcus* spp. of a university hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2016;20(3):276-81. doi:10.1016/j.bjid.2016.03.003.
- [329] Hosseini SS, Niakan M, Sadari H, et al. Frequency of genes encoding erythromycin ribosomal methylases among *Staphylococcus aureus* clinical isolates with different D-phenotypes in Tehran, Iran. *Iran J Microbiol.* 2016;8(3):161-7.
- [330] Sarrou S, Liakopoulos A, Chasioti M, et al. Dissemination of Methicillin-Susceptible CC398 *Staphylococcus aureus* strains in a rural Greek area. *PLoS One.* 2015;10(4):e0122761. doi:10.1371/journal.pone.0122761.
- [331] Sarrou S, Liakopoulos A, Tsoumani K, et al. Characterization of a Novel *Isa(E)*- and *lnu(B)*-Carrying Structure Located in the Chromosome of a *Staphylococcus aureus* Sequence Type 398 Strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(2):1164-6. doi:10.1128/AAC.01178-15.
- [332] Montilla A, Zavala A, Cáceres Cáceres R, et al. Genetic environment of the *lnu(B)* gene in a *Streptococcus agalactiae* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(9):5636-7. doi:10.1128/AAC.02630-14.
- [333] Li XS, Dong WC, Wang XM, et al. Presence and genetic environment of pleuromutilin-lincosamide-streptogramin A resistance gene *Isa(E)* in enterococci of human and swine origin. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(5):1424-6. doi:10.1093/jac/dkt502.
- [334] Fenoll A, Aguilar L, Robledo O, et al. Influence of the beta-lactam resistance phenotype on the cefuroxime versus cefditoren susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* recovered from children with acute otitis media. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(2):323-7. doi:10.1093/jac/dkm209.
- [335] Jensen LB, Frimodt-Møller N, Aarestrup FM. Presence of *erm* gene classes in gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;170(1):151-8.
-

-
- [336] Fuchs PC, Barry AL, Brown SD. Susceptibility of multi-resistant *Streptococcus pneumoniae* to ciprofloxacin, ofloxacin and levofloxacin. *J Antimicrob Chemother.* 1997;39(5):671-2.
- [337] Zhanel GG, Karlowsky JA, Palatnick L, Vercaigne L, Low DE, Hoban DJ. Prevalence of antimicrobial resistance in respiratory tract isolates of *Streptococcus pneumoniae*: results of a Canadian national surveillance study. The Canadian Respiratory Infection Study Group. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(10):2504-9.
- [338] Hoban DJ, Doern GV, Fluit AC, Roussel-Delvallez M, Jones RN. Worldwide prevalence of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis.* 2001;32(Suppl 2):S81-93. doi:10.1086/320181.
- [339] Taha N, Araj GF, Wakim RH, et al. Genotypes and serotype distribution of macrolide resistant invasive and non- invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Lebanon. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2012;11:2. doi:10.1186/1476-0711-11-2.
- [340] SENTRY Participants Group (Latin America), Gales A, Sader H, Jones RN. Activities of BMS 284756 (T-3811) against *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, and *Streptococcus pneumoniae* Isolates from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Medical Centers in Latin America (1999). *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(5):1463-6. doi:10.1128/AAC.45.5.1463-1466.2001.
- [341] Reinert RR, Filimonova OY, Al-Lahham A, et al. Mechanisms of Macrolide Resistance among *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Russia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(6):2260-2. doi:10.1128/AAC.01270-07.
- [342] Monaco M, Camilli R, D'Ambrosio F, Del Grosso M, Pantosti A. Evolution of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Italy. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(2):256-9. doi:10.1093/jac/dkh551.
- [343] Gajić I, Mijač V, Opavski N, et al. Distribution of macrolide-resistant genes among isolates of macrolideresistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* in Serbia. *Arch Biol Sci.* 2014;66(1):93-8. doi:10.2298/ABS1401093G.
- [344] Hadnađev M, Gajić I, Mijač V, et al. Phenotypes and genotypes of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Serbia. *Arch Biol Sci.* 2014;66(1):99-105. doi:10.2298/ABS1401099H.
- [345] Gajić I, Opavski N, Mijač V, Ranin L. Macrolide-resistant phenotypes of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Serbia. *Arch Biol Sci.* 2012;64(4):1377-82. doi:10.2298/ABS1204377G.
-

