



FREQUENCY OF RESISTANCE TO PENICILLIN AND
ERYTHROMYCIN OF PNEUMOCOCCAL STRAINS THAT
CAUSED OTTIS MEDIA

UČESTALOST REZISTENCIJE NA PENICILIN I
ERITROMICIN SOJEVA PNEUMOKOKA
IZAZIVAČA ZAPALJENJA SREDNJEG UHA

Luka Jovanović¹, Katarina Isailović¹, Nataša Opavski^{1,2}

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Srbija

² Institut za mikrobiologiju i imunologiju

Correspondence: lukabgd01137@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: *Streptococcus pneumoniae* is an important human pathogen and the most common cause of acute otitis media (AOM), especially in children. It is also a common cause of community acquired pneumonia, sepsis and bacterial meningitis. Drug of choice in the treatment of these disease are beta lactam antibiotics, and the first alternative are macrolides. The increasing prevalence of resistance to penicillin and macrolides, among pneumococci, has considerably complicated the treatment.

Aim: The aim of this study was to determine susceptibility of pneumococcal isolates from pediatric AOM in Serbia to antibiotics.

Material and methods: Antimicrobial susceptibility testing of 61 pneumococcal AOM was performed, collected from December 2014 to December 2015, using disk diffusion method and E test. Macrolide resistance profile was determined by double disk diffusion test.

Results: In our study, 40 strains (65.6%) showed reduced sensitivity to penicillin and erythromycin. There were 9 (14.8%) high resistant isolates to penicillin, while 31 (50.8%) showed reduced susceptibility. The most frequent resistance phenotype was cMLS. Co-resistance to penicillin and macrolides was found in 14.8% strains.

Conclusion: Our results showed high resistance rate of *S. pneumoniae*, which causes AOM among children, to penicillin and macrolides. Further active surveillance of pneumococcal susceptibility to antibiotics is necessary, and use of these medications in empirical therapy should be limited.

Keywords:

Streptococcus pneumoniae,
otitis,
resistance

SAŽETAK

Uvod: *Streptococcus pneumoniae* je značajan humani patogen, najčešći izazivač akutnog zapaljenja uha (akutni otitis media, AOM), posebno kod dece, ali i vanbolničke pneumonije, sepse i meningitisa u svim uzrastima. Lekovi izbora u terapiji AOM su beta laktamski antibiotici, a u slučaju alergije makrolidi. Veliki problem u lečenju predstavlja porast rezistencije pneumokoka na ove antibiotike.

Cilj: Cilj ove studije bio je ispitavanje osetljivosti izolata pneumokoka, izazivača AOM kod dece, na antibiotike.

Materijal i metode: Ispitivana je osetljivost 61 soja pneumokoka izazivača AOM kod dece, metodom disk difuzije i E-testom. Uzorci su prikupljeni od decembra 2014. do decembra 2015. godine. Fenotipovi rezistencije na makrolide određeni su testom dvostruke disk difuzije.

Rezultati: Od svih ispitanih sojeva, njih 40 (65,6%) pokazalo je smanjenu osetljivost na penicilin i eritromicin. Visokorezistentnih izolata na penicilin bilo je 9 (14,8%), dok je 31 soj (50,8%) imao intermedijarnu osetljivost. Dominantan fenotip makrolidne rezistencije je bio cMLS. Udružena rezistencija na penicilin i eritromicin bila je prisutna kod 14,8% izolata.

Zaključak: Naši rezultati su pokazali da je stopa učestalosti rezistencije pneumokoka, izazivača AOM kod dece, na penicilin i makrolide visoka. Neophodno je aktivno praćenje osetljivosti pneumokoka na antibiotike, kao i ograničenje upotrebe ovih lekova u empirijskoj terapiji.

