



## FENOTIPSKE METODE I NJIHOV ZNAČAJ U DETEKCIJI PENICILIN REZISTENTNOG *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Lejla Osmanović  
Klinički centar univerziteta u Sarajevu

### Sažetak

*Streptococcus pneumoniae* pretežno izaziva infekcije gornjih respiratornih puteva (sinuzitis, otitis) i konjunktivitis. Vodeći je uzročnik vanbolničkih pneumonija, bakterijskog meningitisa i sepse.

Rezistencija na penicilin posredovana je u pneumokoka promjenom ciljnog mjesta. Ciljno mjesto za penicilin su tzv. penicilin vežući proteini ili prema engleskom "penicilin binding proteins" (PBP). Pneumokoki posjeduju šest takvih molekula: 1A, 1B, 2A, 2B, 2X i 3, a rezistentni sojevi imaju promijenjene PBP molekule koje pokazuju smanjeni afinitet za penicilin. Do promjene PBP molekula dolazi zbog izrazite sklonosti pneumokoka genetskoj transformaciji tj. ugrađivanju strane DNA iz okoline u svoj genom. Strana DNA potječe od viridans streptokoka s kojima pneumokoki dijele stanište na sluznici gornjih dišnih puteva. Cilj ovog rada je bio da ispita učestalost izolata *Streptococcus pneumoniae* rezistentnih na penicilin te prikažu i kompariraju fenotipske metode detekcije rezistencije na penicilin kod pneumokoka. Istraživanje je rađeno na osnovu podataka o pacijentima uzetih u periodu od 01.01.2016 do 01.01.2017 u OJ Klinička Mikrobiologija UKC Sarajevo. Za određivanje fenotipova rezistencije na pneumokok su korišteni disk-difuzioni test, kombinovani difuziono-dilucionni test i automatizovani VITEK 2 sistem. problem u invazivnim infekcijama. Najvažniji problem u enterokokoka je pojava rezistencije na vankomicin.

### 1.UVOD

**Autor za korespondenciju:**

**Lejla Osmanović, MA dipl. ing. MLD**

**Klinički centar univerziteta u Sarajevu  
O.J. Klinička mikrobiologija**

**E-mail: osmanovic\_lejla@yahoo.com**

**Tel: 0038761/218-002**



*Streptococcus pneumoniae* ili pneumococcus je Gram pozitivna bakterija koja pripada rodu *Streptococcus*, familiji *Streptococcaceae*. Jedan je od vodećih uzročnika invazivnih oboljenja kao što su bakterijska pneumonija, septikemija i meningitis. Takođe uzrokuje neinvazivna, ali vrlo česta oboljenja kao što su akutna upala srednjeg uha, sinuzitis i nekomplikovana pneumonija. Invazivne pneumokokne infekcije su povezane sa značajnim morbiditetom i mortalitetom, naročito u zemljama u razvoju (1). 2000-te godine pneumokokne bolesti su uzrokovale oko 826 000 smrtnih ishoda kod djece uzrasta do 5 godina (2).

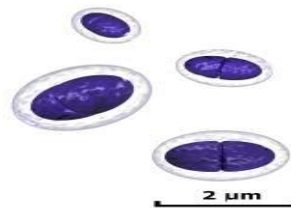


Liječenje pneumokoknih infekcija je otežano zbog porasta i širenja rezistencije na antibiotike. Od posebnog je značaja pojava ukrštene rezistencije pneumokoka na beta laktamske antibiotike i antibiotike iz grupe makrolida. Rezistencija na penicilin uvjetovana je spontanom genskom promjenom bakterijskih proteina koji vežu penicilin (eng. PBP-penicillin binding protein). To su enzimi koji su uključeni u sintezu i modifikaciju stanične stijenke bakterije. Tako PBP u nekih sojeva pneumokoka smanjuju sposobnost stanične stijenke za vezanje s antibioticima. Rezistencija se pojavljuje selekcijom tih sojeva, koji zahtijevaju visoke koncentracije penicilina za zasićenje svojih specifično promijenjenih proteina. Sojevi pneumokoka rezistentni na penicilin mnogo se češće izoliraju iz respiratornog sistema nego iz primarno sterilnih materijala, te stoga možemo zaključiti da su rezistentniji oni sojevi koji se pojavljuju kod kliconoštva, odnosno uzrokuju kolonizaciju ili kontaminaciju (3).

### Morfologija

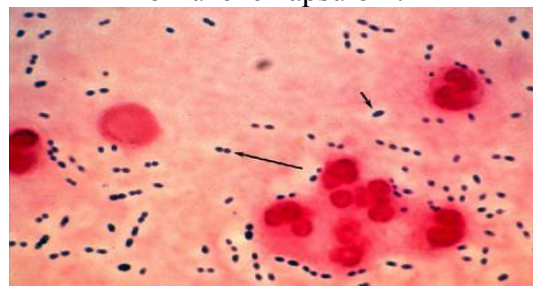
Diplokok je prvi put uočio Pasteur 1880. godine u salivi čovjeka oboljelog od rabijesa, a 1910. godine Neufeld je izvršio tipizaciju na osnovu bubrenja kapsule. *Streptococcus pneumoniae* pripada grupi Gram-pozitivnih bakterija, ali se od njih razlikuje po svom obliku. To je bakterija koja se javlja u paru. Na jednom kraju je zašiljena u vidu plamena svijeće, a drugi kraj je ravan i širok. Mogu biti pojedinačne i u kraćim lancima. Neki sojevi posjeduju i kapsulu koja okružuje jedan par koka ili više parova kada se nalaze u lancima (4). Čelije su dijametra 0,5 do 1,2  $\mu\text{m}$ .

Morfologija kolonija varira, od kolonija obavijenih, velikih (dijametra 1 do 3 mm na krvnom agaru; manjih na čokoladnom agaru), okruglih i mukoidnih, i kolonija nekapsuliranih sojeva manjih i ravnih. Sve kolonije podliježu autolizi vremenom, središnji dio kolonije se rastvara ostavljajući ispupčen izgled (5). Pneumokoki se međusobno razlikuju na osnovi građe polisaharidne kapsule, i upravo se na temelju tih razlika mogu razvrstati u preko 90 različitih serotipova. Polisaharidna kapsula osnova je invazijskog potencijala bakterije, odnosno omogućava joj da lakše izazove infekciju kod čovjeka i izbjegne odbrambenim mehanizmima domaćina, osobito fagocitozu, koja je ključna u odbrani od bakterijskih patogena (3).



*Streptococcus pneumoniae*

**Slika 1.** Pneumokok – diplokoke, okružene kapsulom.



**Slika 2.** Izgled ćelija *Streptococcus pneumoniae* u direktnom preparatu likvora, obojenom po Gramu; uočavaju se izdužene diplokoke, koje mogu formirati lance



### Kulturelne osobine

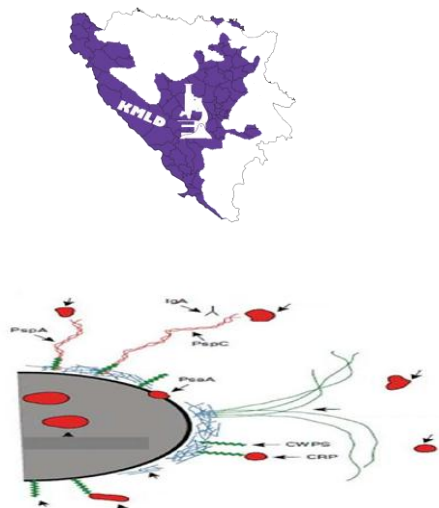
*Streptococcus pneumoniae* za svoj rast treba povećanu koncentraciju CO<sub>2</sub>, od 5 do 10%. Kultiviše se na temperaturi od 35°C (6). Uzročnik ima probirljive nutritivne zahtjeve i raste samo na obogaćenim podlogama sa krvnim produktima (5). Na krvnom agaru raste nakon 24 h u sitnim prozirnim kolonijama sa izraženom zonom α-hemolize. Kolonije mogu biti β-hemolitičke u anaerobnim uvjetima (16). Postoji više faza razvoja pneumokoka i kolonije se razlikuju po izgledu: glatke, sjajne, ravnih ivica (S kolonije), hrapave, mutne, neravnih ivica (R kolonije), i mukoidne, izrazito sluzave pojedinih virulentnih sojeva (tip 3). Kolonije pneumokoka dužim stajanjem mijenjaju svoj izgled: zamute se, deformišu i smanjuju, a kupola im se zaravni. Opisane promjene su posljedica dejstva sopstvenih metaboličkih produkata koje pneumokok stvara (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i nazivaju ih autolizini. Veoma je osjetljiv na promjenu kiselosti sredine tako da je potrebno u određenim intervalima u toku kultiviranja kontrolirati bujonsku kulturu, da bi se dobio obilan rast (6). *Streptococcus pneumoniae* fermentuje karbohidrate, stvarajući mliječnu kiselinu kao primarni metabolički nusprodukt. Raste slabo u medijima sa visokim koncentracijama glukoze, jer mliječna kiselina brzo doseže toksične razine u takvim medijima (5).



**Slika 3.** Izgled kolonija *Streptococcus pneumoniae* na krvnom agaru *Gore*: tipično udubljenje u kolonijama posle 24 časovne inkubacije, koje se javlja kao posljedica autolize; *Dole*: izgled mukoidnih kolonija *Streptococcus pneumoniae*

### Faktori virulencije

*Streptococcus pneumoniae* posjeduje brojne faktore virulencije koji imaju važnu ulogu u patogenezi infekcije. Prema hemijskom sastavu se faktori virulencije mogu podijeliti u dvije grupe. Prva grupa u osnovi ima šećere i predstavljena je polisaharidnom kapsulom, teihoinskom ili poteihoinskom kiselinom. Druga grupa uključuje brojne površinski vezane proteine i enzime.



