

## OSJETLJIVOST NAZOFARINGEALNIH IZOLATA VRSTE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* NA BETA-LAKTAMSKE ANTIBIOTIKE

### ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF NASOPHARYNGEAL *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* STRAINS TO BETA-LACTAMS

Brigita Tićac<sup>1</sup>, Palmira Kesovija<sup>1</sup>, Tomislav Rukavina<sup>1</sup>

#### SAŽETAK

Asimptomatsko nazofaringealno kliconoštvo vrste *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), rašireno poglavito među malenom djecom, pridonosi širenju bakterije u populaciji, te razvoju bolesti. Utvrđivanje prevalencije kliconoštva i osjetljivosti sojeva koji kolaju u populaciji kao mogućih izvora infekcije, pridonosi unapređenju liječenja i preventivnih mjera<sup>1,2</sup>. U radu je u prvome redu analizirana incidencija pneumokoka otpornih na antibiotike u izvanbolničkoj populaciji.

*S. pneumoniae* izoliran je iz 2464/33.139 (7,4%) uzoraka. U razdoblju od 1. siječnja 2003. do 31. prosinca 2006., disk-difuzijskim postupkom ispitana je osjetljivost 2464 izolata na eritromicin, azitromicin, klaritromicin, klindamicin, tetraciklin i trimetoprim sa sulfometoksazolom. Za 493 (20%) izolata sa smanjenom osjetljivošću na penicilin, što je ustanovljeno oksacilinskim diskom, E-testom (AB Biodisk) određene su minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) penicilina. Od 2464 izolata, na penicilin je bio osjetljiv 1971 izolat (80%), a umjereno osjetljiva bila su 493 izolata (20%). Minimalne inhibitorne koncentracije sojeva smanjene osjetljivosti na penicilin, kretale su se od 0,125 do 1,5 µg/ml. Na eritromicin, azitromicin i klaritromicin ustanovljena je otpornost u 418 (18%) ispitanih sojeva, 370 (16%) izolata bilo je otporno na klindamicin, 297 (11%) na tetraciklin, a 543 (22%) izolata bila su otporna na trimetoprim sa sulfometoksazolom.

**Ključne riječi:** *Streptococcus pneumoniae*, nazofaringealno kliconoštvo, beta-laktami, osjetljivost

#### ABSTRACT

The asymptomatic nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) is widely prevalent in children and has been related to the development of disease and the spread of the pathogen. The bacteria carried in the nasopharynx of healthy children reflect the infection-causing strains currently circulating in the community, and so studies of the prevalence of different pathogens and their resistance patterns can provide useful indications for more rational therapeutic and preventive strategies<sup>1,2</sup>. Present studies have been focused mainly on the incidence of antibiotic-resistant pneumococci among out-patients.

*S. pneumoniae* was isolated from 2464/33.139 (7.4%) specimens. From 01. 01. 2003. till 31. 12. 2006. the susceptibility of 2464 *Streptococcus pneumoniae* strains to erythromycin, azithromycin, clindamycin, tetracycline, and trimethoprim-sulfamethoxazole was tested using the disk diffusion method. In (86) isolates with reduced sensitivity to penicillin (as determined with oxacillin disk method), minimal inhibitory concentrations (MIC) of penicillin and ceftriaxone was tested by the E-test (AB Biodisk) method.

Sensitivity to penicillin was found in 1971 (80%) of the 2464 *Streptococcus pneumoniae* while 493 (20%) of the isolates demonstrated decreased susceptibility. Isolates with reduced sensitivity to penicillin had MICs from 0.125 to 1.5 µg/ml. 418 (18%) isolates were resistant to erythromycin, azithromycin and clarithromycin, 370 (16%) to clindamycin, 297 (11%) to tetracycline, and 543 (22%) to trimethoprim-sulfamethoxazole.

**Key words:** *Streptococcus pneumoniae*, nasopharyngeal carriage, beta-lactams, susceptibility

<sup>1</sup> Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije, Mikrobiološki odjel

Primljeno: 25. 1. 2007.

Prihvaćeno: 20. 2. 2007.