Ključne reči:

Streptococcus pneumoniae, otitis, rezistencija

Uvod

Streptococcus pneumoniae je alfa hemolitički, gram-pozitivni diplokok. Deo je normalne mikroflore gornjih respiratornih puteva, a kliconoštvo je posebno često kod dece. Jedan je od najznačajnijih humanih patogena. Bolesti koje izaziva se karakterišu visokom stopom morbiditeta i mortaliteta, kako u svetu, tako i kod nas (1). Vodeći je uzročnik bakterijskog meningitisa i sepse, kao i vanbolničkih pneumonija i dominantni je uzročnik blagog, ali vrlo čestog oboljenja među decom, akutnog zapaljenja srednjeg uha (akutni otitis media, AOM) (2).

Antibiotici prve linije u lečenju AOM su beta laktamski antibiotici (BLA) - derivati penicilina (amoksicilin ili njegove kombinacije sa klavulanskom kislinom) ili, eventualno, cefalosporini (3). U slučaju alergije na penicilinske preparate primenjuju se antibiotici iz grupe makrolida. Poseban problem za uspeh terapije predstavlja porast učestalosti rezistencije pneumokoka na penicilinske i makrolidne preparate (4).

Rezistencija *Streptococcus pneumoniae* na BLA nastaje mehanizmom izmene ciljnih mesta, koja se javlja kao posledica mutacije gena odgovornih za kodiranje proteina koji se vezuju za penicilin (PVP). Promene su postepene, pa je potrebno da dođe do akumulacije mutacija da bi pneumokok stekao visok nivo rezistencije. Rezistencija na BLA kod ove vrste može da nastane i kao rezultat horizontalnog prenošenja mutiranih gena za PVP sa viridans streptokoka (5).

S. pneumoniae rezistenciju na makrolide (eritromicin i derivate) najčešće razvija pomoću dva mehanizma: promenom ciljnih mesta na ribozomu i/ili aktivnim izbacivanjem antibiotika iz ćelije, tj. efluksom. Izmene ribozoma su posledica njegove metilacije i kodirane su erm

genom. Na ovaj način nastaje visoka rezistencija na one antibiotike koji dele isto vezno mesto na ribozomu: makrolide, linkozamide i streptogramine (MLS grupa antibiotika). Stoga se naziva i MLS rezistencija, a može da bude inducibilna (iMLS) i konstitutivna (cMLS). Drugi mehanizam rezistencije je posledica aktivnog izbacivanja antibiotika iz ćelije zbog prisustva efluks pumpe, koju kodira *mefA* gen. Ona je ograničena samo na makrolide, naziva se M-tip rezistencije i umerenog je nivoa (6).

U Srbiji je antibiotska terapija AOM najčešće empirijska, bez dokazivanja etiološkog uzročnika. Retko se uzima sadržaj srednjeg uha u cilju izolacije bakterija i izrade antibiograma. Stoga je cilj ovog istraživanja bio da se ispita osetljivost sojeva pneumokoka, izazivača akutnog otitisa, na penicilin i makrolide i utvrdi stepen rezistencije na ove antibiotike.

Materijal i metode

Istraživanje je obuhvatilo 61 soj *S. pneumoniae* izolovan iz sadržaja srednjeg uha pacijenata mlađih od 15 godina sa dijagnozom AOM, a sprovedeno je od decembra 2014. do decembra 2015. godine. Nakon izolacije u sedam kliničkih laboratorija, sojevi pneumokoka su poslani Referentnoj laboratoriji za streptokok na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Potvrdna identifikacija pneumokoka je izvršena na osnovu morfoloških, kulturalnih, biohemijskih i antigen-skih karakteristika: gram-pozitivnih diplokoka na preparatu, prisustva alfa hemolize na krvnom agaru, osetljivosti na optohin (BioRad, SAD), hidrolize žučnih soli i reakcije lateks aglutinacije sa grupno specifičnim antiserumom (Slidex PneumoKit, bioMerieux, Francuska). Prekonočna

bakterijska kultura u Brain Heart bujonu (Biolife, Italija) konzervirana je i čuvana na temperaturi od -80 °C do dalje obrade.