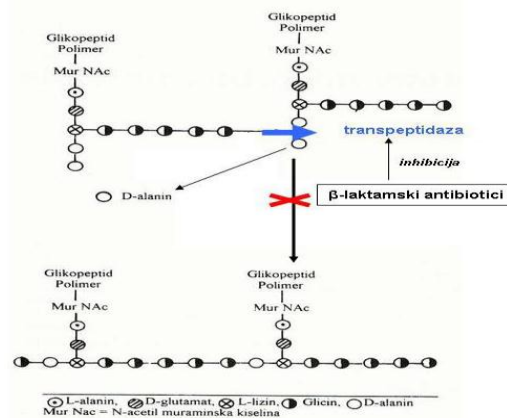
**Slika 4.** Shematski model ćelijskog zida i površinskih proteina pneumokoka

Na staničnu površinu nadovezuje se jasno razvijena polisaharidna kapsula, koja je ujedno i glavni faktor virulencije (7). Polisaharidna kapsula u potpunosti okružuje bakterijsku ćeliju i predstavlja glavni faktor virulencije pneumokoka (8). Kovalentno je vezana fosfodiastarskim vezama za N-acetilglukozamin peptidoglikana ćelijskog zida. Postoje razlike u sastavu polisaharida kapsule, na osnovu kojih je do danas identifikovano 94 različita serotipa pneumokoka (9, 10). Kapsula većine serotipova je kompleksne građe, sastavljena od multiplih šećera sa razgranatim bočnim lancima. Kod nekih tipova, npr. 3 i 37, kapsula ima relativno jednostavnu strukturu i sadrži samo jedan ili dva šećera, dok je kod drugih sastavljena od brojnih ugljenih hidrata. Uprkos navedenim raznolikostima u građi, kapsula svih tipova ima istu primarnu funkciju, da spriječi opsonofagocitozu i inhibiše aktivaciju komplementa alternativnim putem (11).

### Mehanizmi rezistencije pneumokoka na penicilin

Rezistentni sojevi pneumokoka ne proizvode beta-laktamazu. Rezistencija na penicilin uvjetovana je spontanom genskom promjenom bakterijskih proteina koji vežu penicilin (eng. PBP-

penicillin binding protein). To su enzimi koji su uključeni u sintezu i modifikaciju ćelijske stijenke bakterije. Tako PBP u nekih sojeva pneumokoka smanjuju sposobnost ćelijske stijenke za vezanje s antibioticima. Za smanjenu osjetljivost *Streptococcus pneumoniae* na betalaktamske antibiotiske lijekove odgovoran je mehanizam unutarnje rezistencije - izmjene proteina koji vezuju penicilin odnosno ciljnih mjesta djelovanja ovih lijekova.



**Slika 5.** Inhibicija sinteze peptidoglikana iz ćelijskog zida bakterija pomoću  $\beta$ -laktamskih antibiotika

Rezistencija se pojavljuje selekcijom tih sojeva, koji zahtijevaju visoke koncentracije penicilina za zasićenje svojih specifično promijenjenih proteina. Po ispitivanju velikog broja izolata, uočeno je da varijacija u PBP uzorku predstavlja istinski polimorfizam proteina. I zaista, izolati koji dijele određeni abnormalni, ali jedinstveni uzorak također imaju tendenciju da dijele i ostala svojstva, poput serotipa, otpornosti na druge antibiotike i geografsko porijeklo (12, 13). Na osnovu ovih opažanja predloženo je da otporni izolati pneumokoka predstavljaju



specifičnu, odnosno genetički specifičnu liniju pneumokokalnih klonova (14).

### LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

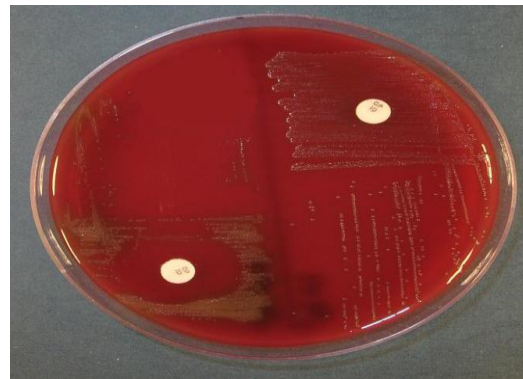
*Streptococcus pneumoniae* napada različite organe i tkiva. Za pregled se uzima sputum koji je često boje rđe (sadrži eritrocite) oboljelih od krupozne pneumonije. Pored sputuma, u ovisnosti od kliničke slike uzima se likvor, gnoj, punktati, krv, brisevi gornjih respiratornih puteva, srednjeg uha, oka i dr. Bakteriološka dijagnoza postavlja se ustaljenim redoslijedom: ispitivanjem mikroskopskih, kulturelnih, biohemijskih i antigenskih karakteristika. Za njihovu diferencijaciju preporučuje se korištenje sljedećih postupaka:

1. Direktni mikroskopski pregled bolesničkog materijala ima veliki dijagnostički značaj. Bojenje po Gramu uzoraka sputuma je brz način za dijagnostiku pneumokokne pneumonije i meningitisa. U razmazima sputuma, likvora, pleuralne tečnosti, itd. bojenjem po Gramu nalaze se tipične Gram pozitivne bakterije, oblika plamena svijeće, raspoređene u parove, okružene širokom kapsulom. Kod starijih kultura bakterije se mogu odbojiti i pokazati u preparatu kao gram negativne (5). Kapsula se može bolje vidjeti ako se razmaz boji nekim od specijalnih bojenja za kapsulu ili negativnim bojenjem (India ink). Pored bakterija, u razmazu se uvijek nalaze i leukociti.

2. *Streptococcus pneumoniae* za svoj rast treba povećanu koncentraciju CO<sub>2</sub> 5 do 10 %. Kultiviše se na temperaturi

od 35°C. Raste na složenim hranjivim podlogama obogaćenim nativnim bjelančevinama (krv, serum, ascit). *Streptococcus pneumoniae* raste vrlo dobro na krvnom agaru, koji sadrži ovčije eritrocite i mesni ekstrakt, u prisustvu povećane koncentracije CO<sub>2</sub> 5 do 10 %.

3. Optohinski test radi se na principu antibiograma. Izvodi se tako što se na zasijanu kulturu alfa-hemolitičkih streptokoka, za koje se pretpostavlja da bi mogle biti *Streptococcus pneumoniae*, stavi disk optohina i inkubira 24 sata na 37°C. Poslije inkubacije posmatra se rast (4). *Streptococcus pneumoniae* je veoma osjetljiv na male koncentracije optohina, zbog čega se oko diska stvara široka zona inhibicije rasta (30mm) (6).

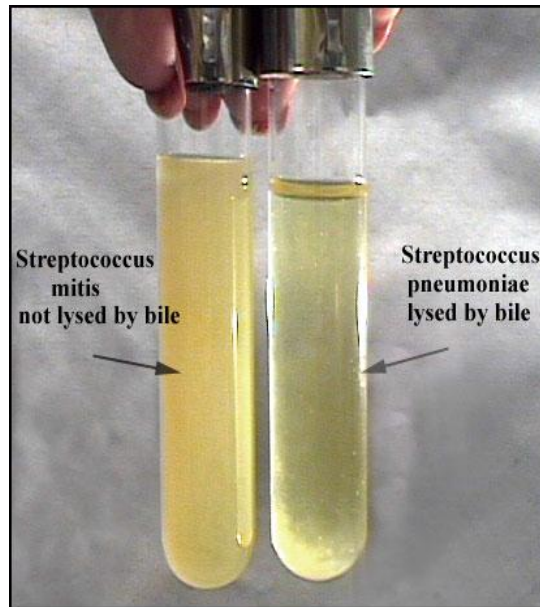


**Slika 6.** Optohinski test. Lijevo: *Streptococcus pneumoniae*, osjetljiv na optohin; desno: viridans streptokoke – rezistentne na optohin

4. Preporučuje se test topljivosti u žuči i žučnim solima (površinski aktivne supstance). Nakon dodavanja površinski aktivnih supstanci kulturi *Streptococcus pneumoniae*, dolazi do lize kolonija na krvnom agaru i razbistravanju bujonske kulture (6). U roku od dva sata kolonija



pneumokoka lizira, dok alfa hemolitičke streptokoke ostaju neizmijenjene (17).



**Slika 7.** Test lize žučnim solima u epruveti. *Lijevo:* viridans streptokoke, čija bujonska kultura ostaje zamućena posle dodavanja žučnih soli, test je negativan. *Desno:* *Streptococcus pneumoniae*, čija se bujonska kultura izbistрила posle dodavanja žučnih soli, test je pozitivan

5. *Streptococcus pneumoniae* se može brzo identificirati serološkom tipizacijom. Uzorcima bolesničkog materijala u kojima se nalaze tipični oblici bakterija, dodaje se tipski specifičan antiserum. Test se izvodi na predmetnom staklu i odmah se posmatra pod mikroskopom. Prati se bubrenje kapsule (Neufeldov test). Do bubrenja kapsule dolazi u homolognom serumu, zbog mikroprecipitacije. Na osnovu različitih antigena kapsule podijeljeni su u 83 serološka tipa (6).

6. Biološki ogled izvodi se ubrizgavanjem suspenzije suspektne kulture u fiziološkom rastvoru miša. Ukoliko je ubrizgan pneumokok miš će uginuti od sepse za 24-72 sata. Iz krvi miša će se izolovati pneumokok u čistoj kulturi (17).

Za identifikaciju *S.pneumoniae* se koriste i komercijalni kitovi kao što su Api Rapid Strept, Rapid ID 32 i VITEK (bioMerieux, Marcy l Etoile, France). Serološkim se testovima mogu dokazati protutijela na četiri pneumokokna antigena: C-polisaharid stanične stijenke, kapsularne polisaharide, fosforilkolin i pneumolizin (ključni faktor virulencije) (3).

Serotipizacija izolata može biti korisna iz epidemioloških razloga kako bi se koreliralo širenje specifičnih klonova i slijedilo razvoj otpornosti na antibiotike. Antibiogram treba raditi na izoliranim sojevima (MSD priručnik dijagnostike i terapije).

Zaključno, za pristup bolesniku sa sumnjom na pneumokoknu bolest i dalje se treba ravnati uglavnom prema nekim kliničkim i laboratorijskim podacima, naročito prema broju leukocita, CRP-u i općem stanju djeteta (15).

