



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
MEDICINSKI FAKULTET  
AKADEMSKE DOKTORSKE STUDIJE  
JAVNO ZDRAVLJE

**FENOTIPSKU I GENOTIPSKU  
KARAKTERISTIKU MAKROLID  
REZISTENTNOG  
*Streptococcus pneumoniae***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Kandidat: Dr Mirjana Hadnađev

Mentori: Prof. dr Nataša Vučković Opavski  
Prof. dr Branislav Perin

Novi Sad, 2015.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**  
**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Mirjana Hadnadev
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof dr Nataša Vučković Opavski, profesor na Katedri za mikrobiologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu  Prof dr Branislav Perin, profesor na Katedri za Internu medicinu Medicinskog fakulteta u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Fenotipske i genotipske karakteristike makrolid rezistentnog <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Jezik publikacije: JP	srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2015.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Medicinski fakultet, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja: 7, stranica:124, slika: 8, grafikona: 11, tabela 18, referenci: 546.
Naučna oblast: NO	Medicina

Naučna disciplina: ND	Mikrobiologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ; makrolidi; bakterijska rezistencija na antibiotike; fenotip; genotip; pneumokokne infekcije
UDK	615.33.015.8 616.981.21:579.862
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad Sad, Srbija
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p><i>Streptococcus pneumoniae</i> (pneumokok) je jedan od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta širom sveta, kada su u pitanju infektivne bolesti. Pretežno izaziva infekcije gornjih respiratornih puteva (sinuzitis, otitis) i konjunktivitis. Vodeći je uzročnik vanbolničkih pneumonija, bakterijskog meningitisa i sepse. Lekovi izbora u terapiji pneumokoknih bolesti su beta laktamski antibiotici i makrolidi. Iako se makrolidni antibiotici uveliko koriste u lečenju pneumokoknih infekcija širom sveta, porast rezistencije na makrolide bi mogao da kompromituje njihovu upotrebu. Rezistencija pneumokoka na makrolide je posredovana putem dva glavna mehanizma: modifikacija ciljnog mesta delovanja leka i aktivni efluks leka. Metilaciju 23S ribozomalne ribonukleinske kiseline (rRNK) obavlja enzim metilaza, čiju sintezu kodira <i>ermB</i> gen. Kod ovog tipa rezistencije dolazi do ukrštene rezistencije na makrolide (M), linkozamide (L) i streptogramine B (Sb). Ovakav vid rezistencije se ispoljava kao MLS<sub>b</sub> - fenotip i karakteriše ga visok nivo rezistencije. Može se javiti kao konstitutivni (cMLS) i inducibilni (iMLS). Drugi mehanizam rezistencije na makrolide je aktivni efluks leka, kodiran od strane <i>mefA</i> gena. Efluks antibiotika determiniše rezistenciju samo na 14-člane i 15-člane makrolide, bez ukrštene rezistencije. Ispoljava se kao M-fenotip, a karakteriše ga niži stepen rezistencije. Cilj ove studije je bio da se odredi učestalost makrolidne rezistencije <i>Streptococcus pneumoniae</i> među invazivnim i neinvazivnim izolatima kod dece i odraslih, da se odredi učestalost ko-rezistencije i multiple rezistencije kod makrolid rezistentnih sojeva <i>Streptococcus pneumoniae</i>, da se fenotipski odredi tip rezistencije na makrolide i da se ispita genska osnova makrolidne rezistencije (detektovati prisustvo <i>ermB</i> i <i>mefA</i> gena). Analizirani su podaci o 326 sojeva <i>Streptococcus pneumoniae</i> rezistentnih na makrolide (MRSP) sakupljenih širom Srbije u periodu od januara 2010. do decembra 2012. godine. Sakupljeni MRSP izolati su transportovani u Nacionalnu referentnu laboratoriju za streptokok radi daljih ispitivanja. Identifikacija je vršena na osnovu mikroskopskih, kulturelnih i biohemijskih osobina. Konzervacija je vršena u moždano-srčanom bujonu sa 10% sadržajem glicerola na -80°C. Dvostruki disk difuzioni test, kombinovani difuziono-dilucionni test i automatizovani VITEK 2 sistem su korišćeni za određivanje fenotipova rezistencije na makrolide. Geni koji kodiraju rezistenciju na makrolide su detektovani PCR metodom. Ukupna rezistencija sojeva <i>S.pneumoniae</i> na makrolide u Srbiji je iznosila 34%. Sojevi <i>S.pneumoniae</i> rezistentni na makrolide su češće bili izolovani kod dece (36%) u odnosu na odrasle (29%) osobe, i češće su izolovani iz neinvazivnih (35,5%) u odnosu na invazivne (27,4%) materijale. Dominantan fenotip rezistencije na makrolide je bio MLS<sub>b</sub> fenotip (78,5%). Konstitutivan MLS fenotip je bio zastupljen kod 73,9%, a inducibilan MLS kod 4,6% MRSP izolata. Potvrđena je udruženost</p>