Adresa za dopisivanje: doc. dr. sc. Brigita Tićac, dr.med., Mikrobiološki odjel, Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije, Krešimirova 52a, 51000 Rijeka, tel.: 051 358 777, faks: 052 213 948, e-mail: brigita@medri.hr

## MATERIJAL I METODE

U razdoblju od 1. siječnja 2003. do 31. prosinca 2006., obrađivani su nazofaringealni obrisci izvanbolničkih bolesnika koji žive u različitim područjima Primorsko-goranske županije. Na mikrobiološku pretragu dostavljani su uzorci iz 14 pedijatrijskih ordinacija, te iz 54 ordinacije opće prakse.

Za prikupljanje nazofaringealnih uzoraka, korišteni su sterilni obrisni štapići s kalcij alginatnim završetkom. Obrisci transportirani u Stuart mediju najkasnije unutar 48 sati, dostavljeni su u laboratorij Mikrobiološkog odjela Nastavnoga zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije, gdje su obavljene izolacija, identifikacija, te ispitivanje osjetljivosti na antibiotike.

*S. pneumoniae* izoliran je i identificiran korištenjem uobičajenih laboratorijskih protokola: obrisci su nacijepljeni na Columbia agar ploče obogaćene s 5% defibrinirane ovčje krvi. Kulture su inkubirane na 35°C u atmosferi s 5% CO<sub>2</sub> kroz 24 – 72 sata. Identifikacija *S. pneumoniae* potvrđena je pomoću Gram-preparata, reakcije katalaze, te testa osjetljivosti na optohin.

Osjetljivost na antibiotike ispitivana je na Mueller-Hinton agaru obogaćenom s 5% defibrinirane ovčje krvi. Osjetljivost izolata na eritromicin, azitromicin, klaritromicin, klindamicin, tetraciklin i trimetoprim sa sulfometoksazolom, testirana je

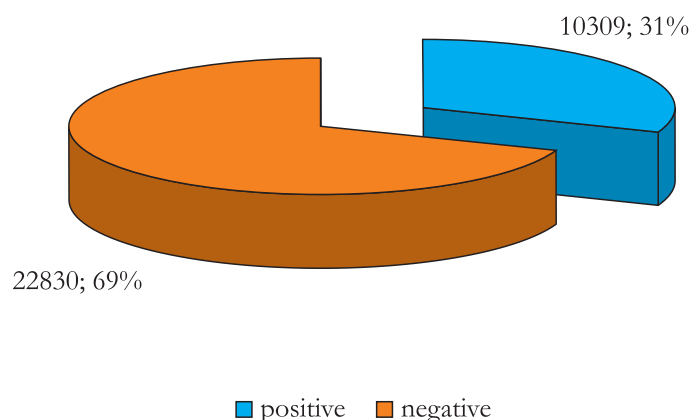
disk-difuzijskim postupkom. Za sve izolate sa smanjenom osjetljivošću na penicilin, što je određeno ispitivanjem osjetljivosti na oksacilin, utvrđene su minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) penicilina korištenjem E-testa (AB Biodisk).

## REZULTATI

U četverogodišnjem razdoblju, od 1. siječnja 2003. do 31. prosinca 2006., obrađeno je 33.139 obrisaka nazofarinksa izvanbolničkih bolesnika s područja Primorsko-goranske županije. Rezultati mikrobiološke pretrage bili su negativni u 22.830 uzoraka (69%), a pozitivni u 10.309 (31%) uzoraka (slika 1.).