Osetljivost na penicilin je procenjena na osnovu disk difuzionog metoda antibiograma sa diskom oksacilina od 1 µg (BioRad, SAD), a E-testom (bioMerieux, Francuska) utvrđena je i vrednost minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) penicilina.

Fenotipovi rezistencije na makrolide su ispitani testom dvostruke disk difuzije (7). Aplikovani su diskovi eritromicina (15 µg) i klindamicina (2 µg) (BioRad, SAD) na udaljenosti od 12 do 16 mm, a rezultati su očitavani posle prekonoćne inkubacije. M-fenotip je definisan kao pojava smanjene osetljivosti na eritromicin (R < 21 mm), uz osetljivost na klindamicin (R ≥ 19 mm). Fenotip cMLS bio je prisutan u slučaju rezistencije na oba antibiotika, dok je iMLS fenotip karakterisalo odsustvo zone inhibicije rasta oko eritromicina i pojave zone inhibicije rasta u obliku slova D oko diska klindamicina, prema disku eritromicina. Za sojeve sa smanjenom osetljivošću na eritromicin vrednost MIK određena je E-testom.

Za ispitivanje osetljivosti na antibiotike korišćena je bakterijska suspenzija turbiditeta 0,5 McFarland (McF), koja je zasejavana na komercijalne podloge Mueller Hinton agara sa dodatkom 5% defibrilirane konjske krvi i sa 20 mg/L β-NAD (bioMerieux, Francuska), nakon čega su aplikovani diskovi antibiotika, odnosno E-test trake. Inokulirane podloge su inkubirane tokom 18+/-2 h, na temperaturi od 35 °C u atmosferi sa 5% ugljen-dioksida (CO2). Prečnici zona inhibicije rasta, MIK, očitavani su

i interpretirani prema preporukama Evropskog komiteta za testiranje antimikrobne osetljivosti (eng. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST*) iz 2015. godine (8). Za nemeningealne izolate korišćene su granične vrednosti penicilina. Kao kontrolni soj korišćen je *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

Podaci su obrađeni metodama deskriptivne statistike.

Rezultati

Od 61 ispitnog soja na penicilin je bilo osetljivo 21. Njihova vrednost MIK je bila manja od 0,06 mg/l. Smanjenu osetljivost na penicilin pokazalo je 40 sojeva (65,6%). Većina izolata (31) bila je intermedijarno osetljiva, sa vrednošću MIK u rasponu od 0,125 do 2 mg/l, dok je visokorezistentnih sojeva, sa MIK većim od 2 mg/l, bilo 9. Vrednosti MIK koja inhibira rast 50% izolata bila je 1 mg/l, dok je MIK koji inhibira rast 90% izolata iznosio 3 mg/l (**tabela 1**).

Rezistencija na eritromicin zabeležena je kod čak 40 izolata (65,6%). Nije bilo intermedijarno osetljivih, dok je 21 soj bio osetljiv. Vrednosti MIK eritromicina kod sojeva sa smanjenom osetljivošću bile su u rangu od 1,5 mg/l do ≥ 256 mg/l. Čak 33 soja bila su visokorezistentna, sa vrednošću MIK eritromicina većom ili jednakom 256 mg/l. Koncentracije eritromicina koje inhibiraju rast 50% i 90% izolata bile su vrlo visoke (256 mg/l I > 256 mg/l) (**tabela 1**).

Tabela 1. Učestalost rezistencije na penicilin i eritromicin i vrednosti MIK50 i MIK90 kod izolata *Streptococcus pneumoniae*

Antibiotik	Osetljivi (S)		Intermedijarno osetljivi (I)		Rezistentni (R)		ukupno	MIK ₅₀ (mg/l)	MIK ₉₀ (mg/l)
	N	%	N	%	N	%			
Penicilin	21	34,4	31	50,8	9	14,8	61 (100)	1	3
Eritromicin	21	34,4	/	/	40	65,6	61 (100)	256	>256

Testom dvostruke disk difuzije otkrivena su sva tri fenotipa makrolidne rezistencije: prevladavao je visoko-

rezistentni cMLS fenotip (90%), dok su iMLS i M fenotip bili znatno ređi (**tabela 2**).