-
- [346] Efstratiou A. Group A streptococci in the 1990s. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45(Suppl):3-12.
- [347] Saifi M, Pourshafie MR, Eshraghian MR, Soltan Dallal MM. Anti-microbial resistance of Enterococci isolated from urinary tract infections in Iran. *Iran Biomed J.* 2008;12(3):185-90.
- [348] Praharaj I, Sujatha S, Parija SC. Phenotypic & genotypic characterization of vancomycin resistant Enterococcus isolates from clinical specimens. *Indian J Med Res.* 2013;138(4):549-56.
- [349] Köller T, Manetti AG, Kreikemeyer B, et al. Typing of the pilus-protein-encoding FCT region and biofilm formation as novel parameters in epidemiological investigations of *Streptococcus pyogenes* isolates from various infection sites. *J Med Microbiol.* 2010;59(Pt 4):442-52. doi:10.1099/jmm.0.013581-0.
- [350] Bae SY, Kim JS, Kwon JA, et al. Phenotypes and genotypes of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* isolated in Seoul, Korea. *J Med Microbiol.* 2007;56(Pt 2):229-35. doi:10.1099/jmm.0.46825-0.
- [351] Savoia D, Avanzini C, Bosio K, et al. Macrolide resistance in group A streptococci. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45(1):41-7. doi:10.1093/jac/45.1.41.
- [352] Malbruny B, Nagai K, Coquemont M, et al. Resistance to macrolides in clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* due to ribosomal mutations. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49(6):935-9.
- [353] Catalanotti P, Catania MR, Lucido M, et al. T serotyping and genomic profile of erythromycin-resistant or -sensitive *Streptococcus pyogenes* isolated in Campania Region, Italy. *J Chemother.* 2005;17(2):131-7. doi:10.1179/joc.2005.17.2.131.
- [354] Shibl AM. Patterns of macrolide resistance determinants among *S. pyogenes* and *S. pneumoniae* isolates in Saudi Arabia. *J Int Med Res.* 2005;33(3):349-55. doi:10.1177/147323000503300310.
- [355] Pavlovic L, Grego E, Sipetic-Grujicic S. Prevalence of macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* collected in Serbia. *Jpn J Infect Dis.* 2010;63(4):275-6.
- [356] Bingen E, Fitoussi F, Doit C, et al. Resistance to macrolides in *Streptococcus pyogenes* in France in pediatric patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(6):1453-7.
- [357] Gattringer R, Sauermann R, Lagler H, et al. Antimicrobial susceptibility and macrolide resistance genes in *Streptococcus pyogenes* collected in Austria and
-

-
- Hungary. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;24(3):290-3. doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.01.009.
- [358] Sauermann R, Gattringer R, Graninger W, Buxbaum A, Georgopoulos A. Phenotypes of macrolide resistance of group A streptococci isolated from outpatients in Bavaria and susceptibility to 16 antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(1):53-7.
- [359] Petinaki E, Kontos F, Pratti A, Skulakis C, Maniatis AN. Clinical isolates of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* in Central Greece. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;21(1):67-70.
- [360] Alós JI, Aracil B, Oteo J, Torres C, Gómez-Garcés JL. High prevalence of erythromycin-resistant, clindamycin/miocomycin-susceptible (M phenotype) *Streptococcus pyogenes*: results of a Spanish multicentre study in 1998. Spanish Group for the Study of Infection in the Primary Health Care Setting. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45(5):605-9.
- [361] Feng L, Lin H, Ma Y, et al. Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* from Chinese pediatric patients in association with Tn916 transposons family over a 16-year period. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;67(4):369-75. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.03.014.
- [362] Liu X, Shen X, Chang H, et al. High macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* strains isolated from children with pharyngitis in China. *Pediatr Pulmonol.* 2009;44(5):436-41. doi:10.1002/ppul.20976.
- [363] Sasan M-S, Zanjan FR, Birjandi B, Naderinasab M, Ejtehadi M-M. Extremely High Prevalence of Erythromycin Resistance of Group A Beta Hemolytic Streptococci in Mashhad (Iran). *Iran J Pediatr.* 2011;21(1):126-127.
- [364] Mazzariol A, Koncan R, Bahar G, Cornaglia G. Susceptibilities of *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* to macrolides and telithromycin: data from an Italian multicenter study. *J Chemother.* 2007;19(5):500-7. doi:10.1179/joc.2007.19.5.500.
- [365] Mazzariol A, Koncan R, Vitali LA, Cornaglia G. Activities of 16-membered ring macrolides and telithromycin against different genotypes of erythromycin-susceptible and erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(6):1171-6. doi:10.1093/jac/dkm089.
- [366] Villaseñor-Sierra A, Katahira E, Jaramillo-Valdivia AN, et al. Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains isolated from
-

