

CHARACTERIZATION OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*
STRAINS ISOLATED FROM PATIENTS WITH MENINGITIS BEFORE
THE INTRODUCTION OF PNEUMOCOCCAL CONJUGATE
VACCINE IN SERBIA

KARAKTERIZACIJA SOJEVA *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*
IZOLOVANIH KOD PACIJENATA SA MENINGITISOM PRE
UVOĐENJA PNEUMOKOKNE KONJUGOVANE VAKCINE U SRBIJI

Sara Milojević¹, Dušan Kekić², Ina Gajić², Vera Mijač², Nataša Opavski²

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

² Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Beograd, Srbija

Correspondence: milosara97@gmail.com

Abstract

Introduction: Pneumococcal meningitis is a serious disease which affects mostly children ≤ 2 years, adults ≥ 65 years and immunodeficient patients. The introduction of pneumococcal conjugate vaccine (PCV) into immunization programs worldwide has led to a significant decrease in the incidence of invasive pneumococcal disease, reduction of antibiotic resistance and changes in the distribution of pneumococcal serotypes. In 2018, PCV10 was introduced into the National Immunization Program in Serbia.

Aim: The aim of this study was to analyze the serotype distribution and antibiotic susceptibility of pneumococcal strains isolated from meningitis cases in the pre-vaccinal period (2009-2018) in Serbia.

Material and methods: Meningeal isolates were sent into the National Reference Laboratory for streptococci between January 2009 and December 2018 for serotyping and antimicrobial susceptibility testing (AST). Serotyping was performed by Quellung reaction, while AST was performed using disk diffusion method and E-test.

Results: A total of 199 strains were analyzed and 32 different serotypes have been identified. Among the 55 (27.64%) strains from children ≤ 16 years, 17 different serotypes were detected of which 19F, 14, 6A, and 6B were the most common. Regarding the 144 (72.36%) adult isolates, 30 different serotypes were present, the most common being 3, 19F, 14, 23F, 6A and 6B. The coverage of pediatric serotypes was 61.82% for PCV10 and 78.18% for PCV13. Statistically significant number of isolates showed resistance to: penicillin (53.26%), erythromycin (45.73%), clindamycin (40.20%), trimethoprim-sulfamethoxazole (34.17%) and tetracycline (34.17%). The isolates from children were more resistant to beta-lactams and macrolides ($p < 0.05$).

Conclusion: During the pre-vaccinal period in Serbia, vaccinal serotypes dominated over non-vaccinal serotypes. Resistance is intermediate to high in the dominant serotypes of children and low in the most common adult serotype 3. Taking into consideration the possible changes in the pneumococcal population in the future, continued monitoring of post-vaccine serotype and resistance trends are essential.

Keywords:

Streptococcus pneumoniae,
pneumococcus,
meningitis,
pneumococcal conjugate
vaccine,
resistance

Sažetak

Uvod: Pneumokokni meningitis je teško oboljenje koje najčešće pogađa decu ≤ 2 godine, odrasle ≥ 65 godina i imunodeficientne osobe. Iskustvo iz zemalja koje su uvele pneumokoknu konjugovanu vakcinu (engl. *pneumococcal conjugate vaccine*, PCV) pokazalo je da je došlo do značajnog pada incidencije pneumokoknog meningitisa, smanjenja rezistencije na antibiotike, ali i izmene u distribuciji serotipova *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*). U Srbiji je 2018. godine uvedena obavezna imunizacija dece PCV.

Cilj: Cilj ovog rada je bio ispitivanje osetljivosti na antibiotike i serotipizacija sojeva pneumokoka izolovanih od pacijenata sa meningitisom u prevakcinalnom periodu (2009-2018. godina) u Srbiji.

Materijal i metode: Meningealni izolati pneumokoka su slati u Nacionalnu referentnu laboratoriju za streptokok od januara 2009. do decembra 2018. godine radi serotipizacije i ispitivanja osetljivosti na antibiotike. Serotipizacija je rađena "reakcijom bubrenja kapsule", a osetljivost na antibiotike ispitivana disk-difuzionom metodom i E-testom.

Rezultati: Obradeno je 199 sojeva pneumokoka i identifikovana su 32 serotipa. Kod ukupno 55 (27,64%) izolata od dece ≤ 16 godina nađeno je 17 različitih serotipova, od kojih su dominantni bili 19F, 14, 6A i 6B. Kod 144 (72,36%) izolata odraslih pacijenata uočena je veća raznolikost serotipova – čak 30, ali su preovladavali: 3, 19F, 14, 23F, 6A i 6B. Obuhvaćenost pedijatrijskih serotipova PCV10 je 61,82%, a PCV13 – 78,18%. Veliki broj izolata je bio rezistentan na: penicilin (53,26%), eritromicin (45,73%), klindamicin (40,20%), trimetoprim-sulfametoksazol (34,17%) i tetraciklin (34,17%). Sojevi izolovani kod dece bili su u većoj meri rezistentni na β -laktamske i makrolidne antibiotike ($p < 0,05$).