Tabela 2. Profili rezistencije *S.pneumoniae* na eritromicin

	Rang MIK	MIK ₅₀ (mg/l)	MIK ₉₀ (mg/l)	Ukupno
Osetljivi	≤ 0,016-0,125	0,047	0,094	21
M-fenotip	4	4	4	1
iMLS fenotip	1,5- > 256	12	> 256	3
cMLS fenotip	3- > 256	256	> 256	36

Od 40 sojeva koji su pokazivali smanjenu osetljivost na penicilin, njih 36 (90%) istovremeno je bilo rezistentno na eritromicin, što znači da je od 61 ispitanog izolata 59% pokazivalo smanjenu osetljivost na oba antibiotika. Svih devet (14,8%) visokorezistentnih sojeva na penicilin pokazivalo je cMLS fenotip rezistencije na makrolide.

Diskusija

Analizom 61 soja bakterije *Streptococcus pneumoniae*, izolovanih od pedijatrijskih pacijenata sa kliničkim znacima AOM, utvrđena je visoka učestalost rezistencije na penicilin i eritromicin. Rezultati ove studije pokazuju da je stopa visoke rezistencije na penicilin (sojevi sa vrednošću MIK > 2 mg/l) u ispitivanoj kolekciji umerena (14,8%). Broj izolata sa smanjenom osetljivošću na penicilin (intermedijarno osetljivi), čije su vrednosti MIK u rasponu od 0,125 mg/l do 2mg/l, bio je, međutim, znatno veći i iznosio je 31 (50,8%). Iz ovoga se može zaključiti da, ukoliko se primeni interpretacija po EUCAST-u, čak 65,6% sojeva pneumokoka izazivača AOM dece kod nas ima smanjenu osetljivost na penicilin. Isti procenti se dobijaju i kada se rezultati interpretiraju prema američkom CLSI standardu (engl. Clinical Laboratory Standard Institute) iz 2015. godine za pneumokok i oralni penicilin V (9). Ukoliko se, međutim, preporuke CLSI, prema kojima se sojevima sa smanjenom osetljivošću na ovaj antibiotik smatraju samo oni čija je vrednost MIK \geq 4 mg/l, primene na parenteralno dati penicilin, broj takvih izolata je 9, dok se svi ostali (52, odnosno 85,2%) mogu smatrati osetljivim. U našoj zemlji se proteklih godina koristio ovaj standard, a preporuka je da se od 2016. godine u Srbiji pređe na standard po EUCAST-u. Očigledno je da se prilikom interpretacije rezultata uzimaju u obzir oblik i način aplikacije antibiotika, s obzirom na to da se pri oralnom i parenteralnom davanju postižu različite koncentracije leka u krvi. Samim tim, nisu ni iste granične vrednosti MIK za iste izolate već zavise od doze i načina davanja penicilina. Ovo je logično, ali može da pravi problem u interpretaciji rezultata i upoređivanju incidencije rezistencije pneumokoka na penicilin u različitim studijama iz različitih zemalja.

Kada analiziramo podatke o rezistenciji pneumokoka na penicilin iz zemalja u okruženju, uočavamo da je incidencija rezistencije invazivnih izolata pneumokoka u 2015. godini u Sloveniji iznosila 16,8% i u Hrvatskoj 31% u 2013. godini (10, 11). Studija o osetljivosti pneumokoka izazivača AOM u Bugarskoj iz 2014. godine prikazala je 28,1% rezistentnih izolata (12). U zemljama Mediterana, gde su stope rezistencije pneumokoka na antibiotike bile tradicionalno visoke, beleži se pad nakon uvođenja obavezne pneumokokne vakcine. Prema podacima iz 2013. godine, one sada iznose 27,6% u Španiji, 22,4% u Francuskoj, a 14,6% u Italiji. Standardno niske stope su registrovane u zemljama Skandinavije: Norveškoj (3,3%), Švedskoj (6,8%) i nešto veće u Finskoj (14,1%) (13).