	<p><i>mefA</i> gena i M fenotipa; <i>ermB</i> gena i iMLS fenotipa, kao i <i>ermB</i> gena i cMLS fenotipa. Prisustvo oba <i>ermB</i> i <i>mefA</i> gena rezistencije je potvrđeno kod 43,9 % izolata. Svi izolati sa koji su imali oba gena rezistencije su ispoljili MLS<sub>B</sub> fenotip. Istovremena neosetljivost na penicilin je bila zastupljena kod 16% MRSP sojeva. Visok nivo rezistencije na penicilin je imalo svega 5,8% MRSP izolata. Među MRSP sojevima je bio prisutan visok nivo rezistencije na tetraciklin (81,3%) i trimetoprim-sulfametoksazol (74,3%). Multirezistentni sojevi, koji su bili rezistentni na tetracikline i trimetoprim-sulfametoksazol su predstavljali dve trećine (66,1 %) MRSP izolata. Zastupljenost udružene rezistencije MRSP na tetraciklin i trimetoprim-sulfametoksazol je bila veća kod sojeva sa MLS fenotipom (73,1%) u odnosu na sojeve sa M fenotipom (36,7%). Zastupljenost istovremene rezistencije na makrolide i druge antibiotike među kojima su penicilin, amoksicilin, cefotaksim, tetraciklin, trimetoprim-sulfametoksazol, kao i multirezistentnih sojeva je bila veća kod pedijatrijskih izolata pneumokoka u odnosu na sojeve dobijene kod odraslih. Učestalost istovremene rezistencije na makrolide i druge antibiotike među kojima su tetraciklin i ofloksacin je bila više prisutna među neinvazivnim u odnosu na invazivne MRSP izolate. Invazivni MRSP izolati iz likvora su pokazivali veću rezistenciju na beta laktamske antibiotike u odnosu neinvazivne sojeve. MRSP sojevi su pokazali veoma visok nivo osetljivosti na levofloksacin (99,6), telitromicin (98,4%), cefotaksim (93,5%), imipenem (97,3%). MRSP sojevi su u potpunosti bili osetljivi na vankomicin, linezolid, moksifloksacin, sparfloksacin, rifampicin i pristinamicin. Među invazivnim sojevima <i>S.pneumoniae</i> rezistentnim na makrolide je nađeno 12 različitih serotipova. Polovina izolata je pripadala serotipovima 19F (25%) i 14 (23%), dok su sledeći po učestalosti bili 6A (10,4%) i 23F (8,3%). Istovremena rezistencija na makrolide, penicilin, tetracikline i trimetoprim-sulfametoksazol je nađena kod serotipova 19F, 14 i 23F, dok su serotipovi 12F i 31 bili neosetljivi samo na makrolide. Naše istraživanje predstavlja prvu detaljnu analizu fenotipskih i genotipskih osobina sojeva pneumokoka rezistentnih na makrolidne antibiotike u Srbiji. Dobijeni rezultati ukazuju na potrebu za aktivnim nadzorom nad pneumokoknim infekcijama u Srbiji.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	10.02.2015.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>Predsednik: Prof. dr Vesna Milošević, redovni profesor, Institut za javno zdravlje Vojvodine, Medicinski fakultet, Novi Sad</p> <p>Član: Doc dr Vladimir Petrović, docent, Institut za javno zdravlje Vojvodine, Medicinski fakultet, Novi Sad</p> <p>Član: Prof dr Mira Mihajlović Ukropina, redovni profesor, Institut za javno zdravlje Vojvodine, Medicinski fakultet, Novi Sad</p> <p>Član: Prof dr Lazar Ranin, redovni profesor, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Beograd</p> <p>Član: Prof dr Ilija Andrijević, vanredni profesor, Institut za plućne bolesti Vojvodine, Medicinski fakultet, Novi Sad</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF MEDICINE  
KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph. D. Thesis
Author: AU	Mirjana Hadnadjev, MD
Mentor: MN	Prof. Natasa Vuckovic Opavski, MD, PhD Prof. Branislav Perin, MD, PhD
Title: TI	Phenotypic and genotypic characterization of macrolide resistant <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2015.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	Number of chapters: 7, pages: 124, images: 8, graphs 11, tables 18, references:546.
Scientific field: SF	Medicine
Scientific discipline: SD	Microbiology
Subject, Key words SKW	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ; Macrolides; Drug Resistance, Bacterial; Phenotype; Genotype; Pneumococcal Infections