Zaključak: Pre uvođenja PCV u Srbiji među invazivnim sojevima pneumokoka dominiraju vakcinalni nad nevakcinalnim serotipovima. Rezistencija je umerena do visoka kod dominantnih serotipova dece i niska kod najučestalijeg serotipa 3 odraslih. Zbog mogućih izmena u populaciji pneumokoka u budućnosti neophodno je kontinuirano praćenje distribucije serotipova i njihove osetljivosti.

Ključne reči:

Streptococcus pneumoniae,
pneumokok,
meningitis,
pneumokokna konjugovana vakcina,
rezistencija

Uvod

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*) je najčešći izazivač zapaljenja srednjeg uha i bakterijske vanbolničke pneumonije, ali i invazivnih pneumokoknih bolesti (IPB) – sepse i bakterijskog meningitisa (1). Evropski centar za kontrolu i prevenciju bolesti je 2014. godine potvrdio 17 hiljada slučajeva IPB sa incidencijom 4,8 na 100.000 (2).

U razvijenim zemljama širom sveta stopa smrtnih slučajeva od pneumokoknog meningitisa kreće se od 5% do 20%, a čak kod 50% preživelih ostaju trajne posledice (3). Prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije „Milan Jovanović Batut“, u Srbiji je u 2017. godini prijavljeno 117 slučajeva bakterijskog meningitisa, sa stopom letaliteta koja je bila najviša u petogodišnjem periodu (2013 - 2017) (4).

Na osnovu razlika u građi najznačajnijeg faktora virulencije pneumokoka do sada je otkriveno 97 serotipova, od kojih su 10 do 15 najčešći izazivači IPB (5). Takođe, pojedini serotipovi pokazuju veću rezistenciju na antibiotike.

Glavne strategije u borbi protiv IPB su antibiotici i vakcina. Za terapiju neinvazivnih pneumokoknih bolesti koriste se penicilinski preparati, makrolidi i „respiratorni“ fluorohinoloni, dok se za lečenje invazivnih bolesti primenjuju cefalosporini treće generacije, meropenem, vankomicin i linezolid. *S. pneumoniae* je razvio rezistenciju na skoro sve navedene antibiotike i ona u pojedinim zemljama dostiže visoke nivoe za beta laktame i makrolide, što otežava

i prolongira lečenje (6). Zato je vakcina dobra strategija za redukovanje IPB (1). Pored 23-valentne polisaharidne vakcine (engl. *23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine*, PPV23), koja je u primeni već četrdesetak godina i daje se samo starijima od 5 godina, u upotrebi su dve pneumokokne konjugovane vakcine (engl. *pneumococcal conjugate vaccine*, PCV) – PCV10 i PCV13, koje se daju deci od drugog meseca života. Iskustvo iz zemalja koje su uvele PCV je pokazalo da ona dovodi do značajnog smanjenja incidencije IPB i pneumonije kod dece < 5 godina (7). Vakcina dovodi i do smanjenja rezistencije pneumokoka na antibiotike (8). Mnogi istraživači, međutim, opisuju i izmene u populaciji pneumokoka – smanjenje vakcinalnih tipova (VT) i pojavu nevakcinalnih tipova (NVT), fenomen nazvan „zamena serotipova“ (7).

U Srbiji je 2018. godine uvedena obavezna aktivna imunizacija dece PCV10. Kako bi se mogao pratiti efekat PCV neophodno je imati podatke o cirkulišućim serotipovima pneumokoka u periodu pre uvođenja vakcine. Ciljevi ovog rada su određivanje distribucije serotipova pneumokoka izolovanih od pacijenata sa meningitisom u prevakcinalnom periodu u Srbiji, procena obuhvaćenosti cirkulišućih serotipova PCV, kao i ispitivanje osetljivosti na antibiotike.

Materijal i metode

U okviru laboratorijskog nadzora nad invazivnom pneumokoknom bolesti, iz regionalnih laboratorija sa cele teritorije Republike Srbije su od 2009. godine u Nacionalnu referentnu laboratoriju (NRL) za streptokok na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu slati sojevi pneumokoka izolovani od pacijenata obolelih od pneumokoknog meningitisa. U analizu je uključen i kratak početni period obavezne vakcinacije, tokom koga se ne mogu očekivati izmene u serološkom praćenju epidemioloških karakteristika. Izolati su identifikovani na osnovu α -hemolize, optohinskog testa i lateks aglutinacije sa poliklonskim antitelima (*bioMérieux*, Francuska; *BioRad*, SAD). U NRL su sojevi ponovo identifikovani testom lize žučnih soli i potvrdom prisustva *lytA* gena, metodom lančane reakcije polimeraze (PCR) (1). Izolati su konzervirani u podlozi sa obranim mlekom na -80°C . Veći deo izolata, prikazanih u ovom radu, okarakterisan je u prethodnom periodu, dok je deo kolekcije iz 2018. godine obrađen u okviru ovog rada.

