

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Ana M. Janjušević

Kolonizacija vankomicin-rezistentnim  
*Enterococcus* spp. sojevima u bolničkoj sredini –  
genotipska i fenotipska karakterizacija sojeva i faktori  
rizika za kolonizaciju

doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Ana M. Janjušević

Colonization of vancomycin-resistant  
*Enterococcus* spp. strains in hospitals setting –  
phenotypic and genotypic characterization of  
isolated strains and risk factors  
for colonization

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

Mentori:

prof. dr Ivana Ćirković, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

prof. dr Ljiljana Marković-Denić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

prof. dr Slobodanka Đukić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

prof. dr Goran Stevanović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

prof. dr Biljana Mijović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Istočnom Sarajevu

Datum odbrane doktorskse disertacije: \_\_\_\_\_

*Mojoj mami,  
koja me je naučila lepoti davanja  
i otkrila čarobne puteve mogućeg*



*„Niko neće pitati koliko su vas ti plodovi koštali. Jer lepota dela onoga ko je radio s ljubavlju tako je snažna da se ne može primetiti očima. Kao što akrobata leti kroz vazduh bez imalo napora, tako i uspeh - kad dođe - izgleda kao najprirodnija stvar.*

*Međutim, ako se neko i usudi da postavi to pitanje, odgovor bi glasio: mislio sam da odustanem, mislio sam da me Bog više ne čuje, mnogo puta sam morao da promenim smer, a u nekim trenucima sam i napustio svoj put. Ali, uprkos svemu, ponovo sam krenuo napred, jer sam bio uveren da nema drugog načina da proživim svoj život.*

*Naučio sam koje mostove treba preći a koje spaliti zauvek.“*

*Paulo Koeljo,  
Rukopis otkriven u Akri*

## ZAHVALNICA

Zahvaljujem se svojoj dragoj mentorki, prof. dr Ivani Ćirković na velikoj podršci, dobroti i razumevanju tokom izrade doktorske disertacije, veri u naš zajednički rad i ukazanom poverenju da svoje ideje samostalno realizujem. A nadasve, zahvaljujem se na dragocenom prijateljstvu koje je proisteklo iz dugogodišnje saradnje.

Zahvaljujem se dragoj komentorki, prof. dr Ljiljani Marković-Denić na divnoj saradnji, kolegijalnosti, strpljenju kao i na velikoj pomoći i savetima prilikom izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem se svojoj pokojnoj mentorki prof. dr Aniti Grgurević sa kojom sam započela naučno usavršavanje, a čiji prerani odlazak nas je sprečio da se ovde i sada radujemo zajedno.

Zahvaljujem se članovima Komisije, prof. dr Slobodanki Đukić, prof. dr Goranu Stevanoviću i prof. dr Biljani Mijović na korisnim savetima, komentarima i sugestijama prilikom uobličavanja doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dr.sc. Rajni Minić koja je bila moja velika podrška i oslonac u toku eksperimentalnog rada.

Zahvaljujem se direktorima Kliničko-bolničkog centra Zemun, Kliničko-bolničkog centra Zvezdara, Klinike za hematologiju, Klinike za nefrologiju i Klinike za akutne infektivne bolesti Kliničkog centra Srbije koji su prepoznali značaj ovog istraživanja i otvorili mi vrata svojih ustanova.

Zahvaljujem se svim medicinskim sestrama, a posebno Gordani Janković, Mirjani Mitić, Biljani Ćirović, Dragani Marić, Svetlani Žeželj Stanivuković, Zorici Nikolić, Marini Štieglar i Divni Milivojević koje su mi svojim razumevanjem i predusretljivošću neizmerno pomogle oko prve faze istraživanja.

Zahvaljujem se svojoj direktorki, dr Veri Stoiljković na ukaznom poverenju i moralnoj i materijanoj podršci .

Zahvaljujem se svim svojim prijateljima i kolegama koji su mi bili velika podrška, koji su se radovali i tugovali sa mnom i koju su čvrsto verovali u mene, kao i svim divnim, dobrim ljudima koje sam upoznala tokom ovog puta.

I na kraju, ali ne najmanje važno, zahvalila bih se svojoj porodici koja je moj najveći oslonac u životu.

## Kolonizacija vankomicin-rezistentnim *Enterococcus* spp. sojevima u bolničkoj sredini - genotipska i fenotipska karakterizacija sojeva i faktori rizika za kolonizaciju

**UVOD:** Detekcija fekalne kolonizacije vankomicin-rezistentnim *Enterococcus* spp. (VRE) sojevima u bolničkoj sredini ima veliki značaj u nadzoru nad bolničkom infekcijom s obzirom da je poznato da VRE kolonizacija najčešće prethodi VRE infekciji. Ovo istraživanje predstavlja prvo epidemiološko-mikrobiološko istraživanje o fekalnoj kolonizaciji VRE sojevima kod hospitalizovanih pacijenata na odeljenjima sa povišenim rizikom za nastanak VRE kolonizacije.

**CILJEVI:** Ciljevi ovog istraživanja su bili: (1) utvrđivanje učestalosti fekalne kolonizacije VRE sojevima kod hospitalizovanih pacijenata na odeljenjima sa povišenim rizikom za nastanak kolonizacije; (2) identifikacija faktora rizika za fekalnu VRE kolonizaciju; (3) ispitivanje fenotipskih i genotipskih karakteristika izolovanih VRE sojeva i utvrđivanje klonalne povezanosti i klonalne diseminacije VRE sojeva.

**MATERIJAL I METODE:** Istraživanje je uključilo 268 ispitanika sa šest odeljenja u tri univerzitetske bolnice u Beogradu. Za ispitivanje faktora rizika (FR) korišćena je multivarijantna logistička regresija. Karakterizacija VRE izolata obuhvatila je određivanje profila rezistencije primenom automatizovanog BD Phoenix™ sistema, molekularnu identifikaciju detekcijom vrsno specifičnih gena (*ddl*<sub>*E. faecium*</sub>, *ddl*<sub>*E. faecalis*</sub>), detekciju gena rezistencije na glikopeptidne antimikrobne lekove (*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3*), detekciju gena rezistencije na kvinupristin-dalfopristin (Q-D) (*vatD*, *vatE*, *vgbA*, *ermB1*), detekciju gena za faktore virulencije (*esp*, *hyl*, *efaA*, *asa1*, *gelE*, *cpd*) i MLVA analizu (eng. Multiple-locus Variable-number tandem repeat analysis). Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma rađeno je metodom u mikrotitracionoj ploči.

**REZULTATI:** Učestalost fekalne VRE kolonizacije je iznosila 28,7%. Nezavisni prediktori za nastanak VRE kolonizacije među ispitanicima hospitalizovanim na kliničkim odeljenjima sa povišenim rizikom za nastanak VRE kolonizacije bili su hospitalizacija na kliničkim odeljenjima, hospitalizacija pre uzorkovanja duža od tri dana, primena cefalosporina i primena flourohinolona. U odnosu na odeljenja za hemodijalizu, boravak na odeljenjima za gerijatriju povećao je rizik za VRE kolonizaciju 6,5 puta, boravak u jedinicama intenzivnog lečenja 5 puta, a boravak na hemato-onkološkim odeljenjima 4,7 puta. U odnosu na ispitanike koji su hospitalizovani 48 sati pre uzorkovanja stolice na VRE, ispitanici hospitalizovani 3-7 dana pre uzorkovanja imali su 5,6 puta veći rizik za VRE kolonizaciju, ispitanici hospitalizovani 8-15 dana pre uzorkovanja 5,5 puta veći rizik za VRE kolonizaciju, dok su ispitanici hospitalizovani duže od 16 dana pre uzorkovanja imali 8,4 puta veći rizik za VRE kolonizaciju. Primena cefalosporina povećala je rizik za VRE kolonizaciju 2,2 puta, a primena flourohinolona 1,8 puta. Svi izolovani VRE sojevi su bili multirezistentni *vanA* *Enterococcus faecium* (VR<sub>fm</sub>) sojevi sa sledećim genima za faktore virulencije (procenat sojeva s naznačenim genom je prikazan u zagradi): *ermB-1* (38,9%), *esp* (84%), *efaA* (71,2%), *hyl* (54,5%), *asa1* (23,4%), *gelE* i *cpd* (11,6%) genima. Sposobnost proizvodnje biofilma pokazalo je 20,8% izolata. Analiza genetske srodnosti izolata otkrila je heterogenu populaciju VRE izolata raspoređenih u 13 klastera sa 25 jedinstvenih MLVA profila (MT). VRE<sub>fm</sub> sojevi koji su pripadali najvećim klasterima su bili dispergovani po različitim bolničkim odeljenjima. SRB3 je označen kao osnivač populacije. SRB3 i SRB9 su označeni kao najbliži srodnici MT-1, a SRB16 kao najbliži srodnik MT-159 klona.

**ZAKLJUČAK:** Učestalost fekalne VRE kolonizacije među ispitanicima hospitalizovanim na kliničkim odeljenjima sa povišenim rizikom za nastanak VRE kolonizacije je viša od evropskog proseka. Boravak na kliničkim odeljenjima, produženo bolničko lečenje, primena cefalosporina i flourohinolona predstavljaju FR za nastanak VRE kolonizacije. Prisustvo multirezistentnih VRE $fm$  sojeva koji imaju sposobnost stvaranja biofilma i nose veliki broj gena za faktore virulencije koji mogu doprineti njihovom patogenom potencijalu, kao i pojava rezistencije na Q-D koji nije registrovan za kliničku upotrebu u našoj zemlji, posebno su zabrinjavajući. Moguća je uloga animalnog izvora u nastanku VRE kao posledica upotrebe antimikrobnih lekova na životinjskim farmama. MLVA analizom se može isključiti transmisija među ispitanicima. Postoji bliska filogenetska srodnost VRE $fm$  genotipova iz našeg istraživanja sa genotipovima koji su najčešći prouzrokovaci VRE bolničkih infekcija u svetu.

**Ključne reči:** VRE kolonizacija; faktori rizika; pacijenti pod rizikom; MLVA tipizacija; antimikrobna rezistencija; faktori virulencije; biofilm.

**Naučna oblast:** medicina

**Uža naučna oblast:** epidemiologija

**UDK broj:**

## Colonization of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. strains in hospitals setting - phenotypic and genotypic characterization of isolated strains and risk factors for colonization

**INTRODUCTION:** Intestinal carriage of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. (VRE) often precedes VRE infection and it could be of key importance in infection control. Our study represents the first epidemiological-microbiological study on VRE intestinal carriage in at-risk inpatients in high-risk departments for VRE colonization.

**AIMS:** The aims of this study were: (1) to determine the frequency of VRE intestinal carriage among high-risk inpatients in Serbia in wards with an increased risk for VRE colonization; (2) identification of risk factors for VRE intestinal carriage; (3) examination of phenotypic and genotypic characteristics of isolated VRE strains and determination of clonal relatedness and clonal dissemination of circulating VRE strains.

**MATERIALS AND METHODS:** The study population included 268 inpatients from six hospital departments at 3 university hospitals in Belgrade. To examine risk factors (RF) multivariate analysis was used. Characterization of the isolated VRE stains was performed with BD Phoenix system. Genotypic identification (*ddl*<sub>*E. faecium*</sub>, *ddl*<sub>*E. faecalis*</sub>), glycopeptide (*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *van C2/C3*) and quinupristin–dalfopristin (Q–D) resistance probing (*vatD*, *vatE*, *vgbA*, *ermB1*), virulence gene detection (*esp*, *hyl*, *efaA*, *asa1*, *gelE*, *cpd*) and MLVA (Multiple-locus Variable-number tandem repeat analysis) were performed by molecular genetic methods. Biofilm formation was evaluated with the microtiter plate method.

**RESULTS:** VRE carriage prevalence among at-risk patients was 28.7%. Independent predictors of VRE colonization among at-risk inpatients for VRE colonization were hospitalization in clinical wards, hospitalization longer than three days before sampling, use of cephalosporins and fluoroquinolones. Compared to the hemodialysis departments, stay in the geriatric departments increased the risk of VRE colonization 6.5 times, stay in intensive care units increased the risk 5 times, and a stay in the hemato-oncology departments 4.7 times. Compared to inpatients who were hospitalized 48 hours before stool sampling for VRE, inpatients hospitalized 3–7 days before sampling had 5.6-fold higher risk for VRE colonization, inpatients hospitalized 8–15 days prior to sampling had 5.5-fold higher risk for VRE colonization, while inpatients hospitalized longer than 16 days prior to sampling had 8.4-fold higher risk for VRE colonization. The use of cephalosporins increased the risk of VRE colonization 2.2 times and the use of fluoroquinolones 1.8 times. All VRE strains were *vanA* positive multidrug-resistant *Enterococcus faecium* (VRE<sub>fm</sub>), harboring *ermB-1* (38.9%), *esp* (84%), *efaA* (71.2%), *hyl* (54.5%), *asa1* (23.4%), *gelE* and *cpd* (11.6%) genes. The ability of biofilm production was detected in 20.8%. Genetic relatedness of the isolates revealed 13 clusters and 25 unique MLVA (MT) profiles. VRE<sub>fm</sub> strains belonging to the largest clusters were dispersed among different hospital departments. SRB3 was labeled as group founder. SRB3 and SRB9 were labeled as subgroup founders of MT-1 clone and SRB16 as subgroup founder of MT-159 clone.

**CONCLUSION:** The obtained prevalence of VRE intestinal carriage among high-risk inpatients in Serbia is higher than European average. Prolonged hospitalization in high-risk departments and administration of cephalosporins and fluoroquinolones were the main risk factors for VRE colonization. High percentage of multidrug- resistance VRE<sub>fm</sub>, with the ability of biofilm production and with various virulence genes that might affect the pathogenicity of the strains, as well as the emergence of resistance to Q–D which has never been licensed for clinical use in our country, are of particular concern. The illicit

usage of antibiotics in animal farming could be implicated. MLVA analysis revealed 29 genotypes, of which 25 were new. MLVA could exclude cross transmission among inpatients. Identified VRE<sub>fm</sub> genotypes were phylogenetically closely related to the most common MTs causing VRE nosocomial infections in the world.

**Key words:** VRE intestinal carriage; risk factors; at-risk patients; MLVA typing; antimicrobial resistance; virulence factors; biofilm.

**Scientific area:** Medicine

**Narrow area of expertise:** Epidemiology

**UDK number:**

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Istorijat.....	2
1.2. Opšte osobine roda <i>Enterococcus</i> .....	3
1.3. Ekologija i evolucija.....	3
1.4. Karakteristike enterokoknog genoma.....	5
1.5. Faktori virulencije.....	7
1.6. Glikopeptidni antimikrobni lekovi.....	9
1.6.1. Mehanizam dejstva i podela.....	9
1.6.2. Terapijske indikacije.....	10
1.7. Rezistencija enterokoka na vankomicin.....	10
1.7.1. Biosinteza peptidoglikana ćelijskog zida.....	10
1.7.2. Mehanizam dejstva vankomicina.....	12
1.7.3. Molekularna osnova rezistencije enterokoka na vankomicin.....	13
1.7.4. Karakteristike <i>van</i> operona.....	16
1.7.5. Regulacija ekspresije <i>van</i> operona.....	18
1.7.6. Fenotip glikopeptidne rezistencije.....	21
1.7.7. Poreklo rezistencije enterokoka na vankomicin.....	22
1.8. Rezistencija enterokoka na ostale grupe antimikrobnih lekova.....	23
1.8.1. Rezistencija enterokoka na ampicilin.....	23
1.8.2. Rezistencija enterokoka na aminoglikozide.....	24
1.8.3. Rezistencija enterokoka na kvinupristin/daflopristin.....	25
1.8.4. Rezistencija enterokoka na fluorohinolone.....	26
1.8.5. Rezistencija enterokoka na linezolid.....	26
1.8.6. Rezistencija enterokoka na tigeciklin.....	26
1.9. Pojava vankomicin-rezistentog <i>Enterococcus</i> spp. (VRE) soja.....	26
1.9.1. VRE u Evropi-uloga avoparcina.....	27
1.9.2. VRE u SAD-uloga vankomicina.....	28
1.9.3. Šta je sve prethodilo nastanku VRE?.....	28
1.10. VRE kolonizacija.....	29
1.10.1. Uloga selektivnog pritiska antibiotika.....	29
1.10.2. Uloga okruženja.....	31
1.11. VRE infekcija.....	33
1.12. Prevalencija invazivnih VRE izolata u Evropi.....	35
1.13. Prevalencija invazivnih VRE izolata u Srbiji.....	36
1.14. Prevalencija VRE kolonizacije.....	37
1.15. Uloga mikrobiološke laboratorije u nadzoru nad VRE transmisijom.....	37
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>38</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>40</b>
3.1. Tip studije, mesto i period istraživanja.....	41
3.2. Selekcija ispitanika i veličina uzorka.....	41
3.2.1. Kriterijumi za uključivanje u studiju.....	41

3.2.2.	Kriterijumi za isključivanje iz studije.....	42
3.2.3.	Veličina uzorka.....	42
3.3.	Studijska populacija.....	42
3.4.	Instrumenti merenja.....	42
3.5.	Epidemiološki upitnik.....	42
3.6.	Laboratorijska ispitivanja.....	43
3.6.1.	Mikrobiološka dijagnostika.....	43
3.6.1.1.	Uzimanje i transport uzoraka za bakteriološki pregled.....	43
3.6.1.2.	Izolacija VRE sojeva.....	43
3.6.1.3.	Identifikacija izolovanih VRE sojeva i ispitivanje antimikrobne osetljivosti.....	44
3.6.1.4.	Dugotrajno čuvanje izolovanih VRE sojeva (zamrzavanje).....	45
3.6.2.	Metode molekularne biologije.....	46
3.6.2.1.	Molekularna identifikacija VRE izolata detekcijom vrsno specifičnih gena i gena nosioca rezistencije na glikopeptidne antimikrobne lekove.....	46
3.6.2.1.1.	DNK ekstrakcija.....	46
3.6.2.1.2.	Amplifikacija DNK primenom multipleks PCR reakcije.....	47
3.6.2.1.3.	Elektroforeza i vizuelizacija PCR produkata.....	47
3.6.2.2.	Detekcija gena nosioca rezistencije na kvinupristin-dalfopristin .....	48
3.6.2.3.	Detekcija gena koji kodiraju faktore virulencije.....	49
3.6.2.4.	Ispitivanje klonalne povezanosti i klonalne diseminacije izolovanih VRE sojeva - MLVA analiza.....	49
3.6.3.	Kvantitativno ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma.....	55
3.7.	Statistička analiza.....	56
<b>4.</b>	<b>REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>58</b>
4.1.	Karakteristike studijske populacije.....	59
4.2.	Distribucija ispitanika prema kliničkim odeljenjima.....	60
4.3.	Distribucija ispitanika prema prisustvu komorbiditeta.....	60
4.4.	Distribucija ispitanika prema podacioma o bolničkom lečenju.....	61
4.5.	Distribucija ispitanika prema podacima o antimikrobnoj terapiji.....	62
4.6.	Distribucija ispitanika prema primenjenim dijagnostičko-terapijskim procedurama.....	62
4.7.	Distribucija ispitanika prema ostalim relevantnim podacima.....	63
4.8.	Učestalost fekalne kolonizacije VRE sojevima u studijskoj populaciji.....	63
4.9.	VRE kolonizacija u odnosu na demografske podatke.....	63
4.10.	VRE kolonizacija prema kliničkim odeljenjima.....	64
4.11.	VRE kolonizacija u odnosu na prisustvo komorbiditeta.....	64
4.12.	VRE kolonizacija u odnosu na podatke o hospitalizaciji.....	65
4.13.	VRE kolonizacija u odnosu na podatke o antimikrobnoj terapiji.....	66
4.14.	VRE kolonizacija u odnosu na primenjene dijagnostičko-terapijske procedure.....	67
4.15.	VRE kolonizacija u odnosu na ostale relevantne podatke.....	67
4.16.	Faktori rizika za VRE kolonizaciju, univarijantna logistička regresija.....	68
4.17.	Faktori rizika za VRE kolonizaciju, multivarijantna logistička regresija.....	71



---

4.18.	Antimikrobna rezistencija i fenotipski profil izolata.....	73
4.19.	Genotipski profil izolata.....	74
4.20.	Ispitivanje klonalne povezanosti i klonalne diseminacije izolovanih VRE sojeva - MLVA analiza.....	77
4.21.	Kvantitativno ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma.....	90
4.22.	Produkcija biofilma u odnosu na prisustvo gena koji kodiraju faktore virulencije.....	90
4.23.	Produkcija biofilma u odnosu na broj gena koji kodiraju faktore virulencije.....	91
4.24.	Prisustvo faktora virulencije u odnosu na pripadnost MLVA klasteru.....	91
<b>5.</b>	<b>DISKUSIJA.....</b>	<b>100</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>133</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>136</b>

# 1. *UVOD*

---

Pripadnici roda *Enterococcus* su Gram-pozitivne koke koje čine deo mikrobiote digestivnog trakta ljudi i životinja. Kod ljudi, osim digestivnog trakta, kolonizuju i genitourinarni trakt, usnu duplju i perineum (1). Enterokoke su oportunistički patogeni, uzočnici su infekcije urinarnog trakta i endodoncije, međutim, mogu biti odgovorne i za nastanak veoma ozbiljnih i po život opasnih infekcija, kao što su endokarditis, bakterijemija, peritonitis i intraabdominalni absces (1), što je od posebnog značaja kod imunokompromitovanih pacijenata (2). Poslednjih 30 godina, ove bakterije su postale značajne i kao višestruko otporni (3) (eng. Multi Drug Resistant, MDR) bolnički patogeni i uzročnici bolničkih infekcija, i predstavljaju veliki terapijski izazov (4).

Pojava vankomicin-rezistentnog enterokoka (VRE) krajem osamdesetih godina u Engleskoj (5), Francuskoj (6) i Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) (7), kao i njegov rastući značaj kao bolničkog patogena kod populacije u riziku, otvorila je niz pitanja vezanih za sprečavanje i suzbijanje VRE kolonizacije/infekcije, kako zbog ogromne sposobnosti adaptacije na uslove bolničke sredine i endemskog potencijala, tako i zbog urođene i stečene rezistencije na veliki broj antimikrobnih lekova i sposobnosti razmene genetskog materijala sa drugim Gram-pozitivnim bakterijama, među kojima najveći značaj svakako ima prenos *van* gena na meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) soj i nastanak vankomicin-rezistentnog *Staphylococcus aureus* (VRSA) soja.

VRE pripada grupi tzv. ESKAPE patogena (8) (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* species) za koje je Udruženje za epidemiologiju zdravstvene zaštite (eng. Society of Healthcare Epidemiology of America, SHEA) formiralo akronim kako bi se naglasio veliki značaj koji imaju kao prouzrokovajući bolničkih infekcija zbog sposobnosti da „pobegnu“ (eng. escape) od antimikrobnog dejstva leka (8). Takođe, VRE se nalazi na listi visoko prioriternih patogena za razvoj novih efikasnih antimikrobnih lekova koju je formirala Svetska zdravstvena organizacije (SZO) (9,10).

## 1.1. Istorijat

Ime „entérocoque“ (grč. *énteron* - crevo; koji se tiče creva; *coccus* - bobice, granule; bakterije okruglastog oblika) uveo je u upotrebu Thiercelin 1899. godine u svom naučnom radu pod nazivom „*Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogen*“, u kome su saprofitne Gram-pozitivne diplokoke intestinalnog porekla prvi put opisane kao uzročnici infekcije. Iste godine, MacCallum i Hastings su opisali smrtni slučaj uzrokovan endokarditisom, a iz krvi i srčanog mišića preminulog pacijenta izolovali su mikroorganizam nazvan tada *Micrococcus zymogenes*, a za koji će se kasnijim ispitivanjima utvrditi da je *Enterococcus faecalis* i time pokazali patogeni potencijal enterokoka. Andrewes i Horder su 1906. godine mikroorganizmu izolovanom kod pacijenta sa endokarditisom dali ime *Streptococcus faecalis* (lat. *faex*, *faecis* - talog, ostaci, smeće; izmet, „stolica“) i na taj način naglasili da je ova vrsta streptokoka karakteristična za gastrointestinalni trakt čoveka (4,11,12).

Enterokoke su prema serološkom sistemu za tipizaciju koji je uvela Rebecca Lancefield 30-tih godina prošlog veka, klasifikovane kao streptokoke grupe D, budući da poseduju grupni D antigen ćelijskog zida, glicerol teihoinisku kiselinu (13). Sherman je u istom periodu predložio klasifikaciju streptokoka koja bi obuhvatala četiri vrste: piogene, hemolitičke i laktičke streptokoke i „enterokok“, odnosno enterične streptokoke. Po ovoj klasifikaciji, termin „enterokok“ bi trebalo da se upotrebljava za

streptokoke koje ispoljavaju sledeće osobine: rast na temperaturi od 10°C do 45°C; rast u prisustvu 6,5% rastvora natrijum hlorida i pri vrednosti pH od 9,6; kao i one koje preživljavaju 30 minuta na temperaturi od 60°C i koje imaju osobinu da hidrolizuju eskulin u prisustvu žuči (4,11,12).

Enterokoke su tek 1984. godine, nakon molekularnih istraživanja kojim je pokazana filogenetska udaljenost eneteričnih streptokoka od ostalih vrsta streptokoka, klasifikovane kao poseban rod – genus *Enterococcus* (14).

## 1.2. Opšte osobine roda *Enterococcus*

Enterokoke se mikroskopski uočavaju kao Gram-pozitivne koke, raspoređene pojedinačno, u parovima ili kratkim lancima, a ćelija enterokoka ima uglavnom oblik izduženih ovalnih koka (1,15,16). Na krvnog agaru (KA) posle inkubacije na temperaturi od 35°C - 37°C u trajanju od 18-24 časova formiraju sitne kolonije (veće od kolonija streptokoka), promera 1-2mm, sivkaste boje, ahemolitične ili okružene zonom alfa hemolize, retko zonom beta hemolize (1,15,16).

Rastu dobro na širokom temperaturnom opsegu, od 10°C do 45°C (optimalna temperature za rast je 35°C), pri širokom rasponu pH vrednosti (od 4,6 do 9,6), u prisustvu 40% žuči (reakcija hidrolize eskulina u prisustvu 40% žuči) i u 6,5% rastvoru natrijum hlorida. Takođe, otporni su na dezinfekciona sredstva, kao što su hlor, glutaldehid i alkohol. Mogu da prežive 30 minuta na temperaturi od 60°C. Oksidaza su negativni. Fakultativni su anaerobi sa fermentativnim metabolizmom koji rezultira produkcijom mlečne kiseline kao glavnog produkta fermentacije glukoze, bez produkcije gasa. Većinom su katalaza negativni, mada neki sojevi mogu proizvoditi pseudokatalazu (pojava slabog penušanja). PYR (L-pirolidonil-β-naftilamid) su pozitivni. Većinom imaju grupno specifični D antigen. Mogu posedovati pigment, kao npr. žuti pigment koji je prisutan kod *Enterococcus sulfureus*, *Enterococcus casseliflavus* i *Enterococcus muntii*. Pojedine vrste su nepokretne (*Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum*). Vrste unutar roda se dalje dokazuju različitim fenotipskim reakcijama (fermentacija, pokretljivost, pigment) (1,15,16).

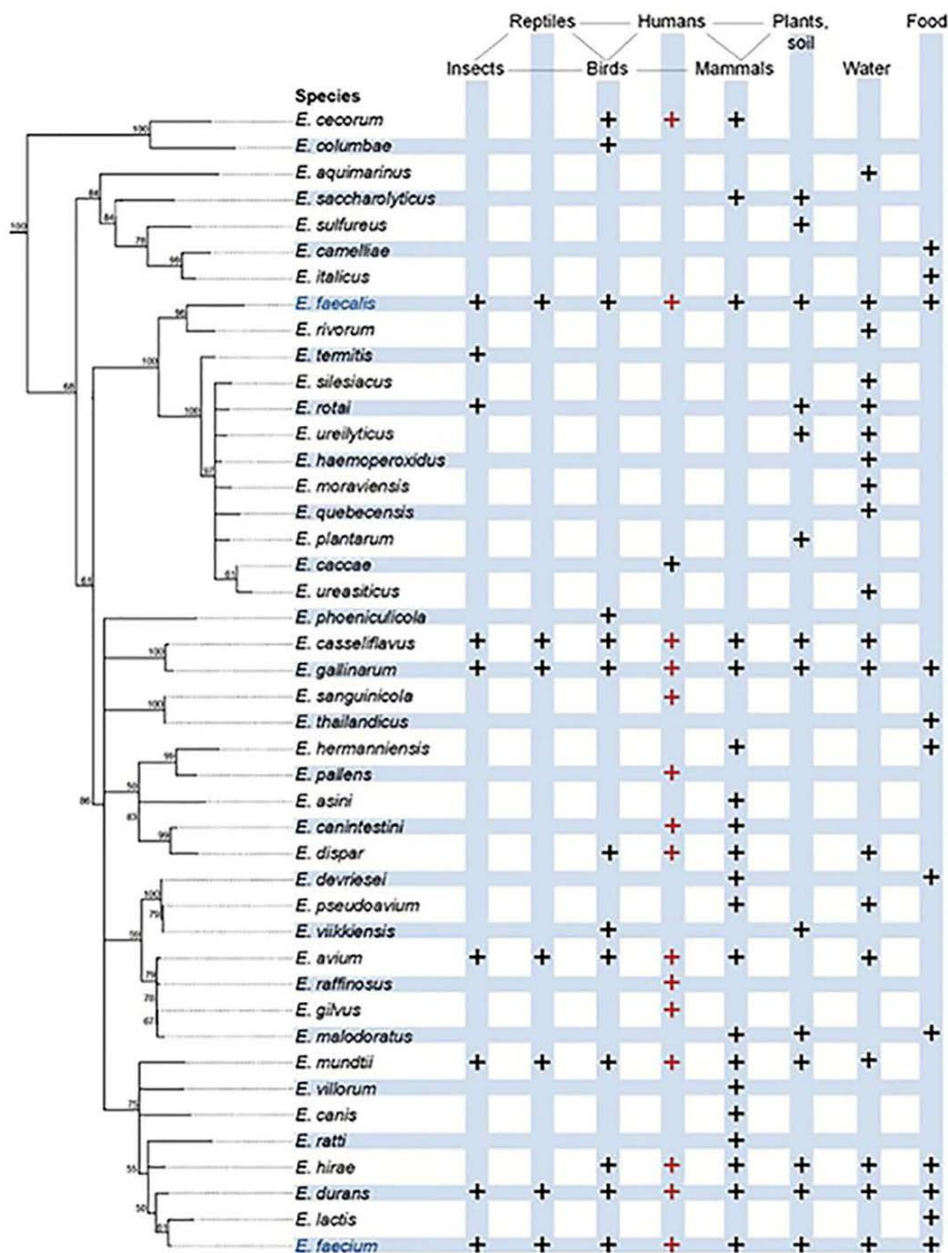
Do sad je identifikovano 68 vrsta i dve podvrste ovog roda (17), a najznačajniji predstavnici su *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*, koji su ujedno i najčešći prouzrokovani enterokoknih infekcija kod ljudi. Takođe, ove dve vrste pokazuju i najveću otpornost na isušivanje i preživljavanje u uslovima sa malo nutritijenata, kao i na uobičajena bolnička dezinfekciona sredstva. Dobra adaptacija na teške uslove spoljašnje sredine se može objasniti postojanjem vijabilnog ali ne i kulturabilnog stanja, ali ovo još nije dokazano (12). Ostali značajni pripadnici su *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hiraе*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus raffinosus* i *Enterococcus mundtii* (18,19) i retki prouzrokovani infekcija kod ljudi. *E. gallinarum* i *E. casseliflavus* su urođeno rezistentni na vankomicin i mogu predstavljati problem prilikom identifikacije.

## 1.3. Ekologija i evolucija

Enterokoke su široko rasprostranjene u prirodi i mogu se naći gotovo svuda, u zemlji, vodi, biljkama i u digestivnom traktu različitih životinjskih vrsta (insekti, gmizavci, ptice i sisari) (Slika 1) (20).

Kod ljudi, deo su mikrobiote digestivnog i genitourinarnog trakta, usne duplje i perineuma i smatra se da jedni su od najranijih kolonizatora creva novorođenčadi (12). Najbrojnije su Gram-pozitivne koke koje nastanjuju humani digestivni trakt i primarno su lokalizovani u tankom i debelom crevu, i to

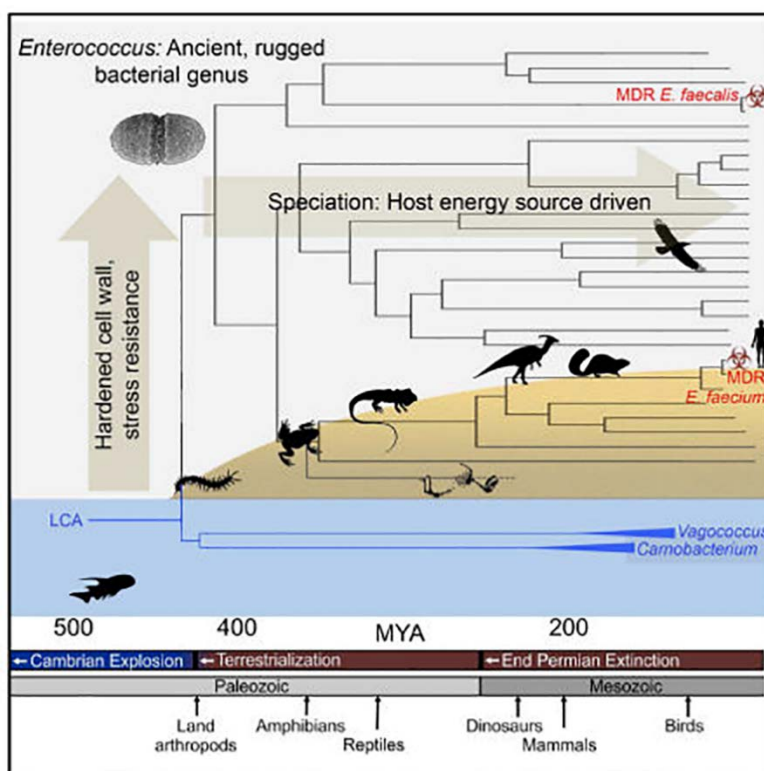
u jejunumu, ileumu, cekumu i rektosigmoidalnoj regiji, s time što je broj najveći u završnom delu kolona. Kolon sadrži od  $10^9$  do  $10^{12}$  bakterija po gramu sadržaja, od toga manje od 1% čine enterokoke (4,21). Najčešće izolovane bakterijske vrste su upravo *E. faecalis* i *E. faecium*. Ostale vrste, kao na primer *E. durans* i *E. avium*, se mogu povremeno otkriti u fecesu i zastupljene su u različitim odnosima (4). Istraživanje Lebreton i saradnika je kvantifikovalo vrste enterokoka u uzorcima humanog fecesa: *E. faecium* (100%), *E. faecalis* (78%), *E. durans* (33%), *E. gallinarum* (33%), *E. avium* (11%) i *E. hirae* (11%) (4). Prevalencija različitih enterokoknih vrsta zavisi od različitih faktora, od kojih se najčešće pominju: starost, ishrana, prethodne bolesti i upotreba antibiotika.



Slika 1. Distribucija roda *Enterococcus* u prirodi. Dendrogram prikazuje filogenetsku povezanost među vrstama. Preuzeto iz Lebreton i sar., 2014.

Molekularna istraživanja evolucije enterokoka, pokazala su da su enterokoke deo mikrobiote digestivnog trakta još od vremena paleozoika, od pre oko 425 do 500 miliona godina, kada su prve životinja prešle iz mora na kopno (Slika 2) (20,22).

Glavni uzrok pojave novih vrsta enterokoka vezuje se za ekološku divergenciju na kopnu i promenu u dostupnosti ugljenih hidrata u crevima domaćina. Opstanak u veoma različitim ekološkim sistemima, zahtevao je izmenu u ćelijskom zidu enterokoka i sticanje otpornosti na različite promene u okruženju. Razvoj ovih osobina predisponirao je nastanak današnjih MDR enterokoknih bolničkih sojeva i naseljavanje nove ekološke niše-digestivni trakt bolničkih pacijenata koji su na terapiji antibioticima (20,22). Pojava MDR genskih linija se među enterokokama javila dva puta, prvo kod *E. faecalis*, a zatim i kod *E. faecium* sojeva (20). Iako procentualno čine mali deo mikrobiote digestivnog trakta, enterokoke su postale vodeći uzročnici MDR bolničkih infekcija i predstavljaju mesta diseminacije gena rezistencije na druge bakterijske vrste (20).



Slika 2. Poreklo enterokoka od paleozoika do bolnice. Preuzeto iz Lebreton, 2017.

#### 1.4. Karakteristike enterokoknog genoma

Metodom sekvenciranja genoma pokazano je da genom *E. faecalis* i *E. faecium* sojeva pored hromozoma sadrži veliki broj različitih tipova plazmida, kao što su feromon indukovani plazmidi i Inc18 grupa plazmida. Takođe, sadrže i različite vrste mobilnih genskih elemenata – transpozone, insercione sekvence, integrativne konjugovane elemente i ostrva patogenosti (23–25). Poređenjem veličine genoma izolata *E. faecalis* OG1RF koji predstavlja prototip komensala i izolata *E. faecalis* V583 koji je prototip



dobro adaptiranog vankomicin-rezistentnog bolničkog soja i uzročnik bolničkih infekcija, pokazano je genom V583 izolata veći za više od 25% od OG1RF izolata, kao i da je povećanje genoma nastalo na račun inluksa mobilnih genskih elemenata - tri plazmida, ostrva patogenosti i profaga (22).

Plazmidi i mobilni genski elementi su nosioci gena antimikrobne rezistencije i faktora virulencije, što čini enterokoke „dobro opremljenim“ za sticanje i diseminaciju istih putem horizontalnog genskog transfera (23,24). Dominantan mehanizam horizontalne razmene genskog materijala je konjugacija, kojom su nastale dobro adaptirane MDR bolničke genske linije kao što su CC2 klonalni kompleks kod *E. faecalis* i CC17 kod *E. faecium* sojeva (24). Istraživanje Rosvoll i saradnika (26) je pokazalo da je 83% ispitivanih *E. faecium* izolata posedovalo od jedan do četiri različita tipa plazmida, kao i da je po izolatu bilo prisutno od jedan do sedam plazmida, prosečno 2,3 plazmida. Veličina plazmida je varirala od 10 kb do preko 250 kb. Istraživanje je takođe pokazalo da je kod VRE izolata bilo značajno više plazmida u odnosu na vankomicin-osetljive izolate (eng. Vancomycin-sensitive enterococcus, VSE) (2,8 prema 1,6) i da je prisustvo većeg broja plazmida značajno povezan sa klinički značajnim genskim linijama za koje se zna da prouzrokuju bolničke epidemije.

Tipovi plazmida koji se nalaze kod *E. faecalis* i *E. faecium* su veoma različiti. Tako se feromon indukovani konjugativni plazmidi uglavnom nalaze kod *E. faecalis* sojeva i nose gene za produkciju citolizina, bakteriocina, otpornost na UV zrake i rezistenciju na tetraciklin i na vankomicin (*vanB* operon) (23,24). Nekoliko feromon indukovanih plazmida je otkriveno i kod *E. faecium* sojeva i uključeni su u diseminaciju gena rezistencije na vankomicin (24). Druga značajna grupa plazmida, Inc18 plazmidi su najviše zastupljeni među *E. faecium* sojevima i nose gene rezistencije na vankomicin (*vanA* operon), hloramfenikol i makrolide, linkozamide i streptogramin B (MLS<sub>B</sub> tip rezistencije) (24).

Glavni medijatori rezistencije na vankomicin (i kod *E. faecalis* i kod *E. faecium* vrste) su feromon-indukovani plazmidi (pHT $\beta$  i pMG1) koji nose transposon Tn1546 na kome se nalazi *vanA* operon. Tn1546 transpozon je takođe pronađen među Inc18 grupom plazmida (pAM830) za koji je utvrđeno da je učestvuje u transferu *van* gena sa VRE na MRSA i nastanak VRSA soja (24). Najčešće lokacije na kojima dolazi do ko-kolonizacija ovim sojevima su površinske rane i digestivni trakt. Nije do kraja razjašnjeno šta podstiče transfer *van* gena između VRE i MRSA sojeva, ali se smatra da dijabetes melitus i prethodna upotreba antimikrobnih lekova imaju ulogu (24).

Podvrsta *vanB* operona, *vanB*<sub>2</sub> operon, nalazi se na konjugativnom transpozonu Tn1549. U uzorcima stolice bolničkih i vanbolničkih pacijenata, u odsustvu VRE izolata, nađen je *vanB*<sub>2</sub> gen što pokazuje njegovu rasprostranjenost među drugim vrstama bakterija koje su deo normalne mikrobiote digestivnog trakta (npr. *Clostridium* spp., *Ruminococcus* spp., *Eggerthella* spp., *Streptococcus* spp.). Visoka prevalencija *vanB*<sub>2</sub> gena neenterokoknog porekla u fecesu ima dijagnostičke implikacije, jer smanjuje pozitivnu prediktivnu vrednost PCR testa koji detektuje *vanB*<sub>2</sub> gene rezistencije na vankomicin direktno iz fecesa (24,25).

Enterokoke imaju sposobnost prenosa velikih hromozomskih fragmenata (do 800kb) iz donorske u recipijentnu ćeliju što može rezultirati izmenom genotipa, a transfer zavisi od prisustva feromon indukovanih plazmida (23). Kod enterokoka su opisani i megaplazmidi (veći od 200kb) koji nose gene rezistencije na veliki broj antimikrobnih lekova, kao npr. pRE25 plazmid, koji nosi gene rezistencije za 12 antibiotika (23).

Jedna od karakteristika genoma enterokoka je perzistencija tzv. R plazmida u odsustvu selektivnog pritiska vankomicina. Naime, R plazmidi su plazmidi koji imaju toksin-antitoksin sistem koji obezbeđuju da se ćerke ćelije koje u toku replikacije ne dobiju plazmid budu uništene. Ovaj mehanizam je potvrđen u *in vitro* eksperimentima, ali i istraživanjima VRE prevalencije među životinjama u odsustvu selektivnog pritiska antibiotika. R plazmidi su otkriveni kod *E. faecium* sojeva koji imaju *vanA* Inc18 plazmide što može da objasni stabilnost dobro adaptiranih sojeva u odsustvu vankomicina (25).

Primećeno je da broj mobilnih genskih elemenata zavisi od sposobnosti adaptacije na različite vrste domaćina, u smislu da vrste koje su dobro adaptirane imaju manje mobilnih genskih elemenata i stabilniji genom, dok je za one vrste koje mogu imati veliki spektar domaćina karakterističan veći broj mobilnih genskih elemenata. Ovaj fenomen se označava kao genska plastičnosti (25) i omogućena je prvenstveno feromon indukovanim konjugativnim plazmidima (24). Može se pretpostaviti da je ovaj mehanizam za brzu razmenu genskog materijala nastao kako bi se u toku lanca ishrane brzo isključile specijalizovane karakteristike jedne sredine, odnosno jednog domaćina i brzo se prilagodio specifičnostima novog domaćina, odnosno da bi npr. *E. faecalis* koji potiče iz „plena“ nastavio saživot sa *E. faecalis* iz „predatora“ (24).

Mobilni genski elementi doprinose genskoj plastičnosti rekombinacijom i rearanžiranjem hromozomske i plazmidske DNK i izmenom genske ekspresije. Tako je na primer, ugradnjom insercione sekvence iz familije IS256 nastala konstitutivna ekspresija *vanA* gena i sposobnost veće produkcije biofilma kod *E. faecalis*. Takođe, konstitutivna ekspresija rezistencije na vankomicin kod *vanD* operona se objašnjava ugradnjom insercione sekvence (25).

Pored svega navedenog, veoma važna karakteristike enterokoknog genoma su nedostatak CRISPR-Cas sistema (grupisani kratki palindromski ponovci na jednakim rastojanjima, eng. clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) i prisustvo PTS sistema (fosfotransferaza sistem, eng. phosphotransferase system, PTS). Naime, CRISPR-Cas sistem predstavlja sistem odbrane od strane DNK i na primeru *E. faecalis* je pokazano da postoji inverzan odnos između CRISPR-Cas sistema i gena rezistencije na antimikrobne lekove, kao i da ovaj sistem češće nedostaje kod bolničkih sojeva i doprinosi akumulaciji mobilnih genskih elemenata (22–25).

PTS sistem omogućava *E. faecium* sojevima upotrebu amino šećera, koji se nalaze na površini epitelnih ćelija digestivnog trakta i u mucinu i povećava sposobnost kolonizacije digestivnog trakta kod kojeg je zbog prethodne primene antimikrobnih agenasa nastao disbalans crevne mikrobiote. Prisustvo ovog sistema upućuje da VRE sojevi koji su adaptirani na bolničke uslove korišćenjem hranljivih materija koje dobijaju od domaćina kada im nisu na raspolaganju druge hranljive materije prihvataju parazitski način života (27).

## 1.5. Faktori virulencije

Jedna od glavnih faktora virulencije kod enterokoka je rezistencija na veliki broj antimikrobnih agenasa.

Prema podacima Evropskog komiteta za testiranje antimikrobne osetljivosti (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) (28) enterokoke su urođeno rezistentne na cefalosporine, niske doze aminoglikozida, makrolide, fusidinsku kiselinu i sulfonamide. *E. faecalis* je



urođeno rezistentan na linkozamide (klindamicin) i na streptogramine (kvinupristin-dalfopristin, Q-D), dok su vrste *E. gallinarum* i *E. casseliflavus* urođeno rezistentne na vankomicin.

Stečena rezistencija obuhvata rezistenciju na glikopeptide (vankomicin, teikoplanin), visoke koncentracije aminoglikozida, florohinolone i Q-D. Iako u literaturi postoje podaci o rezistenciji na linezolid, tigeciklin i daptomicin, ovi sojevi su veoma retki (12,23,29,30). Najznačajnija stečena rezistencija kako sa stanovišta prevencije i brige o javnom zdravlju stanovništva tako i sa stanovišta kontrole i sprečavanja i suzbijanja bolničkih infekcija svakako je rezistencija *E. faecalis* i *E. faecium* na vankomicin (31).

U početku se sposobnost enterokoka da uzrokuje infekciju/kolonizaciju u bolničkoj sredini vezivala isključivo za prisustvo gena rezistencije, međutim, ubrzo se shvatilo da poseduju i druge faktore virulencije, kao što su faktori adherencije (agregaciona supstanca, površinski enterokokni protein, adhezin ćelijskog zida), faktori invazivnosti (citolizin, želatinaza, hijaluronidaza, serin proteaza, superoksid), antifagocitni faktori (kapsularni polisaharid), sposobnost produkcije seks feromona i sposobnost produkcije biofilma (23).

Postoje razlike između *E. faecalis* i *E. faecium* vrsta u odnosu na faktore virulencije. Tako je za *E. faecalis* karakteristično prisustvo: EbpABC pila koji imaju ulogu u formiranju biofilma, nastanku urinarnih infekcija i endokarditisa; agregacione supstance (AS) koja ima ulogu vezivanja za ekstracelularni matriks i nastanak endokarditisa; enterokoknog površinskog proteina specifičnog za *E. faecalis* ( $Esp_{fs}$ ) koji ima ulogu u nastanku urinarnih infekcija i sposobnost stvaranja biofilma; Ace adhezina za kolagen koji je deo MSCRAMM kompleksa (eng. microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules) koji ima ulogu u nastanku endokarditisa. Prisustvo faktora invazivnosti i polisaharidne kapsule je češće kod *E. faecalis* sojeva.

Za *E. faecium* sojeve je karakteristično prisustvo više faktora virulencije: 1. Enterokoknog površinskog proteina (eng. Enterococcal surface protein, Esp) specifičnog za *E. faecium* ( $Esp_{fm}$ ) koji je produkt *esp* gena i ima ulogu u fazi inicijalne adherencije u toku formiranja biofilma, doprinosi povećanju virulencije i povezan je sa procesom kolonizacije (23,32,33); 2. Hijaluronidaze (23,32,33), koja je produkt *hyl* gena koja omogućava lakši transport kroz tkiva; 3. Želatinaze koja je produkt *gelE* gena i vrši hidrolizu kolagena, želatina i malih peptida (23,32,33); 4. EfaA adhezina koji je produkt *efaA* gena (34); 5. Seks feromona - agregacione supstance koju kodira *asa1* gen i proteina koji kodira *cpd* gen (23,33–35). Kao značajni faktori virulencije pominju se još i Acm adhezin za kolagen koji je deo MSCRAMM kompleksa, koji ima ulogu u nastanku endokarditisa i prisustvo Pila i PilB pila čija funkcija nije razjašnjena (36).

Sposobnost vrste *E. faecium* da prouzrokuje infekciju zavisi od prisustva gena rezistencije na antimikrobne lekove, zbog čega je *E. faecium* češći uzročnik bolničkih infekcija u odnosu na vrstu *E. faecalis*, koji ima veću urođenu sposobnost da izazove infekciju i u odsustvu gena rezistencije. Iako je *E. faecium* vrsta koja je najčešće nosilac rezistencije na vankomicin, vrsta koja je prenela gene rezistencije na vankomicin na MRSA soj bila *E. faecalis*, i to zahvaljujući produkciji seks feromona - signalnim peptidima koji indukuju konjugaciju feromon indukovanih plazmida i koji imaju ulogu u diseminaciji gena rezistencije kod *E. faecalis* sojeva (22).

U poslednje vreme se kao važan faktor virulencije enterokoka ističe i sposobnosti produkcije biofilma, čime se dodatno povećava važnost enterokoka kao prouzrokovača infekcije endokarda,

endodoncije, urinarnih infekcija i infekcija povezanih sa prisustvom veštačkog materijala. Najvažnija uloga u formiranju biofilma pripada gore pomenutim adhezivima.

## 1.6. Glikopeptidni antimikrobni lekovi

### 1.6.1. Mehanizam dejstva i podela

SZO je glikopeptidne lekove stavila na listu antimikrobnih lekova koji se koriste za lečenje teških i po život opasnih infekcija prouzrokovanih MDR Gram-pozitivnim bakterijama, prvenstveno MDR MRSA i *Enterococcus* spp. sojevima (37).

Ova grupa lekova ostvaruju svoje dejstvo putem inhibicije sinteze ćelijskog zida bakterija vezujući se za D-alanin-D-alanin (D-Ala-D-Ala) terminalni deo disaharid-pentapeptidnog prekursora peptidoglikana i ispoljava sporo baktericidno delovanje u fazi deobe mikroorganizama (1,38).

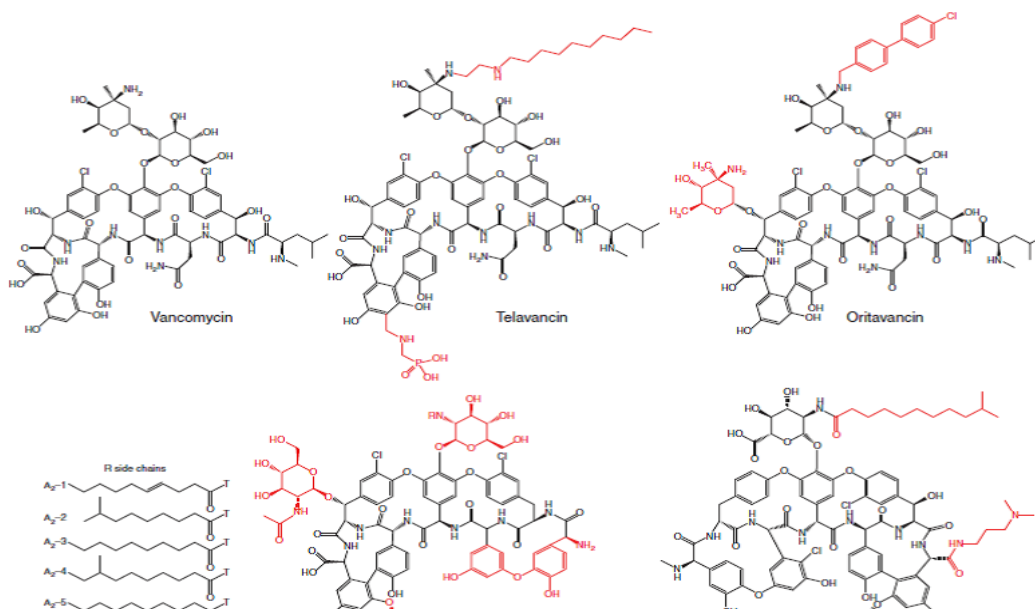
Razlikujemo dve generacije glikozilovanih peptida (Slika 3):

1. Prva generacija obuhvata prirodne glikopeptide koje vode poreklo od aktinomiceta iz zemljišta i u tu grupu spadaju klinički najznačajniji:

- vankomicin (Vancomycin Alvogen, Vancomycin Riemser, Vancomycin-MIP, Edicin, Vanco Sala, Voxin<sup>®</sup>, Vancocin, Vancomycin Enterocaps) i
- teikoplanin (Targocyd, Planicid) (39–41).

2. Druga generacija obuhvata polusintetske glikopeptide:

- telavancin (Vibativ<sup>®</sup>),
- oritavancin (Orbactiv<sup>®</sup>)
- dalbavancin (Dalvance<sup>®</sup>, Xydalba<sup>®</sup>)



Slika 3. Struktura glikopeptida i lipoglikopeptida. Ključna mesta modifikacije su obeležena crvenom bojom. Preuzeto iz Zeng i sar., 2016.

Dobijeni su modifikacijom vankomicina (telavancin i oritavancin) i/ili teikoplanina (dalbavancin). Telavancin je registrovan 2009. godine, a oritavancin i dalbavancin 2014. godine u SAD, Kanadi i na teritoriji Evropske Unije (EU). Oritavancin, za razliku od telavancina i dalbavancina, ostvaruje dejstvo prema VanA tipu VRE. Pomenuti lekovi prema podacima Agencije za lekove i medicinska i sredstva Srbije nisu registrovana u našoj zemlji (38–40).

### 1.6.2. Terapijske indikacije

Vankomicin (eng. vanquish- savladati, pobediti) je glikopeptidni antimikrobni lek koji je sredinom pedesetih godina prošlog veka izolovan iz aktinomicete *Amiclatopsis orientalis* (ranije *Nocardia orientalis*). Prvi je put je upotrebljen 1955. godine, a 1958. godine odobren je za kliničku upotrebu. Struktura vankomicina je okarakterisana tek 27 godina kasnije, 1982. godine (39,40).

Vankomicin se primenjuje parenteralno, kao spora intravenska infuzija u terapiji teških sistemskih infekcija (38,41), kao što su:

1. Sepsa, endokarditis, infekcije kože, mekih tkiva, kostiju i donjih respiratornih puteva prouzrokovanih MRSA sojevima, koagulaza-negativnim stafilokokom, meticilin-osetljivim *S. aureus*; kod pacijenata alergičnih na penicilin ili kod pacijenata koji ne reaguju na terapiju penicilinima i/ili cefalosporinima;

2. Streptokokni (*Streptococcus viridans* ili *Streptococcus bovis*) i enterokokni endokarditis u kombinaciji sa aminoglikozidima;

3. Rani endokarditis veštačkih valvula, uzrokovan *Staphylococcus epidermidis* i/ili difteroidima, u kombinaciji sa rifampicinom i/ili aminoglikozidom.

Nakon intravenske primene, vankomicin se dobro distribuira u skoro sva tkiva i telesne tečnosti (pleura, perikard, ascit, sinovijalnu tečnost). Prodor u inflamirani likvor je slab i neravnomeran i zbog toga doze koje se primenjuju za terapiju meningitisa moraju biti više od uobičajnih. Intravenska primena vankomicina nije efektivna za lečenje pseudomembranoznog enterokolitisa uzrokovanih bakterijom *Clostridioides difficile*, kao i za stafilokokni enterokolitis te se za ove indikacije vankomicin primenjuje oralnim putem (38,41).

Teikoplanin je lipoglikoproteinski kompleks, prvi put izolovan iz *Actinoplanes teichomyceticus* 1978. godine, a odobren za kliničku upotrebu u Evropi 1998. godine (39,40). Spektar antimikrobnog delovanja je sličan vankomicinu, ali je aktivniji prema streptokoku i enterokoku u odnosu na vankomicin, a zbog prisustva lipofilnog repa lakše penetrira u tkiva.

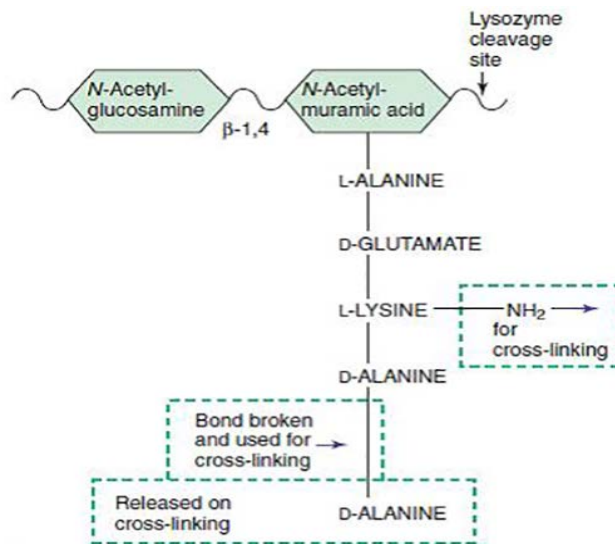
## 1.7. Rezistencija enterokoka na vankomicin

### 1.7.1. Biosinteza peptidoglikana ćelijskog zida

Da bi se razumela molekularna osnova rezistencije enterokoka na vankomicin i mehanizam dejstva glikopeptidnih antimikrobnih lekova, kao prvo se moraju razmotriti enzimski koraci koji su uključeni u sintezu peptidoglikana ćelijskog zida.

Peptidoglikan (mukopeptid, murein) je izgrađen od velikog broja paralelno postavljenih linearnih polimera izgrađenih od ponovljenih jedinica disaharida: N-acetilglikozoamin (NAG) i N-acetilmuraminske kiseline (N-acetil-muramil, NAM) (Slika 4). Disaharidi su međusobno spojeni  $\beta$ -1,4

glikozidnom vezom koju katalizuje enzim transglikozidaza. Za svaki molekul N-acetilmuraminske kiseline vezan je tetrapeptid, koji prominira normalno u odnosu na osnovni lanac. Tetrapeptidi naspramnih lanaca su međusobno povezani peptidnom vezom koju katalizuje enzim transpeptidaza. Peptidna veza se formira između aminokiseline koja se nalazi na trećoj poziciji jednog lanca (npr. lizin, diaminopimelinska kiselina, diaminobuterna kiselina) i aminokiseline D-Alanin (D-Ala) koja se nalazi na četvrtoj poziciji naspramnog lanca. Prekursor tetrapeptida je pentapeptid, koji ima D-Ala-D-Ala terminalni kraj. D-Ala koji se nalazi na petoj poziciji se uklanja u toku izgradnje peptidne veze. Rezultat ovog procesa je umrežavanje lanaca peptidoglikana i formiranje čvrste, trodimenzionalne strukture (1,42,43).



Slika 4. Shematski prikaz građe peptidoglikana ćelijskog zida. Preuzeto iz Murrey i sar., 2013.

Sinteza peptidoglikana se odvija u 4 faze (Slika 5) (1,42,43):

1. Proces biosinteze peptidoglikana počinje u citoplazmi bakterijske ćelije sintezom prekursora: uracil-di-fosfat-N-acetil-muramil-pentapeptid (UDP-NAM-pentapeptid) i uracil-di-fosfat-N-acetilglukozamin (UDP-NAG). Sinteza i aktivacija ovih prekursora se dešava u sukcesivnim enzimskim reakcijama koju katalizuje veliki broj enzima. Sa aspekta ovog rada neophodno je pomenuti sledeće enzime: enzim racemazu koji vrši konverziju aminokiseline L-alanin (L-Ala) u njen izomer D-Ala; enzim ligazu koji spaja dva molekula D-Ala u D-Ala-D-Ala dipeptid; enzim sintetazu koji vezuje nastali dipeptid za UDP-NAM-tripeptid i na taj način se formira se UDP-NAM-pentapeptid.

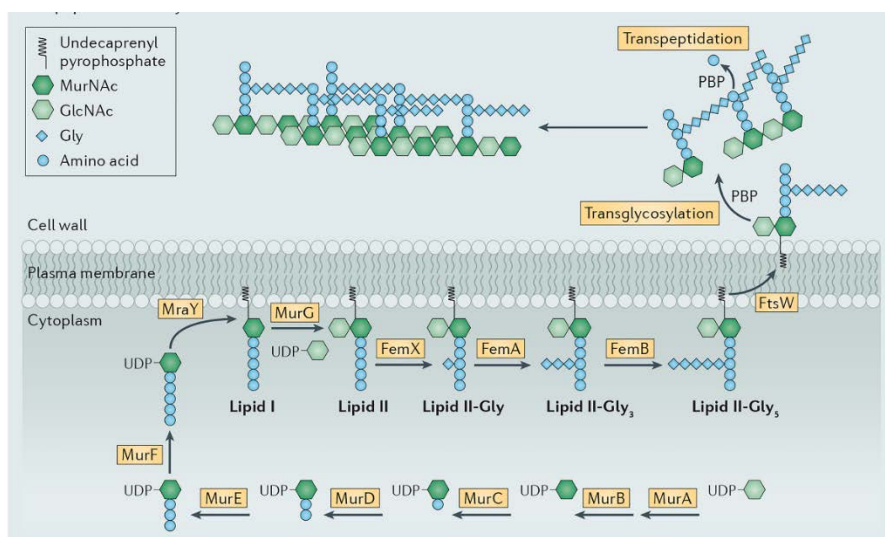
2. Sledeći korak u biosintezi se odvija na citoplazmatskoj membrani. Prekursor UDP-NAM-pentapeptida se vezuje za transportni lipid baktoprenol (C<sub>55</sub> izoprenoid, undekaprenol pirofosfat), što rezultira stvaranjem lipida I. Za lipid I se vezuje NAG iz UDP-NAG i dolazi do stvaranja lipida II.

3. Vezivanje disahard-pentapeptid prekursora za lipidne nosače omogućava njihovu translokaciju na spoljašnju stranu citoplazmatske membrane, što predstavlja treću fazu u sintezi peptidoglikana.

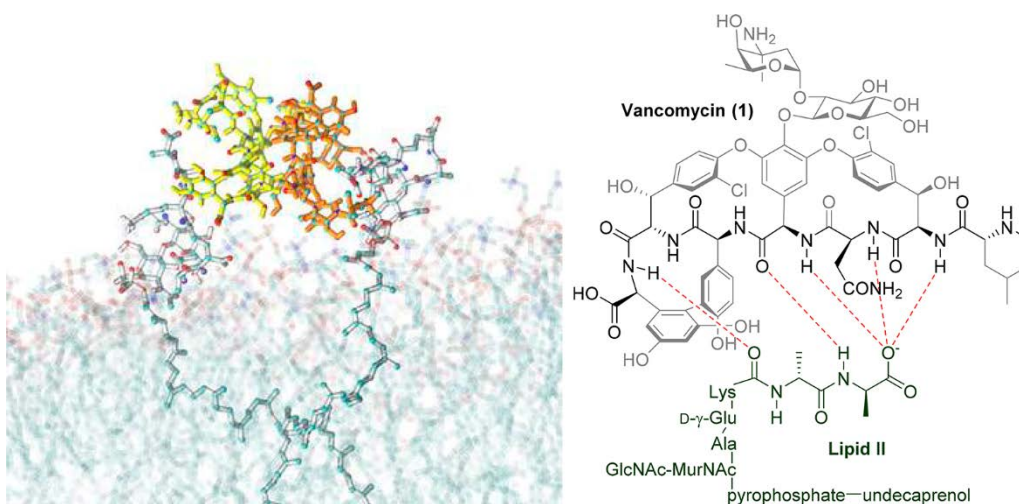
4. Završna faza podrazumeva inkorporaciju prekursora u rastući lanac peptidoglikana posredstvom enzima koji imaju funkciju transglikozilaza/transpeptidaza, a koji se nazivaju penicilin-vezujući proteini (eng. penicillin-binding protein, PBP), što rezultira odgovarajućom polimerizacijom i umrežavanjem.

### 1.7.2. Mehanizam dejstva vankomicina

Kao što je već pomenuto, vankomicin ispoljavaju svoje dejstvo na bakterije inhibicijom sinteze peptidoglikana ćelijskog zida. Ne ulazi u citoplazmu bakterijske ćelije, već se vezuju za njenu spoljašnju površinu, preciznije za D-Ala-D-Ala terminalni deo disaharid-pentapeptidnog prekursora peptidoglikana formirajući, u slučaju vankomicina, pet vodoničnih veza (Slika 6) (40).



Slika 5. Sinteza peptidoglikana ćelijskog zida. Preuzeta iz Pinho i sar., 2013.

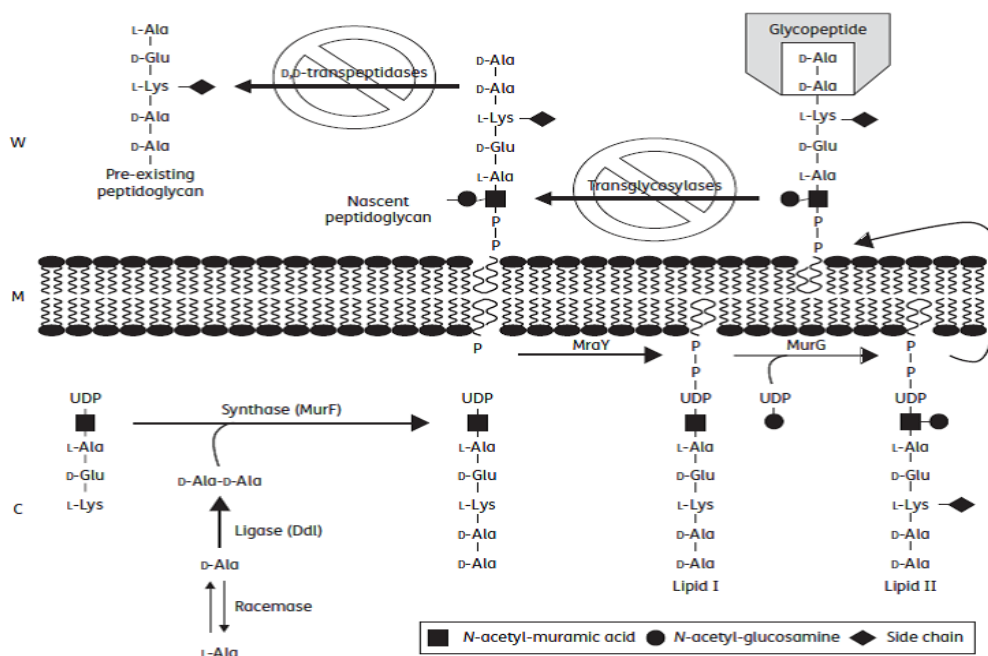


Slika 6. Interakcija vankomicina i Lipida II (levo). Vodonična veza između vankomicina i D-Ala-D-Ala komponente Lipida II. Preuzeto iz Blaskovich i sar., 2018.



Vezivanje se dešava na mestu izlaska prekursora peptidoglikana kroz citoplazmatsku membranu u momentu kada se on ugrađuje u peptidoglikan posredstvom PBP. Zahvaljujući svojoj velikoj molekularnoj masi i „vrećastoj“ strukturi, vankomicin prostorno onemogućava pristup PBP, odnosno posredno dolazi do inhibicije transglikozilacije i transeptidacije i sprečava se umrežavanja peptoglikanskih lanaca (Slika 7) (42,44,45).

S obzirom da je potrebno da prođe kroz sloj peptidoglikana da bi došao do veznog mesta, vankomicin teško postiže visoku koncentraciju na mestu delovanja. Ova pojava doprinosi usporenoj baktericidnoj aktivnosti. Vankomicin (i teikoplanin) ne deluje na Gram-negativne bakterije, jer zbog svoje veličine ne može da difunduje kroz porine spoljašnje membrane (1,44).



Slika 7. Shematski prikaz biosinteze peptidoglikana i mehanizma dejstva glikopeptida. Preuzeto iz Cattoir, 2013.

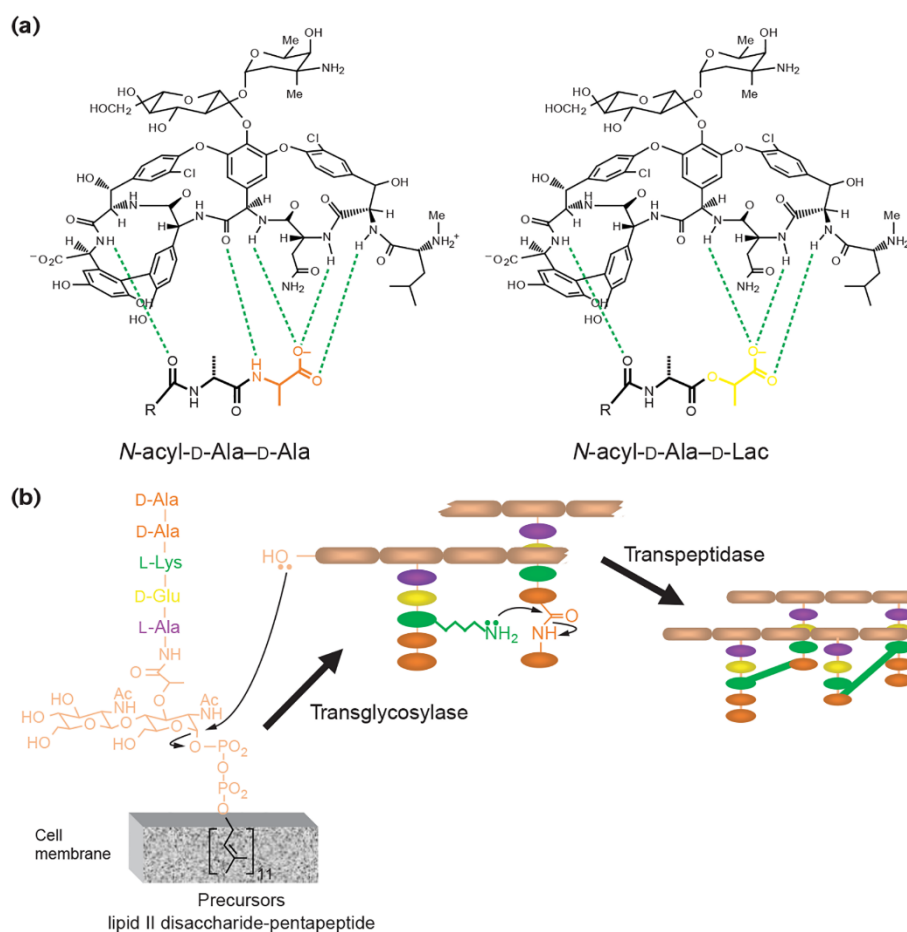
### 1.7.3. Molekularna osnova rezistencije enterokoka na vankomicin

Mehanizam rezistencije enterokoka na vankomicin podrazumeva reprogramiranje biosinteze peptidoglikana ćelijskog zida, supstituciju ciljnog mesta vezivanja i eliminaciju visokoafinitivnih prekursora. Naime, visokoafinitivni prekursori sa D-Ala-D-Ala terminusom se uz pomoć enzima Ddl ligaze zamenjuje sa niskoafinitivnim D-alanin-D-laktat (D-Ala-D-Lak) ili D-alanin-D-serin (D-Ala-D-Ser) terminusima (42,45,46). Suštinski, proizvodnja terminalnog kraja D-Ala-D-Ala pentapeptid se ne nastavlja, i stoga nema mogućnosti za formiranje vodoničnih veza koje su ključne za vezivanje vankomicina što rezultira pojavom rezistencije na vankomicin koja može biti visokog ili niskog tipa, u zavisnosti od toga da li je D-Ala zamenjen sa D-Lak ili sa D-Ser (39). S obzirom da je afinitet vankomicina za vezivanja za D-Ala-D-Lak 1000 puta manji u poređenju sa D-Ala-D-Ala, razviće se visok nivo rezistencije na vankomicin. U slučaju zamene D-Ala-D-Ala sa D-Ala-D-Ser afinitet

vankomicina za vezivanje za terminus prekursora je sedam puta niži i nastaje rezistencije na vankomicin niskog nivoa (Slika 8) (42,46).