## 2.MATERIJAL I METODE

U retrospektivno-prospektivnoj studiji ispitivanje je urađeno na izolatima pneumokoka koji su izolovani iz uzoraka respiratornog trakta pacijenata sa različitih odjela Kliničkog centra univerziteta u Sarajevu koji su zaprimljeni u OJ Klinička mikrobiologija. Studija je obuhvatala period od 01.01.2016 do 01.01.2017.



Podaci o izolatima su uključivali sljedeće podatke: laboratorijski identifikacioni broj, vrstu uzorka, datum uzorkovanja, uzrast i pol pacijenta, dijagnozu.

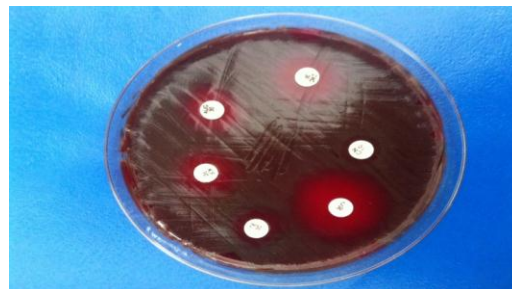
### Procedura kod izolacije pneumokoka

Po dospjeću u laboratoriju, uzorak je zasijan na podlogu krvni agar sa razrijeđenjem. Ploče su pohranjene u posudu sa CO<sub>2</sub>. Da bi se obezbijedili ti uslovi stavljena je upaljena svijeća ili BD Gas Pak EZ, CO<sub>2</sub> container system. Posuda je stavljena u termostat 16-24 h na 37 °C. Nakon 24 h inkubacije izvršeno je očitavanje porasta sa kulture. Sumnjive kolonije *Streptococcus pneumoniae* (pneumokok) su testirane na krvni sektor sa diskom optohina (6 mm, 5 µg) komercijalno dostupnim. *Streptococcus pneumoniae* je veoma osjetljiv na male koncentracije optohina, zbog čega se oko diska stvara široka zona inhibicije rasta (30 mm). Poslije inkubacije od 16-24 h se očitava zona inhibicije rasta, sa gornje strane otvorene ploče, lenijarom. Ukoliko je prečnik zone  $\geq 14$  mm, smatra se da je ispitivani izolat osjetljiv na optohin. Za svaki novi lot diskova optohina treba uraditi pozitivnu i negativnu kontrolu.

### Ispitivanje osjetljivosti *S. pneumoniae* na antibiotike

Zbog osjetljivosti pneumokoka na vanjsku sredinu odmah je urađeno testiranje osjetljivosti na antibiotike. Gustina bakterijske suspenzije treba da je 0,5 McFarland ukoliko se, za pravljenje koristi bakterijska kultura sa krvog agara, odnosno 1,0 McFarland, ukoliko je pneumokok kultivisan na čokoladnom agaru. U našem istraživanju korišten je krvni agar za izolaciju pneumokoka, s ciljem zasijavanja

izolovanih i ispitivanih bakterija. Sterilnom ezom pikirane su istovjetne suspektne kolonije ispitivane bakterijske vrste i potom suspendirane u glukozni bujon (McFarland 0.5). Potom se suspenzija ispitivanog soja bakterija iz glukoznog bujona sterilnim štapićem nanijela preko čitave površine hranjive podloge. Prema standardnim shemama aplicirani su na zasijanu podlogu, diskovi filter papira impregnirani antibioticima određene koncentracije. Ispitana je osjetljivost na sljedeće antibiotike: benzilpenicilin, oksacilin, eritromicin, azitromicin, klaritromicin, tetraciklin, hloramfenikol, gentamicin, trimetoprim-sulfametoksazol, cefazolin, ceftriakson, amoksicilin+klavulonska. Petri ploče su inkubirane na 35-37°C unutar 24 h. Bakterije će rasti u okolini diska ovisno o svojoj osjetljivosti na antibiotik. Osjetljivost bakterija je upravo proporcionalna s promjerom zone inhibicije koja se očitava u milimetrima i uspoređuje sa veličinama zone inhibicije dobivenim testiranjem standardnih i poznatih bakterijskih sojeva. Zone osjetljivosti su interpretirane prema CLSI standardima. U našem istraživanju rezultat testa izrazili smo kao R (rezistentan) i S (senzitivan). Kao kontrolni soj se koristio *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.



**Slika 8.** Antibiogram (disk-difuziona metoda) *Streptococcus pneumoniae*



### Ispitivanje osjetljivosti na beta-laktamske antibiotike

Za ispitivanje osjetljivosti na beta laktamske antibiotike se upotrebljava disk oksacilina, 1 µg. Ukoliko je zona inhibicije rasta  $\geq 20$  mm, može se smatrati da je soj osjetljiv na sve beta laktamske antibiotike. Pošto se za liječenje pneumokoknih bolesti najčešće koriste penicilin i cefalosporini treće generacije (npr. ceftriakson), oba standarda (CLSI i EUCAST) upućuju da se odredi vrijednost MIK ovih antibiotika, a svake godine oba standarda daju nove vodiče sa graničnim vrijednostima za interpretaciju kategorija osjetljivosti. Prilikom procjene osjetljivosti soja treba voditi računa da su i CLSI i EUCAST napravili razliku u interpretaciji u zavisnosti da li je soj izazivač meningitisa ili neke druge invazivne ili neinvazivne bolesti.

Granična vrijednost penicilina je prvenstveno dizajnirana kako bi se osigurao uspjeh terapije za pneumokokni meningitis. Međutim, kliničke studije su pokazale da je ishod pneumokokne upale pluća uzrokovan sojevima sa srednjom osjetljivošću na penicilin i koja je tretirana parenteralnim penicilinom se ne razlikuje od pacijenata tretiranih sa drugim agensima. Uzimajući u obzir na mikrobiološke, farmakokinetičke i farmakodinamične podatke, klinička granična vrijednost za benzilpenicilin za ne-meningitis izolate su revidirani i trenutne granične vrijednosti su navedene i u tabeli. U slučaju meningitisa, granične vrijednosti su strožije.

U slučaju da je ispitivani izolat izazivač pneumonije, sepsa itd., koriste se drugačiji kriterijumi za interpretaciju, koji zavise i od doze datog lijeka, odnosno koncentracije koju lijek dostiže u krvi.

Tabela 1. Granične vrijednosti za oksacilin

Oksacilin 1µg dijametar zone inhibicije	Antibiotik	Dalje testiranje/interpretacija
$\geq 20$ mm	svi beta laktami	izvijestiti da je soj osjetljiv, bez obzira na kliničke indikacije
	benzilpenicilin (meningitis) i fenoksimetilpenicilin (sve indikacije)	izvijestiti da je soj rezistentan
< 20 mm	benzilpenicilin (ne-meningitis)	odrediti MIK i interpretirati
	ampicilin, amoksisicilin i piperacilin (sa ili bez inhibitora beta laktamaza), cefepim, cefotaksim, ceftriakson	<b>zona <math>\geq 8</math> mm:</b> izvijestiti da je soj osjetljiv
		<b>zona &lt;8 mm:</b> odrediti MIK za beta laktame
	drugi beta laktami	odrediti MIK i interpretirati





Tabela 2. Granične vrijednosti za penicilin

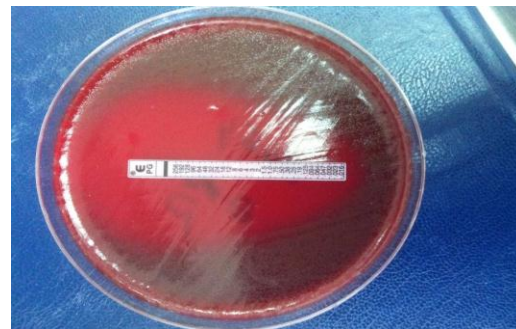
Standard	Antibiotici	S	I	R
CLSI	penicilin (meningealni)	≤0,06	0,12-1	≥2
EUCAST	penicilin (meningealni)	≤0,06	-	>0,06

Tabela 3. Granične vrijednosti za penicilin

Standard	Antibiotici	S	I	R
CLSI	penicilin (ne-meningealni)*	≤2	4	≥8
EUCAST	penicilin (ne-meningealni)**	≤0,06	-	>2

### E-test

Vrijednost MIK-a određen je kod izolata *Streptococcus pneumoniae* korištenjem E testa (BioMerieux). Ovaj test predstavlja kombinaciju dilucijske i difuzijske metode. Dizajniran je u vidu tankih, inertnih plastičnih traka čija je jedna strana kalibrirana sa MIK skalom u ug/ml i to od 0,002-1024 ug/ml zavisno od antibiotika. Kada se E test trake apliciraju na površinu agara, antibiotik brzo difundira u agar i stvara određeni gradijent koncentracije. Ispitivani soj pneumokoka je inokuliran na krvni agar kao za disk difuzijski test, zatim su nanesene E-test trake penicilina sa određenim gradijentom koncentracije antibiotika, koje su prenešene sa trake na čvrstu podlogu. Nakon inkubacije od 18 do 24 sata, kada rast bakterija postane vidljiv, uočava se simetrična elipsa inhibicije rasta i očitava se MIK (minimalna inhibitorna koncentracija) na osnovu veličine zone inhibicije. Rezultat se očitava kao S, I, R i uz to i MIK u ug/ml.



Slika 9. E- test

### Ispitivanje osjetljivosti na antibiotike automatizovanim sistemom Vitek 2

Ispitivanje osjetljivosti na antibiotike je izvedeno automatizovanim VITEK 2 sistemom za brzu izradu testa osjetljivosti (VITEK 2, BioMerieux, Francuska).

Ispitana je osjetljivost na 19 antibiotika (benzilpenicilin, amoksicilin, cefotaksim, ceftriakson, imipenem, levofloksacin, moksifloksacin, ofloksacin, sparfloksacin, eritromicin, telitromicin, pristinamicin, kvinopristin



– dalfopristin, linezolid, vankomicin, tetraciklin, hloramfenikol, rifampicin, trimetoprim–sulfametoksazol) korištenjem kartica AST-P576 prema uputstvu proizvođača (BioMerieux, Francuska). Kao referentni soj u testovima osjetljivosti je korišten *S. pneumoniae* ATCC 49619.