Serotipizacija je vršena reakcijom „bubrenja kapsule“ sa serogrupnim i serotipskim antiserumima na kapsularne polisaharide (*Statens Serum Institute*, Kopenhagen, Danska). Osetljivost na antibiotike je ispitana disk difuzionom metodom prema preporukama koje daje Evropski komitet za ispitivanje osetljivosti bakterija na antibiotike (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST) za 2018. godinu (9). Korišćene su MHF komercijalne podloge (*bioMérieux*, Francuska). Testirana je osetljivost na oksacilin (1 μg), eritromicin (15 μg), klindamicin (2 μg), tetraciklin (30 μg), hloramfenikol (30 μg), rifampicin (5 μg), trimetoprim-sulfametoksazol, TMP-SXT (1,25-23,75 μg), levofloksacin (5 μg), vankomicin (5 μg) i linezolid (10 μg). Korišćeni su diskovi *BioRad*, SAD. Fenotip rezistencije na makrolide je ispitan dvostrukim disk difuzionim testom sa diskovima eritromicina i klindamicina (6). Vrednost minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za penicilin, ceftriakson, eritromicin i klindamicin za rezistentne sojeve određena je E-testom (*bioMérieux*, Francuska). Interpretacija dobijenih zona inhibicije i vrednosti MIK vršena je prema EUCAST standardu za 2018. godinu (9). Kao kontrola za ispitivanje osetljivosti na antibiotike korišćen je ATCC soj *S. pneumoniae* 49619. Statistička obrada podataka rađena je χ^2 testom; vrednost $p < 0,05$ je smatrana statistički značajnom.

Rezultati

U periodu od januara 2009. do decembra 2018. godine u NRL laboratoriji je obrađeno 199 sojeva pneumokoka izazivača meningitisa. Sojevi su izolovani iz likvora 158/199 (79,40%) i krvi 41/199 (20,60%) pacijenata sa dijagnozom meningitisa. Nešto je više sojeva izolovano od pacijenata muškog pola 108/199 (54,27%) u odnosu na ženski pol 91/199 (45,73%). Više od dve trećine sojeva – 144/199 (72,36%) izolovano je od odraslih pacijenata (> 16 godina),

dok je dečijih (≤ 16 godina) izolata bilo 55/199 (27,64%). Skoro polovina pedijatrijskih sojeva – 26/55 (47,27%) izolovana je od dece ≤ 2 godine. Kod odraslih pacijenata sa meningitisom, 53/144 (36,81%) soja pneumokoka izolovano je u najstarijoj uzrasnoj grupi (≥ 65 godina) (tabela 1).

Trend slanja izolata je bio: 2009-2010 (23; 11,56%); 2011-2012 (27; 13,57%); 2013-2014 (49; 24,62%); 2015-2016 (53; 26,63%) i 2017-2018 (47; 23,62%) (grafikon 1).