UC	615.33.015.8 616.981.21:579.862
Holding data: HD	Library of Medical Faculty Novi Sad, 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, Serbia
Note: N	
Abstract: AB	<p><i>Streptococcus pneumoniae</i> (pneumococcus) is one of the leading morbidity and mortality causes all over the world with respect to infectious diseases. <i>Streptococcus pneumoniae</i> 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. Beta lactam and macrolide antibiotics remained a first choice for empirical treatment of pneumococcal infections. Although macrolides are widely used for treatment of pneumococcal infections, an increase in macrolide resistance might compromise their use. Pneumococcal macrolide resistance is mediated by two major mechanisms: target site modification and active drug efflux. Methylation of the 23S ribosomal ribonucleic acid (rRNA) is performed by the enzyme methylase, encoded by the <i>ermB</i> gene. Modification of ribosomal targets leads to cross-resistance to macrolides (M), lincosamides (L) and streptogramins B (Sb). It is expressed as the MLS<sub>b</sub>-phenotype, which confers a high-level resistance. This phenotype can be either constitutively (cMLS) or inducibly (iMLS). expressed. Another macrolide resistance mechanism is the active drug efflux, encoded by the <i>mefA</i> gene. The drug efflux confers resistance to 14- and 15-membered macrolides only, with no cross-resistance. It is expressed as the M-phenotype, which confers low-level resistance. The objective of this study was : 1) to examine the prevalence of macrolide resistant <i>Streptococcus pneumoniae</i> (MRSP) among invasive and noninvasive isolates in children and adults, 2) to examine the prevalence of co-resistance and multiple-resistance among MRSP strains, 3) to examine the prevalence of macrolide resistant phenotypes, and 4) to examine the prevalence of macrolide resistant genotypes (detect the presence of the <i>ermB</i> and <i>mefA</i> gene). A total of 326 MRSP strains were analyzed, which were collected all over Serbia in the period from January, 2010 - December, 2012. The collected MRSP isolates were referred to the National Reference Laboratory for streptococci and pneumococci for further investigation. Identification based on microscopic, culture and biochemical features of the isolates. Conservation was performed in the brain-heart infusion broth with a 10% glycerol content at -80°C. Macrolide resistance phenotypes were determined by a double disc diffusion test, combined diffusion-dilution test and automatized VITEK 2 system. Macrolide resistance genes were determined by PCR. Overall, macrolide nonsusceptibility rate in Serbia was 34%. MRSP isolates were more prevalent among children (36%) than adults (29%), and were more prevalent among noninvasive (35.5%) than invasive (27.4%) samples. Predominant macrolide resistance phenotype was the MLS<sub>b</sub> phenotype (78.5%), from which 73.9% belonged to cMLS and 4.6% to iMLS phenotype. All the strains assigned to the MLS<sub>b</sub> phenotype harbored <i>ermB</i> gene, while all the strains with M phenotype had the <i>mefA</i> gene. The presence of both <i>ermB</i> and <i>mefA</i> resistance genes was confirmed in 43.9 % of isolates. All the isolates which harbored both</p>