Rezultati osjetljivosti su tumačeni u skladu sa preporukama CLSI iz 2013. godine. Granične vrijednosti penicilina za MS su:  $S \leq 0,06 \mu\text{g/ml}$ ,  $R \geq 2 \mu\text{g/ml}$ , a za NMS su:  $S \leq 2 \mu\text{g/ml}$ ,  $R \geq 8 \mu\text{g}$ .

VITEK 2 Compact vrši adekvatnu identifikaciju do nivoa speciosa za > 300 klinički značajnih bakterija i testiranje osjetljivosti na veliku paletu antibiotika. Aparat omogućava nezavisan rad svakog dijela mikrobiološke laboratorije u smislu odvojene pripreme uzorka, u zavisnosti od potreba svake laboratorije, zahvaljujući tzv. malim pokretnim ćelijama (kasetama) koje se koriste odvojeno od aparata. Aparat automatski osigurava validaciju, a kada su rezultati spremni daje tačan fenotipski profil identificiranog mikroorganizma.

Figure 2-1 illustrates the location of instrument access doors.



Figure 2-1: VITEK® 2 Compact Instrument

**Slika 10.** VITEK 2 COMPACT aparat

**Kaseta** je glavna komponenta sistema transporta test kartica. Može da primi do 10 test-kartica sa inokuliranim test-epruvetama.



Figure 2-11: VITEK® 2 Compact Cassette

**Slika 11.** VITEK 2 COMPACT kasetna

### Procedura

Sterilno je prebačeno 3.0 mL sterilne soli ( vodeni rastvor 0,45% do 0,50% NaCl, pH 4,5 do 7,0) u providnu plastičnu (polistirensku) test epruvetu (12mmx75mm). Sterilni štapić ili tampon je korišten za prebacivanje dovoljnog broja morfološki sličnih kolonija pneumokoka u epruvetu sa rastvorom soli. Pripremljena je suspenzija homogenog organizma gustine ekvivalentne McFarland-u broj 0,50 do 0,63 koristeći kalibrisani Vitek „ Densichek“. Starost suspenzije ne smije da prelazi 30 minuta prije stavljanja kartica za inokulaciju.

Epruvete sa suspenzijom su postavljene u kasetu. Iz svake epruvete kojom se ispituje biohemijska aktivnost bakterija mikropipetom je prenešena odgovarajuća količina suspenzije u sljedeću epruvetu koja služi za ispitivanje osjetljivosti. Postavljene su odgovarajuće kartice u test epruvete. Pristupljeno je ubacivanju uzoraka u aparat.



Figure 21: View and Maintain Isolate Results

View and Maintain Isolate Results

Patient Name : Jones, Sarah

Lab ID: 103

Organism: *Enterococcus faecalis*

Review Status: To be reviewed

Bionumber:

ID Confidence:

Analysis Status: 10.25 hr - Final

Analysis Messages:

bioArt Comment:

AST Offline Tests: Beta-Lactamase

View By: Isolate

Filter By: Show All

103-1, *Enterococcus faecalis*

AST-GP55, Final, Jan 17, 2013, 6904

Antibiotic	MIC	Inte...	Antibiotic	MIC	Inte...	Antibiotic	MIC	Inte...
Beta-Lactamase	NEG	-	Streptomycin High Lev...	SVN-R	R	Clindamycin	(-)	(-)
Benzylicillin	(-)	(-)	Gentamicin			Vancomycin	4	S
Ampicillin	16	R	Ciprofloxacin	(-)	(-)	Tetracycline	(-)	(-)
Ampicillin/Subactam	[s2]	I	Levofloxacin	(-)	(-)	Nitrofurantoin	≤16	S
Oxacillin			Norfloxacin	(-)	(-)	Chloramphenicol	(-)	(-)
Cefazolin			Ofloxacin	(-)	(-)	Rifampicin		
Gentamicin High Level...	SVN-5	S	Erythromycin	(-)	(-)			

Slika 12. Pregled rezultata izolata na VITEK2 Compact sistemu



### 3. REZULTATI

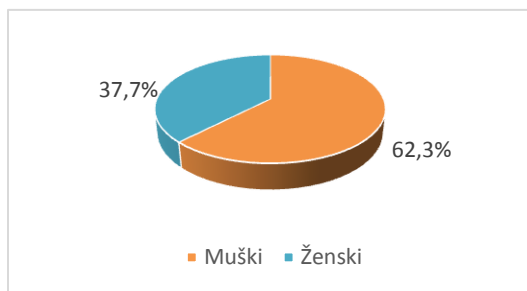
U periodu od 01.01.2016 do 01.01.2017 ukupno su ispitana 53 pacijenta. Izolati *Streptococcus pneumoniae* su dokazani iz uzoraka respiratornog trakta sa različitih odjela Kliničkog centra univerziteta u Sarajevu.

#### Pregled spola ispitanika

U tabeli 1. prikazana je zastupljenost muškog i ženskog spola ispitanika. Analizom zastupljenosti dokazano je da su muškarci bili više zastupljeni sa 33 ili 62,3% u odnosu na žene koje su bile zastupljene sa 20 ili 37,7% slučajeva. Analiza putem hi-kvadrat testa za jedan uzorak pokazuje da ne postoji signifikantna razlika u spolnoj distribuciji ( $\chi^2=3,189$ ;  $p=0,074$ ).

**Tabela 3.** Prikaz spolne zastupljenosti ispitanika prema rezultatu analize

Spol			
		N	%
	Muški	33	62,3
	Ženski	20	37,7
	Ukupno	53	100,0



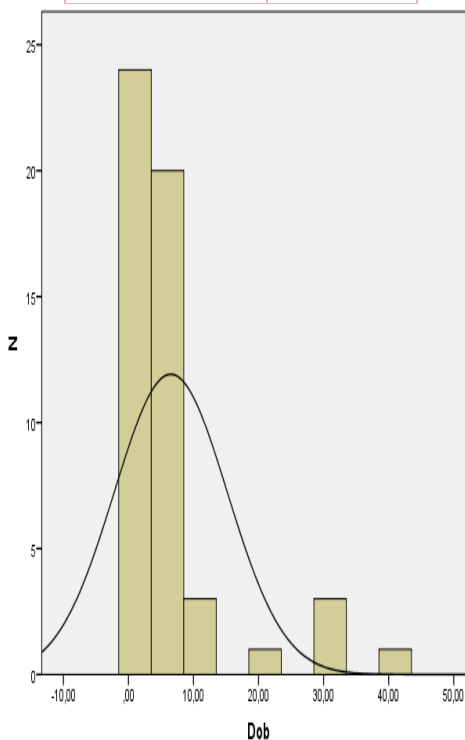
**Grafikon 1.** Grafički prikaz spolne zastupljenosti ispitanika

#### Starosna dob ispitanika

Analizom starosne strukture dokazano je da je prosječna starosna dob ispitanika iznosila  $6,5 \pm 8,7$ . Najmlađi ispitanik je imao 1 godinu, a najstariji 42. Analiza putem Studentovog t testa pokazuje da postoji signifikantno odstupanje od očekivane distribucije ( $t=5,387$ ;  $p=0,0001$ ) u smislu veće zastupljenosti ispitanika mlađe životne dobi (ispod 10 godina života).

**Tabela 4.** Prosječna starost ispitanika prema rezultatu analize

<b>Prosjek</b>	6,5000
<b>Std. greška</b>	1,20660
<b>Std. devijacija</b>	8,70091
<b>Minimum</b>	1,00
<b>Maksimum</b>	42,00



**Grafikon 2.** Grafički prikaz prosječne starosti ispitanika

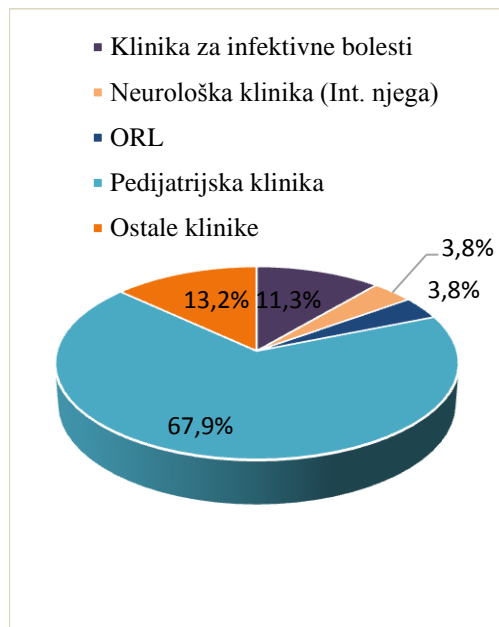


### Prikaz zastupljenosti izolata po klinikama

Analizom distribucije izolata u odnosu na klinike dokazano je da najveći broj izolata potiče sa Pedijatrijske klinike 36 (67,9%), nakon koje slijede Klinika za infektivne bolesti sa 6 (11,3%), te ORL i Neurološka klinika sa 2 (3,8%). Izolati sa ostalih klinika i ustanova su bili zastupljeni sporadično (tabela 3).

**Tabela 5.** Prikaz zastupljenosti izolata po klinikama

Klinika		
	N	%
Ambulanta	1	1,9
C-3	1	1,9
C-8	1	1,9
D.Z. Olovo	1	1,9
Klinika za hematologiju	1	1,9
Klinika za infektivne bolesti	6	11,3
Neurološka klinika (Int. njega)	2	3,8
ORL	2	3,8
Pedijatrijska klinika	36	67,9
Klinika za plućne bolesti	1	1,9
Psijatrijska klinika	1	1,9
Ukupno	53	100,0



**Grafikon 3.** Grafički prikaz zastupljenosti izolata po klinikama

### REZULTATI ISPITIVANJA OSJETLJIVOSTI/ REZISTENCIJE IZOLATA NA ANTIBIOTIKE

U datom periodu ukupno su ispitana 53 izolata. Svi izolati su testirani na sljedeće antibiotike: benzilpenicilin, oksacilin, eritromicin, azitromicin, klaritromicin, tetraciklin, hloramfenikol, gentamicin, trimetoprim sulfametoksazol, cefazolin, ceftriakson, amoksisicilin+klavulonska kiselina.