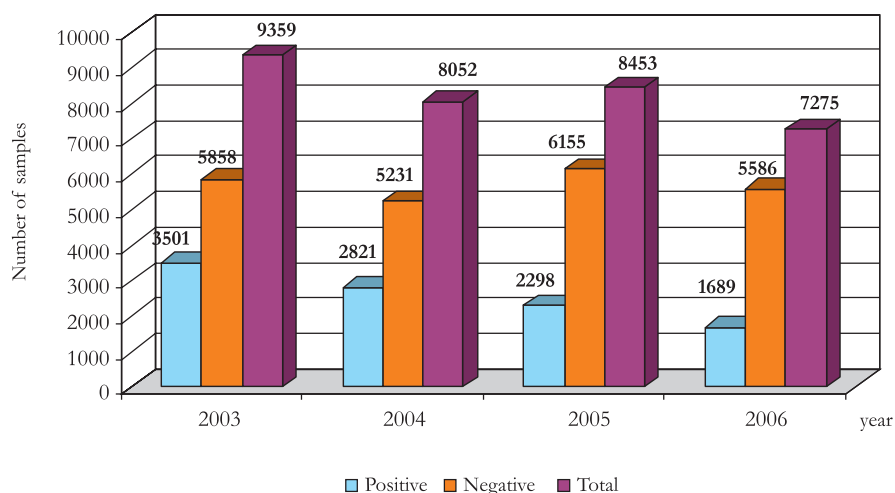
Najveći broj obrisaka nazofarinksa obrađen je godine 2003., kada je na pretragu dostavljeno 9359 (28%) uzoraka. Te je godine zabilježeno najviše pozitivnih nalaza (3501), te najveći udio pozitivnih nalaza u odnosu prema ukupnome godišnjem broju pretraga (37%). Najmanje pozitivnih nalaza (1689 odnosno 23%) u odnosu prema 7275 pretraga obrisaka nazofarinksa, bilo je godine 2006. (slika 2.).

*S. pneumoniae* izoliran je iz 2464/33.139 (7,4%) uzoraka. Tijekom četverogodišnjega razdoblja, broj izolata *S. pneumoniae* postupno se povećavao. Godine 2003. identificirano je 509 pneumokoka, što je u odnosu prema pozitivnim nalazima u toj godini iznosilo 14%. Najviše izolata *S. pneumoniae*



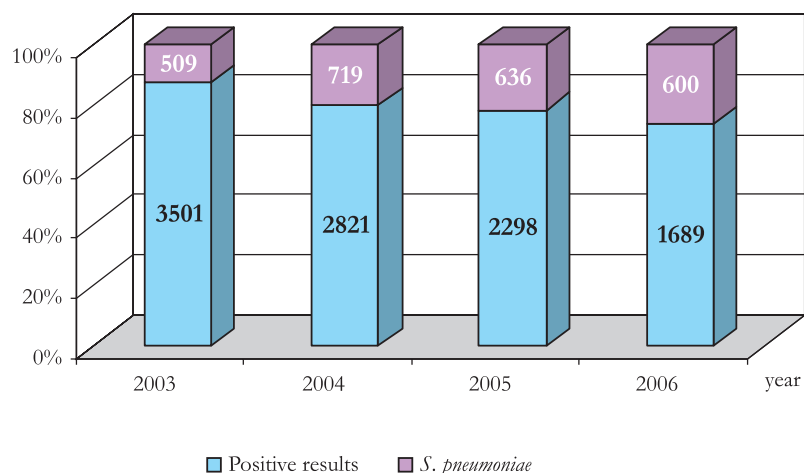
Slika 1. Rezultati mikrobioloških pretraga obrisaka nazofarinksa dobivenih u Laboratoriju za respiratorne infekcije (1. siječnja – 31. prosinca 2003., N=33139)

Figure 1 Results of the microbiological nasopharyngeal swabs analyses performed in the Laboratory for respiratory infections (01. 01. – 31. 12. 2003., N=33139)



Slika 2. Distribucija pozitivnih i negativnih rezultata mikrobioloških analiza obrisaka nazofarinksa dobivenih u Laboratoriju za respiratorne infekcije (1. siječnja 2003. – 31. prosinca 2006., N=33139)

Figure 2 Distribution of the positive and negative results of microbiological nasopharyngeal swabs analyses performed in the Laboratory for respiratory infections (01. 01. 2003. – 31. 12. 2006., N=33139)



Slika 3. Ukupni broj izolata *S. pneumoniae* iz nazofaringealnih obrisaka (1. siječnja 2003. – 31. prosinca 2006., N=2464)

Figure 3 Total number of *S. pneumoniae* isolates from the nasopharyngeal swabs (01. 01. 2003. – 31. 12. 2006., N=2464)