- invasive and non-invasive infections from Mexico and the USA during 1999-2010. *Int J Infect Dis.* 2012;16(3):e178-81. doi:10.1016/j.ijid.2011.11.005.
- [367] Zavadzka D, Bērziņa D, Drukaļska L, Pugacova N, Miklasevics E, Gardovska D. Macrolide resistance in group A beta haemolytic *Streptococcus* isolated from outpatient children in Latvia. *APMIS.* 2010;118(5):366-70. doi:10.1111/j.1600-0463.2010.02607.x.
- [368] Banche G, Roana J, Allizond V, et al. In vitro compared activity of telithromycin and azithromycin against northwest Italian isolates of *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* with different erythromycin susceptibility. *Lett Appl Microbiol.* 2008;47(4):309-14. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02423.x.
- [369] Martínez S, Amoroso AM, Famiglietti A, et al. Genetic and phenotypic characterization of resistance to macrolides in *Streptococcus pyogenes* from Argentina. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;23(1):95-8.
- [370] Barkema HW, Green MJ, Bradley AJ, Zadoks RN. Invited review: The role of contagious disease in udder health. *J Dairy Sci.* 2009;92(10):4717-29. doi:10.3168/jds.2009-2347.
- [371] Köller T, Manetti AG, Kreikemeyer B, et al. Typing of the pilus-protein-encoding FCT region and biofilm formation as novel parameters in epidemiological investigations of *Streptococcus pyogenes* isolates from various infection sites. *J Med Microbiol.* 2010;59(Pt 4):442-52. doi:10.1099/jmm.0.013581-0.
- [372] El-Kersh TA, Marie MA, Al-Sheikh YA, Al-Agamy MH, Al-Bloushy AA. Prevalence and risk factors of early fecal carriage of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus* spp and their antimicrobial resistant patterns among healthy neonates born in a hospital setting in central Saudi Arabia. *Saudi Med J.* 2016;37(3):280-7. doi:10.15537/smj.2016.3.13871.
- [373] Figueira-Coelho J, Ramirez M, Salgado MJ, Melo-Cristino J. *Streptococcus agalactiae* in a large Portuguese teaching hospital: antimicrobial susceptibility, serotype distribution, and clonal analysis of macrolide-resistant isolates. *Microb Drug Resist.* 2004;10(1):31-6. doi:10.1089/107662904323047772.
- [374] Emaneini M, Mirsalehian A, Beigvierdi R, et al. High Incidence of Macrolide and Tetracycline Resistance among *Streptococcus Agalactiae* Strains Isolated from Clinical Samples in Tehran, Iran. *Maedica (Buchar).* 2014;9(2):157-61.
- [375] Hsueh PR, Teng LJ, Lee LN, Ho SW, Yang PC, Luh KT. High incidence of erythromycin resistance among clinical isolates of *Streptococcus agalactiae* in

-
- Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(11):3205-8. doi:10.1128/AAC.45.11.3205-3208.2001.
- [376] Capraro GA, Rambin ED, Vanchiere JA, Bocchini JA Jr, Matthews-Greer JM. High rates of inducible clindamycin resistance among prenatal group B streptococcal isolates in one northwest Louisiana academic medical center. *J Clin Microbiol.* 2013;51(7):2469. doi:10.1128/JCM.00279-13.
- [377] Corrêa AB, Silva LG, Pinto Tde C, et al. The genetic diversity and phenotypic characterisation of *Streptococcus agalactiae* isolates from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(8):1002-6.
- [378] Yook J-H, Kim MY, Kim EJ, et al. Risk Factors Associated with Group B *Streptococcus* Resistant to Clindamycin and Erythromycin in Pregnant Korean Women. *Infect Chemother.* 2013;45(3):299-307. doi:10.3947/ic.2013.45.3.299.
- [379] De Francesco MA, Caracciolo S, Gargiulo F, Manca N. Phenotypes, genotypes, serotypes and molecular epidemiology of erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(8):1741-7. doi:10.1007/s10096-011-1495-4.
- [380] Palmeiro JK, Dalla-Costa LM, Fracalanza SEL, et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of Group B Streptococcal Isolates in Southern Brazil. *J Clin Microbiol.* 2010;48(12):4397-403. doi:10.1128/JCM.00419-10.
- [381] Ip M, Lyon DJ, Yung RW, Chan C, Cheng AF. Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Hong Kong. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(5):1578-80.
- [382] Uh Y, Kim HY, Jang IH, Hwang GY, Yoon KJ. Correlation of Serotypes and Genotypes of Macrolide-Resistant *Streptococcus agalactiae*. *Yonsei Med J.* 2005;46(4):480-3. doi:10.3349/ymj.2005.46.4.480.
- [383] Merino Díaz L, Torres Sánchez MJ, Aznar Martín J. Prevalence and mechanisms of erythromycin and clindamycin resistance in clinical isolates of beta-haemolytic streptococci of Lancefield groups A, B, C and G in Seville, Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(1):85-7. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01881.x.
- [384] Murray BE, Weinstock GM. Enterococci: new aspects of an old organism. *Proc Assoc Am Physicians.* 1999;111(4):328-34.
- [385] Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3(1):46-65.
-