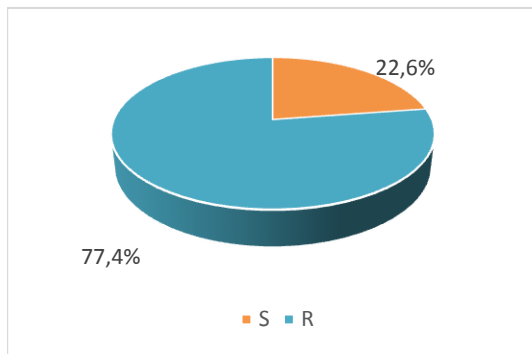
#### Prikaz osjetljivosti/ rezistencije na penicilin

Od ukupnog broja izolata (N=53), analiza je pokazala da je 12 (22,6%) izolata bilo osjetljivo na penicilin, dok je rezistencija zabilježena kod 41 (77,4%) izolata.



**Tabela 6.** Tabela prikaz rezistencije/osjetljivosti izolata na penicilin

	N	%
S	12	22,6
R	41	77,4
Ukupno	53	100,0



**Grafikon 4.** Prikaz osjetljivosti/rezistencije izolata u odnosu na rezultat analize

#### **Prikaz osjetljivosti/rezistencije na ostale antibiotike**

Komparacija osjetljivosti/rezistencije svih antibiotika u odnosu na penicilin (S – 12; 22,6% R – 41;77,4%) pokazuje slijedeće:

Oksacilin pokazuje isti omjer S i R kao i penicilin, bez signifikantne razlike ( $p>0,05$ ).

Eritromicin, azitromicin i klaritromicin pokazuju bolji omjer S:R u odnosu na penicilin (26:27), uz signifikantnu razliku ( $p<0,05$ ).

Tetraciklin pokazuje statistički značajno veću senzitivnost (34:19) u odnosu na penicilin ( $p<0,05$ ).

Gentamicin pokazuje signifikantno manju senzitivnosti (2:51) u odnosu na penicilin ( $p<0,05$ ).

Trimetoprim sulfametoksazol pokazuje veću senzitivnost (17:35) u odnosu na penicilin, bez statističke signifikantnosti ( $p>0,05$ ).

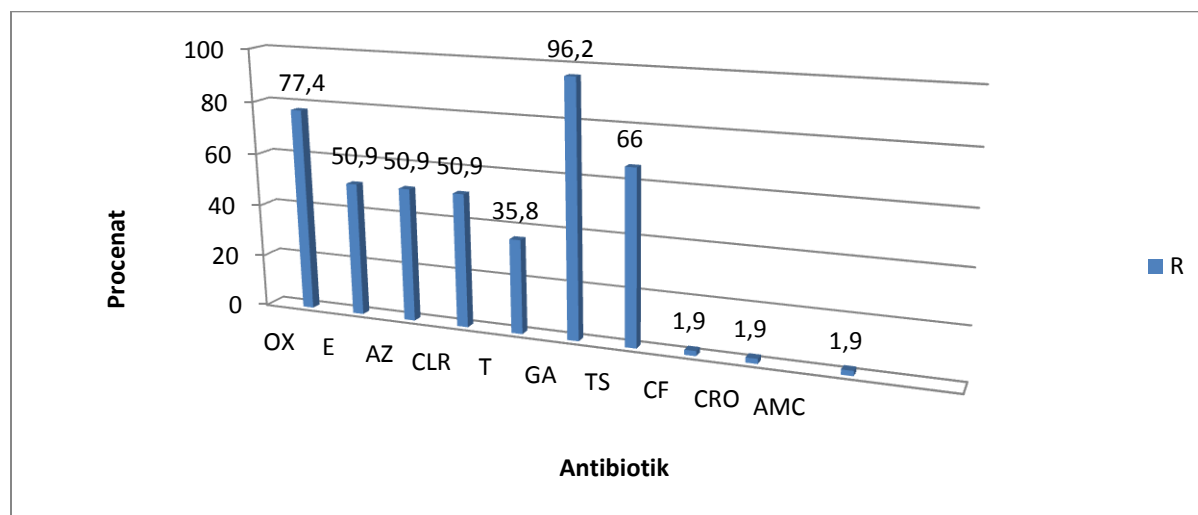
Cefazolin i ceftriakson pokazuju isti omjer S:R (52:1) u odnosu na penicilin, uz signifikantnu razliku ( $p<0,05$ ).

I amoksisicilin+klavulonska kiselina pokazuje bolju senzitivnost (51:2) u odnosu na penicilin, uz signifikantnu razliku ( $p<0,05$ ).



**Tabela 7.** Tabelarni prikaz osjetljivosti/ rezistencije izolata na ostale antibiotike

NAZIV ANTIBIOTIKA		N	%	Komparacija u odnosu na P
OXACILIN	S	12	22,6	$\chi^2=0$ p=1
	R	41	77,4	
ERITROMICIN	S	26	49,1	$\chi^2=8,04$ p=0,005
	R	27	50,9	
AZITROMYCIN	S	26	49,1	$\chi^2=8,04$ p=0,005
	R	27	50,9	
CLARITROMYCIN	S	26	49,1	$\chi^2=8,04$ p=0,005
	R	27	50,9	
TETRACYCLINE	S	34	64,2	$\chi^2=8,588$ p=0,0001
	R	19	35,8	
	N/A	1	1,9	
HLORAMFENIKOL	S	53	100,0	$\chi^2=16,862$ p=0,0001
	R	0	0,0	
GENTAMYCIN	S	2	3,8	$\chi^2=8,23$ p=0,004
	R	51	96,2	
TRIMETOPRIMSULFAMETOKSAZOL	S	17	32,1	$\chi^2=1,326$ p=0,249
	R	35	66,0	
	N/A	1	1,9	
CEFAZOLIN	S	52	98,1	$\chi^2=13,095$ p=0,0001
	N/A	1	1,9	
CEFTRIAZONE	S	52	98,1	$\chi^2=13,095$ p=0,0001
	N/A	1	1,9	
AMOXICILIN/CLAVULANIC ACID	S	51	96,2	$\chi^2=12,234$ p=0,0001
	R	1	1,9	
	N/A	1	1,9	



**Grafikon 5.** Prikaz osjetljivosti/rezistencije svih antibiotika

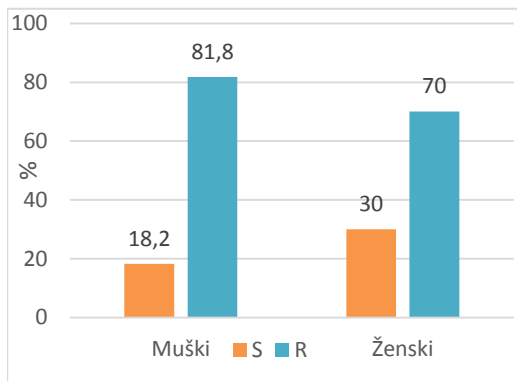


### Prikaz osjetljivosti/rezistencije na penicilin prema spolu

Komparacija spolne distribucije prikazana je u tabeli 6. Analiza senzitivnosti/rezistencije pneumokoka na penicilin u odnosu na spol pokazuje da je rezistencija zabilježena nešto češće kod muškaraca (81,8%) u odnosu na žene (70%), ali bez statistički signifikantne razlike ( $p>0,05$ ), što ukazuje da spol nema značajnog uticaja na senzitivnost/rezistenciju.

**Tabela 8.** Tabelarni prikaz rezistencije pneumokoka na penicilin prema spolu

		Spol		Ukupno
		Muški	Ženski	
S	N	6	6	12
	%	18,2	30,0	22,6
R	N	27	14	41
	%	81,8	70,0	77,4
Ukupno	N	33	20	53
	%	100,0	100,0	100,0



**Grafikon 6.** Prikaz osjetljivosti/rezistencije pneumokoka prema spolu

### Prikaz osjetljivosti/rezistencije pneumokoka na penicilin prema dobi

Komparacija prema dobi pokazuje da je senzitivnost pneumokoka zabilježena u mlađoj prosječnoj životnoj dobi ispitanika od  $4,64\pm 3,04$  godina u odnosu na rezistentne izolate koji su poticali od ispitanika u prosječnoj dobi od  $7\pm 9,64$  godina.

Zbog neravnomjerne distribucije analiza je provedena neparametrijskom metodama putem medijane i interkvartilnog raspona uz korištenje Maan-Whutney testa.

Na osnovu rezultata MW testa možemo zaključiti da se dob ne razlikuje statistički signifikantno ( $p>0,05$ ) te da dob nema značajnog uticaja na senzitivnost/rezistenciju.