Naša studija je pokazala da je rezistencija na eritromicin, što istovremeno znači i rezistenciju na ostale makrolidne antibiotike (azitromicin i klaritromicin), ve-

oma visoka i iznosi 65,6%. Nešto nižu incidenciju rezistencije prikazuju okolne zemlje, Bugarska (46,9%), Rumunija (58,3%) i Hrvatska (37%) (12, 14, 11). Do sada je već opisana pojava da rezistencija streptokoka na makrolide raste sa većom potrošnjom ovih antibiotika (15). Makrolidi, posebno azitromicin, u našoj zemlji su već godinama unazad često korišćeni kao empirijska terapija za lečenje infekcija respiratornog trakta, od kojih najčešće boluju deca. Zbog toga se visoke stope rezistencije pneumokoka na makrolide mogu objasniti i činjenicom da su u studiji korišćeni uzorci pedijatrijskih bolesnika (16).

Stopa udružene rezistencije na makrolide i penicilin (14,8%) svrstava nas u grupu zemalja sa umerenom stopom istovremene rezistencije na ova dva antibiotika. Slične stope udružene rezistencije zabeležene su i u Hrvatskoj (15,5%) i Španiji (16%). Najviše stope udružene rezistencije u Evropi zabeležene su na Kipru (26,7%), u Poljskoj (24,5%) i Rumuniji (21,4%) (13).

Preovlađujući fenotip rezistencije u uzorku koji je obuhvatila ova studija bio je konstitutivni MLS, koji se odlikuje visokom rezistencijom na sve antibiotike MLS grupe: makrolide, linkozamide i streptogramine. U svetu postoje velike varijacije u odnosu na preovlađujući fenotip rezistencije. Prema podacima iz literature, početkom dvihiljaditih MLS fenotip bio je dominantan u Španiji i većini evropskih zemalja, dok je M-fenotip bio znatno češći u Severnoj Americi, Engleskoj i Grčkoj. Skorašnji podaci iz Turske, Španije i Irana (17, 18, 19) pokazuju da je i u tim sredinama, kao i kod nas, najčešći fenotip cMLS. U Južnoj Americi i Saudijskoj Arabiji i dalje je najčešći fenotip M (20, 21).

Rezultati ovog ispitivanja pokazuju da su sojevi pneumokoka, izazivači zapaljenja srednjeg uha u dečijoj populaciji u Srbiji, vrlo rezistentni na eritromicin, dok je rezistencija na oralni oblik penicilina visoka, a na parenteralne umerena. Kako je učestalost rezistencije pneumokoka na antibiotike generalno visoka, sa tendencijom porasta, ima autora koji savetuju nešto drugačiji pristup lečenju AOM. Prema njihovim preporukama, u slučaju blagog oblika AOM sa mogućom virusnom etiologijom antibiotici se ne uvode odmah u terapiju već se prati stanje pacijenta u narednih 48–72h pa se, u zavisnosti od toka bolesti, odlučuje o uvođenju antibiotika u lečenje. Prednost ovog pristupa oni vide u izbegavanju potencijalno štetnih nuspojava leka i smanjenju rezistencije bakterija na antibiotike (22). Treba, ipak, imati u vidu da neblagovremena primena antibiotske terapije u slučaju bakterijskog AOM može da poveća rizik za nastanak komplikacija: rupturu bubne opne, mastoiditis, hronično zapaljenje srednjeg uha, bakteriemiju, pa čak i meningitis.

Ova studija je pokazala da je među izolovanim sojevima *Streptococcus pneumoniae*, najčešćeg izazivača akutnog zapaljenja srednjeg uha kod dece, visoka stopa učestalosti rezistencije na oralni penicilin i makrolidne antibiotike. Stoga je neophodno aktivno i kontinuirano pratiti osetljivost pneumokoka na antibiotike i ograničiti njihovu primenu u cilju smanjenja ili ograničenja rezistencije i, po potrebi, korigovati aktuelne vodiče za tera-

piju akutnog otitisa. Uvođenje pneumokokne vakcine bi takođe imalo pozitivan efekat ne samo na smanjenje invazivnih pneumokoknih bolesti već i na smanjenje rezistencije ove bakterijske vrste na antibiotike.

