



IZMENA FENOTIPOVA REZISTENCIJE NA MAKROLIDE  
KOD FARINGEALNIH SOJEVA STREPTOKOKA  
GRUPE A U DEČIJOJ POPULACIJI

*CHANGES IN MACROLIDE RESISTANCE PHENOTYPE IN  
PHARYNGEAL GROUP A STREPTOCOCCI  
ISOLATES IN CHILDREN*

Pavle Vuksanović<sup>1</sup>, Nataša Opavski<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

<sup>2</sup> Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za mikrobiologiju, Beograd, Srbija

**Correspondence:** pavlius3@yahoo.com

Abstract

**Introduction:** The second drugs of choice for treatment of pharyngitis caused by *Streptococcus pyogenes* (*S.pyogenes*; group A streptococcus – GAS) are macrolides. In the last few years in Serbia the resistance of GAS to erythromycin was moderately high.

**Aim:** The aim of this study was to determine if there was a change in 2016 - 2017 in incidence and phenotypes of macrolide resistance in pharyngeal GAS isolates compared to previous years.

**Material and methods:** The study included 107 isolates of GAS obtained from throat swabs of children with pharyngitis under the age of 18 during a two and a half month period in 2016–2017 in Belgrade. Resistance of GAS isolates to antibiotics was examined using disk diffusion method, macrolide resistance phenotypes by D test, and the minimal inhibitory concentrations (MICs) of erythromycin and clindamycin was determined by E test. The results of this study were compared with results obtained from previous studies.

**Results:** Resistance to erythromycin was observed in 6.5% isolates, which represents a fall in comparison with the period between 2008 and 2009. There was a change in the dominant macrolide resistant phenotype - M phenotype was dominant in the above mentioned period, while cMLSb (71.4%) dominates in the present period. Resistance to trimethoprim + sulfamethoxazole (98.1%), clindamycin (4.7%) and tetracycline (2.8%) was noticed as well.

**Conclusion:** *S.pyogenes* resistance to macrolides in Serbia is above regional average, even though there has been a fall in the resistance rate, as well as the change in macrolide resistance phenotype frequency compared to the 2008 – 2009 period. All this indicates the necessity of continuous monitoring of resistance and GAS resistance phenotype to macrolides.

**Keywords:**

*Streptococcus pyogenes*,  
pharyngitis,  
macrolides,  
resistance



## Sažetak

**Uvod:** Za lečenje faringitisa izazvanog bakterijom *Streptococcus pyogenes* (*S.pyogenes*; grupa A streptokoka - GAS) se, pored penicilina, često koriste i makrolidi. U Srbiji je u prethodnom periodu rezistencija GAS na eritromicin bila umereno visoka.

**Cilj:** Cilj ovog rada je bio da se ispita da li je u 2016. - 2017. godini došlo do izmena u incidenciji i fenotipovima rezistencije faringealnih izolata GAS na makrolide u odnosu na raniji period.

**Materijal i metode:** Istraživanje je obuhvatilo 107 sojeva GAS izolovanih od dece obolele od faringitisa u dvoipomesečnom periodu tokom 2016. - 2017. godine, u Beogradu. Osetljivost izolata na antibiotike je ispitana disk difuzionom metodom antibiograma; fenotipovi rezistencije na makrolide D testom, a vrednost minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) eritromicina i klindamicina je određena E testom. Podaci iz ovog istraživanja su upoređeni sa rezultatima koji su dobijeni prethodnih godina.

**Rezultati:** Rezistencija na eritromicin je uočena kod 6,5% izolata, što predstavlja pad u odnosu na period između 2008. - 2009. godine. Došlo je i do promene dominantnog fenotipa makrolidne rezistencije – dok je u prethodnom periodu najčešći bio M fenotip, sada je to cMLSb (71,4%). Pored rezistencije na eritromicin, primećena je i rezistencija i na: trimetoprim + sulfametoksazol (98,1%), klindamicin (4,7%) i tetracikline (2,8%).