**Tabela 9.** Tabelarni prikaz osjetljivosti/rezistencije pneumokoka na penicilin prema dobi ispitanika

	Dob				
	Prosjek	Std. greška	Mediana	25 percentil	95 percentil
S	4,64	3,04	4,00	2,00	10,00
R	7,00	9,64	4,00	2,00	31,00

$Z=-0,079$ ;  $p=0,937$

### Komparacija rezultata disk difuzione metode i E testa

Komparacija metoda ispitivanja prikazana je u tabeli 8. Od ukupno 12 senzitivnih izolata pneumokoka dokazanih disk difuzionom metodom, E test je potvrdio rezultat u 10 (83,3%), dok je u odnosu na 41 rezistentan izolat dokazan disk difuzionom metodom, E test potvrdio rezultat u 38 (92,7%) slučaja. Analiza testa korelacije pokazuje da je ista statistički signifikantna ( $\rho=0,739$ ;  $p<0,05$ ), te da se rezultati

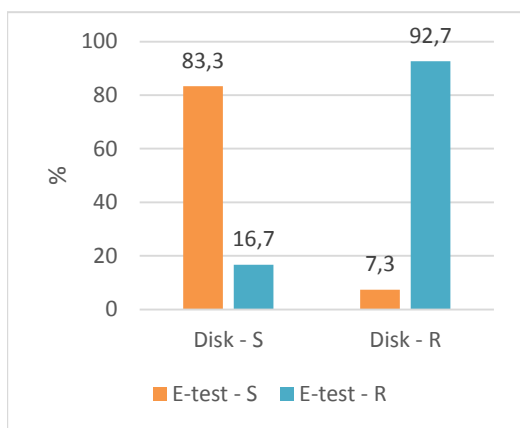




**Tabela 10.** Tabelarni prikaz komparacije rezultata dvije metode

		Disk difuziona metoda		Ukupno	
		S	R		
<b>E test - P</b>	S	N	10	13	
		%	83,3	7,3	24,5
	R	N	2	38	40
		%	16,7	92,7	75,5
<b>Ukupno</b>		N	12	41	53
		%	100,0	100,0	100,0

$\chi^2=28,977$ ;  $p=0,0001$   
 $\rho=0,739$ ;  $p=0,0001$



**Grafikon 7.** Grafički prikaz komparacije disk difuzione metode i E testa

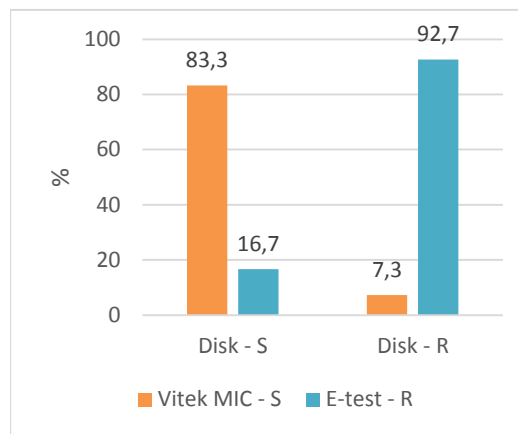
**Komparacija rezultata disk difuzione i automatske metode**

Komparacija disk difuzione i automatske metode je dala iste rezultate kao i komparacija disk difuzione metode i E testa (tabela 9). Analiza testa korelacije pokazuje da je ista statistički signifikatna ( $\rho=0,739$ ;  $p<0,05$ ), te da se rezultati dvije metode podudaraju u 73,9% slučajeva. Od ukupno 12 senzitivnih izolata pneumokoka dokazanih disk difuzionom metodom, Vitek je potvrdio rezultat u 10 (83,3%), dok je u odnosu na 41 rezistentan izolat dokazan disk difuzionom metodom, Vitek potvrdio rezultat u 38 (92,7%) slučajeva.

**Tabela 11.** Prikaz komparacije rezultata disk difuzione i automatske metode

		Disk difuziona metoda		Ukupno	
		S	R		
<b>Vitek MIC za P</b>	S	N	10	13	
		%	83,3	7,3	24,5
	R	N	2	38	40
		%	16,7	92,7	75,5
<b>Ukupno</b>		N	12	41	53
		%	100,0	100,0	100,0

$\chi^2=28,977$ ;  $p=0,0001$   
 $\rho=0,739$ ;  $p=0,0001$



**Grafikon 8.** Grafički prikaz komparacije rezultata disk difuzione i automatske metode

**Komparacije rezultata E testa i automatske metode**

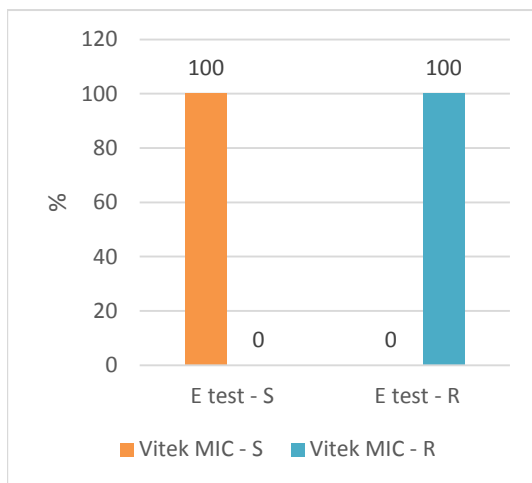
Komparacijom metoda E testa i automatske metode, rezultati ispitivanja su pokazali da je dokazan isti procenat rezistencije/osjetljivosti pneumokoka putem E testa i određivanja MIC putem automatske metode Vitek (tabela10). Rezultat analize korelacije pokazuje da je ista statistički signifikatna ( $\rho=1$ ;  $p<0,05$ ), te da se rezultati dvije metode podudaraju u 100 % slučajeva.



**Tabela 12.** Tabela prikaz komparacije rezultata E testa i automatske metode

		E test		Ukupno
		S	R	
Vitek MIC za P	S	N 13	0	13
		% 100,0	0,0	24,5
	R	N 0	40	40
		% 0,0	100,0	75,5
Ukupno	N	13	40	53
	%	100,0	100,0	100,0

$\chi^2=53,000$ ;  $p=0,0001$   
 $\rho=1$ ;  $p=0,0001$



**Grafikon 9.** Grafički prikaz komparacije rezultata E testa i automatske metode

#### 4. DISKUSIJA

Prošlo je više od 70 godina od početka masovne primjene antibiotika, pa se razvoj rezistencije može smatrati očekivanim procesom evolucije, odnosno razvojem genetskih modifikacija, tj. adaptacije bakterija na novonastalu situaciju u okruženju. S obzirom na kratko vrijeme od samo 20 minuta za koje se broj mnogih bakterija duplira, postaje jasno koliko su velike mogućnosti za razvoj rezistencije. Problem rastuće rezistencije bakterija na propisane antibiotike posebno je izražen u ambulantnim i hospitalnim uslovima (18).

Povećanje antibiotske rezistencije je upravo srazmjerno porastu upotrebe antibiotika u liječenju infekcija (19). Naime, najveći broj rezistentnih bakterija je vezan za bolničke infekcije, vjerovatno zato što antibiotici spadaju u najčešće propisivane i korištene lijekove kod hospitalizovanih bolesnika. Tako se procenjuje da oko 30-50% hospitalizovanih bolesnika primaju antibiotike, a da 50% njih nije adekvatno propisano (20). Poseban problem predstavlja njihova neracionalna, profilaktička upotreba kao i farmakoterapijski neopravdane kombinacije dva ili više antibiotika istovremeno koje mogu dovesti do razvoja rezistencije (21).

Međutim, iako se antibiotici koriste još od 1940. godine multicentrične, prospektivne, kliničke studije počinju da se sprovode tek u ranim devedesetim godinama prošlog vijeka. Jedna od najranijih studija praćenja bila je *Aleksandar studija*, koja je započeta 1992. godine i bila fokusirana isključivo na respiratorne infekcije (22). Od tada pa do danas, sprovode se brojne kliničke studije praćenja potrošnje antibiotika sa posebnim osvrtom na antibiotsku rezistenciju: SMART, EARS-net, PROTEKT, SENTRY i TEST studija, koje se često citiraju u stručnim i naučnim krugovima (23).

Istraživanje o fenotipskim metodama i njihovom značaju u detekciji penicilin rezistentnog *Streptococcus pneumoniae* je provedeno u periodu 01.01.2016-01.01.2017 u KCUS. Ispitana su 53 izolata pneumokoka sa ciljem dokazivanja osjetljivosti/rezistencije na penicilin.



Analiza spolne distribucije ispitanika je pokazala da su muškarci bili više zastupljeni sa 33 (62,3%), a žene sa 20 (37,7%), ali nije dokazana statistički značajna razlika.

Prema rezultatima slične studije tokom 2012.-2013. godine kojom su obuhvaćeni svi bolesnici do 18 godina starosti kojima je izoliran pneumokok iz primarno sterilnih materijala, od 67 ispitanika, ženskog spola je bilo 35 (52,24%), dok je 32 (47,76%) bilo muškog spola (24).

Ispitivanjem učestalosti izolata pneumokoka rezistentnih na penicilin u našem istraživanju utvrđeno je da 22,6 % (12) izolata bilo osjetljivo na penicilin, dok je kod 77,4 % (41) izolata utvrđena rezistencija.

Prema sličnoj studiji Jovanović i saradnici koja je obuhvatala period 2014. do 2015. godine, rezultati su pokazali da od 61 ispitanog soja *Streptococcus pneumoniae* na penicilin je bilo osjetljivo 21 (34,4%). Njihova vrijednost je bila manja od 0,06 µg/ml. Smanjenu osjetljivost na penicilin pokazalo je 40 (65,6%) sojeva (16).

Devedesetih godina otpornost pneumokoka na penicilin je na globalnom nivou dostigla 37%, od čega je 23% sojeva bilo potpuno rezistentno (25). Aleksandar projekat je pokazao porast rezistencije na penicilin u mnogim dijelovima svijeta. U SAD u desetogodišnjem periodu (1992.-2001.godine) rezistencija je porasla sa 5,6% na 20,4%, u Španiji sa 24,9% na 31,2% i u Francuskoj sa 7,7% na 35,8% (26). Nakon uvođenja konjugovane pneumokokne vakcine početkom 2000. godine, dolazi do postepenog smanjenja zastupljenosti rezistencije na penicilin. Prema podacima PROTEKT US studije

koja je obuhvatila 39 495 izolata pneumokoka od pacijenata sa vanbolničkom pneumonijom u SAD u periodu od 2001.-2004. godine, dolazi do postepenog pada rezistencije pneumokoka na penicilin sa 26,3% na 16,5%. Sa druge strane, zapažen je porast prevalencije multirezistentnih sojeva (27).

Prema podacima španske referentne laboratorije, u periodu od 1999.-2008. godine zastupljenost PNSP progresivno opada sa 33,9% na 22,3%. Pad zastupljenosti PNSP je naročito zabilježen u periodu 2005.-2008. godine, što je povezano sa uvođenjem PCV7 vakcine za djecu (28).

Podaci ABCs programa (*engl.* The Active Bacterial Core Surveillance) ukazuju da je u SAD 2007. godine neosjetljivost *S.pneumoniae* na penicilin iznosila 25,6%, da bi 2008. godine pala na 24,8% a već 2010. godine na 10,6% (29).