	<p>resistance genes expressed the MLS<sub>B</sub> phenotype. Among macrolide resistant strains, penicillin nonsusceptibility was observed in 16%. A high level resistance was confirmed in 5.8% of MRSP isolates. MRSP strains showed high resistance rates to tetracyclin (81.3%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (74.3%). Multiresistant strains, resistant to tetracyclines and trimethoprim-sulfamethoxazole, made two thirds (66.1 %) of MRSP isolates. Among MRSP, co-resistance to tetracycline and trimethoprim-sulfamethoxazole was more prevalent among MLS phenotypes (73.1%) than M phenotypes (36.7%). Co-resistance strains to macrolides and other antibiotics including penicillin, amoxicillin, cefotaxime, tetracyclin, trimethoprim-sulfamethoxazole and multiresistant strains were more prevalent among children than adult. Co-resistance to macrolides and other antibiotics including tetracycline and ofloxacin was more prevalent among noninvasive than invasive strains. Invasive MRSP isolates from the cerebrospinal fluid showed a higher resistance rate to beta lactam antibiotics than noninvasive strains. MRSP strains had a high susceptibility rates to levofloxacin (99.6), telithromycin (98.4%), cefotaxime (93.5%) and imipenem (97.3%). MRSP strains were fully susceptible to vancomycin, linezolid, moxifloxacin, sparfloxacin, rifampicin and pristinamycin. Among macrolide resistant <i>S.pneumoniae</i> strains, 12 different serotypes were identified. One half of these isolates belonged to the 19F (27.1%) and 14 (22.9%) serotype, followed in frequency by the 6A (10.41%) and 23F (8.3%) serotype. Multiresistant strains (macrolides, penicillin, tetracyclines and trimethoprim-sulfamethoxazole) belonged to serotypes 19F, 14 and 23F, while the 12F and 31 serotype were resistant to macrolides only. This investigation represents the first detailed analysis of phenotypes and genotypes of macrolide resistant pneumococcal strains in Serbia. The obtained results suggest the need for an active surveillance of pneumococcal infections in Serbia.</p>
Accepted on Scientific Board on: AS	10.02.2015.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>President: Vesna Milosevic M.D., Ph.D.</p> <p>Member: Vladimir Petrovic, M.D., Ph.D.</p> <p>Member: Mira Mihajlovic Ukropina, M.D., Ph.D.</p> <p>Member: Lazar Ranin, M.D., Ph.D.</p> <p>Member: Ilija Andrijevic, M.D., PhD</p>

# SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1	Istorijat otkrića <i>S.pneumoniae</i> .....	1
1.2	Osnovne karakteristike pneumokoka .....	2
1.3	Faktori virulencije pneumokoka .....	3
1.4	Transformacija kod pneumokoka.....	7
1.5	Kliconoštvo i bolesti koje izaziva <i>S.pneumoniae</i> .....	8
1.5.1	Neinvazivne pneumokokne bolesti .....	9
1.5.2	Invazivne pneumokokne bolesti.....	10
1.6	Epidemiologija.....	11
1.7	Prevenција pneumokoknih bolesti – vakcine.....	12
1.8	Antibiotici koji se koriste u lečenju pneumokoknih infekcija.....	13
1.8.1	Makrolidi, linkozamidi i streptogramini .....	13
1.8.2	Ketolidi .....	17
1.8.3	Beta laktamski antibiotici (BLA).....	17
1.8.4	Ostali antibiotici koji se koriste u lečenju pneumokoknih infekcija .....	18
1.9	Mehanizmi rezistencije <i>Streptococcus pneumoniae</i> na antibiotike.....	20
1.9.1	Rezistencija na MLS <sub>b</sub> antibiotike .....	20
1.9.2	Mehanizmi rezistencije na telitromicin.....	23
1.9.3	Mehanizmi rezistencije na beta laktamske antibiotike.....	24
1.9.4	Mehanizmi rezistencije na fluorohinolone.....	25
1.9.5	Mehanizmi rezistencije na ostale antibiotike .....	26
1.10	Razvoj rezistencije pneumokoka na antibiotike.....	26
1.10.1	Rezistencija na antibiotike iz grupe makrolida .....	26
1.10.2	Rezistencija na penicilin .....	27
<b>2</b>	<b>CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>30</b>
3.1.1	Identifikacija .....	31
3.1.2	Ekstrakcija DNK pneumokoka .....	31
3.1.3	Tipizacija.....	33
3.2	Detekcija determinanti rezistencije na makrolide .....	34