**Zaključak:** Iako je kod nas, u odnosu na raniji period, došlo do pada stope rezistencije faringealnih izolata *S.pyogenes* na makrolide, i dalje je nivo rezistencije iznad proseka u regionu. Niskorezistentni M fenotip, koji je bio dominantan 2008. - 2009. godine je zamenio visokorezistentni MLS. Kako bi se pratile promene u dinamičnoj populaciji GAS, neophodno je dalje kontinuirano praćenje rezistencije i fenotipa rezistencije GAS na makrolide.

### Ključne reči:

*Streptococcus pyogenes*,  
GAS,  
faringitis,  
makrolidi,  
rezistencija

## Uvod

*Streptococcus pyogenes* (*S.pyogenes*; grupa A streptokoka – GAS) je najčešći bakterijski izazivač faringitisa od koga pretežno oboljeva mlađa populacija, naročito deca. U zavisnosti od uzrasta i regije, procenjuje se da je GAS uzročnik faringitisa kod 25% (1) do 37% (2) dece i 5-10% odraslih (3).

S obzirom na to da je *S.pyogenes* jedna od retkih bakterija koja je osetljiva na penicilin, ovaj antibiotik je i dalje lek izbora za lečenje streptokoknog faringitisa. U slučaju da je obolela osoba alergična na penicilin alternativa su makrolidi, najčešće eritromicin. Rezistencija na makrolide je prvi put opisana 1958. godine u Velikoj Britaniji, zatim 1968. godine u Sjedinjenim Američkim Državama (4). Do sada je opisano više mehanizama rezistencije na makrolide, ali su dva najčešća - metilacija ribozoma i efluks pumpa. Prvi mehanizam je posredovan metilazama, koji su produkti gena *erm(A)* i *erm(B)*. Pod dejstvom metilaza dolazi do metilacije ciljnog mesta vezivanja antibiotika i udružene rezistencije na tzv. MLSb grupu antibiotika - makrolide, linkozamide i streptogramin B. Ovaj MLSb fenotip se karakteriše visokim nivoom rezistencije na sve tri grupe antibiotika. Može da se eksprimira kao konstitutivni (cMLSb) i inducibilni (iMLSb) tip. Drugi mehanizam nastaje usled dejstva efluks pumpe, koja je produkt *mef(A)* gena. Na ovaj način nastaje rezistencija niskog nivoa, i to samo na makrolide sa 14- i 15-članim prstenom, Ekspirimira se kao M fenotip (5).

Studija sprovedena u Srbiji tokom devedesetih godina 20. veka je pokazala da je nivo rezistencije faringealnih sojeva GAS bio 2,41%, dok je u periodu 2008. - 2009. godina došlo do skoka na 12,5% (6). Najveći broj izolata

GAS je ekspirimirao M fenotip.

Imajući u vidu da je populacija grupe A streptokoka vrlo dinamična, cilj ovog rada je bio da se ispita da li je došlo do promena u osetljivosti faringealnih izolata *S.pyogenes* na makrolide, kao i u fenotipovima rezistencije na ove antibiotike.

## Materijal i metode

Istraživanje je obuhvatilo 107 sojeva GAS izolovanih iz briseva grla dece mlađe od 18 godina obolele od faringitisa na teritoriji grada Beograda u periodu od 22.11.2016. do 9.02.2017. godine. Nakon izolacije i preliminarne identifikacije, izolati su iz tri mikrobiološke laboratorije slati u Nacionalnu referentnu laboratoriju za streptokok (NRL za streptokok) na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, gde su konzervirani i dalje ispitivani.

Identifikacija izolata je izvršena na osnovu prisustva  $\beta$  hemolize, osetljivosti na bacitracin (0,04 U, BioRad, Francuska), kao i metodom lateks aglutinacije sa grupno specifičnim antitelima za grupu A streptokoka (AVIPATH® STREP, Omega, UK). Njihova osetljivost je ispitivana na sledeće antibiotike: penicilin (1 IU), eritromicin (15  $\mu$ g), klindamicin (2  $\mu$ g), tetraciklin (30  $\mu$ g), norfloksacin (10  $\mu$ g), hloramfenikol (30  $\mu$ g) i trimetoprim + sulfametoksazol (1,25 $\mu$ g + 23,75  $\mu$ g) (BioRad, Francuska). Ispitivanje rezistencije na antibiotike je rađeno na Mueller-Hinton agaru sa dodatkom 5% konjske krvi i 20 mg/L  $\beta$ -NAD-a (MH-F agar) (bioMerieux, Francuska) disk difuzionim metodom, prema preporukama Evropskog komiteta za ispitivanje osetljivosti bakterija na antibiotike, EUCAST (7).