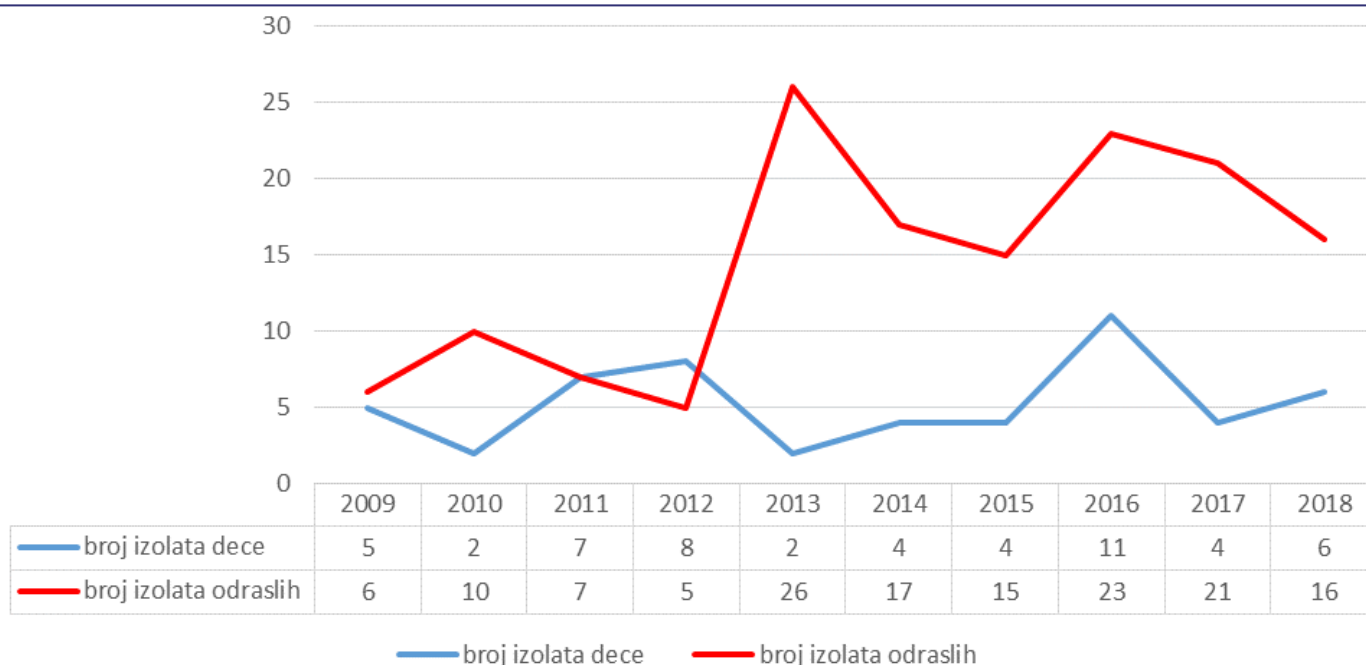
Tabela 1. Zastupljenost meningealnih izolata pneumokoka prema uzrastu pacijenata u periodu od 2009. do 2018. godine u Srbiji

Interval godina	n (199)	% (100)
≤ 2 g	26	13,07
> 2-5 g	10	5,02
> 5-16 g	19	9,55
> 16-65 g	91	45,73
≥ 65 g	53	26,63

Među svim obrađenim sojevima identifikovana su 32 različita serotipa, pri čemu su serotipovi 3, 19F, 14, 6A, 6B i 23F pronađeni kod 112/199 (56,28%) svih izolata (tabela 2). Među preostalih 87/199 (43,72%) izolata su, sa nešto većom učestalošću, nađeni tipovi 18C i 19A (sa po 7 izolata), 4 i 8 (sa po 5 izolata), dok su 22 serotipa detektovana kod ≤ 4 izolata. Kod 55/199 (27,64%) pedijatrijskih sojeva uočeno je 17 različitih serotipova, od kojih su četiri – 19F, 14, 6A i 6B detektovani kod oko polovine (50,91%) izolata, dok je serotip 3 uočen kod samo jednog (1,81%) izolata. Među sojevima izolovanim od odraslih bolesnika nađeno je 30 različitih serotipova. Polovina izolata (79/144; 55%) pripadala je serotipovima 3, 19F, 14, 23F, 6A i 6B, a 25 serotipova je predstavljeno sa ≤ 5 sojeva po serotipu kod preostale polovine izolata. Kod odraslih pacijenata najzastupljeniji je bio serotip 3; skoro četvrtina adultnih izolata (34/144; 24,31%) pripadala je ovom tipu. Za 16/199 (8%) uzoraka, pretežno od odraslih (11/16; 68,75%), nije bilo moguće odrediti serotip, odnosno nije ih bilo moguće tipizirati (engl. *non-typable*).

Među obrađenim izolatima su nađeni svi VT, osim serotipa 5 (tabela 2). Obuhvaćenost serotipova PCV13 je 70,85%. U dečijoj populaciji je obuhvaćenost serotipova PCV10 iznosila 61,82%, a PCV13 – 78,18%. Razlika u zastupljenosti sojeva obuhvaćenih ovim dvema vakcinama nije bila statistički značajna ($p < 0,05$). U populaciji odraslih, zastupljenost sojeva obuhvaćenih PCV13 je 68,06%, a PPV23 – 77,78%.

Izolati su u visokom procentu bili rezistentni na: penicilin, eritromicin, klindamicin, TMP-SXT i tetraciklin (tabela 3). Vrednosti MIK50 i MIK90 za penicilin su iznosile 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ i 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Na ceftriakson je 38/199 (19,21%) izolata pokazivalo smanjenu osetljivost, od čega je rezistentnih sojeva sa vrednošću MIK > 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bilo 1,32%, dok su ostali pokazivali intermedijarnu osetljivost. Od 91 izolata rezistentnog na makrolide, 64/91 (70,33%) je ekspimiralo visokorezistentni fenotip sa konstitutivnom



Grafikon 1. Broj izolata pneumokoka dece i odraslih po godinama u periodu od 2009. do 2018. godine u Srbiji