Ova modifikacija nastaje u kooperaciji nekoliko enzima koji su potrebni za reprogramiranja peptidoglikanske sinteze, a koji su produkti *van* gena smeštenih u okviru *van* operona.

Do sad je opisano devet *van* operona (42,46,47): *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM*, *vanN*, koji se razlikuju prema tipu rezistencije (urođena/stečena), nivou rezistencije (visok/nizak/srednji/varijabilan), vrsti operona (D-Ala-D-Lak operon/ D-Ala-D-Ser operon), lokaciji na genskom materijalu (mobilni genetski elementi, plazmidi, hromozom), sposobnosti prenosa genetskog materijala konjugacijom, fenotipskoj ekspresiji (inducibilna/konstitutivna) i vrsti enterokoka kod koje su prisutni (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum/casseliflavus*), što je prikazano u Tabeli 1



Slika 8. Vezivanje vankomicina za D-Ala-D-Ala i D-Ala-D-Lak terminuse (gore). Inhibicija transglikozilacije i transpeptidacije (dole).

Tabela 1. Fenotipske i genotipske karakteristike vankomicin-rezistenih *Enterococcus* spp. sojeva. Modifikovano iz (25,45–47)

Tip rezistencije Stepen rezistencije Fenotip	Stečena								Urođena
	Visok		Varijabilan	Srednji		Nizak			
	VanA	VanM	VanB	VanD	VanE	VanG	VanL	VanN	VanC
MIK (mg/L)									
Vankomicin	64-1024 (48)	>256 (49)	4-1024(48)	64-128 (50)	8-32 (50)	16 (50)	8 (25)	8 (25)	4-32(48)
Teikoplanin	8-512 (48)	96 (49)	0,06-1(48)	4-64 (50)	0,5 (50)	0,5 (50)	N	N	0,5-1 (50)
Fenotipska ekspresija	Inducibilna	?	Inducibilna	Konstitutivna/ Inducibilna	Inducibilna Konstitutivna	Inducibilna	Inducibilna	Konstitutivna	Konstitutivna/ Inducibilna
<i>van ligaza</i> gen	<i>vanA</i>	<i>vanM</i>	<i>vanB</i> <sub>1-3</sub>	<i>vanD2</i> <i>vanD1-5</i>	<i>vanE</i>	<i>vanG</i> <sub>1-3</sub>	<i>vanL</i>	<i>vanN</i>	<i>vanC</i> <sub>1-3</sub>
Terminus		D-Ala-D-Lak					D-Ala-D-Ser		
Konjugacija	Da	Da	Da	Ne	Ne	Da	Ne	Da	Ne
Mobilni genski element	Tn1546	IS1216 like	Tn1547, Tn 1549 Tn5382 /ICE	N	N	ICE	N	N	N/P
Lokacija	Plazmid Hromozom	Plazmid Hromozom	Plazmid Hromozom	Hromozom	Hromozom	Hromozom	Hromozom	Plazmid?	Hromozom
Zastupljenost među vrstama	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. avium</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. durans</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. hirae</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. raffinosus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. durans</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. hirae</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. avium</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. raffinosus</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i> – <i>vanC1</i> <i>E.casseliflavus</i> – <i>vanC2/3</i>
Zastupljenost van roda	<i>S. aureus</i> <i>B. circulans</i> <i>A.haemolyticum</i> <i>Paenibacillus</i> <i>Rhodococcus</i>		<i>S. epidermidis</i> <i>Streptococcus</i> <i>Clostridium</i> <i>Ruminococcus</i> <i>Eggerthella</i>	<i>Non-enterococcal</i> <i>faecal flora</i>	<i>Non-enterococcal</i> <i>faecal flora</i>				

?-verovatno; N-nepoznato; N/P-nije primenljivo, ICE- integrative conjugative element



Klasifikacija rezistencije na vankomicin kod enterokoka i podela *van* operona je napravljena u odnosu na strukturne *van* gene (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM*, *vanN*) koji proizvode enzim Ddl ligazu (Slika 9) (25,42,46,48,51).

U odnosu na tip Ddl ligaze koju proizvode *van* geni i vrstu supstitucije D-Ala-D-Ala terminusa, *van* operone možemo podeliti na D-Ala-D-Lak i na D-Ala-D-Ser operone (Slika 9).

D-Ala-D-Lak operonu pripadaju: *vanA*, *vanB*, *vanD* i *vanM* operoni koji proizvode Ddl ligazu koja vezuje D-Lak za D-Ala (46).

D-Ala-D-Ser operonu pripadaju *vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* i *vanN* operoni koji proizvode Ddl ligazu koja vezuje D-Ser za D-Ala (46).

D-Ala-D-Lak operon pored gena koji proizvode Ddl ligazu (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanM*) sadrži još najmanje 3 strukturna gena: gen koji proizvode dehidrogenazu koja konvertuje piruvat u laktat (*vanH*, *vanH<sub>B</sub>*, *vanH<sub>D</sub>*, *vanH<sub>M</sub>*), gen koji proizvode dipeptidazu koja vrši hidrolizu formiranog D-Ala-D-Ala dipeptida (*vanX*, *vanX<sub>B</sub>*, *vanX<sub>D</sub>*, *vanX<sub>M</sub>*) i gen koji proizvode enzim D,D-karboksiptidazu, koja uklanja pentapeptid koji se prethodno sintetisao (*vanY*, *vanY<sub>B</sub>*, *vanY<sub>D</sub>*, *vanY<sub>M</sub>*) (Slika 9).

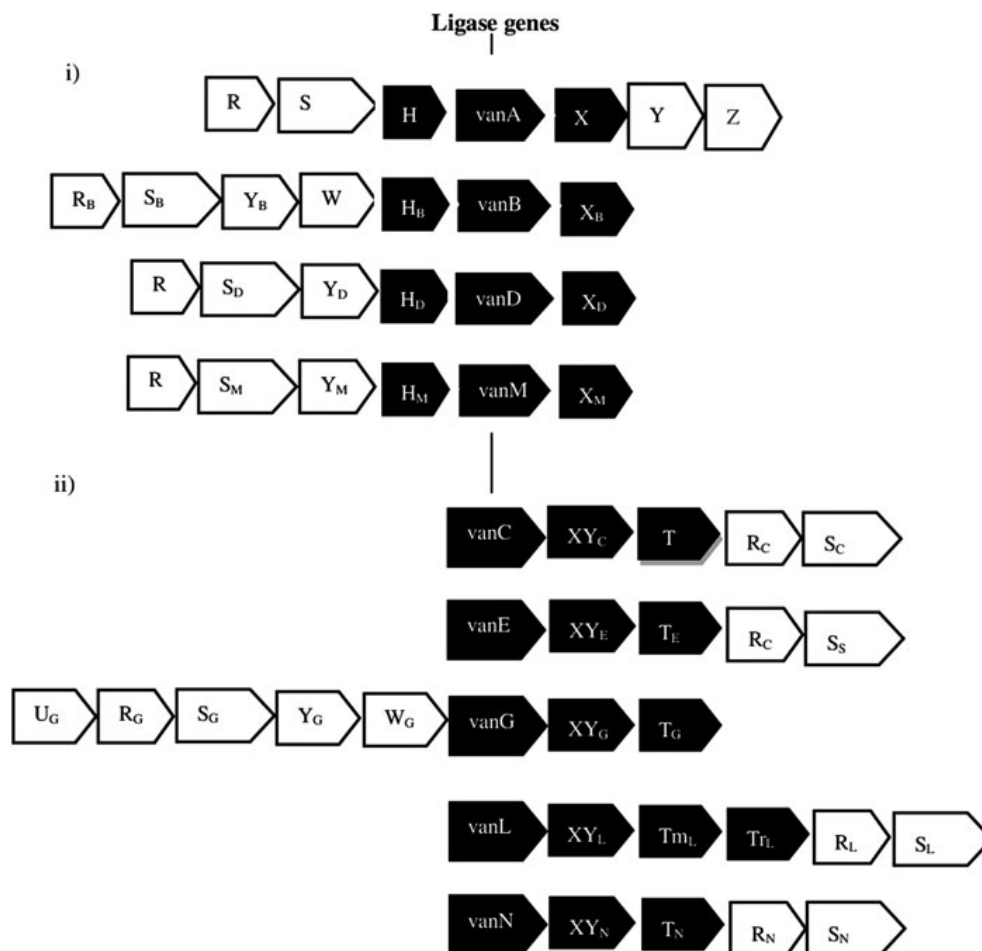
D-Ala-Ser operon pored gena koji proizvode Ddl ligazu (*vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanN*) sadrži još najmanje 2 gena: gen koji proizvode serin racemazu koja vrši konverziju piruvata u serin (*vanT<sub>C</sub>*, *vanT<sub>E</sub>*, *vanT<sub>G</sub>*, *vanT<sub>L</sub>*, *vanT<sub>N</sub>*) i gen koji proizvode peptidaze/karbioksiptidaze koje razlažu D-Ala-D-Ala vezu (*vanXY<sub>C</sub>*, *vanXY<sub>E</sub>*, *vanXY<sub>G</sub>*, *vanXY<sub>L</sub>*, *vanXY<sub>N</sub>*). Karakteristika *vanG* operona je da poseduje trokomponentni regulatorni sistem, pored *vanS/R* gena poseduju i *vanU* gen koji ima ulogu regulatora transkripcije (51). Karakteristika *vanL* da je VanT serin racemaza kodirana sa dva odvojena gena, *vanTmL* i *vanTrL*(52) (Slika 9).

#### 1.7.4. Karakteristike *van* operona

Najznačajniji *van* operoni sa epidemiološkog stanovišta su *vanA* i *vanB* operoni. Najčešće se nalaze među humanim izolatima (kao kolonizatori, uzročnici infekcije i/ili prouzročivači epidemija), ali i među animalnim uzorcima i uzorcima iz spoljašnje sredine, te su i najbolje proučeni u odnosu na ostale *van* operone.

U odnosu na tip rezistencije, urođeni tip rezistencije je do sad opisan samo kod *vanC* operona i karakterističan je za vrste *E.gallinarum* i *E.caseliflavus*. Kod ostalih osam *van* operona rezistencija na glikopeptide je po tipu stečene rezistencije.

Organizacija svih devet *van* operona je slična i obuhvata homologe strukturne i regulatorne gene. Produkti strukturnih gena su enzimi koji učestvuju u formiranju modifikovanog paptidoglikana, dok regulatorni geni učestvuju u modulaciji genske ekspresije. Strukturni i regulatorni geni se prepisuju sa dva odvojena promotora. Lokacija strukturnih gena je nizvodno od regulatornih kod skoro svih *van* operona izuzev *vanC* i *vanE* oprona kod kojih je organizacija obrnuta, regulatorni geni su smešteni nizvodno u odnosu na strukturne gene (51,53).



Slika 9. Shematski prikaz *van* operona. D-Ala-D-Lak operoni: *vanA*, *vanB*, *vanD* i *vanM* operoni (gore). D-Ala-D-Ser operoni: *vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* i *vanN* operoni (dole). Preuzeto iz Ahmed, 2018.

### Karakteristike pojedinačnih *van* operona su sledeće:

- ***vanA*** operon pripada D-Ala-D-Lak operonima. Smešten je na mobilnim genskim elementima, na Tn3 tipu transpozona (Tn1546) koji se najčešće nalaze na plazmidima, a ređe na hromozomu. Pored *vanHAX* gena, *vanA* operon sadrži i *vanZ* gen koji obezbeđuje nizak nivo rezistencije na teikoplanin u odsustvu drugih proteina (za sad nepoznatim mehanizmom) i *orf1* i *orf2* gene za transpoziciju. Opisana je i varijacija *vanA* operona, koji nosi naziv *vanA-like* operon, koji sadrži insercionu sekvencu (46,51).
- ***vanB*** operon takođe pripada D-Ala-D-Lak operonima. Do sad su opisane tri varijante ovog operona koje nose naziv: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>. Smešten je, kao i *vanA* operon na mobilnim genskim elementima (na transpozonima, Tn1547, Tn1549 i Tn5382). Navedeni transpozoni se najčešće nalaze na plazmidu, a ređe na hromozomu. Transpozon, Tn1549, pripada tipu konjugativnih transpozona i najčešći je transpozon koji je nosilac *vanB* rezistentnih gena. Po tipu organizacije, *vanB* operon je sličan *vanA* operonu i sadrži homologe gene koji se označavaju sa *vanH<sub>B</sub>BX<sub>B</sub>*. Homolog *vanZ* gena kod *vanB* operona nije opisan. Umesto njega je prisutan *vanW* gen čija uloga u rezistenciji nije razjašnjena.

Procenat homologije između *vanA* i *vanB* gena je 76%, između *vanH* i *vanH<sub>B</sub>* je 67%, a između *vanX* i *vanX<sub>B</sub>* 71%. Iako je sličnost velika, razlikuju se po homologiji između regulatornih gena za dvokomponentni regulatorni sistem. Karakteristika ovog tipa operona je mogućnost javljanja mutacija u *vanS<sub>B</sub>* genu, i nastanku rezistencije na teikoplanin koja može da bude povezana i sa rezistencijom na oritavascinsin (46,51).

- ***vanA/vanB*** genotip je opisan kod *E. faecium* sojeva koji su izolovani na Bliskom Istoku. Bez obzira na prisustvo oba gena, ovi sojevi pokazuju VanB fenotip, usled delecije *vanZ* gena ili mutacije u *vanS* genu. Osim na Bliskom Istoku, opisani su i u Francuskoj, Finskoj i Australiji (54). U Grčkoj je krajem 2016. godine izolovan *E. faecium* soj koji sadrži oba gena, ali je fenotipski VanA. Smatra se da je došlo do insercije *vanB* gena u hromozom *vanA* soja (54).
- ***vanD* i *vanM*** operoni takođe pripadaju D-Ala-D-Lak operonima. Karakteristika ***vanD*** operona je da se isključivo nalazi na homozomu, da je rezistencija na vankomicin/teikoplanin konstitutivna kao posledica mutacije u regulatornim genima. Retko je opisan među sojevima enterokoka ali se može naći zajedno sa *vanC* operonom kod *E. gallinarum* (46). Prisutan je u pet podtipova, *vanD1-5*.
- Operon tipa ***vanM*** je prvi put otkriven u šangajskoj bolnici u Kini u periodu između 2005. i 2008. godine kod izolata *E. faecium*. Smešten je na plazmidu, ređe na hromozomu i ima sposobnost transfera konjugacijom. Metodom sekvenciranja genoma otkriveno je da *vanM* gen pokazuje najveći stepen homologije sa *vanA* genom, dok je organizacija *vanM* operona je najbližnja *vanD* operonu. Ushodno od *vanM* gena smeštena je inserciona sekvenca IS1216-like koja je veoma slična insercionoj sekvenci IS1216V zastupljenoj kod *vanA* operona, a koja se smatra odgovornom za diseminaciju VRE rezistencije putem transpozona indukovane fuzije *vanA* plazmida sa drugim plazmidima (49).
- ***vanC*** operon pripada D-Ala-D-Ser operonima. Nalazi se na hromozomu i nije transferabilan. Urođeno je prisutan kod vrsta *E. gallinarum* i *E. casseliflavus* i javlja se u tri podtipa. Podtip C<sub>1</sub> je prisutan kod *E. gallinarum*, dok je C<sub>2</sub>/C<sub>3</sub> podtip prisutan kod *E. casseliflavus* (46).
- ***vanG*, *vanE* i *vanL*** operoni pripadaju D-Ala-D-Ser operonima i do sada su otkriveni samo u hromozomu *E. faecalis*. ***vanE*** operon je opisan kod vrste *E. faecalis* izolovanih u Severnoj Americi i Australiji i sličan je C<sub>1</sub> podtipu koji je opisan kod *E. gallinarum*. ***vanG*** operon je prisutan u tri podtipa, *vanG1-3*, nalazi na konjugativnom transpozonu i za razliku od *vanE* i *vanL* može se preneti konjugacijom (46,52,55).
- Poslednji za sad opisan *van* operon je ***vanN*** operon. Pripada D-Ala-D-Ser operonima i otkriven kod *E. faecium* sojeva. Sličan je *vanG* operonu po sposobnosti prenosa konjugacijom (56).

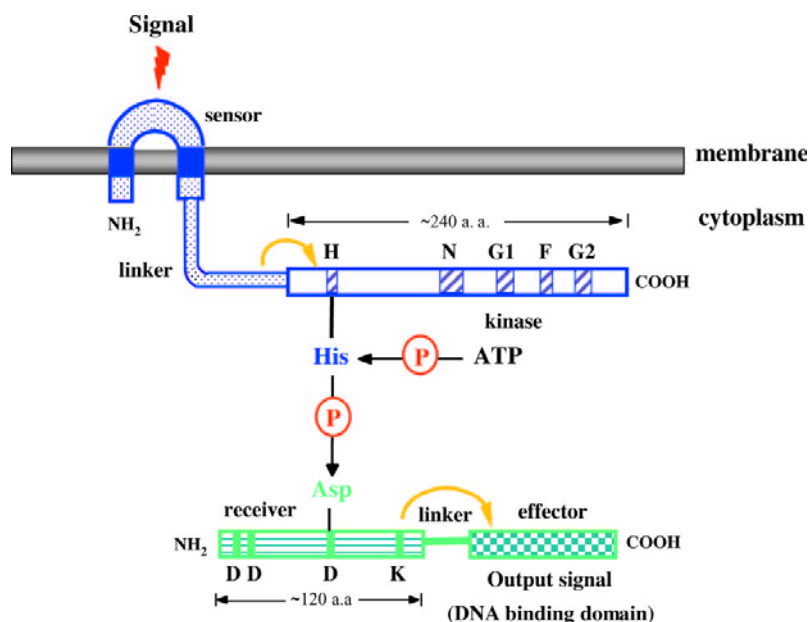
### 1.7.5. Regulacija ekspresije *van* operona

Prisustvo gena rezistencije na antimikrobne lekove predstavlja prednost za bakterije u trenutku kada je antimikrobni agens prisutan u okolini. Međutim, ova prednost je tranzitorna i kada antimikrobni agens nije prisutan u okolini, geni rezistencije za bakteriju predstavljaju višak funkcije i gubitak energije. Modulacija ekspresije gena rezistencije pruža bakterijama mogućnost da se prilagode okruženju u kome se nalaze, odnosno da izbegnu letalno dejstvo antimikrobnog agensa, ali i da obezbede uštedu energije kada agensa nema. Modulacija genske ekspresije se može vršiti na različite načine. U slučaju da prisustvo

signala, u našem slučaju antimikrobnog agensa, dovodi do ekspresije rezistentnih gena, takav agens nazivamo induktor genske ekspresije i kažemo da je ekspresija gena rezistencije inducibilna. Osim inducibilne, ekspresija genske rezistencije može biti i konstitutivna, kada se geni rezistencije stalno transkribuju bez obzira na prisustvo/odsustvo antimikrobnog agensa (51).

Regulacija ekspresije *van* operona je pod kontrolom regulatornih gena čiji produkti su proteini koji formiraju dvokomponentni regulatorni sistem. To je do sada jedini opisan dvokomponentni sistema koji je uključen u kontrolu ekspresije antimikrobne rezistencije i sastoji se od dva proteina: senzora kinaze (S), transmembranskog proteina koji detektuje signale iz okoline i regulatornog proteina (R), koji se nalazi u citoplazmi, prenosi signal i dovodi do izmene u genskoj ekspresiji (Slika 10) (51,53).

Senzor kinaza pripada grupi histidin kinaza, hemodimernih proteina koji imaju dva domena: N-terminalni domen, koji prima signale iz okoline i C-terminalnim domen koji se nalazi u citoplazmi. Prisustvo signala (vankomicin/teikoplanin) dovodi do konformacione promene senzora kinaze, ATP-zavisne autofosforilacije histidin rezidua citoplazmatskog domena i prenosa fosfatne grupe na asparagin rezidui regulatornog proteina. Na ovaj način dolazi do dimerizacije regulatornog proteina koji ima ulogu transkriptornog faktora. Vezivanjem efekorskog dela regulatornog proteina za DNK dovodi do aktivacije transkripcije promotora i regulatornih gena i gena rezistencije *van* operona (Slika 10) (51,53).

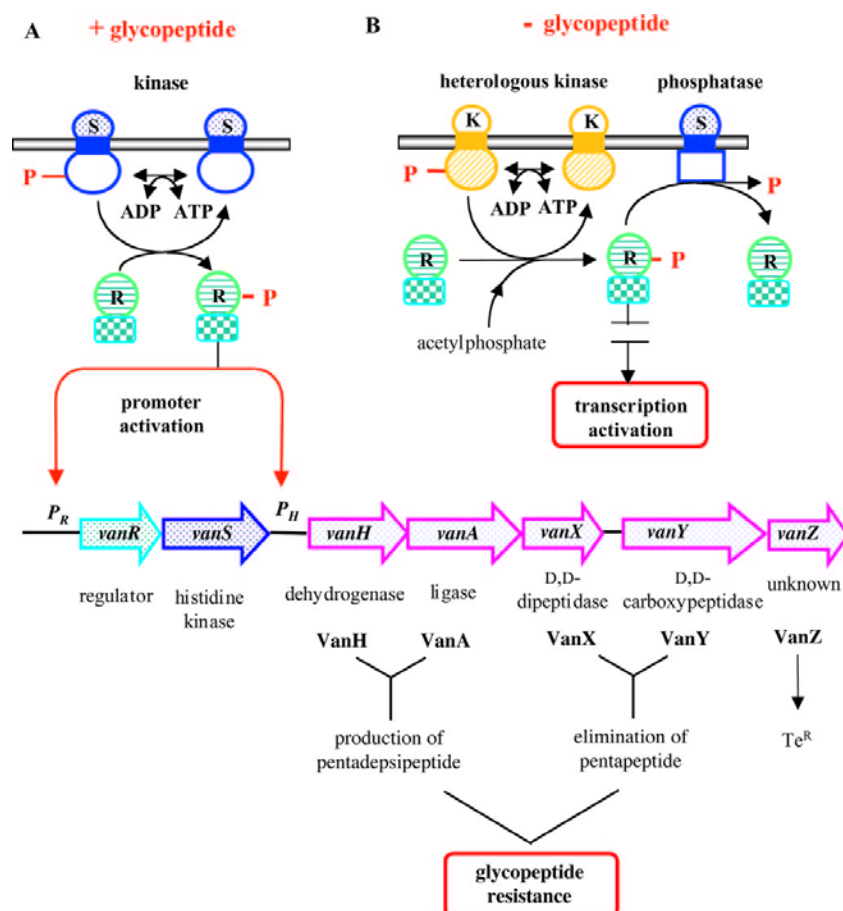


Slika 10. Shematski prikaz dvokomponentnog regulatornog sistema kod enterokoka. Preuzeto iz Depardieu, 2007.

Do sad je opisano devet dvokomponentnih regulatornih sistema koji se međusobno razlikuju u zavisnosti kojem tipu *van* operona pripadaju i obeležavaju se kao: VanS/VanR, VanS<sub>B</sub>/VanR<sub>B</sub>, VanS<sub>C</sub>/VanR<sub>C</sub>, VanS<sub>D</sub>/VanR<sub>D</sub>, VanS<sub>E</sub>/VanR<sub>E</sub>, VanS<sub>G</sub>/VanR<sub>G</sub>, VanS<sub>L</sub>/VanR<sub>L</sub>, VanS<sub>M</sub>/VanR<sub>M</sub>, VanS<sub>N</sub>/VanR<sub>N</sub>. Najbolje su proučeni dvokomponentni sistemi koji su prisutni kod najvažnijih *van* operona, *vanA* i *vanB* operona, i to su VanS/VanR i VanS<sub>B</sub>/VanR<sub>B</sub> dvokomponentni sistemi. Razlika između VanS/VanR i VanS<sub>B</sub>/VanR<sub>B</sub> sistema je u tome što su induktori za VanS/VanR sistem i

vankomicin i teikoplanin, dok je u slučaju VanS<sub>B</sub>/VanR<sub>B</sub> sistema induktor samo vankomicin. Odnosno, kod enterokoka sa *vanB* tipom operona prisustvo teikoplanina ne indukuje transkripciju *van* gena i enterokoke su osjetljive na teikoplanin (51,53). Homologija između *vanS* i *vanS<sub>B</sub>* gena je 23%, a između *vanR* i *vanR<sub>B</sub>* gena je 34%, međutim, bez obzira na nizak stepen sličnosti među ovim genima, njihovi produkti učestvuju u istoj reakciji-reakciji tranfera fosfatne grupe (51).

VanS i VanS<sub>B</sub> su bifunkcionalni proteini koji ima funkciju kinaze i fosfataze. Kao kinaze, VanS/VanS<sub>B</sub> protein učestvuju u reakciji fosforilacije proteina VanR/VanR<sub>B</sub> prevodeći ih u aktivan oblik neophodan za vezivanje za promotor. Kao fosfataze, VanS/VanS<sub>B</sub> protein učestvuju u reakciji defosforilacije VanR/VanR<sub>B</sub> proteina, inaktivira ga i spečava transkripciju gena (Slika 11) (51,53). U prisustvu induktora (vankomicin/teikoplanin), aktivnost VanS/VanS<sub>B</sub> proteina se menja iz fosfataze u kinazu, nakon čega sledi reakcija fosforilacije VanR/VanR<sub>B</sub> proteina, povećava se afinitet njegovog efektorskog dela za vezivanje za oba promotora na DNK i transkripcija rezistentnih gena sa *van* operona je omogućena (Slika 11) (51,53). U odsustvu induktora (vankomicin/teikoplanin), VanS/VanS<sub>B</sub> protein ima funkciju fosfataze, VanR/VanR<sub>B</sub> protein je u defosforilisanom obliku, ne vezuje se za promotor, te prepisivanje rezistentnih gena sa *van* operona izostaje (Slika 11) (51,53).



Slika 11. Shematski prikaz pozitivne (fosforilacija) i negativne (defosforilacija) kontrole VanR proteina od strane VanS proteina u prisustvu i odsustvu induktora. Preuzeto iz Depardieu, 2007.

Za dvokomponentne sisteme karakteristično je da gubitak sensor kinaze i/ili regulatornog proteina dovodi do istog fenotipa, koji se karakteriše gubitkom ekspresije ciljnog gena. Međutim, kod enterokoka ali i kod nekih aktinomiceta (npr. *Streptomyces coelicolor*) delecija *vanS* gena rezultira konstitutivnom ekspresijom vankomicin rezistentnih gena, što ukazuje na to da u odsustvu *vanS/vanS<sub>B</sub>* gena fosforilacija VanR/VanR<sub>B</sub> proteina može da se vrši na drugi način, i to uz pomoć acetilfosfata ili kinaze domaćina. Spontana defosforilacija VanR/VanR<sub>B</sub> proteina je moguća, ali je jako spora. Za regulaciju ekspresije *van* gena važno je da VanS protein ima funkciju fosfataze, čime se sprečava nakupljanje fosforilisanog VanR oblika koji bi se vezao za promotor i aktivirao transkripciju gena rezistencije na vankomicin/teikoplanin u odsustvu istih. Za VanS se kaže da vrši negativnu kontrolu transkripcije. Razlog konstitutivne ekspresije *van* gena nije potpuno razjašnjen, a jedno od mogućih objašnjenja je da je protein VanS/VanS<sub>B</sub> „zaključan“ u funkciji kinaze (51,53). Moguće objašnjenje je insercija insercione sekvence IS19, koja se još naziva i *ISEfm1* u gen koji produkuje ddl ligazu ili *ISEfa4* u *vanS<sub>D</sub>* (51).

### 1.7.6. Fenotip glikopeptidne rezistencije

Fenotip glikopeptidne rezistencije je određen *van* genotipom, te tako razlikujemo devet fenotipova glikopeptidne rezistencije: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM, VanN (Tabela 1). Prema definiciji koji je dao EUCAST u poslednjoj verziji dokumenta pod nazivom „EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, ver2.0“ iz jula 2017. godine, rezistencija na vankomicin kod *E. faecalis* i *E. faecium* sojeva je prisutna ako je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) veća od 4 mg/L (48).

VanA i VanB su najčešći fenotipovi rezistencije na glikopeptide. Geni koji dovode do ekspresije ovih fenotipova se nalaze na transpozonomima koji se mogu naći na plazmidima ili na hromozomu.

**VanA** fenotip karakteriše visok stepen stečene rezistentecije na oba glikopeptidna antibiotika. MIK vrednost za vankomicin se kreće u rasponu od 64 do 1024 mg/L, a za teikoplanin od 8 do 512 mg/L (48). Oba antimikrobna leka su induktori *vanA* gena, odnosno prisustvo ili vankomicina ili teikoplanina dovešće do ispoljavanja VanA fenotipa (2,48,57). U Grčkoj je 2016. godine registrovan soj koji poseduje i *vanA* i *vanB* gene, ali je njegov fenotipski profil VanA (54).

**VanB** fenotip karakteriše varijabilni stepen stečene rezistentecije na vankomicin (MIK: 4-1024 mg/L) i osetljivost na teikoplanin (MIK: 0,06-1 mg/L) (48,57). Mutacije koje se javljaju u *vanS<sub>B</sub>* genu, dovode do varijacija u VanS proteinu i razlikujemo dva VanB fenotipa kod kojih postoji rezistencija na teikoplanin: konstitutivni i heterogeni (51). Konstitutivni fenotip karakterišu visoke MIK vrednosti na vankomicin i na teikoplanin kod izolata koji je prethodno bio osetljiv na teikoplanin. Kod heterogenog fenotipa prilikom testa disk difuzije postoje kolonije unutar zone inhibicije koji se javljaju u toku 48h. Fenotipovi su pokazani u *in vitro* uslovima, na animalnim modelima, ali su izolovani i *in vivo*, kod pacijenata. S obzirom da je do sad opisano šest slučajeva (58–60) pojave rezistencije na teikoplanin u toku njegove terapijske primene kod VRE sa VanB fenotipom, teikoplanin treba oprezno koristiti u slučaju VanB fenotipa. Na Bliskom Istoku je karakteristična pojava VanB fenotipa u čijoj je osnovi *vanA/vanB* genotip (54).

**VanD** fenotip karakteriše srednji stepen konstitutivne rezistencije na vankomicin i nizak stepen rezistencije na teikoplanin. Niska prevalencija i mala geografska rasprostranjenost ovog fenotipa za razliku od visoke rasprostranjenosti i visoke prevalencije sojeva sa VanA i VanB fenotipom, objašnjava



se time što su *vanD* geni smešteni na hromozomu i nisu tranferabilni. Ovaj fenotip se prvo javio u SAD, Kanadi i Brazilu. U Evropi se prvo javio u Francuskoj 2005. godine, a zatim u Švedskoj 2007 i 2016. godine. Flipse i sar. su u istraživanju koje je sprovedeno 2019. godine u tercijalnoj bolnici u Holandiji otkrili šest slučajeva VanD fenotipa kod *E. faecium* sojeva (61).

**VanM** fenotip je karakterističan za Kinu, i karakteriše ga visok stepen stečene rezistencije na vankomicin (MIK > 256 mg /L) i teikoplanin (MIK > 96 mg /L). Rezistencija je otkrivena kod *E. faecium* sojeva, a *vanM* geni su smešteni na plazmidu ili hromozomu i transferabilni su (49).

**VanE, VanG i VanL** fenotipovi su retki i do sada su otkriveni samo na hromozomu kod sojeva *E. faecalis*, dok je **VanN** pronađen samo u jednom izolatu *E. faecium*. VanG i VanN su jedini tranferabilni D-Ala-D-Ser tipovi rezistencije na vankomicin (42).

**VanC** fenotip je karakterističan za vrste *E. gallinarum* i *E. casseliflavus* koje su urođeno rezistentne na vankomicin (MIK od 4 do 16 mg /L) (48,57). Ovaj fenotip je povezan sa niskim rizikom od smrtnog ishoda i retko dovodi do nastanka bolničke infekcije (61), te nije od posebne važnosti u kontroli infekcije niti je uključen u skrining program u Evropi (48). Vrste *E. raffinosus*, *E. gallinarum* i *E. casseliflavus* mogu pored *vanC* gena da sadrže i *vanA*, *vanB* ili druge *van* gene, ali ovi sojevi su veoma retki (48).

Termin **vankomicin varijabilni enterokok** se koristi za one VRE sojeve kod kojih je ekspresija *van* gena utišana zbog genskog rearanžiranja. Međutim, pod selektivnim pritiskom glikopeptidnih antimikrobnih lekova ekspresija *van* gena može biti ekspimirana u punom obimu (48).

Termin **VRE sa niskim MIK vrednostima** (eng. Low-MIC VRE) se uglavnom odnosi za *vanB* izolate kod kojih vankomicin inicijalno ima slabu sposobnost indukcije *vanB* gena. Ekspresija *vanB* gena je niska, a MIK vrednosti su niske. Međutim, nakon dužeg perioda izlaganja vankomicinu, može doći do pune ekspresije *vanB* gena i povećanja MIK vrednosti iznad graničnog nivoa (48). Vankomicin varijabilni enterokok i VRE sa niskim MIK vrednostima mogu se otkriti samo molekularnom analizom, a njihova trenutna rasprostranjenost u različitim geografskim regionima je nepoznata (48).

**Fenomen zavisnosti enterokoka od glikopeptida** se odnosi na određene sojeve *E. faecalis* i *E. faecium* (VanA ili VanB tip) izolovane *in vitro* ali i od pacijenata, kod kojih je utvrđeno da su rezistentni na vankomicin, ali i da njihov rast zavisi od prisustva vankomicina ili teikoplanina. Smatra se da je ova osobina povezana je sa mutacijom u *ddl* genu i nedostatkom funkcionalne „prirodne“ Ddl ligaze. Shodno tome, kod ovih sojeva sinteza peptidoglikana u potpunosti zavisi od ekspresije *van* operona nakon indukcije glikopeptidom (42).

### 1.7.7. Poreklo rezistencije enterokoka na vankomicin

Poreklo rezistencije na vankomicin u kliničkim izolatima nije do kraja razjašnjeno. Jedno od mogućih objašnjenja je da *van* geni vode poreklo od aktinomiceta iz zemljišta kao što su *Streptomyces toyocaensis* ili *Amiclatopsis orientalis*, kod kojih su pronađeni *van* operoni koji su filogenetski udaljeni od enterokoknih *van* operona. Ove aktinomicete proizvode glikopeptide, a *van* operoni u njihovom slučaju predstavljaju mehanizam endogene zaštite (42,53).

Osim kod aktinomiceta, *vanF* genski klaster, koji nije još uvek opisan kod enterokoka a koji pokazuje najveću homologiju sa *vanA* operonom, opisan je kod *Paenibacillus popilliae* (ranije *Bacillus popilliae*)-vankomicin rezistentnog biopesticida, koji se više od 50 godina koristio u SAD za supresiju populacije japanskih buba tako što dovodi do oboljenja njihovih larvi (62).

Istraživanje D'Costa i saradnika o poreklu antimikrobne rezistencije otkrilo je *vanHAX* sekvence u uzorcima permafrosta prikupljenih u Yukonu u Kanadi koji datiraju od pre oko 30 000 godina, što je nesumnjivo pokazuje da je poreklo rezistencije drevno i predstavlja fenomen široko rasprostranjen u prirodi (63).

## 1.8. Rezistencija enterokoka na ostale grupe antimikrobnih lekova

### 1.8.1. Rezistencija enterokoka na ampicilin

Rezistencija *E. faecalis* na ampicilin je retka, međutim kod *E. faecium* je česta i prisutna je u bolničkoj sredini. Rezistencija enterokoka na ampicilin posredovana je sledećim mehanizmima rezistencije (12,23,29,30,64,65):

- a. Rezistencija posredovana modifikacijom PBP
- b. Rezistencija posredovana produkcijom beta-laktamaza
- c. Rezistencija posredovana formiranjem alternativnog puta

#### a. Rezistencija posredovana modifikacijom PBP

Rezistencija na visoke doze ampicilina (MIK  $\geq 128\mu\text{g/mL}$ ) se često viđa kod izolata *E. faecium* u bolničkoj sredini. U osnovi rezistencije se nalazi dva mehanizma: proizvodnja izmenjenog PBP5 i prekomerna ekspresija (hiperprodukcija) PBP5 (64,66).

PBP5 je produkt *pbp5* gena, a molekularnim ispitivanjima je utvrđeno da postoje dve varijante ovog gena. Prva varijanta je označena kao *pbp5*-R gen, a produkt ovog gena je PBP5 protein koji nastaje kao rezultat mutacije u aminokiselinskoj sekvenci. Ovaj protein ima nizak afinitet za vezivanje za ampicilin, odnosno, povezan je sa visokim nivoom rezistencije na ampicilin i prisutan je među izolatima u bolničkoj sredini (23,30,65).

Druga varijanta ovog gena je označena kao *pbp5*-S, povezana je sa osetljivošću na ampicilin (MIK  $\leq 64\mu\text{g/mL}$ ) i javlja se u vanbolničkoj populaciji. Međutim, činjenica da postoje ove dve varijante nije dovoljna da potpunosti objasni različite profile osetljivosti primećene u kliničkoj praksi. Smatra se da još neidentifikovani faktori igraju važnu ulogu u ispoljavanju nivoa rezistencije putem PBP5 kod *E. faecium* (23,30,65).

Modifikacija u PBP5 povezana je sa smanjenom osetljivošću na sve beta-laktamske antimikrobne lekove. Prema ekspertskim pravilima koje daje EUCAST za *Enterococcus* spp. (EUCAST Expert Rules v.3.2 on *Enterococcus* spp.), na osnovu rezistencije enterokoka na ampicilin, izveštava se rezistencija na ureidopeniciline i imipenem (31).



### b. Rezistencija posredovana produkcijom beta-laktamaza

Ovaj tip rezistencije je redak, ali je češći kod *E. faecalis* nego kod *E. faecium*. Prvi put je opisan 1981. godine u Teksasu, a osim u SAD, zabeležen je u Kanadi, Argentini i Libanu. Rezistencija posredovana beta-laktamazama kod *E. faecium* izolata zabeležena je 1992. godine u Ričmondu i 2010. godine u Modeni (65).

Geni za enzim beta-laktamazu se nalaze na plazmidu i odgovaraju *blaZ* genu za penicilinazu kod *S. aureus*. Za razliku od *S. aureus* kod koga je ekspresija ovog gena inducibilna, kod enterokoka je konstitutivna, a represor ne postoji. Nivo rezistencije je mnogi niži u odnosu na *S. aureus*. Ovaj tip rezistencije predstavlja dijagnostički izazov jer je rezistencija zavisna od inokuluma. Naime, pri rutinskom ispitivanju antimikrobne rezistencije (inokulum je obično  $10^5$  CFU/mL), proizvodnja beta-laktamaza je veoma mala, te će ispitivani sojevi pokazati osetljivost na ampicilin. Međutim, pri visokom inokulumu, kao što se npr. dešava za vreme infekcije, produkuje se više beta-laktamaza i rezistencija na ampicilin će tada biti ispoljena. Ovaj tip rezistencije se može otkriti na osnovu razlika u veličini zone inhibicije ampicilina i ampicillin-sulbaktama. Rezultat se smatra pozitivnim kada je razlika veća od 4 mm (30,65).

Karakteristika ovih sojeva je da su osetljivi na imipenem i na kombinaciju beta-laktama sa inhibitorima beta laktamaza (npr. ampicilin-sulbaktam) te ne predstavljaju problem sa stanovišta terapije (23,29,65).

### c. Rezistencija formiranjem alternativnog puta

Pored dva opisana mehanizma rezistencije na ampicilin, u laboratorijskim uslovima kod laboratorijskih mutanata *E. faecium* kojima je uklonjen PBP5 gen, opisan je još jedan mehanizam. Ovi mutanti pored DD-transpeptidaze koja je osetljiva na beta-laktame, poseduju i LD-transpeptidazu, Ldtfm kojim se prevazilazi osetljivost na beta-laktame i omogućava se umrežavanje peptidoglikanskih lanaca (30,65,66).

## 1.8.2. Rezistencija enterokoka na aminoglikozide

Kod enterokoka su prisutna dva tipa rezistencije na aminoglikozide: urođena (intrinzing) i stečena. Zbog urođene rezistencije, monoterapija aminoglikozidima je neefikasna, međutim baktericidno sinergističko delovanje sa beta-laktamima i glikopeptidima (u slučaju da su sojevi osetljivi na ove klase antimikrobnih agenasa) je očuvano i od velikog značaja za terapiju npr. endokarditisa. Najvažniji dijagnostički zadatak je utvrđivanje postojanja stečene rezistencije, s obzirom da u tom slučaju sinergizam sa beta-laktamima i glikopeptidima izostaje (23,29–31,64).

Urođena rezistencija enterokoka na aminoglikozide podrazumeva rezistenciju na niske doze aminoglikozida (eng. Low-Level Aminoglycosides Resistance, LLAR), a u osnovi rezistencije je neefikasan transport kroz citoplazmatsku membranu. Kod *E. faecium* sojeva postoji i dodatni mehanizam urođene rezistencije posredovan hromozomski kodiranim enzimom – aminoglikozid acetiltransferaza (AAC (6')-II) koja inaktivira kanamicin, tobramicin, netilmicin i sisomicin, dok je aktivnost prema gentamicinu i streptomycinu je očuvana. Prisustvo ovog enzima je u slučaju *E. faecium* odgovorno za izostanak sinergizma aminoglikozida sa beta-laktamima i glikopeptidima, izuzev gentamicina i streptomicina (23,29–31,64).

Stečena rezistencija enterokoka na aminoglikozide podrazumeva rezistenciju na visoke doze aminoglikozida (eng. High-Level Aminoglycosides Resistance, HLAR). Prisusvo HLAR uklanja baktericidni sinergistički efekat sa beta-laktamima i glikopeptidima. Stečena rezistencija može nastati putem nekoliko mehanizama (23,29–31,64):

- a. Enzimaska inaktivacija;
- b. Izmena ciljnog mesta;
- c. Modifikacija transporta (retko).

a. Enzimaska inaktivacija je najčešći mehanizam HLAR rezistencije kod enterokoka i podrazumeva produkciju inaktivirajućih enzima kodiranih plazmidskim genima koji katalizuju acetilaciju i fosforilaciju amino grupe, odnosno nukleotidilaciju hidroksilne grupe (aminoglikozid acetiltransferaza, AAC; aminoglikozid-fosfotransferaza, APH; aminoglikozid nukleotidil-transferaza, ANT). Prisusvo različitih enzima se ogleda u različitim fenotipskim profilima rezistencije. Tako je npr. HLAR na gentamicin prvenstveno posledica prisustva bifunkcionalnog AAC (6')-Ie / APH (2') – Ia enzima, koji poseduje i aktivnosti acetiltransferaze i fosfotransferaze i odgovoran je za rezistenciju na sve aminoglikozide, osim streptomocina. HLAR na streptomocin nastaje kao rezultat enzimske inaktivacije usled aktivnosti enzima ANT (3')-Ia ili ANT (6')-Ia, ali i kao rezultat mutacije ciljnog mesta na ribozomu.

b. Izmena ciljnog mesta na ribozomu omogućena je preko ribozomalne RNK (rRNA) metiltransferaze (EfmM), koja vrši metilaciju citidina kod *E. faecium* sojeva, a sojevi su rezistentni na kanamicin i tobramicin.

### 1.8.3. Rezistencija enterokoka na kvinupristin/dalfopristin (Q-D)

Lek Q-D predstavlja kombinaciju streptogramina A (dalfopristin) i streptogramina B (kvinupristin), derivata pristinmicina, koja ima baktericidni efekat i ispoljava svoje dejstvo vezujući se za 50S subjedinicu ribozoma.

*E. faecalis* je urođeno rezistentan na Q-D, a rezistencija je posledica ekspresije *lsa* gena (nosilac rezistencije na linkozamide i streptogramin A). Mehanizam nije skroz razjašnjen ali se smatra da je u osnovi prisustvo efluks pumpe.

Rezistencija na Q-D kod sojeva *E. faecium* posredovana je izmenom ciljnog mesta na ribozimu ili enzimskom modifikacijom leka.

Najčešći opisan mehanizam rezistencije kod *E. faecium* je MLS<sub>B</sub> tip rezistencije koja obuhvata rezistenciju na makrolide, linkozamide i streptogramin B. U osnovi rezistencije je ekspresija *ermB* gena i produkcija enzima koja vrši metilaciju adeninskog rezidua u 23S rRNK. S obzirom da je Q-D kombinacija streptogramina A i B, očekivalo se da će Q-D ostati aktivan kod MLS<sub>B</sub> fenotipa. Međutim, na animalnim modelima je pokazano da primena Q-D kod MLS<sub>B</sub> fenotipa kod endokarditisa može da ima smanjeni terapijski efekat (23,29,30,67,68).

Ostali mehanizmi rezistencije *E. faecium* na Q-D uključuju prisustvo enzima acetiltransferaze i laktonaze (liaze) ali i efluks pumpe. Acetiltransferaza je produkt *vatD* i *vatE* gena. Vezuje se za dalfopristin i modifikuje ga. Laktonaza (liaza) je produkt *vgbA* i *vgbB* gena, inaktivira dalfopristin

otvaranjem prstena. Prisustvo efluks pumpe je rezultat mutacije u *eatA* genu za ABC transporter (23,29,30,67,68).

#### 1.8.4. Rezistencija enterokoka na fluorohinolone

Fluorohinoloni dovode do inhibicije sinteze DNK tako što inhibišu enzime DNK girazu (topoizomeraza II) i topoizomerazu IV, koji učestvuju u regulaciju dodatnog uplitanja (super coiling) DNK. Rezistencija na ove lekove je rezultat mutacije u ciljnim genima (*gyrA* kod DNK giraze; *parC* kod topoizomeraze II) što posledično dovodi do gubitka afiniteta fluorohinolona za ciljno mesto. Ovaj tip rezistencije je opisan i kod *E. faecalis* i kod *E. faecium* sojeva (29,64).

Kod sojeva *E. faecium* opisan je i mehanizam efluks pumpe, dok je kod sojeva *E. faecalis* opisan mehanizam rezistencije u čijoj osnovi je produkt *qnr* gena, protein koji štiti DNK girazu od dejstva fluorohinolona tako što sa njom formira kompleks (29,64).

#### 1.8.5. Rezistencija enterokoka na linezolid

Linezolid pripada oksazolidinima i deluje u ranoj fazi sinteze proteina. Vezuje se za 23S rRNK 50S subjedinice ribozoma i na taj način sprečava vezivanje 30S rRNK i N-formil-metionil-tRNK i stvaranje inicijalnog kompleksa (29,64).

Najčešće opisan mehanizam rezistencije enterokoka na linezolid je mutacija u genu koji kodira 23S rRNK, a koji se kod enterokoka nalazi u većem broju kopija. Broj mutiranih genskih kopija zavisi od dužine ekspozicije linezolidu kao i od stepena rekombinacije između mutiranih alela i alela bez mutacije unutar enterokoknog genoma i predstavlja tzv. gensko-dožnu zavisnost, gde je stepen rezistencije na linezolid u direktnoj korelaciji sa brojem mutiranih kopija, što je pokazano i na animalnim modelima (12). Opisane su još mutacije u ribozomalnom proteinu L3 i L4, modifikacija 23SrRNK metilacijom adenina i prisustvo aktivnog transporta. Gen *cfp* koji kodira metilazu nalazi se na plazmidu ili na mobilnim genskim elementima (IS256), a opisan je i kod MDR stafilokoka. Smatra se da je prisustvo ovog gena vezano za animalne izvore jer je primećena njegova pojava kod bakterija izolovanih sa životinjskih farmi. Prisustvo *optrA* gena koji kodira ABC transporter skoro je opisano i kod *E. faecalis* i *E. faecium* sojeva izolovanih iz humanih i animalnih izvora (23,29,30).

#### 1.8.6. Rezistencija enterokoka na tigeciklin

Tigeciklin je pripada glicilciklinima, a svoje dejstvo ostvaruje vezivanjem za 16S rRNK 30S subjedinice ribozoma i na taj način blokira ulazak aminoacil tRNK na mesto A u ribozomu.

Iako tetraciklini i tigeciklin imaju ista vezna mesta, tigeciklin izbegava tetraciklinsku rezistenciju (efluks pumpa i ribozomalni zaštitni proteini, eng. RPP-Ribosomal Protection Proteins). Rezistencija na tigeciklin je opisana i kod *E. faecalis* i kod *E. faecium* sojeva. U osnovi rezistencije je mutacija S10 proteina koji je deo 30S subjedinice ribozoma (23,29,30)

### 1.9. Pojava vankomicin-rezistentog *Enterococcus* spp. (VRE) soja

Pojava VRE soja je bilo veliko iznenađenje u medicinskim i naučnim krugovima s obzirom da se vankomicin preko 30 godina koristio u kliničkoj praksi.

Prvi slučaj VRE je zabeležen krajem 1986. godine, u bolnici u Velikoj Britaniji od strane Uttley i saradnika (5). Pojava VRE je dovela do razvoja VRE bolničke infekcije među 22 pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom. VRE je izolovan iz različitih uzoraka (krv, urin, peritonealna i pleuralna tečnost, žuč), a većina izolata je pripadala vrsti *E. faecium*, mada su bili prisutni i izolati *E. faecalis* (5).

Godinu dana kasnije, VRE se pojavio i u bolnici u Francuskoj kod dva pacijenta lečena na odeljenju hematologije (6). Iz stolice ovih pacijenata izolovan je vankomicin-rezistentni *E. faecium* (VRE<sub>fm</sub>), a ispitivanja ovih izolata od strane Leclercq i saradnika pokazala su da se radi o rezistenciji koja je posredovana plazmidima (6).

Vrlo brzo nakon pojave VRE u Velikoj Britaniji i Francuskoj, VRE se pojavio i u bolnici u Njujorku. Do 1991. godine broj bolnica u Njujorku u kojima je registrovan VRE je od jedne porastao na 38 (7). VRE epidemije su prvo zabeležene u bolnicama u SAD tokom devedesetih godina prošlog veka, da bi se posle 2000-tih godina VRE epidemije pojavile u Evropi, a zatim i u ostalim delovima sveta (42).

Prvi slučaj VRE u Srbiji zabeležen je 2002. godine, na odeljenju kardiohirurgije, u Kliničkom Centru Srbije (KSC). Radilo se o vankomicin-rezistentnom *E. faecalis* (VRE<sub>fs</sub>) izolatu *vanA* genotipa, koji je izolovan iz brisa rane uzetog nakon aortobifemoralne operacije (69).

### 1.9.1. VRE u Evropi - uloga avoparcina

U potrazi za izvorom VRE rezistencije, u Evropi je primećen visok procenat kolonizacije VRE<sub>fm</sub> sojevima među vanbolničkom populacijom. VRE izolati su pronađeni u mesu i stajnicima na farmama koje su koristile glikopeptid avoparcin kao promotor rasta (70,71).

Avoparcin je glikopeptid koji je bio odobren samo za animalnu upotrebu. Smatra se da je njegova primena na animalnim farmama dovela do selekcije enterokoknih sojeva koji su nosili gene rezistencije na vankomicin, a koji se na enterokoke preneo putem horizontalnog genskog transfera sa drugih mikroorganizama u crevima životinja. Zatim se VRE, putem lanca ishrane ili direktnim kontaktom sa životinjama preneo na zdrave ljude, što je rezultiralo stvaranjem velikog rezervoara gena rezistencije na vankomicin u opštoj populaciji (42,71,72).

Nakon ovog otkrića, avoparcin je 1997. godine zabranjen za korišćenje u agrokulturi u EU (70). Zabrana avoparcina je dovela do značajnog snižavanja VRE izolata kod pilića u Danskoj, kod pilića i svinja u Francuskoj ali i u drugom zemljama Evrope (42). U Švedskoj, gde je upotreba avoparcina ukinuta još 1986. godine, VRE od 1995. godine može da se izoluju samo kod pojedinih hospitalizovanih pacijenata. Situacija u Evropi je delovala ohrabrujuće s obzirom da je registrovano samo nekoliko manjih VRE epidemija i to kod pacijenata pod rizikom, u jedinicama intenzivnog lečenja, transplantacije, hematologije i dijalize, a prevalencija VRE kolonizacije među bolničkim pacijentima je i dalje ostala niska (72). Međutim, početkom 2000-tih godine u nekoliko evropskih zemalja (Irska, Grčka, Nemačka) zabeležen je dramatičan skok bolničkih invazivnih VRE<sub>fm</sub> izolata. Ono što je bilo neobično je da VRE genotipovi koji su se selektovali na životinjskim farmama nisu bili glavni tipovi koji su uzrokovali bolničke infekcije. VRE izolati sa animalnih farmi su bili ampicilin-osetljivi, dok su VRE izolati izolovani u bolnicama bili ampicilin-rezistentni.

### 1.9.2. VRE u SAD - uloga vankomicina

Za razliku od Evrope, avoparcin u SAD nikad nije bio legalno odobren za korišćenje u veterinarskoj upotrebi. Međutim, u SAD je krajem osamdesetih i početkom devedesetih godina prošlog veka, uporedo sa širenjem VRE u bolnicama, zabeležena i povećana potrošnja vankomicina za parenteralnu i oralnu upotrebu koji se koristio u terapiji infekcija izazvanih MRSA i *C. difficile* sojevima u bolničkim uslovima. Izolovani VRE sojevi su bili *E. faecium*, dominantno VanA, rezistentni na ampicilin i na visoke doze aminoglikozida. U odnosu na evropski model nastanka i širenja VRE rezistencije, VRE nikad nije bio pronađen u vanbolničkoj populaciji niti na životinjskim farmama (42,72).

### 1.9.3. Šta je sve prethodilo nastanku VRE?

Nastanak dobro adaptiranog bolničkog *E. faecium* rezistentnog na vankomicin soja predstavlja jednu od paradigmi u evoluciji nastanka multiple antimikrobne rezistencije. Naime, osamdesetih godina prošlog veka se pojavio *E. faecalis* soj rezistentan na visoke doze gentamicina. Ubrzo je zabeležen i *E. faecalis* penicilaza-produkujući soj rezistentan na visoke doze gentamicina. S obzirom da stafilokok i enterokok dele „pool“ gena rezistencije (na makrolide, gentamicin, hloramfenikol) nije bila iznenađujuća pojava penicilaza-produkujućih *E. faecalis* sojeva. Ono što je bilo iznenađujuće je odsustvo diseminacije ovih sojeva i njihovo iščezavanje (42).

Ključni korak u nastanku VRE u bolnicama je pojava visoko rezistentnog *E. faecium* soja na ampicilin (MIK >128 µg/mL) nekoliko godina kasnije, u čijoj osnovi je mutacija u *pbp5* genu (42,72). Primećeno je da visoko rezistentni sojevi eksprimiraju još viši stepen rezistencije prema cefalosporinima (MIK >10 000 µg/mL) (72,73). Rice i sar. su pokazali na animalnom modelu da su upravo cefalosporini ti koji su imali ekstremno selektivan efekat na VRE. Tako na primer, koncentracija cefalosporina od 5000g/mL koju je moguće postići u žuči, eliminiše sve bakterijske vrste sem VRE. Nasuprot tome, primena piperacina (i do 1000 g/mL) ne dovodi do nastanka visokih vrednosti MIK kod VRE (256–1024 g/mL). Na osnovu navedenog, možemo smatrati da administracija piperacilina može imati protektivni efekat na VRE kolonizaciju, dok primena cefalosporina dovodi do selekcije VRE (73). Zapravo, može se zaključiti da se na terenu *E. faecium* soja rezistentnog na ampicilin pojavio vankomicin-rezistentni *E. faecium* (42). Nadalje, isti naučnici (74) su pokazali na animalnom modelu, da primena antimikrobnih lekova sa dejstvom na anaerobe podstiče perzistenciju VRE kolonizacije tako što eliminiše bakterijske vrste koje su u kompeticiji sa enterokokom za kolonizaciju digestivnog trakta. Antimikrobni lekovi sa dejstvom na anaerobe (metronidazole, ampicilin-sulbaktam, piperacilin-tazobaktam, tikarcilin-klavulanska kiselina, klindamicin) su značajni za pospešivanje masovne VRE kolonizacije kod pacijenata koji su prethodno bili kolonizovani sa VRE (74). Brojne studije su takođe pokazale povezanost između upotrebe cefalosporina i antimikrobnih lekova sa dejstvom na anaerobne mikroorganizme sa VRE kolonizacijom i infekcijom (75–78).

U Evropi je rezistencija *E. faecium* na vankomicin nastala kod sojeva osetljivih na ampicilin kasnije okarakterisanih kao pripadnici *E. faecium* genogrupe koja vodi poreklo od vanbolničke populacije. Međutim, među bolničkim sojevima u Evropi prisutan je sličan obrazac kao u SAD - pojava rezistencije prvo na ampicilin, a zatim na vankomicin. Rezistencija na ampicilin je nastala pod selektivnim pritiskom dva antimikrobna leka - imipenema i ciprofloksacina koji su počeli da se primenjuju u terapiji enterokoknog endokarditisa (s obzirom na gubitak sinergizma sa beta-laktamima zbog rezistencije na visoke doze aminoglikozida). U prvom koraku je nastao ampicilin-rezistentni *E.*



*faecium* rezistentan na ciprofloksacin. U drugom koraku, zbog upotrebe vankomicina kao poslednjeg vida terapije, došlo je do selekcije MDR vankomicin-rezistentnog *E. faecium* soja (66) koji pripada CC17 genskoj liniji koji je bio rezistentan na sve do tada postojeće antimikrobne lekove (glikopeptide, beta-laktame, florohinolone). Iako su upotrebu kao novi lekovi ubzo ušli linezolid i daptomicin, vrlo brzo je zabeležena rezistencija i prema njima i pojava manjih epidemija (42).

Pojava MDR *Efm* CC17 klon je dovela do promene u odnosima između vrsta enterokoka kao uzročnika bolničkih infekcija. Na primer, do sredine devedesetih godina u SAD je 90-95% svih kliničkih izolata činio *E. faecalis*, da bi se sa povećanom upotrebom vankomicina ovaj odnos promenio i najčešći uzročnik bolničkih infekcija je postao vankomicin-rezistentni *E. faecium*. Ova promena odnosa nije samo karakteristična za SAD, već je zabeležena i u drugim delovima sveta (23,42).

### 1.10. VRE kolonizacija

Kada se razmatra odnos između čoveka i mikroorganizma, nakon što mikroorganizam koji je sposoban da izazove bolest stupi u kontakt sa domaćinom, moguća su tri scenarija: kolonizacija, infekcija i oboljenje (1).

Kolonizacija je definisana kao prisustvo, rast i umnožavanje mikroorganizma pri čemu imunski sistem domaćina ne odgovara na prisustvo mikroorganizma i nisu prisutni znaci i simptomi bolesti. Kada imunski sistem domaćina odgovori na prisustvo mikroorganizma (produkcijom antitela i/ili aktivacijom celularnog imunskog odgovora) nastaje infekcija, koja je najčešće praćena kliničkim znacima i simptomima bolesti usled oštećenja tkiva, odnosno nastaje oboljenje. U slučaju da je odbrana domaćina efikasna, infekcija može proći bez simptoma – asimptomatska infekcija (1,79).

#### 1.10.1. Uloga selektivnog pritiska antibiotika

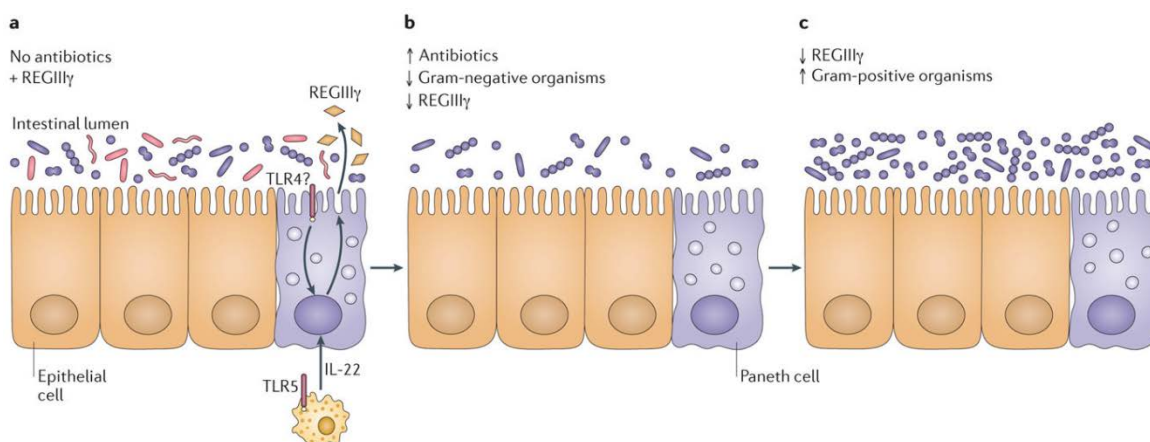
Sa pojavom VRE, počela su i detaljnija istraživanja koja su se bavila proučavanjem kolonizacije digestivnog trakta od strane VRE. Na animalnim modelima je pokazano da primena metronidazola, neomicina i vankomicina doprinosi VRE kolonizaciji, da kolonizacija može da traje od nekoliko meseci do više godina od prekida primene antimikrobnih lekova, da je koža pacijenta koji nose VRE u digestivnom traktu obično kolonizovana istim patogenom, ali i da se pri davanju oralnih glikopeptida ili antibiotika sa dejstvom na anaerobe povećava broj VRE u digestivnom traktu (21,23).

Mehanizam odbrane digestivnog trakta od VRE kolonizacije uključuje intaktnu mukozu, očuvanu sekreciju i peristaltiku, prisutan imunoglobulin A, adekvatan pH želuca, duodenuma i jejunuma, i intestinalnu mikrobiotu koju karakteriše fenomen „otpora kolonizaciji“ (eng. colonization resistance), koji podrazumeva aktivno uklanjanje egzogenih patogena iz creva pomoću različitih molekula od koji su najbolje proučeni antimikrobnih peptidi (defenzini, kripridini, lektini), a koje predominantno obezbeđuju anaerobne bakterije (*Clostridioides* spp., *Bacteroides* spp.) (21).

Sa aspekta evolucije, pojava gena rezistencije predstavlja mehanizam adaptacije bakterija jedne ekološke niše (npr. digestivnog trakta) na selektivni pritisak antibiotika, a diseminacija gena rezistencije koja se odvija putem horizontalnog genskog transfera predstavlja mehanizam kojim se povećava verovatnoća preživljavanja bakterija u nepovoljnim uslovima.







Slika 13. Efekat primene antimikrobnih lekova na mikrobiotu gastrointestinalnog trakta i pojava VRE. Preuzeto iz Arias, 2013

Kod imunokompromitovanih osoba može doći do translokacije VRE kroz mukoznu barijeru u krvni i limfni sistem i nastanka sistemske infekcije. Takođe, perzistentna masovna kolonizacija dovodi do izlučivanja VRE u spoljašnju sredinu, transmisije u bolničkim uslovima i pojave potencijalne epidemije. Dakle, potrebne su tri faze da bi došlo do infekcije: kolonizacija VRE, masovna kolonizacija i translokacija kroz mukozu. Istraživanja su pokazala da je kod životinja koje su lečene antimikrobnim lekovima, a kod kojih je primenjen TLR4 agonista LPS ili agonista TLR5 flagelina, došlo do ponovne ekspresije REGIII $\gamma$  lektina, koji je smanjio broj VRE u crevima miševa (4,21,23).

Navedena saznanja su dovele do pitanja da li je opravdano vršiti dekolonizacija kao meru prevencije transmisije s obzirom da vrlo brzo dolazi do rekolonizacije. Ubeda i sar. (82) su na animalnim modelima primetili da je posle postupka fekalne transplantacije kod miševa koji su bili masovno kolonizovani sa VRE došlo do znatnog smanjenja njegovog broja. Pokazali su i da obligatno anaerobni komensali koji pripadaju rodu *Barnesiella* imaju značajnu ulogu u obesključavanju od VRE. Takođe, pokazali su da kod pacijenata koji podležu alogenoj transplantaciji koštane srži, kolonizacija digestivnog trakta sojevima iz roda *Barnesiella* dovodi do stvaranja intestinalne otpornosti prema VRE dominaciji i posledičnoj VRE bakterijemiji.

### 1.10.2. Uloga okruženja

Kolonizacija digestivnog trakta osetljivog domaćina VRE sojevima u bolničkoj sredini najčešće se dešava u kao posledica unakrsne transmisije u toku postupaka nege i terapije, a u uslovima kada u bolničkoj sredini postoji visok „pritisak kolonizacije“ (72,83,84) (definisan kao broj pacijenata na odeljenju koji su prethodno kolonizovani sa VRE) (84). Verovatnoća unakrsne transmisije je određena prevalencijom kolonizacije, ali i odnosom između broja pacijenata i brojem medicinskog osoblja na odeljenju. Naime, preveliki broj pacijenata i premalo osoblja dovešće do povećanja broja kontakata koje pojedinačni medicinski radnik ostvaruje sa pacijentom što povećava verovatnoću za nastanak VRE transmisije (75). Ako se povećanom broju kontakata pridoda pritisak kolonizacije uz činjenicu da se rizik za kolonizaciju povećava 1,4 puta sa povećanjem kolonizacije od 10%, jasno je da lako dolazi do unakrsne tansmisije VRE među pacijentima. Bonten i sar. su pokazali da u slučaju kada je pritisak

kolonizacije viši od 50% drugi faktori, kao primena cefalosporina 3. generacije, vankomicina i enteralna ishrana, nemaju uticaja (84).

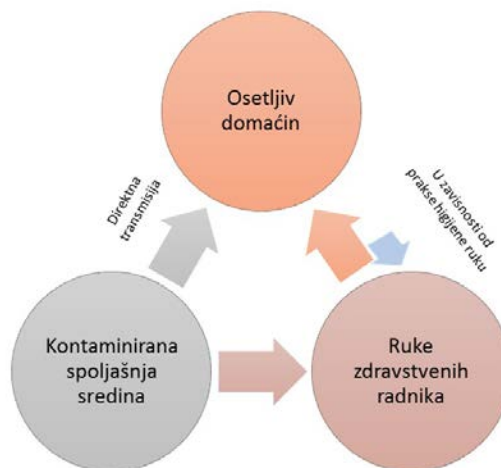
Specifičnost VRE sojeva je što imaju karakteristike različitih bolničkih patogena: sposobnost perzistentne kolonizacije digestivnog trakta, kao Gram-negativne bakterije; sposobnost kolonizacije kože, kao *S. aureus*; sposobnost kontaminacije okoline, kao *C. difficile* (72). Izvanredna sposobnost VRE da se adaptira na različite uslove spoljašnje sredine ogleda se u sposobnosti da dugo opstane na rukama i uniformi medicinskog osoblja, ali i na medicinskoj opremi i priboru. Istraživanja su pokazala da su ruke osoblja primarni način VRE transmisije u bolnici (85,86) i da tranzitorna kolonizacija ruku medicinskog osoblja može trajati i do 60 minuta (86). Preko kontaminiranih ruku može doći npr. do kontaminacije intravenskog katetera i/ili urinarnog katetera i nastanka infekcije, odnosno, ruke medicinskog osoblja postaju deo puta širenje VRE sojeva između pacijenat smeštenih u različitim sobama i odeljenjima (47). Lična higijena medicinskog osoblja je od izuzetne važnosti, naročito praksa pranja i dezinfekcije ruku i menjanja rukavica. Međutim, istraživanja su pokazala da je primena prakse pranja ruku dosta niska i da se kreće od 30 do 60% (87). S obzirom da VRE može da opstane i do četiri meseca na neživim predmetima (86) u odsustvu neadekvatne prakse čišćenja i dezinfekcije u bolnici, različita medicinska oprema i pribor, kao npr. manžetna merača pritiska, stetoskop, termometar, kvake, ormarići pored kreveta, drške od kreveta, toalet mogu postati VRE rezervoari (Slika 14) (21,72,88). Takođe, istraživanja su pokazala da prijem pacijenta u sobu u kojoj je prethodno boravio pacijent sa VRE infekcijom povećava rizik za kolonizaciju za 4,4 puta (89).

Da bi došlo do nastanka VRE kolonizacije potrebno je da osetljiv domaćin bude izložen VRE sojevima. U pogledu izloženosti VRE sojevima, najznačajniji faktori su blizak kontakt sa rezervoarom i dužina trajanje kontakta (83).

Direktni kontakt sa predmetima se smatra najverovatnijim putem nastanka kolonizacije digestivnog trakta pacijenata kod kojih je zbog korišćenja antibiotika širokog spekta i selektivnog pritiska antibiotika tzv. otpor kolonizacije snižen. U tim uslovima, VRE postaje deo endogene flore i izvor infekcije (21). VRE kolonizacija digestivnog trakta može trajati dugo (više meseci i godina) (21,23) i predstavljati glavni rezervoar za širenje VRE u bolničkoj sredini i nastanak bolničke infekcije. Kolonizacija prethodi infekciji i procenjuje se da je odnos kolonizacije i infekcije 10:1 (21,85). Da li će se infekcija razviti zavisi od imunološkog statusa domaćina (83).

Osetljivim domaćinima mogu se smatrati pacijenti koji su pod visokim rizikom za VRE kolonizaciju - teško bolesni i imunokompromitovani pacijenti, na dugotrajnoj terapiji antimikrobnim lekovima, posebno vankomicinu, cefalosporinima 3. generacije i antimikrobnim lekovima sa dejstvom na anaerobe (21). Prethodne studije su izdvojile odeljenja kao mesta rizika za kolonizaciju VRE sojevima. To su odeljenja hematologije, onkologije, nefrologije i hemodijalize, gerijatrije, jedinice intenzivnog lečenja, jedinice za transplantaciju jetre i koštane srži, odeljenja za opekotine, za neonatologiju i akutne infektivne bolesti (21,47,83,90–95). Takođe, pokazano je da je kolonizacija veća u univerzitetskim bolnicama čiji posteljni kapacitet prelazi 500 postelja (96). U različitim istraživanjima izdvojeni su faktori rizika za VRE kolonizaciju kao što su starost pacijenta, primena antimikrobne terapije, dužina bolničkog lečenja, broj prethodnih bolničkih lečenja, boravak u jedinici intenzivnog lečenja, dijagnostičko-terapijske procedure, hirurška intervencija, neutropenija i komorbiditeti (npr. *diabetes mellitus*) (21,47,90).

Od strane patogena, značajnim faktorom koji dovodi do nastanka bolničke epidemije smatra se prisustvo *esp* gena koji nosi informaciju za sintezu enterokoknog površinskog proteina koji ima ulogu u adherenciji za epitelne ćelije. Došlo se do zaključka da postoje posebne genogrupe koje su prouzrokovale bolničkih infekcija, sporadičnih ili sa epidemijom širenjem. Ove genske linije su dobro adaptirane na bolničke uslove zato što poseduju *esp* gen i transpozon sa *van* genom.



Slika 14. Najčešći način prenosa VRE iz okruženja na osetljivog domaćina. Modifikovano iz Kramer i sar., 2006.