Ploče su zasejane bakterijskom suspenzijom u fiziološkom rastvoru koja odgovara gustini standarda turbiditeta 0,5 *McFarland*. Potom su stavljani diskovi gore navedenih antibiotika. Podloge su zatim inkubirane 18-20 sati na temperaturi od 35°C u aerobnim uslovima. Kao kontrolni soj je korišćen *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. Tumačenje rezultata je rađeno u skladu sa preporukama EUCAST (8).

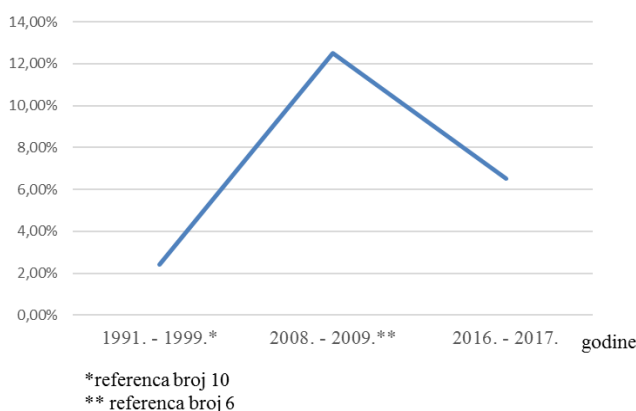
U cilju određivanja fenotipa rezistencije na makrolide je rađen test dvostruke disk difuzije, odnosno D-test. Diskovi eritromicina (15 µg) i klindamicina (2 µg) su postavljani na rastojanju od 12 do 15 mm (9). Nakon 18-20-to časovne inkubacije na temperaturi od 35°C su detektovani fenotipovi makrolidne rezistencije. Sojevi sa M fenotipom su bili rezistentni samo na eritromicin i osetljivi na klindamicin. Inducibilan MLS fenotip (iMLSb) se karakteriše rezistencijom na eritromicin i smanjenom osetljivošću na klindamicin, koja se manifestuje pojavom takozvane "D" zone inhibicije rasta oko diska klindamicina. Zaravnjena strana zone inhibicije rasta je okrenuta prema disku eritromicina. cMLSb fenotip se odlikuje odsustvom zona inhibicije rasta oko oba diska.

Vrednosti MIK eritromicina i klindamicina su određene E testom (*bioMerieux, Francuska*) na pločama MH-F agara, prema uputstvu proizvođača.

Dobijeni rezultati su upoređivani sa rezultatima studija rađenih od 1991. do 1999. godine (10) i od 2008. do 2009. godije (6).

## Rezultati

Od 107 izolata GAS, sedam (6,5%) je bilo rezistentno na eritromicin (MRGAS). Uvidom u **Grafikon 1** može se videti da je u našoj zemlji, posle vrlo niske rezistencije GAS na makrolide tokom 90-tih godina prošlog veka - 2,4% (10), i velikog skoka u periodu 2008. - 2009. godina - 12,5% (6), došlo do smanjenja rezistencije GAS na eritromicin.



**Grafikon 1.** Trend rezistencije GAS na eritromicin

Svi izolati rezistentni na makrolide su ispoljavali MLSb tip rezistencije. Dominirao je cMLSb fenotip - 71% izolata je ispoljavalo ovaj model rezistencije, dok je iMLSb fenotip bio prisutan kod oko 29% izolata. U prethodnom periodu (2008. - 2009. godina) bio je dominantan M

fenotip (72%), dok su iMLSb i cMLSb fenotipovi bili manje zastupljeni (6) (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Uporedni prikaz fenotipova rezistencije na makrolide

Fenotipovi rezistencije	2008. - 2009. godina* N (%)	2016. - 2017. godina* N (%)
M	74 (71,8)	0
cMLSb	10 (9,7)	5 (71,4)
iMLSb	19 (18,5)	2 (28,6)
Ukupno	103 (100)	7 (100)

\*referenca broj 6

Vrednost MIK eritromicina je kod svih sojeva MRGAS bila  $\geq 256$  µg/ml, dok je MIK klindamicina kod cMLSb bio  $\geq 256$  µg/ml, dok je kod sojeva sa iMLSb bio 0,064 µg/ml.