-
- [386] Kaye KS, Engemann JJ, Fraimow HS, Abrutyn E. Pathogens resistant to antimicrobial agents: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infect Dis Clin North Am.* 2004;18(3):467-511. doi:10.1016/j.idc.2004.04.003.
- [387] Katz KC, McGeer AJ, Duncan CL, et al. Emergence of macrolide resistance in throat culture isolates of group a streptococci in Ontario, Canada, in 2001. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(7):2370-2.
- [388] Jia W, Li G, Wang W. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species: a hospital-based study in China. *Int J Environ Res Public Health.* 2014;11(3):3424-42. doi:10.3390/ijerph110303424.
- [389] Reyes J, Hidalgo M, Díaz L, et al. Characterization of macrolide resistance in Gram-positive cocci from Colombian hospitals: a countrywide surveillance. *Int J Infect Dis.* 2007;11(4):329-36. doi:10.1016/j.ijid.2006.09.005.
- [390] Min YH, Jeong JH, Choi YJ, et al. Heterogeneity of macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(11):3415-20.
- [391] Schmitz FJ, Sadurski R, Kray A, et al. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45(6):891-4.
- [392] Roberts MC. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;282(2):147-59. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01145.x.
- [393] Canu A, Leclercq R. Macrolides and Lincosamides. In: Mayers DL, editor. *Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance.* NJ, USA: Humana Press; 2009. doi:10.1007/978-1-59745-180-2.
- [394] Silva-Costa C, Ramirez M, Melo-Cristino J. Rapid Inversion of the Prevalences of Macrolide Resistance Phenotypes Paralleled by a Diversification of T and emm Types among *Streptococcus pyogenes* in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(5):2109-11. doi:10.1128/AAC.49.5.2109-2111.2005.
- [395] Van Heirstraeten L, Coenen S, Lammens C, Hens N, Goossens H, Malhotra-Kumar S. Antimicrobial drug use and macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*, Belgium. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(9):1515-8. doi:10.3201/eid1809.120049.
- [396] Hawkins PA, Law CS, Metcalf BJ, et al. Cross-resistance to lincosamides, streptogramins A and pleuromutilins in *Streptococcus agalactiae* isolates from the USA. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(7):1886-92. doi:10.1093/jac/dkx077.
-

- [397] Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):836-71. doi:10.1128/CMR.14.4.836-871.2001.
- [398] Martineau F, Picard FJ, Lansac N, et al. Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(2):231-8.
- [399] Abdollahi S, Ramazanzadeh R, Delami Khiabani Z, Kalantar E, Menbari S. Molecular Detection of Inducible Clindamycin Resistance among Staphylococcal Strains Isolated from Hospital Patients. *J Ardabil Univ Med Sci.* 2013;13(1):59-68.
- [400] Park AK, Kim H, Jin HJ. Phylogenetic analysis of rRNA methyltransferases, Erm and KsgA, as related to antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Lett.* 2010;309(2):151-62. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02031.x.
- [401] Srinivasan U, Miller B, Debusscher J, et al. Identification of a Novel Keyhole Phenotype in Double-Disk Diffusion Assays of Clindamycin-Resistant Erythromycin-Sensitive Strains of *Streptococcus agalactiae*. *Microb Drug Resist.* 2011;17(1):121-4. doi:10.1089/mdr.2010.0040.