Na izvještavanje o osjetljivosti pneumokoka na penicilin su uticale promjene u graničnim vrijednostima. Prema starim graničnim vrijednostima, soj pneumokoka se smatrao osjetljivim ukoliko mu je vrijednost MIK penicilina iznosila  $\leq 0,06$  µg/ml, bez obzira na vrstu materijala iz kojeg je soj izolovan i način davanja lijeka. Uprkos porastu rezistencije pneumokoka na penicilin u mnogim djelovima svijeta, zapažen je nedostatak korelacije između rezistencije *in vitro* sa kliničkim odgovorom kod nemeningealnih pneumokoknih infekcija (30). U Evropi je, u periodu od 2008.-2011. godine primjećen trend značajnog opadanja rezistencije na penicilin kod pneumokoka u Belgiji, Francuskoj i Španiji, u kojima je registrovano <1%, 27%, odnosno 22% PNSP. Sa druge



strane trend signifikantnog porasta neosjetljivosti *S. pneumoniae* na penicilin je zabilježen u Bugarskoj (37%), Irskoj (20%) i Luksemburgu (19%) (31). U južnoevropskim zemljama je zabilježen viši nivo rezistencije nego u zapadnoevropskim zemljama. U južnim i istočnim zemljama Mediterana zastupljenost PNSP je i dalje bila visoka. U prosjeku je 26% invazivnih izolata pneumokoka bilo neosjetljivo na penicilin, sa najvišom rezistencijom u Alžiru 44% i Libanu 40% (32).

Krajem 2012. godine je, u nekoliko evropskih zemalja, vodič za ispitivanje antimikrobne rezistencije prema CLSI zamijenjen vodičem koji preporučuje EUCAST. Prema kriterijumima EUCAST definisane su strožije granične vrijednosti osjetljivosti pneumokoka na penicilin. Korištenje kriterijuma EUCAST se odrazilo na izvještavanje o porastu rezistencije pneumokoka na penicilin i cefotaksim, a samim tim i na korištenje povećanih doza antibiotika i na povećanu upotrebu lijekova druge i treće linije u liječenju infekcija respiratornog trakta. Naime, oba korištena standarda (CLSI i EUCAST) baziraju svoje granične vrijednosti u odnosu na dozu lijeka i vrijeme davanja lijeka (33).

Prema podacima EARS-Neta iz 2012. godine, zastupljenost invazivnog PNSP u Evropi iznosi 11,6%. Najviše vrijednosti su zabilježene na Malti (38,9%), u Rumuniji (37,2%) i Bugarskoj (28,6%), a najniže u Estoniji (0%), Belgiji (1,5%) i Holandiji (1,5%). Trend porasta rezistencije pneumokoka na penicilin je tokom 2009-2012. godine zabilježen u Belgiji, Danskoj, Finskoj, Norveškoj i Velikoj Britaniji, dok je značajan pad rezistencije zabilježen u Francuskoj,

Luksemburgu i Portugalu (34).

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 (35). Studija o osjetljivosti pneumokoka u Bugarskoj iz 2014. godine prikazala je 28,1% rezistentnih izolata (36). U zemljama Mediterana, gdje su stope rezistencije pneumokoka na antibiotike bile tradicionalno visoke, bilježi 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%) (37).

Rezistencija na penicilin je često povezana sa rezistencijom na druge klase antibiotika tzv. korezistencija. Istovremena rezistencija pneumokoka na makrolide i penicilin se posljednjih godina sve više širi.

U našem istraživanju, od ukupnog broja izolata (N=53), njih 26 (49,1%) je bilo osjetljivo na eritromicin, dok je rezistencija zabilježena kod 27 (50,9%) izolata.

Prema istraživanju sprovedenom u Srbiji u periodu od 2014. do 2015. koje je obuhvatilo 61 soj *Streptococcus pneumoniae* izolovan iz sadržaja srednjeg uha pacijenata mlađih od 5 godina, rezultati su pokazali da je rezistencija na eritromicin zabilježena kod čak 40 (65,6%) izolata, dok je 21 (34,4%) soj bio osjetljiv (16).

Prevalencija takvih sojeva značajno varira među državama (22).



U periodu od 2003.-2005. godine u zemljama Mediterana je zapažena visoka prevalencija kombinovane rezistencije na ova dva antibiotika, sa najvišim vrijednostima u Tunisu 24%, dok je u Egiptu iznosila svega 3% (20). U Španiji je nivo udružene rezistencije među pedijatrijskim izolatima varirao između 24% i 35% u periodu od 1997.-2003. godine. Nakon toga dolazi do značajnog i progresivnog pada udružene rezistencije na 11,5% u 2008. godini (38).

U našem istraživanju je dokazana visoka rezistencija na makrolide. Rezultati su pokazali da je od ukupnog broja izolata (N=53), rezistencija zabilježena kod 27 (50,9%) izolata.

Prema poslednjim podacima EARS-Neta-a iz 2012. godine zastupljenost udružene rezistencije na penicilin i makrolide u Evropi iznosi 8,7%. Kreće od 0% u Estoniji i Litvaniji do preko 30% na Malti (38,9%) i u Rumuniji (32,5%). Tokom 2009.-2012. godine je trend značajnog porasta MRPNSP sojeva zabilježen u Danskoj, Litvaniji, Norveskoj, Španiji, Švedskoj i Velikoj Britaniji. Međutim, u zemljama poput Francuske i Portugala uočen je pad (34).

U našem istraživanju rezistencija na hloramfenikol nije zabilježena. Od ukupno izolovanih 53 izolata pneumokoka, svi su bili osjetljivi na ovaj antibiotik.

Hloramfenikol se decenijama koristio u empirijskoj terapiji akutnog bakterijskog meningitisa. Rezistencija na hloramfenikol je češća među PNSP sojevima i 2003. godine u Španiji je iznosila 21% (39). U periodu od 2008.-2012. godine rezistencija invazivnih sojeva pneumokoka na Tajvanu je iznosila 26,2% (40), a u nekim zemljama

je dostigla čak 40% (41). Sa druge strane, u Brazilu je, tokom 2010. godine rezistencija pneumokoka na hloramfenikol iznosila svega 3,3% (42). U Grčkoj je rezistencija pneumokoka na hloramfenikol takođe niska ali je zapažen porast rezistencije sa 0,7% (2009. godine) na 3,2% (2012. godine) (43). Porast rezistencije na hloramfenikol bi mogao da se očekuje i u drugim zemljama u kojima se hloramfenikol intenzivno koristi i gde se ne sprovodi vakcinacija protiv pneumokoka.

U odnosu na metodologiju ispitivanja korištenu u našoj studiji, disk-difuzioni metod, prvi put opisan 1966. godine je dobro standardizirana i širom svijeta primijenjena metoda. Uz manje modifikacije prihvaćena je kao referentna metoda za rutinsku primjenu u laboratorijama. Iako je difuziona metoda prihvaćena kao standard u mikrobiološkim laboratorijama, postoje slučajevi kada su rezultati ove metode nedovoljni. U teškim, prolongiranim infekcijama (npr. endokarditis) potrebno je kvantitativnom metodom odrediti preciznu dozu antibiotika (44).

U toku našeg istraživanja komparacijom metoda ispitivanja zabilježeno je da je od ukupno 12 izolata osjetljivih na penicilin dokazanih disk- difuzionom metodom, E test potvrdio rezultat u 10 (83,3%), dok je u odnosu na 41 rezistentan izolat potvrdio isti u 38 (92,7%) izolata. Analiza testa korelacije pokazuje da se rezultati dvije metode podudaraju u 73,9% slučajeva. Dodatna analiza ove dvije metode je pokazala senzitivnost 83,3%, specifičnost 92,7%, PPV(S) 76,9% te NPV(R) 95%. Komparacijom E testa i automatske metode, dokazan je isti procenat



rezistencije/osjetljivosti izolata sa obje primjenjene metode. Za ispitivanje osjetljivosti pneumokoka na penicilin upotrebljava se disk oksacilina kao skrining metod. Prema smjernicama EUCAST ukoliko je zona inhibicije rasta oksacilina manja od 20 mm, upućuje se na određivanje vrijednost MIC-a. Naša studija je pokazala testom korelacije da je metod izbora za određivanje MIC-a penicilina neka od primjenjenih metoda ispitivanja i to E test i/ili automatska metoda ispitivanja. Prema rezultatima koji se dobiju određivanjem MIC-a vrši se interpretacija osjetljivosti na penicilin (S, R). Disk-difuziona metoda ostaje metoda izbora za visoko osjetljive izolate pneumokoka i koristi se kao rutinska u većini laboratorija.

Iako nema komercijalnih testova, razvijeno je više protokola za reakcije PCR pomoću kojih je moguće identifikovati gene specifične za *S. pneumoniae*. Detektuju se *lytA*gen (za autolizin), *ply*gen (za pneumolizin), *psaA*gen (za pneumokokni površni adhezin). Od gore pomenutih gena, *lytA*gen se smatra najspecifičnijim za pneumokok, s obzirom da se ostala dva relativno često nalaze i kod ostalih streptokoka iz grupe *mitis*. Za identifikaciju pneumokoka je, takođe, vrlo specifičan PCR za detekciju 16S Rrna (45). Molekularne metode također, omogućuju praćenje gena rezistencije kod pneumokoka. Novi RT PCR testovi mogu detektovati gene rezistencije direktno iz kliničkih uzoraka u par sati.

Praćenje otpornosti pneumokoka na antibiotike je prijeko potrebna polazišna tačka za sve intervencije usmjerene prema kontroli razvoja i širenja otpornosti. Podaci o otpornosti u vlastitoj sredini moraju biti osnova za

osmišljavanje empirijske terapije, kako bi bila što uspješnija u liječenju svakoga pojedinačnoga bolesnika, te ujedno učinkovita u sprječavanju širenja otpornih sojeva u zajednici. Uspjeh pojedinih intervencija usmjerenih prema smanjenju otpornosti na antibiotike, može se mjeriti jedino ako postoje podaci o razini otpornosti prije intervencije i poslije nje.