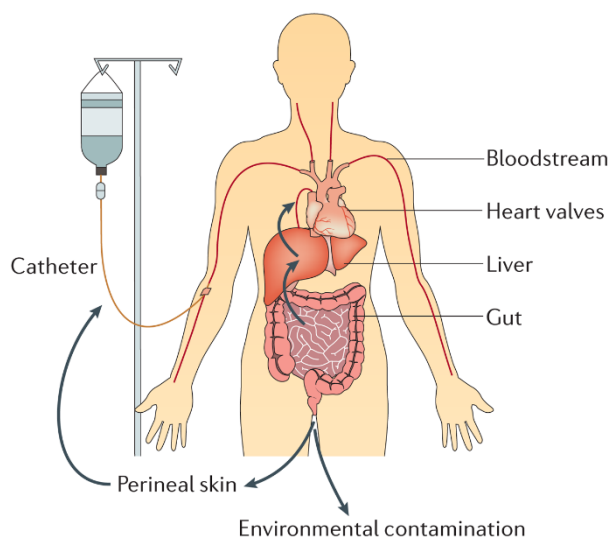
### 1.11. VRE infekcija

VRE infekcija najčešće nastaje kod pacijenata čiji je digestivni trakt prethodno kolonizovan VRE sojevima. Kolonizacija najčešće nastaje oralnim unosom male količine VRE sa kontaminiranih površina iz neposrednog bolničkog okruženja (27). VRE zatim prolazi kroz želudac i tanko crevo i dospeva u debelo crevo gde se zbog smanjene kompeticije usled selektivnog pritiska antibiotika lako umnožava. Prisustvo visokih koncentracija VRE u digestivnom traktu omogućava lakšu diseminaciju u spoljašnju sredinu, kontaminaciju neposrednog pacijentovog okruženja i ponavljanje celog ciklusa (20,27).

Rizik od razvoja VRE infekcije je vrlo verovatno direktno proporcionalna broju VRE u digestivnom traktu, odnosno veća kolonizacija predstavlja veći rizik od infekcije (27). Iz digestivnog trakta VRE translokacijom kroz zid creva (koji je često inflamiran tokom hemoterapije) može dospeti u krvotok i prouzrokovati endokarditis. Takođe, iz digestivnog trakta VRE može dospeti na kožu, koja predstavlja glavni put nastanka urinarnih infekcija, infekcije povezane sa prisustvom intravenskih katetera i infekcije rane (hirurške, dekubitusi) ili u spoljašnju sredinu, što može rezultirati kolonizacijom drugih pacijenata i/ili predmeta (Slika 15) (23).

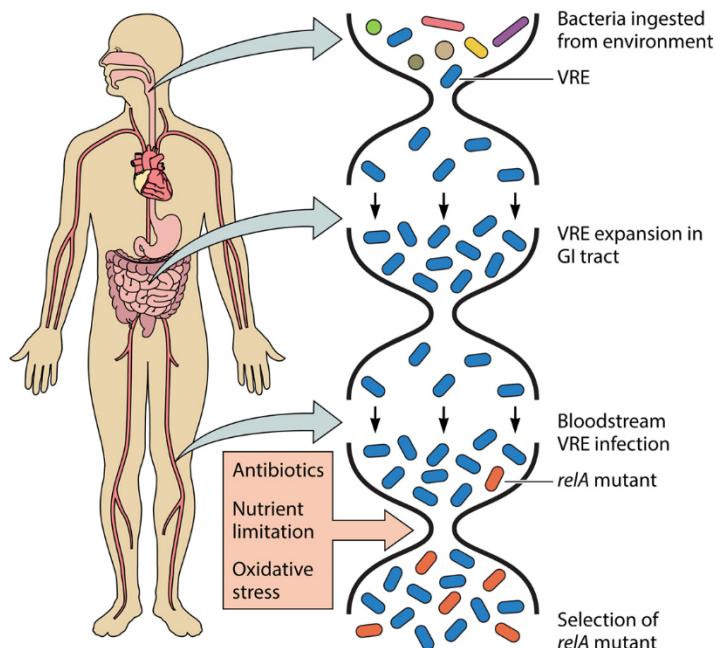
VRE su uzročnici bakterijemije, endokarditisa, intraabdominalnog i pelvičnog apscesa (mešane infekcije), infekcije mekih tkiva, peritonitisa (kod pacijenata na peritonealnoj dijalizi), infekcije urinarnog trakta. Retko, mogu biti prouzrokovani meningitisa, osteomijelitisa, septičnog artritisa i

pneumonije (dokumentovano nekoliko slučajeva) (21). Bakterijemija i endokarditis su najčešće kliničke manifestacije enterokokne infekcije. Bakterijemija je povezana sa infekcijom urinarnog trakta, intaabdominalnim i pelvičnim apscesom, prisustvom centralne venske linije i infekcije mekih tkiva (21). Kao faktori rizika za razvoj enterokokne bakterijemije navode se hemodijaliza, malignitet, starost, dijabetes melitus, kardiovaskularne bolesti, transplantacija organa, hirurška intervencija, urinarni i intavaskularni kateter, neutropenija (21,47,83,91–95). Podaci o smrtnom ishodu kod pacijenata sa bakterijemijom variraju u zavisnosti od populacije. Istraživanja su pokazala da se smrtni ishod javlja u 26-46% enterokokne bakterijemije, dok je kod pacijenata u riziku ovaj procenat i do 75%. Smrtni ishod se češće javlja kod bakterijemije uzorkovane *E. faecium* nego bakterijemije uzrokovane *E. faecalis* sojevima (21,83). Zbog pojave MDR VRE, najveći problem je adekvatna terapija.



Slika 15. Glavni putevi nastanka infekcije i širenja enterokoka iz digestivnog trakta. Preuzeto iz Arias, 2013.

Honsa i sar. (97) su sekvencirali 22 uzastopna VRE $_{fm}$  izolata koji vode poreklo od istog domaćina–novorođenčeta starosti šest nedelja kod kojeg je utvrđena akutna mijeloidna leukemija i kod koga je, uprkos adekvatno primenjenoj antimikrobnoj terapiji, bakterijemija trajala 26 dana. Kod 8 od 22 izolata identifikovana je mutacija (L152F) u *relA* genu koja je nastala u toku infekcije i koja je dovela do konstitutivne aktivacije stres-indikovanog odgovora i povećanja osnovnog nivoa guanozin tetrafosfata (ppGpp), signalnog molekula ili alarmona. Ovi molekuli su modulatori transkripcije i u nepovoljnim sredinskim uslovima usporavaju metabolizam i omogućavaju toleranciju na antimikrobne lekove bez povećanja MIK vrednosti. Ovaj mutant je pokazao osetljivost na daptomicin i linezolid tokom planktonskog rasta, međutim, pokazao je toleranciju na visoke doze antimikrobnih lekova kada raste u biofilmu. Samo je eksperimentalni antimikrobni lek koji aktivira ClpP aktivnost uspeo da ispolji baktericidno dejstvo prema mutantu u formiranom biofilmu.



Slika 14. Pojednostavljeni model VRE populacije tokom kolonizacije, infekcije i selekcije *relA* mutanata kod imunokompromitovanog pacijenta. Preuzeto iz Van Tyne i sar., 2017.

Autori zaključuju (97) da nastanak *relA* mutacije u toku perzistentne VRE bakterijemije i aktivacija stres-indukovanog odgovora i posledična tolerancija na antimikrobne lekove predstavlja novi način VRE sojeva da zaobuđu nepovoljno okruženja kod imunokompromitovanih pacijenata (visoke koncentracije antimikrobnih lekova, ograničene količine nutrijenata u krvi i oksidativni stres od npr. strane tkivnih makrofaga) (Slika 16) (27).

### 1.12. Prevalencija invazivnih VRE izolata u Evropi

Prevalencija invazivnih VRE izolata u Evropi je različita i prema poslednjim dostupnim podacima Evropskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti (eng. European Centre for Disease Control and Prevention, ECDC) za 2019. godinu, kreće se od 0% -50% (98,99).

Procenat invazivnih VRE<sub>fs</sub> izolata je nizak u skoro svim zemljama članicama EU i izuzev Letonije (8,1%) i Litvanije (5,6%) i ne prelazi 2,7% (98,99).

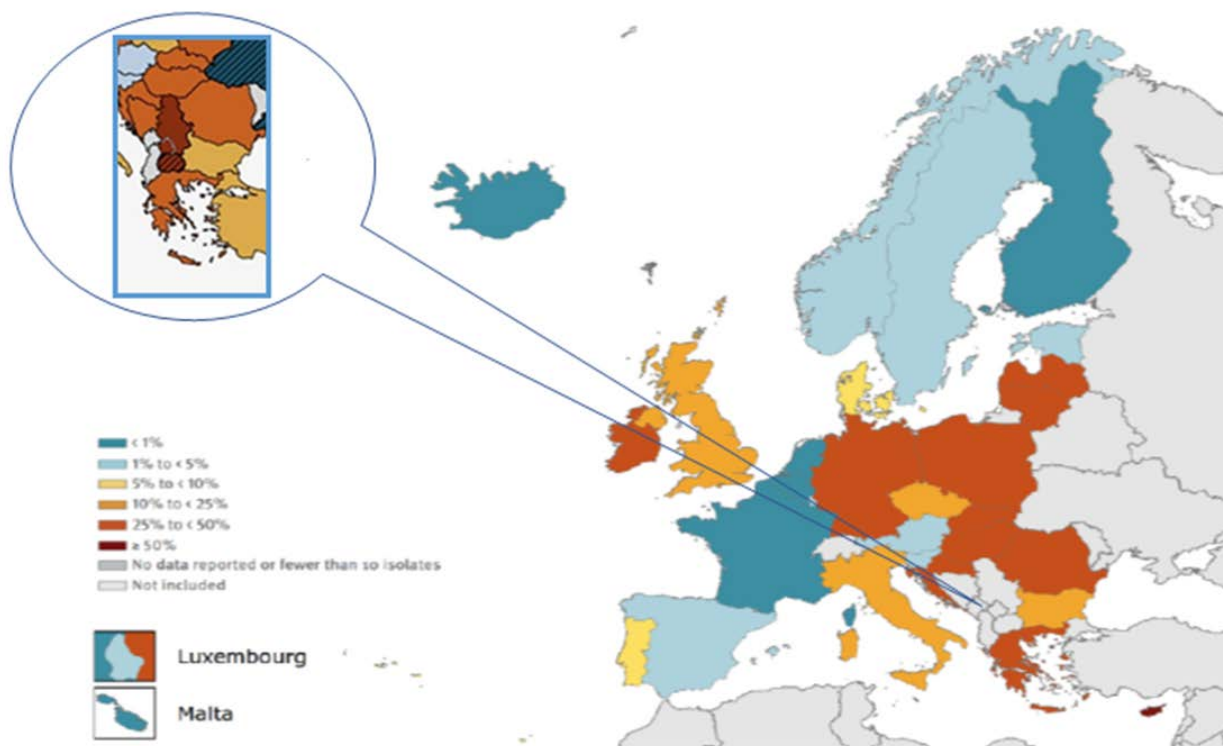
Procenat invazivnih VRE<sub>fm</sub> izolata je samo u Belgiji, Holandiji i Francuskoj manji od 1%, u šest zemalja članica EU ovaj procenat je manji od 5% dok je u trećini zemalja taj procenat preko 25%, od kojih se izdvajaju Kipar sa 50%, Grčka sa 47% i Poljska sa 44%. Invazivni VRE<sub>fm</sub> izolati nisu registrovani (0%) u 3 zemlje - u Finskoj, na Islandu i Malti (Slika 17) (98,99).

Ako se posmatraju zemlje u regionu (bivše jugoslovenske republike, Grčka, Mađarska, Rumunija, Bugarska), procenat invazivnih VRE<sub>fs</sub> izolata je nizak kao i u zemljama EU. Najviša vrednost



je 1,6%, koliko je zabeleženo u Hrvatskoj. U Grčkoj ovaj procenat iznos 1,4%, u Mađarskoj i Rumuniji su vrednosti manje od 1%, dok u drugim zemljama invazivni VRE<sub>fs</sub> izolati nisu detektovani (99,100).

Procenat invazivnih VRE<sub>fm</sub> izolata u zemljama u regionu se kreće od 12,1% koliko je zabeleženo u Bugarskoj do 64% koliko je zabeleženo u Severnoj Makedoniji. Osim Bugarske (12,1%) i Hrvatske (25,7%) vrednosti invazivnih VRE<sub>fm</sub> izolata su u ostalim zemljama su preko 35%, i to: u Mađarskoj 35,9%, Rumuniji 35,7%, Bosni i Hercegovini 38%, Grčkoj 47% i Crnoj Gori 50% (Slika 17) (99,100).



Slika 17. Učestalost invazivnih *E. faecium* izolata rezistentnih na vankomicin u Evropi za 2019. godinu. Modifikovano iz Izveštaja nadzora nad antimikrobnom rezistencijom za Evropu EARS-Net i Izveštaja nadzora nad antimikrobnom rezistencijom za centralnu Aziju i Evropu (CAESAR).

### 1.13. Prevalencija invazivnih VRE izolata u Srbiji

Prema podacima CAESAR (eng. Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance) mreže za 2019. godinu, u Srbiji je procenat invazivnih VRE<sub>fs</sub> izolata 6%, dok je procenat invazivnih VRE<sub>fm</sub> izolata 60% (100). Poslednjih 6 godina praćenja, procenat invazivnih VRE<sub>fs</sub> se u Srbiji kretao između 2% (2015. godine) i 10% (2017. godine), a srednja vrednost iznosi 6,8%. Procenat invazivnih VRE<sub>fm</sub> izolata u istom periodu posmatranja se kretao između 35% (2016. godine) i 75% (2014. godine), a srednja vrednost iznosi 55,2% (100). Ovako visoki procenti invazivni VRE izolata su zabrinjavajući i mogu da budu odraz prisustva intrahospitalne infekcije i diseminacije dobro adaptiranog bolničkog klona (100).

### 1.14. Prevalencija VRE kolonizacije

Prema prethodnim istraživanjima, VRE kolonizacija među bolničkim pacijentima varira u Evropi od 1,5% koji je zabeležen u Holandiji (101), preko 19% koliko je zabeleženo u nekim delovima Grčke (102) do 31% u Irskoj (103) i 37% u nekim delovima Francuske (104).

### 1.15. Uloga mikrobiološke laboratorije u nadzoru nad VRE transmisijom

Smernice za prevenciju širenja VRE u bolnicama koje su dale i Stručna komisija za kontrolu i prevenciju zaraznih bolesti u Atlanti (eng. Healthcare Infection Control Practice Advisory Committee, HICPAC) (18) i SHEA (105) uključuju kontrolu upotrebe antimikrobnih lekova sa naglaskom na vankomicin, kohortnu izolaciju pacijenata sa VRE infekcijom/kolonizacijom, edukaciju medicinskog osoblja o značaju higijene ruku, upotrebi lične zaštitne opreme (rukavice, mantili) i temeljnog čišćenja i dezinfekcije bolesničkih soba, ali i aktivan skrining visokorizičnih pacijenata na prisustvo VRE kolonizacije i dobru mikrobiološku praksu. Mere imaju za cilj smanjenje VRE transmisije među pacijentima u bolnici i potrebno ih je uskladiti sa prevalencijom VRE sojeva u pojedinačnoj ustanovi (21).

Zadatak mikrobiološke laboratorije je da obezbediti promptnu i tačnu identifikaciju enterokoka i ispita osetljivost izolata na antimikrobne lekove, što predstavlja početnu tačku za uspostavljanje tačne dijagnoze, primenu odgovarajuće terapije i primenu mera prevencije (21).

Prilikom testiranja pacijenata na prisustvo VRE neophodno je obezbediti optimalni uzorak koji će biti uzet sa pravog mesta, na pravi način i u dovoljnoj količini. Prema HICPAC smernicama za skrining na VRE može da se koristi feces ili rektalni bris (18).

Za izolaciju VRE se može koristiti klasičan metod koji se koristi u mnogim laboratorijama a koji podrazumeva upotrebu žuč eskulin ili žuč eskulin azid agara sa dodatkom vankomicina (BEAV). Takođe, mogu se koristiti hromogene hranljive podloge nove generacije za koje je pokazano da imaju veću senzitivnost u poređenju sa BEAV (47,90).

Identifikacija do nivoa vrste se može izvršiti na osnovu fiziološko-biohemijskih osobina, korišćenjem komercijalnih kitova (npr. Api sistem), automatizovanih sistema (npr. Phoenix, Vitek 2, MALDI-TOF MS) ili reakcijom lančanog umnožavanja (eng. Polymerase chain reaction, PCR) za vrsno-specifične gene. Za detekciju rezistencije na glikopeptidne antimikrobne lekove mogu se koristiti disk difuzioni ili dilucioni metod, automatizovani sistemi i PCR za *van* gene koji predstavlja zlatni standard (1,15,16).

Molekularnim metodama za genotipizaciju, kao što je MLVA (eng. Multiple-locus Variable-number tandem repeat analysis) tipizacija, a koje sve više uzimaju primat u molekularnoj epidemiologiji u svetu, moguće je izvršiti molekularno genetičku karakterizaciju sojeva u cilju sagledavanja njihove filogenetske strukture i dinamike transmisije. Na taj način moguće je otkriti međusobnu povezanost VRE izolata, utvrditi da li se radi o klonalnom širenju ili genskom transferu, odnosno utvrditi dominantni put transmisije VRE sojeva, i izdvojiti pojedine genogrupe/klonalne komplekse, koji se vezuju za nastanak bolničke infekcije. Takođe, moguće je odrediti stadijum širenja VRE kolonizacije u bolnicama prema Haydenu i sledstveno primeniti odgovarajuće mere za spečavanje i suzbijanje VRE u bolnicama (106–108).



## ***2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA***

---

U skladu sa podacima iznetim u uvodu, definisani su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Utvrditi učestalost fekalne kolonizacije VRE sojevima kod hospitalizovanih pacijenata na odeljenjima sa povišenim rizikom od nastanka kolonizacije.
2. Identifikovati faktore rizika za fekalnu VRE kolonizaciju.
3. Ispitati fenotipske i genotipske karakteristike izolovanih VRE sojeva i utvrditi klonalnu povezanost i klonalnu diseminaciju VRE sojeva.

### **3. *MATERIJAL I METODE***

---

### 3.1. Tip studije, mesto i period istraživanja

U istraživanju kolonizacije vankomicin-rezistentnim *Enterococcus* spp. sojevima u bolničkoj sredini korišćen je analitički epidemiološki metod po tipu studije preseka.

Istraživanje je sprovedeno u periodu od 01.06.2015. do 01.07.2020. godine, u tri univerzitetske bolnice u Beogradu: KCS, Kliničko-bolničkom centru (KBC) Zemun i KBC Zvezdara.

KCS je najveća bolnica za tercijarnu zdravstvenu zaštitu u Srbiji i glavni referentni centar za susedne zemlje bivše Jugoslavije (Crna Gora, Bosna i Hercegovina). Posteljni kapacitet KCS broji preko 3000 kreveta, a godišnje se u ovoj ustanovi zbrine preko milion pacijenata.

KBC Zvezdara i KBC Zemun, sa oko 800, odnosno sa oko 650 kreveta, dve su najveće tercijarne bolnice u Beogradu i obezbeđuju širok spektar medicinskih specijalnosti.

Istraživanjem su obuhvaćena klinička odeljenja pomenutih bolnica identifikovana na osnovu literaturnih podataka (21,47,83,91–95) kao mesta sa povećanim rizikom za VRE kolonizaciju, i to:

1. Odeljenja za hemato-onkologiju;
2. Odeljenja za gerijatriju;
3. Odeljenja za hemodijalizu;
4. Odeljenja za akutne infektivne bolesti;
5. Jedinice intenzivnog lečenja (JIL).

Na navedenim kliničkim odeljenjima obavljen je postupak uzorkovanja stolice za bakteriološki pregled i prikupljanje epidemioloških podataka o pacijentima.

Laboratorijski deo istraživanja, koji je obuhvatio mikrobiološku dijagnostiku i metode molekularne biologije, obavljen je u Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u Institutu za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ i Zavodu za javno zdravlje Požarevac.

Statistička obrada podataka prikupljenih epidemiološkim upitnikom urađena je u Institutu za epidemiologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

### 3.2. Selekcija ispitanika i veličina uzorka

#### 3.2.1. Kriterijumi za uključivanje u studiju

U studiju su uključeni pacijenti oba pola, stariji od 18 godina, koji su periodu od 01.06.2015 do 01.07.2020. godine bili hospitalizovani na odeljenjima sa povećanim rizikom za nastanak VRE kolonizacije, a koji su dali informisani pristanak za učestvovanje u istraživanju posle informacija koje su dobili o istraživanju.

### 3.2.2. Kriterijumi za isključivanje iz studije

Iz istraživanja su isključeni pacijenti mlađi od 18 godina, kao i svi pacijenti koji su se posle informacija koje su dobili o istraživanju opredelili da odustanu od učestvovanja u istom.

### 3.2.3. Veličina uzorka

Veličina uzorka je dobijena korišćenjem programa za izračunavanje veličine uzorka Epi info<sup>TM</sup> 7 (CDC, SAD). Dovoljan broj jedinica posmatranja za ocenu proporcije kolonizovanih pacijanata VRE sojevima u bolničkoj populaciji iznosio je 226 jedinica posmatranja, uz pretpostavku na osnovu prethodnih istraživanja (104) da je ta proporcija 18%, sa 95% intervalom poverenja i intervalnom ocenom preciznosti od 5%.

## 3.3. Studijska populacija

Studijska populacija je obuhvatila 268 ispitanika. Svi ispitanici uključeni u istraživanje bili su detaljno upoznati sa ciljevima i svrhom istraživanja i pristupili su uzorkovanju nakon davanja pisane saglasnost.

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj: 1322/II-4).

## 3.4. Instrumenti merenja

Proces prikupljanja podataka uključivao je primenu epidemiološkog upitnika i niza laboratorijskih ispitivanja uzorkovanog materijala kao instrumente merenja.

## 3.5. Epidemiološki upitnik

Epidemiološkim upitikom, otvorenog tipa, prikupljeni su demografski, epidemiološki i klinički podaci o ispitanicima (Prilog: Epidemiološki upitnik).

Upitnik je konstituisan na osnovu literaturnih podataka o faktorima rizika za VRE kolonizaciju (21,47,83,90–95) i obuhvatio je pitanja grupisana u nekoliko celina:

1. Demografske podatke o pacijentima (ime i prezime, datum rođenja, pol, mesto boravka);
2. Podatke o osnovnoj bolesti i komorbiditetima (Međunarodna klasifikacija bolesti, MKB-10);
3. Podatke o bolničkom lečenju (datum prijema, prevod iz druge ustanove, hitan prijem, broj prethodnih bolničkih lečenja, hirurška intervencija u toku prijema);
4. Podatke o primeni antimikrobne terapije;
5. Podatke o dijagnostičko-terapijskim procedurama;
6. Ostali relevantni podaci.

Popunjavanje upitnika vršio je istraživač uvidom u istoriju bolesti ispitanika.

### 3.6. Laboratorijska ispitivanja

Laboratorijska ispitivanja uzorkovanog materijala obuhvatila su mikrobiološku dijagnostiku, metode molekularne biologije i kvantitativno ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma.

#### 3.6.1 Mikrobiološka dijagnostika

Mikrobiološka dijagnostika je obuhvatila postupke uzimanja i transporta uzorkovanog materijala za bakteriološki pregled, izolaciju i identifikaciju VRE sojeva i ispitivanje osetljivosti izolovanih VRE sojeva na antimikrobna agense.

Postupci izolacije, identifikacije i ispitivanja osetljivosti su se izvodili u komori za bezbedan rad, uz pridržavanje principa aseptičke tehnike rada i svih uputstava o korišćenju odgovarajuće lične zaštitne opreme, higijeni prostora i opreme.

Po završetku rada, infektivni material je odložen u za to namenjene žute kese/žute kantice, obeležen i transportovan na centralno mesto za dekontaminiranaciju.

##### 3.6.1.1. Uzimanje i transport uzoraka za bakteriološki pregled

Svim učesnicima ispitivanja je detaljno objašnjeno kako pravilno da uzmu uzorak stolice.

Uzorci stolice su prikupljeni od svih ispitanika uključenih u istraživanje. Za prikupljanje uzoraka koristile su se sterilne plastične bočice za koprokulturu sa kašičicom za uzorkovanje na poklopcu. Stolica se uzimala neposredno posle defekacije, u količini od 1-2 g, odnosno 3–4 kašičice formirane stolice ili 1-2 mL tečne stolice.

Svi uzorci su transportovani i obrađeni u mikrobiološkoj laboratoriji u roku od 2 sata nakon prikupljanja u skladu sa principima dobre mikrobiološke prakse.

##### 3.6.1.2. Izolacija VRE sojeva

Za izolaciju VRE sojeva iz prikupljenog materijala koristili smo selektivnu hromogenu gotovu hranljivu podlogu CHROMID®VRE (bioMerieux, Francuska) (109).

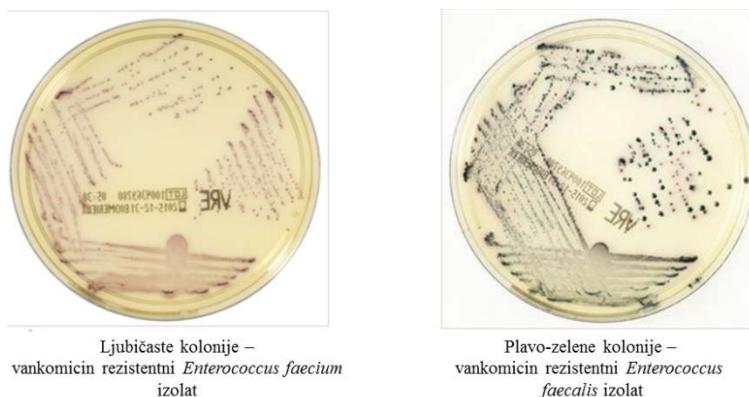
CHROMID®VRE podloga se sastoji od različitih vrsta peptona koji predstavlja izvor hranljivih supstanci i proteinskih komponenti neophodnih za rast mikroorganizama. Natrijum-hlorid održava osmotsku ravnotežu u podlozi, agar je komponenta koja obezbeđuje očvršćavanje podloge, a skrob je polisaharid koji poboljšava rast i može da apsorbuje toksične produkte metabolizma. Podloga sadrži i dva hromogena supstrata i antimikrobni agens vankomicin u koncentraciji od 8 mg/L, koji omogućavaju specifičan i selektivan rast VRE bez prethodnog preobogaćenja rasta, direktnu identifikaciju VRE sojeva sa stečenom rezistencijom na vankomicin, kao i diferencijaciju između vrsta VRE $fm$  i VRE $fs$ , na osnovu karakteristične boje kolonija (Slika 18):

-VRE $fm$ : ljubičasta boja (ciljni enzim je  $\beta$ -galaktozidaza, a supstrat indoksil-  $\beta$ -galaktozid);

-VRE<sub>fs</sub>: plavo-zelena boja (ciljni enzim je  $\alpha$ -glikozidaza; supstrat je indoksil- $\alpha$ - glikopiranozid).

Takođe, podloga sadrži i selektivnu smešu koja inhibira sojeve enterokoka koji ne ekspimiraju stečenu rezistencija na vankomicin, vrste enterokoka koje su urođeno rezistentne na vakomicin (*vanC* genotip: *E. gallinarum* i *E. casseliflavus*) i većinu Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija, kvasnice i plesni.

Materijal je sterilnim brisom (HIMEDIA, India) direktno nanet na hranljivu podlogu. Zasejane hranljive podloge su zatim prema uputstvu proizvođača inkubirane u termostatu na temperaturi  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ , u aerobnim uslovima, u periodu od 24 do 48 sati. U skladu sa uputstvom proizvođača, ljubičaste kolonije su preliminarno identifikovane kao VRE<sub>fm</sub>, a plavo-zelene kolonije kao VRE<sub>fs</sub>.



Slika 18. Porast VRE<sub>fm</sub> i VRE<sub>fs</sub> na CHROMID®VRE podlozi. Preuzeto sa <https://www.biomerieux-diagnostics.com/chromid-vre>.

### 3.6.1.3. Identifikacija izolovanih VRE sojeva i ispitivanje antimikrobne osetljivosti

Za identifikaciju do nivoa vrste i ispitivanje antimikrobne osetljivosti VRE izolata, korišćen je BD Phoenix™ automatizovani mikrobiološki sistem (BD, SAD) i paneli za Gram-pozitivne bakterije (PMIC /ID-94, BD Phoenix Gram Postitive Combo Panels, BD, SAD). BD Phoenix™ automatizovani sistem omogućava brzu *in vitro* identifikaciju (ID) i kvantitativno određivanje antimikrobne osetljivosti (AST) bakterijskih izolata na osnovu vrednosti MIK.

Phoenix panel se sastoji od ID strane, sa 51 bunara za identifikaciju izolata koji sadrže liofilizovane supstrate i AST strane, sa 85 bunara za ispitivanje antimikrobne osetljivosti koji sadrže različite antimikrobne agense u različitim koncentracijama. Oba dela sadrže i kontrolne bunare. Različiti kolorimetrijski i florometrijski indikatori se koriste za test identifikacije, dok se kolorimetrijski redoks indikator koristi za detekciju rasta u prisustvu antimikrobnog agensa. AST podloga sadrži optimalne koncentracije jona kalcijuma i jona magnezijuma koji doprinise optimizaciji performansi testa. Princip identifikacije se zasniva na sposobnosti mikroorganizama da: 1. fermentuju različite ugljene hidrate, u prisustvu rezazurina kao redoks indiktora; 2. vrši enzimsku hidrolizu hromogenog supstrata, p-nitrofenil ili p-nitroanilid derivata; 3. vrši enzimsku hidrolizu fluorogenih supstrata i oslobađanja fluorescentnog kumarinskog derivata (110).



Tri do četiri kolonije čiste kulture, preliminarno identifikovane kao VRE su, prema uputstvu proizvođača koristeći sterilni pamučni bris, resuspendovane u komercijalnoj Phoenix ID Broth tečnoj podlozi. Tuba sa ID podlogom je zatim zatvorena, a sadržaj je promešan na vorteks mešalici u trajanju od 5 s. Dalji postupak je obuhvatio izradu standardizovanog inokuluma za inokulaciju ID i AST dela Phoenix panela, za koju je proizvođač dao kriterijum od 0,5 jedinica po McFarland standardu uz dozvoljenu granicu do 0,6. Optička gustina je proverena na nefelometru (BD PhoenixSpec Nephelometer).

Nakon toga usledila je priprema Phoenix AST Broth podloge. U podlogu je dodata jedna kap komercijalnog rastvora Phoenix AST indikatora koji predstavlja indikator oksido-redukcije na bazi rezazurina ili Alamar plavog. AST podloga je pažljivo promešana inverzijom, bez vorteksiranja. Mikropipetom od 25  $\mu$ L i odgovarajućim sterilnim nastavkom, preneto je 25  $\mu$ L prethodno pripremljene bakterijske suspenzije iz ID podloge u AST podlogu. Tuba je zatvorena i pažljivo promešana inverzijom, bez vorteksiranja.

Nakon ovog postupka, usledila je inokulacija panela sa ID i AST bakterijskim suspenzijama i postavljanje panela u BD Phoenix™ sistem uz kontinuirano inkubiranje na temperaturi od 35°C i očitavanje reakcija sa panela u intervalima od 20 minuta u toku 16 časova.

Za ispitivanje čistoće ispitivanih bakterijskih suspenzija kalibrisanom ezom od 10 $\mu$ L izvršena je inokulacija KA (Torlak, Srbija). Ploče su inkubirane u termostatu na temperaturi 36  $\pm$  1°C, u aerobnim uslovima, u peridu od 18 do 24 sata.

Phoenix automatizovani sistem generiše rezultate testiranja upoređivanjem biohemijskog profila ispitivanog izolata sa bazom podataka (the Phoenix ID Database). Rezultati se prikazuju u Izveštaju (Phoenix Report Form) uz podatak o verovatnoći identifikacije i najčešće su dostupni u periodu od 8 do 12 časova. Rezultat ispitivanja antimikrobne osetljivosti se za svaki odgovarajući antimikrobni agens izražava kvantitativno kao MIK vrednost i kao kvalitativna vrednost kroz kategorije osetljivosti. Dodatno, kada BDXpert™ System detektuje rezultate koji su od kliničkog značaja, u Izveštaju će se generisati posebna poruka.

Interpretacija rezultat i kontrola kvaliteta izvršene su prema uputstvu proizvođača i u saglasnosti sa preporukama koje daje EUCAST (v10.0) (31).

#### **3.6.1.4. Dugotrajno čuvanje izolovanih VRE sojeva (zamrzavanje)**

Za dugotrajno čuvanje VRE izolata zamrzavanjem korišćena je krioprotektivna podloga - Trypton soja bujon (TSB, Torlak, Srbija) sa dodatkom glicerola (Merck, Nemačka), u finalnoj koncentraciji od 10%.

Tri do četiri kolonije VRE izolata su sterilnom ezom inokulisane u 1 ml TSB. Posle 24 časovne inkubacije i potvrđene mikroskopske čistoće, po 800 $\mu$ L bakterijske kulture je razliveno u sterilne kriotube. U svaku kriotubu je dodato po 200  $\mu$ L prethodno sterilisanog rastvora glicerola. Kriotube su obeležene nazivom i brojem i čuvane na -80 °C (Thermo Scientific Heraeus, SAD) do buduće obrade.

Pre izvođenja planiranih istraživanja VRE sojevi su subkultivisani na hranljive podloge: KA ili Columbia agar sa 5% ovčije krvi (CA, Torlak, Srbija) na 37°C tokom 24 sata.

### 3.6.2. Metode molekularne biologije

Metode molekularne biologije obuhvatile su postupke ekstrakcije bakterijske DNK, detekciju vrsno specifičnih gena, gena nosioca rezistencije na antimikrobne agense i gena koji kodiraju faktore virulencije konvencijalnom PCR metodom, kao i genotipizaciju VRE $f_{m}$  izolata MLVA metodom, baziranoj na PCR metodi.

Svi postupci su se izvodili u komori za bezbedan rad, uz pridržavanje principa aseptičke tehnike rada i svih uputstava o korišćenju odgovarajuće lične zaštitne opreme, higijeni prostora i opreme.

Po završetku rada, infektivni material je odložen u za to namenjene žute kese/žute kantice, obeležen i transportovan na centralno mesto za dekontaminiranaciju.

#### 3.6.2.1. Molekularna identifikacija VRE izolata detekcijom vrsno specifičnih gena i gena nosioca rezistencije na glikopeptidne antimikrobne lekove

Svi izolati koji su automatizovanim sistemom identifikovani kao VRE uključeni su u postupak molekularne identifikacije detekcijom vrsno specifičnih gena (*ddl<sub>E. faecium</sub>*, *ddl<sub>E. faecalis</sub>*) i gena nosioca rezistencije na glikopeptidne antimikrobne lekove (*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *van C2/C3*).

Postupak je obuhvatio DNK ekstrakciju i precipitaciju, amplifikaciju DNK primenom multipleks PCR reakcije, razdvajanje PCR amplifikona gel-elektroforezom i njihovu vizuelizaciju pomoću transiluminatora.

##### 3.6.2.1.1. DNK ekstrakcija

DNK ekstrakcija je urađena prema modifikovanom protokolu Top i sar. (50), i obuhvatila je mehaničke, enzimske, fizičke i hemijske postupke.

Iz prethodno pripremljenih zamrznutih suspenzija, VRE izolati su subkultivisani na CA i inkubirani u toku 24 sata, na temperaturi 36±1°C. Posle provere čistoće, 4-5 kolonija je inokulisano u 5 mL TSB, a nakon inkubacije (24h, 36±1 °C) i mikroskopske provere čistoće, umnožene bakterijske kulture su centrifugirane na 8000 x g, tokom 2 minuta (Megafuge<sup>TM</sup>, Thermo Fisher Scientific). Supernatant je odliven, a talog je resuspendovan u 200 Tris EDTA rastvora (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH8.0). Nakon inkubacije na 36±1°C, tokom 15 minuta, dodate su 2-3 staklene kuglice prečnika 0,1 mm. Suspenzija je mešana na vorteks mešalici tokom 1 min, nakon čega je dodato 20μL rastvora lizozima (50-mg/ml solution of egg white lysozyme, MERCK, Nemačka) i 20μL rastvora ahromosomeptidaze (10000 IU/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka). Suspenzija sa dodatim enzimima je inkubirana tokom 1 sata na temperaturi od 36±1°C, a zatim tokom 1 sata na 65°C. Usledila su 2 ciklusa „zamrzavanje-odmrzavanje“, koji su obuhvatili zamrzavanje suspenzije na -20°C, tokom 20 minuta i zagrevanje suspenzije na 80°C, tokom 7 minuta, u sušnici (Sutjeska, Srbija). Po završetku ovih koraka i dodavanja 30 μL pufera za lizu (0,25% SDS, 0,05 N NaOH) i 180 μL 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, ćelijski lizati su centrifugirani na 16 000 x g tokom 5 min (Megafuge<sup>TM</sup>, Thermo Fisher Scientific). DNK koja se nalazila u supernatantu je odlivena u nove sterilne mikrotube i usledio je postupak precipitacije DNK sa etanolom.

U mikrotube u kojima se nalazila DNK ekstrahovana u prethodnom opisanom postupku, dodato je 50 μL 3M NaCl i 1 mL prethodno ohlađenog apsolutnog etanola. Nakon postupka zamrzavanja na

temperaturi od  $-20^{\circ}\text{C}$ , tokom 10 minuta i centrifugiranja na  $10\,000 \times g$  (10 minuta, na  $+4^{\circ}\text{C}$ ), supernatant je odliven, a u tubice je dodato po 1 mL prethodno ohlađenog 70% etanola. Potom su ponovljeni koraci zamrzavanja, centrifugiranja i odlivanja supernatanta, a otvorene tubice su sušene u sušnici, na  $50^{\circ}\text{C}$ , u trajanju od oko 2 sata, odnosno do isparenja alkohola.

Na ovaj način izolovana i prečišćena DNK, resuspendovana je sa 50 do 100  $\mu\text{L}$  prethodno sterilisane vode za injekcije (WFI) i čuvana na temperaturi od  $-20^{\circ}\text{C}$ .

DNK je korišćena u postupcima molekularne identifikacije do nivoa vrste, dokazivanja prisustva gena rezistencije na antibiotike i gena koji kodiraju faktore virulencije, kao i za potrebe genotipizacije.

#### **3.6.2.1.2. Amplifikacija DNK primenom multipleks PCR reakcije**

Za izradu PCR reakcione smeše korišćen je komercijalni PCR kit, Fast Gene® Taq (2x) Ready Mix with dye (NIPPON Genetics, EUROPE GmbH, zemlja), koji sadrži sve komponente potrebne za odvijanje reakcije izuzev prajmera i DNK matrice.

U plastičnoj mikrotubi, zapremine 1,5 mL, pomešane su reakcione komponente u sledećim zapreminama po izolatu: 12,5  $\mu\text{L}$  Taq Ready Mix-a, po 0,5  $\mu\text{L}$  Forward i Reverse prajmera (Microsynth AG, Švajcarska) i „molecular grade water“ do 22,5  $\mu\text{L}$ . Ovako napravljena reakciona smeša alikvotirana je u plastične mikrotube, zapremine 0,5 mL, i u svaku mikrotubu dodato je po 2,5  $\mu\text{L}$  prethodno ekstrahovane DNK.

Amplifikacija DNK se odvijala u finalnoj zapremini od 25  $\mu\text{L}$  u aparatu Eppendorf Mastercycler personal DNA thermal cycler, prema optimalnim uslovima za izvođenje PCR metode (111–113). Spisak prajmera i parametri amplifikacije DNK su prikazani u Tabeli 2.

#### **3.6.2.1.3. Elektroforeza i vizuelizacija PCR produkata**

Rezultati PCR amplifikacije su provereni elektroforezom na 1,5 % agaroznom gelu (Bioline, Meridian Bioscience Inc, zemlja) sa dodatkom etidijum bromida u 0,5X TBE (Tris/Borate/EDTA) puferu, pri naponu od 120 V i jačini struje od 200 mA u trajanju od 45 minuta.

Uzorci su analizirani nakon osvetljenja agaroznog gela UV svetlom na transiluminatoru (UVstar, Biometra, Nemačka).

Za određivanje veličine fragmenata korišćen je DNK marker od 100 bp (H3 RTU, NIPPON Genetics, EUROPE GmbH). Veličina nastalog DNK produkta je poređena sa veličinom DNK fragmenta u markeru.

Tabela 2. Spisak prajmera i parametri amplifikacije za identifikaciju VRE izolata detekcijom vrsno specifičnih gena i gena nosioca rezistencije na glikopeptidne antimikrobne lekove.

Gen	Oligonukleotidna sekvenca (5'-3')	PCR produkt (kb)	Uslovi PCR reakcije
<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	F: GCA AGG CTT CTT AGA GA R: CAT CGT GTA AGC TAA CTT C	550	Inicijalna denaturacija 95 °C, 2 min
<i>ddl<sub>E. faecalis</sub></i>	F: ATC AAG TAC AGT TAG TCT T R: ACG ATT CAA AGC TAA CTG	941	
<i>vanA</i>	F: GGA AAA CGA CAA TTG CTA TT R: GTA CAA TGC GGC CGT TA	731	35 ciklusa: 94°C, 1 min 54°C, 1 min 72°C, 1 min
<i>vanB</i>	F: ACT GGC CTA CAT TCT TAC A R: AGC GTT TAG TTC TTC CGT	175	Finalna ekstenzija 72°C, 10 min
<i>vanC1</i>	F: TCT CCA GAA TAC TCA GTG T R: ACA TGG CAA CCA ACA TAA G	329	
<i>vanC2/3</i>	F: CCT CAA AAG GGA TCA CTA A R: TCT TGA TAG GAT AAG CCG A	448	

*ddl<sub>E. faecium</sub>* - D-alanin–D-alanin ligaza gen specifičan za *E. faecium*; *ddl<sub>E. faecalis</sub>*- D-alanin–D-alanin ligaza gen specifičan za *E. faecalis*; *vanA* – *van A* tip rezistencije na vankomicin; *vanB* – *van B* tip rezistencije na vankomicin, *vanC* (C1,C2/3) – *van C* tip rezistencije na vankomicin, F-forward; R-reverse.

### 3.6.2.2. Detekcija gena nosioca rezistencije na kvinupristin-dalfopristin (Q-D)

Svi izolati koji su u prethodno opisanom postupku potvrđeni kao VRE, a koji su na osnovu ispitivanja antimikrobne osetljivosti u BD Phoenix™ automatizovanom mikrobiološkom sistemu rezistentni na Q-D, uključeni su u postupak detekcije sledećih gena nosilaca rezistencije na navedeni antimikrobni agens: *vatD*, *vatE*, *vgbA*, *ermB1*.

Postupak je obuhvatio amplifikaciju prethodno ekstrahovane i prečišćene DNK primenom multipleks PCR reakcije, razdvajanje PCR amplifikona gel-elektroforezom i njihovu vizuelizaciju pomoću transiluminatora.

Za izradu PCR reakcione smeše korišćen je komercijalni PCR kit, Fusion Hot Start II High Fidelity Master Mix (Thermo Scientific, SAD), koji sadrži sve komponente potrebne za odvijanje reakcije izuzev prajmera i DNK matrice. Amplifikacija DNK se odvijala u finalnoj zapremini od 25 µL u aparatu Eppendorf Mastercycler personal DNA thermal cyler, prema optimalnim uslovima za izvođenje PCR metode (114), a rezultati amplifikacije su provereni elektroforezom i vizuelizovani na transiluminatoru. Spisak prajmera i parametri amplifikacije DNK su prikazani u Tabeli 3.

Tabela 3. Spisak prajmera i parametri amplifikacije za detekciju gena nosioca rezistencije na antimikrobni agens Q-D

Gen	Oligonukleotidna sekvenca (5'-3')	PCR produkt (kb)	Uslovi PCR reakcije
<i>vat(D)</i>	F: GCTCAATAGGACCAGGTGTA R: TCCAGCTAACATGTATGGCG	271	Inicijalna denaturacija 98°C, 30s
<i>vat(E)</i>	F: ACTATACCTGACGCAAATGC R: GGTCAAATCTTGGTCCG	511	35 ciklusa: 98°C, 10 s 52°C, 15 s 72°C, 15 s
<i>vgb(A)</i>	F: TACAGAGTACCCACTACCGA R: TCAATTCTGCTCCAGCAGT	569	Finalna ekstenzija 72°C, 5 min
<i>ermB1</i>	F: CATTTAACGACGAAACTGGC R: GGAACATCTGTGGTATGGCG	424	

*vat(D)* i *vat(E)* - streptogramin A rezistancija; *vgb(A)* i *ermB1* - streptogramin B rezistancija; F-forward; R-reverse.

### 3.6.2.3. Detekcija gena koji kodiraju faktore virulencije

Na osnovu rezultata PCR metode za detekciju vrsno specifičnih gena i gena rezistencije na vankomicin, kod potvrđenih VRE izolata detektovani su sledeći geni koji kodiraju faktore virulencije: *esp*, *efaA*, *hyl*, *gelE*, *asa1*, *cpd*.

Postupak je obuhvatio amplifikaciju prethodno ekstrahovane i prečišćene DNK primenom dve multipleks PCR reakcije, razdvajanje PCR amplifikona gel-elektroforezom i njihovu vizuelizaciju pomoću transiluminatora.

Za izradu PCR reakcione smeše korišćen je komercijalni PCR kit, Fast Gene® Taq (2x) Ready Mix with dye (NIPPON Genetics, EUROPE GmbH). Amplifikacija DNK se odvijala u finalnoj zapremini od 25 µL u aparatu Eppendorf Mastercycler personal DNA thermal cycler, prema optimalnim uslovima za izvođenje PCR metode (33,35), a rezultati amplifikacije su provereni elektroforezom i vizuelizovani na transiluminatoru. Spisak prajmera i parametri amplifikacije DNK su prikazani u Tabelama 4 i 5.

### 3.6.2.4. Ispitivanje klonalne povezanosti i klonalne diseminacije izolovanih VRE sojeva – MLVA analiza

Na osnovu rezultata prethodnih molekularnih ispitivanja, potvrđeni VRE<sub>fm</sub> izolati su tipizirani MLVA metodom, koja se zasniva na principima konvencionalne PCR metode.

MLVA genotipizacija podrazumeva detekciju broja tandem ponovaka (eng. VNTR, Variable Number of Tandem Repeats) na multiplim lokusima na hromozomu ispitivanih izolata. Karakteristike VNTR lokusa su prikazane u Tabelama 6-11.

Tabela 4. Spisak prajmera i parametri amplifikacije za detekciju gena koji kodiraju faktore virulencije.

Gen	Oligonukleotidna sekvenca (5'-3')	PCR produkt (kb)	Uslovi PCR reakcije
<i>esp</i>	F:AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG R: AATTGATTCTTTAGCATCTGG	510	Inicijalna denaturacija 94 °C, 2 min
<i>hyl</i>	F: ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG R: GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	276	35 ciklusa: 94°C, 1 min 54°C, 1 min 72°C, 1 min
<i>efaA</i>	F: AACAGATCCGCATGAATA R:CATTTTCATCATCTGATAGTA	735	Finalna ekstenzija 72°C, 10 min

*esp* – gen koji kodira enterokokni površinski protein; *hyl* - gen koji kodira hijaluronidazu; *efaA* – gen koji kodira adhezin ćelijskog zida, F-forward; R-reverse.

Tabela 5. Spisak prajmera i parametri amplifikacije za detekciju gena koji kodiraju faktore virulencije.

Gen	Oligonukleotidna sekvenca (5'-3')	PCR produkt (kb)	Uslovi PCR reakcije
<i>asa1</i>	F: GCACGCTATTACGAACATATGA R: TAAGAAAGAACATCACCACGA	375	Inicijalna denaturacija 95 °C, 15 min
<i>gelE</i>	F: TATGACAATGCTTTTTGGGAT R: AGATGCACCCGAAATAATATA	213	35 ciklusa: 94°C, 1 min 56°C, 1 min 72°C, 1 min
<i>cpd</i>	F: TGGTGGGTTATTTTTCAATTC R: TACGGCTCTGGCTTACTA	782	Finalna ekstenzija 72°C, 10 min

*asa1* - gen koji kodira agregacionu supstancu; *gelE* - gen koji kodira želatinazu; *cpd* - gen koji kodira seks feromon; F-forward; R-reverse.

Tabela 6. Karakteristike VNTR-1 lokusa.

Dužina ponovka: 123bp Opseg ponavljanja: 0-8 Stepen konzervacije: 95%	
PCR produkt (bp)	Broj ponovaka
250	0
274	1
397	2
520	3
643	4
766	5
889	6
1012	7

Tabela 7. Karakteristike VNTR-2 lokusa.

Dužina ponovka: 279 bp Opseg ponavljanja: 1-14 Stepen konzervacije:96%	
PCR produkt (bp)	Broj ponovaka
504	0
724	1
1003	2
1282	3
1561	4
1840	5
2119	6
2398	7
2677	8
2956	9

Tabela 8. Karakteristike VNTR-7 lokusa

Dužina ponovka: 121bp Opseg ponavljanja: 1-7 Stepen konzervacije:98%	
PCR produkt (bp)	Broj ponovaka
381	0
416	1
537	2
658	3
779	4

Tabela 9. Karakteristike VNTR-8 lokusa.

Dužina ponovka: 121bp Opseg ponavljanja: 0-7 Stepen konzervacije: 96%	
PCR produkt (bp)	Broj ponovaka
197	0
237	1
358	2
479	3
600	4
721	5
842	6
963	7



Tabela 10. Karakteristike VNTR-9 lokusa.

Dužina ponovka: 121bp Opseg ponavljanja: 1-3 Stepen konzervacije: 93%	
PCR produkt (bp)	Broj ponovaka
158	0
205	1
326	2
447	3
568	4

Tabela 11. Karakteristike VNTR-10 lokusa.

Dužina ponovka: 121bp Opseg ponavljanja: 0-3 Stepen konzervacije: 96%	
PCR produkt (bp)	Broj ponovaka
158	0
205	1
326	2
447	3
568	4

Prema prethodno opisanoj metodi (50,115), uz manje modifikacije, za svaki *VRE<sub>fm</sub>* izolat ispitivano je prisustvo šest VNTR lokusa: VNTR-1, VNTR-2, VNTR-7, VNTR-8, VNTR-9, VNTR-10, odnosno za svaki *VRE<sub>fm</sub>* izolat urađeno je šest pojedinačnih PCR reakcija. Spisak prajmera i uslovi PCR reakcije za svaki VNTR lokus su prikazani u Tabeli 12.

Modifikacije protokola su se odnosile na parametre PCR reakcije za pojedine VNTR lokuse, i obuhvatale su sledeće izmene:

1. Za VNTR-2 lokus:

-inicijalna denaturacija na 95°C tokom 5 minuta;

-Touch Down (TD) PCR je urađen na sledeći način: 10 ciklusa od 30s na 94° C, 30s na 70° C i 3 min na 72°C, pri čemu se temperatura anilinga smanjivala za 0,7°C u svakom ciklusu tokom sledećih 9 ciklusa i tokom narednih 35 ciklusa temperatura anilinga je bila 63°C;

2. Za VNTR-9 lokus:

-TD PCR je urađen na sledeći način: 10 ciklusa od 30s na 94°C, 30s na 70°C i 1 min na 72C, pri čemu se temperatura anilinga smanjivala za 0,6°C u svakom ciklusu tokom sledećih 9 ciklusa i tokom narednih 35 ciklusa temperatura anilinga je bila 64°C;

3. Za VNTR-7, VNTR-8 i VNTR-10: na temperaturi anilinga od 55°C, PCR ciklus je produžen na 35 ciklusa.

Postupak je obuhvatio amplifikaciju prethodno ekstrahovane i prečišćene DNK primenom PCR reakcije, razdvajanje PCR amplifika gel-elektroforezom i njihovu vizuelizaciju pomoću transiluminatora.

Tabela 12. Spisak prajmera i uslovi PCR reakcije za svaki VNTR lokus.

Lokus	Oligonukleotidna sekvenca (5'-3')	PCR product (kb)	Uslovi PCR reakcije
VNTR-1	F:CTGTGATTTGGAGTTAGATGG R:CATTGTCCAGTAGAATTAGATTTG	250-1012	-Inicijalna denaturacija: 95°C, 15 min -35 ciklusa: 30 s, 94°C 30 s, 52°C 1 min, 72°C -Finalna ekstenzija: 5 min, 72°C
VNTR-2	F:GATGCTTATTTCCACTGCTTGTTG R:GTTTTACCCTCTCTTTTAAGGTCAATG	724-4251	-Inicijalna denaturacija: 95°C, 5 min -10 ciklusa, ΔT: -0.7 °C: 30 s, 94°C 30 s, 70 °C -35 ciklusa: 30 s, 94 °C 30 s, 63 °C 3 min, 72 °C -Finalna ekstenzija: 5 min, 72°C
VNTR-7	F: CTATCAGTTTTAGCTATTCCATC R: CTGGTACGAATCAAATCAAGTG	416-1021	-Inicijalna denaturacija: 95°C, 15 min -10 ciklusa, ΔT: -1.0 °C: 30 s, 94°C 30 s, 70 °C
VNTR-8	F: GGGGAGTGGCAAAAAATAGTGTG R: CAGATCATCAACTATCAACCGCTG	237-963	-35 ciklusa: 30 s, 94 °C 30 s, 60 °C 3 min, 72 °C -Finalna ekstenzija: 5 min, 72°C
VNTR-9	F:CTGCATCTAATAACAAGGACCCATG R: ACATTCCGATTAACGCGAAATAAG	205-447	-Inicijalna denaturacija: 95°C, 5 min; -10 ciklusa, ΔT: -0.6 °C: 30 s, 94°C 30 s, 70 °C -35 ciklusa 30 s, 94 °C 30 s, 64 °C; 3 min, 72 °C -Finalna ekstenzija: 5 min, 72°C
VNTR-10	F: CCTACAGAAAATCCAGACGG R: TTTTTCCATCCTCT TGAATTG	174-474	-Inicijalna denaturacija: 95°C, 15 min -10 ciklusa, ΔT: -1.0 °C: 30 s, 94°C 30 s, 70 °C -35 ciklusa 30 s, 94 °C 30 s, 60 °C 3 min, 72 °C -Finalna ekstenzija: 5 min, 72°C

Za izradu PCR reakcije smeše korišćen je komercijalni PCR kit, Fast Gene® Taq (2x) Ready Mix with dye (NIPPON Genetics, EUROPE GmbH). Amplifikacija DNK se odvijala u finalnoj zapremini od 25 µL u aparatu Eppendorf Mastercycler personal DNA thermal cycler, prema optimalnim uslovima za izvođenje PCR metode, a rezultati amplifikacije su provereni elektroforezom i vizuelizovani na transiluminatoru.

Prema instrukcijama za web stranice za MLVA tipizaciju, Univerziteta Utrecht, iz Holandije (<https://www.umcutrecht.nl/en/Research/Miscellaneous/MLVA-typing>) (50), veličina amplifikovanog PCR produkta je prevedena u broj, koji označava broj tandem ponovaka u svakom od 6 ispitivanih VNTR lokusa (Tabele 6-11). Na osnovu dodeljenih brojeva, za svaki VRE $fm$  izolat napravljen je MLVA profil. MLVA profil je preveden u MLVA tip (MT) na osnovu poređenja sa MLVA bazom (lična prepiska sa prof. Janetta Top, Univerziteta Utrecht, Holandija). Za nove MLVA kombinacije, dodeljeni su novi MT. Ime novog MT sastoji se od početnih slova imena zemlje izolacije (SRB), praćenim rastućim redosledom javljanja MT u analizi klastera.

Za ispitivanje međusobne povezanosti izolata, odnosno za analizu klastera korišćen je softver BioNumerics software (version 7; Applied Maths). Dendrogram je konstruisan primenom UPGMA metode (eng. Unweighted-pair group with arithmetic averages) uz kategorijalni koeficijent sličnosti (eng. categorical coefficient of similarity). Klaster je definisan kao grupa od najmanje 2 člana. Za „cut-off“ vrednost za formiranje klastera određena je sličnost od 85%.

Odnosi između genotipova su analizirani na osnovu konstrukcije dendrograma i stabla minimalnog raspona (eng. Minimum spanning tree, MST) - seta konekcija koje povezuje genome izolata putem najkraćeg rastojanja, ali i pomoću matrice korelacije koja predstavlja sumarnu tabelu koja koeficijentata korelacije između genotipova. Koeficijenti korelacije su prikazani u vidu spektra boja.

Za analizu međusobnih odnosa klastera, primenili smo preporuke za MLVA tipizaciju u kontekstu kontrole bolničkih infekcija koje je u svojoj doktorskoj disertaciji iznela J. Top (66). Postoje 4 moguće varijante:

1. Izolate smatramo *povezanim* ako imaju isti MT (za definitivnu potvrdu transmisije među ispitanicima potrebni su epidemiološki podaci kao što je podatak o boravku u zajedničkoj bolesničkoj sobi ili boravak u bolnici u istom vremenskom periodu; za definitivnu potvrdu klonalnog širenja preporuka je da se uradi MLST (eng. Multilocus Sequence Typing) metoda.
2. Izolate smatramo *blisko povezanim* ili najbližim srođnicima (eng. single locus variants, SLV) ako se dva MT izolata razlikuju u jednom VNTR lokusu (za definitivnu potvrdu transmisije među ispitanicima potrebni su epidemiološki podaci kao što je podatak o boravku u zajedničkoj bolesničkoj sobi ili boravak u bolnici u istom periodu; za definitivnu potvrdu klonalnog širenja preporuka je da se uradi MLST metoda.
3. Izolate smatramo *moguće povezanim* ili daljim srođnicima (eng. double locus variants, DLV) ako se dva MT izolata razlikuju u dva VNTR lokusa (samo u izuzetnim slučajevima sumnje da postoji povezanost potrebno je uraditi MLST).
4. Izolate smatramo *nepovezanim* ako se dva MT izolata razlikuju u tri ili više VNTR lokusa.

Za utvrđivanje evolutivnih odnosa između MT genotipova izolata, odnosno određivanja začetnika populacije i njegovih prvih mlađih srođnika koristili smo geoBURST algoritam u okviru softverskog programa PHYLOViZ (ver.2.0). Izvršeno je upoređivanje naše populacije MT genotipova sa MT

genotipovima koji su detektovani kod invazivnih VRE $_{fm}$  izolata na teritoriji Republike Srbije (116). Takođe, upoređivanje je izvršeno i sa dostupnom MLVA bazom (personalna komunikacija sa prof. J. Top).

Za numeričku procenu povezanosti genotipova i određivanje stepena raznolikosti i/ili dominacije jednog genotipa, izračunali smo indekse diverziteta: Simpsonov indeks diverziteta, Shanon H indeks (indikator obilja) i Shanon E indeks (indikator ujednačenosti). Indeksi su izračunati pomoću Kalkulatora za izračunavanje biodiverziteta koji su razvili Danoff-Burg i C. Xu (117). Simpsonov indeks diverziteta (D) je definisan kao verovatnoća da se dva uzorka iz ispitivane populacije nađu u različitim genogrupama (118). Ovaj indeks se može naći i u obliku 1-D i 1/D, s toga treba pažljivo da se definiše koji oblik indeksa se koristi. Mi smo se odlučili za oblik 1-D zato što je jasniji za interpretaciju.

### 3.6.3. Kvantitativno ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma

Kvantitativno ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma u mikrotitracionim pločama sa 96 bunara za kulturu tkiva (BioLite 96 Well Multidish, ThermoFisher Scientific, SAD) urađeno je prema protokolu Stepanovića i sar. (119). Postupak za kvantitativno ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma obuhvatao je sledeće korake:

Iz prethodno pripremljenih zamrznutih suspenzija, VRE izolati su subkultivisani na KA i inkubirani u toku 24 sata, na temperaturi  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . Posle provere čistoće kulture, 4-5 kolonija je resuspendovano u 5 mL 0,9% rastvora natrijum hlorida (fiziološki rastvor, FR) radi dobijanja bakterijske suspenzije koja odgovara optičkoj gustini od 0,5 po McFarland standardu ( $\approx 10^8$  CFU/mL). Za određivanje optičke gustine korišćen je DEN-1 denzitometar (Biosan, Litvanija).

Kao medijum za biofilm kultivaciju korišćen je TSB sa dodatkom 1% glukoze (TSB-Glu). U mikritracionu ploču je dodato po 180  $\mu\text{L}$  TSB-Glu podloge, a u svaki bunar mikrotitracione ploče dodato je po 20  $\mu\text{L}$  prethodno pripremljene bakterijske suspenzije u petoplikatima, posle mešanja na vorteks mešalici. Petoplikat samog TSB-Glu medijuma predstavljao je negativnu kontrolu svake ploče. Nakon inkubacije ( $24 \pm 2\text{h}$ ,  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ ) u aerobnim uslovima, sadržaj bunara je odliven, što omogućava uklanjanje neadherisanih ćelija, a svaki bunar je tri puta ispran sa 300  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera (eng. Phosphate-Buffer Saline, PBS;  $\text{pH}=7,2$ ) koji je prethodno podešen na temperaturu od  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Ploče su osušene na vazduhu, a za fiksaciju preostalih bakterija korišćen je metanol (150  $\mu\text{L}$  po bunaru) u trajanju od 20 minuta, nakon čega su ploče odlivene, osušene i obojene sa 150  $\mu\text{L}$  2% rastvora kristal violet (Himedia) tokom 15 minuta. Višak nevezane boje je ispran tekućom vodom. Boja vezana za adherisane bakterije je oslobođena sa 150  $\mu\text{L}$  96% etanola u trajanju od 20 minuta. ..

Nakon čitanja apsorbance (OD) na mikroplejt čitaču (Multiscan Ascent, 96/384 Plate Reader, MTX Lab Systems, SAD), na talasnoj dužini od 580nm, izračunate su srednje vrednosti apsorbance petoplikata za sve ispitivane sojeve i negativne kontrole. Ispitivanje sposobnosti stvaranja biofilma je ponavljano 3 puta tokom 3 uzastopna dana.

Da bi se odredila kategorija produkcije biofilma, za svaku mikrotitracionu ploču definisana je „cut off“ vrednost (ODc) i izračunata prema sledećoj formuli:

$$\text{ODc} = \text{srODn} + (3 \times \text{SDn}),$$

gde je  $srOD_n$  srednja vrednost apsorbance negativnih kontrola, a  $SD$  standardna devijacija srednje vrednosti negativnih kontrola

Na osnovu srednje vrednosti apsorbance svakog ispitivanog soja, „cut off“ vrednosti za svaku mikrotitracionu ploču i primenom dole nevedene formule (119), svaki soj je svrstan u četiri kategorije produkcije biofilma (Tabela 13).

Tabela 13. Kategorizacija biofilm produkcije.

Formula	Produkcija biofilma	Kategorija biofilm produkcije
$OD \leq OD_c$	Nema produkcije biofilma	0 ili -
$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	Slaba produkcija biofilma	1 ili +
$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$	Umerena produkcija biofilma	2 ili ++
$\geq 4 \times OD_c$	Izražena produkcija biofilma	3 ili +++

OD-srednja vrednost apsorbance triplicate za svaki ispitivani soj;  $OD_c$ -„cut off“ vrednost za mikrotitracionu ploču

### 3.7. Statistička analiza

Na osnovu prikupljenih podataka, koristeći Microsoft Excel program za tabelarne kalkulacije, formirana je istraživačka baza podataka, praćena šifarnikom koji sadrži informacije o nazivu varijabli, opisu varijabli, mernim jedinicima i skali merenja. Osim toga u šifarnik su, za kategorijalne varijable, uključene informacije o broju kategorija i kodovima tih kategorija.

Statistička analiza podataka je urađena u SPSS-21.0 statističkom programskom paketu (SPSS Inc. Chicago, IL, USA), a baza podataka za analizu je kreirana učitavanjem podataka iz prethodno formirane Excel baze i postupkom definisanja varijabli.

Prikupljeni podaci su analizirani metodama deskriptivne i analitičke statistike.

Deskriptivna statistika je uključila statističke postupke za izračunavanje apsolutne i relativne učestalosti, mere centralne tendencije, mere varijabiliteta. Podaci su grupisani i prikazani tabelarno. Zbog malih učestalosti pojedinih varijabli, izvršeno je sažimanje kategorija.

Analitički testovi su obuhvatili ispitivanje značajnosti razlike i metode bivarijantne logističke regresione analize.

Za ispitivanje značajnosti razlike između posmatranih grupa, korišćen je Hi-kvadrat test i Fišerov test tačne verovatnoće. Nivo verovatnoće postavljen je na  $p < 0,05$ .

Ispitivanje prediktivnih svojstava nezavisnih promenljivih u svojstvu faktora rizika za nastanak kolonizacije VRE sojevima, testirano je pomoću univarijantne i multivarijantne binarne logističke regresione analize. Ishodna varijabla „VRE kolonizacija“ kodirana je kao „dummy“ varijabla (1=VRE kolonizacija prisutna, 0=VRE kolonizacija nije prisutna). Takođe, nezavisne varijable kodirane su kao „dummy varijable“ (1=postoji svojstvo od interesa, 0=ne postoji svojstvo od interesa).

Za procenu doprinosa svake pojedinačne varijable u univarijantnoj analizi korišćen je Nagelkerke  $R^2$  koeficijent. Varijable koje su pokazale nivo statističke značajnosti  $p < 0,1$  u univarijantnoj logističkoj regresiji ušle su u finalni multivarijantni model logističke regresije.

Kao metod uključivanja varijabli u model multivarijantne binarne logističke regresione analize izabran je Stepwise Backward metod (metod povratnog odabira), koji podrazumeva da se sve varijable od interesa unose u početni model, a zatim se pri svakom koraku, jedna po jedna uklanjaju one varijable koje najmanje doprinose modelu. Ovaj metod je izabran s obzirom na veliki broj prediktora koji su u univarijantnom modelu pokazali statistički značajnu povezanost sa zavisnom varijablom te primena metode simultanog uključivanje (Enter) nije pogodna zbog potencijalnog fenomena prezasićenosti modela (eng. overfitting). Takođe, nije bila pogodna ni primena metoda Stepwise Forward s obzirom da ovaj metod proizvodi supresorske efekte.

Nivo značajnosti pri kom se varijable isključuju iz modela je postavljen na 0,1. Za ispitivanje multikolinearnosti između varijabli korišćena je standardna greška (SE) B koeficijenta nezavisnih varijabli. Ako je vrednost  $SE > 2$ , smatra se da postoji multikolinearnost između varijabli.

Evaluacija modela podrazumevala je ispitivanje performansi, odnosno kvaliteta modela i ispitivanje validnosti, odnosno valjanosti modela.

Mere performansi modela koje su ispitivane su: klasifikaciona tačnost (Omnibus test i Nagelkerke  $R^2$ ), diskriminaciona moći (C statistika-AUC) i kalibracije modela (Hosmer-Lemeshow statistika).

Validacija modela je urađena prema metodi interne validacije, odnosno model se validirao na postojećem skupu podataka (80-20 cross validacija). Na ovaj način rešava se problem fenomena prezasićenosti modela, odnosno mogućnosti dobijanja visko značajnih ali besmislenih rezultata zbog velikog broja prediktora u modelu.

## **4. *REZULTATI ISTRAŽIVANJA***

---



#### 4.1. Karakteristike studijske populacije

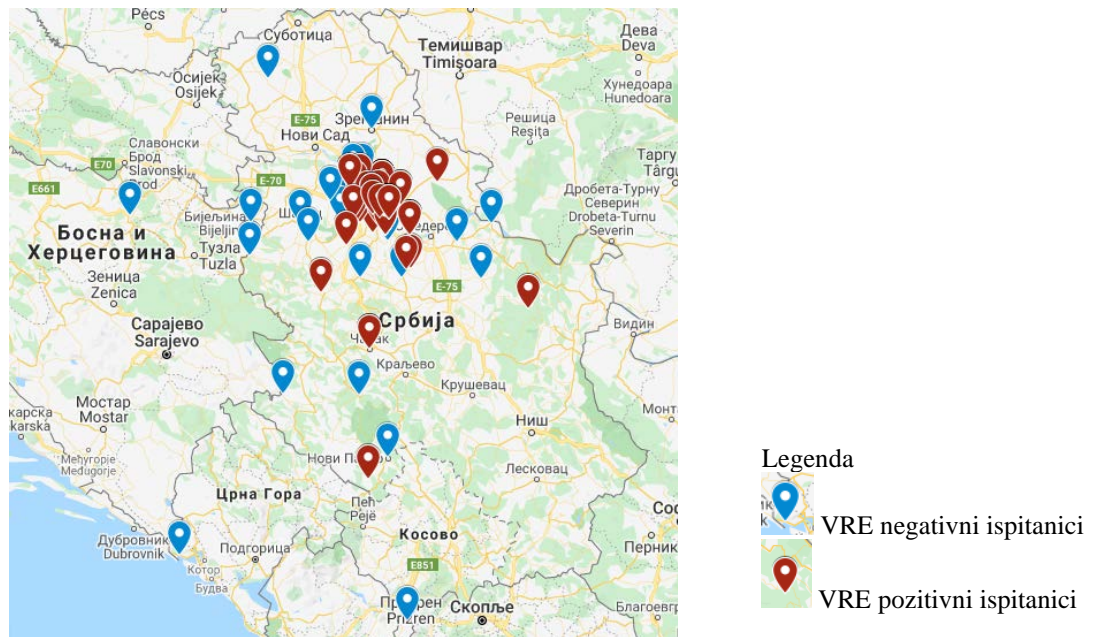
U studiji je učestvovalo 268 ispitanika. Od ukupnog broja ispitanika, 54,1% su bili muškarci, a 45,9% žene. Srednja vrednost godina života u studijskoj populaciji je iznosila  $65,3 \pm 16,4$  godine. Srednje vrednosti godina života ispitanika u odnosu na pol su bile približne. U grupi muškaraca, srednja vrednost je iznosila  $65,9 \pm 15,6$  godina, dok je u grupi žena srednja vrednost bila  $64,6 \pm 17,4$  godina. Procenat ispitanika starijih od 65 godina iznosio je 61,2%, dok je procenat ispitanika mlađih od 65 godina iznosio 38,8%. U grupi starijih od 65 godina, muškaraca je bilo 85 (51,8%), a žena 79 (48,2%). U grupi mlađih od 65 godina, muškaraca je bilo 60 (57,7%), a žena 44 (42,3%).

U odnosu na mesto boravka, mesto stanovanja za 265 ispitanika je bilo Republika Srbija, dva ispitanika su bili državljani Bosne i Hercegovine (Doboj, Bijeljina), a jedan ispitanik državljanin Crne Gore (Herceg Novi) (Slika 19). U seoskoj sredini je boravilo 17,5% ispitanika. Distribucija ispitanika prema demografskim karakteristikama prikazana je u Tabeli 14.

Tabela 14. Distribucija ispitanika prema demografskim karakteristikama.

Demografske karakteristike	Broj	%
Pol		
muški	145	54,1
ženski	123	45,9
Starost, godine (sv±sd)	65,3±16,4	n.p.
muškarci	65,9±15,6	n.p.
žene	64,6±17,4	n.p.
Uzrasne grupe, godine		
≥65	164	61,2
muškarci	85	51,8
žene	79	48,2
<65	104	38,8
muškarci	60	57,7
žene	44	42,3
Državaljanstvo		
RS	265	98,8
BiH	2	0,75
CG	1	0,45
Mesto boravka		
Beograd	203	75,7
Ostali gradovi	18	6,7
Selo	47	17,5

sv±sd – srednja vrednost ± standardna devijacija; n.p.- nije primenljivo; RS-Republika Srbija; BiH-Bosna i Hercegovina; CG-Crna Gora;



Slika 19. Grafička raspodela studijske populacije prema mestu boravka.