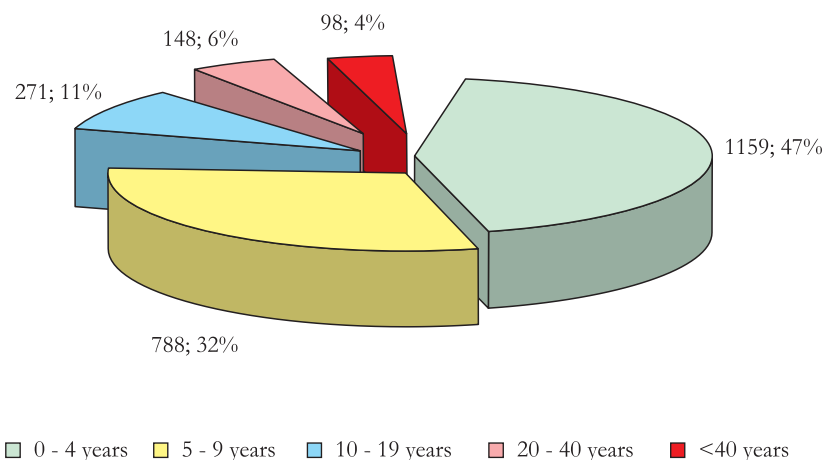
bilo je u godini 2004., odnosno 719, ili 25% izolata iz obrisaka nazofarinksa. Godine 2005. pneumokoki su bili zastupljeni u 639 izolata, odnosno u 28%, a godine 2006. dokazani su u 600 izolata, odnosno u 35% pozitivnih uzoraka nazofarinksa (slika 3.).

Iz obrisaka nazofarinksa djece u dobi do 10 godina, izolirano je 79% sojeva *S. Pneumoniae*, a samo 10% izolata odnosilo se na uzorke osoba starijih od 20 godina (slika 4.)

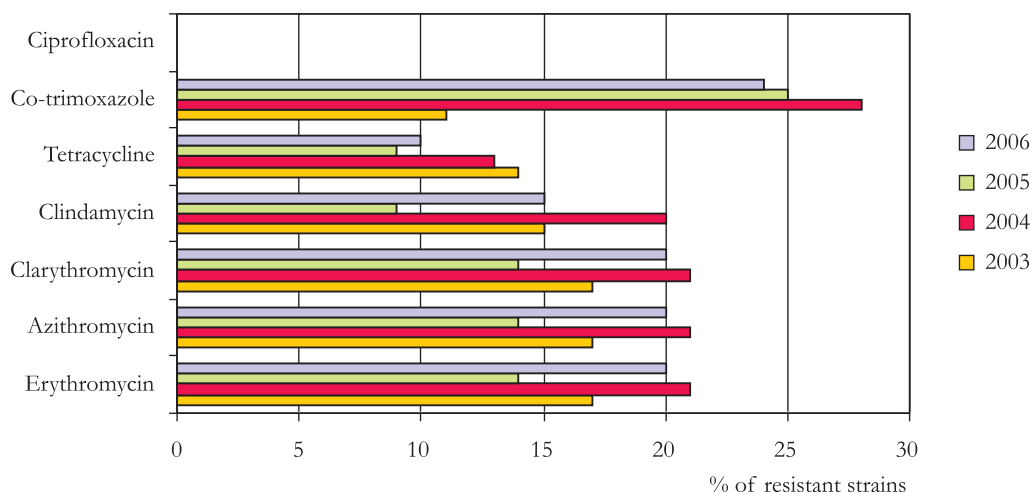
U razdoblju od 1. siječnja 2003. do 31. prosinca 2006., disk-difuzijskim postupkom ispitana je

osjetljivost 2464 izolata *S. pneumoniae* na eritromicin, azitromicin, klaritromicin, klindamicin, tetraciklin i trimetoprim sa sulfometoksazolom. Na eritromicin, azitromicin i klaritromicin ustanovljena je otpornost u 418 testiranih sojeva ili u 18%, na klindamicin bilo je otporno 370 izolata ili 16%, na tetraciklin bilo je otporno 297 izolata ili 11%, a na trimetoprim sa sulfometoksazolom bila su otporna 543 izolata ili 22% (slika 5.).