U borbi protiv širenja rezistencije pneumokoka na antibiotike ključnu ulogu imaju i znanstvena istraživanja kojima se otkrivaju novi mehanizmi rezistencije i mogućnosti njihove prevencije i kontrole.

## 6. LITERATURA

1. O'Brien KL, Santosham M. Potential impact of conjugate pneumococcal vaccines on pediatric pneumococcal diseases. *Am J Epidemiol.* 2004; 159:634–644.
2. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet.* 2009; 374(9693):893–902.
3. Begovac J, Božinović D, Lisić M, Baršić B, Shoenwald S. *Infektologija*. Zagreb. 2006. Profil International.
4. Bešlić E, saradnici. *Medicinska mikrobiologija*. Sarajevo 2010; 208-209.
5. Murray PR, *Streptococcus and enterococcus*. In: Murray PR, Rosenthal KS & Pfaller MA. *Medical microbiology*. 8 th edition. Philadelphia: Elsevier, 2016; 195-199.
6. Hukić M, Gram-pozitivne koke. U: Hukić, M, saradnici. *Bakteriologija*. Sarajevo: Jež, 2005; 170-171.



7. Kalenić S, Streptokoki. U: Kalenić S, saradnici. Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada, 2013; 134-138.
8. Hardy GG, Magee AD, Ventura CL, Caimano MJ, Yother J. Essential role for cellular phosphoglucosyltransferase in virulence of type 3 *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2001; 69:2309–2317.
9. Jin P, Kong F, Xiao M, Oftaden S, Zhou F, Liu C, et al. First report of putative *Streptococcus pneumoniae* serotype 6D among nasopharyngeal isolates from Fijian children. *J Infect Dis*. 2009; 200:1375–1380.
10. Calix JJ, Nahm MH. A new pneumococcal serotype, 11E, has a variably inactivated *wcjE* gene. *J Infect Dis*. 2010; 202(1):29–38.
11. Abeyta M, Hardy GG, Yother J. Genetic alteration of capsule type but not *PspA* type affects accessibility of surface-bound complement and surface antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2003; 71:218–225.
12. Markiewicz Z, Tomasz A. Variation in penicillin-binding protein patterns of penicillin-resistant clinical isolates of pneumococci. *J Clin Microbiol* 1989; 27:405-410.
13. Jabes D, Nachman S, Tomasz A. Penicillin-binding protein families: evidence for the clonal nature of penicillin resistance in clinical isolates of pneumococci. *J Infect Dis* 1989; 159:16-25.
14. Munoz R, Musser JM, Crain M, Briles DE, Marton A, Parkinson AJ, et al. Geographic distribution of penicillin-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*: characterization by penicillin-binding protein profile, surface protein A typing, and multilocus enzyme analysis. *Clin Infect Dis* 1992; 15:112-8.
15. Markovinović L. Klinička slika invazivne pneumokokne bolesti u djece. *Pediatr Croat*. 2011; 55(Supl 1):81-90.
16. Jovanović L, Isailović K, Opavski N. Frequency of resistance to penicillin and erythromycin of pneumococcal strains that caused otitis media. *MedPodml* 2017; 68(1):26-30.
17. Karakašević B, saradnici. *Mikrobiologija i parazitologija*. Medicinska knjiga. Beograd-Zagreb. 1987; 626-630.
18. Vlahović-Palcevski V, Morović M, Palcevski G, Betica-Radić L. Antimicrobial utilization and bacterial resistance at three different hospitals. *Eur J Epidemiol* 2001; 17(4):375–383.
19. Raymond DP, Pelletier SJ, Sawyer RG. Antibiotic utilization strategies to limit antimicrobial resistance. *Semin Respir Crit Care Med* 2002; 23(5):497–501.
20. Willemsen I, Groenhuijzen A, Bogaers D, Stuurman A, van Keulen P, Kluytmans J. Appropriateness of antimicrobial therapy measured by repeated prevalence surveys. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(3):864–867.
21. Goosens H. Antibiotic consumption and link to resistance. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(3):12-5.
22. Felmingham D, White AR, Jacobs MR, Appelbaum PC, Poupard J, Miller LA, et al. The Alexander Project: the benefits from a decade of surveillance. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:ii3-ii21.
23. Hawser S. Surveillance programmes and antibiotic resistance: Worldwide and regional monitoring of antibiotic resistance trends. *Antibiotic Resist* 2012; 211:31-43.
24. Martinović I. Mogućnost prevencije invazivne pneumokokne bolesti kod djece u Hrvatskoj. *Pediatr Croat* 2015; 49 (Supl 1): 198-201.



25. Felmingham D, Canton R and Jenkins SG. Regional trends in beta-lactam, macrolide, fluoroquinolone and telithromycin resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates 2001–2004. *J Infect.* 2007; 55:111–118.
26. Felmingham D, White AR, Jacobs MR, Appelbaum PC, Poupard J, Miller LA, et al. The Alexander Project: the benefits from a decade of surveillance. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(suppl 2):ii3–ii21.
27. Jenkins SG, Brown SD, Farrell DJ. Trends in antibacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA: update from PROTEKT US Years 1–4. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2008; 7: 1–11.
28. Fenoll A, Granizo JJ, Aguilar L, Gimenez MJ, Aragonese-Fenoll L, Hanquet G, et al. Temporal trends of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antimicrobial resistance patterns in Spain from 1979 to 2007. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 1012-1020.
29. Centers for Disease Control and Prevention. ABCs Report: *Streptococcus Pneumoniae*. 2010[cited 2011 December]. Available from: <http://www.cdc.gov/abcs/index.htm./15/11/2012>.
30. Weinstein MP, Klugman KP, Jones RN. Rationale for revised penicillin susceptibility breakpoints versus *Streptococcus pneumoniae*: coping with antimicrobial susceptibility in an era of resistance. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48(11):1596–1600.
31. European Antimicrobial Resistance Surveillance System. (EARSS, 2010). Available from: [http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111\\_SU\\_R\\_AMR\\_data.pdf/12/5/2012](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111_SU_R_AMR_data.pdf/12/5/2012).
32. Borg MA, Tiemersma E, Scicluna E, Sande-Bruinsma N, Kraker M, Monen J, et al. ARMed Project members and collaborators. Prevalence of penicillin and erythromycin resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates reported by laboratories in the southern and eastern Mediterranean region. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15:232–237.
33. Marchese A, Esposito S, Barbieri R, Bassetti M, Debbia E. Does the adoption of EUCAST susceptibility breakpoints affect the selection of antimicrobials to treat acute community-acquired respiratory tract infections *BMC Infectious Diseases.* 2012; 12:181.
34. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net): Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillanceeurope-2012.pdf./8/3/2013/>.
35. Fürst J, Čižman M, Mrak J, Kos D, Campbell S, Coenen S, 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):279-289.
36. 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; 12:16.





37. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, EARS, Annual report 2013.
38. Linares J, Ardanuy C, Pallares R, Fenoll A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16: 402-410.
39. Hernández M, Mejía GI, Trujillo H, Robledo J. Effectiveness of the antibiotics chloramphenicol and rifampin in the treatment of *Streptococcus pneumoniae*-induced meningitis and systemic infections. *Biomedica.*2003; 23(4):456-461
40. Chen YY, Yao SM, Chen YH, Jiang SF, Kuo TL, Chen TL, et al. Antimicrobial susceptibility of invasive *Streptococcus pneumoniae* in Taiwan, 2008-2012. *Taiwan Epidemiol Bull.* 2013; 29(19):232-251.
41. Manning L, Laman M, Greenhill AR, Michael A, Siba P, Mueller I, Davis TM. Increasing chloramphenicol resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates from Papua New Guinean children with acute bacterial meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(9):4454-4456.
42. Neves FPG, Castro Abreu Pinto T, Alves Corrêa A, Barreto R, Moreira G, Rodrigues-Gomes H, et al. Nasopharyngeal carriage, serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* among children from Brazil before the introduction of the 10-valent conjugate vaccine. *BMC Infectious Diseases* 2013; 13:318.
43. Maraki S, Papadakis IS. Antimicrobial resistance trends among community-acquired respiratory tract pathogens in Greece, 2009.:2012. *The Scientific World Journal*. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/941564>./12/9/2011.
44. Van Bambeke F, Reinert R, Appelbaum P, Tulkens PM, Peetermans WE. Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* infections. *Drugs.* 2007; 67:2355–2382.
45. Rantala M, Huikko S, Huovinen P, Jalava J. Prevalence and Molecular Genetics of Macrolide Resistance among *Streptococcus pneumoniae* Isolates Collected in Finland in 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(10):4180–4184.



## PHENOTYPIC METHODS AND THEIR IMPORTANCE IN THE DETECTION OF PENICILIN RESISTANT *STREPTOCOCCUS* *PNEUMONIAE*

Osmanović L.

### ABSTRACT

*Streptococcus pneumoniae* is a leading cause of upper respiratory tract infections (sinusitis, otitis) and conjunctivitis. It is also the most common cause of community-acquired pneumonia, bacterial meningitis and sepsis. Resistance to penicilin is mediated in pneumococcus by change of locus. Locus for penicilin is so called penicilin binding proteins (PBP). Pneumococci have 6 of such molecules:

1A, 1B, 2A, 2B, 2X and 3, and resistant strings have changed PBP molecules which show lower affinity for penicilin. Change of molecules of PBP comes from great tendency of pneumococcus to transform genes, that is to build in foreign DNA from the environment into its own genome. Foreign DNA comes from viridans streptococci with whom pneumococci share habitat in the mucus of upper respiratory pathways. The aim of this thesis is to check the frequency of the isolate of *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicilin, and to show and compare phenotype methods of detection of pneumococci resistance to penicilin. Research has been done based on the data of patients in the period from 01.01.2016 to 01.01.2017 in OJ Klinička Mikrobiologija UKC Sarajevo. Diffusion test, E test and automated VITEK 2 system were used to determine phenotypes of resistant pneumococci.

### *Corresponding author:*

*Lejla Osmanović, MA graduate eng. of MLD  
Clinical Center of the University of Sarajevo  
O.J. Clinical microbiology  
E-mail: osmanovic\_lejla@yahoo.com  
Tel: 0038761/218-002*