#### 4.2. Distribucija ispitanika prema kliničkim odeljenjima

Od ukupno 268 ispitanika uključenih u istraživanje, oko 30% su činili ispitanici sa odeljenja hemato-onkologije. Slede odeljenja gerijatrije i hemodijalize sa po oko 20%, a zatim JIL i akutne infektivne bolesti sa oko 15% (Tabela 15). U odnosu na zdravstvene ustanove iz kojih su ispitanici regrutovani za učešće u istraživanju, najviše ispitanika je bilo iz KBC Zemun, 101 ispitanik, slede KBC Zvezdara sa 86 ispitanika i KCS sa 81 ispitanikom.

Table 15. Distribucija ispitanika prema kliničkim odeljenjima uključenim u istraživanje.

Klinička odeljenja	Broj	%
Gerijatrija	54	20,1
Hemato-onkologija	79	29,5
Akutne infektivne bolesti	44	16,4
JIL	40	15,0
Hemodijaliza	51	19,0
Ukupno	268	100

JIL-Jedinica intenzivnog lečenja;

#### 4.3. Distribucija ispitanika prema prisustvu komorbiditeta

Hronična bolest sa najvećom učestalošću u studijskoj populaciji je bila hipertenzija, koja je prisutna kod 53% ispitanika. Slede *diabetes mellitus (DM)*, ishemijska bolest srca, srčana insuficijencija, cerebrovaskularna bolest (CVB) i hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP) (Tabela 16).

Tabela 16. Distribucija ispitanika prema komorbiditetima.

<b>Oboljenje</b>	<b>Broj</b>	<b>%</b>
<i>Diabetes mellitus</i>	49	18,30
Hipertenzija	142	53,0
Ishemijska bolest srca	42	15,7
Srčana insuficijencija	36	13,4
Cerebrovaskularna bolest	53	13,0
Hronična opstruktivna bolest pluća	19	7,10

#### 4.4. Distribucija ispitanika prema podacioma o bolničkom lečenju

Od ukupnog broja ispitanika, oko 5% njih je bilo prevedeno iz druge ustanove. Najveći broj ispitanika (34,7%) je bio hospitalizovan u bolnici duže od 16 dana pre uzorkovanja stolice. Više od 80% ispitanika je bilo bar jednom na bolničkom lečenju. Hiruršku intervenciju u toku sadašnjeg bolničkog lečenja je imalo 6,3% pacijenata. (Tabela 17).

Tabela 17. Distribucija ispitanika prema podacima o bolničkom lečenju.

<b>Podaci o bolničkom lečenju</b>	<b>Broj</b>	<b>%</b>
Prevod iz druge ustanove		
Da	14	5,2
Dužina bolničkog lečenja pre uzorkovanja:		
≤48 sati	40	14,9
3-7 dana	75	28,0
8-15dana	60	22,4
≥16 dana	93	34,7
Prethodni boravak u bolnici		
Ne (prvi prijem)	47	17,5
Da, u poslednja 3 meseca	136	50,7
Da, pre 3- 6 meseci	11	4,1
Da, pre 6-12 meseci	12	4,5
Da, pre više od godinu dana	62	23,1
Hirurška intervencija u toku bolničkog lečenja		
Da	17	6,3
Hirurška intervencija u toku prethodna tri meseca		
Da	21	7,8

#### 4.5. Distribucija ispitanika prema podacima o antimikrobnoj terapiji

Više od trećine ispitanika je primilo bar jedan antimikrobni lek u toku bolničkog lečenja. Najčešće propisivane grupe antimikrobnih lekova su bili cefalosporini, metronidazol i fluorohinoloni. Petina ispitanika je primala antimikrobne lekove u toku poslednjih šest meseci (Tabela 18).

Tabela 18. Distribucija ispitanika prema podacima o antimikrobnoj terapiji.

<b>Podaci o antimikrobnoj terapiji</b>	<b>Broj</b>	<b>%</b>
Primena antimikrobne terapije u toku bolničkog lečenja		
Ne	14	52,6
Da, jedan antimikrobni lek	95	35,4
Da, više od dva antimikrobna leka	32	11,9
Grupe antimikrobnih lekova		
Beta-laktami (osim cefalosporina)	37	13,8
Cefalosporini	57	21,3
Fluorohinoloni	44	16,4
Aminoglikozidi	19	7,1
Vankomicin	27	10,1
Makrolidi i Linkozamidi	21	7,8
Metronidazol	46	17,2
Ostali antimikrobni lekovi	17	6,3
Primena antimikrobne terapije u toku prethodnih šest meseci (Da)	56	21,0

#### 4.6. Distribucija ispitanika prema dijagnostičko-terapijskim procedurama

Najzastupljenije dijagnostičko-terapijske procedure među studijskom populacijom su bile onkološka terapija i transfuzija koje su zastupljene sa oko 30% (Tabela 19).

Tabela 19. Distribucija ispitanika prema dijagnostičko-terapijske procedurama.

<b>Dijagnostičko-terapijske procedure</b>	<b>Broj</b>	<b>%</b>
Onkološka terapija	79	29,5
Kortikosteroidna terapija	37	13,8
Transfuzija	73	27,2
Urinarni kateter	26	9,7
CVK	17	6,3
Hematološke procedure	29	10,8
JIL procedure (bez CVK)	18	6,7
Endoskopske procedure	36	13,4

CVK-centralni venski kateter; JIL-jedinica intenzivnog lečenja;

#### 4.7. Distribucija ispitanika prema ostalim relevantnim podacima

Od 268 ispitanika, neutropenija je bila prisutna kod 12,3%. Skoro polovina ispitanika je imala hipoalbuminemiju. Terapiju lekovima iz grupe inhibitora protonske pumpe (IPP) i terapiju probioticima primalo više od 40% ispitanika. Infekcija uzrokovana bakterijom *C. difficile* bila je registrovana kod 6 ispitanika (Tabela 20).

Tabela 20. Distribucija ispitanika prema ostalim karakteristikama.

Ostale karakteristike	Broj	%
IPP	62	23,1
Probiotici	56	20,9
Infekcija <i>Clostridioides difficile</i>	6	2,2
Virusna infekcija	24	9,0
Neutropenija	33	12,3
Hipoalbuminemija	133	49,6
Antimikotici	5	1,9

IPP-inhibitori protonske pumpe;.

#### 4.8. Učestalost fekalne kolonizacije VRE sojevima u studijskoj populaciji

Učestalost fekalne kolonizacije VRE sojevima u studijskoj populaciji u posmatranom studijskom periodu iznosila je 28,7% (77/268) (Tabela 21).

Tabela 21. Distribucija ispitanika prema prisustvu kolonizacije VRE sojevima u stolici.

Kolonizacija VRE sojevima	Broj	%
Da	77	28,7
Ne	191	71,3
Ukupno	268	100

#### 4.9. VRE kolonizacija u odnosu na demografske podatke

Ispitanici stariji od 65 godina su bili zastupljeni u grupi VRE kolonizovanih sa 70,1%. Nije bilo značajne razlike u pogledu VRE kolonizacije u odnosu na pol ( $\chi^2=0,519$ ,  $p = 0,471$ ) i starost preko 65 godina ( $\chi^2=3,633$ ,  $p = 0,057$ ) (Tabela 22).

Tabela 22. VRE kolonizacija u odnosu na demografske podatke.

Demografske karakteristike	VRE status				$\chi^2$	<i>p</i>
	Pozitivni		Negativni			
	N	%	N	%		
Pol						
muški	39	50,6	106	55,5	0,519	0,471
ženski	38	49,4	85	44,5		
Uzrasne grupe, godine						
≥65	54	70,1	110	57,6	3,633	0,057
<65	23	29,9	81	42,4		

N- apsolutna učestalost;%-relativna učestalost iskazana u procentima.  $\chi^2$ –Hi kvadrat test; *p*-statistička značajnost; zadebljani broj-*p*<0,05.

#### 4.10. VRE kolonizacija prema kliničkim odeljenjima

Učestalost kolonizacije VRE sojevima je bila najviša na kliničkim odeljenjima za gerijatriju (42,6%) i JIL (40,0%), a najniža na odeljenjima za hemodijalizu (11,7%) (Tabela 23).

Postoji statistički značajna razlika između grupe VRE kolonizovanih i VRE nekolonizovanih u odnosu na klinička odeljenja uključena u istraživanje (Tabela 23).

Tabela 23. VRE kolonizacija prema kliničkim odeljenjima.

Oboljenje	VRE status				$\chi^2$	<i>p</i>
	Pozitivni		Negativni			
	N	%	N	%		
Gerijatrija	23	42,6	31	57,4	15,522	<b>0,004</b>
JIL	16	40,0	24	60,0		
Hemato-onkologija	22	27,9	57	72,1		
Akutne infektivne bolesti	10	22,7	34	77,3		
Hemodijaliza	6	11,7	45	88,3		
Ukupno	77	28,7	191	71,3		

N- apsolutna učestalost;%-relativna učestalost iskazana u procentima.  $\chi^2$ –Hi kvadrat test; *p*-statistička značajnost; zadebljani broj-*p*<0,05.

#### 4.11. VRE kolonizacija u odnosu na prisustvo komorbiditeta

VRE kolonizacija je u najvećem procentu zabeležena kod pacijenata koji su imali hipertenziju. Na postoji statistički značajna razlika među ispitivanim grupama u odnosu na prisustvo komorbiditeta (Tabela 24).

Tabela 24. VRE kolonizacija u odnosu na prisustvo komorbiditeta.

Oboljenje	VRE status				$\chi^2$	<i>p</i>
	Pozitivni		Negativni			
	N	%	N	%		
<i>Diabetes mellitus</i>	14	18,2	63	32,9	0,001	0,978
Hipertenzija	44	57,1	33	42,9	0,750	0,387
Ishemijska bolest srca	14	18,2	28	14,7	0,515	0,473
Srčana insuficijencija	6	7,8	12	6,3	0,200	0,655
Cerebrovaskularna bolest	15	19,5	21	11,0	3,398	0,065
Hronična opstruktivna bolest pluća	8	10,4	11	5,8	1,786	0,181

N- apsolutna učestalost;%-relativna učestalost iskazana u procentima,  $\chi^2$ –Hi kvadrat test; *p*-statistička značajnost.

#### 4.12. VRE kolonizacija u odnosu na podatke o hospitalizaciji

Postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa u odnosu na dužinu vremenskog perioda između prijema i uzorkovanja ( $\chi^2=11,730$ ,  $p = 0,008$ ), kao i u odnosu na primenu antimikrobne terapije od prijema do uzorkovanja ( $\chi^2=15,395$ ,  $p < 0,001$ ). Više od 60% VRE kolonizovanih ispitanika je boravilo duže od 7 dana u bolnici, a skoro polovina VRE kolonizovanih ispitanika je boravila u bolnici u periodu od 3 meseca pre uzorkovanja.

U odnosu na grupu koja nije kolonizovana VRE sojevima, u grupi VRE kolonizovanih ispitanika bilo je statistički značajno više ispitanika koji su imali hiruršku intervenciju tokom prijema ( $\chi^2=5,196$ ,  $p = 0,023$ ) (Tabela 25).

Tabela 25. VRE kolonizacija u odnosu na podatke o prijemu u bolnicu.

Podaci o bolničkom lečenju	VRE status				$\chi^2$	<i>p</i>
	Pozitivni		Negativni			
	N	%	N	%		
Prevod iz druge ustanove (Da)	5	6,5	9	4,7	0,352	0,553
Dužina hospitalizacije pre uzorkovanja						
≤48h	3	3,9	37	19,4	11,730	<b>0,008</b>
3-7 dana	23	29,9	52	27,2		
8-15dana	23	29,9	37	19,4		
≥16 dana	28	36,4	65	34,0		
Prethodna hospitalizacija						
Ne (prvi prijem)	18	23,4	29	15,2	3,081	0,544
Da, u poslednja 3 meseca	38	49,4	98	51,3		
Da, pre 3- 6 meseci	2	2,6	9	4,7		
Da, pre 6-12 meseci	3	3,9	9	4,7		
Da, pre više od godinu dana	16	20,8	46	24,1		
HI (Da)	9	11,7	8	4,2	5,196	<b>0,023</b>
HI pre 3m (Da)	6	7,6	15	7,9	0,000	0,987

N- apsolutna učestalost;%-relativna učestalost iskazana u procentima,  $\chi^2$ –Hi kvadrat test; *p*-statistička značajnost, zadebljani broj- $p < 0,05$ , HI-hirurška intervencija u toku prijema; HI pre 3m-hirurška intervencija pre 3 meseca od prijema.



#### 4.13. VRE kolonizacija u odnosu na podatke o antimikrobnoj terapiji

U grupi VRE kolonizovanih ispitanika postoji veća učestalost primene antimikrobnih lekova u odnosu na grupu VRE nekolonizovanih. U grupi VRE kolonizovanih jedan antimikrobni lek je primilo 49,4% ispitanika, dok je dva primilo 16,9%. Razlika između grupa je statistički značajna ( $\chi^2=15,395$ ,  $p < 0,001$ ) (Tabela 26).

U grupi VRE kolonizovanih ispitanika postoji veća učestalost primene antimikrobnih lekova iz grupe cefalosporina i grupe fluorohinolona u odnosu na grupu VRE nekolonizovanih.

U grupi VRE kolonizovanih antimikrobni lek iz grupe cefalosporina je primilo 35,1% ispitanika. Ova razlika je statistički značajna ( $\chi^2=12,281$ ,  $p < 0,001$ ).

Antimikrobni lek iz grupe fluorohinolona je primilo 24,7%. Ova razlika je takođe statistički značajna ( $\chi^2=5,368$ ,  $p = 0,021$ ) (Tabela 26).

Tabela 26. VRE kolonizacija prema podacima o antimikrobnoj terapiji.

Podaci o antimikrobnoj terapiji	VRE status				$\chi^2$	p
	Pozitivni		Negativni			
	N	%	N	%		
Primena antimikrobne terapije u toku bolničkog lečenja						
Ne	26	33,8	115	60,2		
Da, jedan antimikrobni lek	38	49,4	57	29,8	15,395	<0,001
Da, više od dva antimikrobna leka	13	16,9	19	9,9		
Klase antimikrobnih lekova						
Beta-laktami bez cefalosporina	9	11,7	28	14,7	0,407	0,523
Cefalosporini	27	35,1	30	15,7	12,281	<0,001
Fluorohinoloni	19	24,7	25	13,1	5,368	0,021
Aminoglikozidi	7	9,1	12	6,3	0,657	0,418
Vankomicin	10	13,0	17	8,9	1,012	0,315
Makrolidi i Linkozamidi	9	11,7	12	6,3	2,220	0,136
Metronidazol	18	23,4	28	14,7	2,933	0,087
Ostali antimikrobni lekovi	5	6,5	12	6,3	0,004	0,949
Primena antimikrobne terapije u toku prethodnih šest meseci						
Da	14	18,2	42	22,1	0,509	0,476

N- apsolutna učestalost; %-relativna učestalost iskazana u procentima,  $\chi^2$  –Hi kvadrat test; p-statistička značajnost, zadebljani broj-p<0,05.

#### 4.14. VRE kolonizacija u odnosu na primenjene dijagnostičko-terapijske procedure

Primena JIL procedura bez plasiranja centralnog venskog katetera (CVK) je češća u grupi kolonizovanih pacijenata. Ova razlika je statistički značajna ( $\chi^2=4,263$ ,  $p = 0,039$ ).

U odnosu na ostale dijagnostičko-terapijske procedure, ne postoji razlika između grupa (Tabela 27).

Tabela 27. VRE kolonizacija u odnosu na primenjene dijagnostičko-terapijske procedure.

Dijagnostičko-terapijske procedure	VRE status				$\chi^2$	<i>p</i>
	Pozitivni		Negativni			
	N	%	N	%		
Onkološka terapija	22	28,6	57	29,8	0,043	0,836
Kortikosteroidna terapija	17	22,1	20	10,5	0,073	0,683
Transfuzija	21	27,3	52	27,2	0,097	0,756
Urinarni kateter	9	11,7	17	8,9	0,487	0,485
CVK	3	3,9	14	7,3	1,089	0,297
Hematološke procedure	11	14,3	18	9,4	1,344	0,246
JIL procedure bez CVK	9	11,7	9	4,7	4,263	<b>0,039</b>
Endoskopske procedure	9	11,7	27	14,1	0,283	0,595

CVK-centralni venski kateter, JIL-jedinica intenzivnog lečenja; N- apsolutna učestalost;%-relativna učestalost iskazana u procentima,  $\chi^2$ -Hi kvadrat test; *p*-statistička značajnost, zadebljani broj- $p < 0,05$ .

#### 4.15. VRE kolonizacija u odnosu na ostale relevantne podatke

Ne postoji značajna razlika između grupa u odnosu na primenu lekova iz grupe IPP, probiotika, infekciju prouzrokovanu bakterijom *C. difficile*, hepatitis, leukopeniju, neutropeniju, hipoalbuminemiju, niti primenu antimikotika (Tabela 28).

Tabela 28. VRE kolonizacija u odnosu na ostale relevantne podatke.

Ostale karakteristike	VRE status				$\chi^2$	<i>p</i>
	Pozitivni		Negativni			
	N	%	N	%		
IPP	20	26,0	42	22,0	0,490	0,484
Probiotici	17	22,1	39	20,4	0,091	0,762
Infekcija <i>Clostridioides difficile</i>	3	3,9	3	1,6	1,356	0,244
Virusna infekcija	6	7,8	18	9,4	0,179	0,672
Neutropenija	11	14,3	22	11,5	0,389	0,533
Hipoalbuminemija	45	58,4	88	46,1	3,358	0,067
Antimikotici	2	2,6	3	1,6	0,316	0,574

IPP-inhibitori protonske pumpe; N- apsolutna učestalost;%-relativna učestalost iskazana u procentima,  $\chi^2$ -Hi kvadrat test; *p*-statistička značajnost.

#### 4.16. Faktori rizika za VRE kolonizaciju, univarijantna logistička analiza

Logističkom regresionom analizom ispitali smo koje od nezavisnih varijabli predstavljaju najbolje prediktore za prisustvo VRE kolonizacije.

Prisustvo VRE kolonizacije korišćeno je kao zavisna varijabla i kodirana je kao „dummy varijabla“ (0=nema kolonizacije; 1=kolonizacija prisutna). Sve prethodno ispitivane varijable su korišćene kao nezavisne varijable.

Prvo je sprovedena univarijantna binarna logistička regresija (Tabela 29). Ocenjen je doprinos svake pojedinačne nezavisne varijable u objašnjenju prisustva VRE kolonizacije. Sve varijable kod kojih je  $p < 0,1$  ušle su multivarijantni model (Tabela 30). Na osnovu analize vrednosti SE B koeficijenta nezavisnih varijabli, možemo da kažemo da nije bilo multikolinearnosti.

Kao prediktori VRE kolonizacije, izdvojili su se: starost  $\geq 65$  godina (Wald=3,592;  $p=0,058$ ), boravak na kliničkim odeljenjima (Wald=14,327;  $p=0,004$ ), prisustvo cerebrovaskularne bolesti (Wald=3,315;  $p=0,069$ ), dužina hospitalizacije pre uzorkovanja (Wald=9,641;  $p=0,008$ ), hirurška intervencija u toku prijema (Wald=4,788;  $p=0,029$ ); antimikrobna terapija u toku prijema (Wald=14,813;  $p \leq 0,001$ ); primena cefalosporina (Wald=11,722;  $p \leq 0,001$ ); primena fluorohinolona (Wald=5,211;  $p=0,022$ ) i metronidazola (Wald=2,885;  $p=0,089$ ), JIL procedure bez CVK (Wald=3,998;  $p=0,046$ ) i hipoalbuminemija (Wald=0,331;  $p=0,068$ );

Najveći procenat objašnjenja varijanse ima boravak na klinički odeljenjima (Nagelkerke  $R^2 = 0,085$ ) objašnjavajući 8,5% zavisne varijable, slede terapija antibioticima u toku prijema (Nagelkerke  $R^2 = 0,081$ ) objašnjavajući 8,1% zavisne varijable, dužina boravka u bolnici pre uzorkovanja (Nagelkerke  $R^2 = 0,073$ ) objašnjavajući 7,3% zavisne varijable i primena cefalosporina (Nagelkerke  $R^2 = 0,060$ ) objašnjavajući 6,0% zavisne varijable.

Tabela 29. Prediktori VRE kolonizacije, univarijantna analiza.

VARIJABLE	UNIVARIJANTNA LINEARNA REGRESIJA						
		B	RR	95% CI	p	Wald	R <sup>2</sup>
Pol	Ženski	0,195	1,2	0,715-2,065	0,471	0,519	0,003
Uzrast (godine)	$\geq 65$	0,547	1,7	0,981-3,045	<b>0,058</b>	3,592	0,020
Klinička odeljenja	Ger	1,716	5,5	2,030-15,251	<b>0,001</b>	11,133	0,085
	HO	1,063	2,9	1,082-7,741	<b>0,034</b>	4,485	
	AIB	0,791	2,2	0,730-6,665	0,161	1,966	
	JIL	1,609	5,0	1,731-14,447	<b>0,003</b>	8,839	
	HD (ref)				/	/	

Tabela 29. Prediktori VRE kolonizacije prema univarijantnoj analizi (nastavak).

VARIJABLE	UNIVARIJANTNA LINEARNA REGRESIJA					
	B	RR	95% CI	p	Wald	R <sup>2</sup>
Komorbiteti						
DM	-0,010	0,9	0,499-1,966	0,978	0,001	0,000
HTA	0,235	1,2	0,742-2,156	0,387	0,748	0,004
IBS	0,257	1,2	0,640-2,616	0,474	0,513	0,003
IC	0,232	1,2	0,456-3,488	0,656	0,199	0,001
CVB	0,672	1,9	0,950-4,038	<b>0,069</b>	3,315	0,017
HOBP	0,640	1,8	0,732-4,916	0,187	1,738	0,009
Prevod iz druge ustanove						
Da	0,340	1,4	0,455-4,333	0,555	0,349	0,002
Dužina bolničkog lečenja pre uzorkovanja						
≤48sati (ref)				/	/	
3-7 dana	1,697	5,4	1,525-19,516	<b>0,009</b>	6,803	
8-15dana	2,037	7,6	2,118-27,755	<b>0,002</b>	9,629	
≥16 dana	1,670	5,3	1,511-18,678	<b>0,009</b>	6,779	0,073
Prethodni boravak u bolnici						
Ne (ref)				/	/	
Da, u poslednja 3 meseca	-0,047	0,6	0,311-1,255	0,186	1,749	
Da, pre 3- 6 meseci	-1,027	0,3	0,069-1,848	0,220	1,505	
Da, pre 6-12 meseci	-0,622	0,5	0,128-2,251	0,395	0,723	
Da, pre više od 1 godinu	-0,579	0,5	0,247-1,270	0,165	1,924	0,016
Hirurška intervencija u toku bolničkog lečenja						
Da	1,108	3,0	1,122-8,166	<b>0,029</b>	4,788	0,025
Hirurška intervencija u prethodna 3 meseca						
Da	-0,008	0,9	0,370-2,658	0,987	0,000	0,000
Primena antimikrobne terapije u toku bolničkog lečenja						
Ne (ref)				/	/	
1	1,081	2,9	1,632-5,326	<b>0,001</b>	12,848	
≥2	1,107	3,0	1,328-6,898	<b>0,008</b>	6,939	0,081
Klasa antimikrobnih lekova						
Beta-laktami bez cefalosporina	-0,261	0,7	0,345-1,719	0,524	0,405	0,002
Cefalosporini	1,064	2,8	1,576-5,329	<b>0,001</b>	11,722	0,060

Fluorohinoloni	0,777	2,1	1,116-4,239	<b>0,022</b>	5.211	0,027
----------------	-------	-----	-------------	--------------	-------	-------

Tabela 29. Prediktori VRE kolonizacije prema univarijantnoj analizi (nastavak).

VARIJABLE	UNIVARIJANTNA LINEARNA REGRESIJA					
	B	RR	95% CI	p	Wald	R <sup>2</sup>
Aminoglikozidi	0,400	1,4	0,564-3,944	0,420	0,650	0,003
Vankomicin	0,424	1,5	0,666-3,505	0,317	1,000	0,005
Makrolidi i linkozamidi	0,680	1,9	0,796-4,896	0,142	2,155	0,011
Metronidazol	0,574	1,7	0,915-3,446	<b>0,089</b>	2,885	0,015
Ostali	0,035	1,0	0,352-3,046	0,949	0,058	0,000
Antimikrobna terapija u prethodnih šest meseci						
Da	-0,245	0,7	0,400-1,535	0,476	0,507	0,003
Dijagnostičko-terapijske procedure						
Onkološka terapija	-0,062	0,9	0,525-1,685	0,836	0,043	0,000
Kortikosteroidna terapija	-0,005	0,9	0,534-1,711	0,683	0,073	0,000
Transfuzija	-0,002	0,9	0,551-1,807	0,756	0,097	0,000
Urinarni kateter	-0,304	0,7	0,314-1,736	0,487	0,484	0,003
CVK	0,668	1,9	0,545-6,990	0,305	1,054	0,006
Hematološke procedure	0,471	1,6	0,718-3,572	0,249	1,326	0,007
JIL procedure bez CVK	0,984	2,6	1,020-7,025	<b>0,046</b>	3,998	0,021
Endoskopske procedure	-0,218	0,8	1,359-1,799	1,595	1,282	0,002
Ostale karakteristike						
IPP	0,219	1,2	1,674-2,200	1,484	1,489	0,003
Probiotici	0,099	1,1	1,580-2,101	1,762	1,091	0,000
<i>Clostridioides difficile</i>	0,932	2,5	1,501-12,873	1,260	1,268	0,007
Virusna infekcija	-0,209	0,8	1,310-2,130	1,672	0,179	0,001
Neutropenija	0,247	1,2	1,588-2,786	1,533	1,388	0,002
Hipoalbuminemija	0,498	1,6	1,964-2,811	1,068	1,331	0,018
Antimikotici	0,513	1,6	1,274-11,202	1,578	1,309	0,002

B-koeficijent regresije; RR-relativni rizik; CI-interval poverenja; p-statistička značajnost; Wald-Wald statistika, R<sup>2</sup>-Nagelkerke R<sup>2</sup>, Ger-gerijatrija, HO-hemato-onkologija; AIB-akutne infektivne bolesti; JIL-jedinica intenzivnog lečenja; HD-hemodijaliza; DM-dijabetes melitus, HTA-hipertenzija; IBS-ishemijska bolest srca; IC- srčana insuficijencija; CVB-cerebrovaskularna bolest; HOBT-hronična opstruktivna bolest pluća; IPP-inhibitori protonske pumpe; CVK-centralni venski kateter.

#### 4.17. Faktori rizika za VRE kolonizaciju, multivarijantna logistička analiza

Nakon univarijantne analize, sprovedena je multivarijantna binarna logistička regresija (Tabela 30). Korišćen je Sterwise Backward metod. Ova metoda podrazumeva da su u prvom koraku uključene sve nezavisne varijable, a da se u svakom sledećem koraku varijable isključuju iz modela. Redosled isključivanja iz modela je određen doprinosom svake pojedinačne varijable objašnjenju zavisne promenljive.

Tabela 30. Prediktori VRE kolonizacije, multivarijantna analiza.

Varijable	MULTIVARIJANTNA LOGISTIČKA REGRESIJA			
	Wald	<i>p</i>	RR	95% CI
Klinička odeljenja				
Ger	11,2	0,001	6,5	2,185-19,747
HO	7,8	0,005	4,7	1,599-14,204
AIB	1,2	0,264	2,0	0,580-7,308
JIL	7,0	0,008	5,0	1,523-16,491
HD (ref)	/	/		
Dužina bolničkog lečenja pre uzorkovanja				
≤48sati(ref)	/	/		
3-7 dana	6,7	0,010	5,5	1,519-20,388
8-15dana	6,3	0,012	5,4	1,450-20,655
≥16 dana	9,9	0,002	8,4	2,236-31,529
Cefalosporini	4,9	0,027	2,2	1,093-4,351
Fluorohinoloni	2,5	0,111	1,8	0,865-4,066

Wald-Wald statistika *p*-statistička značajnost; RR-relativni rizik; CI-interval poverenja; Ger-gerijatrija, HO-hemato-onkologija; AIB-akutne infektivne bolesti; JIL-jedinica intenzivnog lečenja; HD-hemodijaliza.

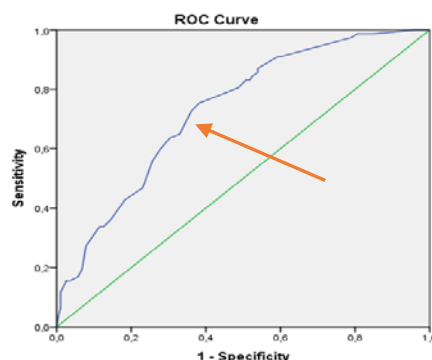
Prema definisanim statističkim kriterijumima (*p* vrednost), izdvojeno je devet koraka. U drugom koraku je isključena je promenljiva „CVB“ (*p*=0,983), u trećem „CVB“ (*p*=0,988) i „JIL procedure bez CVK“ (*p*=0,862). U četvrtom koraku su isključene: „CVB“ (*p*=0,975), „hipoalbuminemija“ (*p*=0,818) i „JIL procedure bez CVK“ (*p*=0,855). U petom koraku je, pored prethodno nabrojanih varijabli, isključena i varijabla „primena antimikrobnog leka u toku bolničkog lečenja“ (*p*=0,575). U šestom koraku, pored svih prethodno nabrojanih varijabli, isključena je i varijabla „metronidazol“ (*p*=0,766). U sedmom koraku je, pored svih prethodno nabrojanih varijabli, isključena i varijabla „hirurška intervencija u toku bolničkog lečenja“ (*p*=0,208). U osmom koraku je, pored svih prethodno nabrojanih varijabli, isključena i varijabla „uzrast (godine) ≥65“ (*p*=0,167). U devetom koraku je, pored svih prethodno nabrojanih varijabli, isključena i varijabla „fluorohinoloni“ (*p*=0,109). Deveti korak, i poslednji korak u multivarijantnoj analizi, predstavlja traženi, optimalni model. U našem modelu, kao značajni prediktori izdvojile su se sledeće varijable: „klinička odeljenja“, „dužina bolničkog lečenja pre uzorkovanja“ i „cefalosporini“.

Varijabla „fluorohinoloni“ nije bila statistički značajna, međutim, uvidom u dodatne statističke parametre, kao što je interval poverenja, može se primetiti da je donja granica intervala poverenja za navedenu varijablu blizu 1, tako da je verovatno da bi ova varijabla postala značajna sa povećanjem veličine uzorka. Zbog toga smo varijablu „fluorohinoloni“ ostavili u modelu.

Nezavisni prediktori za nastanak VRE kolonizacije među ispitanicima hospitalizovanim na kliničkim odeljenjima sa povišenim rizikom za nastanak VRE kolonizacije bili su hospitalizacija na kliničkim odeljenjima, hospitalizacija pre uzorkovanja duža od tri dana, primena cefalosporina i flourohinolona.

U odnosu na odeljenje za hemodijalizu, boravak na odeljenju za gerijatriju povećava rizik za VRE kolonizacije 6,5 puta, boravak u JIL povećava rizik 5 puta, a boravak na hemato-onkološkom odeljenju 4,7 puta. Hospitalizacija na odeljenju za akutne infektivne bolesti povećava rizik za VRE kolonizaciju 2 puta, međutim ova varijabla nije bila statistički značajna. U odnosu na ispitanike koji su hospitalizovani 48 sati pre uzorkovanja stolice na VRE, ispitanici koji su hospitalizovani 3-7 dana pre uzorkovanja imali su 5,6 puta veći rizik za VRE kolonizaciju, ispitanici hospitalizovani 8-15 dana pre uzorkovanja imali su 5,5 puta veći rizik za VRE kolonizaciju, dok su ispitanici hospitalizovani duže od 16 dana pre uzorkovanja imali 8,4 puta veći rizik za VRE kolonizaciju. Primena cefalosporina je povećala rizik za VRE kolonizaciju 2,2 puta, a fluorohinolona 1,8 puta.

Izvršena je evaluacija dobijenog modela: Vrednost Omnibus testa je:  $p < 0,001$ , te možemo reći da naš model dobro fituje empirijske podatke. Nagelkerke  $R^2$  iznosi 0,206, odnosno 20,6 % promena u zavisnoj varijabli se može objasniti promenama u ovim nezavisnim varijablama. Rezidualno variranje je 79,4%, odnosno, 79,4% promena zavisi od nekih drugih varijabli. Vrednost Hosmer-Lemeshow testa je  $p = 0,804$ , što govori da ne postoji značajno odstupanje između opserviranog i očekivanog rizika. Odnosno, model je dobro kalibrisan. Klasifikaciona tačnost modela je 72,8%. Model je pokazao dobru diskriminatornu sposobnost (AUC: 0,732;  $p \leq 0,001$ ) (Slika 20). Validacija modela je izvršena na 74,3% ispitanika, odnosno na 198 ispitanika: Vrednost Omnibus testa je:  $p < 0,001$ , te možemo reći da naš model dobro fituje empirijske podatke. Nagelkerke  $R^2$  iznosi 0,232, odnosno 23,2% promena u zavisnoj varijabli se može objasniti promenama u ovim nezavisnim varijablama. Rezidualno variranje je 76,8%, odnosno, 76,8% promena zavisi od nekih drugih varijabli. Vrednost Hosmer-Lemeshow testa je  $p = 0,364$ , što govori da ne postoji značajno odstupanje između opserviranog i očekivanog rizika. Odnosno, model je dobro kalibrisan. Klasifikaciona tačnost modela je 74,3%. Model je pokazao dobru diskriminatornu sposobnost (AUC: 0,732;  $p \leq 0,001$ ). Model je validan i može da se koristi.



Slika 20. ROC (Receiver Operating Characteristic Curve) kriva i AUC (Area Under the Curve). Model je označen strelicom.



#### 4.18. Antimikrobna rezistencija i fenotipski profil izolata

Za svih 77 izolata preliminarno identifikovanih na hromogenoj CHROMID®VRE podlozi kao VRE<sub>fm</sub>, BD Phoenix™ automatizovani mikrobiološki sistem je dao potvrdu identifikacije i potvrdu rezistencije na vankomicin. Od 77 izolovanih VRE, svih 77 je bilo VRE<sub>fm</sub>. Takođe, svih 77 VRE<sub>fm</sub> izolata je pored rezistencije na vankomicin bilo rezistentno i na teikoplanin, odnosno, svih 77 VRE<sub>fm</sub> izolata je imalo VanA fenotip (visok nivo rezistencije na vankomicin i varijabilni nivo rezistencije na teikoplanina) (Tabela 31). Ispitivanje antimikrobne osetljivosti pokazalo je da su svi ispitivani VRE<sub>fm</sub> izolati MDR VRE<sub>fm</sub>. Pored rezistencije na vankomicin i teikoplanin ispitivani VRE<sub>fm</sub> izolati su ispoljili visok stepen rezistencije na gotovo sve testirane antimikrobne lekove, osim na linezolid i tigeciklin na koje su svi bili osetljivi. Šest izolata (7,8%) je bilo osetljivo na ampicilin. Neočekivano, 38,9% VRE<sub>fm</sub> izolata je bilo rezistentno na Q-D (Tabela 31).

Tabela 31. Ispitivanje osetljivosti VRE<sub>fm</sub> na različite klase antimikrobnih agenasa (N=77).

Antimikrobni agensi	VRE <sub>fm</sub> izolati	
	Rezistencija	
	Broj	%
AMP	71	92,2
IMP	71	92,2
CIP	75	97,4
LEV	75	97,4
GEN-HLS	69	89,6
STR-HLS	73	94,8
TEI	77	100
Q-D	30	38,9
TIG	0	0
LIN	0	0

AMP - Ampicilin; IMP - Imipenem; CIP - Ciprofloksacin; LEV - Levofloksacin; GEN-HLS - Gentamicin-visok nivo rezistencije na aminoglikozide; STR-HLS - Streptomycin- visok nivo rezistencije na aminoglikozide; TEI - Teikoplanin; Q-D - Kvinupristin-dalfopristin;

Izrada fenotipskog profila za svaki pojedinačni ispitivani VRE<sub>fm</sub> izolat pokazala je da je prisutno osam profila antimikrobne rezistencije (Tabela 32). Dva fenotipska profila su bila dominantna i zastupljena su kod 85,7% izolata.

Fenotipski profil sa najvećom učestalošću, od 62,3% (48/77) uključivao je rezistenciju na sve ispitivane antimikrobne agense osim Q-D, linezolid i tigeciklin. Fenotipski profil koji je obuhvatio rezistenciju na sve testirane antimikrobne agense osim linezolid i tigeciklin, sledeći je po učestalosti i zastupljen je sa 23,4% (18/77). Šest VRE<sub>fm</sub> izolata koji su bili osetljivi na ampicilin imali su različite fenotipske profile. Četiri od pomenutih šest izolata je bilo osetljivo na ampicilin (osetljiv, standardni režim doziranja) i imipenem (osetljiv, povećana izloženost), a rezistentno na sve ostale ispitivane antimikrobne agense. Jedan VRE<sub>fm</sub> izolat (1,3%) je osim rezistencije na vankomicin i teikoplanin, bio osetljiv na sve ostale ispitivane antimikrobne agense.

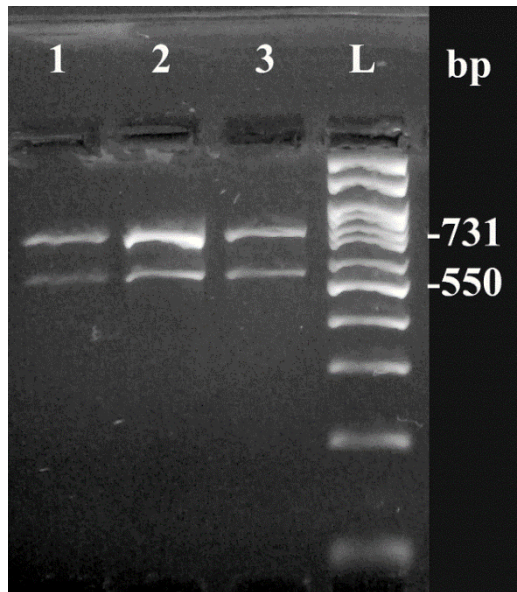
Tabela 32. Fenotipski profil VRE $fm$  izolata.

Fenotipski profil rezistencije	VRE $fm$ sojevi	
	Broj	%
AMP-IMP-CIP-LEVO-GEN-HLS-STR-HLS-TEI	48	62,3
AMP-IMP-CIP-LEVO-GEN-HLS-STR-HLS-TEI-Q-D	18	23,4
CIP-LEVO-GEN-HLS-STR-HLS-TEI-Q-D	4	5,2
AMP-IMP-CIP-LEVO-STR-HLS-TEI-Q-D	2	2,6
AMP-IMP-CIP-LEVO-GEN-HLS-TEI-Q-D	2	2,6
CIP-LEVO-GEN-HLS-TEI	1	1,3
AMP-IMP-TEI-Q-D	1	1,3
TEI-Q-D	1	1,3
Ukupno	77	100

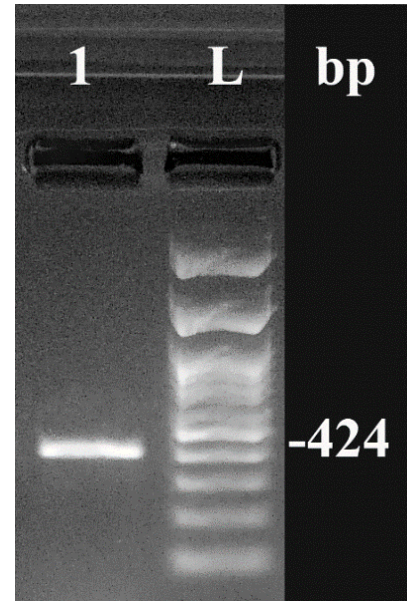
AMP - Ampicilin; IMP - Imipenem; CIP - Ciprofloksacin; LEV - Levofloksacin; GEN-HLS - Gentamicin-visok nivo rezistencije na aminoglikozide; STR-HLS - Streptomycin- visok nivo rezistencije na aminoglikozide; TEI - Teikoplanin; Q-D - Kvinupristin-dalfopristin

#### 4.19. Genotipski profil izolata

PCR analiza za molekularnu potvrdu identifikacije VRE izolata detekcijom vrsno specifičnih gena i gena nosioca rezistencije na glikopeptidne antimikrobne agense, urađena je na uzorcima bakterijske DNK dobijene prečišćavanjem ispitivanih izolata. Analiza je potvrdila da je svih 77 ispitivanih izolata nosilo D-alanin–D-alanin ligaza gen specifičan za *E. faecium* (*ddl<sub>E. faecium</sub>*), odnosno da svih 77 izolata pripada vrsti VRE $fm$ . Analiza je, takođe, potvrdila da je svih 77 ispitivanih izolata koji su prethodno pokazali fenotipski VanA tip rezistencije nosilo *vanA* gen, odnosno da ispoljava *vanA* tip rezistencije na vankomicin (Slika 21) (Tabela 33).



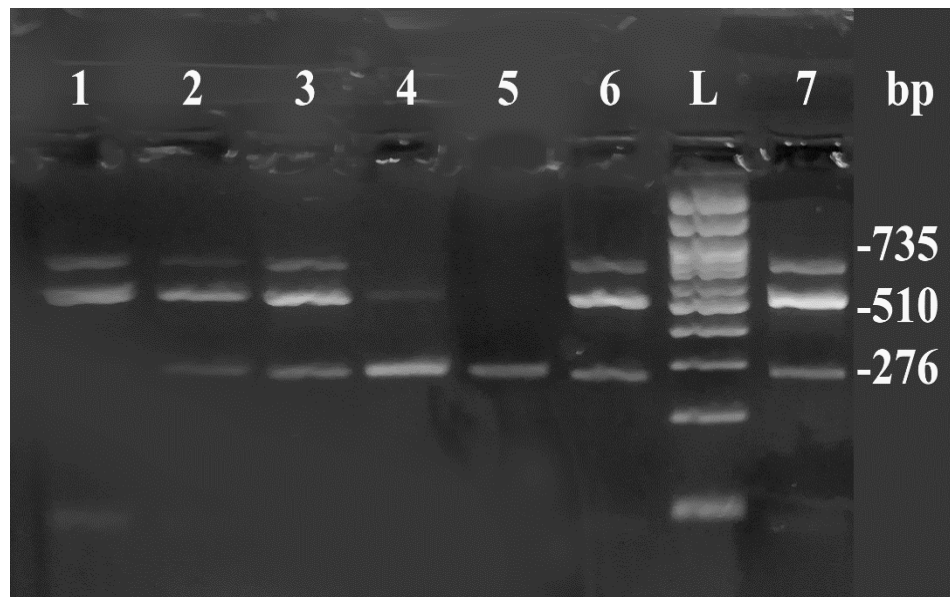
Slika 21. Agarozna gel elektroforeza PCR produkata za vrsno specifične gene (550 bp) i gene nosioce rezistencije na glikopeptidne antimikrobne lekove (731 bp).



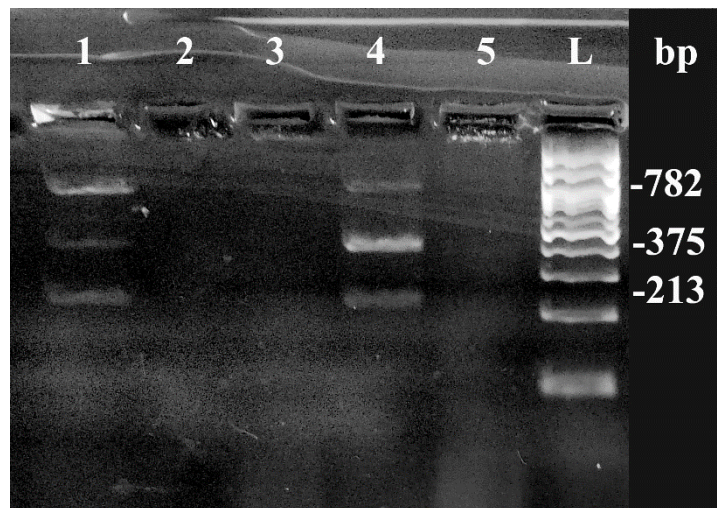
Slika 22. Agarozna gel elektroforeza PCR produkata za gene nosioce rezistencije na quinupristin-dalfopristin (424 bp).

PCR analiza za molekularnu potvrdu Q-D rezistencije detekcijom gena nosioca rezistencije na Q-D, urađena je na uzorcima bakterijske DNK dobijene prečišćavanjem ispitivanih izolata. Analiza je potvrdila da su svi izolati koji pokazuju fenotipsku rezistenciju nosili gen *ermB1*. Ostali geni povezani sa rezistencijom na Q-D (*vatD*, *vatE*, *vgaA*) nisu bili detektovani (Slika 22) (Tabela 33).

Genetska analiza prisustva gena virulencije otkrila je da je kod 84% (65/77) VRE*fm* izolata detektovan *esp* gen koji kodira enterokokni površinski protein. Slede *efaA* gen koji kodira adhezin ćelijskog zida, koji je zastupljen sa 71,2% (55/77) i *hyl* gen koji kodira hijaluronidazu zastupljen sa 54% (42/77) (Slike 23 i 24) (Tabela 33).



Slika 23. Agarozna gel elektroforeza PCR produkata za gene nosioce faktora virulencije: *cpd* (782 bp), *asa1* (375 bp) i *gelE* (276 bp).



Slika 24. Agarozna gel elektroforeza PCR produkata za gene nosioce faktora virulencije: *efaA* (735 bp), *esp* (510 bp) i *hyl* (276 bp).

Tabela 33. Genotipski profil VRE<sub>fm</sub> izolata.

Genotipski profil	Broj	%
Geni identifikacije		
<i>ddl</i> <sub>E. faecium</sub>	77	100
<i>ddl</i> <sub>E. faecalis</sub>	0	0
Geni rezistencije na vakomicin		
<i>vanA</i>	77	100
<i>vanB</i>	0	0
<i>vanC</i> (C1 i C2/3)	0	0
Geni rezistencije na Q-D		
<i>vatD</i>	0	0
<i>vatE</i>	0	0
<i>vgbA</i>	0	0
<i>ermB1</i>	30	38,9
Geni virulencije		
<i>esp</i>	65	84,0
<i>efaA</i>	55	71,2
<i>hyl</i>	42	54,5
<i>asa1</i>	18	23,4
<i>gelE</i>	9	11,6
<i>cpd</i>	9	11,6
Broj gena virulencije po izolatu		
0	8	10,4
1	4	5,2
2	20	26,0
3	34	44,0
4	4	5,2
5	4	5,2
6	3	4,0

*ddl*<sub>E. faecium</sub> - D-alanin–D-alanin ligaza gen specifičan za *E. faecium*; *ddl*<sub>E. faecalis</sub> - D-alanin–D-alanin ligaza gen specifičan za *E. faecalis*; *van A* – *van A* tip rezistencije na vankomicin; *vanB* - *van B* tip rezistencije na vankomicin; *vanC* (C1and C2/3) – *van C* tip rezistencije na vankomicin; *vat*(D) i *vat*(E) – geni rezistencije na streptogramin A; *vgb*(A) i *ermB*-1- geni rezistencije na streptogramin B; *esp* – gen koji kodira enterokokni površinski protein; *hyl* - gen koji kodira hialuronidazu; *efaA* – gen koji kodira adhezin ćelijskog zida; *asa1*- gen koji kodira agregacionu supstancu; *gelE* - gen koji kodira želatinazu; *cpd* - gen koji kodira seks feromon.

Broj gena koji kodiraju faktora virulencije po VRE<sub>fm</sub> izolatu je bio različit i kretao se od 0 do 6. Najveći broj izolata, 44% (34/77) nosio je tri od šest ispitivanih gena za faktore virulencije, dok je 26% (20/77) izolata nosilo dva gena koji kodiraju faktore virulencije. Tri izolata su nosila sve ispitivane gene, a deset izolata nije imalo ni jedan od ispitivanih gena za kodiranje faktora virulencije, a 58,4% izolata nosi minimum tri gena za faktore virulencije (Tabela 33).



#### 4.20. Ispitivanje klonalne povezanosti i klonalne diseminacije izolovanih VRE sojeva - MLVA analiza

Da bi se procenila filogenetska povezanost VRE*fm* izolata, izvršena je MLVA analiza izolovanih sojeva. Od ukupno 77 VRE*fm* izolata, 93,5% (72/77) je generisalo MLVA profil (Slike 25-30). Za 5/77 (6,5%) izolata MLVA profil nije mogao da se formira, i to: dva izolata nisu dala PCR produkt za lokuse VNTR-2 i VNTR-10, jedan izolat nije dao PCR produkt za VNTR-1, VNTR-7 i VNTR10 lokuse, jedan izolat nije dao PCR produkt za VNTR-9 lokus, a jedan za VNTR-2 lokus. Od netipabilnih izolata, samo je jedan izolat bio osetljiv na ampicilin dok su osatli bili ampicilnin rezistentni. Analiza diverziteta pojedinačnih VNTR lokusa pokazala je da je najveća raznolikost u VNTR-7 lokusu za koji je Simpsonov indeks diverziteta 74,9%, a najniži je za VNTR-8 lokus i iznosi 8,2%. Za VNTR-1 lokus je 13,3%, za VNTR-2 je 11%, za VNTR-9 je 58,9% a za VNTR-10 lokus 51,2%.

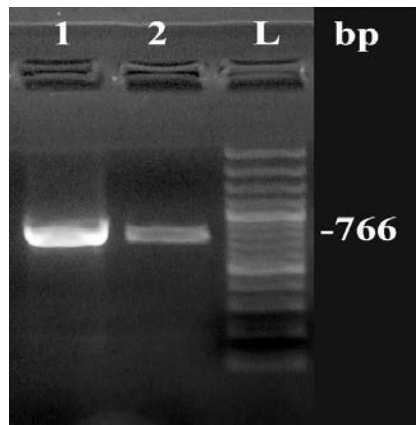
MLVA analiza je otkrila 29 različitih MLVA tipova, od kojih je 25 sa jedinstvenim profilima koji nisu otkriveni ranije. Simpsonov indeks diverziteta (1-D) među izolatima je bio 0,94 (94%). Shanon H indeks je iznosio 3,01, a Shanon E indeks 0,88.

Analizom filogenetske povezanosti ispitivanih izolata otkriveno je 13 klastera koji su obuhvatili 56/72 (77,7%) izolovanih VRE*fm* sojeva (Slike 31 i 32). Tri najveća klastera su obuhvatila: 12 (SRB2), 9 (SRB16) i 7 (MT161) izolata, dok je preostalih 10 klastera obuhvatilo od 2 do 4 izolata. Šesnaest VRE*fm* izolata (22,2%) nije bilo klonalno povezano i imali su jedinstvene genotipove. Klaster MT-161 predstavlja SLD varijantu MT-159, odnosno došlo je do izmene u tandem ponovcima sa 7 na 9 u VNTR-2 lokusu. Klaster SRB16 predstavlja SLV MT-161 (izmena u tandem ponovcima 3 na 4 u VNTR-7 ) i DLV MT-159 (izmena u tandem ponovcima 3 na 4 u VNTR-2 i sa 7 na 9 u VNTR-2 lokusu). Klaster SRB2 predstavlja SLV MT-340 (izmena u tandem ponovcima sa 7 na 9 u VNTR-2 lokusu).

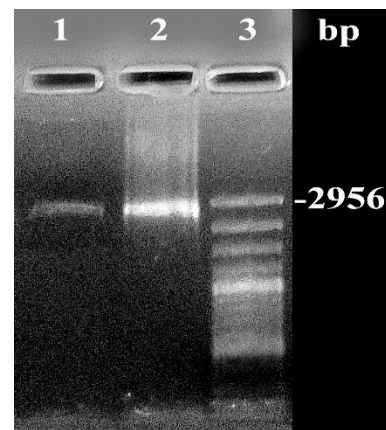
Analiza profila VNTR-7, 8 i 10, pokazala je da profil 3-3-3, 3-3-2 i 4-3-3 ima 24 od 72 izolata odnosno 33,3%. Profil 3-3-3 ima 5,5% (4/72); profil 3-3-2 ima 12,5% (9/72); profil 4-3-3 ima 15,3% (11/72). Svi izolati koji pripadaju MT-161 klasteru su imali 3-3-2 profil. U okviru klastera SRB16 ni jedan izolat nije imao ni jedan od pomenutih profila za VNTR-7,8 i 10 lokuse. Tri od četiri izolata koji pripadaju SRB3 i sva četiri izolata koja pripadaju SRB11 klasteru su imali 4-3-3 profil. Izolati koji pripadaju najvećim klasterima dispergovani po različitim bolničkim odeljenjima (Slika 33). Zanimljivo je da izolati koji pripadaju manjim klasterima (SRB6, SRB9, SRB12) potiču samo sa hematološkog odeljenja i da SRB6 ima VNTR-7,8,10 profil: 4-3-3, a SRB9 3-3-3.

U okviru pojedinačnih VRE*fm* klastera posebno su prikazani markeri CC17 klonskog kompleksa, odnosno rezistencija na ampicilin, rezistencija na ciprofloksacin i prisustvo *esp* i *hyl* gena. Takođe, prikana je i rezistencija na Q-D (Slika 34). Dendrogrami sa matricom korelacije su prikazani za *esp*, *hyl* i *efa* A pozitivne i negativne MT profile i za Q-D rezistentne i osetljive MT profile (Slike 35-38).

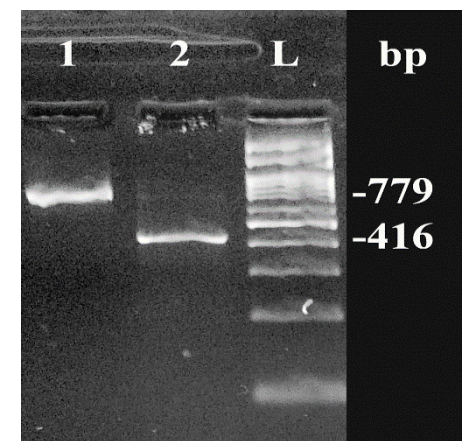
SRB3 MLVA tip je prema geoBURST analizi označen kao začetnik populacije VRE*fm* klonova iz našeg istraživanja, a SRB16, SRB11, SRB1, MT-524 i MT-379 kao najbliži srodnici SRB3 klona (Slika 39). Kombinacijom klonova iz naše populacije sa klonovima detektovanim u istraživanju Jovanović i sar. (116) pokazano je da je začetnik zajedničke populacije SRB3 tip (Slika 40). Upoređivanjem naše populacije sa dostupnom bazom MT klonova pokazano je da su SRB3 i SRB9 najbliži srodnici MT-1 klona, a da je SRB16 najbliži srodnik MT-159 klona (Slike 41 i 42).



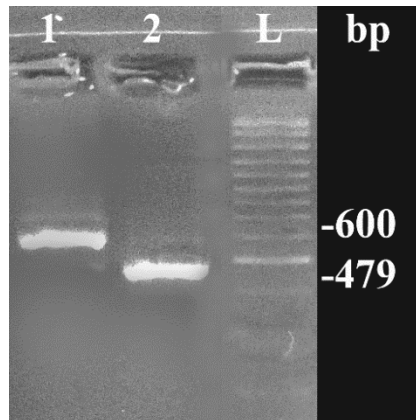
Slika 25. Agarozna gel elektroforeza PCR produkata za VNTR-1 lokus: signal na 766 bp odgovara kodu 5.



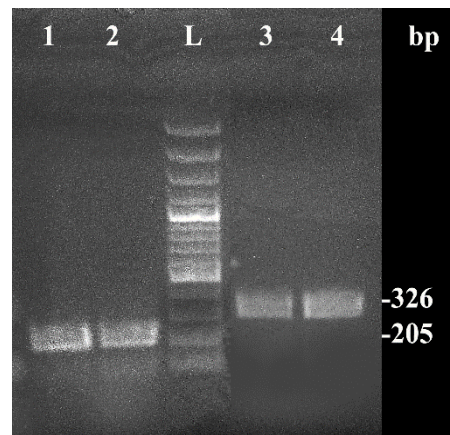
Slika 26. Agarozna gel elektroforeza PCR produkata za VNTR-2 lokus: signal na 2956 bp odgovara kodu 9.



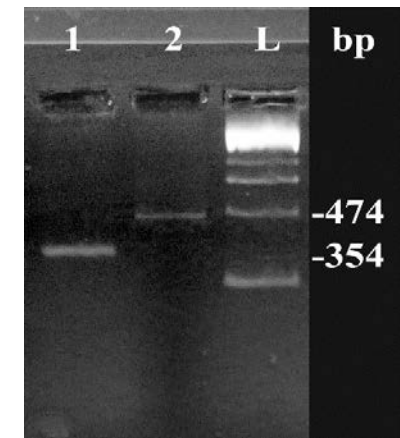
Slika 27. Agarozna gel elektroforeza PCR produkata za VNTR-7 lokus: signal na 779 bp odgovara kodu 4, a signal na 416 bp kodu 1.



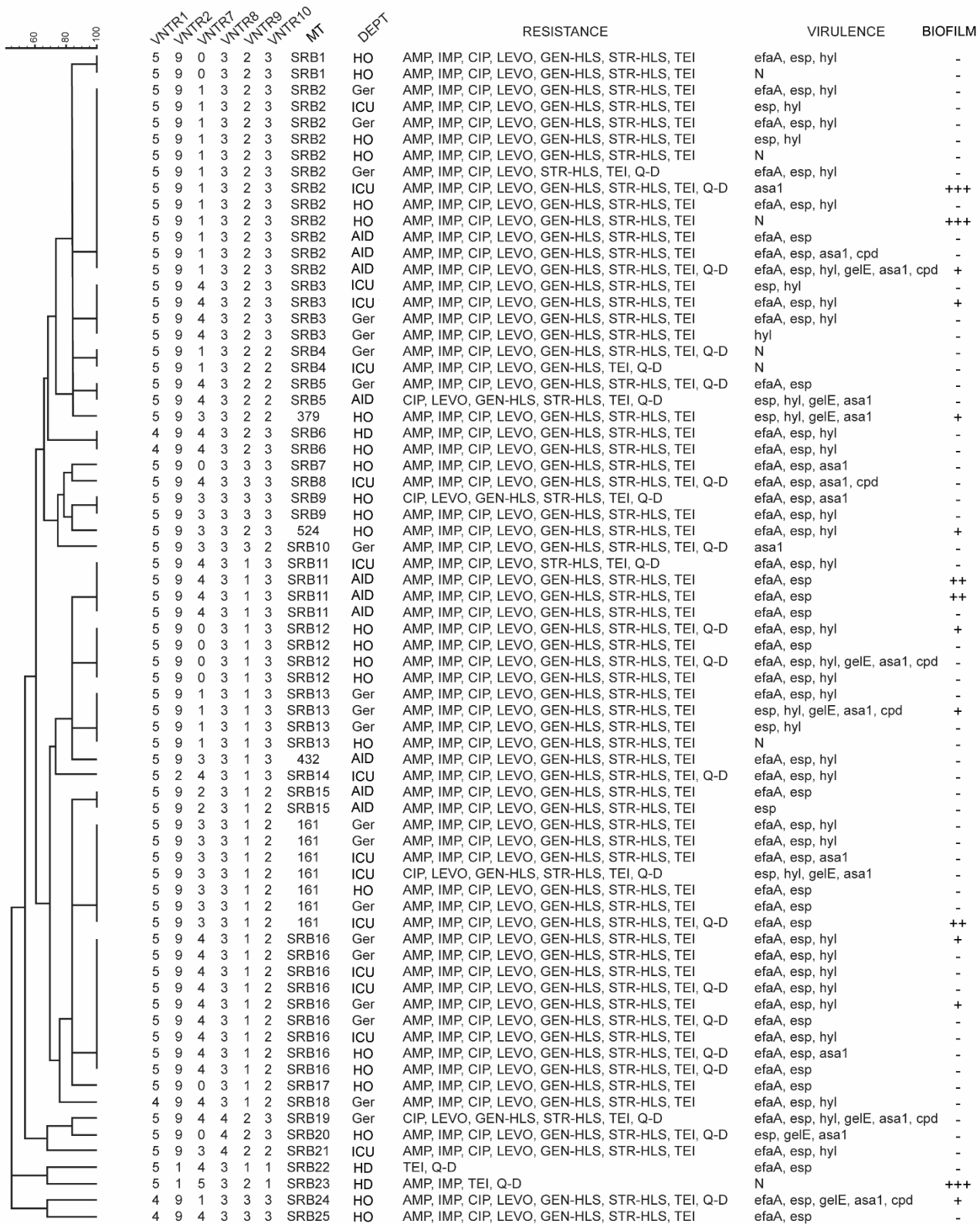
Slika 28. Agarozna gel elektroforeza PCR produkata za VNTR-7 lokus: signal na 600 bp odgovara kodu 4, a signal na 479 bp kodu 3.



Slika 29. Agarozna gel elektroforeza PCR produkata za VNTR-7 lokus: signal na 326 bp odgovara kodu 2, a signal na 205 bp kodu 1.



Slika 30. Agarozna gel elektroforeza PCR produkata za VNTR-7 lokus: signal na 474 bp odgovara kodu 3, a signal na 354 bp kodu 2.



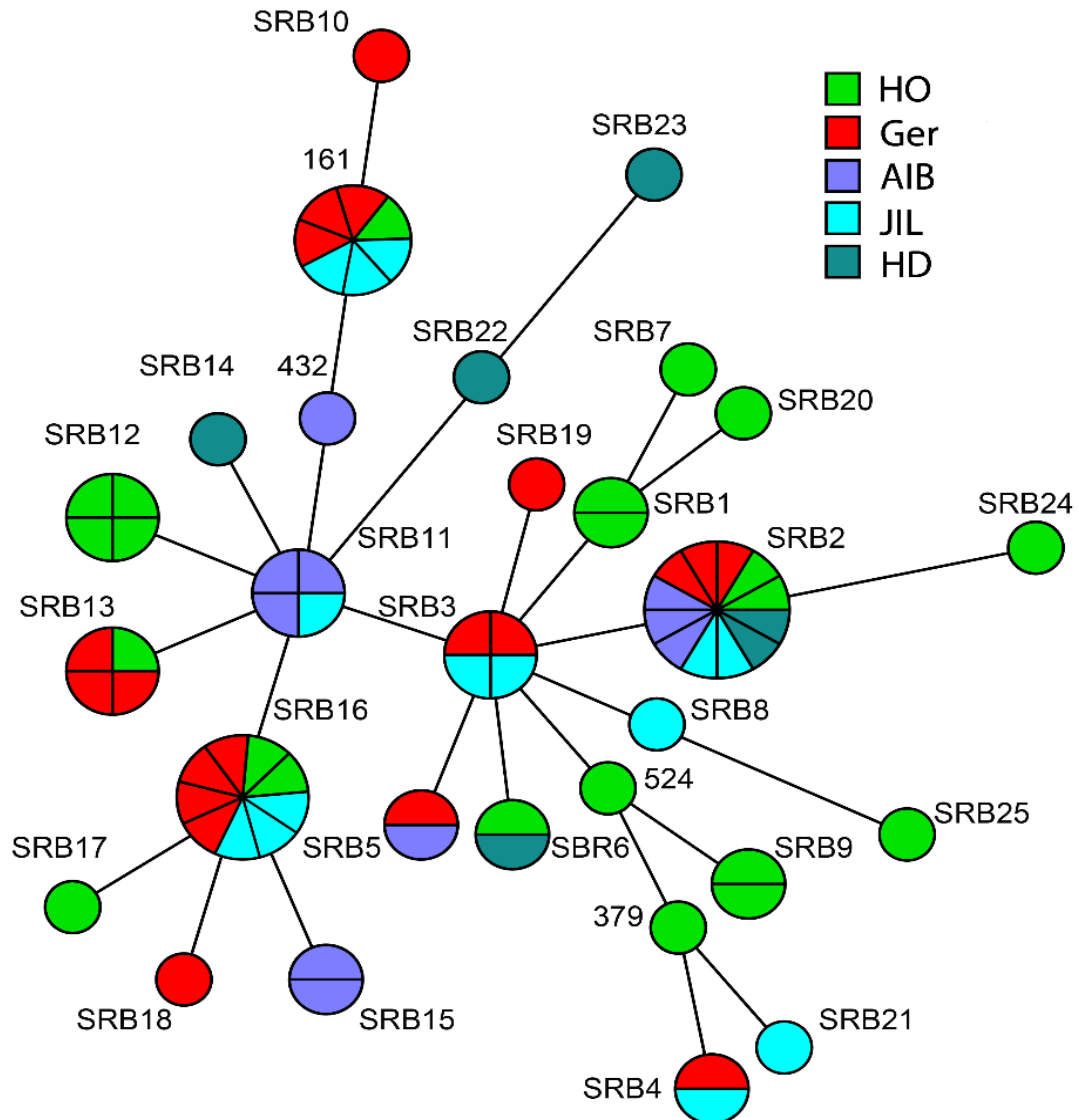
Slika 31. Dendrogram za 72 VRE<sub>fm</sub> izolata koji su generisali MLVA profil.



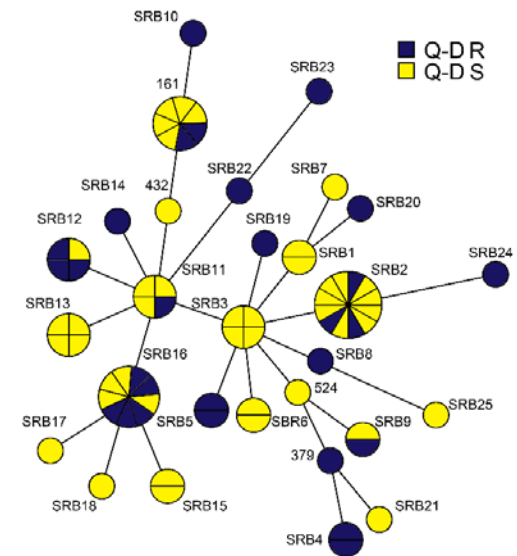
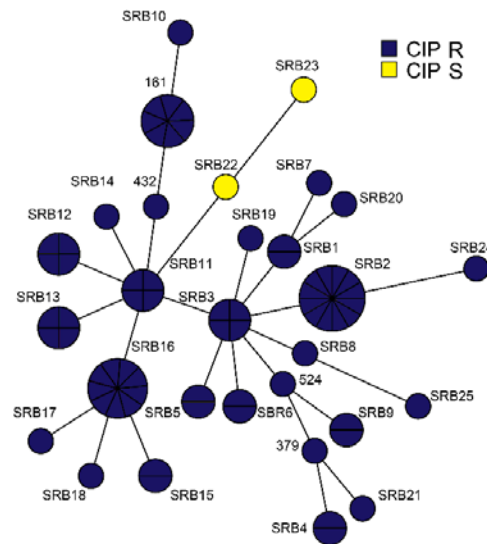
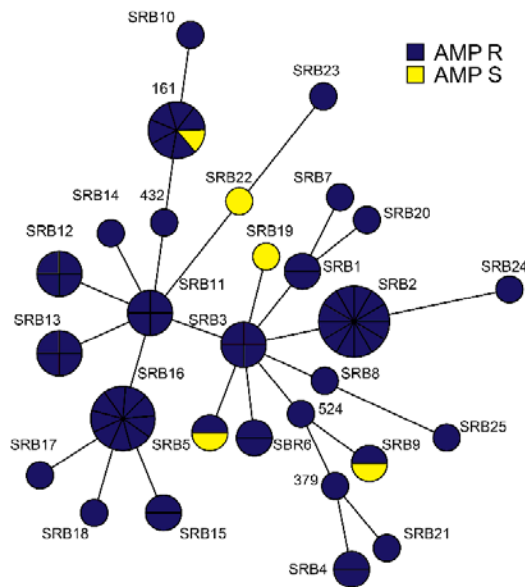
Legenda za dendrogram:VNTR lokusi-variable-number tandem-repeat lokusi; MT-MLVA tip; HO-Hemato-onkologija, Ger-Gerijatrija; ICU- jedinica intenzivnog lečenja; AID- Akutne infektivne bolesti; HD-Hemodijaliza,; AMP - Ampicilin; IMP - Imipenem; CIP - Ciprofloksacin; LEV - Levofloksacin; GEN-HLS - Gentamicin-visok nivo rezistencije na aminoglikozide; STR-HLS - Streptomycin- visok nivo rezistencije na aminoglikozide; TEI - Teikoplanin; Q-D - Quinupristin-dalfopristin; *esp* – gen koji kodira Enterokokni površinski protein; *hyl* - gen koji kodira hijaluronidazu; *efaA* – gen koji kodira adhezin ćelijskog zida; *asal*- gen koji kodira agregacionu supstancu; *gelE* - gen koji kodira želatinazu; *cpd* - gen koji kodira seks feromon; +-slaba produkcija biofilma –kategorija 1; ++ -umerena produkcija biofilma –kategorija; +++- izražena produkcija biofilma –kategorija; - nema produkcije biofilma



Slika 32. Dendrogram za 72 VRE<sub>fm</sub> izolata koji su generisali MLVA profil prikazan uz matricu korelacije. Svaka ćelija matrice prikazuje koeficijente korelacije između genotipova.



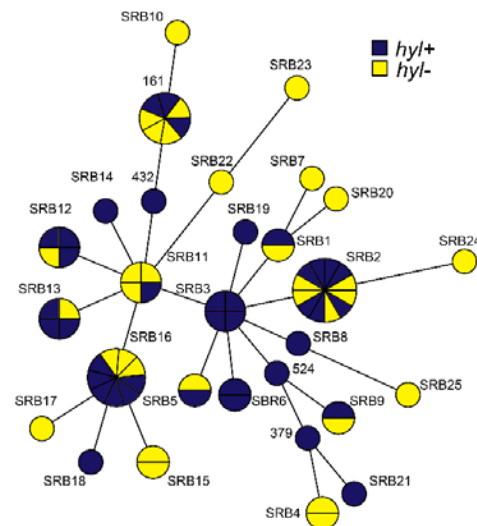
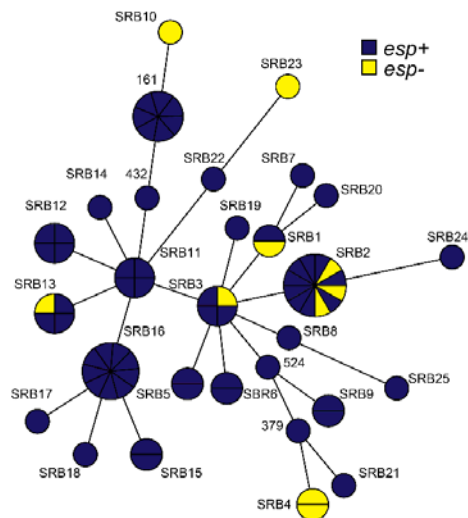
Slika 33. Stablo minimalnog raspona (MST) za 72 VRE izolata koja su generisala MLVA profil u odnosu na klinička odeljenja sa kojih su izolovana. Na slici su obeleženi MLVA tipovi (MT). Na slici se može primetiti da su izolati dispergovani među odeljenjima.



A.

B.

C.