Pored eritromicina rezistencija je zabeležena još i na tetracikline (2,8%), klindamicin (4,7%) i trimetoprim + sulfametoksazol (98,1%) (**Tabela 2**). Svi izolati su bili osetljivi na penicilin, norfloksacin i hloramfenikol.

**Tabela 2.** Osetljivost sojeva *S. pyogenes* na antibiotike

Lek	N (%)		
	Osetljivi	Rezistentni	Ukupno
Penicilin	107 (100)	0	107 (100)
Eritromicin	100 (93,5)	7 (6,5)	107 (100)
Klindamicin	102 (95,3)	5 (4,7)	107 (100)
Tetraciklin	104 (97,2)	3 (2,8)	107 (100)
Norfloksacin	107 (100)	0	107 (100)
Hloramfenikol	107 (100)	0	107 (100)
Trimetoprim + sulfametoksazol	2 (1,9)	105 (98,1)	107 (100)

Multirezistentnih (MR) izolata, koji su bili istovremeno rezistentni na bar tri antibiotika različitih klasa je bilo pet (4,7%). Svi su ekspimirali cMLSb fenotip i bili rezistentni i na trimetoprim + sulfametoksazol. Jedan multirezistentni izolat (0,93%) je pored navedenih lekova bio i rezistentan na tetracikline.

## Diskusija

Rezultati ove studije ukazuju da je rezistencija faringealnih izolata grupe A streptokoka na eritromicin 6,5%. U studiji NRL za streptokok, sprovedenoj u periodu između 1991. i 1999. godine je nađeno da je procenat izolata *S. pyogenes* rezistentnih na makrolide bio nizak - 2,41% (10). Međutim, u periodu od 2008. do 2009. godine uočen je značajan porast incidencije sojeva GAS rezistentnih na ove antibiotike - 12,5% (6). Ovaj veliki porast u stopi rezistencije GAS na makrolide je verovatno bio posledica velike potrošnje makrolida u Srbiji, naročito dugodelujućih, poput azitromcina. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije Srbija je 2011. godine bila druga zemlja u istočnoj Evropi po potrošnji makrolida (11). U toku



poslednjih godina je, zahvaljujući zakonskim merama, upotreba antibiotika u Srbiji smanjena, što se odrazilo i na pad stope rezistencije GAS na makrolide, na šta ukazuje ova studija. Ipak, ovaj procenat i dalje nije zanemarljiv.

Podaci iz zemalja Evrope su vrlo raznoliki. Prosečna stopa rezistencije na makrolide u zapadnoj i srednjoj Evropi 2005. godine je iznosila oko 11,5%. Međutim, postoje značajne varijacije – dok su Slovačka sa 40,9% i Španija sa 18,4% imale najviše stopame rezistencije, dotle su Holandija i Norveška, sa stopama od 0% do 1,2% imale najniže (12). U Grčkoj je rezistencija GAS na makrolide 2008. godine bila skoro 30%, ali je postepeno padala, da bi 2013. godine bila 10,95% (13), što se povezuje sa smanjenom upotrebom makrolida u ovoj zemlji. U zemljama regiona stopa rezistencije varira: Rumunija - 5,8% (14), Bugarska - 2,1% (15), Austrija - 4,7% i Mađarska - 3,7% (16).