Tabela 2. Zastupljenost serotipova meningokoka dece i odraslih i obuhvaćenost pneumokoknim konjugovanim vakcinama 2009 - 2018. godine u Srbiji

	Serotip	Deca (N)	%	Odrasli (N)	%	Ukupno (N)	%
PCV10	1	1	1,82	1	0,69	2	1,01
	4	1	1,82	4	2,78	5	2,51
	5		0,00		0,00	0	0,00
	7F	1	1,82	3	2,08	4	2,01
	6B	5	9,09	6	4,17	11	5,53
	9V		0,00	4	2,78	4	2,01
	14	8	14,55	8	5,56	16	8,04
	18C	4	7,27	3	2,08	7	3,52
	19F	10	18,18	17	11,81	27	13,57
	23F	4	7,27	7	4,86	11	5,53
Nevakcinalni serotipovi	3	1	1,82	35	24,31	36	18,09
	6A	5	9,09	6	4,17	11	5,53
	19A	3	5,45	4	2,78	7	3,52
	8		0,00	5	3,47	5	2,51
	9A		0,00	2	1,39	2	1,01
	9N	1	1,82	4	2,78	5	2,51
	10A	1	1,82	1	0,69	2	1,01
	11A		0,00	2	1,39	2	1,01
	12F		0,00	2	1,39	2	1,01
	15A		0,00	3	2,08	3	1,51
	15B		0,00	1	0,69	1	0,50
	15C		0,00	2	1,39	2	1,01
	15F		0,00	2	1,39	2	1,01
	16F		0,00	1	0,69	1	0,50
	17F		0,00	1	0,69	1	0,50
	18F		0,00	1	0,69	1	0,50
	20	1	1,82		0,00	1	0,50
	22F		0,00	2	1,39	2	1,01
	23A	2	3,64	2	1,39	4	2,01
24F	1	1,82		0,00	1	0,50	
31		0,00	2	1,39	2	1,01	
33A		0,00	1	0,69	1	0,50	
33F	1	1,82	1	0,69	2	1,01	
nontype	5	9,09	11	7,64	16	8,04	

Tabela 3. Osetljivost izolata pneumokoka na antibiotike 2009–2018. godine u Srbiji (S – osetljiv, I – intermedijarno osetljiv, R – rezistentan, TMP-SXT – trimetoprim-sulfametroksazol)

Antibiotik	S			I			R		
	Odrasli n (%)	Deca n (%)	Ukupno n (%)	Odrasli n (%)	Deca n (%)	Ukupno n (%)	Odrasli n (%)	Deca n (%)	Ukupno n (%)
Penicilin	76 (52,78)	17 (30,91)	93 (46,73)	/	/	/	68 (47,22)	38 (69,09)	106 (53,26)
Ceftriakson	121 (84,03)	37 (67,27)	158 (79,47)	21 (14,58)	17 (30,91)	38 (19,21)	2 (1,39)	1 (1,82)	3 (1,32)
Eritromicin	94 (65,28)	14 (25,45)	108 (54,27)	/	/	/	50 (34,72)	41 (74,55)	91 (45,73)
Klindamicin	96 (66,67)	23 (41,81)	119 (59,80)	/	/	/	48 (33,33)	32 (58,19)	80 (40,20)
Tetraciklin	99 (68,75)	31 (56,36)	130 (65,33)	1 (0,69)	0 (0)	1 (0,62)	44 (30,56)	24 (43,64)	68 (34,17)
Hloramfenikol	131 (90,97)	50 (90,91)	181 (90,95)	/	/	/	13 (9,03)	5 (9,09)	18 (9,05)
TMP-SXT	96 (66,67)	24 (43,64)	120 (60,30)	7 (4,86)	4 (7,28)	11 (5,53)	41 (28,47)	27 (49,08)	68 (34,17)

rezistencijom na makrolide, linkozamide i streptogramine (cMLS) sa vrednostima MIK50 i MIK90 za eritromicin i klindamicin $\geq 256 \mu\text{g/ml}$. Fenotip M je bio prisutan kod 24/91 (26,38%) i oni su bili osetljivi na klindamicin. Vrednosti MIK50 i MIK90 eritromicina za ove izolate su iznosile $3 \mu\text{g/ml}$, odnosno $4 \mu\text{g/ml}$. Istovremenu rezistenciju na penicilin i eritromicin je pokazivalo 28,50% izolata, dok je 23,50% bilo rezistentno na ≥ 3 antibiotika, te su bili okarakterisani kao multirezistentni (MR). Najčešći fenotip MR je bio istovremena rezistencija na penicilin i eritromicin, uz dodatnu rezistenciju na klindamicin/tetraciklin/TMP-SXT. Sojevi izolovani od dece bili su statistički značajno više rezistentni na većinu antibiotika: penicilin, ceftriakson, eritromicin, klindamicin i TMP-SXT u odnosu na izolate od odraslih pacijenata ($p < 0,05$). Razlika nije postojala u slučaju tetraciklina i hloramfenikola. Svi sojevi su bili osetljivi na imipenem, rifampicin, levofloksacin, vankomicin i linezolid.