Od 2464 izolata, na penicilin bio je osjetljiv 1971 izolat ili 80%, a umjereno osjetljiva bila su



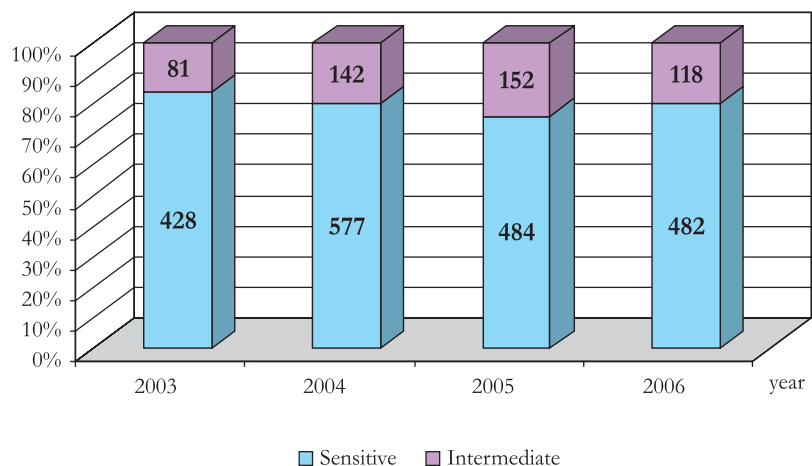
Slika 4. Distribucija nazofaringealnih izolata *S. pneumoniae* s obzirom na dob (N=2464)  
 Figure 4 Distribution of nasopharyngeal *S. pneumoniae* isolates by age (N=2464)



Slika 5. Otpornost izolata *S. pneumoniae* na antibiotike (1. siječnja 2003. – 31. prosinca 2006., N=2464)  
 Figure 5 Antibiotic resistance pattern of *S. pneumoniae* isolates (01. 01. 2003. – 31. 12. 2006., N=2464)

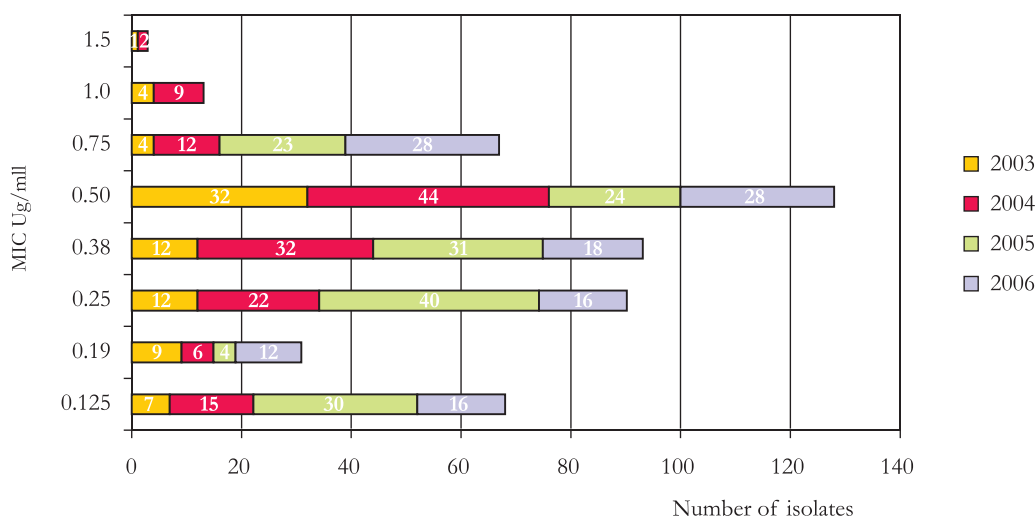
493 izolata ili 20%. U četverogodišnjem razdoblju, u našem Laboratoriju nisu izolirani sojevi s visokim stupnjem otpornosti. Godine 2003. izoliran je 81 pneumokok smanjene osjetljivosti, odnosno 16%, godine 2004. i 2006. izolirana su 142 soja, odnosno 118 sojeva, ili 20%, a godine 2005. smanjeno osjetljiva bila su 152 izolirana soja, odnosno 24% (slika 6).