Primećena je i promena u fenotipu rezistencije GAS na makrolide u odnosu na studiju sprovedenu 2008. - 2009. godine (6). Došlo je do potpunog iščezavanja M fenotipa koji je tada bio dominantan - sa 71,8% na 0%. Njega je u potpunosti zamenio visokorezistentni MLSb fenotip, koji je u ranijem periodu bio prisutan kod oko 30% izolata. Incidencija iMLSb je porasla sa 18,4% na 28,5% dok je procenat cMLSb skočio sa 9,7% na 71,5%. Ovaj podatak je važan zato što MLSb fenotip smanjuje terapijske mogućnosti usled visoke rezistencije na sve makrolide, ali i klindamicin. Slične poremene su viđene i u Portugalu. Tokom perioda od 2004. do 2006. godine došlo je do pada stope GAS M fenotipa rezistencije na makrolide u odnosu na period od 1998.-2003. godine - dok je 2003. godine stopa M fenotipa bila skoro 77%, u periodu od 2004. do 2006. godine ta stopa je pala na 47,4% (17).

Rezistencija GAS na tetracikline u ovoj studiji iznosila je 2,8%. Više stope su zabeležene u Portugaliji - 6% (18) i Španiji - 3,5% (19). Prema rezultatima dobijenim u

ovoj studiji uočen je samo jedan izolat (0,93%) koji je imao cMLSb fenotip i bio rezistentan na tetracikline. Ovo je značajno, jer postoji mogućnost prenosa gena putem konjugacije za MLSb fenotipove i gena za rezistenciju na tetracikline (20). U Španiji je procenat korezistencije na tetracikline i eritromicin 2,1% (21), dok je u Turskoj 7,8% (22).

Svi izolovani sojevi GAS su bili osetljivi na penicilin, norfloksacin i hloramfenikol.

Ograničenje ove studije je u tome što je uzorak bio relativno mali i reprezentuje prvenstveno Beograd. Iako bi uključivanje većeg broja uzoraka sa teritorije cele zemlje svakako vernije prikazalo promene koje su nastale u populaciji grupe A streptokoka, ranije iskustvo (6) nam pokazuje da nije bilo značajnih razlika u makrolidnoj rezistenciji između pojedinih delova Srbije. Ovi preliminarni podaci ukazuju da su se desile značajne izmene u rezistenciji *S. pyogenes* na makrolidne antibiotike. Samim tim se može očekivati da će se promene dešavati i u budućnosti, te bi ih trebalo i dalje pratiti.

## Zaključak

Iako je došlo do pada rezistencije faringealnih izolata *S. pyogenes* na makrolide u odnosu na period 2008. - 2009. godina, sa stopom od 6,5%, naša zemlja je iznad proseka u regionu. Za razliku od ranijeg perioda, među MRGAS sada dominira visokorezistentni MLSb fenotip. Nema promene u osetljivosti GAS na penicilin, te se on i dalje može koristiti kao lek izbora. Verovatno da je ograničenje upotrebe antibiotika u našoj zemlji, pa i makrolida imalo pozitivne efekte na smanjenje rezistencije GAS na eritromicin. Ipak, s obzirom na to da ovaj vid rezistencije može biti posledica i propagacije rezistentnih klonova *S. pyogenes*, nophodno je i dalje kontinuirano praćenje njegove osetljivosti na antibiotike.

## Literatura

1. Tapia MD, Sow SO, Tamboura B, Keita MM, Berthe A, Samake M, et al. Streptococcal pharyngitis in schoolchildren in Bamako, Mali. *Pediatr Infect Dis J*. 2015 May; 34(5):463-8.
2. Shaikh N, Leonard E, Martin JM. Prevalence of streptococcal pharyngitis and streptococcal carriage in children: a meta-analysis. *Pediatrics* 2010 Sep; 126(3):e557-64.
3. Bisno AL, Gerber MA, Gwaltney JM Jr, Kaplan EL, Schwartz RH, Infectious Diseases Society of America. Practice guidelines for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis. *Clin Infect Dis*. 2002 Jul; 35(2):113-25.
4. Bingen E, Fitoussi F, Doit C, Cohen R, Tanna A, George R, et al. Resistance to Macrolides in *Streptococcus pyogenes* in France in Pediatric Patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Jun; 44(6):1453-57.
5. Kataja J, Huovinen P, Skurnik M, the Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance, Seppala H. Erythromycin Resistance Genes in Group A Streptococci in Finland. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Jan; 43(1):48-52.
6. Opavski N, Gajic I, Borek AL, Obszanska K, Stanojevic M, Lazarevic I, et al. Molecular characterization of macrolide resistant *Streptococcus pyogenes* isolates from pharyngitis patients in Serbia. *Infect Genet Evol*. 2015 Jul; 33:246-52.
7. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. Version 6.0, 2017. <http://www.eucast.org>.
8. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.0, 2017. <http://www.eucast.org>.
9. Seppala H, Nissinen A, Yu Q, Huovinen P. Three different phenotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Finland. *J Antimicrob Chemother*. 1993 Dec; 32(6):885-91.
10. Ranin L, Opavski N, Djukic S, Mijac V. Epidemiology of diseases caused by *Streptococcus pyogenes* in Serbia during a nine-year period (1991-1999). *Indian J Med Res*. 2004 May; 119 Suppl:155-9.
11. Versporten A, Bolokhovets G, Ghazaryan L, Abilova V, Pyshnik G, Spasojevic, et al. Antibiotic use in eastern Europe: a cross-national database study in coordination