Uočeno je da postoji statički značajna povezanost ($p < 0,05$) nekih VT sa rezistencijom na pojedine antibiotike. Najčešći dečiji serotip, 19F, značajno je češće rezistentan na penicilin, ceftriakson, eritromicin, klindamicin i tetraciklin, a drugi po učestalosti pedijatrijski serotip 14 na penicilin, ceftriakson i eritromicin. Veća rezistencija na pojedine antibiotike je uočena i kod serotipova: 6A, 6B, 23F i 19A, ali ne na nivou statističke značajnosti. Sa druge strane, statistički značajna osetljivost na antibiotike je primećena kod najčešćeg serotipa odraslih - 3.

Diskusija

Ovim ispitivanjem je prikazana distribucija serotipova pneumokoka izazivača meningitisa i njihova osetljivost na antibiotike u desetogodišnjem periodu u Srbiji. Više od 2/3 je bilo izolovano od odraslih pacijenata. Međutim, za razliku od rezultata drugih studija (2), koji

izveštavaju najveću incidenciju meningitisa kod odraslih ≥ 65 godina, u ovom radu je nađeno manje od 40% izolata kod najstarijih, dok su veći udeo činili sojevi odraslih pacijenata od 16 do 65 godina. Dečiji sojevi su pretežno izolovani od najmlađe populacije (≤ 2 godine), što je u skladu sa rezultatima drugih studija (2). Razlog za ovakvu distribuciju izolata kod nas može se objasniti time što je u Srbiji tek 2009. godine započeo laboratorijski nadzor nad IPB, koji je podrazumevao isključivo volontersko slanje invazivnih izolata pneumokoka. Ova činjenica objašnjava i vrlo skroman broj izolata u prvim godinama nadzora, koji se postepeno povećavao u narednom periodu. Imajući u vidu da je na broj poslatih izolata uticalo dosta faktora: doktrina uzimanja hemokulture od pacijenata, stepen izolacije pneumokoka iz hemokulture, prethodno započeta antibiotska terapija bolesnika koja smanjuje stepen pozitivnih nalaza, slanje pneumokoka u NRL na dobrovoljnoj bazi, kao i mogućnost gubitka vijabilnosti izolata tokom transporta, dobijena distribucija izolata po uzrastu ne odgovara podacima iz zemalja u kojima je nadzor aktivan (10).

Karakteristično za naše izolate je da je raznolikost serotipova veća kod odraslih u odnosu na decu. Serotip 3 je bio ubedljivo najčešći tip u odrasloj populaciji, dok je kod dece nađen kod samo jednog izolata. Zajednička za obe starosne grupe je dominacija serotipova 19F, 14, 6A, 6B i 23F. Ovakva distribucija serotipova odgovara zemljama u kojima PCV nije uvedena u kalendar obavezne imunizacije, odnosno u kojima je niska obuhvaćenost populacije PCV. Postoje, ipak, neke razlike. Tako je, npr. istraživanje iz 2011-2012. godine u Sloveniji, u kojoj je PCV preporučena vakcina, ali bez velikog obuhvata, pokazalo da su i kod dece i odraslih česti invazivni serotipovi 14, 3, 9V, 7F, 19A i 6A/B, dok se 19F, koji je najčešći kod naših pedijatrijskih izolata, uopšte ne izveštava (11). I u Hrvatskoj se navode serotipovi 14, 6B, 18C i 23F kao najčešći izazivači IPB dece u periodu pre 2010. godine, a 19F se ne spominje

ni u ovoj studiji (12). U Portugalu, u kojem je više godina primenjivana sa malim obuhvatom PCV7, zapaža se i dalje dominacija VT - 3, 14, 1, 7F i 19A, te autori zaključuju da je za postizanje pravog efekta vakcine neophodan veliki obuhvat vakcinom (7).

Obuhvaćenost konjugovanim vakcinama pedijatrijskih izolata iz ove studije bila je dobra i veća od 60% za PCV10 i PCV13. Zbog tri dodatna serotipa je, očekivano, nešto veća obuhvaćenost PCV13 u odnosu na PCV10, kojoj je, međutim, na osnovu rezultata studija, priznato da obezbeđuje dodatni imunitet i za serotip 19A koji nije u sastavu ove vakcine (<https://www.ema.europa.eu/en>). Za adultne sojeve je obuhvaćenost PCV13 i PPV23 veća od 68%.