3.2.1	Ispitivanje fenotipova rezistencije pneumokoka na makrolide .....	34
3.2.2	Određivanje vrednosti MIK eritromicina i klindamicina .....	34
3.3	Test osetljivosti na ostale antibiotike .....	35
3.3.1	Ispitivanje osetljivosti difuzionom metodom .....	35
3.3.2	Ispitivanje osetljivosti na antibiotike automatizovanim sistemom Vitek 2 .....	35
3.4	Detekcija gena rezistencijena makrolide, PCR metodom .....	36
3.4.1	Izolacija i kvantitacija DNK .....	36
3.4.2	Prajmeri koji su korišćeni za umnožavanje gena rezistencije pneumokoka na makrolidne antibiotike .....	36
3.4.3	Protokol za izvođenje reakcije lančanog umnožavanja <i>mefA</i> i <i>ermB</i> gena .....	37
3.4.4	Elektroforeza u agaroznom gelu .....	38
3.4.5	Vizualizacija PCR produkata .....	38
3.5	Statistička obrada rezultata .....	39
<b>4</b>	<b>REZULTATI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>39</b>
4.1	Osnovne osobine uzorka .....	39
4.2	Fenotipovi rezistencije na makrolide sojeva <i>Streptococcus pneumoniae</i> izolovanih u Srbiji ....	42
4.3	Genotipovi rezistencije na makrolide kod sojeva <i>Streptococcus pneumoniae</i> izolovanih u Srbiji .....	45
4.4	Učestalost rezistencije sojeva MRSP na druge antibiotike u Srbiji .....	47
4.5	Serotipizacija invazivnih sojeva MRSP .....	57
<b>5</b>	<b>DISKUSIJA .....</b>	<b>62</b>
5.1	Učestalost rezistencije pneumokoka na makrolidne antibiotike u Srbiji .....	62
5.2	Fenotipovi i genotipovi rezistencije na makrolide sojeva <i>S. pneumoniae</i> .....	69
5.3	Osetljivost MRSP sojeva na penicilin .....	74
5.4	Osetljivost MRSP sojeva na cefalosporine .....	80
5.5	Osetljivost MRSP sojeva na ostale antibiotike .....	83
5.6	Lečenje pneumokoknih infekcija .....	90
5.7	Distribucija serotipova kod sojeva MRSP izolovanih u Srbiji .....	94
5.8	Nadzor nad pneumokoknim infekcijama .....	97
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČCI .....</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>101</b>

## SKRAĆENICE

ABCs -	američki program nadzora nad incidencijom i epidemiologijom invazivnih patogena ( <i>engl.</i> The Active Bacterial Core Surveillance)
AEHB -	akutna egzacerbacija hroničnog bronhitisa
AGAR-	multicentrična studija za praćenje antimikrobne rezistencije u Australiji ( <i>engl.</i> The Australian Group on Antimicrobial Resistance)
ANSORP-	studija za ispitivanje antimikrobne osetljivosti rezistentnih patogena na azijskom kontinentu ( <i>engl.</i> Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens)
AOM --	akutno zapaljenje srednjeg uha ( <i>engl.</i> acute otitis media)
Armed-	projekat za praćenje antimikrobne rezistencije zemalja mediteranskog regiona ( <i>engl.</i> The Antibiotic Resistance Surveillance & Control in the Mediterranean Region)
AST-P576 -	kartica za VITEK
ATCC -	američka kolekcija kultura sojeva ( <i>engl.</i> American type culture collection)
ATS -	američko torakalno udruženje ( <i>engl.</i> American Thoracic Society)
BLA -	beta-laktamski antibiotici
CABP -	vanbolnička bakterijska pneumonija ( <i>engl.</i> Community Acquired Bacterial Pneumonia)
CANWARD -	kanadska alijansa antimikrobne rezistencije ( <i>engl.</i> Canadian Ward Surveillance Study)
CAP-	vanbolnička pneumonija ( <i>engl.</i> Community Acquired Pneumonia)
CARTI -	vanbolnička infekcija respiratornog trakta ( <i>engl.</i> community-acquired respiratory tract infections)
CbpA -	holin vezujući protein A pneumokoka ( <i>engl.</i> Choline-binding protein A)
CBPs -	holin-vezujući proteini ( <i>engl.</i> Choline-binding protein)
CDC -	Centri za kontrolu i prevenciju bolesti ( <i>engl.</i> Centers for Disease Control and Prevention)
CLSI -	Institut za kliničke i laboratorijske standarde ( <i>engl.</i> Clinical and Laboratory Standards Institute)
CROSS-	kanadska studija za praćenje rezistencije respiratornih patogena ( <i>engl.</i> Canadian Respiratory Organism Susceptibility Study)
DDD -	dnevno definisana doza leka na 1000 stanovnika
DNK-	dezoksiribonukleinska kiselina
EARS-Net-	evropska mreža za praćenje antimikrobne rezistencije ( <i>engl.</i> European Antimicrobial Resistance Surveillance System)
ECDC-	evropski centar za prevenciju i kontrolu bolesti ( <i>engl.</i> European Centre for Disease Prevention and Control)
ECDD-	eritromicin klindamicin dvostruki disk difuzioni test ( <i>engl.</i> erythromycin-clindamycin double-disk)
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
FDA	američka Agencija za hranu i lekove ( <i>engl.</i> Food and Drug Administration)
Hib –	<i>Haemophilus influenzae</i> tip B vakcina
HIV –	virus humane imunodeficijencije
HOBP -	hronična opstruktivna bolest pluća
IDSA -	Američko udruženje infektologa ( <i>engl.</i> Infectious Diseases Society of America)
IL –	interleukin
IMPACT -	kanadski program imunizacije ( <i>engl.</i> Canadian Pediatric Society's Immunization Program, Active)
IPB-	invazivne pneumokokne bolesti
IU-	međunarodna jedinica ( <i>engl.</i> International Unit)
LPXTG –	površinski proteini pneumokoka ( <i>engl.</i> Leucine-proline-x-threonine-glycine binding motif)