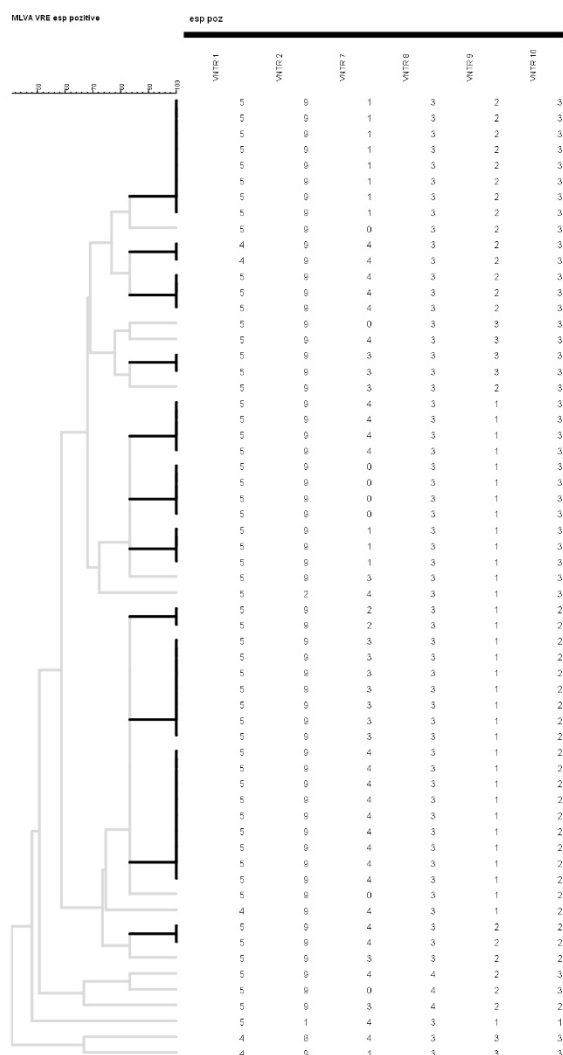


D.

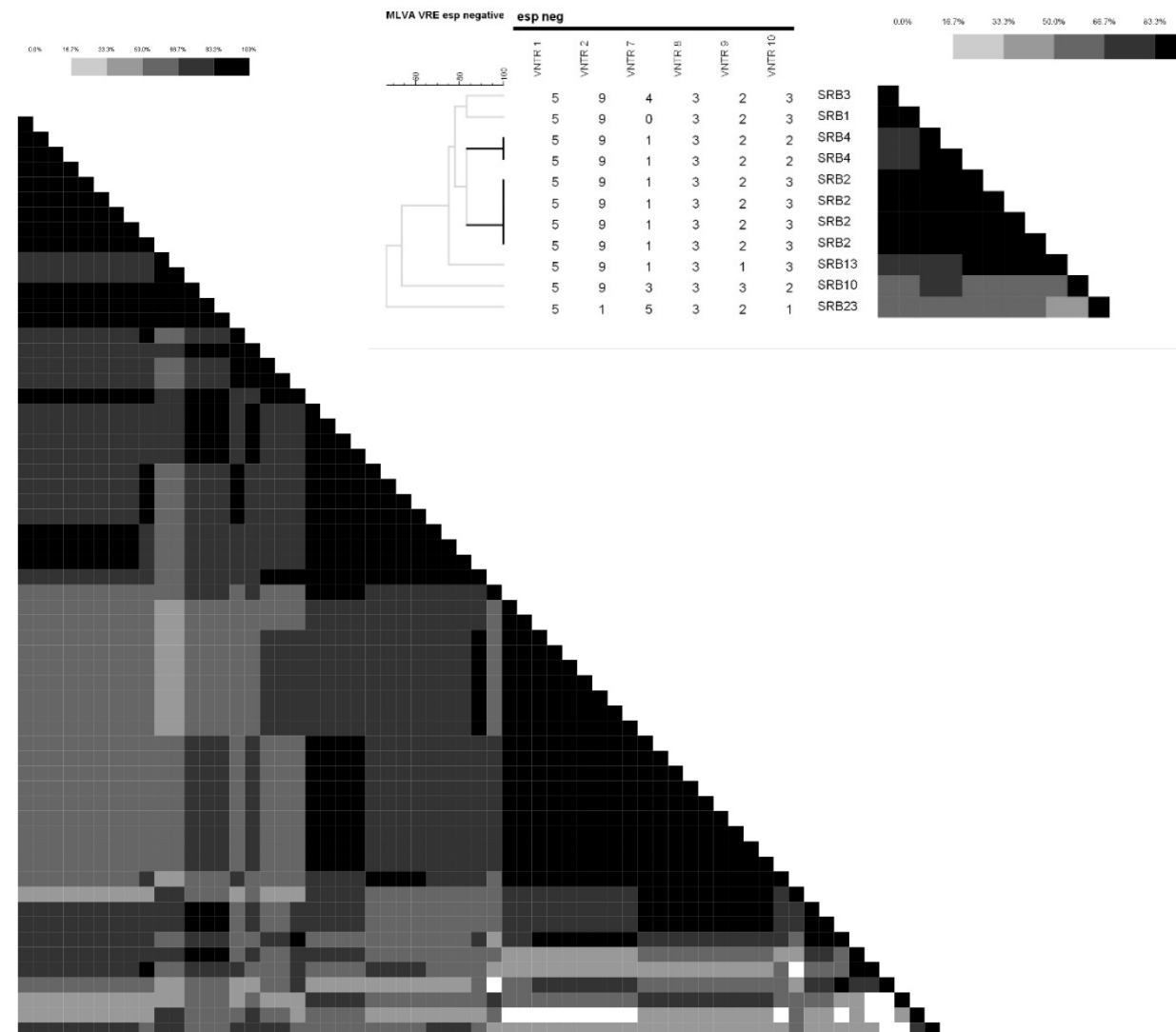
E.

Slika 34. Stablo minimalnog raspona (MST) za 72 VRE izolata koja su generisala MLVA profil u odnosu na: A. Rezistenciju na ampicilin (AMP); B. Rezistenciju na ciprofloksacin (CIP); C. Rezistenciju na kvinupristin-daptopristin (Q-D); D. Prisustvo *esp* gena; E. Prisustvo *hyl* gena. Na slici su obeleženi MLVA tipovi (MT)

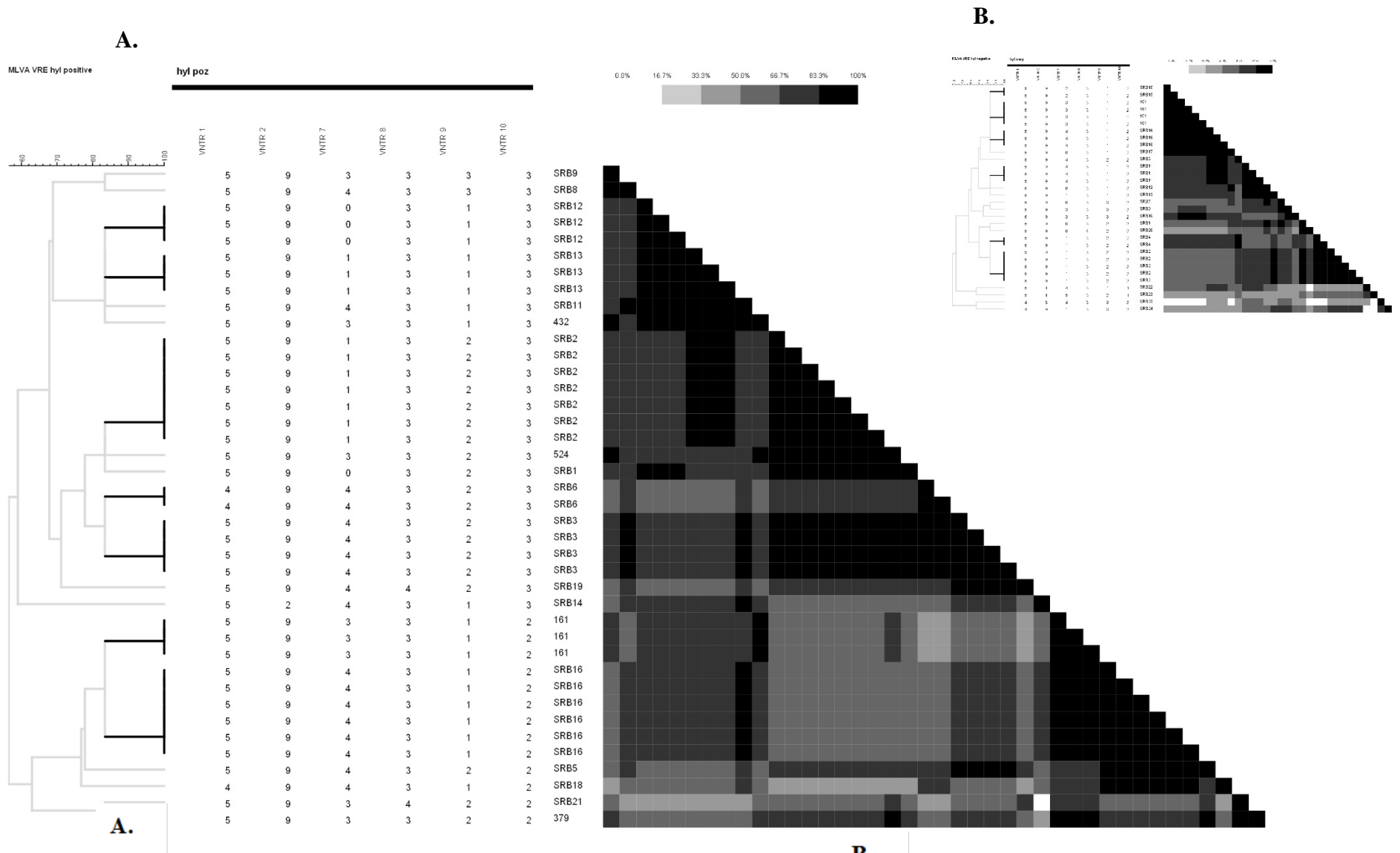
A.



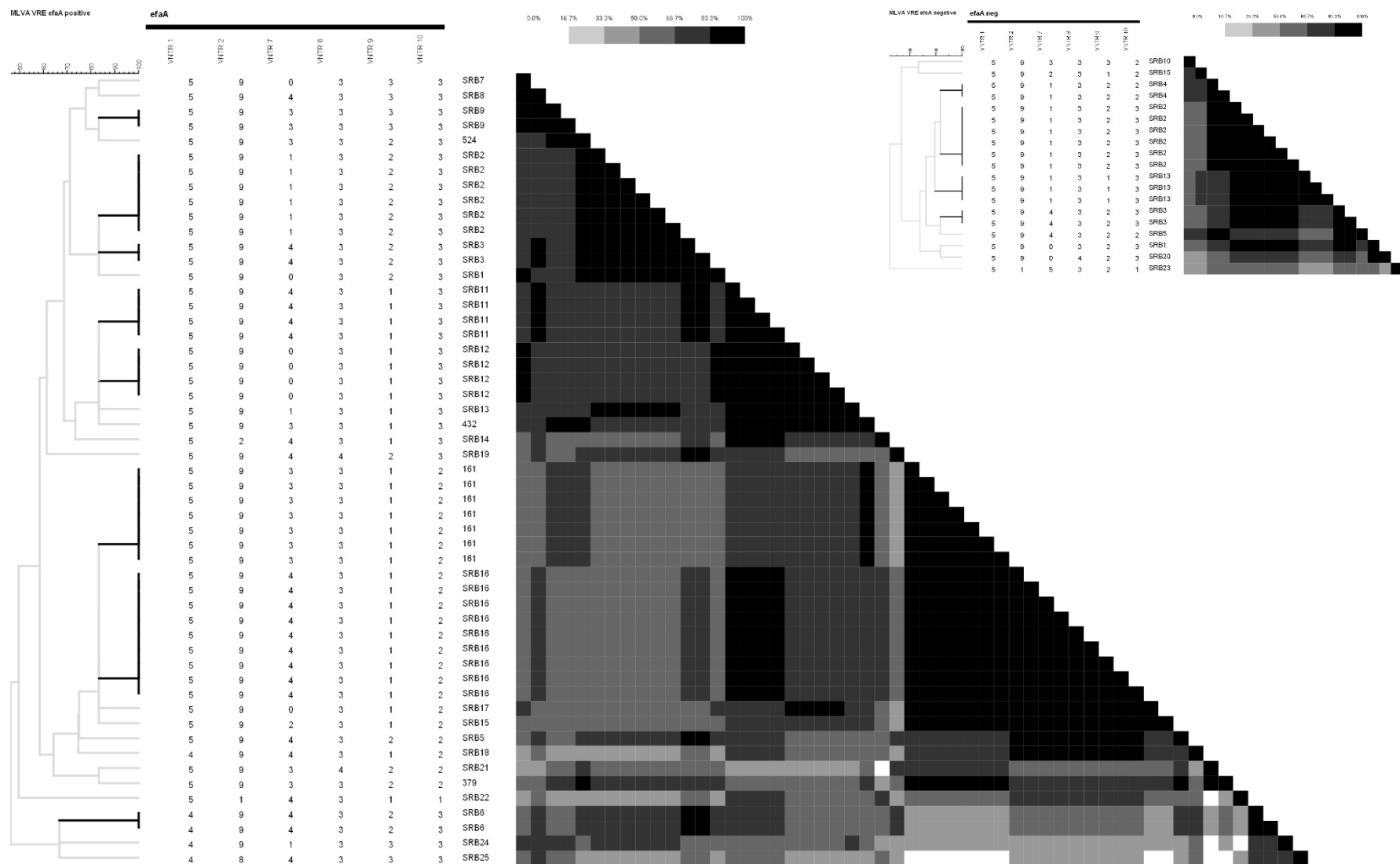
B.



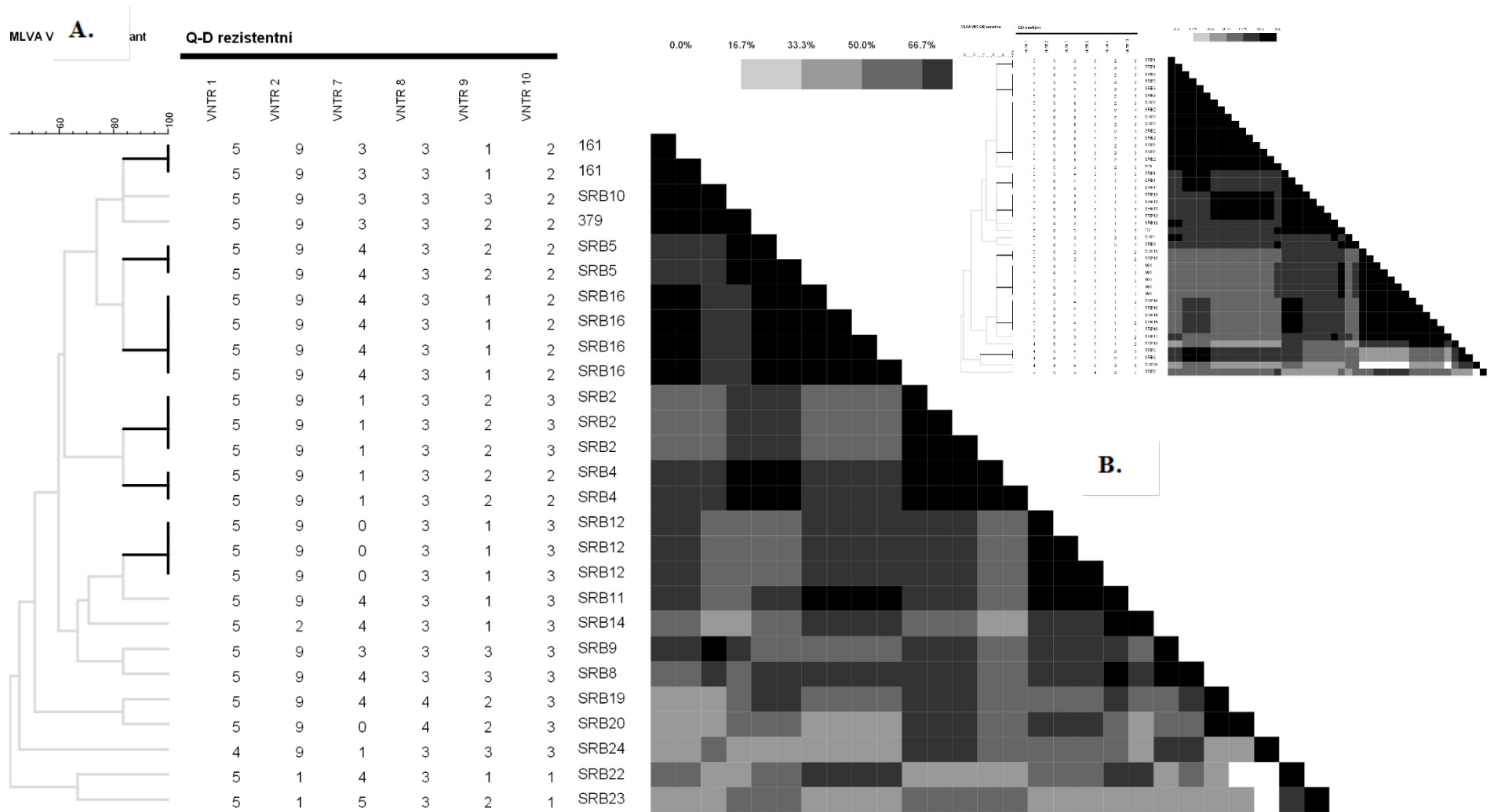
Slika 35: Dendrogram sa matricom korelacije za: A. esp pozitivne MLVA profile (MT)- levo; B. za esp negativne MT-desno.



Slika 36: Dendrogram sa matricom korelacije za: A. *hyl* pozitivne MLVA profile (MT)-l B. za *hyl* negativne MT-desno.

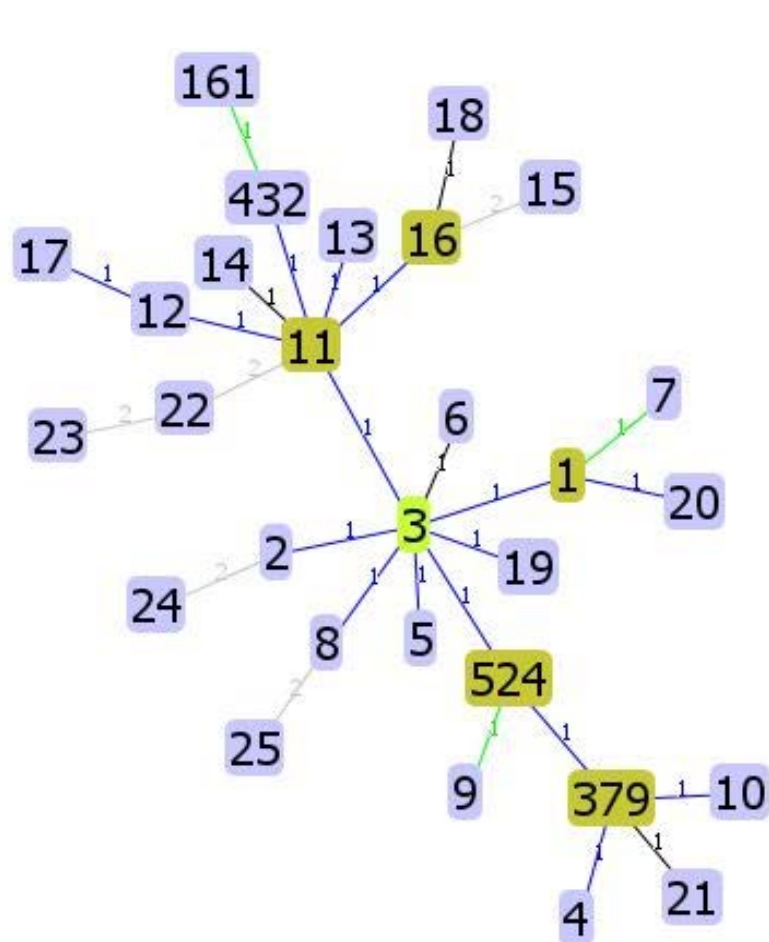


Slika 37: Dendrogram sa matricom korelacije za: A. *efaA* pozitivne MLVA profile (MT)- levo; B. za *efaA* negativne MT-desno.

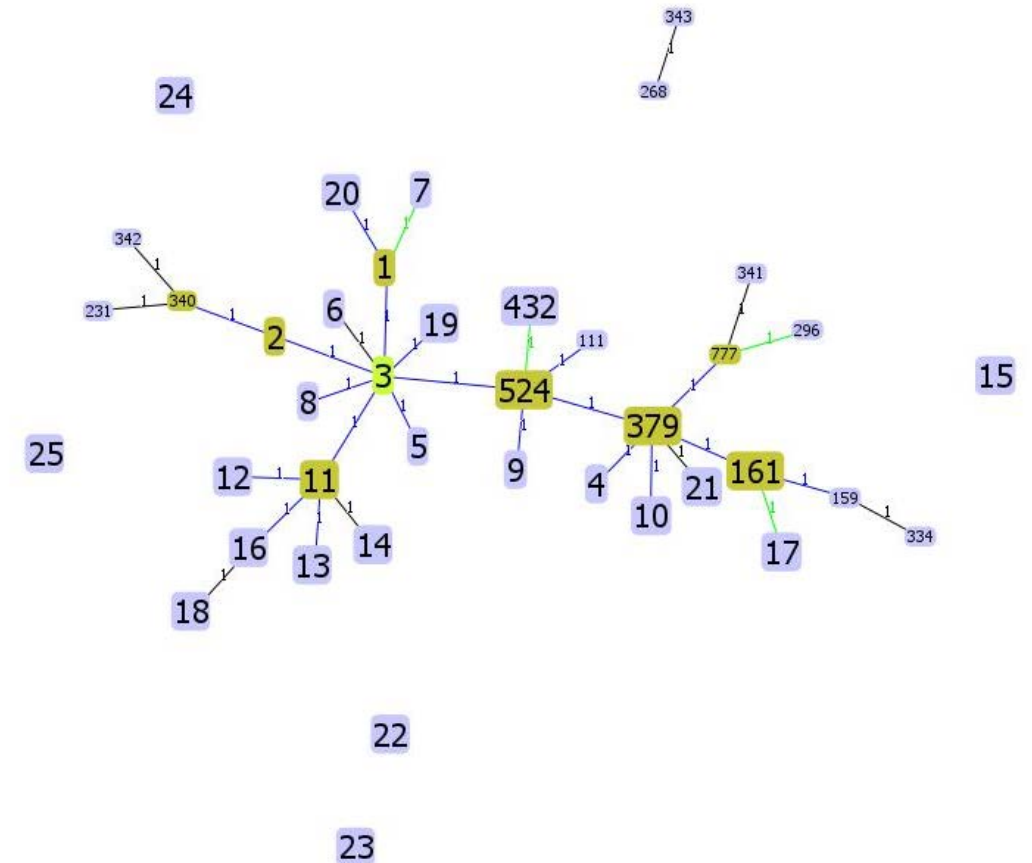


Slika 38: Dendrogram sa matricom korelacije za: A. quinupristin-daftopristin (Q-D) rezistentne MLVA profile (MT)- levo; B. za Q-D osetljive MT-desno.

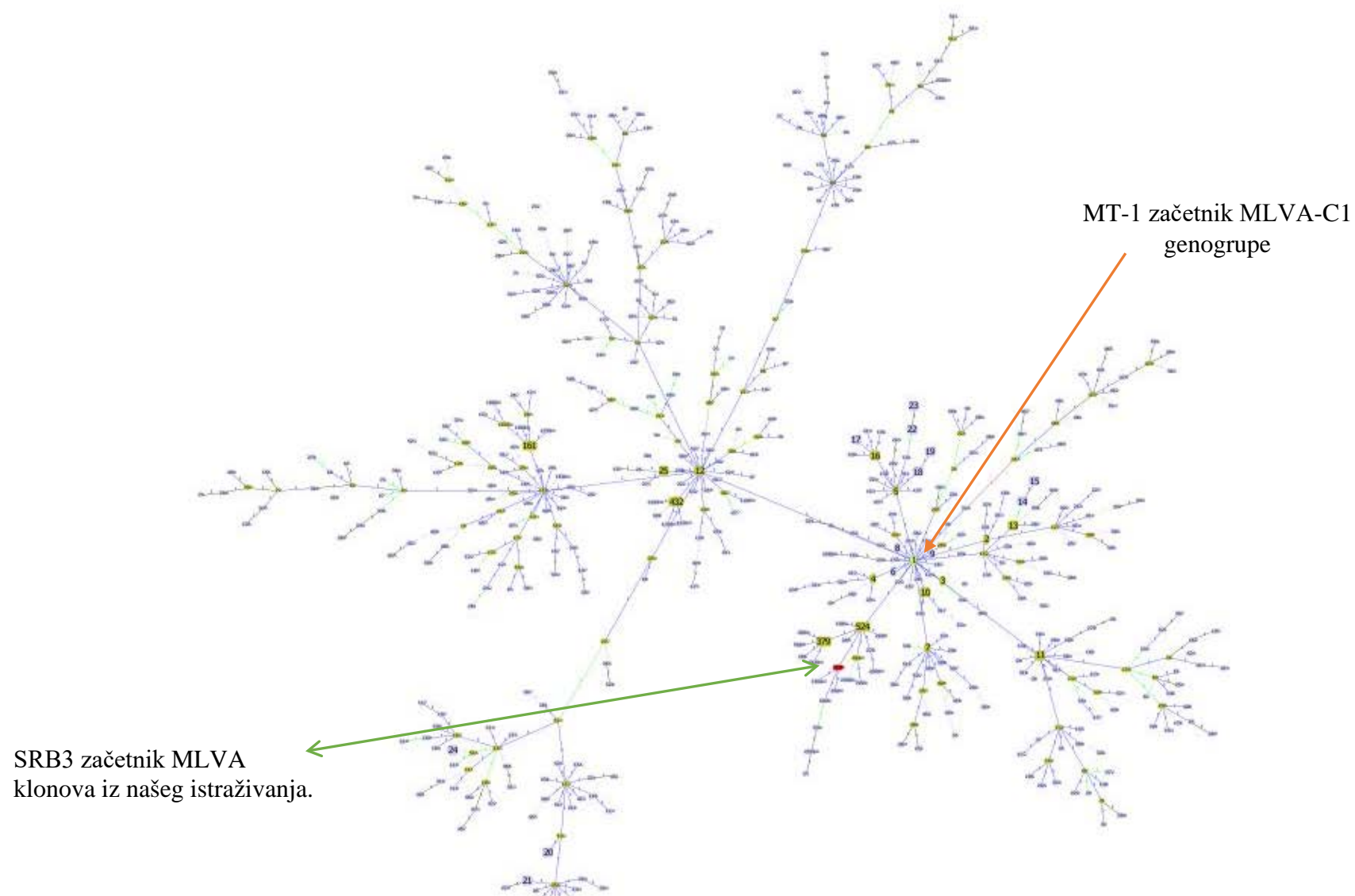




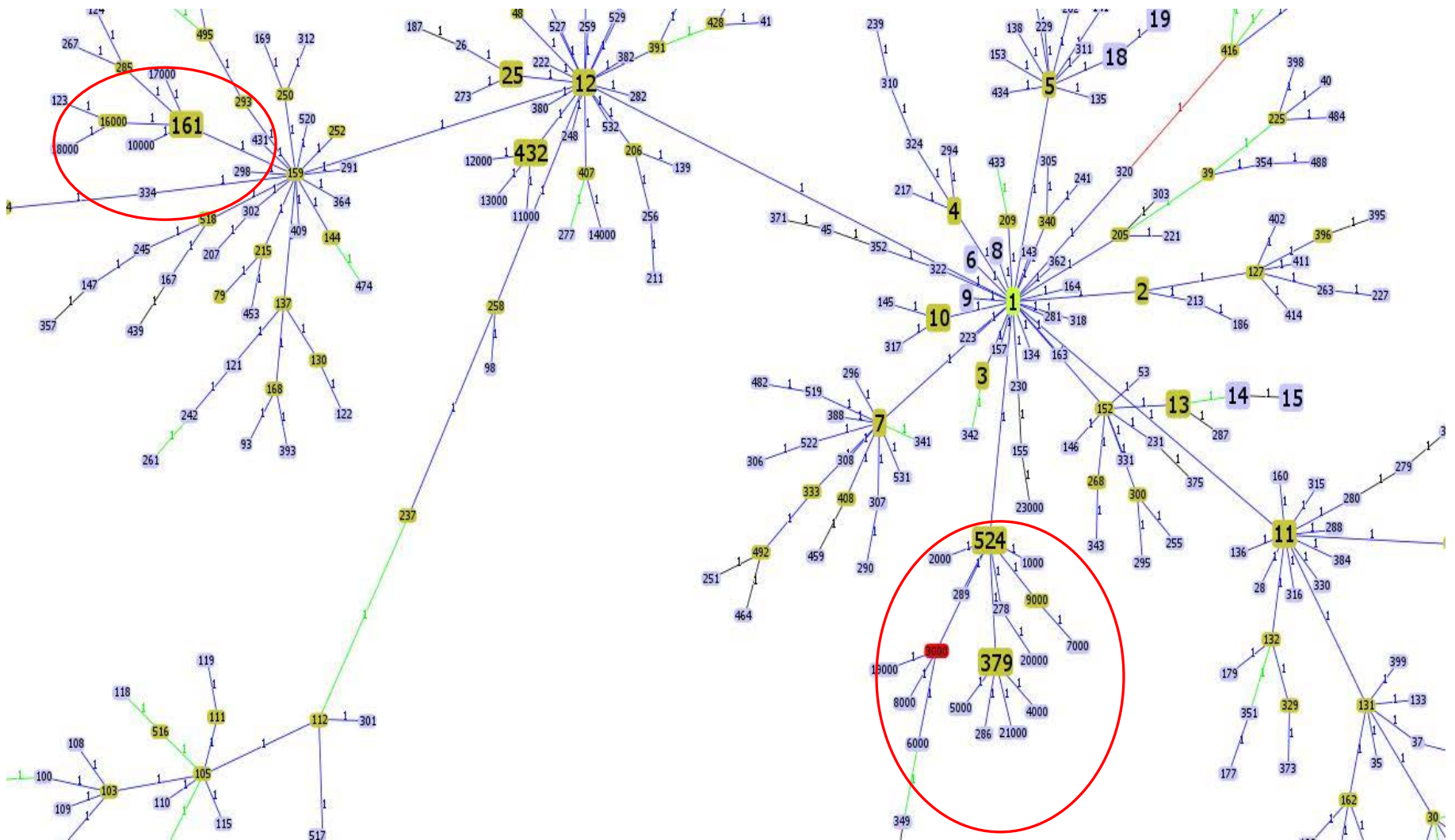
Slika 39: Prikaz populacije detektovanih VRE $fm$  MLVA profila (MT) kroz geoBURST algoritam. Začetnik populacije je označen svetlo zelenom bojom. Najbliži srodnici su označeni tamnije zelenom bojom. Brojevi od 1-25 označavaju MT tipove iz našeg istraživanja (SRB1 do SRB25).



Slika 40: Prikaz kombinovane populacije VRE $fm$  MLVA(MT) profila detektovanih u našoj studiji i invazivnih VRE $fm$  MT kroz geoBURST algoritam. Začetnik populacije je označen svetlo zelenom bojom. Najbliži srodnici su označeni tamnije zelenom bojom. Brojevi od 1-25 označavaju MT tipove iz našeg istraživanja (SRB1 do SRB25). Broj 111 predstavlja MT-1, a broj 777 predstavlja MT-7.



Slika 41: Upoređivanje *VREfm* MLVA profila (MT) iz naše populacije sa MT bazom podataka. Zelena strelica označava SRB3, a narandžasta MT-1.



Slika 42: Slika predstavlja uveličan segment sa slike 41. Svetlo zelenom bojom je označen začetnik MLVA-C1 genogrupe MT-1. Tamnije zelenom bojom su obeleženi njegovi najbliži srodnici. SRB3 je označen crvenom bojom. Crveni krugovi označavaju delove stabla u kojima su predstavljeni MT iz našeg istraživanja.

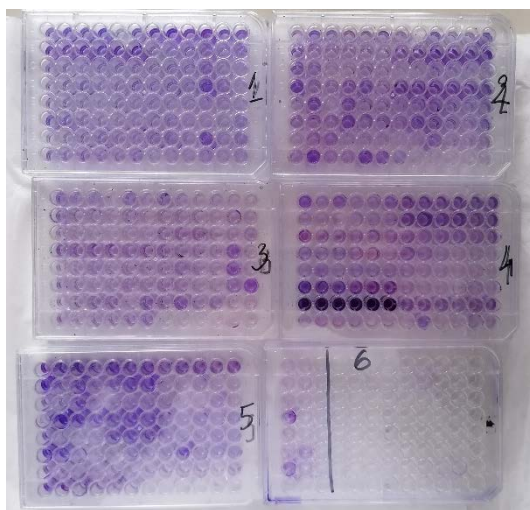
#### 4.21. Kvantitativno ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma

Kvantitativni test sposobnosti formiranja biofilma pokazao je da su 20,7% (16/77) bakterijskih sojeva bili produktori biofilma različitog kapaciteta (Tabela 34, Slika 43).

Tabela 34. Sposobnost produkcije biofilma izolovanih VRE $f_m$  sojeva.

Produkcija biofilma	Broj	%
Da	16	20,8
Slaba	9	11,7
Umerena	4	5,2
Izražena	3	3,9
Ne	61	79,2
Ukupno	77	100

Slaba produkcija biofilma –kategorija 1, +; umerena produkcija biofilma –kategorija 2, ++; izražena produkcija biofilma –kategorija 3, +++; ne - nema produkcije biofilma.



Slika 43. Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma

#### 4.22. Produkcija biofilma u odnosu na prisustvo gena koji kodiraju faktore virulencije

Razlike u učestalostima između ispitivanih gena koji kodiraju faktore virulencije u odnosu na sposobnost formiraju biofilma nisu bile značajne. Prisustvo ispitivanih gena nije značajno povezano sa sposobnošću sojeva VRE $f_m$  da formiraju biofilm (Tabela 3)

Tabela 35. Formiranje biofilma u odnosu na prisustvo gena koji kodiraju faktore virulencije.

Ispitivani geni koji kodiraju faktore virulencije	Formiranje biofilma				$\chi^2$	<i>p</i>
	da (16)		ne (61)			
	N	%	N	%		
<i>esp</i>	12	75	53	86,8	1,361	0,243
<i>hyl</i>	8	50	34	55,7	0,168	0,682
<i>efaA</i>	11	68,7	44	72,1	0,071	0,790
<i>gelE</i>	3	18,7	6	9,8	0,976	0,323
<i>asa1</i>	5	31,2	13	21,3	0,699	0,403
<i>cpd</i>	3	18,7	6	9,8	0,976	0,323

*esp* – gen koji kodira enterokokni površinski protein; *hyl* - gen koji kodira hialuronidazu; *efaA* – gen koji kodira adhezin ćelijskog zida; *asa1*- gen koji kodira agregacionu supstancu; *gelE* - gen koji kodira želatinazu; *cpd* - gen koji kodira seks feromon, N- apsolutna učestalost;%-relativna učestalost iskazana u procentima.  $\chi^2$ –Hi kvadrat test; *p*-statistička značajnost

#### 4.23. Produkcija biofilma u odnosu na broj gena koji kodiraju faktore virulencije

Razlike u učestalostima između ispitivanih varijabli u odnosu na sposobnost formiraju biofima nisu bile značajne. Rezultati su prikazani u Tabeli 36.

Tabela 36. Produkcija biofilma u odnosu na broj gena koji kodiraju faktore virulencije.

Broj gena koji kodiraju faktore virulencije	Produkcija biofilma				$\chi^2$	<i>p</i>
	da (16)		ne (61)			
	N	%	N	%		
<3	7		27		0.001	0.917
≥3	9		34			

#### 4.24. Prisustvo faktora virulencije u odnosu na pripadnost MLVA klasteru

Neepidemijski izolati (izolati koji nisu u MLVA kalsteru) su češće imali prisutne *asa1*, *gelE* i *cpd* gene u odnosu na epidemijske izolate (izolati koji pripadaju MLVA klasteru). Nije bilo statistički značajne razlike između posmatranih grupa u odnosu na gene virulencije.

Tabela 37: Prisustvo faktora virulencije u odnosu na pripadnost MLVA klasteru.

Ispitivani geni koji kodiraju faktore virulencije	MLVA klaster				F	<i>p</i>
	DA (56)		NE (16)			
	N	%	N	%		
<i>esp</i>	47	83,9	14	87,5	0,123	1,000
<i>hyl</i>	32	57,1	8	50,0	0,257	0,776
<i>efaA</i>	40	71,4	13	81,2	0,618	0,533
<i>gelE</i>	4	7,1	3	18,8	1,910	0,179
<i>asa1</i>	10	17,9	7	43,8	4,626	0,052
<i>cpd</i>	4	7,1	3	18,8	1,910	0,179

*esp* – gen koji kodira enterokokni površinski protein; *hyl* - gen koji kodira hialuronidazu; *efaA* – gen koji kodira adhezin ćelijskog zida; *asa1*- gen koji kodira agregacionu supstancu; *gelE* - gen koji kodira želatinazu; *cpd* - gen koji kodira seks feromon, - apsolutna učestalost;%-relativna učestalost iskazana u procentima, F–Fišerov test tačne verovatnoće ; *p*-statistička značajnost

U Tabeli 38. sumarno su prikazane karakteristike 77 VRE*fm* izolata.

Tabela 38. Karakteristike 77 VRE<sub>fm</sub> izolata – sumarna tabela.

ID	OD	ID geni	Rez geni	Fenotipski profil	Vir geni	MT	VNTR						Biofilm
							1	2	7	8	9	10	
395	AIB	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp</i>	SRB11	5	9	4	3	1	3	umerena
397	AIB	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp</i>	SRB11	5	9	4	3	1	3	umerena
399	AIB	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp, hyl</i>	432	5	9	3	3	1	3	N
421	AIB	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp</i>	SRB11	5	9	4	3	1	3	N
424	AIB	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp</i>	SRB2	5	9	1	3	2	3	N
426	AIB	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp</i>	SRB15	5	9	2	3	1	2	N
434	AIB	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA,</i> <i>ermB1</i>	CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>esp, hyl,</i> <i>gelE, asa1</i>	SRB5	5	9	4	3	2	2	N
440	AIB	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp,</i> <i>asa1, cpd</i>	SRB2	5	9	1	3	2	3	N
442	AIB	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA,</i> <i>ermB1</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>efaA, esp,</i> <i>hyl, gelE,</i> <i>asa1, cpd</i>	SRB2	5	9	1	3	2	3	slaba
443	AIB	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>esp</i>	SRB15	5	9	2	3	1	2	N



Tabela 38. Karakteristike 77 VRE<sub>fm</sub> izolata – sumarna tabela (nastavak).

ID	OD	ID geni	Rez geni	Fenotipski profil	Vir geni	MT	VNTR						Biofilm
							1	2	7	8	9	10	
78	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp, hyl</i>	SRB18	4	9	4	3	1	2	N
80	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp, hyl</i>	NT	5	9	1	3	/	3	N
97	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp, hyl</i>	SRB16	5	9	4	3	1	2	slaba
100	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp, hyl</i>	SRB2	5	9	1	3	2	3	N
106	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp, hyl</i>	SRB16	5	9	4	3	1	2	N
110	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp, hyl</i>	SRB3	5	9	4	3	2	3	N
111	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>hyl</i>	SRB3	5	9	4	3	2	3	N
113	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp, hyl</i>	SRB13	5	9	1	3	1	3	N
115	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>esp, hyl</i>	NT	5	/	3	4	2	/	N
117	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp, hyl</i>	161	5	9	3	3	1	2	N



Tabela 38. Karakteristike 77 VRE<sub>fm</sub> izolata – sumarna tabela (nastavak).

ID	OD	ID geni	Rez geni	Fenotipski profil	Vir geni	MT	VNTR						Biofilm
							1	2	7	8	9	10	
129	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp, hyl</i>	SRB2	5	9	1	3	2	3	N
135	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp, hyl</i>	SRB16	5	9	4	3	1	2	slaba
137	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>esp, hyl, gelE, asa1, cpd</i>	SRB13	5	9	1	3	1	3	slaba
138	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA, ermB1</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>efaA, esp,</i>	SRB16	5	9	4	3	1	2	N
140	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>esp, hyl</i>	SRB13	5	9	1	3	1	3	N
141	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp, hyl</i>	161	5	9	3	3	1	2	N
216	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp</i>	161	5	9	3	3	1	2	N
217	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA, ermB1</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>asa1</i>	SRB10	5	9	3	3	3	2	N
218	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp, gelE, asa1, cpd</i>	NT	5	/	4	4	2	3	N
219	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA, ermB1</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>efaA, esp</i>	SRB5	5	9	4	3	2	2	N

Tabela 38. Karakteristike 77 VRE<sub>fm</sub> izolata – sumarna tabela (nastavak).

ID	OD	ID geni	Rez geni	Fenotipski profil	Vir geni	MT	VNTR						Biofilm
							1	2	7	8	9	10	
220	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i> , <i>ermB1</i>	CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>efaA</i> , <i>esp</i> , <i>hyl</i> , <i>gelE</i> , <i>asa1</i> , <i>cpd</i>	SRB19	5	9	4	4	2	3	N
233	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i> , <i>ermB1</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI, Q-D	N	SRB4	5	9	1	3	2	2	N
237	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i> , <i>ermB1</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>efaA</i> , <i>esp</i> , <i>hyl</i>	SRB2	5	9	1	3	2	3	N
239	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i> , <i>ermB1</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>esp</i> , <i>gelE</i> , <i>cpd</i>	NT	5	/	4	3	1	/	N
9	Ger	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i> , <i>ermB1</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>efaA</i> , <i>esp</i> , <i>gelE</i> , <i>asa1</i> , <i>cpd</i>	SRB24	4	9	1	3	3	3	slaba
10	HO	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA</i> , <i>esp</i> , <i>hyl</i>	524	5	9	3	3	2	3	slaba
12	HO	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA</i> , <i>esp</i> , <i>hyl</i>	SRB6	4	9	4	3	2	3	N
54	HO	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA</i> , <i>esp</i>	SRB25	4	8	4	3	3	3	N
142	HO	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	N	SRB13	5	9	1	3	1	3	N
143	HO	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>esp</i> , <i>hyl</i>	SRB2	5	9	1	3	2	3	N

Tabela 38. Karakteristike 77 VRE<sub>fm</sub> izolata – sumarna tabela (nastavak).

ID	OD	ID geni	Rez geni	Fenotipski profil	Vir geni	MT	VNTR						Biofilm
							1	2	7	8	9	10	
144	HO	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	N	SRB2	5	9	1	3	2	3	N
146	HO	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp, hyl</i>	SRB1	5	9	0	3	2	3	N
155	HO	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp, asaI</i>	SRB7	5	9	0	3	3	3	N
156	HO	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA, ermB1</i>	CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>efaA, esp, asaI</i>	SRB9	5	9	3	3	3	3	N
192	HO	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA, ermB</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp, hyl, asaI</i>	379	5	9	3	3	2	2	slaba
193	HO	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA, ermB1</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>efaA, esp, hyl</i>	SRB12	5	9	0	3	1	3	slaba
194	HO	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp</i>	SRB12	5	9	0	3	1	3	N
198	HO	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp</i>	SRB17	5	9	0	3	1	2	N
199	HO	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA, ermB1</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>efaA, esp, asaI</i>	SRB16	5	9	4	3	1	2	N
201	HO	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp, hyl</i>	SRB9	5	9	3	3	3	3	N

Tabela 38. Karakteristike 77 VRE<sub>fm</sub> izolata – sumarna tabela (nastavak).

ID	OD	ID geni	Rez geni	Fenotipski profil	Vir geni	MT	VNTR						Biofilm
							1	2	7	8	9	10	
202	HO	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	N	SRB1	5	9	0	3	2	3	N
203	HO	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp</i>	161	5	9	3	3	1	2	N
221	HO	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA,</i> <i>ermB1</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>esp, gelE,</i> <i>asa1</i>	SRB20	5	9	0	4	2	3	N
222	HO	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA,</i> <i>ermB1</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>efaA, esp,</i> <i>hyl, gelE,</i> <i>asa1, cpd</i>	SRB12	5	9	0	3	1	3	N
223	HO	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA,</i> <i>ermB1</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>efaA, esp</i>	SRB16	5	9	4	3	1	2	N
224	HO	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA,</i> <i>ermB1</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp, hyl</i>	SRB12	5	9	0	3	1	3	N
4	HD	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp, hyl</i>	SRB6	4	9	4	3	2	3	N
242	HD	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA,</i> <i>ermB1</i>	TEI, Q-D	<i>efaA, esp</i>	SRB22	5	1	4	3	1	1	N
244	HD	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA,</i> <i>ermB1</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>efaA, esp, hyl</i>	SRB14	5	2	4	3	1	3	N
292	HD	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA, esp, hyl</i>	SRB2	5	9	1	3	2	3	N

Tabela 38. Karakteristike 77 VRE<sub>fm</sub> izolata – sumarna tabela (nastavak).

ID	OD	ID geni	Rez geni	Fenotipski profil	Vir geni	MT	VNTR						Biofilm
							1	2	7	8	9	10	
294	HD	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i> , <i>ermB1</i>	AMP, IMP, TEI, Q-D	N	SRB23	5	1	5	3	2	1	izražena
372	HD	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	N	SRB2	5	9	1	3	2	3	izražena
99	JIL	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>esp</i> , <i>hyl</i>	SRB3	5	9	4	3	2	3	N
103	JIL	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>esp</i> , <i>hyl</i>	SRB2	5	9	1	3	2	3	N
104	JIL	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA</i> , <i>esp</i> , <i>hyl</i>	SRB3	5	9	4	3	2	3	slaba
108	JIL	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA</i> , <i>esp</i> , <i>hyl</i>	SRB16	5	9	4	3	1	2	N
109	JIL	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i> , <i>ermB1</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>efaA</i> , <i>esp</i> , <i>hyl</i>	SRB16	5	9	4	3	1	2	N
139	JIL	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA</i> , <i>esp</i> , <i>hyl</i>	SRB16	5	9	4	3	1	2	N
151	JIL	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA</i> , <i>esp</i> , <i>hyl</i> ,	SRB21	5	9	3	4	2	2	N
152	JIL	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI	<i>efaA</i> , <i>esp</i> , <i>asa1</i>	161	5	9	3	3	1	2	N

Tabela 38. Karakteristike 77 VRE<sub>fm</sub> izolata – sumarna tabela (nastavak).

ID	OD	ID geni	Rez geni	Fenotipski profil	Vir geni	MT	VNTR						Biofilm
							1	2	7	8	9	10	
153	JIL	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i> , <i>ermB1</i>	CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>efaA</i> , <i>esp</i> , <i>hyl</i> , <i>asaI</i>	161	5	9	3	3	1	2	N
240	JIL	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i> , <i>ermB1</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>efaA</i> , <i>esp</i> , <i>hyl</i> , <i>asaI</i> , <i>cpd</i>	SRB8	5	9	4	3	3	3	N
241	JIL	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i> , <i>ermB1</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>asaI</i>	SRB2	5	9	1	3	2	3	izražena
380	JIL	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i> , <i>ermB1</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>efaA</i> , <i>esp</i>	161	5	9	3	3	1	2	umerena
381	JIL	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, TEI	N	NT	/	9	/	3	2	/	umerena
382	JIL	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i> , <i>ermB1</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, GEN-HLS, TEI, Q-D	N	SRB4	5	9	1	3	2	2	N
383	JIL	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>vanA</i> , <i>ermB1</i>	AMP, IMP, CIP, LEVO, STR-HLS, TEI, Q-D	<i>efaA</i> , <i>esp</i> , <i>hyl</i>	SRB11	5	9	4	3	1	3	N

ID-identifikacioni broj uzorka; OD-kliničko odeljenje; ID geni-geni identifikacije; Rez geni- geni rezistencije; Vir geni-geni virulencije; MT-MLVA tip; VNTR-Variable Number Tandem Repeats; Ger-gerijatrija; HO-hemato-onkologija; AIB-akutne infektivne bolesti; HD-hemodijaliza; JIL-jedinica intenzivnog lečenja, AMP - Ampicilin; IMP - Imipenem; CIP - Ciprofloksacin; LEV - Levofloksacin; GEN-HLS - Gentamicin-visok nivo rezistencije na aminoglikozide; STR-HLS - Streptomycin- visok nivo rezistencije na aminoglikozide; TEI - Teikoplanin; Q-D - Quinupristin-dalfopristin; *ddl<sub>E. faecium</sub>* - D-alanin–D-alanin ligaza gen specifičan za *E. faecium*; *van A* – Van A tip rezistencije na vankomicin; *ermB1*- geni rezistencije na streptogramin B; *esp* – gen koji kodira Enterokokni površinski protein; *hyl* - gen koji kodira hijaluronidazu; *efaA* – gen koji kodira adhezin ćelijskog zida; *asaI*- gen koji kodira agregacionu supstancu; *gelE* - gen koji kodira želatinazu; *cpd* - gen koji kodira seks feromon; NT-netipiziran izolat; /-ne daje product za VNTR lokus; *slaba produkcija biofilma* –kategorija 1, +; *umerena produkcija biofilma* –kategorija 2, ++; *izražena produkcija biofilma* –kategorija 3, +++; N - nema produkcije biofilma

## **5. *DISKUSIJA***

---



Zbog svojih karakteristika kao što su urođena i stečena rezistencija na različite grupe antimikrobnih lekova, velikog endemijskog kapaciteta koji mogu da ostvare u bolničkom okruženju i nedostatku terapijskih opcija, VRE sojevi su se u poslednjih petnaest godina izdvojili u svetu kao jedni od vodećih uzročnika bolničkih infekcija (98,120).

U Izveštaju ECDC o nadzoru nad antimikrobnom rezistencijom u Evropi za 2019. godinu (98), naglašava se da u evropskim zemljama postoji trend povećanja kako broja infekcija uzrokovanih VRE $_{fm}$  sojevima (sa 10,5% u 2015. godini, na 18,3% u 2019. godini), tako i broja smrtnih ishoda povezanih sa VRE $_{fm}$  sojevima, što zajedno dodatno utiče na opterećenost evropskog zdravstvenog sistema antimikrobnom rezistencijom. Retrospektivno istraživanje o ekonomskom opterećenju zdravstvenog sistema koji nosi bolnička infekcija proizrokovana VRE sojevima pokazalo je da su ukupni dodatni bolnički troškovi (definisani kao razlika u ukupnim bolničkim troškovima između VRE i VSE grupe pacijenata) iznosili 13.157 evra i da se najveći deo ukupnih dodatnih troškova odnosio na upotrebu rezervnih antimikrobnih lekova, kao što je linezolid. U istraživanju je pokazano i da VRE predstavlja nezavisni prediktor bolničkih troškova i povećava troškove bolničkog lečenja za 40% (121). U izveštaju ECDC (98) se još ističe važnost nadzora nad VRE $_{fm}$  sojevima u funkciji boljeg razumevanja molekularne epidemiologije istih, kao i utvrđivanja faktora rizika za nastanak infekcije. S obzirom da se smatra da VRE infekcija predstavlja samo vrh ledenog brega (122) i da VRE kolonizacija najčešće prethodi VRE infekciji (83), brza identifikacija i izolacija hospitalizovanih pacijenata u riziku za VRE kolonizaciju predstavlja jedan od ključnih koraka u kontroli VRE transmisije među pacijentima i jednu od preporučenih mera za kontrolu bolničkih infekcija (47,72,83).

Prvi slučaj VRE infekcije u Srbiji zabeležen je 2002. godine, na odeljenju kardiohirurgije u KCS. Radilo se o VRE $_{fs}$  izolatu *vanA* genotipa, koji je izolovan iz brisa rane uzetog nakon aortobifemoralne operacije (69). Do sada su u našoj zemlji sprovedena pojedinačna istraživanja o VRE sojevima kao prouzrokovateljima infekcija, a VRE izolati su prikupljeni u mikrobiološkim laboratorijama iz različitog kliničkog materijala (69,116,123). Stoga, naše istraživanje je prvo sveobuhvatno multicentrično epidemiološko-mikrobiološko istraživanje o fekalnoj kolonizaciji VRE sojevima kod hospitalizovanih pacijenata na odeljenjima sa povišenim rizikom za nastanak VRE kolonizacije (124). Učestalost fekalne kolonizacije VRE sojevima u našem istraživanju koje je uključivalo 268 ispitanika hospitalizovanih na kliničkim odeljenjima sa povišenim rizikom za nastanak VRE kolonizacije (klinička odeljenja za hemato-onkologiju, gerijatriju, hemodijalizu, akutne infektivne bolesti i JIL) u bolnicama univerzitetskog tipa (KCS, KBC Zvezdara i KBC Zemun) u posmatranom studijskom periodu iznosila je 28,7%.

Većina istraživanja koja se bave fekalnom kolonizacijom VRE sojevima su orjentisana na ispitivanje faktora rizika za VRE kolonizaciju u toku bolničke epidemije, dok je malo studija koje se bave ovom problematikom van detektovane bolničke epidemije u populaciji pod rizikom i koje su tako koncipirane da je iz njih moguće ekstahovati podatak o učestalosti kolonizacije na način kako je urađeno u našoj studiji. U istraživanju Goossens i sar. (125) koje je sprovedeno u osam evropskih zemalja (Austrija, Belgija, Francuska, Nemačka, Italija, Holandija, Španija, Velika Britanija) tokom 2003. godine, a koje se bavilo istraživanjem VRE kolonizacije na odeljenjima pod rizikom za VRE kolonizaciju/infekciju zabeležene su sledeće vrednosti: u Austriji, Francuskoj, Španiji i Belgiji učestalosti su bile manje od 1%, u Nemačkoj je vrednost bila 1,2%, u Italiji 7,5%, u Velikoj Britaniji učestalost VRE kolonizacije je iznosila 32,6%. Rezultati sličnih studija rađenih u Evropi takođe pokazuju veoma veliku raznolikost u pogledu učestalosti fekalne VRE kolonizacije među bolničkom populacijom,

i to u rasponu od 1,5% (126) koliko je zabeleženo u studiji Braak i sar. rađenoj u Holandiji, do 37% koliko je zabeleženo u studiji Gambarotto i sar. (104) rađenoj u Francuskoj.

Ovako velike varijacije u učestalosti VRE kolonizacije nisu samo prisutne među državama, već su prisutne i u okviru iste države. Tako se na primer učestalosti VRE kolonizacije u istraživanjima sprovedenim u Grčkoj kreću u rasponu od 3,9% do 30,5% (102,127–130), a u Francuskoj u rasponu od 4,9% do 37,0% (104,131).

Podaci iz sličnih studija rađenih van evropskog kontinenta pokazuju manje varijacije, mada su iste ipak prisutne. Tako je učestalost fekalne VRE kolonizacije detektovane u studiji Coque i sar. (132) rađenoj u Teksasu, iznosila 16%, dok je studija Montecalvo i sar. (133) koja je rađena u Njujorku, detektovala vrednost od 28%. U jednom istraživanju rađenom u Australiji učestalost VRE kolonizacije je iznosila 17,5% (134), dok je istraživanje rađeno u južnom delu Indije detektovalo vrednost od 29% (135).

Dobijene vrednosti učestalosti VRE kolonizacije u našem istraživanju su visoke u poređenju sa evropskim zemljama sa tradicionalno niskom prevalencijom invazivnih VRE izolata, kao što su npr. Nordijske zemlje ili zemlje Beneluksa. Učestalost kolonizacije koja je detektovana u dva istraživanja sprovedena u Holandiji je iznosila 1,5% (126) i 2% (101), u istraživanju Suppola i sar. (136) sprovedenom u Finskoj zabeležena je vrednost od 2%, dok je u istraživanju sprovedenom u Belgiji od strane Gordts i sar. (137) učestalost VRE kolonizacije iznosila 3,5%. S obzirom na visoke stope invazivnih VRE $fm$  izolata u Srbiji u prethodnim godinama, koje su se prema podacima CAESAR mreže (100) kretale između 35% (2016. godine) i 75% (2014. godine) sa srednjom vrednosti od 55,2%, čime je Srbija svrstana među zemlje sa najvećom stopom VRE $fm$  na evropskom kontinentu, dobijene vrednosti učestalosti VRE kolonizacije u našem istraživanju su očekivane. Rezultati našeg istraživanja su, u poređenju sa sličnim istraživanjima rađenim u Evropi, najbliži učestalostima detektovanim u studiji Metallidis i sar. (130) rađenoj u Grčkoj koja je iznosila 30,5% i studiji Whelton i sar. (103) rađenoj u Irskoj gde je učestalost VRE kolonizacije iznosila 31,4%. I Grčka i Irska su među evropskim zemljama koje su takođe u vrhu kada govorimo o učestalosti invazivnih VRE izolata u Evropi, čime se može objasniti sličnost naših rezultata sa rezultatima istraživanja iz Grčke i Irske.

Razlike u učestalostima VRE kolonizacije između različitih zemalja mogu predstavljati odraz razlika u praksi kontrole infekcije, politici potrošnje antimikrobnih lekova i kulturološkim razlikama među zdravstvenim osobljem. Samim tim, poređenje podataka o kolonizaciji iz različitih zemalja je veoma teško i zahteva dozu opreznosti s obzirom da postoji mnogo varijabli koje se moraju uzeti u obzir. Na primer, mogu postojati razlike u veličini uzorka, u primarnoj dijagnozi, u bolničkim odeljenjima uključenim u studiju, u tipu analiziranih uzoraka, u hranljivim podlogama koje se koriste za izolaciju, u primeni različitih standarda za interpretaciju rezultata antimikrobne rezistencije. Pored toga, u zavisnosti od načina identifikacije vrste i rezistencije na vankomicin, mogu postojati razlike u izveštavanju o stečenoj i urođenoj rezistenciji na vankomicin, što može imati značajan uticaj na dobijene rezultate. S tim u vezi, analizom svake od gore pomenutih referiranih studija, možemo da utvrdimo postojanje razlika u metodologiji za detekciju kolonizacije.

Ako razmotrimo bolničke centre u kojima su sprovedena istraživanja koja su do sada publikovana i dostupna, najčešće se radilo o bolnicama univerzitetskog tipa, mada se pominju i opšte bolnice (137). Takođe, bolnice uključene u studiju su bile različitog posteljnog kapaciteta, u rasponu od oko 300 do oko 800 postelja. Istraživanje je u 11 od analiziranih 16 studija, rađeno na jednoj lokaciji,

odnosno u samo jednoj bolnici, dok je pet studija bilo multicentričnog tipa i uključivale su različiti broj bolnica: četiri (127), pet (101), devet (126), 13 (128) i 24 (131) bolnice. Broj ispitanika uključenih u studije je takođe bio različit i kretao se u rasponu od 70 ispitanika, koliko je bilo u istraživanju Gambarotto i sar. (104) do 1246 ispitanika, koliko je bilo uključeno u jednoj od studija rađenoj u Grčkoj (128). Istraživanja su se razlikovala i po tipu odeljenja na kojima su istraživanja rađena. Jedna studija je uključila samo pacijente na hemodijalizi (127), jedna samo pacijente koji su podvrgnuti onkološkom lečenju i terapiji (133), dve studije su uključile pacijente sa hematološkim malignitetima (104,136), pet studija je uključilo pacijente iz JIL (102,126,130,131,135), šest studija je uključilo sva bolnička odeljenja (103,128,129,132,134,137), dok je jedna studija uključila samo pacijente pod rizikom za VRE kolonizaciju (101). Prethodna istraživanja (96) su pokazala da je VRE prevalencija najviša među bolnicama čiji posteljni kapacitet prelazi 500 postelja i koje su univerzitetskog tipa, a kako KCS i tri od četiri KBC u Beogradu (Zvezdara, Zemun, „Dr Dragiša Mišović“) zadovoljavaju te uslove (138), a dva KBC (Zvezdara i Zemun) imaju i sva potrebna klinička odeljenja koja se u literaturi pominju kao mesta visokog rizika za VRE kolonizaciju, odlučili smo da naše istraživanje sprovedemo u KCS i KBC Zvezdara i KBC Zemun. U istraživanju smo se odlučili za izbor analitičkog epidemiološkog metoda po tipu studije preseka, što je u saglasnosti sa većinom pomenutih referiranih studija i prihvatljiv metod za dobijanje inicijalnih podataka o kolonizaciji VRE sojevima u bolničkoj sredini.

U odnosu na tip uzorka, četiri studije su kao uzorak koristile samo rektalni bris (129,131,134,135), dve studije su koristile uzorak fecesa (103,132), u jednoj studiji je korišćen perirektalni bris (133), dok je u ostalim analiziranim studijama kao uzorak korišćen ili rektalni bris ili feces. Izbor uzorka predstavlja kritično mesto u mikrobiološkom radu, a odluka o tome da li će se mere prevencije u kontroli VRE transmisije primeniti ili ne, bazira se na rezultatima dobijenim iz kliničkog materijala. Centar za kontrolu i prevenciju bolesti u Atlanti preporučuje da se kao uzorak za ispitivanje VRE kolonizacije ravnopravno mogu koristiti i feces i rektalni bris (18). Studija Hacek i sar. (139) je poredila rektalni bris i uzorke fecesa u pogledu učestalosti VRE izolacije nakon zasejavanja na iste hranljive podloge i kultivacije pod istim uslovima. Procenat izolovanih VRE iz fecesa je iznosio 10,4%, dok je procenat izolovanih VRE iz rektalnog brisa bio malo niži i iznosio je 9,7%.

Rektalni bris je praktičan, brzo dostupan, odnosno ne zavisi od vremena crevnog pražnjenja što je važno ako se radi o potencijalnoj bolničkoj epidemiji i potrebnoj brznoj implementaciji mera prevencije (140). Na senzitivnost rektalnog brisa može da utiče tehnika uzorkovanja, odnosno da li pacijent uzima bris samostalno ili uzorkovanje vrši zdravstveni radnik. Jedan od isključnih kriterijuma za prijem rektalnog brisa u mikrobiološku laboratoriju je odsustvo golim okom vidljivog fekalnog materijala prilikom vizuelne inspekcije brisa (141). Prema istraživanju Glišović i sar. (141) primenom ovog kriterijuma oko 10% rektalnih briseva koji se dostave mikrobiološkoj laboratoriji se odbaci. Osim toga, odbacivanje uzorka i zahtev za ponovljenim uzimanjem uzorka rezultiraju održavanjem pacijenta u neodređenoj kategoriji što se tiče statusa kolonizacije čime se otvara vremenski interval u kojem bi se mogla povećati mogućnost daljeg širenja VRE od strane pacijenata koji još nisu prepoznati kao kolonizovani (141). Međutim, i pored široke primene rektalnog brisa u nadzoru nad rezistentnim bakterijama (141) i samim tim njegove glavne uloge u određivanju primene mera prevencije za kontrolu VRE infekcije, osetljivost rektalnog brisa nije poznata. D'Agata i sar. (142) su u svom istraživanju pokazali da je korišćenje uzorka fecesa superiornije u odnosu na rektalni bris. Naime, u direktnom poređenju parnih uzoraka fecesa i rektalnog brisa, zasejanih na istu hranljivu podlogu pod istim uslovima, pokazano je da je senzitivnost rektalnog brisa 58% u odnosu na uzorak feces i da senzitivnost varira u odnosu na gustinu VRE u fecesu, u opsegu 0% pri gustini VRE  $\leq 4,5 \log_{10}$  CFU/g fecesa do 100% kada je gustina VRE veća od  $7,5 \log_{10}$  CFU/g fecesa. Niska gustina VRE u stolici možda neće biti otkrivena

rektalnim brisom, ali ipak može rezultirati kontaminacijom kože i VRE transmisijom. Zbog svega navedenog, u našem istraživanju smo odlučili da za ispitivanje učestalosti VRE kolonizacije koristimo uzorak fecesa.

Brza i precizna VRE identifikacija je ključna tačka u nadzoru nad bolničkim infekcijama. Uprkos pojavi molekularnih tehnika koje omogućavaju brzu detekciju gena rezistencije direktno iz kliničkog materijala, primena mikrobioloških podloga i izolacija bakterija i dalje predstavljaju važan deo u kontroli bolničkih infekcija. Primenom molekularne tehnike direktno u uzorku, bez prethodne izolacije mikroorganizma na hranljivim podlogama, mogu se detektovati geni mikroorganizma koji nije vijabilan, a koji se može naći u uzorku. Dobijena kultura omogućava dalje ispitivanje, odnosno postupak identifikacije i ispitivanje osetljivosti na antimikrobne agense i dobijanje profila rezistencije. Izolovani sojevi se mogu dodatno fenotipski ispitivati u smislu sposobnosti produkcije faktora virulencije.

U odnosu na postupak VRE izolacije, istraživači su koristili različite hranljive podloge. Pojedina istraživanja su za izolaciju koristila samo hranljive podloge u čvrstoj formi, dok su pojedina koristila kombinaciju dve podloge različitih formi, čvrste i tečne (101,102,104,126,128). Iako su se u studijama koristile različite hranljive podloge, zajedničko im je to što su sve podloge bile po tipu selektivnih podloga i namenjene za izolaciju enterokoka čiji se princip zasnivao na hidrolizi eskulina. Međutim, neke su imale dodatak azida i različite koncentracije vankomicina. U nekoliko studija vankomicin je bio u koncentraciji od 6 µg/mL, u nekoliko u koncentraciji od 8 µg/mL, a u jednoj u koncentraciji od 16 µg/mL. U studiji Whelton i sar. (103) koja je rađena u Irskoj korišćena je CHROMID® VRE podloga. U studiji iz Finske (136) korišćen je Slanetz-Bartley agar, selektivna podloga za detekciju enterokoka sa natrijum azidom, bez eskulina.

Ne postoji optimalni metod za izolaciju i identifikaciju VRE iz kliničkog materijala. Mikrobiološkim laboratorijama su na raspolaganju klasične hranljive podloge, kao što je BE(A)V sa dodatkom vankomicina u finalnoj koncentraciji od 6 mg/L. Međutim, klasične hranljive podloge imaju nedostatke: 1. ne mogu da naprave razliku između *E. faecalis*/*E. faecium* i drugih vrsta enterokoka; 2. zbog niske selektivnosti dozvoljavaju porast vrstama *E. gallinarum* i *E. casseliflavus* koje su urođeno rezistentne na vankomicin; 3. daju lažno pozitivne rezultate ako su u uzorku prisutne druge eskulin hidrolizujuće bakterije (*Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp.); 4. crni „oblak“ koji se formira oko kolonije otežava čitanje i otežava izbor odgovarajuće kolonije za dalje potvrdne testove; 5. potrebno je do 72 sata da bi se upotrebom BE(A)V agara potvrdilo da je u pitanje VRE (139,142–144).

Osim klasičnih podloga, postoje i hromogene podloge, tzv. podloge nove generacije čija se upotreba pokazala efikasnom u prevenciji MRSA bolničke infekcije (143,144). Ova vrsta podloga istovremeno omogućava i kultivaciju i identifikaciju mikroorganizama iz kliničkih uzoraka i na taj način skraćuje vreme i potrebu za potvrdnim testom. Princip detekcije mikroorganizama zasniva na prisustvu hromogenih supstrata, za razliku od klasičnih hranljivih podloga koje se zasnivaju na principu promene boje pH indikatora. Hromogene podloge sadrže rastvorljive bezbojne molekule zvane hromogeni koji se sastoje iz dva dela: supstrata (koji je ciljno mesto specifične enzimske aktivnosti mikroorganizma) i hromofora. Kada se veza između supstrata i hromofora raskine određenim enzimom koji proizvodi ciljni mikroorganizam, oslobađa se hromofor. U svom nekonjugovanom obliku, hromofor pokazuje prepoznatljivu boju. Zbog smanjene rastvorljivosti, hromofor formira talog koji koloniji daje jedinstvenu boju. U zavisnosti od boje kolonije, utvrđuje se prisustvo ili odsustvo ciljnog organizma i diferencijacija od drugih mikroorganizama. Selektivne hromogene podloge, koje imaju inkorporiran antibiotik, omogućavaju rast samo rezistentnim sojevima, što je od značaja u brzoj identifikaciji ispitivanog



mikroorganizma. Iako su danas dostupni raznovrsni savremeni hromogeni supstrati, većina modernih supstrata zasniva se na indoksil-supstratu, čija je glavna prednost što ostaje u ćeliji, i na taj način omogućava karakterizaciju jedne ćelije (bez difuzije u medijum) (109,145,146).

Na svetskom tržištu postoji više vrsta odobrenih hromogenih podloga namenjenih za VRE detekciju. Njihova sveukupna senzitivnost se kreće u rasponu od 90 do 99%, u poređenju sa BE(A)V podlogom, čija je senzitivnost oko 85% (147,148). Specifičnost hromogenih podloga je takođe bolja od BE(A)V, koja se kreće od 70 do 75% (146–152). Selektivnost hromogenih podloga je viša od klasičnih i zbog toga daju manje lažno-pozitivnih rezultata koji su najčešće posledica prisustva *vanC* pozitivnih enterokoka (*E. gallinarum* i *E. casseliflavus*) ili drugih eskulin pozitivnih bakterija (*Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp) u kliničkom materijalu.

Hromogena podloga francuskog proizvođača *bioMerieux*, CHROMID®VRE, koja je korišćena u studiji Whelton i sar. u kojoj je ispitivana VRE kolonizacije u bolnici u Irskoj (103), prva je hromogena podloga namenjena izolaciji i diferencijaciju VRE $_{fm}$  i VRE $_{fs}$  sojeva iz kliničkog materijala (153). U dva od šest istraživanja koja su poredila senzitivnost CHROMID®VRE podloge sa BE(A)V podlogom pokazano je da CHROMID®VRE ima veću senzitivnost, dok je u ostalim istraživanjima senzitivnost ista. Velika prednost CHROMID®VRE u odnosu na BE(A)V je to što omogućava diferencijaciju VRE $_{fm}$  i VRE $_{fs}$  sojeva, što je postignuto dodavanjem hromogenog supstrata za detekciju  $\alpha$ -glikozidaze i  $\beta$ -galaktozidaze. CHROMID®VRE pokazuje veću specifičnost, što se ogleda u smanjenju broja potvrđenih testova koji su bili potrebni za tzv. sumnjive kolonije. Osim CHROMID®VRE na svetskom tržištu postoje i druge hromogene podloge koje su u poređenju sa BEAV podlogom pokazale veću senzitivnost i specifičnost, kao što su npr. AES VRE agar (154), Brilliance VRE (155), CHROMagar VRE (156,157), Spectra VRE (149,158,159) i VRESelect (147).

Nema mnogo studija koje su se bavile međusobnim poređenjem hromogenih podloga za izolaciju VRE iz kliničkih uzoraka (148,150,154,160). U jednom istraživanju poređeni su CHROMID®VRE i CHROMagar i pokazano je da su im senzitivnost i specifičnost iste (150). Gouliouris i sar. su upoređivali CHROMID®VRE i Brilliance VRE iz 295 uzoraka stolice i pokazali da imaju identičnu senzitivnost (160). U velikoj studiji Suwantarat i sar. (148) koja je upoređivala pet vrsta hromogenih podloga sa klasičnom BE(A)V podlogom, pokazano je da je senzitivnost hromogenih podloga značajno veća (89,9 do 93,9%) u odnosu na BE(A)V (84,8%). CHROMID®VRE je pokazao najveću senzitivnost u odnosu na pet ispitivanih hromogenih podloga, ali ova razlika nije bila statistički značajna. Takođe, istraživanje je pokazalo da je izolacija ne-VRE mikroorganizama na hromogenom agaru bila u opsegu od 0,9% do 5,6% ispitivanih uzoraka, dok je na BE(A)V agaru bila 16,5%. Razlike u pogledu detekcije ne-VRE mikroorganizama su verovatno posledica niže koncentracije vankomicina (6  $\mu\text{g/mL}$ ) koji se koristi za BE(A)V agar, nasuprot 8 do 10  $\mu\text{g/mL}$  koji se koristi u hromogenim podlogama, kao i specifične boje kolonije koju daje hromogeni miks koji se koristi.