Iako su obe vakcine dovele do značajne redukcije IPB, brojni su radovi koji svedoče o sve češćem pojavljivanju NVT kao izazivača IPB. Tako se, npr. u Nemačkoj, koja već dugi niz godina primenjuje PCV7, a potom i PCV13, zapaža među invazivnim izolatima pneumokoka pojava NVT - 10A, 24F, 15C, 12F, 38, 22F, 23B i 15B (13). Od ukupno 20 identifikovanih NVT u ovoj studiji, većina (18) je nađena kod odraslih pacijenata, dok je među dečijim izolatima bilo svega šest. Zapaženo je, međutim, da je tokom poslednjih godina rastao broj novootkrivenih NVT, pa je u periodu od 2012. do 2018. godine detektovano čak 11 novih NVT. Najučestaliji NVT u ovoj studiji bili su 8, 9N i 15A kod odraslih i 23A među dečijom populacijom (13). Zato je vrlo važno da se u narednom periodu prati zastupljenost serotipova pneumokoka među invazivnim i neinvazivnim izolatima kako bi se sagledao direktni i indirektni efekat vakcine i uočile potencijalne promene u distribuciji serotipova.

Posebno je zabrinjavajuća visoka rezistencija na antibiotike invazivnih izolata iz ove studije. Uočene su vrlo visoke stope rezistencije na: penicilin (> 50% izolata), eritromicin (~ 50%), klindamicin (~ 40%), TMP-SXT (~ 35%) i tetraciklin (~ 35%). Rezistenciju na ceftriakson je pokazalo < 2% sojeva, ali treba imati u vidu da je ~ 20% imalo smanjenu osetljivost na ovaj antibiotik prvog izbora, što znači da je za postizanje pravog efekta ceftriaksona potrebno povećanje doze leka (14). Makrolidi nisu lekovi za lečenje IPB, ali se ovi antibiotici veoma često koriste za terapiju neinvazivnih pneumokoknih infekcija respiratornog trakta. Pored visoke rezistencije na makrolide zapažen je i izuzetno visok udeo cMLS fenotipa rezistencije (~ 70%) koji se karakteriše visokim nivoima i udruženom rezistencijom na makrolide i linkozamide. Skoro četvrtina sojeva (~ 24%) bila je rezistentna na ≥ 3 antibiotika. Ovi rezultati su u skladu sa već objavljivanim podacima o rezistenciji *S. pneumoniae* na antibiotike u našoj zemlji, prema kojima su stope rezistencije tokom prve decenije 21. veka iznosile ~ 36% na penicilin i ~ 34% na eritromicin (16). Visoki nivoi rezistencije su zapaženi i u nekim drugim zemljama u okruženju. Stope smanjene osetljivosti pneumokoka na penicilin i eritromicin u Grčkoj iznosile su ~ 38% i 33% (17), u Hrvatskoj 43% i ~ 44% (18), a u Rumuniji čak ~ 78% i 72% (19). S druge strane, u Bugarskoj je rezistencija na antibiotike bila manja – 13% na penicilin i 25% na eritromicin (18).

Povezanost pojedinih serotipova sa rezistencijom je dokazana u ovom radu. Ona je bila naglašena kod "pedijatrijskih" serotipova koji su dominirali kod osoba ≤ 16 godina; 19F, 14, 6A, 6B i 23F. Sojevi pneumokoka ovih serotipova kolonizuju respiratorne puteve dece i često su rezistentni na antibiotike, što doprinosi njihovoj perzistenciji (7). To su istovremeno i VT. Zato se može očekivati da će primena PCV10 u Srbiji smanjiti učestalost ovih tipova, ali i 19A zbog proizvodnje unakrsno specifičnih antitela (20). Serotip 3, koji je čest izazivač IPB, posebno kod odraslih, poznat je po svojoj osetljivosti na antibiotike, što je bio slučaj i u ovoj studiji. Među najučestalijim NVT kod odraslih, izolati serotipa 8 i 9N uglavnom su bili osetljivi na ispitivane antibiotike. Za razliku od njih, serotip 23A, najučestaliji među decom, bio je rezistentan na skoro sve antibiotike.

Prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije „Milan Jovanović Batut“, letalitet od bakterijskih meningitisa raste 2014. godine (25,88%), dok je najveći letalitet uočen 2017. godine (71,57%) (4). Rezultati naše studije pokazuju pojavu novih nevakcinalnih serotipova, kao i porast učestalosti vakcinalnih serotipova 6B i 19A, koji su bili rezistentni na penicilin. Kako letalitet ukazuje na uspešnost terapije i ozbiljnost bolesti, povećanje rezistencije pneumokoka u ovom periodu moglo bi biti jedno od objašnjenja i za porast letaliteta.