Za izolate *S. pneumoniae* sa smanjenom osjetljivošću na penicilin, određene su minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) penicilina. Te su se koncentracije tijekom godina kretale u rasponu od 0,125 do 1,5 µg/ml. Najzastupljeniji su izolati s MIK-om od 0,50 µg/ml, 20% izolata ima MIK manji od 0,25 µg/ml, a izolirano je tek 16,4% pneumokoka s MIK-om višim od 0,75 µg/ml (slika 7.).



Slika 6. In vitro osjetljivost nazofaringealnih izolata *S. pneumoniae* na penicilin (1. siječnja 2003. – 31. prosinca 2006., N=2464)

Figure 6 In vitro susceptibility of nasopharyngeal *S. pneumoniae* isolates to Penicilline (01. 01. 2003. – 31. 12. 2006., N=2464)



Slika 7. Distribucija MIK-a penicilina za nazofaringealne izolate *S. pneumoniae*, određene E-testom (N=493)

Figure 7 Distribution of Penicilline MICs for nasopharyngeal isolates of *S. pneumoniae* determined by E-test (N=493)

RASPRAVA

*S. pneumoniae* važan je uzročnik infekcija dišnog sustava. Najčešće uzrokuje lobarnu pneumoniju, te infekcije paranazalnih sinusa i srednjega uha. Također, često dovodi do invazivnih bakterijskih infekcija, meningitisa i sepse<sup>3</sup>. Pneumokok kolonizira gornje dišne putove u djece i odraslih, a infekcije su učestalije u osoba s oslabljenim imunitetom, asplenijom, te kroničnim dišnim bolestima.

Iako prvobitno osjetljiv na antibiotike, *Streptococcus pneumoniae* danas je u mnogim zemljama terapijski problem zbog otpornosti na penicilinske i druge antibiotike. Otpornost je češća u 23F i 6B serotipovima pneumokoka koji su zastupljeniji u dječjoj dobi, negoli u odrasloj dobi<sup>4,5,6</sup>.

Otpornost pneumokoka na penicilin opisana je šezdesetih godina prošloga stoljeća, i od tada je u postupnu porastu širom svijeta. Razvoj otpornosti povezan je s učestalom primjenom antibiotika.

Najviši stupanj otpornosti zabilježen je u južnoj i istočnoj Europi, gdje antibiotici imaju široku primjenu. U Francuskoj, Mađarskoj, Španjolskoj i u Portugalu, otporno je i do 50% izoliranih pneumokoka<sup>7</sup>. U Hrvatskoj, otpornost pneumokoka na peniciline zadnjih se godina nije bitnije mijenjala. Na penicilin umjereno je otporno približno 26% izolata *S. pneumoniae*, a visokootporno je svega 3% izolata<sup>8</sup>. Iako se Primorsko-goranska županija nalazi u neposrednoj blizini Istarske županije u kojoj je registrirano najviše pneumokoka smanjene (45%) i visoke otpornosti na penicilin (8%), prema našim podacima o stanovništvu na području Primorsko-goranske županije, tijekom zadnjih četiriju godina nije bilo pneumokoka s visokim stupnjem otpornosti na penicilin. Zastupljenost umjereno otpornih izolata donekle je niža u odnosu prema hrvatskome prosjeku, i kreće se od 14% u godini 2003. do 24% u godini 2004. Otpornost na penicilin određena je izmjenom penicilin vežućih proteina (Penicillin binding proteins, PBP) koji se nalaze u staničnome zidu bakterija, što dovodi do smanjene sposobnosti vezanja i smanjene učinkovitosti antibiotika.

Umjereno otporni, neinvazivni izolati *S. pneumoniae* (MIK penicilina 0,125 – 1,0 µg/ml), *in vivo* pokazuju dobar odgovor na penicilinsku terapiju. Visokootporni sojevi imaju MIK penicilina viši od 2 µg/ml, stoga se ne mogu liječiti penicilinskim pripravcima<sup>9</sup>. MIK penicilina naših izolata tijekom zadnjih četiriju godina kretao se u rasponu od 0,125 do 1,5 µg/ml. Najzastupljeniji su izolati s MIK-om od 0,50 µg/ml, MIK manji od 0,25 µg/ml ima 20% izolata, a izolirano je tek 16,4% pneumokoka s MIK-om višim od 0,75 µg/ml.