Lyt –	autolizin
McF-	McFarland
MDR-	multirezistentni sojevi ( <i>engl.</i> Multidrug resistant)
MH-	Mueller Hinton agar
MIK-	minimalna inhibitorna koncentracija
µm-	Mikrometar
MRPNP-	pneumokok rezistentan na makrolide i penicilin ( <i>engl.</i> Macrolide resistant penicillin nonsusceptible <i>Streptococcus pneumoniae</i> )
MRSP	Sojevi <i>Streptococcus pneumoniae</i> rezistentni na makrolide ( <i>engl.</i> Macrolide-resistant <i>Streptococcus pneumoniae</i> )
MS -	meningealni sojevi
Nan-	neuraminidaza
NMS	nemeningelani sojevi
NRL -	Nacionalna referentna laboratorija
NVT-	nevakcinalni tipovi
PABA-	para-aminobenzoeva kiselina
PAF-	trombocit aktivirajući faktor ( <i>engl.</i> Platelet-activating factor)
PavA -	fibronektin vezujući protein ( <i>engl.</i> Pneumococcal adhesion and virulence A)
PBS –	pufersani fiziološki rastvor ( <i>engl.</i> phosphate-buffered saline)
Pce -	fosforilholin esteraza ( <i>engl.</i> phosphorylcholine esterase)
PCR-	reakcija lančanog umnožavanja ( <i>engl.</i> polimerase chain reaction)
PCV-	pneumokokna konjugovana vakcina ( <i>engl.</i> Pneumococcal Conjugate Vaccine)
PFGE-	elektroforeza u pulsirajućem električnom polju ( <i>engl.</i> pulsed-field gel electrophoresis)
Ply -	pneumolizin
PNSP -	penicilin neosetljivi pneumokok
PPSV-	pneumokokna polisaharidna vakcina ( <i>engl.</i> Pneumococcal Polysaccharide Vaccine)
PROTEKT US–	studija antimikrobne osjetljivosti na respiratorne patogene ( <i>engl.</i> Prospective Resistant Organism Tracking and Epidemiology for the Ketolide Telithromycin in the United States).
PsaA -	pneumokokni površinski antigen A ( <i>engl.</i> Pneumococcal surface antigen A)
PVP-	penicilin-vezujući proteini
RNK.-	ribonukleinska kiselina
rpm -	broj obrtaja u minuti ( <i>engl.</i> rotation per minute)
SENTRY-	studija za nadzor nad rezistencijom bakterija na antimikrobne preparate ( <i>engl.</i> Antimicrobial Surveillance Program)
Ta-	temperatura vezivanja prajmera ( <i>engl.</i> annealing temperature)
Taq polimeraza -	termostabilna DNK polimeraza izolovana iz termofilne bakterije <i>Thermus aquaticus</i>
TEST–	globalna studija za ispitivanje osjetljivosti bakterija na tigećiklin ( <i>engl.</i> Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial)
TIGR-	Institut za genska istraživanja ( <i>engl.</i> The Institute for Genomic Research)
Tm-	Temperature topljenja ( <i>engl.</i> melting temperature)
Tn-	transpozoni
TNF-	faktor nekroze tumora ( <i>engl.</i> tumor necrosis factor)
VT-	vakcinalni tipovi

## 1 UVOD

*Streptococcus pneumoniae* ili pneumococcus je Gram pozitivna bakterija koja pripada rodu *Streptococcus*, familiji *Streptococcaceae*. Jedan je od vodećih izazivača invazivnih oboljenja kao što su bakterijemijaska pneumonija, septikemija i meningitis. Takođe uzrokuje neinvazivna, ali vrlo česta oboljenja kao što su akutna upala srednjeg uha (*engl.* acute otitis media, AOM) 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 dece uzrasta do 5 godina (2). Lečenje 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. Prevalencija rezistencije značajno varira među državama. Iako su makrolidi u širokoj upotrebi u lečenju respiratornih infekcija izazavnih pneumokokom, porast rezistencije bi mogao da kompromituje njihovu upotrebu.