Literatura

1. Van Bambeke F, Reinert R, Appelbaum P, Tulkens P, Peetermans W. Multidrug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Infections. *Drugs*. 2007; 67(16):2355-82.
2. Palmu AAI, Herva E, Savolainen H, Karma P, Makela PH, Kilpi TM. Association of clinical signs and symptoms with bacterial findings in acute otitis media. *Clin Infect Dis*. 2004;38:234-242.
3. Lieberthal AS et al. "The Diagnosis and Management of Acute Otitis Media. *Pediatrics*. 2013; doi: 10.1542/peds.2012-3488.
4. Ramakrishnan K, Sparks R, Berryhill W. Diagnosis and Treatment of Otitis Media. *Am Fam Physician*. 2007; 1;76(11):1650-1658.
5. Hakenbeck R, Grebe T, Zähler D, Stock JB. beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol Microbiol*. 1999; 33(4):673-8.
6. Leclercq R, Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(9):2727-34.
7. Montanari MP, Mingoia M, Giovanetti E, Varaldo PE. Differentiation of resistance phenotypes among erythromycin-resistant *Pneumococci*. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(4):1311-5.
8. EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, January 2015.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
10. Fürst J, Čižman M, Mrak J et al. The influence of a sustained multifaceted approach to improve antibiotic prescribing in Slovenia during the past decade: findings and implications. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015; 13(2):279-89.
11. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2013.g.
12. Setchanova L, Kostyanov T, Alexandrova A, Mitov I, Nashev D, Kantardjiev T. Microbiological characterization of *Streptococcus pneumoniae* and non-typeable *Haemophilus influenzae* isolates as primary causes of acute otitis media in Bulgarian children before the introduction of conjugate vaccines. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2013; 12:6.
13. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, EARS, Annual report 2013.
14. Falup-Pecurariu O, Leibovitz E, Mercas A et al. Pneumococcal acute otitis media in infants and children in central Romania, 2009-2011: microbiological characteristics and potential coverage by pneumococcal conjugate vaccines. *Int J Infect Dis*. 2013; 17(9):e702-6.
15. Doern GV, Pfaller MA, Kugler K, et al. Prevalence of antimicrobial resistance among respiratory tract isolates of *Streptococcus pneumoniae* in North America: 1997 results from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis* 1998; 27:764-70.
16. Conly JM, Johnston BL. Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Fallacy or fact? *Can J Infect Dis*. 2002; 13(1): 13-16.
17. Telli M, Eyigör M, Gültekin B, Aydın N. Evaluation of resistance mechanisms and serotype and genotype distributions of macrolide-resistant strains in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Aydı, Turkey. *J Infect Chemother*. 2011; 17(5):658-64.
18. Pedrosa EG, Morosini MI, et al. Polyclonal population structure of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Spain carrying *mef* and *mef* plus *erm(B)*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(6):1964-9.
19. Ahmadi A, Talebi M, Irajian G. High Prevalence of Erythromycin- and Tetracycline- Resistant Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Iran. *Infect Dis Clin Pract*. 2013; 21(5):299-301.
20. Reijtman V, Gagetti P, Faccone D et al. Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolated from Argentinian pediatric patients suffering from acute otitis media. *Rev Argent Microbiol*. 2013; 45(4):262-6.
21. Shibl AM. Patterns of macrolide resistance determinants among *S. pyogenes* and *S. pneumoniae* isolates in Saudi Arabia. *J Int Med Res*. 2005; 33(3):349-55.
22. Le Saux N, Robinson J. Management of acute otitis media in children six months of age and older. *Paediatr Child Health* 2016; 21(1):39-44.