Pneumokoki otporni na peniciline, često su istodobno otporni i na druge antibiotike<sup>10</sup>. U Hrvatskoj, zadnjih je godina približno 30% izolata *S. pneumoniae* otporno na 14- i 15- makrolide (eritromicin, azitromicin, klaritromicin), a donekle manji postotak izolata otporan je na klindamicin. Na osnovi rezultata naših testiranja, na eritromicin, azitromicin i klaritromicin otporno je 14% (2005.) do 21% (2004.) izolata *S. pneumoniae*. Približno 25% izoliranih sojeva otporno je na sulfometoksazol s trimetoprimom, a od 10% (2005.) do 14% (2003.) otporno je na tetracikline.

## ZAKLJUČAK

Ispitivanjem MIK-a, te izradom disk-difuzijskog antibiograma, na području Primorsko-goranske županije testirana je osjetljivost 2464 izolata *S.*

*pneumoniae* na penicilin, makrolide, tetracikline, sulfometoksazol s trimetoprimom, te na kinolone.

Na području Primorsko-goranske županije, 20% sojeva pneumokoka izoliranih iz nazofaringealnih obrisaka imalo je MIK od 0,125 do 1,5 µg/ml penicilina, odnosno bili su umjereno otporni na penicilin.

Tijekom četverogodišnjega razdoblja, nisu izolirani sojevi *S. pneumoniae* s visokim stupnjem otpornosti na penicilin (MIK  $\geq$  2,0 µg/ml), niti sojevi otporni na kinolone.

Najzastupljenija je otpornost izolata *S. pneumoniae* na sulfometoksazol s trimetoprimom (do 28%), potom na makrolide (do 21%), te na tetracikline (do 14%).

Mikrobna flora nazofarinksa, uključujući *S. pneumoniae*, ne uzrokuje smetnje u djece, ali je "rezervoar" patogena izravno povezanih s dišnim i invazivnim infekcijama. Fiziološka flora i fakultativni patogeni nalaze se u međusobnu suodnosu, što omogućuje razmjenu informacija – gena koji određuju pojavu otpornosti na antibiotike. Izolacija, praćenje učestalosti, te ispitivanje osjetljivosti nazofaringealnih izolata *S. pneumoniae*, izvor su podataka korisnih za racionalizaciju liječenja i prevenciju bolesti.

## LITERATURA

1. Soderstrom M, Hovellius B, Prellner K, Schalen C. Quantification of nasopharyngeal bacteria for diagnosis of respiratory tract infection in children. *Scand J Infect Dis* 1990;22:333-7.
2. Lieberman D, Shimoni A, Shleyfer E, Castel H, Terry A, Herman-Boehm, Peled N. Naso- and oropharyngeal potential respiratory pathogens in adults with nonpneumonic lower respiratory tract infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;12.
3. Porath A, Schlaeffer F, Pick N, Leinonen M, Lieberman D. Pneumococcal community – acquired pneumonia in 148 hospitalized adult patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:863-70.
4. Nicoletti C, Brandileone MC, Guerra ML, Levin AS. Prevalence, serotypes, and risk factors for pneumococcal carriage among HIV – infected adults. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;57:259-65.
5. Antimicrobial susceptibility of community-acquired respiratory tract pathogens in the UK during 2002/3 determined locally and centrally by BSAC methods. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:200-8.
6. Vieira AC, Gomes MC, Rolo FM, Eudes FJ, Bello EJ, de Figueiredo RB. *Streptococcus pneumoniae*: a study of strains isolated from cerebrospinal fluid. *J Pediatr (Rio J)* 2007;83:71-8.

7. Cardozo DM, Nascimento-Carvalho CM, Souza FR, Silva NM. Nasopharyngeal colonization and penicillin resistance among pneumococcal strains: a Worldwide 2004 update. *Braz J Infect Dis* 2006;10:293-303.
8. Tambić T, Tambić Andrašević A. Praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u RH. U: Tambić T, Tambić Andrašević A., ur. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2005. g. Zagreb: AMZH 2006:30-2.
9. Livermore DM. Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J Antimicrob Chemoth* 1998;41:25-41.
10. Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. U: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000:2128-47.