Na našem tržištu je dostupno nekoliko vrsta hromogenih podloga, kao dehidrogenizovane, praškaste formulacije (CHROMagar™VRE, HiCROME™VRE Agar Base, Modified) ili kao gotove podloge (CHROMID®VRE, Brilliance™VRE AGAR). U odnosu na gotove podloge, upotreba suvih podloga zahteva dodatni laboratorijski rad u smislu procesa pripreme, koji uključuje odmeravanje i izradu rastvora, autoklaviranje, razlivanje u sterilne Petri šolje pod aseptičnim uslovima i kontrolu kvaliteta svake serije podloga koristeći standardne referentne mikroorganizme, npr. ATCC sojeve (eng. the American Type Culture Collection). Gotove podloge su jednostavnije za upotrebu, ekonomičnije su i ne zahtevaju dodatnu opremu i materijal. Gotove podloge koje su dostupne na našem tržištu

(CHROMID®VRE, Brilliance™VRE AGAR) imaju ekvivalentnu specifičnost za *vanA* genotip (150), dok je CHROMID®VRE bolja za *vanB* genotip (161). Takođe, CHROMID®VRE je selektivnija, odnosno ne dozvoljava porast sojeva sa urođenom VRE rezistencijom (*E.gallinarum*, *E.casseliflavus*), kao ni porast većine Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija, kvasnica i plesni (145). Zbog svega navedenog, u našem istraživanju smo odlučili da za izolaciju VRE iz fecesa koristimo CHROMID®VRE hranljivu podlogu.

U cilju identifikacije izolata do nivoa vrste, najveći broj studija je koristio komercijalne sisteme i to: u šest studija je korišćen komercijalni API 20 Strep sistem (102,104,130–132,137), u dve studije je korišćen VITEK sistem (127,134), u jednoj Phoenix sistem (129), a u jednoj MALDI-TOF MS sistem (103). U jednoj od dve studije koje su za identifikaciju koristile samo metode klasične mikrobiologije, korišćena je molekularna potvrda identifikacije detekcijom vrsno specifičnih gena (128). U cilju ispitivanja osetljivosti izolata na vankomicin, u devet studija korišćen je gradijent test. Tri studije su koristile disk difuzionu metodu (103,132,137), jedna bujon mikrodilucionu metodu (129) i jedna agar dilucionu metodu (135). Molekularnu potvrdu identifikacije izolata detekcijom vrsno specifičnih gena koristilo je sedam studija (102–104,127–129,131). U trinaest studija, rezistencija na vankomicin je potvrđena detekcijom *van* gena, dok u tri studije nije bilo potvrde rezistencije na vankomicin upotrebom molekularnih tehnika (130,133,137). U dve studije, prijavljene učestalosti VRE kolonizacije su obuhvatile i *vanC* genotip. U studiji Gambarotto i sar. (104) učestalost VRE kolonizacije je iznosila 37%. Međutim, kad se uzmu u obzir samo *vanA* izolati (9 VRE<sub>fm</sub> *vanA* izolata), učestalost kolonizacije je iznosila 12,8%. Slično je zapaženo i u drugoj francuskoj studiji. Naime, prijavljena učestalost VRE kolonizacije u studiji Boisivon i sar. (131) iznosila je 4,9%, ali kad se uzmu u obzir samo *vanA* izolati (13 VRE<sub>fm</sub> *van A* izolata), učestalost kolonizacije iznosi 2,0%.

Primena automatizovanih metoda za identifikaciju i ispitivanje osetljivosti na antimikrobne agense značajno je pojednostavila i ubrzala mikrobiološku dijagnostiku. Zatvoreni sistem smanjuje mogućnost kontaminacije, a softverska analiza i interpretacija dobijenih rezultata smanjuje mogućnost greške. Reproducibilnost i pouzdanost rezultata je veća, kao i sveukupni kvalitet rada mikrobiološke laboratorije. Polazeći od čiste kulture i izradom samo jednog razblaženja, automatizovani sistem obezbeđuje istovremeno dobijanje rezultata identifikacije i antimikrobne osetljivosti. Rezultati su dostupni u toku jednog radnog dana što pruža mogućnost bržeg saopštavanja rezultata kliničarima i brzog delovanja u slučaju izbijanja bolničke infekcije. Na našem tržištu su dostupna dva automatizovana sistema: BD Phoenix (Becton Dickinson Diagnostic Systems, BD) i Vitek 2 (bioMerieux, Marcy l’Étoile, France). U studiji Donay i sar. evaluiran je automatizovani Phoenix sistem. U istraživanju su poređeni rezultati ispitivanja 305 različitih kliničkih uzoraka, testirani rutinskom metodom i Phoenix sistemom za enterokok izolate. Procenti podudarnosti za identifikaciju su bili: 93,3 % za enterobakterije; 89,4% za nefermentujuće Gram-negativne bacile; 91,8% za stafilokok i 85,7% za streptokok-enterokok. Slični rezultati su dobijeni i u doktorskoj disertaciji Janette Top (66), koja se bavila molekularnom epidemiologijom *E. faecium*, a u kojoj je na kolekciji prethodno molekularno potvrđenih izolata iz roda *Enterococcus* urađena evaluacija dva automatizovana sistema: BD Phoenix i Vitek 2. Rezultati istraživanja su pokazali da oba automatizovana sistema imaju preciznost od 87% u identifikaciji enterokoka. Zbog svega navedenog kao i zbog dostupnosti laboratorijskog materijala i opreme, odlučili smo da u našem istraživanju koristimo automatizovani BD Phoenix sistem.

Ukratko, da bismo utvrdili učestalost fekalne VRE kolonizacije kod pacijenata pod rizikom za VRE kolonizaciju, u našem istraživanju smo odlučili da za uzorkovanje, izolaciju i identifikaciju VRE do novoa vrste i ispitivanje osetljivosti izolata na antimikrobne agense koristimo metode koje imaju

naveću senzitivnost i specifičnost, koje su brze i lake za izvođenje i koje predstavljaju zlatni standard za potvrdu vrsno specifičnih i *van* gena. Stoga, koristili smo feces kao uzorak, hromogene podloge (CHROMID®VRE) za izolaciju, automatizovani Phoenix sistem za identifikaciju i ispitivanje osetljivosti na antimikrobne agense i PCR metodu koja predstavlja zlatni standard za potvrdu identifikacije vrsno specifičnih i *van* gena. Na ovaj način smo omogućili dve stvari: prvo, da dobijemo što tačniji podatak o učestalosti VRE kolonizacije na odeljenjima sa povećanim rizikom za VRE kolonizaciju; drugo, da smanjimo mogućnost pogrešnog klasifikovanja ispitanika u odnosu na (ne)identifikovanu VRE kolonizaciju na grupe VRE kolonizovanih/nekolonizovanih i nastanka informacione pristrasnosti, kao i sledstvenog podcenjivanja ili precenjivanja rizika pojedinih ispitivanih faktora za nastanak VRE kolonizacije.

Da bismo ispitali faktore rizika za VRE kolonizaciju koristili smo multivarijantnu binarnu logističku regresiju koja pokazuje veliku fleksibilnost pri istraživanju faktora rizika i koja je ujedno i jedna od najčešće korišćenih metoda za kontrolu pristrasnosti usled pridruživanja (eng. confounding) u analitičkoj fazi istraživanja (162). Studijsku populaciju u našem istraživanju činili su ispitanici koji su u istraživanje uključeni na osnovu odabira mesta uzorkovanja i dobrovoljnog pristanka, te smo svesni toga da u našem istraživanju postoji pristrasnost izbora, ali smo internom validacijom modela pokazali njegovu valjanost. Naime, model može savršeno da se slaže sa podacima na jednom uzroku ali da nema nikakvu prediktivni vrednost na drugom uzroku (163). Osim provere validnosti modela na novom uzorku i njegovoj eksternoj validaciji, model može da se validira na postojećem skupu podataka, što se naziva interna validacija. U našem istraživanju smo primenili internu validaciju koja je podrazumevala da se iz postojećeg uzorka ekstrahuje novi uzorak koji predstavlja 80% inicijalnog uzorka koji se nasumično generiše. Nakon formiranja novog uzorka, ponovili smo multivarijantnu logističku regresionu analizu, a rezultat koji smo dobili odgovarao je prethodno dobijenim podacima, čime je podržana valjanost našeg modela.

Ako posmatramo koeficijent determinacije ( $R^2$ ) u optimalnom modelu koji smo dobili u našem istraživanju, a koji je definisan kao procenat varijacije u zavisnoj promenljivoj koja se objašnjava varijacijom u nezavisnoj promenljivoj, možemo da vidimo da isti iznosi 20,6%, što znači da 79,4% promena u zavisnoj varijabli zavisi od nekih drugih varijabli, koje nisu u modelu. Istraživanje Hamilton i sar. (163) se bavilo značajem  $R^2$  koeficijenta i tumačenjem njegove vrednosti u medicinskim istraživanjima. Prema Hamilton i sar. (163) jedan od osnovnih problema u interpretaciji  $R^2$  koeficijenta je što varijansa u proučavanoj populaciji može snažno uticati na njegovu vrednost. Autori ističu da ne postoji garancija da visoka vrednost  $R^2$  koeficijenta ukazuje da je model bolji i obrnuto, da niska vrednost  $R^2$  koeficijenta ukazuje na slab model. Takođe, autori naglašavaju da nije racionalno upoređivati  $R^2$  koeficijente, s obzirom da će se uzorci značajno razlikovati u varijansi nezavisnih i zavisnih promenljivih. Istraživanja su pokazala da će u istraživanjima koja su rađena u kontrolisanim uslovima varijansa među prediktorima biti mala, dok će se u kliničkim studijama vrednosti  $R^2$  koeficijenta veoma razlikovati što zavisi opet od prirode analize. Autori zaključuju da istraživači treba da prihvate vrednost  $R^2$  koeficijenta kao putokaz za dalji rad i istraživanje, a ne kao manje vredan rezultat. Dobijeni model opisuje petinu promena u zavisnoj varijabli, što je zadovoljavajuće s obzirom da je ovo prvo istraživanje o VRE kolonizaciju u Srbiji među pacijentima u riziku za VRE kolonizaciju i da dobijeni podaci predstavljaju polaznu tačku za dalja istraživanja. U našem modelu su se kao nezavisni prediktori za VRE kolonizaciju izdvojile sledeće varijable: „klinička odeljenja“, „dužina bolničkog lečenja pre uzorkovanja“, „cefalosporini“ i „fluorohinoloni“, što je u skladu sa prethodnim podacima iz literature, koji će biti izloženi u daljem tekstu.



Razmatranje kliničkih odeljenja kao mesta rizika za VRE kolonizaciju vezuje se za detekciju prvog VRE soja krajem 1986. godine u bolnici u Velikoj Britaniji od strane Uttley i sar. (5) među pacijentima sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom, a nakon toga detekciju i prvog VRSA soja među pacijenata na hemodijalizi (164). Tada se nametnulo logično pitanje da li određena klinička odeljenja imaju ulogu u VRE kolonizaciji/infekciji ili VRE kolonizacija/infekcija predstavlja marker težine opšteg stanja pacijenata na tim odeljenjima (165). Različite studije su ispitivale povezanost boravka na određenim kliničkim odeljenjima i značaj bolničkog lečenja na ovim odeljenjima u nastanku VRE kolonizacije (164,166–168).

U našem istraživanju učestalost fekalne VRE kolonizacije je bila najviša na kliničkim odeljenjima za gerijatriju (42,6%) i JIL (40%), a najniža na odeljenjima za hemodijalizu (11,7%). Na odeljenjima za hemato-onkologiju ova vrednost je iznosila 27,9%, dok je na odeljenjima za akutne infektivne bolesti vrednost bila nešto niža i iznosila je 22,7%. Razlika u učestalosti VRE kolonizacije između pacijenata na hemodijalizi i pacijenata sa ostalih kliničkih odeljenja se može objasniti time što su pacijentni na hemodijalizi kao izrazito vulnerabilna populacija pacijenata češće pod nadzorom zdravstvenih radnika ali i zato što postoji edukacija i veća svesnost zdravstvenog osoblja i pacijenata na hemodijalizi o značaju preventivnih mera za sprečavanje i suzbijanja bolničkih infekcija. Pojedinačne studije koje su istraživale prevalenciju VRE kolonizacije među pacijentima na hemodijalizi zabeležile su vrednosti od 5,8% do 9,5% u SAD, 13% u Irskoj, 14,4% u Brazilu i 19,6% u Iranu. Niske učestalosti su detektovane u istraživanjima u Izralu (4,8%) i Atini (3,9%) (92). Meta analiza Zacharioudakis i sar. (164) iz 2014. godine je istraživala fekalnu VRE kolonizaciju kod pacijenata na hemodijalizi. Nakon pretrage PubMed i EMBASE baze podataka i primene isključnih kriterijuma, u meta analizu je uključeno 23 studije, odnosno 4842 ispitanika iz 100 različitih dijaliznih centara. Ukupna prevalencija VRE kolonizacije u navedenoj meta-analizi je iznosila 6,2% (2,8%-10,8%), a rizik za nastanak VRE bakterijemije kod VRE kolonizovanih pacijenata na hemodijalizi je bio skoro 22 puta veći u odnosu na VRE nekolonizovane pacijente. Vrednost VRE kolonizacije među pacijentima na hemodijalizi u našem istraživanju je iznosila 11,7% i najsličnija je podacima iz studije u Irskoj (169) i neznatno je viša od maksimalne učestalosti dobijene u meta-analizi Zacharioudakis i sar. (164).

U našem istraživanju detektovana je statistički značajna razlika između grupe VRE kolonizovanih i VRE nekolonizovanih u odnosu na klinička odeljenja uključena u istraživanje. Da bismo utvrdili rizik VRE kolonizacije na pojedinačnim odeljenjima, varijablu „klinička odeljenja“ smo formirali tako što su odeljenja za hemodijalizu uzeta kao referentna odeljenja prema kojem je procenjen rizik za VRE kolonizaciju na ostalim odeljenjima. U odnosu na odeljenja za hemodijalizu, boravak na odeljenjima za gerijatriju povećao je rizik za VRE kolonizaciju 6,5 puta, boravak u JIL pet puta, a boravak na hemato-onkološkom odeljenju 4,7 puta. Boravak na odeljenjima za akutne infektivne bolesti je dva puta povećava rizik za VRE kolonizaciju, međutim, ovaj rezultat nije bio statistički značajan. Ovi podaci mogu biti odraz težine kliničke slike, smanjene komplijanse čišćenja i dezinfekcije i smanjenja nadzora nad pacijentima kao posledica manjka osoblja ali i karakteristika VRE $_{fm}$  sojeva koje omogućavaju dobru adaptaciju i otpornost na preduzimanja mera za sprečavanje i suzbijanje bolničkih infekcija.

Retrospektivno istraživanje VRE epidemije u periodu 2013/2014. godine u univerzitetskoj bolnici u Francuskoj od strane Djembi i sar. (170) koje se bavilo identifikacijom faktora rizika za VRE kolonizaciju/infekciju, kao nezavisni faktor rizika za VRE kolonizaciju/infekciju izdvojilo je hospitalizaciju na kliničkom odeljenju za gerijatriju. Istraživanja vezana za VRE kolonizaciju kod starije populacije se najčešće odnose na identifikaciju faktora rizika kod osoba iz domova za stare. Istraživanje

Elizaga i sar. (171) o VRE kolonizaciji pacijenata iz staračkih domova koji su primljeni u opštu bolnicu u Čikagu, pokazalo je da je procenat VRE kolonizacije među starima visok i da je iznosio 59%, što je dosta više nego što je zabeleženo u našoj studiji. Autori su istakli značaj osoba iz staračkih domova kao važan VRE rezervoar. Takođe, Bonilla i sar. (172) su u svom istraživanju ukazali na veliku učestalost VRE kolonizacije među pacijentima iz staračkih domova koja je premašila učestalost VRE u JIL, što je u skladu za našim rezultatima. Istraživanja su pokazala da su stariji pacijenti izloženi većem riziku od razvoja infekcija iz više razloga koji su povezani sa procesom starenja, poput nepokretnosti, promena u sistemima organa, kao npr. urinarnog trakta, češća upotreba urinarnih katetera, antimikrobne terapije, češće hospitalizacije uzrokovane brojnim komorbiditetima, kao i zbog imunoloških promena koje prate proces starenja (173). Sve prethodno nabrojano mogu biti moguća objašnjenja za rezultat u našem istraživanju, odnosno da učestalost VRE kolonizacija bude najviša na kliničkim odeljenjima za gerijatriju. Neizvesno je da li sam proces starenja određuje ovu razliku ili je razlika posledica toga što su stariji pacijenti ostvaruju češći kontakt sa zdravstvenim sistemom, što im je zbog komorbiditeta potrebna češća ili produžena nega, što se češće primaju u bolnicu i što duže ostaju u bolnici u odnosu na pacijente mlađe starosne dobi i što zbog podložnosti infekcijama češće primaju veći broj antimikrobnih lekova (173). Takođe, starije osobe zbog ograničene pokretnosti češće koriste „guske“, koje mogu predstavljati VRE rezervoar (88) što može biti jedno od objašnjenja za češću kolonizaciju na kliničkim odeljenjima za gerijatriju. Ne sme se zanemariti i činjenica da visoka vrednost učestalosti VRE kolonizacije može biti i odraz manjka zdravstvenog osoblja i osoblja koje obavlja održavanje higijene zbog čega može doći do smanjenja komplijanse čišćenja i dezinfekcije.

Interesantno je da, iako produženje prosečnog životnog veka i starenje stanovništva na globalnom nivou predstavljaju jedan od trijumfa čovečanstva, a s druge strane trećinu smrtnosti kod ljudi starijih od 65 godina čine upravo infekcije (174), nema mnogo istraživanja koja su se bavila ispitivanjem faktora rizika za VRE kolonizaciju/infekciju kod starije populacije. Naša zemlja se sa 17,4% populacije starijih od 65 godina (175) svrstava u grupu demografski najstarijih populacija ne samo u evropskim već i u svetskim okvirima i smatramo da podatak koje smo dobili o visokoj učestalosti VRE kolonizacije na odeljenjima za gerijatriju treba shvatiti veoma ozbiljno prilikom planiranja organizacije zdravstvenog sistema, s obzirom da ova odeljenja predstavljaju važan VRE rezervoar.

Pacijenti koji su smešteni u JIL su kritično oboleli pacijenti, sa različitim vrstama imunodefijencija i/ili pacijenti nakon hirurških intervencija, a VRE kolonizacija gastrointestinalnog trakta ovako teških pacijenata predstavlja polazno mesto za nastanak infekcije i mogućeg smrtnog ishoda (107). Rezultati meta analize procenili su da je rizik za VRE infekciju među VRE kolonizovanim pacijentima od 0% do 45%, a rizik za nastanak VRE bakterijemije između 0% i 16%. Nasuprot tome, rizik za nastanak VRE infekcije kod VRE nekolonizovanih pacijenata je bio <2%. U istraživanju Goossens i sar. (125) koje je ispitivalo VRE kolonizaciju među pacijentima iz 13 bolnica u osam evropskih zemalja, najviša učestalost VRE kolonizacije zabeležena je među ispitanicima u JIL i iznosila je 42,3%. Slično tome, ispitivanje VRE kolonizacije u JIL u bolnici u Sao Paulo u Brazilu, detektovala je učestalost VRE kolonizacije od 32,6% (167). Učestalost VRE kolonizacije koju smo detektovali u JIL u našem istraživanju je u skladu sa dobijenim podacima iz datih istraživanja. Ako razmatrimo rezultate meta-analize Ziakas i sar. (107) iz 2013. godine koja je nakon pretrage PubMed i EMBASE baza podataka i primene isključnih kriterijuma obuhvatila 37 studija i 67 959 pacijenata i koja je imala dva cilja: 1. da istaži značaj VRE kolonizacije na prijemu u JIL na ukupnu VRE prevalenciju; 2. utvrdi uticaj VRE kolonizacije na prijemu u JIL na nastanak VRE infekcije, možemo da uočimo da je srednja vrednost prevalencije VRE kolonizacije na prijemu iznosila 8,8% (7,1%-10,6%) što je oko 20% vrednosti ukupne učestalosti nađene u našoj studiji, ali i prethodno pomenutim istraživanjima. Razlog za visoke vrednosti

učestalosti VRE kolonizacije u JIL u našem istraživanju se može objasniti ili visokim vrednostima na prijemu u JIL i/ili VRE transmisijom među pacijentima od strane zdravstvenog osoblja usled nedovoljnog broja zdravstvenih radnika u bolnicama i/ili iz okoline, u odsustvu adekvatnog postupka čišćenja i dezinfekcije s obzirom da je indirektni kontakt često opisan kao način VRE transmije zahvaljujući sposobnosti da dugo preživljava u spoljašnjoj sredini. Značaj dovoljnog broja zdravstvenih radnika u JIL u odnosu na broj hospitalizovanih pacijenata je naglašen u istraživanju Kampmeier i sar. (176) u kojem je opisana manja epidemija VRE u JIL u nemačkoj bolnici u toku pandemije KOVID-19. U periodu pojave VRE klastera u JIL u bolnicama u Nemačkoj je na snazi bila obustava minimalnih zahteva za osobljem zbog preusmeravanja kadra u kovid bolnice. Uzorkovanje prostora otkrilo je VRE na mestima najčešćih kontakta, kao što je radni sto medicinskih sestara, PC računar i njegovi delovi, držač za infuziju i slično.

Primena hemoterapije kod pacijenata sa malignitetima dovodi do oštećenja mukoze gastrointestinalnog trakta i olakšava translokaciju VRE u krvotok. Neutropenija koja prati hemoterapiju dodatno povećava rizik za nastanak VRE bakterijemije s obzirom da nema adekvatne fagocitoze patogena od stane neutrofila. Stoga su onkološki pacijenti, a posebno pacijenti sa hematološkim malignitetima podložni nastanku VRE bakterijemije ili VRE infekcije drugog mesta (168,177,178). U istraživanju Goossens i sar. (125) učestalost VRE kolonizacije na odeljenjima za hemato-onkologiju i transplantaciju je iznosila 31,5%, što je slično rezultatima dobijenim u našem istraživanju. Meta-analiza Alevizakos i sar. (168) iz 2016. godine je istraživala fekalnu VRE kolonizaciju kod pacijenata sa malignitetima i rizik za nastanak bakterijemije. Meta analiza je obuhvatila 34 studije i 8391 ispitanika sa malignitetom. Ukupna prevalencija VRE kolonizacije je iznosila 20% (14% - 26%). Prevalencija VRE kolonizacije u Evropi se kretala od 9% do 34%, a u SAD od 13% do 31%. VRE kolonizacija među pacijentima sa hematološkim malignitetima je iznosila 24%, što je slično vrednostima detektovanim u našoj studiji. Učestalost VRE kolonizacije među pacijentima koji su oboleli od tumora solidnih organa nije bila poznata, jer nije bila posebno prijavljivana u studijama. Nadalje, pokazano je da je rizik za nastanak VRE bakterijemije kod VRE kolonizovanih pacijenata 24,15 puta veći u odnosu na VRE nekolonizovane pacijente. Meta-analiza (168) je dala predviđanje da će oko 13% VRE kolonizovanih pacijenata sa malignitom razviti VRE infekciju u periodu od pet nedelja.

Ispitanici hospitalizovani na odeljenjima akutnih infektivnih bolesti koji su bili uključeni u našu studiju su najvećim delom hospitalizovani na kliničkom odeljenju za nejasna febrilna stanja. Nejasna febrilna stanja se definišu kao produžena febrilna bolest, odnosno kao stanje sa povišenom telesnom temperaturom koja ima vrednost preko 38,3°C i koja traje duže od tri nedelje, a koja ostaje bez utvrđene etiologije uprkos intenzivnoj proceni i dijagnostičkom ispitivanju (179). Febrilnost je česta klinička prezentacija velikog broja bolesti jer se može pripisati širokom spektru poremećaja, uglavnom infekcijama, malignim bolestima, neinfektivnim inflamatornim bolestima, ali i raznim drugim bolestima. Temperatura može biti jedini klinički simptom na početku nastanka infekcije kod onkoloških pacijenata koji su na imunosupresivnoj terapiji, ali može biti i maskirana kortikosteroidnom terapijom i antiinflamatornim lekovima (179). Karki i sar. (180) su zabeležili češću VRE kolonizaciju među pacijentima na odeljenjima infektivnih bolesti, i izdvojili ova odeljenja kao nezavisini prediktor za VRE kolonizaciju. Rizik za VRE kolonizaciju pacijenata koji borave na odeljenjima za infektivne bolesti je bio 1,8 puta veći u odnosu na ispitanike koji ne borave na ovim odeljenjima. U našem istraživanju rizik za VRE kolonizaciju na odeljenju za akutne infektivne bolesti je bio dva puta veći u odnosu na odeljenje za hemodijalizu, međutim ova razlika nije bila statistički značajna. Smatramo da bi sa povećanjem veličine uzorka, ista postala značajna. Učestalost VRE kolonizacije u istraživanju Karki i sar. (180) iznosila je 7,7% dok je u našem istraživanju učestalost bilo značajno viša i iznosila 22,7%. Ovako velika

razlika može da se objasni time što su u našem istraživanju uključeni ispitanici sa odeljenja za nejasna febrilna stanja koji prema protokolu kao empirijsku terapiju do dobijanja tačnog mikrobiološkog nalaza primaju između ostalog i cefalosporine 3. generacije, koji su induktori rezistencije enterokoka na vankomicin, o čemu će se biti više reči u narednim delovima diskusije (179,181).

Kao i u istraživanjima mnogih autora (129,130,135,182,183) i naša studija je potvrdila da je varijabla „dužina bolničkog lečenja pre uzorkovanja“ značajan nezavisni prediktor za VRE kolonizaciju. U našem istraživanju, više od 60% VRE pozitivnih ispitanika je boravilo u bolnici duže od sedam dana pre dana uzorkovanja, dok je trećina ispitanika boravila duže od 16 dana pre dana uzorkovanja. U odnosu na ispitanike koji su hospitalizovani 48 sati pre uzorkovanja stolice na VRE, ispitanici hospitalizovani 3-7 dana pre uzorkovanja imali su 5,6 puta veći rizik za VRE kolonizaciju, ispitanici hospitalizovani 8-15 dana pre uzorkovanja imali su 5,5 puta veći rizik za VRE kolonizaciju, dok su ispitanici hospitalizovani duže od 16 dana pre uzorkovanja imali 8,4 puta veći rizik za VRE kolonizaciju. U studiji Amberpet i sar. (135) rizik za VRE kolonizaciju kod ispitanika koji su boravili duže u bolnici ( $8 \pm 5,2$  dana) je bio 1,2 puta veći u odnosu na ispitanike koji su boravili kraće ( $4,5 \pm 2,9$  dana). U odnosu na navedene literaturne podatke, rizici za VRE kolonizaciju u našoj studiji su izuzetno visoki. Ovako visoki rizici za VRE kolonizaciju u odnosu na dužinu bolničkog lečenja u našoj studiji mogu da budu odraz diseminacije dobro adaptiranog bolničkog VRE soja.

Iako je skoro polovina VRE kolonizovanih ispitanika u našem istraživanju imala zabeležen podatak o prethodnom boravku u bolnici u periodu kraćem od tri meseca pre uzorkovanja za potrebe ovog istraživanja, nije bilo značajne razlike među ispitivanim grupama u odnosu na ovaj parametar. Ova razlika takođe nije bila zabeležena ni u istraživanju Amberpet i sar. (135), Metallidis i sar. (130) i Shaghaghian i sar. (92). Studija Karki i sar. (180) izdvojila je bolničko lečenje u periodu od tri meseca od uzorkovanja kao nezavisni prediktor za VRE kolonizaciju pri čemu je detektovan 8,4 puta veći rizik. Meta-analiza Alevizakos i sar. (184) je izdvojila prethodni boravak u bolnici u periodu od tri meseca kao nezavisni prediktor za VRE kolonizaciju koji povećava rizik za VRE kolonizaciju 4,7 puta. U dva istraživanja kao nezavisni prediktor VRE kolonizacije izdvojila se varijabla „bolničko lečenje unutar perioda od šest meseci pre uzorkovanja“ (129,185). U istraživanju Sakka i sar. (129) ispitanici koji su boravili u bolnici unutar šest meseci od uzorkovanja imali su 3,6 puta veći rizik za VRE kolonizaciju. Nasuprot tome, u istraživanju Souli i sar. (186) nije bilo značajne razlike među posmatranim grupama u odnosu na boravak u bolnici unutar šest meseci od uzorkovanja. Meta-analiza Zacharioudakis i sar. (164) je izdvojila prethodni boravak u bolnici u periodu od jedan do 12 meseci kao nezavisni prediktor za VRE kolonizaciju koji povećava rizik za VRE kolonizaciju 4,6 puta.

Različite studije su pokazale da primena antimikrobne terapije predstavlja faktor rizika za VRE kolonizaciju. U našem istraživanju u grupi VRE kolonizovanih ispitanika postoji veća učestalost primene antimikrobnih lekova u odnosu na grupu VRE nekolonizovanih. U grupi VRE kolonizovanih primena cefalosporina je iznosila 25,1%, flouorinolona 24,7%, metronidazola 23,4% vankomicina 13% i makrolida 11,7%. Među VRE pozitivnim ispitanicima oko 50% njih je primalo jedan antimikrobni lek, a više od 15% dva antimikrobna leka. Primena jednog antimikrobnog leka povećava rizik za VRE kolonizaciju oko tri puta. Toliki je rizik i prilikom primene dva ili više antimikrobnih lekova. Ova varijabla je ušla u multivarijantni model, ali se nije zadržala u optimalnom modelu. U istraživanju Sakka i sar. (129) primena antimikrobne terapije u toku hospitalizacije povećava rizik za VRE kolonizaciju 7,9 puta. Nasuprot ovom, u istraživanju Souli i sar., nije nađena razlika između posmatranih grupa u odnosu na primenu antimikrobne terapije. Istraživanje Shaghaghian i sar. (92) je detektovalo značajnu razliku između posmatranih grupa u odnosu na primenu antimikrobne terapije u toku mesec dana od



uzorkovanja. Karki i sar. (180) su kao nezavisnu varijablu koristili primenu antimikrobne terapije u periodu od tri meseca od uzorkovanja i detektovali da primena antimikrobnih lekova u tom periodu 4,3 puta povećava rizik za VRE kolonizaciju, a primena intravenskog antimikrobnog leka čak 13,4 puta. Primena dva ili više antimikrobnih lekova povećava rizik 10,2 puta, a hospitalizacija zajedno sa primenom antimikrobnog leka povećava rizik za VRE kolonizaciju 18 puta. U našem istraživanju, nije bilo značajne razlike između grupa VRE kolonizovanih i VRE nekolonizovanih u odnosu na primenu antimikrobnih lekova u periodu od šest meseci pre uzorkovanja. Slični rezultati su detektovani i u studiji Souli i sar. (186), dok u istraživanju Sakka i sar. (129) postoji značajna razlika u primeni antimikrobnih lekova u periodu od 6 meseci a rizik za kolonizaciju je 3,5 puta veći.

U odnosu na primenu pojedinačnih grupa antimikrobnih lekova, u našem istraživanju su se u univarijantnoj analizi kao prediktori izdvojili cefalosporini, fluorohinoloni i metronidazol. Primena cefalosporina povećava rizik za VRE kolonizaciju skoro tri puta, primena flourohinolona dva puta, a primena metronidazola 1,7 puta. Rizik za VRE kolonizaciju prilikom primene antimikrobnih lekova iz grupa makrolida i linkozamida je skoro dva puta, a vankomicina 1,5 puta, međutim ove varijable nisu bile statistički značajne. Pretpostavljamo da bi sa povećanjem veličine uzorka ove varijable postale statistički značajne i da bi se zadržale u modelu. U multivarijantnom modelu zadržali su se varijable „cefalosporini“ i „flourohinoloni“. Primena cefalosporina povećava rizik za VRE kolonizaciju dva puta, a primena flourohinolona 1,8 puta.

U istraživanju Amberpet i sar. (135) se kao značajni prediktor VRE kolonizacije izdvojio ceftriakson čija je primena, slično kao u našem istraživanju, dva puta povećavala rizik za VRE kolonizaciju. U istraživanju McEnoy i sar. (182) izdvojili su se cefalosporini 3. generacije čija primena je povećavala rizik za VRE kolonizaciju više od tri puta. Interesantno je da u dva istraživanja – u istraživanju Karki i sar. (180) i Sakka i sar. (129), primena cefalosporina nije bila značajna. U istraživanju McEnoy i sar. (182), Karki i sar. (180) i Sakka i sar. (129) su se kao faktori rizika za VRE kolonizaciju izdvojili flourohinoloni. Najsličnije vrednosti našim rezultatima ali više, možemo videti kod McEnoy i sar. (182), gde je pokazano da flourohinoloni povećavaju rizik za VRE kolonizaciju 2,3 puta. U istraživanju Sakka i sar. (129) ovaj rizik je bio šest puta viši, dok je u istraživanju Karki i sar. (180) ovaj rizik bio čak 16 puta viši. Zapravo, primena antimikrobnih lekova ima jednu od glavnih uloga u bolničkoj VRE epidemiologiji u smislu selekcije VRE kolonizacije i mogućnosti transmisije (187).

Problem sa cefalosporinima i enterokokom je vezan za činjenicu da su enterokoke urođeno rezistentne na cefalosporine. Cefalosporini imaju širok spektar antimikrobnog dejstva i prilikom terapije ovim antimikrobnim lekovima mikroorganizmi koji su osetljivi na cefalosporine, a koji čine dominantni mikrobiom gastrointestinalnog trakta bivaju eliminisani i zamenjeni enterokokom, koji zatim postaje dominantni deo mikrobioma gastrointestinalnog trakta (188). Cefalosporini imaju baktericidno dejstvo, ali ne dovode brzo do ćelijske lize, kao što je slučaj sa amoksicilinom. Naime, cefalosporini dovode do nastanka tzv. filamentoznih formacija – aberentnih bakterijskih ćelija koje mogu da opstanu dugo u *in vivo* uslovima pre nego što nastupi ćelijska liza. Ove formacije su detektovane u toku infekcija prouzrokovanim Gram-negativnim bakterijama kada su se u terapiji koristili cefuroksim, cefotaksime, ceftazidim i ceftriakson. Može se smatrati da je vreme koje je potrebno da se filamentozne formacije stvore zapravo vreme koje je dovoljno za indukciju antimikrobne rezistencije. Zapravo, antimikrobni agensi koji brzo dovode do smrti ćelije, smanjuju mogućnost indukcije antimikrobne rezistencije (188).

Cefalosporini su odavno bili povezivani sa povećanim rizikom za nastanak VRE kolonizacije (189,190). Međutim, veza između pojedinačnih antimikrobnih lekova u okviru klase cefalosporina i

nastanak VRE kolonizacije je tek skoro pokazana (191). Povezanost između broja dana primene cefepima/ceftazidima na 1000 pacijent-dana i incidencija VRE kolonizacije je bila uočena u istraživanju McKinelli i sar. (191). Nažalost, ova veza nije bila uočena u multivarijantnom modelu kontrolisanom za demografske i kliničke kovarijate. U istraživanju je pokazano da cefepim dovodi do smanjenja broja *Escherichia coli* i *Bifidobacter* u fecesu, da ceftazidim dovodi do smanjenja broja bakterija iz reda *Enterobacteriales* i vrsta *Lactobacillus bifidus* i *Bacteroides fragilis*, a da ceftiakson dovodi do smanjenja broja bakterija iz reda *Enterobacteriales* i roda *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Clostridium*. Primena sva tri pomenuta cefalosporina imala je isti ishod koji se ogleda u posledičnom povećanju broja enterokoka. U jednoj studiji pokazano je da je primena ceftriaksona povezana sa nastankom bolničke VRE bakterijemije, dok drugi antimikrobni lekovi kao npr. piperacilin-tazobaktam, ceftazidim i cefepim nisu bili povezani sa nastankom infekcije (192). Promene u učestalosti bolničkih infekcija se mogu primetiti u slučajevima nestašice leka i njegove supstitucije. Tako je zbog nestašice piperacilin-tazobaktama i zamene sa cefepimom dovelo do dvostrukog povećanja VRE infekcije (193). Istraživanja na zdravim dobrovoljcima kojima su davani cefalosporini su pokazala da nakon primene cefalosporina dolazi do povećanja broja enterokoka u digestivnom traktu. Slično je pokazano i kod pacijenata i na animalnim modelima. Druga istraživanja su pokazala da je endemski prisutan VRE na odeljenju hematologije efikasno eradikovano zamenu ceftazidima koji se koristi u terapiji febrilne neutropenije sa piperacilin-tazobaktamom. Međutim, ponovno uvođenje ceftazidima je bilo praćeno ponovnim javljanjem VRE, bez obzira što su mere higijene bile sve vreme na istom stepenu. Smanjenje izolovanje VRE sojeva u ovom istraživanju kao posledica zamene ceftazidima sa piperacilin-tazobaktamom je bila sa značajna, sa 16% na 5% (194,195).

Mnoge studije su pokazale da je primena cefalosporina, kao i vankomicina faktor rizika za nastanak VRE kolonizacije/infekcije (165,196–198). Rezultati jedne ekološke studije koja je obuhvatila 126 odeljenja intenzivne nege i lečenja su pokazali da su cefalosporini i vankomicin nezavisni faktori rizika za nastanak VRE infekcije (199). Retrospektivna studija Lautenbach i sar. (200) je istraživala uticaj restrikcije vankomicina i cefalosporina 3. generacije na prevalenciju VRE infekcije u periodu od deset godina. U posmatranom periodu primena vankomicina je smanjena za 27%, a cefalosporina 3. generacije za 85%, međutim, uprkos ovoj intervenciji prevalencija VRE infekcije je čak bila u porastu, sa 17,4% na 29,6%. Nasuprot ovome, istraživanje Quale i sar. (201) je pokazalo da je restrikcija vankomicina i 3. generacije cefalosporina u periodu od šest meseci dovela do smanjenja učestalosti VRE kolonizacije sa 47% na 15%. Slično su pokazali i Montecalvo i sar. u svom istraživanju (202).

Izvršna biorasploživost prilikom upotrebe oralne forme flourohinolona čine fluorohinolone antimikrobnim agensima koji se često primenjuju u različitim kliničkim stanjima, uključujući npr. urosepsu (203). Uprkos potencijalnoj toksičnosti i neželjenim reakcijama na lek kao što je ruptura tetive i neuropatija, prelazak na oralnu formu leka doprinelo je njegovoj prekomernoj upotrebi, tako da je od 2000. godine do 2010. godine u svetu zabeleženo povećanje od 64% u propisivanju flourohinolona (204). Nažalost, ova prekomerna upotreba je takođe dovela do pojave rezistencije na fluorohinolone, što ima negativne posledice po klinički ishod bolesti (203). Proučeni su efekti najčešće korišćenih fluorohinolona na fekalnu mikrobiotu, kao što su ciprofloksacin, levofloksacin i moksifloksacin i rezultati su pokazali relativno dosledne rezultate (205,206). Naime, ciprofloksacin dovodi do eliminacije bakterija iz reda *Enterobacteriales*, roda *Bifidobacterium* i *Clostridium* u gastrointestinalnom traktu i do posledičnog povećanje broja enterokoka. Za razliku od ciprofloksacina, primena levofloksacina i moksifloksacina ima suprotan efekat na enterokok i dovode do smanjenja njegovog broja. Terapija flourohinolonima je zastupljena u bolničkom lečenju kao profilaktička terapija ili kao inicijalna empirijska terapija među hematološkim pacijentima sa febrilnom neutropenijom. Flourohinoloni, pogotovo ciprofloksacin imaju

veliki uticaj na mikrobiom gastrointestinalnog trakta, s obzirom da se u toku metabolizma leka postižu visoke koncentracije u fecesu. de Lastours i sar. (207) su na zdravim dobrovoljcima ispitivali uticaj primene ciprofloksacina na populaciju enterokoka i na razvoj rezistencije na flourohinolone. Istraživanje je pokazalo da primena ciprofloksacina dovodi do smanjenja gustine enterokoka u fecesu u toku terapije, ali i da se gustina enterokoka po gramu fecesa vraća na preekspozicioni nivo posle završetka terapije. Primena ciprofloksacina dovodi do promena u odnosima između vrsta enterokoka, koja se ne menja sa završetkom terapije. Pokazano je da tokom terapije dolazi do nastanka rezistencije na flourohinolone kod *E. faecalis* ili *E. faecium* vrste, a zatim ovaj klon postaje dominantan. Ono što je takođe veoma zanimljivo u ovom istraživanju je da je mehanizam rezistencije kod vrste *E. faecalis* drugačiji od mehanizma rezistencije *E. faecium* vrste i da je soj *E. faecium* rezistentan na flourohinolone veoma često rezistentan i na ampicilin (207). Rezistencija na flourohinolone je povezana sa obimom potrošnje flourohonolona.

Dobro je dokumentovano da metronidazol stimuliše nastanak VRE kolonizacije (191,208). Metronidazol se dugo smatrao lekom prvog izbora u terapiji infekcije izazvane *C. difficile* blagog i srednjeg stepena, prvenstveno zbog niske cene i ekvivalencije sa vankomicinom, dok je vankomicin bio rezervisan za terapiju teških oblika (209). Novi vodiči za terapiju infekcije izazvane *C. difficile* preporučuju da se za sve oblike infekcije izazvane *C. difficile* koristi vankomicin U jednoj multicentričnoj retrospektivnoj opservacionoj studiji Stevens i sar. (209) upoređivan je efekat primene vankomicina i metronidazola u terapiji infekcije izazvane *C. difficile* i praćeni su efekti terapije na nastanku VRE infekcije. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da oralna primena vankomicina i metronidazola ima identičan efekat na nastanak VRE infekcije kod pacijenata pod rizikom. Istraživači smatraju da u bolničkoj sredini u kojoj je stabilna učestalost javljanja infekcije uzrokovane *C. difficile*, primena oralnog vankomicina umesto metronidazola neće dovesti do značajnih promena u nastanku VRE infekcije.

Makrolidi su poznati više od pet decenija i godinama predstavljaju glavnu alternativu za lečenje infekcija izazvanih Gram-pozitivnim bakterijama (uglavnom  $\beta$ -hemolitičkog streptokoka i pneumokoka) kod osoba alergičnih na penicilin (210). Podaci pokazuju da se oko osam miliona doza makrolida aplikuje godišnje, od čega su azitromicin i klaritromicin na globalnom nivou najviše propisivani antimikrobni lekovi (211). U studiji rađenoj u Finskoj među decom uzrasta od dve do sedam godina, primena makrolida je u posmatranom periodu dovela do izmena u mikrobioti gastrointestinalnog trakta, u smislu izmene odnosa pojednih vrsta i sazrevanja mikrobioma, ali i do pojave rezistencije na makrolide (212). U randomizovanoj placebo kontrolisanoj studiji u južnoj Indiji (211) koja je takođe ispitivala efekat azitromicina na mikrobiom dece starosti od šest do jedanaet meseci pokazano je da primena azitromicina takođe ima efekat na izmenu odnosa vrsta mikrobiote i eliminaciji pojedinih bakterijskih vrsti, ali nije uočena pojava rezistencije na makrolide, kao ni sazrevanje mikrobioma. Autori smatraju da je sam sastav mikorbioma visoko specifičan za uzrast i za područje.

U meta-analizi Alevizakos i sar. (168) prethodna primena vankomicina povećava rizik za VRE kolonizaciju skoro dva puta. Vankomicin vrši selektivni pritisak na enterokoke ali ima i ulogu u interferenciji sa mikrobiomom gastrointestinalnog trakta i na taj način omogućava VRE predominaciju. Ova činjenica je posebno zabrinjavajuća, s obzirom da je primećena povećana potrošnja vankomicina kod pacijenata sa febrilnom neutropenijom. Meta-analiza Zacharioudakis i sar. (164) procenjuje da će jedan od osam pacijenata tretiranih vankomicinom biti identifikovani kao VRE nosioci. Intravenski primenjen vankomicin u periodu dužem od pet dana može da prođe kroz zid gastrointestinalnog trakta i da se nađe u fecesu, a redukovana bubrežna funkcija kod pacijenata na hemodijalizi može da ima ulogu u akumulaciji intavenski datog vankomicina u fecesu. Na ovaj način, povećava se koncentracija VRE u



stolici, a samim tim i mogućnost transmisije sa pacijenta u okolinu, zdravstveno osoblje i na druge pacijente. S druge strane, sistematski pregled literature koji je procenjivao efekat redukcije primene vankomicina na prevalenciju i incidenciju VRE kolonizacije u SAD nije kao rezultat dao pozitivan efekat ove intervencije (213). Moguće objašnjenje je da upotreba glikopeptida predstavlja samo prvi korak u procesu selekcije VRE. Smatra se da izloženost glikopeptidima ne pospešuje pojavu VRE na nivou nastanka mutacije, ali olakšava selekciju VRE. U drugom koraku, upotreba specifičnih antimikrobnih agenasa dodatno utiče na mikrobnu ravnotežu što dovodi do nastanka VRE kolonizacije visoke gustine (214).

Veći broj studija je pokazao da povećana upotreba antimikrobnih lekova doprinosi nastanku antimikrobne rezistencije (215,216). Prema podacima o obimu potrošnje cefalosporina izraženo u broju definisanih dnevnih doza (DDD) na 1000 stanovnika po danu (DDD/1000/d) u Republici Srbiji u periodu od 2006. godine do 2018. godine, možemo da vidimo da se obim potrošnje cefalosporina smanjio 1,5 puta, sa 5,4 koliko je iznosio 2006. godine na 3,5 koliko je zabeleženo 2018. godine (138,217,218). Međutim, iako se ukupna potrošnja cefalosporina smanjila, smanjenje se u najvećem obimu odigralo na račun cefalosporina 1. generacije i to 3,3 puta, ali je zabrinjavajuće što se beleži povećanje u obimu potrošnje cefalosporina 3. generacije, i to 3,2 puta. Ako se posmatra obim potrošnje pojedinačnih lekova iz grupe cefalosporina u posmatranom periodu praćenja potrošnje lekova, ceftriakson je povećan za oko 12%, sa 0,36 na 0,41, ceftazidim je smanjen 1,5 puta (sa 0,03 na 0,02), a cefepim je povećan 2 puta, sa 0,01 na 0,02. Ako u istom posmatranom periodu razmotrimo podatke za ostale antimikrobne lekove od interesa za naše istraživanje možemo da zapazimo nekoliko sledećih činjenica. Naime, potrošnja flourohinolona je porasla 1,6 puta, sa 2,03 koliko je iznosila 2013. godine na 3,37 koliko je zabeleženo 2018. godine (138,217,218). Među flourohinolonima, najviše je propisivan ciprofloksacin, i njegova potrošnja je u posmatranom period povećana 1,25 puta sa 1,28 na 1,6 DDD/1000/d. Takođe, potrošnja metronidazole je porasla 2,2 puta, sa 0,06 koliko je iznosila 2013. godine na 0,135 koliko je zabeleženo 2018. godine (138,217,218). Nadalje, porasla je i potrošnja makrolida i to 1,4 puta, sa 3,73 koliko je iznosila 2013. godine na 5,28 koliko je zabeleženo 2018. godine (138,217,218). Među makrolidima, najviše je propisivan azitromicin, i njegova potrošnja je u posmatranom periodu povećana 1,6 puta sa 1,56 na 2,58. I na kraju, obim potrošnje vankomicina je porastao skoro dva puta, sa 0,02 koliko je iznosio 2013. godine na 0,039 koliko je zabeleženo 2018. godine (138,217,218). Ako uporedimo obim potrošnje prethodno analiziranih antimikrobnih lekova sa drugim evropskim zemljama koje su u vrhu što se tiče učestalosti invazivnih VRE *fm* izolata kao što su Grčka, Irska, Kipar, Poljska, Mađarska, Rumunija, Bugarska, možemo da se iznenadimo činjenicom da je Srbija prema potrošnji cefalosporina 3. generacije prema podacima ECDC za 2018. godinu ubedljivo na prvom mestu. Prema potrošnji flourohinolona zauzimamo drugo mesto. Tako je i sa makrolidima. Pozitivno je to što smo prema potrošnji vankomicina na 5. mestu, a metronidazole na 4. mestu od grupe prethodno nabrojanih evropskih zemalja (120). Prekomeran obim potrošnje antimikrobnih lekova koji su dobri induktori VRE rezistencije može da bude jedno od potencijalnih objašnjenja za visoku učestalost VRE kolonizacije u našem istraživanju.

U literaturi su dobro dokumentovane ne samo razlike između učestalosti javljanja pojedinih infektivnih bolesti u odnosu na pol, već i razlike u težini kliničke slike i češćeg smrtnog ishoda od određenih infektivnih bolesti u odnosu na pol (219). Podaci o razlici u učestalosti kolonizacije MDR bakterijama u odnosu na pol su oskudni, ali i kontradiktorni. Dok su neke studije izdvojile muški pol kao faktor rizika za kolonizaciju za MRSA, VRE i rezistentne Gram-negativne bakterije, druge nisu uspele da dokažu ovu povezanost. Objašnjenje se može naći u polno-specifičnim razlikama u imunskom odgovoru, razlikama u mikrobiomu i ličnoj higijeni, posebno higijeni ruku (220). U našem istraživanju, kao i u istraživanju Metallidis i sar. (130), ali i u istraživanjima drugih autora (102,129,134) nije bilo

razlike između ispitivanih grupa u odnosu na pol. Nasuprot tome, u studiji Kalochertis i sar. (127) VRE kolonizovani ispitanici su bili češće muškog pola, međutim autori su naglasili da preovladavanje muškog pola među VRE kolonizovanim pacijentima do tada nije zabeleženo. Rezultati studije rađene u Francuskoj 2017. godine (170) su takođe pokazali da je muški pol značajno povezan sa VRE kolonizacijom. Jedno od potencijalnih objašnjenja autora za povezanost muškog pola bi bilo da je ova povezanost odraz neke druge povezanosti koja nije bila ispitivana u pomenutim studijama, kao što je uticaj težine bolesti. U studiji Whelton i sar. (103) kao i u studiji koja je sprovedena u Singapuru (221), detektovano je da su VRE ispitanici bili češće ženskog pola. Potencijalno objašnjenje za detekciju povezanost VRE kolonizacije i ženskog pola koje autori iznose u diskusiji, moglo bi biti odraz toga što su u obe studije pacijentkinje bile smeštene u višekrevetna sobe, što dovodi do većeg broja kontakata među pacijentima. Interesantno je napomenuti da je u našoj studiji, iako nema statističke značajnosti u odnosu na pol, ženski pol povezan sa većim rizikom za VRE kolonizaciju, odnosno, ženski pol je imao 20% veći rizik za VRE kolonizaciju.

U našem istraživanju nije nađena statistički značajna razlika između grupe VRE kolonizovanih i VRE nekolonizovanih u odnosu na starost. Slične rezultate su objavili i drugi autori, kao što su npr. autori nekoliko istraživanja koja su sprovedena u Grčkoj (102,127,129), ali i autori studije iz Australije (134). Naime, ni u ovim istraživanjima nisu nađene razlike između ispitivanih grupa u odnosu na starost. Nasuprot ovome, u istraživanjima Metallidis i sar. (130) koje je sprovedeno u Grčkoj i Whelton i sar. (103) koje je sprovedeno u Irskoj, postojala je razlika između grupe VRE kolonizovanih i VRE nekolonizovanih u odnosu na starost, odnosno, ispitanici u grupi VRE kolonizovanih su bili češće starije životne dobi u odnosu na ispitanike u grupi VRE nekolonizovanih. Osnov za ovu povezanost može se naći u činjenici da sa starenjem imunski i endokrini sistem prolaze kroz različite vrste promena koje utiču na veću podložnost infektivnim bolestima i da se infekcije smatraju vodećim uzrocima morbiditeta i mortaliteta u starijim godinama. Različiti faktori, uključujući imunoscencenciju (promene u imunskom sistemu koja je povezana sa godinama), hronične bolesti i promene u normalnim funkcijama fizioloških organa mogu modifikovati učestalost i težinu infekcije kod starijih pacijenata (219,222). Zanimljivo je da su u studiji sprovedenoj u Indiji (135) VRE kolonizovani ispitanici češće bili mlađe životne dobi, u odnosu na VRE nekolonizovane, što je bilo neočekivano i za šta autori nisu imali objašnjenje. Bez obzira što u našem istraživanju nije pronađena statistički značajna razlika između posmatranih grupa u odnosu na varijablu „uzrasna grupa (godine)  $\geq 65$ “, ista se pokazala kao prediktor VRE kolonizacije u univarijantnoj analizi. U našem istraživanju osobe starije od 65 godina imaju 1,7 puta veći rizik za VRE kolonizaciju. Međutim, ova varijabla se nije zadržala kao prediktor u multivarijantnom modelu. Pretpostavljamo da je to posledica veličine uzorka i da bi sa povećanjem veličine uzorka ova varijabla bila značajno povezana za VRE kolonizacijom.

Komorbidity, kao što su DM i vaskularne bolesti predstavljaju jedne od faktora koji doprinose riziku za nastanak infekcije uzrokovane MDR bakterijama (223). Studije koje se bave ispitivanjem ovog rizika najčešće u statistički model uključuju hronične bolesti u vidu dihotomnih varijabli (prisustvo/odsustvo bolesti). Mana takvog načina uključivanja je što ne može biti uključeno previše varijabli s obzirom da na taj način može nastati prezasićenje statističkog modela (223). Kao rešenje za ovaj problem neke studije koriste skorove komorbiditeta, kao što su Charlson Comorbidity Index (CCI) i Chronic Disease Score (CDS). Iako postoje i drugi skorovi komorbiditeta, ni jedan nije napravljena konkretno za ispitivanje infektivnih bolesti, a posebno ne za antimikrobnu rezistenciju kao ishodnu varijablu. Takođe, sami skorovi ne uključuju sve komorbiditete koji bi mogli predstavljati rizik za bolničku infekciju, a opet uključuju komorbiditete koji nisu povezani sa nastankom bolničke infekcije, kao što su demencija ili migrena (223). McGregor i sar. (223) u istraživanju koje se bavilo upotrebom

ovih skorova u studijama koje se bave bolničkim infekcijama, navode da je diskriminatorsna moć oba skora ispod nivoa prihvatljivosti, kao i da su skorovi loše kalibrisani, odnosno da predviđanje da budu slučajevi ili kontrole nije konzistentno. Zbog svega gore navedenog, odlučili smo da u naše istraživanje uključimo najčešće pojedinačne komorbiditete, a ne da ih izrazimo kroz neki od pomenutih skorova. Međutim, u našoj studiji nije bilo razlike između VRE kolonizovanih i VRE nekolonizovanih ispitanika u odnosu na ispitavane komorbiditete.

U studijama: Sakka i sar. (129), Amberpet i sar. (135), Souli i sar. (186), Pao-Yu Chen i sar. (224), Metallidis i sar. (130), Kee i sar. (185), Kim i sar. (225), kao u našoj studiji, nije bilo razlike između VRE kolonizovanih i VRE nekolonizovanih ispitanika u odnosu na prisustvo DM. Nasuprot tome, u dve studije iz Australije DM je izdvojen kao nezavisni prediktor za VRE kolonizaciju. U studiji Karki i sar. (180) ispitanici koji imaju DM imaju 3,1 puta veći rizik za VRE kolonizaciju u odnosu na ispitanike bez DM, dok je u studiji McEvoy i sar. (182) taj rizik veći iznosi 3,98. Odsustvo razlike između VRE kolonizovanih i VRE nekolonizovanih ispitanika u odnosu na prisustvo hipertenzije u našoj studiji je u saglasnosti sa drugim istraživanjima (92,185), kao i odsustvo ove razlike u odnosu na hroničnu opstruktivnu bolest pluća (183). Odsustvo razlike posmatranih grupa u odnosu na prisustvo infarkta miokarda i srčane insuficijencije u našem istraživanju je u saglasnosti sa drugim istraživanjima (183,224). Nasuprot tome, u istraživanju u australijskoj bolnici (182), kardiovaskularna oboljenja su izdvojena kao nezavisni prediktor sa rizikom od 2,18 za nastanak VRE kolonizacije, a oboljenja centralnog nervnog sistema kao nezavisni prediktor sa rizikom od 2,08 za nastanak VRE kolonizacije (182). U odnosu na prisustvo cerebrovaskularnih bolesti u našem istraživanju nismo detektovali značajnu razliku između VRE kolonizovanih i VRE nekolonizovanih ispitanika. U univarijantnoj analizi ova varijabla je bila povezana sa 1,9 puta većim rizikom za VRE kolonizaciju, međutim, nije se zadržala u multivarijantnom modelu. U odnosu na prevod iz druge ustanove nije bilo razlike između VRE kolonizovanih i VRE nekolonizovanih ispitanika, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživanja (178,182).

U našem istraživanju varijabla „hirurška intervencija u toku sadašnjeg bolničkog lečenja“ se izdvojila kao prediktor u univarijantnoj analizi. Ispitanici koji su imali hiruršku intervenciju u toku posmatranog bolničkog lečenja imali su tri puta veći rizik za VRE kolonizaciju. Ova varijabla je ušla u multivarijantni model, ali se nije zadržala u optimalnom modelu. Nasuprot našem istraživanju, u istraživanju drugih autora nije nađena ovakva razlika (130,135,182).

U našem istraživanju, kao i u istraživanju, Papadimitriou-Olivgeris i sar. (226) nije bilo statistički značajne razlike između VRE kolonizovanih i VRE nekolonizovanih ispitanika u odnosu na primenu onkološke i kortikosteroidne terapije. Nasuprot ovom, u primena imunosupresivne terapije i kortikosteroidne terapije je bila značajna u istraživanju Zhou i sar. (227) i Furtado i sar. (167). U odnosu na primenu transfuzije u istraživanju McEvoy i sar. (182) postojala je razlika između ispitivanih grupa, za razliku od našeg istraživanja u kojem ova razlika nije detektovana. Kao i u našem istraživanju i u drugim istraživanjima (102,130) nije postojala razlika između ispitivanih grupa u odnosu na prisustvo urinarnog katetera. U našem istraživanju nije detektovana razlika između ispitivanih grupa u odnosu na plasiranje CVK, što je u saglasnosti sa drugim istraživanjima (130,167). Nasuprot tome, u istraživanju Christidou i sar. (102) pronađena je statistički značajna razlika između grupa u odnosu na plasiranje CVK. Nadalje, u našem istraživanju nije detektovana razlika između ispitivanih grupa u odnosu na hematološke procedure (182), ali ni u odnosu na JIL procedure bez plasiranja CVK, što je u saglasnosti sa drugim istraživanjima (102,167,226). U našem istraživanju, kao i u istraživanju Metallidis i sar. (130),

Karki i sar. (180) i Christidou i sar. (102) nije bilo značajnih razlika između ispitivanih grupa u odnosu na primenu endoskopskih procedura.

Želudačna kiselina i očuvana mikrobiota gastrointestinalnog trakta štite gastrointestinalni trakt od kolonizacije egzogenim bakterijama. IPP pripadaju grupi lekova koji inhibiraju sekreciju želudačne kiseline i mogu da dovedu do promene sastava mikrobiote, što može dovesti do kolonizacije i nadalje imati ulogu u nastanku infekcije. Tokom proteklih nekoliko decenija obim propisivanja IPP se znatno povećao. Osim toga, IPP su dostupni i bez recepta. Upotreba IPP je najviša u populaciji od 60 do 80 godina i iznosi oko 17%. Veliki broj studija je ispitivao povezanost upotrebe IPP i VRE kolonizacije, međutim podaci su nedosledni, s obzirom na to da neke epidemiološke studije prijavljuju povećan rizik od kolonizacije MDR, dok druge ne pokazuju takvu povezanost (228). Sistematski pregled i meta-analiza Willems i sar. (228) rađena zaključno sa julom mesecom 2019. godine je posle primene isključnih kriterijuma uključila 26 opservacionih studija odnosno 29 382 ispitanika. Meta-analiza je pokazala da primena IPP povećava rizik za gastrointestinalnu kolonizaciju MDR bakterijama iz reda *Enterobacterales* i VRE i to za 75%. U našem istraživanju kao i u istraživanju Zhou i sar. (227) nije nađena razlika između grupa VRE kolonizovanih i VRE nekolonizovanih u odnosu na primenu IPP, niti je u univarijantnoj analizi primena IPP detektovana kao prediktor.

Mikrobiota gastrointestinalnog trakta predstavlja kompleksnu bakterijsku zajednicu koja ima važnu ulogu u održavanju gastrointestinalne homeostaze i zdravlja ljudi. *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) (ATCC soj 53103) je izolovan 1985. godine i opsežnim proučavanjem na ljudima pokazao se sigurnim i nepatogenim. Studije su pokazale da LGG dovodi do skraćenja trajanje i učestalost dijareje kod dece, prevenciju relapsa dijareje povezane sa *C. difficile* i prevenciju dijareje putnika. Opsežna klinička ispitivanja o upotrebi LGG u jogurtu i kao dodatak hrani takođe su pokazali bezbednost LGG soja (229). Serija *in vitro* studija je pokazala da LGG proizvodi antibakterijske supstance koja inhibiraju i imaju baktericidno dejstvo prema četiri različita VRE soja (229). Plupjeen i sar. (230) su izolovali *Lactobacillus lactis* KA-FF1-4, iz fermentovane ribe i pokazali da ovaj soj proizvodi veliki broj antimikrobnih supstanci koji imaju širok spektar dejstva prema različitim patogenima, kao i da ima modulatorno dejstvo na mikrobiotu gastrointestinalnog trakta tako što podstiče rast i umnožavanje „dobrih“ bakterija koje proizvode veliki broj korisnih metabolita. Ideja o tome da irigacija kolona može uticati na poboljšanje zdravstvenog stanja potiče krajem 19. veka, kada je dr Dr J H Kellogglekar (231) iz Mičigena počeo kod svojih pacijenata da primenjuje terapiju jogurtom u lečenju različitih oboljenja. Prvo randomizovano, duplo slepo, placebo kontrolisano ispitivanje uticaja LGG kulture u formi jogurta na eliminaciju VRE iz gastrointestinalnog trakta kod VRE kolonizovanih pacijenata sproveli su Manley i sar. (232). U studiji je učestvovalo 27 ispitanika, od toga je 14 ispitanika primalo tretman (100 g jogurta dnevno koji sadrži LGG tokom 4 nedelje), a 13 ispitanika placebo, odnosno običan jogurt. Svih 11 pacijenata iz grupe koja je primala tretman, a koji su završili studiju bili su VRE negativni. Skoro svi su ostali negativni najmanje 4 nedelje nakon završetka ispitivanja. Jedanaest ispitanika iz kontrolne grupe koji su završili studiju su ostali VRE pozitivni. Osam od pomenutih 11 pacijenata je naknadno prebačeno na tretman LGG jogurtom i u roku od 4 nedelje su bili VRE negativni. U našem istraživanju nije nađena razlika između ispitivanih grupa u odnosu na primenu probiotika, niti je primena probiotika značajno povezana sa VRE kolonizacijom. Potencijalno objašnjenje odsustva povezanosti bi bilo to što se najveći procenat propisivanih probiotika među ispitanicima u našoj studijskoj populaciji odnosio na Bulardi® koji sadrži gljivicu *Saccharomyces boulardii*, a ne na probiotike koji sadrže laktobacile kao što je npr. Liobif®.



Koinfekcija *C. difficile* kod pacijenata sa VRE kolonizacijom/infekcijom predstavlja važan faktor u bolničkom okruženju u kojem je sve veća incidencija *C. difficile* infekcije i VRE infekcije, ali i poteškoća u njihovoj eradikaciji. Stoga, pritisak kolonizacije predstavlja važnu meru u kontroli bolničke infekcije i može da posluži kao parametar za kvantifikaciju opterećenja bakterijama rezistentnim na antimikrobne agense u bolničkoj sredini, ali i da predstavlja parametar kojim se procenjuje verovatnoća unakrsne transmisije rezistentnih bakterija u okviru bolničkih odeljenja (233). Istraživanje Roghmann i sar. (234) je kao faktor rizika za VRE bakterijemiju kod pacijenata sa akutnom leukemijom izdvojio infekciju *C. difficile*. Istraživanje Podual i sar. (235) je utvrdilo da je kolitis prouzrokovan *C. difficile* česta koinfekcija kod pacijenata sa VRE kolonizacijom/infekcijom, a da stopa koinfekcije iznosi 19%. U univarijantnoj analizi koja je rađena u našem istraživanju, infekcija *C. difficile* nije statistički značajni prediktor za VRE kolonizaciju, međutim, ispitanici koji imaju infekciju *C. difficile* imaju 2,5 puta veći rizik za VRE kolonizaciju. Pretpostavljamo da kada bi uzorak bio veći, da bi varijabla „infekcija *C. difficile*“ postala statistički značajan prediktor za VRE kolonizaciju. Povezanost *C. difficile* i VRE se može pripisati sledećim činjenicama: 1) *C. difficile* i VRE imaju veliki broj zajedničkih faktora rizika za kolonizaciju/infekciju; 2) upotreba vankomicina za lečenje kolitisa *C. difficile* može doprineti nastanku VRE kolonizacije; 3) upotreba metronidazola za lečenje kolitisa *C. difficile* može doprineti nastanku VRE kolonizacije; i 4) upotreba kombinovane antimikrobne terapije za lečenje enterokokne seapse može biti predispozicija pacijenata za *C. difficile* kolitis (235).

Imunosupresija se smatra ključnim stanjem za nastanak VRE bakterijemije a virusi mogu izazvati imunosupresiju različitim mehanizmima. Prvo, imunosupresija može biti rezultat direktnih efekata replikacije virusa na funkciju limfocita. Drugo, različiti solubilni faktori virusnog porekla ili porekla ćelija domaćina koji se oslobađaju iz zaraženih ćelija mogu uticati na imunosupresiju. Treći mehanizam je rezultat virusne infekcije na makrofage i utiče na funkciju ovih ćelija kako u okviru urođenog, tako i u okviru stečenog imunskog odgovora. Konačno, imunosupresija može biti rezultat prekomerne aktivnosti supresorskih ćelija, koja nastaje kao posledica dejstva virusa na imunološku regulaciju (236,237). U našem istraživanju nije bilo razlike među posmatranim grupama ispitanika u odnosu na virusnu infekciju, niti je ista u univarijantnoj analizi izdvojena kao značajan prediktor VRE kolonizacije.

Neutrofili su najbrojniji leukociti u cirkulaciji i najvažniji su za akutni zapaljenski odgovor na bakterijsku infekciju, stoga je i glavna komplikacija neutropenije povećan rizik od infekcije. Jedan od glavnih rizika za nastanak neutropenije je primena hemoterapije. Febrilna neutropenija se smatra urgentnim stanjem (179). Istraživanje Bossaer i sar. (181) je pokazalo da oko 38% VRE kolonizovanih onkoloških pacijenata sa neutropenijom razviju VRE infekciju a oko 26% razvije bakterijemiju. Neutropenija koja traje duže od sedam dana predstavlja faktor rizika za nastanak VRE infekcije. U našem istraživanju nije bilo razlike između grupa u odnosu na neutropeniju, što je u saglasnosti sa istraživanjem Kee i sar. (185). Nasuprot ovim rezultatima, u istraživanju Shaghaghian i sar. (92) detektovana je razlika između posmatranih grupa i VRE kolonizovani ispitanici su značajno češće imalu neutropeniju.

Hipoalbuminemija je faktor rizika za nastanak infekcije i prediktor težine kliničke slike. Nivo serumskog albumina ima ulogu u urođenom i stečenom imunskom odgovoru, a proces oksidacije i razgradnje albumina utiču na interakcije sa lipidima koji igraju važnu ulogu u odbrani od infektivnih agenasa (238). Hipalbuminemija je povezana sa povećanim mortalitetom kod pacijenata sa VRE bakterijemijom. Takođe, predstavlja nezavisni faktor rizika za mortalitet od infekcije *C. difficile* (238). Kod starijih osoba, hipalbuminemija je povezana sa lošim kliničkim ishodom u slučaju nastanka bakterijemije kao bolničke infekcije (238). U našem istraživanju, kao i u istraživanju Shaghaghian i sar.

(92) nije bilo razlike među posmatranim grupama ispitanika u odnosu na hipoalbuminemiju. Međutim, u istraživanju Zhou i sar. (227) i Kee i sar. (185) ova razlika je detektovana.

Poznato je da mnogi antimikrobni lekovi podstiču rast, razmnožavanje i patogenost gljiva zato što eliminišu anaerobne bakterije u crevima koje bi inače mogle inhibirati gljive. Gljivične infekcije kod ljudi mogu varirati od blagih, površinskih infekcija do invazivnih infekcija opasnih po život, posebno kod imunokompromitovanih pacijenata. Većina gljivičnih infekcija doprinose povećanom morbiditetu i mortalitetu u populaciji zdravih, a posebno u populaciji imunokompromitovanih pacijenata (239–241). Posakonazol i verikonazol se zajedno sa antimikrobnom terapijom koriste kao primarna odnosno sekundarna profilaksa febrilne neutropenije nakon hemoterapije i primenjuje se sve dok broj neutrofila ne bude u zadovoljavajućem opsegu. Sa druge strane, podaci o efektu antimikotika na mikrobiom gastrointestinalnog trakta su oskudni (239–241). U našem istraživanju nije bilo razlike među posmatranim grupama ispitanika u odnosu na terapiju antimikoticima, niti je primena antimikotika u univarijantnoj analizi izdvojena kao značajan prediktor VRE kolonizacije.

*E. faecalis* je i dalje najčešće izolovana vrsta enterokoka kada se radi o prouzrokovateljima infekcije i to sa učestalošću od oko 60%, dok taj procenat varira između 5% i 20% u slučaju vrste *E. faecium* (242). I dok je *E. faecalis* povezan sa nastankom vanbolničke bakterijemije i odgovoran za više stope oboljevanja u odnosu na *E. faecium*, *E. faecium* je povezan sa nastankom bolničke bakterijemije i višim stopama mortaliteta u odnosu na *E. faecalis* zbog veće prevalencije rezistencije na vankomicin (243). Kada se analizira VRE populacija, odnos između vrsta se menja i gotovo je recipročan. Naime, rezistencija na vankomicin je veoma česta među *E. faecium* populacijom i to npr. u SAD 93%, a u Evropi 74,1%, dok je među *E. faecalis* populacijom oko 10% (242,244). Zapravo, povećanje prevalencije VRE izolata na globalnom nivou kao uzročnika bolničkih infekcija je gotovo u potpunosti na račun VRE $_{fm}$ , što se objašnjava izvanrednom sposobnošću adaptacije VRE $_{fm}$  na uslove u bolničkom okruženju ali i pojavom poliklonalnog genskog klastera poznatog kao klonalni kompleks 17 ili CC17 (245–247). Uspeh ovih bolničkih klonova najverovatnije je rezultat kumulativnog sticanja adaptivnih elemenata kao što su geni ili genski elementi koji kodiraju nosioce rezistencije na antibiotike ili faktore virulencije (248). Markeri ovog klastera su visok novo rezistencije na ampicilin i flourohinolon i prisustvo *esp* i *hyl* gena (246,249).