Zaključak

U periodu pre uvođenja PCV u Srbiji više od 60% meningealnih izolata pneumokoka pripada VT. Rezistencija na antibiotike je umerena do visoka kod dominantnih serotipova dece -19F, 14 i 6A/6B, a niska kod najučestalijeg serotipa odraslih – 3. Ovi rezultati predstavljaju polaznu osnovu za praćenje izmena u distribuciji serotipova koje se mogu očekivati kao jedan od efekata PCV.

Literatura

1. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Medical Microbiology: Streptococcus and Enterococcus. ed. 8. Philadelphia: Elsevier; 2016.
2. European Centre for Disease Prevention and Control. Invasive pneumococcal disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2016. Stockholm: ECDC; 2018. dostupno na sajtu: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/invasive-pneumococcal-disease-annual-epidemiological-report-2016>
3. Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. Clin Microbiol Rev. 2010 Jul; 23(3): 467-92.
4. Dimitrijević D, Drakulović M, Milinković M, Plavša D, Simić D, Stošić M. et al. Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2017. godinu: Bakterijski meningitisi (Meningitis bacterialis). Beograd: Institut za javno zdravlje Srbije „Milan Jovanović Batut“; 2018.
5. Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted, IC, Klugman KP, Jones C. et al. Pneumococcal capsules and their types: past, present and future. Clin Microbiol Rev. 2015 Jun; 28(3): 871-99.
6. Cherazard R, Epstein M, Doan TL, Salim T, Bharti S, Smith MA. Antimicrobial resistant Streptococcus pneumoniae: prevalence, mechanisms, and clinical Implications. Am J Ther. 2017 May; 24(3): 361-9.

7. Silva-Costa C, Brito M, Aguiar S, Lopes JP, Ramirez M, Melo-Cristino J. et al. Dominance of vaccine serotypes in pediatric invasive pneumococcal infections in Portugal (2012–2015). *Sci Rep – Nature*. 2018 Jan; 8(1): 1-9.
8. Tin Tin Htar M, Christopoulou D, Schmitt HJ. Pneumococcal serotype evolution in Western Europe. *BMC Infect Dis*. 2015 Sep; 15(1): 419-29.
9. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018. dostupno na sajtu: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
10. Vergison A, Tuerlinckx D, Verhaegen J, Malfroot A. Epidemiologic features of invasive pneumococcal disease in Belgian children: passive surveillance is not enough. *Pediatrics*. 2006 Oct; 118(3): 801-9.
11. Müller Premru M, Beović B, Pokorn M, Cvitković Špik V. Serotypes and genotype of invasive pneumococci in the central part of Slovenia. *Wien Klin Wochenschr*. 2015 Sep; 127(1): 691-5.
12. Guzvinec M, Tesović G, Tambić-Andrasević A, Zidovec-Lepej S, Vukić BT, Begovac J. The epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* disease in Croatian children. *Med Sci Monit*. 2008 Apr; 14(4): 59-64.
13. Weinberger R, von Kries R, van der Linden M, Rieck T, Siedler A, Falkenhorst G. Invasive pneumococcal disease in children under 16 years of age: Incomplete rebound in incidence after the maximum effect of PCV13 in 2012/13 in Germany. *Vaccine*. 2018 Jan; 36(4): 572-7.
14. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. dostupno na sajtu: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
15. Kim L, McGee L, Tomczyk S, Beall B. Biological and epidemiological features of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in pre- and post-conjugate vaccine eras: a United States perspective. *Clin Microbiol Rev*. 2016 Apr; 29(3): 525-52.
16. Hadnađev M, Gajić I, Mijač V, Kurucin T, Považan A, Opavski N. et al. Phenotypes and genotypes of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Serbia. *Arch Biol Sci*. 2014; 66(1): 99-105.
17. Maraki S, Mantadakis E, Samonis G. Serotype distribution and antimicrobial resistance of adult *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates over the period 2001-2008 in Crete, Greece. *Chemotherapy*. 2010 Aug; 56(4): 325-32.
18. Torumkuney D, Nica M, Nistor I, Morrissey I. Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2014-16 in Bulgaria, Romania, Serbia and Croatia. *J Antimicrob Chemother* 2018 Apr; 73(5): 2-13.
19. Luminos M, Dorobat O, Jugulete G, Popescu GA. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Romanian children before the introduction of the pneumococcal conjugated vaccination into the national immunization programme: a national, multi-centre, cross-sectional observational study. *Int J Infect Dis*. 2014 Oct; 29C(C): 169-73.
20. Isturiz R, Sings H, Hilton B, Reinert RR, Jodar L. *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A: worldwide epidemiology. *Expert Rev Vaccines*. 2017 Jul; 16(10): 1007-27.