### 1.1 Istorijat otkrića *S.pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae* je prvi put opisan pre više od 130 godina. Klebs ga je 1875.godine prvi put uočio u direktnom preparatu pleuralnog izliva pacijenta obolelog od pneumonije. Potom su 1881. godine, Džordž Sternberg (George Sternberg) u SAD i Luj Paster (Louis Paster) u Francuskoj, nezavisno jedan od drugog izolovali pneumokok i demonstrirali njegovu patogenost inokulacijom u zeca (3, 4). U to vreme je bio prepoznat kao vodeći uzročnik lobarne pneumonije. Nazvan je *Diplococcus pneumoniae* i u eri pre otkrića antibiotika je uzrokovao više smrtnih ishoda nego karcinomi i kardiovaskularne bolesti zajedno. Početkom 1900-ih godina pneumokok je bio predmet istraživanja mnogih laboratorija širom sveta, uključujući “Public Health Ministry” u Londonu i “Rockefeller Institut” u Njujorku.

Fred Grifit (Fred Griffith) je 1928. godine izveo čuveni eksperiment inokulacije u miša dva soja pneumokoka, od kojih je jedan bio inkapsuliran i ubijen toplotom, a drugi živ, i nekapsuliran. Tom prilikom je dokazao da se živi nekapsulirani soj može transformisati u inkapsulirani soj sa istim kapsularnim tipom kao mrtav soj. Nazvao je ovaj fenomen - transformacija i ukazao na značaj kapsule u virulenciji (5, 6). Više od decenije kasnije Oswald Ejveri (Oswald T. Avery),

Kolin Meklaud (Colin M. MacLeod) i Meklin Mekarti (Maclyn McCarty) su dokazali da je DNK nosilac genetske informacije koja je odgovorna za sintezu kapsule (7). Sva dalja istraživanja na pneumokoku su doprinela razumevanju brojnih bioloških principa od fundamentalnog značaja za genetiku.

Nova era istraživanja pneumokoka je započela kada je sekvenciran njegov genom. Kompletna genska sekvenca soja pneumokoka serotipa 4 je očitana i novembra 1997. godine je objavljena na sajtu <http://www.tigr.org> Instituta za genetička istraživanja (*engl.* The Institute for Genomic Research, TIGR) iz Rokvila (*engl.* Rockville), SAD (8). To je bio prvi genom gram-pozitivnih bakterija koji je sekvenciran u celini (9).

## 1.2 Osnovne karakteristike pneumokoka

*Streptococcus pneumoniae* je Gram pozitivna bakterija oblika plamena sveće, dijametra 1-2 µm, koja se reda u parovima ili kratkim lancima. Katalaza je negativna, nepokretna, asporogena (10) i stvara tipičnu alfa hemolizu na krvnom agaru. Pneumokoke se razlikuju od drugih alfa-hemolitičnih ili viridans streptokoka na osnovu njihove osetljivosti na optohin, rastvorljivosti u žuči i na osnovu imunološke reakcije kapsule sa specifičnim antiserumima.

Fenotipska identifikacija izolata pneumokoka kojima nedostaju tipične karakteristike (sojevi rezistentni na optohin, sojevi bez kapsule) je otežana (11, 12). Studije su pokazale da je do 3 % sojeva pneumokoka rezistentno na optohin (13). Smatra se da je test lize pneumokokne kulture žučnim solima pouzdaniji od optohinskog testa. 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).