Naše istraživanje je potvrdilo prethodna saznanja koja se tiču uticaja rezistencije enterokoka na vankomicin na odnos između vrsta *E. faecalis* i *E. faecium* u bolničkoj sredini. Svi izolovani VRE sojevi u našem istraživanju su bili VRE $_{fm}$ , a druge vrste enterokoka, kao što su VRE $_{fs}$  i *E. gallinarum/casseliflavus* nisu bile detektovane. Isti odnos među izolovanim vrstama enterokoka zabeležen je u istraživanju Whelton i sar. (103) iz Irske. U istraživanjima Kalocheretis i sar., Sakka i sar., Gambarotto i sar., Boisivon i sar. (104,127,129,131) takođe je izolovan VRE $_{fm}$ , ali je izolovana i vrsta *E. gallinarum/casseliflavus*. U našem istraživanju, kao i u prethodno nabrojanim istraživanjima (103,104,127,129,131) VRE $_{fs}$  nije detektovan. Istraživači iz Irske su za izolaciju VRE iz fecesa ispitanika koristili hranljivu podlogu CHROMID®VRE, što je identično metodologiji koja je korišćena u našem istraživanju. Ako uzmemo u obzir prethodno iznete činjenice o visokoj selektivnosti ove hromogene podloge prema VRE sojevima sa urođenom rezistencijom, lako je zaključiti zašto ni u istraživanju Whelton i sar. (103), kao ni u našem istraživanju nije izolovana vrsta *E. gallinarum/casseliflavus*. U ostalim pomenutim istraživanjima (104,127,129,131) za VRE izolaciju korišćena je BE(A)V agar hranljiva podloga sa dodatkom vankomicina (6 mg/mL) koja je manje selektivna u odnosu na CHROMID®VRE. U svim pomenutim istraživanjima (103,104,127,129,131), kao i u našem istraživanju, vrsno specifični geni i geni rezistencije na glikopeptide su potvrđeni

molekularnim metodama. U studiji Metallidis i sar. (130) su takođe svi VRE izolati bili *VREfm*, međutim, istraživači nisu koristili molekularnu potvrdu vrsno specifičnih gena. U studiji Amberpet i sar. (135) pored *VREfm* izolata detektovani su i *VREfs* izolati. Međutim, istraživači su identifikaciju vršili klasičnim mikrobiološkim metodama i nisu koristili molekularnu potvrdu vrsno specifičnih gena.

Svi izolovani *VREfm* u našoj studiji su imali VanA fenotipski profil koji se karakteriše visokim stepenom rezistencije na vankomicin i varijabilnim stepenom rezistencije na teikoplanin. Svi izolovani *VREfm* sojevi u našem istraživanju su nosili *vanA* gen, odnosno imali su *vanA* genotipski profil, što je u saglasnosti sa činjenicom da je *vanA* genotip dominantan VRE genotip u Evropi i SAD (72,122,250). Izolovani *VREfm* sojevi u prethodno nabrojanim istraživanjima (104,127,129,131) su takođe imali VanA fenotipski profil i nosili su *vanA* gen rezistencije. Važno je napomenuti da se u poslednjih deset godina geografska distribucija *vanA/vanB* genotipova polako menja i da se sve češće beleži prisustvo *vanB* genotipa u evropskim zemljama, kao što su Španija, Grčka, Nemačka, Francuska, Poljska, dok je u Australiji, gde se *vanB* genotip smatra dominantnim, zabeležena pojava *vanA* genotipa (122). Sve ovo govori u prilog plastičnosti *VREfm* genoma, osobine koja obezbeđuje da genom konstantno odgovara i da se prilagođava novim bolničkim i sredinskim uslovima (122). Tako su npr. *VREfm* izolati u istraživanju Whelton i sar. (103) iz Irske, imali fenotipski VanA profil, ali je deo izolata osim *vanA* gena nosio i *vanB2/3* gene rezistencije, a *VREfm* izolati iz studije Christidou i sar. (102) iz Grčke su predominantno imali *vanB* gen i VanB fenotipski profil. S obzirom na dinamičnost *VREfm* genoma i činjenicu da je od prvog VRE izolata detektovanog u Srbiji (69) prošlo skoro 20 godina i da je izolat imao *vanA* genotip, realno je očekivati da će u sledećoj dekadi doći do pojave *vanB* genotipa među *VREfm* izolatima u Srbiji, što kao posledica sve veće dostupnosti različitih turističkih destinacija, što kao posledica zdravstvenog turizma.

Ispitivanje antimikrobne osetljivosti pokazalo je da su svi ispitivani *VREfm* izolati MDR *VREfm*. Pored rezistencije na vankomicin i teikoplanin ispitivani *VREfm* izolati su ispoljili visok nivo rezistencije na gotovo sve testirane antimikrobne lekove, osim na linezolid i tigeciklin na koje su svi bili osetljivi. Rezistencija na ampicilin je u našem istraživanju bila 92,2%, odnosno 7,8% *VREfm* je bilo osetljivo na ampicilin. Slično je zabeleženo i u istraživanju Amberpet i sar. (135) u kojem je prijavljeno oko 10% *VREfm* izolata koji nisu rezistentni na ampicilin. Nasuprot tome, u istraživanju Whelton i sar. (103), Franyó i sar. (251) i Oh i sar. (252) svi *VREfm* izolati su bili rezistentni na ampicilin. Pojava visoke učestalosti rezistencije na ampicilin nas nije posebno iznenadila s obzirom da je poznata činjenica da je pojava *VREfm* izolata u SAD prethodila pojava ampicilin rezistentnog *E. faecium* soja, najverovatnije kao posledica horizontalnog genskog transfera. Izenadila nas je pojava šest izolata osetljivih na ampicilin. Potencijalno objašnjenje bi moglo da se nađe u saznanjima iz populacione genetike. Naime, postoje dve udaljene genske linije u okviru vrste *E. faecium*. Prva genska linija ili tzv. vanbolnička linija (linija B), obuhvata komensale gastrointestinalnog trakta i nije povezana sa nastankom kliničkih infekcija. Druga genska linija ili tzv. bolnička linija (linija A2), obuhvata bolničke izolate - uzročnike bolničkih epidemija i uzročnike infekcija kod bolničkih pacijenata u riziku. Izolate *E. faecium* koji pripadaju bolničkoj liniji karakteriše rezistencija na ampicilin i prisustvo ostrva patogenosti, rezistencija na veliki broj antimikrobnih agenasa i prisustvo gena virulencije koji stimulišu nastanak biofilma i povećavaju mogućnost kolonizacije. Ove adaptivne osobine su posledica sticanja novih gena što se dešava kroz transfer plazmida i rekombinacijom homolognih sekvenci (122). Bolnička linija *VREfm* je dominantna na svim kontinentima: u Evropi je učestalost: 1 - 47%, u SAD oko 80%, a u Australiji između 11% i 75% (122). Epidemiološki uspeh u svetskoj diseminaciji je rezultat dobro prilagođene bolničke linije koja pripada CC17 nastale kao posledica kumulativnih evolutivnih procesa, i čije zajedničke karakteristike su visok nivo rezistencije na ampicilin i flourohinolone, ali i prisustvo *esp* i *hyl* gena



(245,253). U Evropi, prevalencija VRE kolonizacije među vanbolničkom populacijom kao posledica primene avoparcina iznosi oko 2% i predstavlja izvor gena rezistencije za vankomicin. Vanbolnička VRE $fm$  linija je u istom klasteru sa VRE $fm$  koji su detektirani kod svinja što govori o tome da je kolonizacija VRE $fm$  u vanbolničkoj populaciji nastala preko lanca ishrane ili direktnom transmisijom od životinja na ljude. Dakle, vanbolničkoj VRE $fm$  liniji ne prethodi pojava ampicilin rezistentnog *E. faecium* soja, a bolnička VRE $fm$  linija nije postala direktno od vanbolničke. Prisustvo ampicilin osetljivih VRE $fm$  izolata u našem istraživanju bi moglo da ukaže da se radi o VRE $fm$  sojevima koji nisu bolničkog porekla već da su ispitanici kolonizovani na drugi način, moguće preko lanca ishrane (npr. konzumiranjem mesa ili sireva), u direktnom kontaktu sa domaćim životinjama ali i preko zagađenih površinskih voda (115,245,254).

Rezistencija na ciprofloksacin/levofloksacin među ispitivanim VRE $fm$  izolatima je bila skoro 100%, što je u saglasnosti sa istraživanjima Arshadi i sar. (255), Franyó i sar. (251) i Oh i sar. (252). Visok stepen rezistencije na flouorinolone se smatra veoma rasprostranjenim među *E. faecium* sojevima koji pripadaju bolničkoj liniji, a naročito onima koji pripadaju CC17 klonalnom kompleksu. Podaci pokazuju da je oko 80% *E. faecium* i oko 90% VRE $fm$  sojeva koji pripadaju CC17 rezistentno na levofloksacin (253). Među stresorima koji imaju veliku ulogu u nastanku i diseminaciji antimikrobne rezistencije, poseban značaj imaju subinhibitorne koncentracije (SIK) antimikrobnih lekova (koncentracija ispod MIK vrednosti) koje imaju značajne efekte na fiziologiju i morfologiju bakterijske ćelije i dovode do fenotipskih promena pod dejstvom SIK. S obzirom da su fluorohinoloni antimikrobni lekovi koji se propisuju u visokoj meri, vrlo je verovatno da se u *in vivo* uslovima pojavljuje SIK, sa potencijalnim efektima na bakterijski metabolizam i sa naknadnom modulacijom osobina. Istraživanje Sineli i sar. je pokazalo da prisustvo SIK ciprofloksacina dovodi do indukcije 196 gena i do represije 286 gena, odnosno da dolazi do modulacije u 16,7% bakterijskog genoma (256).

Rezistencija na visok nivo gentamicina (GEN-HLS) i visok novo streptomocina (STR-HLS) u našem istraživanju je bila prisutna u oko 90% VRE $fm$  izolata što je slično rezultatima Whelton i sar. (103), Amberpet i sar. (135), Arshadi i sar. (255), Franyó i sar. (251) i Oh i sar. (252). Pojava rezistencije na GEN-HLS i STR-HLS među VRE $fm$  izolatima je primećena u skoro svim delovima sveta, od Evrope i Azije do Južne Amerike (257). U istraživanju Rosvoll i sar. (257) iz Norveške ispitivana je kolekcija invazivnih *E. faecium* izolata i genotipizacija je pokazala da postoji poliklonska populacija koja dominantno pripada bolničkoj liniji, a gen rezistencije se u ispitivanim izolatima nalazio na megaplazmidu. Takođe, kod ovih izolata primećen je veći broj plazmida i faktora virulencije što ide u prilog hipotezi da dobro adaptirane bolničke VRE $fm$  linije imaju bolju sposobnost za sticanje i stabilizaciju dodatnog genskog materijala što ih čini još uspešnijim u prilagođavanju na nove sredinske uslove, što je zapravo princip tzv. „genskog kapitalizma“.

Interesanto je što je u našem istraživanju zabeležen visok novo rezistencije VRE $fm$  na Q-D (38,9%). Prethodna istraživanja su pokazala da je oko 10% *E. faecium* izolata u Evropi rezistentno na Q-D u poređenju sa samo 0,6% u SAD (242). Naime, Q-D je antimikrobni lek iz grupe streptogramina koji je registrovan za primenu u terapiji bakterijskih infekcija uzrokovanim MDR bakterijama uključujući i VRE $fm$ . Iako je rezistencija VRE $fm$  na ovaj antimikrobni lek opisana, retka je među humanim izolatima (258). Takođe, Q-D nije registrovan za kliničku promenu u Srbiji. Uzimajući sve prethodne činjenice u obzir, visoka učestalost VRE $fm$  sojeva u Srbiji na Q-D je veoma zabrinjavajuća iz najmanje dva razloga. Prvo, potencijal VRE $fm$  sojeva koji nose gene rezistencije na Q-D za diseminaciju u bolničkoj sredini i potencijalno izbijanje epidemije je veoma visoko. Drugo, terapijske opcije za lečenje infekcija uzrokovanim ovim sojevima su sužene. Naše istraživanje je pokazalo da svi VRE $fm$  izolati koji

fenotipski pokazuju rezistenciju na Q-D nose *ermB1* gen, koji takođe ima ulogu u rezistenciji na makrolide, linkozamine i streptogramin B, što je u saglasnosti sa prethodnim saznanjima (258). Ostali ispitivani geni (*vatD*, *vatE* i *vgaA*) nisu bili prisutni ni kod jednog izolata, što je takođe u skladu sa prethodnim saznanjima (242). Uzimajući u obzir da Q-D nije registrovan u našoj zemlji za kliničku upotrebu i da nikada nije bio deo terapijskih protokola, moguće objašnjenje za Q-D rezistenciju kod VRE izolata bi bila razmena gena nosioca rezistencije između *E. faecium* sojeva animalnog i humanog izvora, s obzirom da je rezistencija na Q-D česta kod sojeva koji se izoluju kod životinja i vezuju se za upotrebu virginamicina i pristinomicina kao faktora rasta na životinjskim farmama, koje se smatraju mesta perzistencije gena rezistencije (67,242,258).

Vrlo je važno istaći da su VRE $fm$  sojevi iz našeg istraživanja osetljivi na linezolid i tigeciklin kao antimikrobne lekove poslednje linije, što je slučaj u većini evropskih zemalja (259,260).

Prema podacima T.E.S.T. nadzorne studija koja je sprovedena u Francuskoj, Nemačkoj, Italiji, Španiji i Velikoj Britaniji, u periodu 2004–2009 godine, zabeležene su niske učestalosti rezistencije *E. faecium* na tigeciklin (0,2%). Podaci iz nemačkog nadzora u period 2004-2007 godine, su otkrili niske učestalosti (<1%) VRE $fm$  na tigeciklin (TVRE $fm$ ). Međutim, nemački sistem za nadzor je u poslednjih nekoliko godina detektovao sve veći broj potvrđenih *E. faecium* izolata koji su rezistentni na tigeciklin (260). U jednoj bolnici u Irskoj je u periodu od 2012 do 2017. godine zabeleženo 11 VRE invazivnih izolata koji su rezistentni na tigeciklin, od toga je 10 bilo TVRE $fm$  (260). Istraživanje Kessel i sar. (259) o faktorima rizika za kolonizaciju TVRE $fm$  rađeno u Frankfurtu, pokazalo je da je glavni faktor rizika upotreba tigeciklina, i da se sa smanjenjem upotrebe tigeciklina smanjuje i prisustvo TVRE $fm$ . Ako se razmotri obim potrošnje tigeciklina u Republici Srbiji u periodu od 2013. godine do 2018. godine, možemo da vidimo da je obim potrošnje porastao 2,5 puta, sa 0,002 DDD/1000/d koliko je iznosila 2013. godine na 0,005 DDD/1000/d koliko je zabeleženo 2018. godine (138,217). Na osnovu ovih podataka, realno je očekivati pojavu TVRE $fm$  u našoj zemlji u narednom periodu.

Kao i u istraživanju Whelton i sar. (103), Amberpet i sar. (135) i Arshadi i sar. (255) i u našem istraživanju su svi VRE $fm$  izolati bili osetljivi na linezolid. Prema podacima različitih kolaborativnih mreža nadzora u Evropi, rezistencija na linezolid među *E. faecium* izolatima se kreće od 0 preko 3,3% koliko je zabeleženo u Španiji, do 5,2% koliko je zabeleženo u Irskoj. U Irskoj se od 2012. godine posebno prati rezistencija na linezolid među neinvazivnim VRE izolatima i podaci su pokazali da postoji povećanje rezistencije na linezolid među VRE $fm$  izolatima od četiri puta (sa četiri koliko je zabeleženo 2015. godine na 16 koliko je zabeleženo 2016. godine) (260). U nekim istraživanjima pojava rezistenije na linezolid među enterokoknim vrstama se vezuje za povećanu upotrebu linezolida kod neutropeničnih pacijenata, dok rezultati drugih istraživanja smatraju da povećana upotreba nije glavni faktor rizika (260). Bez obzira na ove neusaglašene rezultate, važno je istaći dve bitne činjenice vezane za potencijalno javljanje linezolid rezistentog VRE $fm$  soja u našoj zemlji u narednom periodu. Prva, da je obim potrošnje linezolida u Republici Srbiji u periodu od 2013. godine do 2018. godine porastao 5 puta, sa 0,001 DDD/1000/d koliko je iznosila 2013. godine na 0,005 DDD/1000/d koliko je zabeleženo 2018. godine (138,217). Druga, da je u Srbiji prema Izveštaju CAESAR mreže za 2018. godinu (261) među *E. faecium* izolatima zabeležen 1% učestalosti rezistencija na linezolid.

Predominacija MDR VRE $fm$  u našem istraživanju može da označava da je za VRE $fm$  bolnička sredina postala nova ekološka niša koju je uspešno osvojio, što je u saglasnosti sa prethodnim zaključcima da je MDR *E. faecium* dominantni rezervoar stečene rezistencije na vankomicin, posebno

među imunokompromitovanim pacijentima, što rezultira diseminacijom gena rezistencije među bakterijskom populacijom nakon selektivnog pritiska antimikrobnih lekova (72,262).

Podaci o antimikrobnoj rezistenciji su osnov za primenu adekvatne antimikrobne terapije, a postojeći sistemi nadzora se baziraju na učestalostima rezistencije na antimikrobne lekove među patogenima od interesa prema uzorcima iz kojih su isti izolovani, tzv. *sample-based* nadzor. Izveštavanje o antimikrobnoj rezistenciji koje bi obuhvatilo izradu profila rezistencije pružilo bi daleko kvalitetnije podatke o praćenju rezistencije patogena od interesa što bi dalje uticalo na pravovremeni odabir terapije i bržu reakciju u slučaju izbijanja epidemije (263). S toga smo u našem istraživanju primenili novi koncept i izradili antimikrobni profil rezistencije. Izrada fenotipskog profila za svaki pojedinačni ispitivani VRE $f$ m izolat pokazala je da je prisutno osam profila antimikrobne rezistencije. Dva fenotipska profila su bila dominantna i zastupljena su kod 85,7% izolata. Izveštavanje o kompletnom profilu antimikrobne rezistencije zajedno sa učestalostima rezistencije na pojedinačne antimikrobne lekove za populaciju pod rizikom predstavlja promenu u izveštavanju podataka na antimikrobnu rezistenciju i korak bliže novom konceptu koji se zasniva na *case-based* nadzoru nad antimikrobnom rezistencijom (263).

Da bismo bolje razumeli VRE kolonizaciju i njenu implikaciju na nastanak infekcije, ispitivali smo faktore virulencije. Dobijeni rezultati su pokazali da skoro svi ispitivani VRE $f$ m imaju skoro sve ispitivane gene nosioce faktora virulencije (*esp*, *hyl*, *efaA*, *asa1*, *gelE*, *cpd*).

Površinski enterokokni protein (eng. Enterococcal surface protein, Esp) je produkt *esp* gena i smešten na ostrvu patogenosti (eng. pathogenicity island, PAI), koji je transferibilan i ima karakteristike integrativnog konjugativnog elementa ICE $f$ m1 (32). Najčešće se nalazi kod kliničkih izolata, ima ulogu u fazi inicijalne adherenciji u toku formiranja biofilma, doprinosi povećanju virulencije i povezan je sa kolonizacijom (23,33). Takođe, primećeno je da prisustvo *esp* gena dovodi do povećane učestalosti procesa konjugacije (264). Naše istraživanje je pokazalo da je *esp* gen prisutan kod 84% VRE $f$ m izolata. Naši podaci su u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima. U istraživanju Vankerckhoven i sar. (33) koje je obuhvatilo 153 kliničkih i 118 fekalnih izolata kod pacijenata sa povećanim rizikom za razvoj VRE infekcije (JIL i hematološka odeljenja) iz 13 evropskih zemalja, učestalost *esp* gena među VRE $f$ m izolatima je iznosila 73%. U istraživanju Rice i sar. (265) učestalost *esp* gena među VRE $f$ m izolatima iz fecesa pacijenata je iznosila 77%, a u istraživanju Marchi i sar. 97% (266). U istraživanjima Hallgren i sar. (267) i Eaton i sar. (35) u kojima je ispitivana učestalost *esp* gena kod *E. faecium* sojeva, pronađeno je da je učestalost u prvoj studiji 71%, a u drugoj 80%. Za *esp* gen je se smatra da je jedan od markera CC17 kompleksa i da se češće nalazi kod epidemijskih izolata.

Hijaluronidaza je degradativni enzim koji dovodi do oštećenja tkiva i omogućava lakši transport bakterije kroz tkiva (23,33,34). Naše istraživanje je pokazalo da je *hyl* gen prisutan kod 54,5% VRE $f$ m izolata, što je značajno više nego u prethodnim istraživanjima. U istraživanju Marchi i sar. (266) učestalost ovog gena je bila 2,8%, u istraživanju Vankerckhoven i sar. (33) detektovana je učestalost od 17%, dok je u istraživanju Rice i sar. (265) učestalost *hyl* gena među VRE $f$ m izolatima iznosila 33,3%. Kako su prethodne studije identifikovale *esp* i *hyl* gene kao značajne markere CC17 genske linije *E. faecium* izolata i kako ovi geni među VRE $f$ m izolatima u našem istraživanju čine skoro 50% izolata, mogli bismo da pretpostavimo da oko 50% naših VRE $f$ m izolata pripada CC17, ali da bi se to potvrdilo, potrebna su dalja istraživanja (245,268).

Želatinaza je cink endopeptidaza koja vrši hidrolizu kolagena, želatina i malih peptida i povezana je sa pogoršanjem endokarditisa kod animalnih modela. Želatinaza je produkt *gelE* gena smeštenog na hromozomu (33). Pokazano je da je *gelE* gen češće prisutan kod *E. faecium* vrste kada se radi o humanim izolatima, dok se kod *E. faecalis* vrste češće javlja iz uzoraka hrane i to posebno iz sireva pravljenih ručno, odnosno na tradicionalni način (eng. artisanal cheeses) što je karakteristično za mediteranske zemlje (269). To se objašnjava selekcijom enterokoknih sojeva koji mogu da produkuju proteazu, kako bi mogli da koriste protein iz sira kao izvor aminokiselina (269). U našem istraživanju, *gelE* gen je detektovan kod 11,6% VRE*fm*. U istraživanju Vankerckhoven i sar. (33) ovaj gen nije detektovan, a u istraživanju Marchi i sar. (266) prisustvo *gelE* gena je iznosilo 51%.

EfaA je adhezin ćelijskog zida i uglavnom je prisutan kod *E. faecalis* sojeva. Produkt je *efaA* gena. Predstavlja vezujući protein receptor za mangan transportni sistem, a ekspresija mu se povećava kada se nađe u sredini sa niskom koncentracijom mangana. Prisustvo *efaA* gena je vezano za produženo preživljavanje sojeva koji eksprimiraju EfaA protein (34). Učestalost detekcije *efaA* gena u našem istraživanju (72,1%) je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima (35,266).

Agregaciona supstancija (AS) je protein koji kodira *asa1* gen koji je smešten na plazmidu. Pripada seks feromonima, signalnim peptidima koji indukuju konjugaciju feromon inducibilnih plazmida i ima ulogu u diseminaciji gena rezistencije kod sojeva *E. faecalis*. Kao seks feromon, njegova funkcija se ogleda u olakšavanju kontakta između dve enterokokne ćelije stvarajući tzv. klampove ili agregate. Recipijentna ćelija sekretuje u medijum seks feromone koji odgovaraju plazmidu koji one nemaju. Zatim, donorska ćelija kao odgovor na seks feromone produkuje AS, koja dovodi do stvaranja bliskog kontakta između ćelija i omogućava visoko-frekventni konjugativni transfer. Interesantno je da kad se plazmid prenese u recipijentnu ćeliju, gen za produkciju odgovarajućeg seks feromona se gasi, ali ćelija nastavlja da produkuje seks feromone za plazmide koje nema. Kao faktor virulencije, AS povećava adherenciju bakterijske ćelije za ćelije renalnih tubula i endokarda, omogućava preživljavanje u polimorfonulearnim leukocitima i translokaciju u tkiva domaćina, posebno u ćelije digestivnog trakta (23,33,34). Uvreženo je mišljenje da se ovaj gen nalazi kod *E. faecalis* sojeva, međutim, suprotno prethodnim istraživanjima Eaton i sar. (35) i Franz i sar. (269), među našim izolatima ovaj gen je detektovan i to sa učestalošću od 23,4%. Marchi i sar.(266) su takođe detektovali *asa1* gen među izolatima i to u učestalosti od 60%. U istoj studiji, u univarijantnom modelu prisustvo *asa1* gen povećava rizik od smrtnog ishoda, mada se ova varijabla nije zadržala u multivarijantnom modelu. Sojevi koji sadrže gene koji produkuju seks feromone, kao što je i *cpd* gen, imaju sposobnost da steknu plazmide koji reaguju sa seks feromonima, a nose i determinante virulencije (33). Učestalost *cpd* gena viša nego u prethodnim istraživanjima (35,266).

Sposobnost formiranja biofilma na medicinskim implantatima kao što su kateteri i veštački srčani zalisci, jedna je od veoma važnih karakteristika enterokoka i ima značajnu ulogu u njihovoj virulenciji. Proces adherencije i formiranje biofilma je složen proces i uključuje više faktora virulencije, a takođe zavisi i od uslova okoline i načina ispitivanja biofilma. Sve navedeno dovodi do otežane interpretacije rezultata istraživanja koja se bave utvrđivanjem uloga pojedinih faktora virulencije u formiranju biofilma (244). Petina VRE*fm* izolata u našem istraživanju je pokazala sposobnost formiranje biofilma. Polovina biofilm produktora su bili biofilm produktori slabog kapaciteta. U istraživanju Franyó i sar. (251) koje je rađeno na kolekciji invazivnih i neinvazivnih VRE*fm* izolata iz bolnice u Istočnoj Mađarskoj, a u kojem je korišćena identična metodologija po Stepanoviću i sar. (119), za razliku od našeg istraživanja, nije zabeležen ni jedan biofilm produktor izraženog kapaciteta. Biofilm produktori slabog kapaciteta su i u njihovom istraživanju bili dominantni, ali je njihova učestalost bila viša i iznosila je 76,5%. U našem istraživanju kao i u istraživanju Franyó i sar. (251), ali i u drugim istraživanjima nije pronađena razlika



između grupe biofilm produktora/neproduktora i prisustva *esp* gena (270–274). Nasuprot ovim zaključcima, drugi autori su pokazali da je sposobnost stvaranja biofilma posredovana Esp proteinom (275–277). Pored činjenice da je formiranje biofilma multifaktorski proces, varijacije u ekspresiji gena mogu da komplikuju vezu pojedinih gena sa ovim procesom. Tako je, npr. pokazano da je ekspresija Esp proteina kod *E. faecium* varijabilna, odnosno da neki *esp* pozitivni sojevi teško produkuju Esp protein i formiraju biofilm, dok drugi sojevi imaju visok nivo ekspresije *esp* gena i visoku produkciju Esp proteina i lako produkuju biofilm (277). Dakle, prisustvo specifičnog gena, ne znači automatski i ekspresiju istog, što se dobro ilustruje rezultatima istraživanja Eaton i sar. koji su dokazali prisustvo *gelE* gena bez njegove ekspresije, tzv. silent genes (35).

Među VRE*fm* izolatima iz našeg istraživanja 58,4% izolata je nosilo minimum tri gena za faktore virulencije. Nasuprot našim rezultatima, u istraživanju Billström i sar. samo 2% izolata je nosilo multiple gene za faktore virulencije (278). Nedavno, Freitas i sar. (279) su pokazali da je broj gena za faktore virulencije kod VRE*fm* sojeva u korelaciji sa rezistencijom na ampicilin i da VRE*fm* sojevi sa višim MIK vrednostima na ampicilin imaju veći broj faktora virulencije, što doprinosi njihovom patogenom potencijalu. Skoro svi VRE*fm* sojevi iz našeg istraživanja su rezistentni na ampicilin i skoro svi sadrže veći broj faktora virulencije i stoga predstavljaju veliki rizik za nastanak infekcije kod pacijenata pod rizikom. Čak, izolati koji su osetljivi na ampicilin imaju minimum dva faktora virulencije. Još uvek nije utvrđeno koliki je uticaj svih analiziranih gena koji kodiraju faktore virulencije na nastanak infekcije i da bi se rasvetlio ovaj uticaj potrebna su opsežna istraživanja, posebno imajući u vidu da je ključni momenat genska ekspresija (278). Naši podaci su pokazali da je VRE*fm* sa svim faktorima virulencije koje ima opremljen da može uspešno da preživi i da se širi u bolničkoj sredini. Sposobnost da prikuplja različite gene nosioce faktora virulencije može se objasniti adaptivnim mehanizmima, kao što je npr. „genski kapitalizam“ i rezultat je genskog transfera i rekombinacija i oslikava proces u kojem već uspešni klonovi postaju još uspešniji (80,245,280).

U istraživanju Willems i sar. (281) koje je ispitivalo uzročnike bolničkih epidemija na tri kontinenta, utvrđena je specifična subpopulacija VR*fm* koja se razlikovala od neepidemijskih izolata VRE*fm* prema prisustvu varijante *esp* gena koja nije bila prisutna u neepidemijskim i životinjskim izolatima. Sve VRE*fm* izolate iz našeg istraživanja smo podelili na epidemijske i neepidemijske u odnosu na to da li pripadaju klasteru ili ne. Naime, izolati koji su pripadali MLVA klasteru su označeni kao „epidemijski“, dok su izolati sa jedinstvenim profilima označeni kao „neepidemijski“. Nije bilo statistički značajne razlike između epidemijskih izolata u odnosu na neepidemijske u pogledu prisustva svih ispitivanih gena faktora virulencije. To je u saglasnosti sa istraživanjima Popović i sar. (282) koji su ispitivali prisustvo faktora virulencije među enterokokama koje se koriste kao starter kulture u proizvodnji autohtonih sireva u Srbiji i detektovali *esp* gen, kao i u saglasnosti sa prisustvom *esp* gena u površinskim vodama u Beogradu (283).

Ako se sagleda genska povezanost *esp*-pozitivnih izolata u odnosu na *esp*-negativne izolate, možemo da primetimo da postoji razlika u grupisanju u klasteru. Naime, *esp*-pozitivni izolati su grupisani u 10 klastera (tri veća, od kojih najveći broji devet izolata i 7 manjih klastera), dok su *esp*-negativni izolati grupisani u 2 manja klastera. Nasuprot našim rezultatima, rezultati sličnog istraživanja rađenog u okviru doktorske disertacije Hanna Billström sa Univerziteta Karolionska (284), *esp*-pozitivni izolati su bili grupisani u manji broj klastera, a najveći klaster je brojao 33 izolata. Slične rezultate smo dobili i kada smo posmatrali gensku povezanost *hyl* pozitivnih i *hyl*-negativnih izolata, *efaA* pozitivnih i *efaA* negativnih izolata i Q-D pozitivnih i Q-D negativnih izolata, što sve govori u prilog heterogenosti VRE*fm* izolata u našem istraživanju.

Genotipizacija VRE $f$ m izolata je neophodan korak u nadzoru nad cirulišućim VRE $f$ m izolatima u bolničkoj sredini. U slučaju sumnje na nastanak bolničke VRE $f$ m infekcije potrebno je brzo i tačno ispitati klonalnu povezanost ispitivanih uzročnika, što je od suštinskog značaja kako za otkivanje transmisije među pacijentima, tako za donošenje odluke o izmeni i/ili pojačavanju mera prevencije u bolnici. Brza informacija o tome da li ima ili nema klonalnog širenja praćena merama prevencije za nastanak bolničke infekcije, može dovesti do brze kontrole nozokomijalnog širenja (122).

Postoje različite metode za VRE genotipizaciju koje se međusobno razlikuju po reproducibilnosti, lakoći izvođenja, interpretaciji dobijenih podataka, jednostavnoj laboratorijskoj razmeni podataka, troškovima po uzorku i diskriminatornim sposobnostima (122). Najčešće korišćena metoda za genotipizaciju VRE $f$ m izolata bila je elektroforeza u pulsnom polju (PFGE) - laboratorijski veoma zametna metoda, koja nije standardizovana i nema jasne kriterijume za interpretaciju dobijenih PFGE tipova, što sve otežava laboratorijsku razmenu podataka (66,115). Top i sar. (66,115) su razvili MLVA metodu za genotipizaciju VRE $f$ m izolata sa ciljem zamene PFGE metode. MLVA je visoko reproducibilna metoda u kojoj se VNTR sekvence dobijaju klasičnom PCR metodom koristeći specifične prajmere. Budući da je prevod sa veličine opsega VNTR sekvence na broj tandem ponovaka jednostavan, a da je MLVA profil determinisan prisustvom ili odsustvom tandem ponovaka u okviru VNTR sekvenci, MLVA metoda daje jasan numerički rezultat pogodan za razmenu podataka između laboratorija. Istraživači su upoređivali ove dve metode (66,115) prema gore navedenim kriterijumima, i rezultati njihovog istraživanja su pokazali da je sposobnost tipizacije VRE $f$ m izolata primenom MLVA viša (99,5%) u odnosu na tipizaciju istih uzoraka PFGE metodom (91,1%). Sposobnost diskriminacije MLVA je viša kada su u pitanju vrste, ali je niža u poređenju sa PFGE kada su u pitanju podtipovi. Ukupno vreme potrebno za izradu jednog PFGE gela za 13 uzoraka i dodeljivanje PFGE tipa iznosilo je približno tri dana, dok je približno dva dana bilo potrebno za određivanje MLVA profila za 94 uzorka. Procenjeni trošak po testiranom izolatu korišćenjem MLVA metode, uključujući materijal, radnu snagu i amortizaciju opreme bio je niži u odnosu PFGE (122).

MLST metoda je brza i visoko reproducibilna metoda, jednostavnija od PFGE ali laboratorijski veoma zametna u odnosu na MLVA, ima manju diskriminatornu moć od PFGE, ali višu od MLVA, dok je cena približna PFGE metodi ali je viša od MLVA (115,122). Molekularno epidemiološke studije koje su koristile MLST metodu genotipizacije su otkrile postojanje *E. faecium* bolničke genske linije (285) označene kao MLST-C1 genogrupa, koja je kasnije preimenovana u CC17 (285). MLST analiza je takođe identifikovala tri bolničke genske linije označene kao ST17, ST18 i ST78. Primena antimikrobnih lekova u bolnici može favorizovati VRE $f$ m subpopulaciju CC17 koja ima izuzetnu sposobnost transmisije i koji se ubrzano globalno širi tokom poslednje dve decenije (285). Top i sar. (66,115) su u svom istraživanju uspeli da povežu MLVA profil sa CC17, što nije moguće sa PFGE, što je izuzetna prednost MLVA metode. Brza identifikacija CC17 kompleksa zasnovana na MLVA metodi može pomoći u kontroli širenja CC17 u bolničkom okruženju (115) i razdvajanju bolničkih CC17 izolata od vanbolničkih izolata kao i sledstvenu primenu mera za kontrolu transmisije VRE u bolnici. U istraživanju Top i sar. (115) pokazano je da MLVA tipizacija ima sličnu diskriminatornu moć kao MLST, mada su kasnije neka istraživanja utvrdila da MLVA ima nižu diskriminatornu moć od MLST (286), ali da kao MLST može da identifikuje specifične genogrupe vezane za različite domaćine (115). Naime, prema Top i sar. (115) MLVA genotipizacijom utvrđeno je da postoji pet MLVA genogrupa: A, B, C, C1 i R. Genogrupa A obuhvata vanbolničke izolate i izolate svinja. Genogrupa B obuhvata izolate živine i teladi. Genogrupe C i C1 obuhvataju izolate koji su prouzrokovali infekcije, pri čemu se u okviru C1 genogrupe nalaze izolati koji su prouzrokovali bolničkih epidemija. Genogrupa R obuhvata izolate različitog porekla. Interesantno je da su izolati iz bolničkog nadzora bili proporcionalno zastupljeni među A, B i C i C1



genogrupama. UPGMA grupisanje MLVA profila je potvrdilo grupisanje izolata koji su pripadali grupi MLST-C1 u jednu grupu MLVA-C1, sa izuzetkom jednog klona koji je poreklom iz bolničke epidemije. Međutim, tri izolata koja su prouzrokovali bolničke epidemije, a koja se nisu grupisala u MLST-C1 genogrupi grupisani u okviru klastera MLVA-C1 (115). Bez obzira na visok stepen poklapanja sa MLST tipizacijom, različiti MLVA profili su nađeni među MLST klonovima, ali i obrnuto, što se može objasniti različitim brzinama genskih promena koje se dešavaju među tandem ponovcima u odnosu na varijacije „housekeeping“ gena (115). Nadalje, autori su koristeći MLST kao referentnu metodu, ispitivali senzitivnost pojedinačnih VNTR lokusa i profila različitih kombinacija VNTR lokusa za identifikaciju izolata koji pripadaju MLST-C1 klasteru. Senzitivnost se kretala u rasponu od 76% za tipizaciju na osnovu VNTR 8 do 97% za MLVA kompletnog seta lokusa. Specifičnost za VNTR-7 je bila najniža (65%), ali se povećala na 90% za MLVA u kompletnom setu lokusa i za MLVA sa kombinacijama VNTR lokusa 7, 8 i 9 ili 7, 8,9 i 10. Pozitivna prediktivna vrednost (PPV) i negativna prediktivna vrednost (NPV) za identifikaciju MLST-C1 klastera izračunati su za kompletan MLVA profil i za kombinaciju VNTR lokusa (7, 8, 9 i 10 ili 7, 8 i 10). Pozitivna prediktivna vrednost je iznosila 87%, a negativna prediktivna vrednost 97% i to za sve tri analizirane kombinacije VNTR lokusa. Shodno tome, za brzu orijentaciju klonalne povezanosti može se primeniti i višestepeni pristup, počev od jednog PCR ciklusa za VNTR 7 lokus. Preporuka je da se uvek koristi svih šest VNTR lokusa zbog toga što se indeks diverziteta povećava. U izradi MLVA sheme, izabrani su tandem ponovci koji se nisu nalazili u poznatim otvorenim okvirima čitanja. Zbog toga su autori pretpostavili da promene broja ponavljanja nisu rezultat selektivnog pritiska antimikrobnih lekova, što znači da se podaci MLVA takođe mogu koristiti za proučavanje filogenetike *E. faecium* izolata.

Metoda sekvenciranja celog genoma (eng. Whole-genome sequencing, WGS) se sve više primenjuje u svrhe tipizacije bolničkih izolata kao i za utvrđivanje postojanja bolničkih epidemija. Uprkos dramatičnom tehnološkom napretku poslednjih godina, WGS se još uvek ne primenjuje u okviru nadzora nad bolničkim infekcijama koje u okviru kliničkih laboratorija zahtevaju obradu većeg broja izolata na dnevnom nivou. Dodatno, tumačenje rezultata i razmena podataka su i dalje ograničavajući faktori (122,287). Sa poboljšanjem WGS i npr. primenom koncepta MLVA na WGS u smislu detekcije repetitivnih jedinica i identifikacije različitih promenljivih delova genoma i upoređivanjem ovih sekvenci bez potrebe za tumačenjem celog genoma, omogućila bi se razmena podataka sličnih MLVA među laboratorijama (287). S druge strane, sa porastom prevalencije *VRE<sub>fm</sub>* MDR izolata na globalnom novou više nije izvodljivo sprovoditi mikrobiološki nadzor nad svim izolatima. Umesto toga, fokus bi trebalo da bude na brznoj identifikaciji transmisije i pravovremenom upozorenju sa sledstvenim koracima koji će voditi ka zaustavljanju epidemije (287). U slučaju epidemije koja je epidemiološki evidentna, WGS je nesumljivo metod izbora za potvrđivanje klonalne povezanosti između izolata. Međutim, za standardni nadzor nad bolničkom infekcijom, potrebne su pouzdane metode genotipizacije kojima se lako i brzo rukuje, a čiji je primarni cilj isključivanje klonalne povezanosti.

Ukratko, MLVA tipizacija je brza, jednostavna i jeftina metoda zasnovana na PCR metodi i preporučena kao inicijalna, brza skrinig genotipizacija za analizu filogenetske povezanosti *VRE<sub>fm</sub>* izolata u bolničkoj sredini (50,115). Visoko je podudarna sa PFGE, iako manje diskriminatorna u odnosu na nju, ali je brža i pruža manje dvosmislene podatke od PFGE koji su numerički, lako se čuvaju i razmenjuju. MLVA ima manju diskriminatornu moć u odnosu na MLST ali može takođe da identifikuje specifične genogrupe vezane za različite domaćine i pogodna je metoda za identifikovanje izolata epidemijskih klonskih linija *E. faecium* i njihovo razlikovanje od izolata drugog porekla. Pojedini MLVA profili su sa visokom specifičnošću (90%) i sezitivnošću (97%) identifikovani kao pripadnici CC17 (66,115), te se MLVA može povezati sa MLST genotipovima. Iako definitivna potvrda transmisije VRE

među pacijentima u bolničkoj sredini zahteva visoko diskriminatorne tehnike kao što su MLST i WGS (227,249), u skladu sa svim prethodno navedenim, smatramo da je MLVA pouzdana metoda tipiziranja u kontekstu nadzora nad kontrolom bolničkih infekcija gde je primarni fokus na isključenju klonalne povezanosti među izolatima i pravovremeno upozorenje ako je potrebno da se započne istraga bolničke epidemije, što je čini pogodnom kao metodom „prve linije odbrane“ u epidemiološkom nadzoru. Stoga, za ispitivanje klonalne povezanosti i klonalne diseminacije izolovanih VRE sojeva u našem istraživanju koristili smo MLVA metodu.

MLVA analiza je otkrila 29 različitih MT, od kojih je 25 genotipova imalo jedinstvene profile koji nisu otkriveni ranije, što govori u prilog plastičnosti VRE $f_m$  genoma i visokog kapaciteta za gensko rearanžiranje koje se dešava u gastrointestinalnom traktu. MLVA analiza je otkrila 13 klastera koji su obuhvatili 77,7% izolovanih VRE $f_m$  sojeva. Najveći izdvojeni klasteri u našem istraživanju, SRB2, MT-161 i SRB16 koji obuhvataju 38,8% (28/72) tipiziranih izolata predstavljaju SLV, odnosno DLV dva MLVA genotipa: MT-159 i MT-340, koji su dokazani kao uzročnici bolničkih infekcija u Srbiji (116,268). Naime, kako je u prethodnom delu objašnjeno, MLVA-C1 genogrupa obuhvata najveći deo epidemijskih i kliničkih VRE $f_m$  izolata, a MT-1 klonalna linija je prema geoBURST analizi označena kao začetnik MLVA-C1 genogrupe i glavni predstavnik bolnički adaptiranog klona. MT-1 genska linija i njena SLV varijanta MT-159 su najčešći genske linije povezane sa bolničkim epidemijama i nastankom invazivnih infekcija u poslednjih 20 godina u Evropi (116,123,268,286). MLST tipizacija MT-1 je pokazala da se sastoji od većeg broja ST genskih linija, odnosno da MT-1 predstavlja poliklonalni kompleks (115,246). Longitudinalna analiza podataka o genotipizaciji otkrila je da je MT-1 bio prisutan u bolnici još 1994. godine, kao i da se njegovo prisustvo u bolnicama povećalo nakon 1999. godine (66). MT-159 *E. faecium* izolat se prvi put pojavio 2005. godine kao prourokovač infekcije u jednoj bolnici, da bi već sledeće godine bio prisutan u pet bolnica. MLST tipizacija reprezentativnih MT-159 izolata pokazala je da pripadaju ST78 genskoj liniji, koja je potvrđena u Koreji i u evropskim zemljama (Nemačka, Italija) kao uzročnik bolničkih epidemija (288–290).

U istraživanju koje su sproveli Jovanović i sar. (116) u kojem su ispitivali MLVA genotipove kliničkih invazivnih i neinvazivnih VRE izolata iz univerzitetskih i opštih bolnica u Srbiji u dva perioda, od 2002. do 2006. godine i od 2007. do 2010. godine, otkriveno je 11 MLVA genotipova, od kojih 4 MLVA genotipa prethodno nisu bila opisana (MT-340 do MT-343). Najveću učestalost je imao MT-159 genotip i činio je 21,6% svih ispitivanih VRE. MT-1 je bio zastupljen u 13,5%, a MT-340 u 10%. Autori (116) dalje navode da MT-159 nije bio identifikovan među reprezentativnim klonovima iz prvog perioda ispitivanja (2002. do 2006. godina) i pretpostavljaju da se MT-159 pojavio u drugom periodu u Srbiji, od 2007. do 2010. godine, i da se brzo proširio. Nadalje, MT-1 genotip, iako drugi po učestalosti, bio je zastupljen u oba vremenska perioda, što je u saglasnosti sa podacima istraživanja koja su pratila populacione promene u okviru genusa *Enterococcus* tokom dužeg vremenskog perioda i koja su pokazala da je period prisustva MT-1 klona od 10 do 11 godina, nakon čega se zamenjuje bolje adaptiranim klonom (291,292). Na osnovu MLST genotipizacije, MT-159 iz ovog istraživanja je pripisan ST203 klonu, dok je MT-304 pripisan ST18 klonu. Za MT-1 je pokazano da je poliklonalna genogrupa kojoj se pripisuje ST-17 klon koji je začetnik MLST-C1 bolničkih sojeva ali koji se sad već smatra drevnim. ST203 i ST18 predstavljaju bolje adaptirane bolničke klonove i vode poreklo od ST17 (286). Autori smatraju da ove činjenice podržavaju pretpostavku da će MT-1 biti uskoro u potpunosti zamenjen sa MT-159 i MT-340 genotipovima u Srbiji (116). U istraživanju Werner i sar. (286) dominantni MLVA genotipovi u periodu od 2004. godine do 2006. godine su bili takođe MT-1 i MT-159. MT-1 tipu je pripisivan ST-17 klon, dok je MT-159 tipu pripisivan ST203 i ST78, što je u skladu sa tadašnjim podacima za Srbiju. Libisch i sar. (123) su ispitivali invazivne i neinvazivne kliničke uzorke iz Srbije i

Mađarske u periodu 2003. do 2004. godine i slično Jovanović i sar. (116), detektovali MT-1 genotip kao dominantan genotip. Prema MLST, MT-1 genotip je obuhvatao ST17 i ST18 i ST80 genske linije. U istraživanju koje je sprovedeno u Švedskoj (284) i koje je obuhvatilo ispitivanje kolekcije invazivnih izolata sakupljenih u periodu od 2000. godine do 2007. godine, detektovano je 23 MLVA genotipova, od kojih je 13 (56,5%) novih. Od ukupnog broja izolata, 17,7% izolata su bili netipabilni izolati, od kojih je 30,5% bilo rezistentno na ampicilin. MT-1 genotip je bio dominantan i činio je 65% svih ispitivanih izolata. Sledeći genotip po učestalosti bio je MT-159 sa učestalosti od 13%. Autori su istakli da je prelazak sa MT-1 na MT-159 genotip uočen 2007. godine kada je 40% izolata pripadalo MT-159, za razliku od 8% u toku 2006. godine. Istraživači iz Švedske su na osnovu različitih kombinacija za VNTR-7, VNTR-8 i VNTR-10 lokusa otkrili da 94% izolata pripada CC17 (66,115). U istraživanju Top i sar. koje je rađeno u Holandiji (66,115) ispitivani su *VRE<sub>fm</sub>* uzorci iz perioda 1999. godine do 2006. godine. Najveći deo tipabilnih izolata (67%) generisalo je pet MLVA profila. Dominantni MLVA profil u istraživanju bio je MT-1, dok su MT-5, MT-12 i MT-159 bili ravnomerno zastupljeni. MT-5 i MT-12 su se pojavili u period od 1999. godine do 2002. godine. MT-159 je pronađen u dve bolnice 2005. godine, da bi se 2006. godine otkrilo prisustvo ovog klona u tri dodatne bolnice. Istraživači su na osnovu različitih kombinacija za VNTR-7, VNTR-8 i VNTR-10 lokusa otkrili da 86% izolata pripada CC17.

Naše istraživanje je detektovalo 29 MLVA profila, što je skoro 2,5 puta više u odnosu na istraživanje Jovanović i sar. (116). Takođe, u našem istraživanju otkriveno je 86,2% novih profila, što je takođe skoro 2,5 puta više u odnosu na broj novih profila detektovanih u prethodnom istraživanju u Srbiji koji je iznosio 36,4% (116). Ukupan broj MLVA profila, kao i broj novootkrivenih MLVA profila detektovanih u našem istraživanju sličniji je podacima dobijenim u istraživanju iz Švedske, mada je viši. Potencijalno objašnjenje ovakvih razlika može da se nađe u činjenici da smo u našem istraživanju tipizirali izolate iz fecesa, odnosno izolate iz nadzora, dok su u svim prethodno analiziranim istraživanjima izolati bili identifikovani kao proizrokovači infekcija. Kako je već poznato, gensko rearanžiranje VRE izolata se dešava u gastrointestinalnom traktu, te je prisustvo velikog broja različitih MLVA profila očekivano. Nadalje, u našem istraživanju je bilo manje netipabilnih izolata u odnosu na istraživanja iz Švedske (284) i Holandije (66) iako smo svi koristili isti metod koji je predložen od strane Top i sar. (115). Manji procenat netipabilnih izolata se može objasniti time što je u našem istraživanju urađena modifikacija protokola koja se odnosila na parametre PCR reakcije za skoro sve VNTR lokuse (VNTR-2,7,8,9,10). Stoga, smatramo da bi zvanična modifikacija predloženog protokola bila neophodni korak koji bi trebalo da se preduzme kako bi se omogućilo smanjenje broja netipabilnih izolata i na taj način potpunije sagledali cirkulišući *VRE<sub>fm</sub>* bolnički klonovi. Za razliku od pomenutih istraživanja iz Švedske (284) i Holandije (66), u kojima su svi netipabilni izolati bili osetljivi na ampicilin, 80% netipabilnih izolata u našem istraživanju je bilo rezistentno na ampicilin. Ovaj podatak je u saglasnosti sa pretpostavkom da se nastanak VRE u Evropi vezuje za upotrebu avoparcina na životinjskim farmama, dok je u Srbiji prisutan scenario sličniji onom u SAD, gde je nastanak VRE najverovatnije posledica selektivnog pritiska vankomicina. Na osnovu različitih kombinacija za VNTR-7, VNTR-8 i VNTR-10 lokusa u našem istraživanju za 33,3% izolata je detektovano da pripadaju CC17, što je skoro trećina manje u odnosu na istraživanje iz Švedske (284) i Holandije (66), ali i skoro upola manje u poređenju sa podacima iz istraživanja Jovanović i sar. (116). Ovaj podatak je u saglasnosti sa rezultatima istraživanja Top i sar. o MLVA genogrupama u kojem su uzorci iz nadzora bili ravnomerno raspodeljeni među MLVA genogrupama. Izolati iz gore pomenutih istraživanja su prouzrokovači infekcije, pa ne čudi što najvećim delom pripadaju CC17 genskoj liniji. Takođe, ovaj podatak je u saglasnosti sa visokim stepenom rezistencije na Q-D koja je nađena među našim izolatima a za čije poreklo se vezuje postojanje animalnih izvora. Interesantno je da iako je najveći varijabilitet među našim izolatima prisutan u okviru VNTR-7 lokusa, u genotipovima iz našeg istraživanja koji su SLV i DLV MT-159 i SLV MT-340,

najveće promene su se desile u VNTR-2 lokusu. Promene od MT-1 do MT-159 takođe nisu bile u VNTR-7 lokusu, već u lokusu VNTR-8 i to ne u smislu povećanja tandem ponovaka, već u smislu gubitka tandem ponovka. Isto se desilo i sa MT-340 genotipom - došlo je do gubitka tandem ponovka u VNTR-7 lokusu. Da bismo bolje sagledali povezanost među genotipovima u našem istraživanju, izračunali smo indekse diverziteta. Indeksi diverziteta predstavljaju kvantitativnu meru biodiverziteta određenog sistema u prirodi. Biodiverzitet se najčešće opisuje kroz sledeće termine: obilje (kvantifikuje koliko vrsta od interesa postoji) i ujednačenost (da li je jedna vrsta dominantna) (293). Simpsonov indeks diverziteta (1-D) pokazuje visok stepen raznolikosti među izolatima, što ukazuje da među njima nema filogenetske povezanosti. Shanon H indeks je indikator obilja i najviša vrednost mu je  $\ln S$ , gde je S broj subtipova, koja u našem istraživanju iznosi 3,4. Visoka vredost Shanon H indeksa je pokazatelj postojanja velikog broja različitih genotipova, odnosno da postoji obilje genotipova, što je u saglasnosti sa 29 različitim MLVA profila koje smo detektovali. Nadalje, Shanon E indeks je indikator ujednačenosti i najviša vrednost mu je 1. Vrednost ovog indeksa u našem istraživanju iznosi 0,88, što je pokazatelj ujednačenosti, odnosno da nema dominacije jednog genotipa nad ostalim.

Naše istraživanje je rađeno kao studija prevalencije te nemamo podatke o tome koliko je ispitanika bilo kolonizovano na prijemu, a koliko je ispitanika kolonizovano u toku hospitalizacije. Analiza podataka za tri ispitanika za koje smo znali da su bili kolonizovani u periodu kraćem od 48h od prijema, pokazala je da jedan ispitanik nije bio hospitalizovan, da je drugi bio hospitalizovan pre više od godinu dana i da je treći bio hospitalizovan pre više od tri meseca. Dva ispitanika su hospitalizovana na kliničkom odeljenju za gerijatriju, a jedan na odeljenju onkologije. Analizom izolata ovih ispitanika možemo ustanoviti da su sva tri izolata rezistentna na sve ispitivane antimikrobne lekove izuzev na Q-D, kao i da pripadaju različitim MLVA genotipovima. Za ove ispitanike možemo da pretpostavimo da je u pitanju scenario u kojem su ispitanici bili kolonizovani van bolnice, a da je primena antimikrobnih lekova selektovala već postojeću kolonizaciju. Naime, prethodna istraživanja (254) su ukazala na kritičnu ulogu površinskih voda kao važnog puta VRE širenja i prenosa na ljude. Takođe, otpadne vode iz zdravstvenih ustanova se mogu smatrati izvorom VRE, jer je moguća direktna selekcija VRE u bolničkoj kanalizaciji. Veljović i sar. (283) su u toku 2013. godine ispitivali površinske vode u Beogradu i nisu našli VRE, ali su našli MDR *E. faecium* koji nosi *esp* gen. Međutim, Ćirković i sar. su tokom 2018. godine detektovali više od 15 VRE izolata u površinskim vodama u Beogradu (neobjavljeni podaci), što bi moglo da podrži našu pretpostavku o vanbolničkoj kolonizaciji VRE sojevima.

Pokazali smo da postoji povezanost između dužine boravka u bolnici i VRE kolonizacije, i da povećanje dužine boravka u bolnici značajno povećava rizik za VRE kolonizaciju, što je sa jedne strane u saglasnosti sa činjenicom da VRE kolonizacija može da traje dug vremenski (180) period koji je mnogo duži od boravka u bolnici, a sa druge strane ukazuje na povećan rizik za transmisiju VRE u bolničkim uslovima. Međutim, ako razmotrimo i činjenicu da u našem istraživanju postoji velika raznolikost izolata koji nisu filogenetski povezani, ova povezanost može da se tumači na drugi način, odnosno, kao pokazatelj postojanja direktnog prenosa endemski prisutnog VRE $fm$  klonu sa neživih predmeta u bolnici na ispitanike, a čiji rizik se takođe povećava sa dužinom boravka u bolnici. U našem istraživanju je pokazano da VRE $fm$  izolati imaju sposobnost formiranja biofilma. Prethodne studije (294) su pokazale da se bakterije koje formiraju biofilm mogu naći u bolničkoj kanalizacionoj mreži, ali i u odvodnim cevima tuševa, umivaonika i toaleta u bolnici, kao i da konstrukcija odvodnih cevi može da formira zone stagnacije koje promovišu stvaranje biofilma i održavanje MDR bakterija, te da bi zamena instalacija u bolnici bila važna mera u sprečavanju i suzbijanju bolničkih infekcija. Cheah i sar. (295) su napravili matematički model VRE transmisije u bolnici u toku pasivnog i aktivnog nadzora i naglasili da je neophodno da se nađe VRE izvor i način nastanka kolonizacije/infekcije, s obzirom da je kod većine



pacijenata na hematološko-onkološkom odeljenju VRE kolonizacija/infekcija nastala ne zbog transmisije među pacijentima, već endogeno što uključuje selektivni pritisak antimikrobnih lekova i prisustvo VRE u životnoj sredini. Nadalje, autori (295) su istakli i to da izolacija kontakata kao mera sprečavanja i suzbijanja VRE u bolnici nije bila značajno povezana sa smanjenjem VRE u sredini gde je VRE endogeno prisutan i naglašavaju da je potrebno razmotriti i optimizovati mere prevencije u smislu poboljšanja pravilne upotrebe antimikrobnih lekova (eng. Antibiotic Stewardship), čišćenja i higijene ruku.

Najviša prevalencija VRE $fm$  izolata u našem istraživanju je pronađena na kliničkom odeljenju za gerijatriju gde se vankomicin ali i metronidazol najčešće koriste kao terapija infekcije prouzrokovana *C. difficile* (296). Nadalje, antimikrobni lekovi širokog spektra dejstva su najčešća deo terapijskog protokola u JIL, dok se vankomicin najčešće koristi kao empirijska terapija kod febrilne neutropenije kod pacijenata sa hematološkim malignitetima (91,297). Stoga, za razliku od ostalog dela Evrope gde se poreklo VRE u bolničkoj sredini vezuje za upotrebu avoparcina na životinjskim farmama, u Srbiji primećujemo drugačiji scenario, sličan SAD, gde je VRE u bolnicama posledica prevelike upotrebe vankomicina (72). Uz činjenice da je u našoj zemlji postoji visok obim potrošnje antimikrobnih lekova koji su dobri induktori rezistencije enterokoka na vankomicin i trend rasta potrošnje navedenih lekova i rezultat ispitivanja klonalne povezanosti koji govori u prilog da nema filogenetske srodnosti među izolatima, selektivni pritisak antimikrobnih lekova može da bude jedno od objašnjenja visokog stepena.

Ispitivanje učestalost fekalne kolonizacije VRE sojevima kod hospitalizovanih pacijenata na odeljenjima sa povišenim rizikom od nastanka kolonizacije u Srbiji do sada nije rađeno, te rezultati ovog istraživanja predstavljaju važan doprinos u razumevanju kolonizacije vankomicin rezistentnim enterokokom u bolničkoj sredini, definisanju faktora rizika za identifikaciju osoba u riziku za VRE kolonizaciju na koje bi strateški moglo da se deluje i proširivanju svesti i znanja o VRE kolonizaciji u Srbiji. Takođe, kroz ovo istraživanje su dobijeni i inicijalni podaci o molekularnoj epidemiologiji i genetskoj raznolikosti cirkulišućih VRE sojeva u Srbiji, koji mogu da posluže kao signal za detekciju potencijalnog izbijanja epidemije. Naši rezultati mogu predstavljati evoluciju dobro adaptiranog bolničkog klona, što se sporadično dešava i predstavlja princip „genskog kapitalizma“ karakterističnog za VRE. Nemogućnost da izvršimo tipizaciju pet izolata, najverovatnije kao rezultat izmene u tri VNTR lokusa, uz činjenicu da smo identifikovali 25 jedinstvenih MLVA profila, može da ukaže na to da je poreklo rezistencije na vankomicin kod *E. faecium* izolata iz našeg istraživanja posledica horizontalnog genskog transfera i selektivnog pritiska antimikrobnih lekova i to prvenstveno cefalosporina i flourohinolona koje smo identifikovani kao faktore rizika za VRE kolonizaciju (25,80,245).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da se rizik za nastanak VRE kolonizacije značajno povećava sa produženjem dužine boravka u bolnici, ali i sa primnom cefalosporina i flourohinolona kao dokazanih induktora rezistencije enterokoka na vankomicin, što uz visok obim potrošnje navedenih antimikrobnih lekova u našoj zemlji i prisustvo velikog diverziteta u okviru VRE $fm$  izolata koji su dispergovani među ispitivanim bolničkim odeljenjima ukazuje da nastanak VRE kolonizacije u našem istraživanju može da ima dvojako poreklo. Sa jedne strane, VRE $fm$  kolonizacija može biti posledica direktnog prenosa endemski prisutnog VRE $fm$  klona sa neživih predmeta u bolnici na ispitanike, a sa druge strane može biti posledica upliva VRE $fm$  klonova iz animalnih izvora putem lanca ishrane i naknadne selekcije VRE u toku bolničkog lečenja usled selektivnog pritiska antimikrobnih lekova.

Uvođenje obaveznog VRE skrining programa prilikom prijema pacijenata na odeljenja koja su identifikovana kao mesta sa visokim rizikom za VRE kolonizaciju, pojačavanje postupaka čišćenja i

dezinfekcije na ovim odeljenjima, povećanje broja zdravstvenih radnika i edukacija zdravstvenog osoblja o značaju VRE kolonizacije/infekcije, smanjila bi mogućnost opstanka i daljeg procesa adaptacije VRE $fm$  klonova u bolnicama. Izveštavanje o antimikrobnoj rezistenciji koje bi obuhvatilo izradu profila rezistencije pružilo bi kvalitetnije podatke o praćenju rezistencije patogena od interesa. Upotreba MLVA metode u kontekstu nadzora nad kontrolom bolničkih infekcija gde je primarni fokus na isključenju klonalne povezanosti među izolatima i pravovremeno upozorenje da se započne istraga bolničke epidemije, može da se koristi kao metoda „prve linije odbrane“ u epidemiološkom nadzoru nad VRE. Skraćenje bolničkog lečenja na odeljenjima sa povećanim rizikom za VRE kolonizaciju, uvođenje ciljanih vodiča za upravljanje antimikrobnim lekovima koji bi bili usmereni na smanjenje obima potrošnje cefalosporina i flouorohinolona, ali i ugradnja posebnih filtera koji bi sprečili izlazak VRE iz bolničke u vanbolničku sredinu, omogućili bi smanjenje učestalosti VRE kolonizacije na odeljenjima pod rizikom za VRE kolonizaciju i sledstveno smanjenje invazivnih bolničkih VRE $fm$  infekcija, čime bi se postigla kontrola nad cirkulišućim bolničkim VRE $fm$  sojevima, a Srbija svrstala u red evropskih zemalja sa prosečnom učestalosti VRE $fm$  invazivnih izolata.



## **6. ZAKLJUČCI**

---

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj studiji, izvedeni su sledeći zaključci:

- Učestalost fekalne kolonizacije VRE sojevima među ispitanicima hospitalizovanim na kliničkim odeljenjima sa povišenim rizikom za nastanak VRE kolonizacije iznosila je 28,7%, što je više od evropskog proseka. Dobijene vrednosti u našem istraživanju su očekivane, s obzirom na podatke CAESAR mreže o visokim stopama invazivnih VRE $_{fm}$  izolata u Srbiji prema kojima je Srbija svrstana među zemlje sa najvišom stopom VRE $_{fm}$  na evropskom kontinentu.
- Učestalost fekalne kolonizacije VRE sojevima je bila najviša na kliničkim odeljenjima za gerijatriju (42,6%) i JIL (40%), a najniža na odeljenjima za hemodijalizu (11,7%). Na odeljenjima za hemato-onkologiju ova vrednost je iznosila 27,9%, dok je na odeljenjima za akutne infektivne bolesti vrednost bila nešto niža i iznosila je 22,7%. Razlika u učestalosti VRE kolonizacije između pacijenata na hemodijalizi i pacijenata sa ostalih kliničkih odeljenja se može objasniti time što su pacijenti na hemodijalizi kao izrazito vulnerabilna populacija pacijenata češće pod nadzorom zdravstvenih radnika ali i zato što postoji edukacija i veća svesnost zdravstvenog osoblja i pacijenata na hemodijalizi o značaju preventivnih mera za sprečavanje i suzbijanja bolničkih infekcija.
- Nezavisni prediktori za nastanak VRE kolonizacije među ispitanicima hospitalizovanim na kliničkim odeljenjima sa povišenim rizikom za nastanak VRE kolonizacije bili su hospitalizacija na kliničkim odeljenjima, hospitalizacija pre uzorkovanja duža od tri dana, primena cefalosporina i flourohinolona, što je u saglasnosti sa dokumentovanim faktorima rizika za VRE kolonizaciju.
- U odnosu na odeljenja za hemodijalizu, boravak na odeljenjima za gerijatriju povećao je rizik za VRE kolonizaciju 6,5 puta, boravak u JIL povećao je rizik 5 puta, a boravak na hemato-onkološkim odeljenjima 4,7 puta. Ovi podaci mogu biti odraz težine kliničke slike, smanjene komplikacije čišćenja i dezinfekcije i smanjenja nadzora nad pacijentima kao posledica manjka osoblja ali i karakteristika VRE $_{fm}$  sojeva koje omogućavaju dobru adaptaciju i otpornost na preduzimanje mera za sprečavanje i suzbijanje bolničkih infekcija.
- U odnosu na ispitanike koji su hospitalizovani 48 sati pre uzorkovanja stolice na VRE, ispitanici hospitalizovani 3-7 dana pre uzorkovanja imali su 5,6 puta veći rizik za VRE kolonizaciju, ispitanici hospitalizovani 8-15 dana pre uzorkovanja imali su 5,5 puta veći rizik za VRE kolonizaciju, dok su ispitanici hospitalizovani duže od 16 dana pre uzorkovanja imali 8,4 puta veći rizik za VRE kolonizaciju, što je u saglasnosti sa činjenicom da se sa produžetkom bolničkog lečenja povećava verovatnoća transmisije VRE klonova iz bolničkog okruženja. Visoki rizici za VRE kolonizaciju u odnosu na dužinu bolničkog lečenja detektovani u našoj studiji mogu da budu odraz diseminacije dobro adaptiranog bolničkog VRE klona.
- Primena cefalosporina povećala je rizik za VRE kolonizaciju 2,2 puta, a primena flourohinolona 1,8 puta, što je u saglasnosti sa činjenicom da su ovi antimikrobni agensi poznati kao induktori VRE kolonizacije, kao i sa podacima o povećanoj potrošnji ovih antimikrobnih lekova u Srbiji.

- Svi izolovani VRE sojevi u našem istraživanju su bili VRE<sub>fm</sub> sa VanA fenotipskim i *vanA* genotipskim profilom, što je u saglasnosti sa činjenicom da je *vanA* genotip dominantan VRE genotip u Evropi.
- Svi ispitivani VRE<sub>fm</sub> izolati su bili MDR VRE<sub>fm</sub> sa visokim stepenom rezistencije na gotovo sve testirane antimikrobne lekove, osim na linezolid i tigeciklin. Među ispitivanim VRE<sub>fm</sub> izolatima identifikovano je osam profila antimikrobne rezistencije, od kojih su dva bila dominantna: AMP-IMP-CIP-LEVO-GEN-HLS-STR-HLS-TEI (62,3%) i AMP-IMP-CIP-LEVO-GEN-HLS-STR-HLS-TEI-Q-D (23,4%). Predominacija MDR VRE<sub>fm</sub> u našem istraživanju može da označava da je za VRE<sub>fm</sub> bolnička sredina postala nova ekološka niša koju je uspešno osvojio i da je MDR *E. faecium* dominantni rezervoar stečene rezistencije na vankomicin.
- Visok stepen rezistencije VRE<sub>fm</sub> na Q-D (38,9%), koji do sada nije registrovan u našoj zemlji za kliničku upotrebu, niti je deo terapijskih protokola i prisustvo ampicilin osetljivih VRE<sub>fm</sub> izolata ukazuju na razmenu gena nosioca rezistencije između *E. faecium* sojeva animalnog i humanog izvora, odnosno ukazuje na postojanje vanbolničkog VRE<sub>fm</sub> izvora.
- Visok procenat MDR VRE<sub>fm</sub> izolata koji imaju sposobnost produkcije biofilma, od kojih većina nosi skoro sve ispitivane gene za faktore virulencije (*esp*, *hyl*, *efaA*, *asa1*, *gelE*, *cpd*), a 58,4% izolata nosi minimum tri gena za faktore virulencije pokazatelj je odlične adaptacije VRE<sub>fm</sub> za uspešno preživljavanje i diseminaciju u bolničkoj sredini.
- MLVA analiza je otkrila 29 različitih MLVA genotipova, od kojih je 25 genotipova imalo jedinstvene profile koji nisu otkriveni ranije čime smo doprineli upotpunjavanju globalne mape cirkulišućih VRE<sub>fm</sub> genotipova. Prisustvo novih MT profila govori u prilog plastičnosti VRE<sub>fm</sub> genoma i visokog kapaciteta za gensko rearanžiranje koje se dešava u gastrointestinalnom traktu.
- MLVA analiza je otkrila 13 klastera koji su obuhvatili 77,7% izolovanih VRE<sub>fm</sub> sojeva. Tri najveća klastera (SRB2, SRB16 i MT161) su činila 38,8% tipiziranih VRE<sub>fm</sub> izolata i predstavljala su SLV, odnosno DLV dva MLVA genotipa (MT-159 i MT-340) koji su dokazani uzročnici bolničkih infekcija. VRE<sub>fm</sub> sojevi koji su pripadali najvećim klasterima bili su dispergovani po različitim bolničkim odeljenjima, čime se može isključiti transmisija među ispitanicima.
- Na osnovu različitih kombinacija za VNTR-7, VNTR-8 i VNTR-10 lokuse u našem istraživanju, za 33,3% izolata je detektovano da pripadaju CC17, što je niža vrednost u odnosu na istraživanja koja su uključivala samo invazivne isolate, ali je u skladu sa podacima o izolatima iz nadzora.
- SRB3 MLVA tip je prema geoBURST analizi označen kao začetnik populacije VRE<sub>fm</sub> klonova iz našeg istraživanja, a SRB16, SRB11, SRB1, MT-524 i MT-379 genotipovi su označeni kao njegovi najbliži srodnici. Upoređivanjem populacije VRE<sub>fm</sub> klonova iz našeg istraživanja sa dostupnom bazom MLVA klonova pokazano je da su SRB3 i SRB9 najbliži srodnici MT-1 klona, a da je SRB16 najbliži srodnik MT-159 klona. Ova analiza je pokazala blisku filogenetsku povezanost VRE<sub>fm</sub> izolata iz našeg istraživanja sa poznatim klonovima prouzrokovateljima VRE bolničkih infekcija.