- with the WHO Regional Office for Europe. *Lancet Infect Dis.* 2014 May; 14(5):381-7.
12. Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Beekmann SE, Riahi F, Garcia-de-Lomas J, et al. Increasing telithromycin resistance among *Streptococcus pyogenes* in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Mar; 61(3):603-11.
  13. Michos A, Koutouzi FI, Tsakris A, Chatzichristou P, Koutouzis EI, Daikos GL, et al. Molecular analysis of *Streptococcus pyogenes* macrolide resistance of paediatric isolates during a 7 year period (2007-13). *J Antimicrob Chemother.* 2016 Aug; 71(8):2113-7.
  14. Dorobat OM, Badicut I, Talapan D, Tenea C, Rafila A. Antibiotic resistance of Gram-positive cocci isolated in 2008. *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol.* 2010 Apr-Jun; 55(2):83-92.
  15. Detcheva A, Facklam RR, Beall B. Erythromycin-resistant group A streptococcal isolates recovered in Sofia, Bulgaria, from 1995 to 2001. *J Clin Microbiol.* 2002 Oct; 40(10):3831-34.
  16. Gattringer R, Sauer mann R, Lagler H, Stich K, Buxbaum A, Graninger W, et al. Antimicrobial susceptibility and macrolide resistance genes in *Streptococcus pyogenes* collected in Austria and Hungary. *Int J Antimicrob Agents.* 2004 Sep; 24(3):290-3.
  17. Silva-Costa C, Pinto FR, Ramirez M, Melo-Cristino J. Portuguese Surveillance Group for the Study of Respiratory Pathogens. Decrease in macrolide resistance and clonal instability among *Streptococcus pyogenes* in Portugal. *Clin Microbiol Infect.* 2008. 14(12):1152-9.
  18. Friaes A, Pinto FR, Silva-Costa C, Ramirez M, Melo-Cristino J, Portuguese Group for the Study of Streptococcal Infections. Group A streptococci clones associated with invasive infections and pharyngitis in Portugal present differences in emm types, superantigen gene content and antimicrobial resistance. *BMC Microbiol.* 2012 Nov; 12:280.
  19. Montes M, Tamayo E, Mojica C, Garcia-Arenzana JM, Esnal O, Perez-Trallero E. What causes decreased erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes*? Dynamics of four clones in a southern European region from 2005 to 2012. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Jun; 69(6):1474-82.
  20. Giovanetti E, Brenciani A, Lupidi R, Roberts MC, Varaldo PE. Presence of the tet(O) gene in erythromycin- and tetracycline-resistant strains of *Streptococcus pyogenes* and linkage with either the mef(A) or the erm(A) gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Sep; 47(9):2844-9.
  21. Rubio-Lopez V, Valdezate S, Alvarez D, Villalon P, Medina MJ, Salcedo C, et al. Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibilities and resistance mechanisms of *Streptococcus pyogenes* isolates resistant to erythromycin and tetracycline in Spain (1994-2006). *BMC Microbiol.* 2012 Sep; 12:215.
  22. Dundar D, Sayan M, Tamer GS. Macrolide and tetracycline resistance and emm type distribution of *Streptococcus pyogenes* isolates recovered from Turkish patients. *Microb Drug Resist.* 2010 Dec; 16(4):279-84.