## ***7. LITERATURA***

---

1. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013.
2. Centers for Disease Control and Prevention. VRE in Healthcare Settings [Internet]. [cited 2021 Mar 21]. Available from: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/vre/vre.html>
3. Magiorakos A, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268–81.
4. Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y et al., editor. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts: Eye and Ear Infirmary; 2014.
5. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J GR. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*. 1988;1(8575–6):57–8.
6. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med*. 1988;319(3):157–61.
7. Frieden TR, Munsiff SS, Williams G, Faur Y, Kreiswirth B, Low DE, et al. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in New York City. *Lancet*. 1993;342(8863):76–9.
8. Rice LB. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis*. 2008;197(8):1079–81.
9. Tacconelli E, Margini. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics [Internet]. World Health Organization, Geneva; 2017 [cited 2020 Jul 27]. Available from: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
10. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(3):318–27.
11. Murrey B. The life and times of the Enterococcus. *Clin Microbiol Rev*. 1990;3(1):46–65.
12. Fiore E, Van Tyne D, Gilmore MS. Pathogenicity of Enterococci. *Microbiol Spectr*. 2019;7(4):10.
13. Lancefield RC. A Serological Differentiation Of Human And Other Groups Of Hemolytic Streptococci. *J Exp Med*. 1933;57(4):571–95.
14. Schleifer KH, Kilpper-Balz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1984;34(1):31–4.
15. Kalenić S. *Medicinska mikrobiologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
16. Savić B, Mitrović S, Jovanović T, editors. *Medicinska mikrobiologija: udžbenik za studente medicine*. 2th ed. Beograd: Medicinski fakultet Beograd, CIBID; 2020.
17. The List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) [Internet]. [cited 2020 Jul 13]. Available from: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=enterococcus>
18. Recommendations for Preventing the Spread of Vancomycin Resistance Recommendations of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) [Internet]. [cited 2020 Jul 26]. Available from: <https://www.cdc.gov/MMWR/preview/mmwrhtml/00039349.htm>

19. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [Internet]. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 10.0. 2020 [cited 2020 Jul 28]. Available from: <http://www.eucast.org>.
20. Lebreton F, Manson AL, Saavedra JT, Straub TJ, Earl AM, Gilmore MS. Tracing the Enterococci from Paleozoic Origins to the Hospital. *Cell*. 2017;169(5):849-861.e13.
21. Higueta NIA, Huycke MM. Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014.
22. Gilmore MS, Lebreton F, van Schaik W. Genomic Transition of Enterococci from Gut Commensals to Leading Causes of Multidrug-resistant Hospital Infection in the Antibiotic Era. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16(1):10–6.
23. Arias CA, Murray BE. The rise of the Enterococcus: Beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(4):266–78.
24. Palmer KL, Kos VN, Gilmore MS. Horizontal Gene Transfer and the Genomics of Enterococcal Antibiotic Resistance. *Curr Opin Microbiol*. 2010;13(5):632–629.
25. Hegstad K, Mikalsen T, Coque TM, Werner G, Sundsfjord A. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(6):541–54.
26. Rosvoll TCS, Pedersen T, Sletvold H, Johnsen PJ, Sollid JE, Simonsen GS, et al. PCR-based plasmid typing in *Enterococcus faecium* strains reveals widely distributed pRE25-, pRUM-, pIP501- and pHT $\beta$ -related replicons associated with glycopeptide resistance and stabilizing toxin-antitoxin systems. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010;58(2):254–68.
27. Van Tyne D, Gilmore MS. Raising the Alarmone : Within-Host Evolution of Antibiotic-Tolerant *Enterococcus faecium*. *Am Soc Microbiol*. 2017;8(1):1–4.
28. The European committee and Antimicrobial susceptibility testing. Intrinsic Resistance and Unusual Phenotypes version 3.2 February 2020. [https://EucastOrg/Expert\\_Rules\\_and\\_Intrinsic\\_Resistance/](https://EucastOrg/Expert_Rules_and_Intrinsic_Resistance/). 2020;(3.2):1–12.
29. Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12(10):1221–36.
30. Miller WR, Murray BE, Rice LB, Arias CA. Vancomycin-Resistant Enterococci: Therapeutic Challenges in the 21st Century. *Infect Dis Clin North Am*. 2016;30(2):415–39.
31. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [Internet]. [cited 2020 Feb 21]. Available from: <http://www.eucast.org/>
32. Top J, Paganelli FL, Zhang X, van Schaik W, Leavis HL, van Luit-Asbroek M, et al. The *Enterococcus faecium* Enterococcal Biofilm Regulator, EbrB, Regulates the *esp* Operon and Is Implicated in Biofilm Formation and Intestinal Colonization. *PLoS One*. 2013;8(5):e65224.
33. Vankerckhoven V, Autgaerden T Van, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, et al. Development of a Multiplex PCR for the Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* Genes in Enterococci and Survey for Virulence Determinants among European Hospital Isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*.



- 2004;42(10):4473–9.
34. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(5):308–20.
  35. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(4):1628–35.
  36. Johnson DI. *Enterococcus* spp. In: *Bacterial Pathogens and Their Virulence Factors*. 2018.
  37. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine-4th rev [Internet]. World Health Organization, Geneva, Switzerland; 2016. Available from: <http://www.who.int>
  38. Хумани лекови - Алимс [Internet]. [cited 2020 Jul 7]. Available from: <https://www.alims.gov.rs/ciril/lekovi/>
  39. Binda E, Marinelli F, Marcone GL. Old and new glycopeptide antibiotics: Action and resistance. *Antibiot*. 2014 Nov 4;3(4):572–94.
  40. Blaskovich MAT, Hansford KA, Butler MS, Jia Z, Mark AE, Cooper MA. Developments in Glycopeptide Antibiotics. *ACS Infect Dis*. 2018;4(5):715–35.
  41. Vancocin (vancomycin) dosing, indications, interactions, adverse effects, and more [Internet]. [cited 2020 Jul 9]. Available from: <https://reference.medscape.com/drug/firvanq-vancocin-vancomycin-342573>
  42. 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.
  43. Pinho MG, Kjos M, Veening JW. How to get (a)round: Mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(9):601–14.
  44. Munita J, AA C. Antibiotic Resistance Mechanisms. *Microbiol Spectr*. 2016;4(2):10.
  45. Healy VL, Lessard IAD, Roper DI, Knox JR, Walsh CT. Vancomycin resistance in enterococci: Reprogramming of the D-Ala-D-Ala ligases in bacterial peptidoglycan biosynthesis. *Chem Biol*. 2000;7(5):109–19.
  46. Ahmed MO, Baptiste KE. Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. *Microb Drug Resist*. 2018;24(5):590–606.
  47. Faron ML, Ledebor NA, Buchan BW. Resistance mechanisms, epidemiology, and approaches to screening for vancomycin-resistant *Enterococcus* in the health care setting. *J Clin Microbiol*. 2016;54(10):2436–47.
  48. The European committee and Antimicrobial susceptibility testing. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance-ver.2.0. 2017.
  49. Xu X, Lin D, Yan G, Ye X, Wu S, Guo Y, et al. vanM, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(11):4643–7.
  50. Top J. MLVA-typing - UMC Utrecht [Internet]. [cited 2019 Nov 23]. Available from: <https://www.umcutrecht.nl/en/Research/Miscellaneous/MLVA-typing>
  51. Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P. Modes and modulations of antibiotic

- resistance gene expression. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):79–114.
52. Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(7):2667–72.
  53. Hong H, Hutchings MI, Buttner MJ. Vancomycin Resistance VanS/VanR Two-Component Systems. *Adv Exp Med Biol.* 2008;
  54. Papagiannitsis CC, Malli E, Florou Z, Medvecky M, Sarrou S, Hrabak J, et al. First description in Europe of the emergence of *Enterococcus faecium* ST117 carrying both vanA and vanB genes, isolated in Greece. *J Glob Antimicrob Resist.* 2017;11:68–70.
  55. McKessar SJ, Berry AM, Bell JM, Turnidge JD, Paton JC. Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(11):3224–8.
  56. Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, et al. D-Ala-D-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(10):4606–12.
  57. Centers for Disease Control and Prevention. Vancomycin-resistant Enterococci (VRE) and the Clinical Laboratory [Internet]. [cited 2020 Aug 16]. Available from: <https://www.cdc.gov/hai/settings/lab/vreclinical-laboratory.html>
  58. Hayden MK, Trenholme GM, Schultz JE, Sahm DF. In Vivo Development of Teicoplanin Resistance in a VanB *Enterococcus faecium* Isolate. *J Infect Dis.* 1993;167(5):1224–7.
  59. Kawalec M, Gniadkowski M, Kedzierska J, Skotnicki A, Fielt J, Hryniewicz W. Selection of a teicoplanin-resistant *Enterococcus faecium* mutant during an outbreak caused by vancomycin-resistant enterococci with the VanB phenotype. *J Clin Microbiol.* 2001;39(12):4274–82.
  60. Holmes NE, Ballard SA, Lam MMC, Johnson PDR, Grayson ML, Stinear TP, et al. Genomic analysis of teicoplanin resistance emerging during treatment of vanB vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infections in solid organ transplant recipients including donor-derived cases. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(9):2134–9.
  61. Flipse J, Wintersdorff CJH Von, Niekerk JM Van, Jamin C, Tiel FH Van, Hasman H, et al. Appearance of vanD-positive *Enterococcus faecium* in a tertiary hospital in the Netherlands: prevalence of vanC and vanD in hospitalized patients. *Sci Rep.* 2019;9(1):6949.
  62. Patel R, Piper K, Cockerill FR, Steckelberg JM, Yousten AA. The biopesticide *Paenibacillus popilliae* has a vancomycin resistance gene cluster homologous to the enterococcal VanA vancomycin resistance gene cluster. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(3):705–9.
  63. D’Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature.* 2011;477(7365):457–61.
  64. Jehl F, Chomarant M, Weber M, Gérard A, Livermore D. From antibiogram to prescription. 2th ed. Marcy l’Etoile: bioMérieux S.A.; 2004.
  65. Gagetti P, Bonofiglio L, García Gabarrot G, Kaufman S, Mollerach M, Vigliarolo L, et al. Resistance to  $\beta$ -lactams in enterococci. *Rev Argent Microbiol.* 2019;51(2):179–83.

66. Top J. Molecular epidemiology of *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital adapted pathogen [Internet]. Utrecht University; 2007. Available from: <https://dspace.library.uu.nl/handle/1874/21193>
67. Soltani M, Beighton D, Philpott-Howard J, Woodford N. Mechanisms of resistance to quinupristin-dalfopristin among isolates of *Enterococcus faecium* from animals, raw meat, and hospital patients in western Europe. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(2):433–6.
68. Hershberger E, Donabedian S, Konstantinou K, Zervos MJ. Quinupristin-Dalfopristin Resistance in Gram-Positive Bacteria : Mechanism of Resistance and Epidemiology. 2004;38(1):92–8.
69. Stosovic B, Stepanovic S, Donabedian S, Tosic T JM. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Serbia. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(1):157–8.
70. Cogliani C, Goossens H, Greko C. Restricting antimicrobial use in food animals: Lessons from Europe. *Microbe*. 2011;6(6):274–9.
71. Misic D. Metode mikrobiološke dijagnostike. Beograd: Elit Medica; 2013.
72. Bonten MJ, Willems R, Weinstein RA. Vancomycin-resistant enterococci: Why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect Dis*. 2001;1(5):314–25.
73. Rice LB. Emergence of Vancomycin-Resistant Enterococci. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(2):183–7.
74. Donskey CJ, Helfand MS, Pultz NJ, Rice LB. Effect of Parenteral Antibiotic Administration on Persistence of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* in the Mouse Gastrointestinal Tract. *J Infect Dis*. 1999;180(2):384–90.
75. Bonten MJM, Hayden MK, Nathan C, Van Voorhis J, Matushek M, Slaughter S, et al. Epidemiology of colonisation of patients and environment with vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*. 1996;348(9042):1615–9.
76. Livornese LL, Dias S, Samel C, Romanowski B, Taylor S, May P, et al. Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. *Ann Intern Med*. 1992;117(2):112–6.
77. Bischoff WE, Reynolds TM, Hall GO, Wenzel RP, Edmond MB. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a large urban hospital over a 5-year period. *J Clin Microbiol*. 1999;37(12):3912–6.
78. Edmond MB, Ober JF, Weinbaum DL, Pfaller MA, Hwang T, Sanford MD, et al. Vancomycin-Resistant *Enterococcus Faecium* Bacteremia: Risk Factors for Infection. *Pediatr Infect Dis J*. 1996;15(4):390.
79. Guidelines for the Management of Patients with Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) Colonisation/Infection. Standing Committee on Infection Control, the Department of Human Services. Melbourne: Human Services Victoria; 1999.
80. Baquero F, Martinez JL. Ecology and evolution of antibiotic resistance. *Environmental Microbiol Reports*. 2009;1(6):469–76.
81. Brandl K, Plitas G, Mihiu CN, Ubeda C, Jia T, Schnabl B, et al. Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. *Nature*. 2008;455(7214):804–7.
82. Ubeda C, Bucci V, Caballero S, Djukovic A, Toussaint NC, Equinda M, et al. Intestinal microbiota containing *Barnesiella* species cures vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization. *Infect*

- Immun. 2013;81(3):965–73.
83. Zirakzadeh A, Patel R. Vancomycin-resistant enterococci: Colonization, infection, detection, and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2006;81(4):529–36.
  84. Bonten MJM, Slaughter S, Ambergen AW, Hayden MK. The Role of “Colonization Pressure” in the Spread of Vancomycin-Resistant Enterococci. *Arch Intern Med.* 1998;158(10):1127–32.
  85. Weinstein RA, Editor S, Hayden MK. Insights into the Epidemiology and Control of Infection with Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clin Infect Dis.* 2000;31(4):1058–65.
  86. Noskin GA, Stosor V, Cooper I, Peterson LR. Recovery of Vancomycin-Resistant Enterococci on Fingertips and Environmental Surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1995;16(10):577–81.
  87. Kingston L, O’Connell NH, Dunne CP. Hand hygiene-related clinical trials reported since 2010: a systematic review. *J Hosp Infect.* 2016;92(4):309–20.
  88. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis.* 2006;6:130.
  89. Drees M, Snyderman DR, Schmid CH, Barefoot L, Hansjosten K, Vue PM, et al. Prior Environmental Contamination Increases the Risk of Acquisition of Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clin Infect Dis.* 2008;46(5):678–85.
  90. Faron ML, Ledebouer NA, Buchan BW. Resistance Mechanisms , Epidemiology , and Approaches to Screening. *J Clin Microbiol.* 2016;54(10):2436–47.
  91. Pan S, Wang J, Chen Y, Chang Y, Chen M, Chang C. Incidence of and Risk Factors for Infection or Colonization of Vancomycin-Resistant Enterococci in Patients in the Intensive Care Unit. *PLoS One.* 2012;7(10):e47297.
  92. Shaghaghian S, Pourabbas B, Alborzi A, Askarian M, Mardaneh J. Vancomycin-Resistant Enterococci colonization in chronic hemodialysis patients and its risk factors in southern. *Iran Red Crescent Med J.* 2012;14(3):686–91.
  93. Gudiol C, Ayats J, Camoez M, Domínguez MÁ, García- C, Bodro M, et al. Increase in Bloodstream Infection Due to Vancomycin- Susceptible *Enterococcus faecium* in Cancer Patients : Risk Factors, Molecular Epidemiology and Outcomes. *PLoS One.* 2013;8(9):e74734.
  94. Ghanem G, Hachem R, Jiang Y, Chemaly RF, Raad I. Outcomes for and Risk Factors Associated With Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* and Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Bacteremia in Cancer Patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007;28(9):1054–9.
  95. Mazuski JE. Vancomycin-resistant enterococcus: risk factors, surveillance, infections, and treatment. *Surg Infect.* 2008;9(6):567–71.
  96. DeLisle S, Perl TM. Vancomycin-resistant enterococci: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. *Chest.* 2003;123(5):504S-18S.
  97. Honsa ES, Cooper VS, Mhaisien MN, Frank M, Shaker J, Iverson A, et al. RelA mutant *Enterococcus faecium* with Multiantibiotic Tolerance Arising in an Immunocompromised Host. *Am Soc Microbiol.* 2017;8(1):1–12.
  98. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-

- Net). 2020.
99. European Centre for Disease Prevention and Control. Data from the ECDC Surveillance Atlas - Antimicrobial resistance [Internet]. [cited 2021 Apr 30]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc>
  100. World Health Organisation. Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance (CAESAR) [Internet]. 2020 [cited 2020 Jun 7]. Available from: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/surveillance/central-asian-and-european-surveillance-of-antimicrobial-resistance-caesar>
  101. Endtz HP, Van Den Braak N, Van Belkum A, Kluytmans JAJW, Koeleman JGM, Spanjaard L, et al. Fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients and those living in the community in the Netherlands. *J Clin Microbiol.* 1997;35(12):3026–31.
  102. Christidou A, Gikas A, Scoulica E, PEDIADITIS J, Roumelaki M, Georgiladakis A, et al. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital in Crete, Greece: A cluster of cases and prevalence study on intestinal colonisation. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(11):999–1005.
  103. Whelton E, Lynch C, Reilly BO, Corcoran D, Cryan B, Keane SM, et al. Vancomycin-resistant enterococci carriage in an acute Irish hospital. *J Hosp Infect.* 2016;93(2):175–80.
  104. Gambarotto K, Ploy MC, Turlure P, Grélaud C, Martin C, Bordessoule D, et al. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and nonhospitalized controls in a cattle-rearing area of France. *J Clin Microbiol.* 2000;38(2):620–4.
  105. Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, Boyce JM, et al. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and enterococcus. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003;24(5):362–86.
  106. Shenoy ES, Paras ML, Noubary F, Walensky RP, Hooper DC. Natural history of colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant Enterococcus (VRE): a systematic review. *BMC Infect Dis.* 2014;14:177.
  107. Ziakas PD, Thapa R, Rice LB, Mylonakis E. Trends and Significance of VRE Colonization in the ICU: A Meta-Analysis of Published Studies. *PLoS One.* 2013;8(9):e75658.
  108. Hayden MK. Epidemiology and Control of Infection with Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clin Infect Dis.* 2000;31(october):1058–65.
  109. bioMérieux. CHROMID® VRE - clinical diagnostics products [Internet]. [cited 2021 Mar 27]. Available from: <https://www.biomerieux-diagnostics.com/chromidr-vre>
  110. BD Phoenix™ Automated Identification and Susceptibility Testing System - BD [Internet]. [cited 2021 Mar 22]. Available from: <https://www.bd.com/en-us/offering/capabilities/microbiology-solutions/identification-and-susceptibility-testing/bd-phoenix-automated-identification-and-susceptibility-testing-system>
  111. Dutka-malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of Glycopeptide Resistance Genotypes and Identification to the Species Level of Clinically Relevant Enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995;33(1):24–7.
  112. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification

- to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. ERRATUM. *J Clin Microbiol*. 1995;33(5):1434.
113. Poulsen RL, Pallesen L V., Frimodt-Møller N, Espersen F. Detection of clinical vancomycin-resistant enterococci in Denmark by multiplex PCR and sandwich hybridization. *Apmis*. 1999;107(4):404–12.
  114. Soltani M, Beighton D, Philpott-howard J. Mechanisms of Resistance to Quinupristin-Dalfopristin among Isolates of *Enterococcus faecium* from Animals , Raw Meat , and Hospital Patients in Western Europe. 2000;44(2):433–6.
  115. Top J, Schouls LM, Bonten MJM, Willems RJL. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates. *J Clin Microbiol*. 2004;42(10):4503–11.
  116. Jovanović M, Top J, Majoor E, Zervos M, Tošić T, Stošović B, et al. Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis Typing of Vancomycin- Resistant *Enterococcus faecium* in Serbia. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014;34(12):12–5.
  117. Measuring Biological Diversity - Links [Internet]. [cited 2021 Jun 6]. Available from: [http://www.columbia.edu/itc/cerc/danoff-burg/MBD\\_Links.html](http://www.columbia.edu/itc/cerc/danoff-burg/MBD_Links.html)
  118. Hunter PR, Gaston MA. Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity. *J Clin Microbiol*. 1988;26(11):2465–6.
  119. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura G Di, Djukić S, Ćirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates. *Apmis*. 2007;115(8):891–9.
  120. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. Stockholm: ECDC; 2019.
  121. Puchter L, Chaberny IF, Schwab F, Vonberg RP, Bange FC, Ebadi E. Economic burden of nosocomial infections caused by vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018;7:1.
  122. Zhou X, Willems RJL, Friedrich AW, Rossen JWA, Bathoorn E. *Enterococcus faecium*: From microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. *Antimicrob*
  123. Libish B, Lepsanovic Z, Top J, Muzslay M, Konkoly-Thege M, Gacs M, et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp . clinical isolates from Hungary and Serbia. 2008;40(10):778–84.
  124. Janjusevic A, Markovic Denic L, Minic R, Grgurevic A, Cirkovic I. Intestinal carriage of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. among high-risk patients in university hospitals in Serbia: first surveillance report. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2021;20:18.
  125. Goossens H, Jabes D, Rossi R, Lammens C, Privitera G, Courvalin P. European survey of vancomycin-resistant enterococci in at-risk hospital wards and in vitro susceptibility testing of ramoplanin against these isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51(SUPPL. 3):5–12.
  126. Braak N Van Den, Ott A, Belkum A Van, Jan AJW, Koeleman JGM, Spanjaard L, et al. Prevalence and Determinants of Fecal Colonization With Vancomycin-Resistant *Enterococcus* in Hospitalized Patients in The Netherlands. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2000;21(August):520–4.
  127. Kalocheretis P, Baimakou E, Zerbala S, Papaparaskevas J, Makriniotou I, Tassios PT, et al. Dissemination of vancomycin-resistant enterococci among haemodialysis patients in Athens, Greece. *J*



- Antimicrob Chemother. 2004;54(6):1031–4.
128. Gikas A, Christidou A, Scoulica E, Nikolaidis P, Skoutelis A, Levidiotou S, et al. Epidemiology and molecular analysis of intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci in Greek hospitals. *J Clin Microbiol*. 2005;43(11):5796–9.
  129. Sakka V, Tsiodras S, Galani L, Antoniadou A, Souli M, Galani I, et al. Risk-factors and predictors of mortality in patients colonised with vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(1):14–21.
  130. Metallidis S, Chatzidimitriou M, Tsona A, Bisiklis A, Lazaraki G, Koumentaki E, et al. Vancomycin-Resistant Enterococci, Colonizing the Intestinal Tract of Patients in a University Hospital in Greece. *Brazilian J Infect Dis*. 2006;10(3):179–84.
  131. Boisivon A, Thibault M, Leclercq R, Bellon O, Chardon H, Garrigues B, et al. Colonization by vancomycin-resistant enterococci of the intestinal tract of patients in intensive care units from French general hospitals. *Clin Microbiol Infect*. 1997;3(2):175–9.
  132. Coque TM, Tomayko JF, Ricke SC, Okhyusen PC, Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(11):2605–9.
  133. Montecalvo MA, de Lencastre H, Carraher M, Gedris C, Chung M, VanHorn K, et al. Natural History of Colonization with Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1995;16(12):680–5.
  134. Karki S, Houston L, Land G, Bass P, Kehoe R, Borrell S, et al. Prevalence and risk factors for VRE colonisation in a tertiary hospital in Melbourne, Australia : a cross sectional study. *Antimicrob Resist Infect Control* . 2012;1(1):31.
  135. Amberpet R, Sistla S, Parija SC, Thabah MM. Screening for Intestinal Colonization with Vancomycin Resistant Enterococci and Associated Risk Factors among Patients Admitted to an Adult Intensive Care Unit of a Large Teaching Hospital. 2016;10(9):6–9.
  136. Suppola JP, Volin L, Valtonen V V., Vaara M. Overgrowth of *Enterococcus faecium* in the feces of patients with hematologic malignancies. *Clin Infect Dis*. 1996;23(4):694–7.
  137. Gordts B, Van Landuyt H, Ieven M, Vandamme P, Goossens H. Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. *J Clin Microbiol*. 1995;33(11):2842–6.
  138. Radonjić V. Promet i potrošnja gotovih lekova za humanu upotrebu u Republici Srbiji u 2013. godini. Beograd; 2014.
  139. Hacek DM, Bednarz P, Noskin GA, Zembower T, Peterson LR. Yield of vancomycin-resistant enterococci and multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from stools submitted for *Clostridium difficile* testing compared to results from a focused surveillance program. *J Clin Microbiol*. 2001;39(3):1152–4.
  140. Drews SJ, Johnson G, Gharabaghi F, Roscoe M, Matlow A, Tellier R, et al. A 24-hour screening protocol for identification of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*. 2006;44(4):1578–80.
  141. Glisovic S, Eintracht S, Longtin Y, Oughton M, Brukner I. Rectal swab screening assays of public health importance in molecular diagnostics: Sample adequacy control. *J Infect Public Health*. 2018;11(2):234–7.
  142. D’Agata EMC, Gautam S, Green WK, Tang YW. High rate of false-negative results of the rectal swab

- culture method in detection of gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis*. 2002;34(2):167–72.
143. Das S, Harazin M, Wright MO, Dusich I, Robicsek A, Peterson LR. Active Surveillance and Decolonization Without Isolation Is Effective in Preventing Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* Transmission in the Psychiatry Units. *Open Forum Infect Dis*. 2014;1(2):ofu067.
  144. Robotham J V, Graves N, Cookson BD, Barnett AG, Wilson JA, Edgeworth JD, et al. Screening, isolation, and decolonisation strategies in the control of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units: cost effectiveness evaluation. *BMJ*. 2011;343:d5694.
  145. Jang W, Penglilly S, Wong A, Tauruc J, Champagne S, Rommey M, et al. Evaluation of bioMérieux chromID™ VRE Agar for the detection of Vancomycin Resistant Enterococci (VRE). In: *Multidrug-Resistant Organism Screening and Clostridium Difficile Culture*. bioMérieux S.A.; 2013.
  146. Ledebøer NA, Tibbetts RJ, Dunne WM. AA new chromogenic agar medium, chromID VRE, to screen for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;59(4):477–9.
  147. Anderson NW, Buchan BW, Young CL, Newton DW, Brenke C, Lapsley L, et al. Multicenter clinical evaluation of VREselect agar for identification of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*. 2013;51(8):2758–60.
  148. Suwantarant N, Roberts A, Prestridge J, Seeley R, Speser S, Harmon C, et al. Comparison of five chromogenic media for recovery of vancomycin-resistant enterococci from fecal samples. *J Clin Microbiol*. 2014;52(11):4039–42.
  149. Peterson JF, Doern CD, Kallstrom G, Riebe KM, Sander T, Dunne WM, et al. Evaluation of Spectra VRE , a New Chromogenic Agar Medium Designed To Screen for Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* □. 2010;48(12):4627–9.
  150. Peltroche-Illacsahuanga H, Top J, Lütticken R, Haase G, Peltroche-Illacsahuanga H, Top J, et al. Comparison of two chromogenic media for selective isolation of vancomycin- resistant enterococci from stool specimens. *J Clin Microbiol*. 2009;47(12):4113–6.
  151. Devrim F, Gülfidan G, Gözmen S, Demirağ B, Oymak Y, Yaman Y, et al. Comparison of the BD GeneOhm VanR assay and a chromogenic agar-based culture method in screening for vancomycin-resistant enterococci in rectal specimens of pediatric hematology-oncology patients. *Turk J Pediatr*. 2015;57(2):161–6.
  152. Mak A, Miller MA, Chong G, Monczak Y. Comparison of PCR and culture for screening of vancomycin-resistant enterococci: Highly disparate results for vanA and vanB. *J Clin Microbiol*. 2009;47(12):4136–7.
  153. Ledebøer NA, Das K, Eveland M, Mailler S, Chatellier S, Dunne WM. Evaluation of a novel chromogenic agar medium for isolation and differentiation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates. *J Clin Microbiol*. 2007;45(5):1556–60.
  154. Asir K, Wilkinson K, Perry JD, Reed RH, Gould FK. Evaluation of chromogenic media for the isolation of vancomycin-resistant enterococci from stool samples. *Lett Appl Microbiol*. 2009;48(2):230–3.
  155. Ongut G, Kilinckaya H, Baysan BO, Ogunc D, Colak D, Inan D, et al. Evaluation of Brilliance VRE agar for the detection of vancomycin-resistant enterococci in rectal swab specimens. *J Med Microbiol*.

- 2013;62(Pt 4):661–2.
156. Kallstrom G, Doern CD, Michael W, Kallstrom G, Doern CD, Dunne WM. Evaluation of a Chromogenic Agar under Development To Screen for VRE Colonization. *J Clin Microbiol.* 2010;48(3):999–1001.
  157. Stamper PD, Shulder S, Bekalo P, Manandhar D, Ross TL, Speser S, et al. Evaluation of BBL CHROMagar VanRE for Detection of Vancomycin-Resistant Enterococci in Rectal Swab Specimens. *J Clin Microbiol.* 2010;48(11):4294–7.
  158. Jenkins SG, Raskoshina L, Schuetz AN. Comparison of performance of the novel chromogenic spectra VRE agar to that of bile esculin azide and Campylobacter agars for detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples. *J Clin Microbiol.* 2011;49(11):3947–9.
  159. Hua Nguyen TD, Evans KD, Goh RA, Tan GL, Peterson EM. Comparison of medium, temperature, and length of incubation for detection of vancomycin-resistant *Enterococcus*. *J Clin Microbiol.* 2012;50(7):2503–5.
  160. Gouliouris T, Blane B, Brodrick HJ, Raven KE, Ambridge KE, Kidney AD, et al. Comparison of two chromogenic media for the detection of vancomycin-resistant enterococcal carriage by nursing home residents. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016;85(4):409–12.
  161. Klare I, Fleige C, Geringer U, Witte W, Werner G. Performance of three chromogenic VRE screening agars, two Etest® vancomycin protocols, and different microdilution methods in detecting vanB genotype *Enterococcus faecium* with varying vancomycin MICs. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74(2):171–6.
  162. Kahlert J, Gribsholt SB, Gammelager H, Dekkers OM, Luta G. Control of confounding in the analysis phase – an overview for clinicians. *Clin Epidemiol.* 2017;9:195–204.
  163. Hamilton DF, Ghert M, Simpson AHRW. Interpreting regression models in clinical outcome studies. *Bone Jt Res.* 2015;4(9):152–3.
  164. Zacharioudakis IM, Zervou FN, Ziakas PD, Rice LB, Mylonakis E. Vancomycin-resistant enterococci colonization among dialysis patients: A meta-analysis of prevalence, risk factors, and significance. *Am J Kidney Dis.* 2015;65(1):88–97.
  165. Lautenbach E, Bilker WB, Brennan PJ. Enterococcal Bacteremia: Risk Factors for Vancomycin Resistance and Predictors of Mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1999;20(5):318–23.
  166. Tan D, Htun HL, Koh J, Kanagasabai K, Lim JW, Hon PY, et al. Comparative epidemiology of vancomycin-resistant enterococci colonization in an acute-care hospital and its affiliated intermediate- and long-term care facilities in Singapore. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(12):e01507-18.
  167. Furtado GHC, Martins ST, Coutinho AP, Wey SB, Servolo Medeiros EA. Prevalence and factors associated with rectal vancomycin-resistant enterococci colonization in two intensive care units in São Paulo, Brazil. *Brazilian J Infect Dis.* 2005;9(1):64–9.
  168. Alevizakos M, Gaitanidis A, Nasioudis D, Tori K, Flokas ME, Mylonakis E. Colonization with vancomycin-resistant enterococci and risk for bloodstream infection among patients with malignancy: A systematic review and meta-analysis. *Open Forum Infect Dis.* 2017;4(1):ofw246.
  169. Humphreys H. Controlling the spread of vancomycin-resistant enterococci. Is active screening worthwhile? *J Hosp Infect.* 2014;88(4):191–8.

170. Fossi Djembi L, Hodille E, Chomat-Jaboulay S, Coudrais S, De Santis N, Gardes S, et al. Factors associated with Vancomycin-resistant Enterococcus acquisition during a large outbreak. *J Infect Public Health*. 2017;10(2):185–90.
171. Elizaga ML, Weinstein RA, Hayden MK. Patients in long-term care facilities: A reservoir for vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis*. 2002;34(4):441–6.
172. Bonilla HF, Zervos MA, Lyons MJ, Bradley SF, Hedderwick SA, Ramsey MA, et al. Colonization with Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium: Comparison of a Long-Term-Care Unit with an Acute-Care Hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1997;18(5):333–9.
173. Ioannou P, Plexousaki M, Dimogerontas K, Aftzi V, Drougkaki M, Konidaki M, et al. Characteristics of urinary tract infections in older patients in a tertiary hospital in Greece. *Geriatr Gerontol Int*. 2020;20(12):1228–33.
174. Kline KA, Bowdish DME. Infection in an aging population. *Curr Opin Microbiol*. 2016;29:63–7.
175. Republički zavod za statistiku Srbije. Popis 2011 [Internet]. [cited 2021 May 3]. Available from: <https://www.stat.gov.rs/sr-latn/oblasti/popis/popis-2011/>
176. Kampmeier S, Tönnies H, Correa-Martinez CL, Mellmann A, Schwierzeck V. A nosocomial cluster of vancomycin resistant enterococci among COVID-19 patients in an intensive care unit. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2020 Sep 22;9(1):154.
177. Matar MJ, Tarrand J, Raad I, Rolston KVI. Colonization and infection with vancomycin-resistant enterococcus among patients with cancer. *Am J Infect Control*. 2006;34(8):534–6.
178. Worth LJ, Thursky KA, Seymour JF, Slavin MA. Vancomycin-resistant Enterococcus faecium infection in patients with hematologic malignancy: patients with acute myeloid leukemia are at high-risk. *Eur J Haematol*. 2007;79(3):226–33.
179. Heinz WJ, Buchheidt D, Christopeit M, von Lilienfeld-Toal M, Cornely OA, Einsele H, et al. Diagnosis and empirical treatment of fever of unknown origin (FUO) in adult neutropenic patients: guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Medical Oncology (DGHO). *Ann Hematol*. 2017;96(11):1775–92.
180. Karki S, Land G, Aitchison S, Kennon J, Johnson PDR, Ballard SA, et al. Long-Term Carriage of Vancomycin-Resistant Enterococci in Patients Discharged from Hospitals: a 12-Year Retrospective. *J Clin Microbiol*. 2013;51(10):3374–9.
181. Bossaer JB, Hall PD, Garrett-Mayer E. Incidence of vancomycin-resistant enterococci (VRE) infection in high-risk febrile neutropenic patients colonized with VRE. *Support Care Cancer*. 2011;19(2):231–7.
182. McEvoy SP, Plant AJ, Pearman JW, Christiansen KJ. Risk factors for the acquisition of vancomycin-resistant enterococci during a single-strain outbreak at a major Australian teaching hospital. *J Hosp Infect*. 2006;62(2):256–8.
183. Ostrowsky BE, Venkataraman L, D'Agata EMC, Gold HS, DeGirolami PC, Samore MH. Vancomycin-resistant enterococci in intensive care units: High frequency of stool carriage during a non-outbreak period. *Arch Intern Med*. 1999;159(13):1467–72.
184. Alevizakos M, Gaitanidis A, Nasioudis D, Tori K, Flokas ME, Mylonakis E. Colonization with vancomycin-resistant enterococci and risk for bloodstream infection among patients with malignancy: A

- systematic review and meta-analysis. *Open Forum Infect Dis.* 2017;4(1):ofw246.
185. Kee SY, Park CW, Lee JE, Kwon YJ, Pyo HJ, Kim WJ, et al. Healthcare-associated risk factors of vancomycin-resistant enterococci colonization among outpatients undergoing hemodialysis. *Jpn J Infect Dis.* 2012;65(1):57–60.
  186. Souli M, Sakka V, Galani I, Antoniadou A, Galani L, Siafakas N, et al. Colonisation with vancomycin- and linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in a university hospital: molecular epidemiology and risk factor analysis. *Int J Antimicrob Agents.* 2009 Feb 1;33(2):137–42.
  187. Kritsotakis EI, Christidou A, Roubelaki M, Tselentis Y, Gikas A. The dynamic relationship between antibiotic use and the incidence of vancomycin-resistant *Enterococcus*: Time-series modelling of 7-year surveillance data in a tertiary-care hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(8):747–54.
  188. Dancer SJ. The problem with cephalosporins. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(4):463–78.
  189. Flokas ME, Karageorgos SA, Detsis M, Alevizakos M, Mylonakis E. Vancomycin-resistant enterococci colonisation, risk factors and risk for infection among hospitalised paediatric patients: a systematic review and meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;49(5):565–72.
  190. Rice LB, Hutton-Thomas R, Lakticova V, Helfand MS, Donskey CJ.  $\beta$ -Lactam antibiotics and gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci. *J Infect Dis.* 2004;189(6):1113–8.
  191. McKinnell JA, Kunz DF, Moser SA, Vangala S, Tseng CH, Shapiro M, et al. Patient-level analysis of incident vancomycin-resistant enterococci colonization and antibiotic days of therapy. *Epidemiol Infect.* 2016;144(8):1748–55.
  192. McKinnell JA, Kunz DF, Chamot E, Patel M, Shirley RM, Moser SA, et al. Association between Vancomycin-Resistant Enterococci Bacteremia and Ceftriaxone Usage. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2012;33(7):718–24.
  193. King ST, Barber KE, Parham JJ, Stover KR. Shifts in antimicrobial consumption and infection rates before and during a piperacillin/tazobactam shortage. *J Glob Antimicrob Resist.* 2017;11(12):111–3.
  194. Bradley SJ, Wilson ALT, Allen MC, Sher HA, Goldstone AH, Scott GM. The control of hyperendemic glycopeptide-resistant *Enterococcus* spp. on a haematology unit by changing antibiotic usage. *J Antimicrob Chemother.* 1999;43(2):261–6.
  195. Smith DW. Decreased antimicrobial resistance following changes in antibiotic use. *Surg Infect (Larchmt).* 2000;1(1):73–8.
  196. Boyle JF, Soumakis SA, Rendo A, Herrington JA, Gianarkis DG, Thurberg BE, et al. Epidemiologic analysis and genotypic characterization of a nosocomial outbreak of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol.* 1993;31(5):1280–5.
  197. Riley LW. Risk factors associated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection or colonization in 145 matched case patients and control patients. *Clin Infect Dis.* 1996;23(4):767–72.
  198. Dahms RA, Johnson EM, Statz CL, Lee JT, Dunn DL, Beilman GJ. Third-generation cephalosporins and vancomycin as risk factors for postoperative vancomycin-resistant enterococcus infection. *Arch Surg.* 1998;133(12):1343–6.
  199. Fridkin SK, Edwards JR, Courval JM, Hill H, Tenover FC, Lawton R, et al. The effect of vancomycin and third-generation cephalosporins on prevalence of vancomycin-resistant enterococci in 126 U.S. adult



- intensive care units. *Ann Intern Med.* 2001;135(3):175–83.
200. Lautenbach E, LaRosa LA, Marr AM, Nachamkin I, Bilker WB, Fishman NO. Changes in the prevalence of vancomycin-resistant enterococci in response to antimicrobial formulary interventions: Impact of progressive restrictions on use of vancomycin and third-generation cephalosporins. *Clin Infect Dis.* 2003;36(4):440–6.
  201. Quale J, Landmah D, Saurina G, Atwood E, DiTore V, Patel K. Manipulation of a hospital antimicrobial formulary to control an outbreak of vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis.* 1996;23(5):1020–5.
  202. Montecalvo MA, Jarvis WR, Uman J, Shay DK, Petrullo C, Rodney K, et al. Infection-control measures reduce transmission of vancomycin-resistant Enterococci in an endemic setting. *Ann Intern Med.* 1999;131(4):269–72.
  203. Bhalodi AA, Van Engelen TSR, Virk HS, Wiersinga WJ. Impact of antimicrobial therapy on the gut microbiome. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(Suppl 1):i6–15.
  204. Van Boeckel TP, Gandra S, Ashok A, Caudron Q, Grenfell BT, Levin SA, et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: An analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(8):742–50.
  205. Wiström J, Gentry LO, Palmgren AC, Price M, Nord CE, Ljungh Å, et al. Ecological effects of short-term ciprofloxacin treatment of travellers' diarrhoea. *J Antimicrob Chemother.* 1992;30(5):693–706.
  206. Borzio M, Salerno F, Saudelli M, Galvagno D, Piantoni L, Fragiaco L. Efficacy of oral ciprofloxacin as selective intestinal decontaminant in cirrhosis - PubMed. *Ital J Gastroenterol Hepatol.* 1997;29(3):262–6.
  207. de Lastours V, Fantin B. Impact of fluoroquinolones on human microbiota. *J des Anti-Infectieux.* 2015;10(7):1241–55.
  208. Al-Nassir WN, Sethi AK, Li Y, Pultz MJ, Riggs MM, Donskey CJ. Both oral metronidazole and oral vancomycin promote persistent overgrowth of vancomycin-resistant enterococci during treatment of *Clostridium difficile*-associated disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(7):2403–6.
  209. Stevens VW, Khader K, Echevarria K, Nelson RE, Zhang Y, Jones M, et al. Use of oral vancomycin for clostridioides difficile infection and the risk of vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis.* 2020;71(3):645–51.
  210. 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.
  211. Parker EPK, Praharaj I, John J, Kaliappan SP, Kampmann B, Kang G, et al. Changes in the intestinal microbiota following the administration of azithromycin in a randomised placebo-controlled trial among infants in south India. *Sci Rep.* 2017;7(1):9168.
  212. Korpela K, Salonen A, Virta LJ, Kekkonen RA, Forslund K, Bork P, et al. Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children. *Nat Commun.* 2016;7:10410.
  213. de Bruin MA, Riley LW. Does vancomycin prescribing intervention affect vancomycin-resistant enterococcus infection and colonization in hospitals? A systematic review. *BMC Infect Dis.* 2007;7:24.
  214. Remschmidt C, Behnke M, Kola A, Peña Diaz LA, Rohde AM, Gastmeier P, et al. The effect of



- antibiotic use on prevalence of nosocomial vancomycin-resistant enterococci- an ecologic study. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017;6:95.
215. Goossens H. Antibiotic consumption and link to resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2009 Apr 1;15(Suppl 3):12–5.
216. Loeffler JM, Garbino J, Lew D, Harbarth S, Rohner P. Antibiotic consumption, bacterial resistance and their correlation in a swiss university hospital and its adult intensive care units. *Scand J Infect Dis*. 2003;35(11–12):843–50.
217. Vukajlović I, Bogdanović M. Promet i potrošnja gotovih lekova za humanu upotrebu u Republici Srbiji u 2018. godini. Beograd; 2019.
218. Radonjić V. Promet i potrošnja gotovih lekova za humanu upotrebu u Republici Srbiji u 2006. godini. Beograd; 2007.
219. Giefing-Kröll C, Berger P, Lepperdinger G, Grubeck-Loebenstien B. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. *Aging Cell*. 2015 Jun 1;14(3):309–21.
220. Gontjes KJ, Gibson KE, Lansing BJ, Mody L, Cassone M. Assessment of race and sex as risk factors for colonization with multidrug-resistant organisms in six nursing homes. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2020;41(10):1222–4.
221. Yang KS, Fong YT, Lee HY, Kurup A, Koh TH, Koh D, et al. Predictors of vancomycin-resistant enterococcus (VRE) carriage in the first major VRE outbreak in Singapore. *Ann Acad Med Singapore*. 2007;36(6):379–83.
222. Esme M, Topeli A, Yavuz BB, Akova M. Infections in the Elderly Critically-Ill Patients. *Front Med*. 2019;6:118.
223. McGregor JC, Kim PW, Perencevich EN, Bradham DD, Furuno JP, Kaye KS, et al. Utility of the Chronic Disease Score and Charlson Comorbidity Index as comorbidity measures for use in epidemiologic studies of antibiotic-resistant organisms. *Am J Epidemiol*. 2005;161(5):483–93.
224. Chen PY, Chuang YC, Wang JT, Sheng WH, Chen YC, Chang SC. Predictors for vancomycin resistant *Enterococcus faecium* transforming from colonization to infection: A case control study. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8(1):196.
225. Kim YJ, Kim S II, Kim YR, Lee JY, Park YJ, Kang MW. Risk factors for vancomycin-resistant enterococci infection and mortality in colonized patients on intensive care unit admission. *Am J Infect Control*. 2012;40(10):1018–9.
226. Papadimitriou-Olivgeris M, Drougka E, Fligou F, Kolonitsiou F, Liakopoulos A, Dodou V, et al. Risk factors for enterococcal infection and colonization by vancomycin-resistant enterococci in critically ill patients. *Infection*. 2014;42(6).
227. Zhou MJ, Li J, Salmasian H, Zachariah P, Yang YX, Freedberg DE. The local hospital milieu and healthcare-associated vancomycin-resistant enterococcus acquisition. *J Hosp Infect*. 2019;101(1):69–75.
228. Willems RPJ, Van Dijk K, Ket JCF, Vandenbroucke-Grauls CMJE. Evaluation of the Association between Gastric Acid Suppression and Risk of Intestinal Colonization with Multidrug-Resistant Microorganisms: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Intern Med*. 2020;180(4):561–71.
229. Doron S, Hibberd PL, Goldin B, Thorpe C, McDermott L, Snyderman DR. Effect of *Lactobacillus*

- rhamnosus GG administration on vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization in adults with comorbidities. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(8):4593–9.
230. Plupjeen S ngapong, Chawjiraphan W, Charoensiddhi S, Nitisinprasert S, Nakphaichit M. *Lactococcus lactis* KA-FF 1-4 reduces vancomycin-resistant enterococci and impacts the human gut microbiome. *3 Biotech.* 2020;10(7):295.
231. Magee HR. Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci: A randomised controlled trial. *Med J Aust.* 2007;187(5):320.
232. Manley KJ, Fraenkel MB, Mayall BC, Power DA. Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci: A randomised controlled trial. *Med J Aust.* 2007;186(9):454–7.
233. Adebola O. Ajao, Anthony D. Harris, Mary-Claire Roghmann, J. Kristie Johnson, Min Zhan JCM and JPF. Systematic Review of Measurement and Adjustment for Colonization Pressure in Studies of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Vancomycin-Resistant Enterococci, and *Clostridium difficile* Acquisition. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2012;32(5):481–9.
234. Roghmann MC, McCarter RJ, Brewrink J, Cross AS, Glenn Morris J. *Clostridium difficile* infection is a risk factor for bacteremia due to vancomycin-resistant enterococci (VRE) in VRE-colonized patients with acute leukemia. *Clin Infect Dis.* 1997;25(5):1056–9.
235. Poduval RD, Kamath RP, Corpuz M, Norkus EP, Pitchumoni CS. *Clostridium difficile* and vancomycin-resistant *Enterococcus*: The new nosocomial alliance. *Am J Gastroenterol.* 2000;95(12):3513–5.
236. Kara A, Devrim I, Bayram N, Katipoğlu N, Kiran E, Oruç Y, et al. Risk of vancomycin-resistant enterococci bloodstream infection among patients colonized with vancomycin-resistant enterococci. *Brazilian J Infect Dis.* 2015;19(1):58–61.
237. Rouse BT, Horohov DW. Immunosuppression in viral infections. *Rev Infect Dis.* 1986;8(6):850–73.
238. Wiedermann CJ. Hypoalbuminemia as Surrogate and Culprit of Infections. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9):4495.
239. Habip G, Funda Ş, Arzu K, Taner Y, Deniz A, Demet A, et al. Vancomycin-resistant enterococci colonization in patients with hematological malignancies: Screening and its cost-effectiveness. *Afr Health Sci.* 2014;14(4):899–905.
240. Garsin DA, Lorenz MC. *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* in the gut: Synergy in commensalism? *Gut Microbes.* 2013;4(5):409–15.
241. Sam QH, Chang MW, Chai LYA. The fungal mycobiome and its interaction with gut bacteria in the host. *Int J Mol Sci.* 2017;18(2):330.
242. Deshpande LM, Fritsche TR, Moet GJ, Biedenbach DJ, Jones RN. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;58(2):163–70.
243. Kao PHN, Kline KA. Dr. Jekyll and Mr. Hide: How *Enterococcus faecalis* Subverts the Host Immune Response to Cause Infection. *J Mol Biol.* 2019;431(16):2932–45.
244. Willems RJL, Bonten MJM. Glycopeptide-resistant enterococci: Deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Curr Opin Infect Dis.* 2007;20(4):384–90.

245. Leavis HL, Bonten MJM, Willems RJL. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes : global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol*. 2006;(9):454–60.
246. Willems RJL, Top J, Santen M Van, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, et al. Global Spread of Vancomycin- resistant *Enterococcus faecium* from Distinct Nosocomial Genetic Complex. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(6):821–8.
247. Top J, Banga NMI, Hayes R, Willems RJ, Bonten MJM, Hayden MK. Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis and pulsed-field gel electrophoresis in a setting of polyclonal endemicity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(4):363–9.
248. Leavis H, Top J, Shankar N, Borgen K, Bonten M, Embden J Van, et al. A Novel Putative Enterococcal Pathogenicity Island Linked to the *esp* Virulence Gene of *Enterococcus faecium* and Associated with Epidemicity. *J Bacteriol*. 2004;186(3):672–82.
249. Schaik W Van, Willems RJL. Genome-based insights into the evolution of enterococci. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16:527–32.
250. Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill*. 2008;13(47):19046.
251. Franyó D, Kocsi B, Lesinszki V, Pászti J, Kozák A, Bukta EE, et al. Characterization of clinical vancomycin-resistant enterococcus *faecium* isolated in Eastern Hungary. *Microb Drug Resist*. 2018;24(10):1559–67.
252. Oh S, Kwan, Ko S, Song J-H, Lee MY, Park S, et al. High Rate of Resistance to Quinupristin-Dalfopristin in *Enterococcus faecium* Clinical Isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(12):5176–8.
253. Cattoir V, Giard JC. Antibiotic resistance in *Enterococcus faecium* clinical isolates. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12(2):239–48.
254. Savin M, Bierbaum G, Hammerl JA, Heinemann C, Parcina M, Sib E, et al. Antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial residues in wastewater and process water from German pig slaughterhouses and their receiving municipal wastewater treatment plants. *Sci Total Environ*. 2020;727:138788.
255. Arshadi M, Mahmoudi M, Motahar MS, Soltani S, Pourmand MR. Virulence determinants and antimicrobial resistance patterns of vancomycin-resistant enterococcus *faecium* isolated from different sources in southwest Iran. *Iran J Public Health*. 2018;47(2):264–72.
256. Sinel C, Cacaci M, Meignen P, Guérin F, Davies BW, Sanguinetti M, et al. Subinhibitory concentrations of ciprofloxacin enhance antimicrobial resistance and pathogenicity of enterococcus *faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(5):e02763-16.
257. Rosvoll TCS, Lindstad BL, Lunde TM, Hegstad K, Aasnæs B, Hammerum AM, et al. Increased high-level gentamicin resistance in invasive *Enterococcus faecium* is associated with *aac(6')Ie-aph(2'')Ia*-encoding transferable megaplasms hosted by major hospital-adapted lineages. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;66(2):166–76.
258. Donabedian SM, Perri MB, Vager D, Hershberger E, Malani P, Simjee S, et al. Quinupristin-Dalfopristin Resistance in *Enterococcus faecium* Isolates from Humans , Farm Animals, and Grocery Store Meat in the United States. *J Clin Microbiol*. 2006;44(9):3361–5.

259. Kessel J, Bender J, Werner G, Griskaitis M, Herrmann E, Lehn A, et al. Risk factors and outcomes associated with the carriage of tigecycline- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Infect*. 2021;82(2):227–34.
260. Bender JK, Cattoir V, Hegstad K, Sadowy E, Coque TM, Westh H, et al. Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: Towards a common nomenclature. *Drug Resist Updat*. 2018;40:25–39.
261. World Health Organization. Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance. Copenhagen, Denmark; 2019.
262. Mutters NT, Mersch-Sundermann V, Mutters R, Brandt C, Schneider-Brachert W, Frank U. Control of the spread of vancomycin-resistant enterococci in hospitals: Epidemiology and clinical relevance. *Dtsch Arztebl Int*. 2013;110(43):725–32.
263. Ryu S, Cowling BJ, Wu P, Olesen S, Fraser C, Sun DS, et al. Case-based surveillance of antimicrobial resistance with full susceptibility profiles. *JAC-Antimicrobial Resist*. 2019;1(3):dlz070.
264. Lund B, Billstro H. Cross-transmission of clinical *Enterococcus faecium* in relation to *esp* and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol*. 2008;105(6):2115–22.
265. Rice LB, Carias L, Rudin S, Vael C, Goossens H, Konstabel C, et al. A potential virulence gene, *hyleFm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J Infect Dis*. 2003;187(3):508–12.
266. Marchi AP, Perdigão Neto LV, Martins RCR, Rizek CF, Camargo CH ML et al. Vancomycin-resistant enterococci isolates colonizing and infecting haematology patients: clonality and virulence and resistance profile. *J Hosp Infect*. 2018;99(3):346–55.
267. Hällgren A, Claesson C, Saeedi B, Monstein HJ, Hanberger H, Nilsson LE. Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. *Int J Med Microbiol*. 2009;299(5):323–32.
268. Billström H, Top J, Edlund C, Lund B. Frequent occurrence of multidrug-resistant CC17 *Enterococcus faecium* among clinical isolates in Sweden. *J Appl Microbiol*. 2010;108(5):1810–6.
269. Franz CMAP, Muscholl-silberhorn AB, Yousif NMK, Vancanneyt M, Swings J, Holzappel WH. Incidence of Virulence Factors and Antibiotic Resistance among Enterococci Isolated from Food. *Appl Env Microbiol*. 2001;67(9):4385–9.
270. Dupre I, Zanetti S, Schito AM, Fadda G, Sechi LA, Cuore S. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *JournalofMedicalMicrobiology*. 2003;(52):491–8.
271. Hancock LE, Perego M. The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J Bacteriol*. 2004 Sep;186(17):5629–39.
272. Kristich CJ, Li YH, Cvitkovitch DG, Dunny GM. *Esp*-Independent Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*. 2004 Jan;186(1):154–63.
273. Raad II, Hanna HA, Boktour M, Chaiban G, Hachem RY, Dvorak T, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: Catheter colonization, *esp* gene, and decreased susceptibility to antibiotics in biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(12):5046–50.

274. Di Rosa R, Creti R, Venditti M, D'Amelio R, Arciola C, Montanaro L, et al. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006 Mar;256(1):145–50.
275. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*. 2004;72(10):6032–9.
276. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. The N-terminal domain of enterococcal surface protein, Esp, is sufficient for Esp-mediated biofilm enhancement in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*. 2005;187(17):6213–22.
277. Wamel WJB Van, Hendrickx APA, Bonten MJM, Top J, Posthuma G, Willems RJL. Growth Condition-Dependent Esp Expression by *Enterococcus faecium* Affects Initial Adherence and Biofilm Formation □. 2007;75(2):924–31.
278. Billström H, Lund B, Sullivan Å, Erik C. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32(2005):374–7.
279. Freitas AR, Tedim AP, Novais C, Coque TM, Peixe L. Distribution of putative virulence markers in *Enterococcus faecium*: towards a safety profile review. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(2):306–19.
280. Baquero F. From pieces to patterns : evolutionary engineering in bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(6):510–8.
281. Willems RJL, Homan W, Top J, Santen-verheuvél M Van, Tribe D, Manziros X, et al. Variant esp gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet*. 2001;357(9259):853–5.
282. Popovic N, Dinic M, Tolinački M, Mihajlović S, Terzić-Vidojević A, Bojić S, et al. New insight into biofilm formation ability, the presence of virulence genes and probiotic potential of *Enterococcus* sp. dairy isolates. *Front Microbiol*. 2018;9:78.
283. Veljović K, Popović N, Vidojević AT, Tolinački M, Mihajlović S, Jovčić B, et al. Environmental waters as a source of antibiotic-resistant *Enterococcus* species in Belgrade, Serbia. *Environ Monit Assess*. 2015;187(9):599.
284. Hanna Billström. *Molecular Epidemiology of Clinical Enterococcus faecium*. Karolinska Institutet Stockholm; 2008.
285. Willems RJL, Top J, van Schaik W, Leavis H, Bonten M, Sifn J, et al. Restricted gene flow among hospital subpopulations of *Enterococcus faecium*. *MBio*. 2012;3(4):e00151-12.
286. Werner G, Klare I, Witte W. The current MLVA typing scheme for *Enterococcus faecium* is less discriminatory than MLST and PFGE for epidemic-virulent, hospital-adapted clonal types. *BMC Microbiol*. 2007;7:28.
287. Helldal L, Karami N, Welinder-Olsson C, Moore ERB, Åhren C. Evaluation of MLVA for epidemiological typing and outbreak detection of ESBL-producing *Escherichia coli* in Sweden. *BMC Microbiol*. 2017;17(1):8.
288. Bonora MG, Ligozzi M, De Fatima M, Bragagnolo L, Goglio A, Guazzotti GC, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates causing hospital outbreaks in northern Italy belong to the multilocus sequence typing C1 lineage. *Microb Drug Resist*. 2004;10(2):114–23.

289. Klare I, Konstabel C, Mueller-Bertling S, Werner G, Strommenger B, Kettlitz C, et al. Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24(12):815–25.
290. Ko KS, Baek JY, Lee JY, Oh WS, Peck KR, Lee NY, et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Korea. *J Clin Microbiol*. 2005;43(5):2303–6.
291. Top J, Willems R, Van Der Velden S, Asbroek M, Bonten M. Emergence of clonal complex 17 *Enterococcus faecium* in the Netherlands. *J Clin Microbiol*. 2008;46(1):214–9.
292. Borgmann S, Schulte B, Wolz C, Gruber H, Werner G, Goerke C, et al. Discrimination between epidemic and non-epidemic glycopeptide-resistant *E. faecium* in a post-outbreak situation. *J Hosp Infect*. 2007;67(1):49–55.
293. Bertrand S, De Lamine De Bex G, Wildemauwe C, Lunguya O, Phoba MF, Ley B, et al. Multi locus variable-number tandem repeat (MLVA) typing tools improved the surveillance of *Salmonella enteritidis*: A 6 years retrospective study. *PLoS One*. 2015;10(2):e0117950.
294. Voigt AM, Zacharias N, Timm C, Wasser F, Sib E, Skutlarek D, et al. Association between antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in anthropogenic wastewater – An evaluation of clinical influences. *Chemosphere*. 2020;241:125032.
295. Cheah ALY, Cheng AC, Spelman D, Nation RL, Kong DCM, McBryde ES. Mathematical modelling of vancomycin-resistant enterococci transmission during passive surveillance and active surveillance with contact isolation highlights the need to identify and address the source of acquisition. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):511.
296. Poutanen SM, Simor AE. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *CMAJ*. 2004;171(1):51–8.
297. Deplano A, Denis O, Nonhoff C, Rost F, Byl B, Jacobs F, et al. Outbreak of hospital-adapted clonal complex-17 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain in a haematology unit: Role of rapid typing for early control. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(4):849–54.



## LISTA SKRAĆENICA

AMP	-	ampicilin
AS	-	agregaciona supstancija
<i>asaI</i>	-	gen koji kodira agregacionu supstancu
AST	-	određivanje antimikrobne osetljivosti
ATP	-	adenozin-trifosfat, eng. Adenosine Triphosphate
BE(A)V	-	žuč eskulina (azid) agar sa dodatkom vankomicina
bp	-	bazni par(ovi)
CA	-	Columbia agar
CAESAR	-	Nadzor nad antimikrobnom rezistencijom za centralnu Aziju i Evropu, eng. Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance
Cas	-	protein (nukleaza); geni koji kodiraju ovu nukleazu se nalaze blizu CRISPR ponovaka
CC	-	klonalni kompleks
CC17	-	klonalni kompleks 17, ranije MLST-C1 genogrupa
CCI	-	Čarlsonov indeks komorbiditeta, eng. Charlson Comorbidity Index
CDS	-	Skor za hronične bolesti, eng. Chronic Disease Score
CFU	-	jedinica formiranja bakterijskih kolonija po uzorku, eng. Colony Forming Unit
CIP	-	ciprofloksacin
<i>cpd</i>	-	gen koji kodira seks feromon(e)
CRISPR	-	grupisani kratki palindromski ponovci na jednakim rastojanjima (eng. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)
CVB	-	cerebrovaskularna bolest
CVK	-	centralni venski kateter
D-Ala	-	D-alanin
D-Ala-D-Lak	-	D-alanin-D-laktat
D-Ala-D-Ser	-	D-alanin-D-serin
DDD/1000/d	-	broj definisanih dnevnih doza (DDD) na 1000 stanovnika po danu
<i>ddl<sub>E. faecalis</sub></i>	-	D-alanin-D-alanin ligaza gen specifičan za <i>E. faecalis</i>
<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	-	D-alanin-D-alanin ligaza gen specifičan za <i>E. faecium</i>
DLV	-	moguće povezani izolati; dalji srodnici, eng. Double Locus Variants
DM	-	<i>diabetes mellitus</i>
DNK	-	dezoksiribonuleinska kiselina
ECDC	-	Evropski centar za kontrolu i prevenciju bolesti, eng. European Centre for Disease Control and Prevention
<i>efaA</i>	-	gen koji kodira adhezin ćelijskog zida, EfaA
EfaA	-	adhezin ćelijskog zida
<i>esp</i>	-	gen koji kodira enterokokni površinski protein, Esp
Esp	-	površinski enterokokni protein, eng. Enterococcal Surface Protein
EU	-	Evropska Unija
EUCAST	-	Evropski komitet za testiranje antimikrobne osetljivosti, eng. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<i>gelE</i>	-	gen koji kodira želatinazu
GEN-HLS	-	rezistencija na visok nivo gentamicina

HICPAC	-	Stručna komisija za kontrolu i prevenciju zaraznih bolesti u Atlanti, eng. Healthcare Infection Control Practice Advisory Committee
HLAR	-	rezistencija na visoke doze aminoglikozida, eng. High-Level Aminoglycosides Resistance
HOBP	-	hronična opstruktivna bolest pluća
<i>hyl</i>	-	gen koji kodira hijaluronidazu
ICE	-	Integrativni konjugativni element, eng. Integrative Conjugative Element
ID	-	identifikacija
IMP	-	imipenem
IPP	-	inhibitori protonske pumpe
JIL	-	jedinica intenzivnog lečenja
KA	-	krvni agar
KBC	-	Kliničko-bolnički centar
KSC	-	Klinički Centar Srbije
LEVO	-	levofloksacin
LGG	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
LLAR	-	rezistencija na niske doze aminoglikozida, eng. Low-Level Aminoglycosides Resistance
MDR	-	višestruka otpornost na antimikrobne agense; rezistencija na više grupa antimikrobnih lekova, eng. Multi Drug Resistant
MIK	-	minimalna inhibitorna koncentracija
MKB-10	-	Međunarodna klasifikacija bolesti, revizija 10
MLST	-	tipizacija sekvenciranjem više lokusa, eng. Multilocus Sequence Typing
MLVA	-	metoda detekcije broja tandem ponovaka na multiplim lokusima u genomu ispitivanog izolata, eng. Multiple-locus Variable-number tandem repeat analysis
MRSA	-	meticilin-rezistentni <i>Staphylococcus aureus</i>
MST	-	stablo minimalnog raspona, eng. Minimum Spinning Tree
MT	-	MLVA tip
NAG	-	N-acetilglikozoamin
NAM	-	N-acetil-muramil
NPV	-	negativna prediktivna vrednost
OD	-	apsorbanca
ODc	-	cut off vrednost OD za mikrotitracionu ploču
<i>p</i>	-	statistička značajnost
PAI	-	ostrvo patogenosti, eng. Pathogenicity Island
PBP	-	penicilin-vezujući protein, eng. Penicillin-Binding Protein
PBS	-	fosfatni pufer, eng. Phosphate-Buffer Saline
PCR	-	reakcija lančanog umnožavanja, eng. Polymerase Chain Reaction
PFGE	-	elektroforeza u pulsnom polju
PPV	-	pozitivna prediktivna vrednost
PTS	-	fosfostreansferaza sistem, eng. Phosphotransferase System
Q-D	-	kvinupristin-dalfopristin
R protein	-	regulatorni protein
RNK	-	Ribonukleinska kiselina
RPP	-	ribosomalni zaštitni proteini, eng. Ribosomal Protection Proteins
rRNK	-	ribosomalna RNK

S protein	-	sensor kinaza
SAD	-	Sjedinjene Američke Države
SE	-	standarna greška
SHEA	-	Udruženje za epidemiologiju zdravstvene zaštite, eng. Society of Healthcare Epidemiology of America
SLV	-	blisko povezani izolati, najbliži srodnici, eng. Single Locus Variants
ST	-	sekvencni tip, eng. Sequence Type
STR-HLS	-	rezistencija na visok novo streptomocin
SZO	-	Svetska zdravstvena organizacija
TD	-	Touch Down PCR
TEI	-	teikoplanin
TSB	-	Trypton soja bujon
TSB-Glu	-	Trypton soja bujon sa dodatkom 1% glukoze
TVRE <sub>fm</sub>	-	vankomicin rezistentni <i>Enterococcus faecium</i> rezistentan na tigecliklin
UDP-NAG	-	uracil-di-fosfat-N-acetilglukozamin
UDP-NAM	-	uracil-di-fosfat-N-acetil-muramil
UPGMA	-	metoda grupiranja neponderisanih parova sa aritmetičkim prosekom, eng. Unweighted-pair group with arithmetic averages
vanA	-	vanA tip rezistencije na vankomicin
vanB	-	vanB tip rezistencije na vankomicin
vanC (C1, C2/3)	-	vanC tip rezistencije na vankomicin
vat(D) i vat(E)	-	geni rezistencije na streptogramin A
vgb(A) i ermB1	-	geni rezistencije na streptogramin B
VNTR	-	Varijabilni broj tandem ponovaka, eng. Variable Number of Tandem Repeats
VRE	-	vankomicin-rezistentni enterokok
VRE <sub>fm</sub>	-	vankomicin rezistentni <i>Enterococcus faecium</i> , <i>E. faecium</i>
VRE <sub>fs</sub>	-	vankomicin-rezistentni <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecalis</i>
VRSA	-	vankomicin-rezistentni <i>Staphylococcus aureus</i>
WGS	-	sekvenciranje celog genoma, eng. Whole-genome sequencing
$\chi^2$	-	Hi kvadrat test

## PRILOG

### EPIDEMIOLOŠKI UPITNIK

Zdravstvena ustanova:

Kliničko odeljenje:

#### 1. DEMOGRAFSKI PODACI

Ime i prezime:

Datum rođenja:

Pol: muški [ ] ženski [ ]

Mesto boravka:

Matični broj:

Državljanstvo:

#### 2. PODACI O ZDRAVSTVENOM STANJU ISPITANIKA

Osnovna bolest –šifra bolesti prema MKB-10 klasifikaciji bolesti:

Komorbidity –šifra bolesti prema MKB-10 klasifikaciji bolesti:

#### 3. PODACI O BOLNIČKOM LEČENJU

Prijem	hitno [ ]	zakazan [ ]
Transfer iz druge ustanove	DA [ ]	NE [ ]
Datum prijema:		
Broj dana od prijema do uzorkovanja:		
Prethodno bolničko lečenje	DA [ ]	NE [ ]
Broj prethodnih bolničkih lečenja:		
Prethodni boravak u bolnici:		
▪ u poslednja 3 meseca	DA [ ]	NE [ ]
▪ pre 3- 6 meseci	DA [ ]	NE [ ]
▪ pre 6-12 meseci	DA [ ]	NE [ ]
▪ pre više od godinu dana	DA [ ]	NE [ ]
Hirurška intervencija u toku bolničkog lečenja	DA [ ]	NE [ ]
Hirurška intervencija u toku prethodna tri meseca	DA [ ]	NE [ ]

#### 4. PODACI O PRIMENI ANTIMIKROBNE TERAPIJE

Primena antimikrobne terapije u toku bolničkog lečenja	DA [ ]	NE [ ]
--	--------	--------

## EPIDEMIOLOŠKI UPITNIK

Broj antimikrobnih lekova:

Klasa antimikrobnog agensa:

Primena antimikrobne terapije  
u toku prethodnih šest meseci

DA[ ]

NE[ ]

### 5. DIJAGNOSTIČKO-TERAPIJSKE PROCEDURE

Onkološka terapija

- radioterapija
- hemoterapija

DA[ ]

NE[ ]

DA[ ]

NE[ ]

Kortikosteroidna terapija

DA[ ]

NE[ ]

Transfuzija

DA[ ]

NE[ ]

Urinarni kateter

DA[ ]

NE[ ]

Centralni venski kateter (CVK)

DA[ ]

NE[ ]

Hematološke procedure:

- aspiracija kostne srži,
- punkcija limfnog čvora,
- lumbalna/sternalna punkcija
- drugo \_\_\_\_\_

DA[ ]

NE[ ]

DA[ ]

NE[ ]

DA[ ]

NE[ ]

JIL procedure (bez CVK):

- nazogastrična sonda
- dren
- pleuralna punkcija
- mehanička ventilacija
- drugo \_\_\_\_\_

DA[ ]

NE[ ]

DA[ ]

NE[ ]

DA[ ]

NE[ ]

DA[ ]

NE[ ]

Endoskopske procedure:

- bronhoskopija
- cistoskopija
- gastroskopija
- kolonoskopija
- drugo \_\_\_\_\_

DA[ ]

NE[ ]

DA[ ]

NE[ ]

DA[ ]

NE[ ]

DA[ ]

NE[ ]

### 6. OSTALO

Terapija inhibitorima protonске pumpe

DA[ ]

NE[ ]

IPP

DA[ ]

NE[ ]

Probiotici

DA[ ]

NE[ ]

Infekcija *Clostridioides difficile*

DA[ ]

NE[ ]

Virusna infekcija

DA[ ]

NE[ ]

Neutropenija

DA[ ]

NE[ ]

Hipoalbuminemija

DA[ ]

NE[ ]

Antimikotici

DA[ ]

NE[ ]

KOMENTAR

## BIOGRAFIJA

Ana Janjušević je rođena 5. maja 1983. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju.

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2002/03. godine, a diplomirala 16. jula 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,26. U toku osnovnih studija bila je stipendista Ministarstva prosvete i sporta Republike Srbije 2004. godine, a u oktobru 2007. godine boravila je na Univerzitetnoj klinici Suez Canal University Hospital, Ismailia, Egypt u okviru profesionalne razmene studenata u organizaciji Međunarodnog udruženje studenata medicine IFMSA.

Pripravnički staž obavila je u Domu zdravlja „Stari grad“ u Beogradu, Klinici za kardiovaskularne bolesti Kliničkog centra Srbija i Gradskom zavodu za hitnu medicinsku pomoć. Stručni ispit za doktora medicine položila je 28. marta 2011. godine. U periodu od marta do septembra 2011. godine učestvovala je kao istraživač volonter u okviru DILS projekta „Očuvanje zdravlja i unapređenje kvaliteta života nepokretnih i polupokretnih stanovnika opštine Stari grad u Beogradu“.

U oktobru 2012. godine upisala je specijalizaciju iz Medicinske mikrobiologije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu koju je završila 20. aprila 2017. godine.

Školske 2013/14. godine na istom fakultetu upisala je doktorske studije u okviru studijskog programa Epidemiologija i uspešno položila sve ispite predviđene programom.

Ana Janjušević je od 19. septembra 2011. godine zaposlena u Institutu za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ u Službi za proizvodnju bakterijskih vakcina. Odlukom Naučnog veća Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“, 16. juna 2020. godine izabrana je u istraživačko zvanje istraživač saradnik. Tokom pandemije prouzrokovane virusom SARS-CoV-2 bila je angažovana u radu laboratorije Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ za COVID-19 dijagnostiku i na taj način dala doprinos u borbi protiv SARS-CoV-2 virusa.

U skladu sa svojim stručnim i naučnim interesovanjem, učestvovala je na više stručnih sastanaka i domaćih i inostranih programa kontinuirane medicinske edukacije. Učestvovala je kao predavač u programu kontinuirane medicinske edukacije organizovane od strane Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Nadzor nad antimikrobnom rezistencijom u Srbiji) i kao predavač na dva Kongresa mikrobiologa Srbije. Član je Srpskog lekarskog društva i Lekarske komore Srbije.

Do sada je objavila dva rada štampana *in extenso* u časopisima indeksiranim u JCR listi i četiri rada štampana u izvodima međunarodnih skupova.



## Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora **Ana Janjušević**

Broj indeksa: EP-06/13

### Izjavljujem

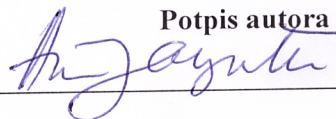
da je doktorska disertacija pod naslovom „**Kolonizacija vankomicin-rezistentnim *Enterococcus* spp. sojevima u bolničkoj sredini- genotipska i fenotipska karakterizacija sojeva i faktori rizika za kolonizaciju**“

rezultat sopstvenog istraživačkog rada,

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

U Beogradu,  
09.07.2021 godine .

Potpis autora



## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Ana Janjušević

Broj upisa: EP-06/13

Studijski program: Epidemiologija

Naslov rada: „Kolonizacija vankomicin-rezistentnim *Enterococcus* spp. sojevima u bolničkoj sredini- genotipska i fenotipska karakterizacija sojeva i faktori rizika za kolonizaciju“

Mentori: Prof. dr Ivana Ćirković

Prof.dr Ljiljana Marković Denić

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

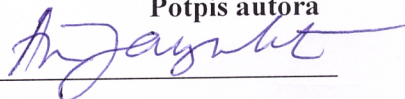
Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

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

U Beogradu,

09.07.2021. godine .

Potpis autora





## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom „Kolonizacija vankomicin-rezistentnim *Enterococcus* spp. sojevima u bolničkoj sredini- genotipska i fenotipska karakterizacija sojeva i faktori rizika za kolonizaciju“, koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

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

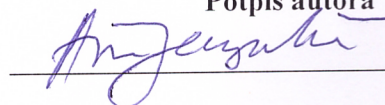
1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu,

09.07.2021. godine .

Potpis autora



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.