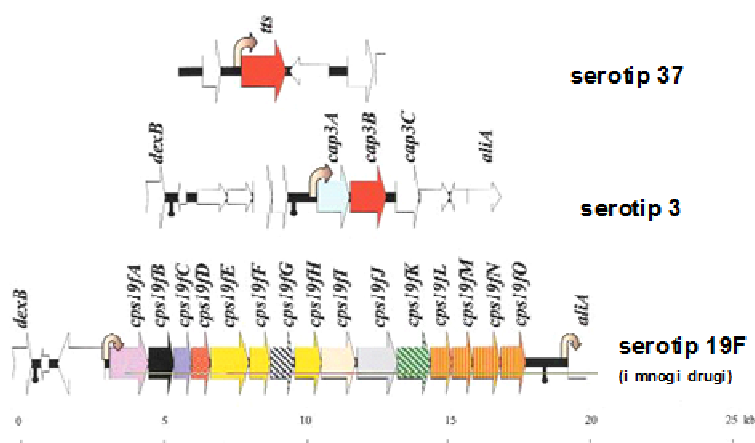
Genetičke studije su pokazale da postoji visok stepen srodnosti između *S.pneumoniae* i nekih vrsta viridans streptokoka - *S. mitis*, *S. pseudopneumoniae*, *S.oralis*, *S.infantis* i *S. oligofermentans*. Zato se smatra da u nekim slučajevima samo molekularne metode mogu pomoći u razlikovanju ovih vrsta: DNK probe (AccuProbe, GEN-PROBE, San Diego, Ca), reakcija lančane polimerizacije (PCR), kojima se detektuju *lytA*, *ply*, *psaA* geni i metoda MLST (*engl.* multilocus sequence typing).

### 1.3 Faktori virulencije pneumokoka

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

**Polisaharidna kapsula** u potpunosti okružuje bakterijsku ćeliju i predstavlja glavni faktor virulencije pneumokoka (6, 14, 15). 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 (16, 17). 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 (slika 1). Uprkos navedenim raznolikostima u građi, kapsula svih tipova ima istu primarnu funkciju, da spreči opsonofagocitozu i inhibiše aktivaciju komplementa alternativnim putem (18, 19, 20, 10).

**Slika 1: Razlike u broju i sastavu gena koji kodiraju kapsulu kod tri različita serotipa pneumokoka**



(Izvor: Lopez, 2004 (21))

Kapsularni polisaharidi su antigeni i indukuju stvaranje tipski specifičnih antitela u domaćinu (22, 3). Pomenute razlike u sastavu polisaharida kapsule predstavljaju osnovu serotipizacije

pneumokoka. Iako postoji preko 90 različitih serotipova pneumokoka, relativno mali broj njih izaziva većinu pneumokoknih bolesti. Najčešći izazivači invazivnih infekcija su serotipovi 6B, 9V, 14, 19F, 23F, 18C, 7F, 1, 6A i 4. Navedeni serotipovi uzrokuju između 60 i 80% pneumokoknih infekcija širom sveta. Zastupljenost pojedinih serotipova varira u zavisnosti od uzrasta, geografske lokacije i vrste oboljenja. Osim inkapsuliranih postoje i neinkapsulirane forme pneumokoka (23). Neinkapsulirane forme pneumokoka su prisutne kod 2% sojeva izolovanih iz primarno sterilnih tečnosti (24), ali se često mogu naći kod osoba sa konjunktivitisom (25). Pneumokok može da reguliše ekspresiju kapsule, te je u slučajevima kada je neophodno da budu izloženi adhezini, npr. kod kolonizacije, ekspresija kapsule redukovana, dok je visok nivo kapsularne ekspresije esencijalan za izbegavanje komplementom posredovane opsonofagocitoze tokom sistemske infekcije. Zahvaljujući velikoj sposobnosti razmene genetskog materijala transformacijom, sojevi pneumokoka mogu međusobno da prenose gene za sintezu kapsule i tako izmene kapsularni serotip (*engl.* serotype switch) (26). Navedena pojava je uglavnom posledica selektivnog pritiska. Pojedinačni serotip pneumokoka obično obuhvata brojne genski različite klonove usled horizontalnog transfera gena za biosintezu kapsule (27, 28, 29).

Postoje dva različita sistema nomenklature serotipova pneumokoka, danski i američki. Danski sistem grupisanja serotipova, baziran na antigenskim sličnostima, se pokazao funkcionalnim i u upotrebi je u referentnim laboratorijama za pneumokok. Prema danskom sistemu, pneumokok je grupisan u 46 grupa i 94 serotipa, koji su označeni brojevima ili kombinacijom slova i brojeva (30).

Mnogi faktori virulencije pneumokoka se nalaze na površini bakterijske ćelije. Kao i druge streptokoke, pneumokok adheriše za epitelne ćelije nazofarinksa. Za različite niše je karakteristično prisustvo različitih receptora. Tako je, na primer sijalinska kiselina dominantan receptor na konjunktivi, Eustahijevoj tubi i u nazofarinksu, dok je disaharid N-acetilgalaktozamin b1-4 galaktoza prisutan u donjem respiratornom traktu.

Među najvažnije pneumokokne **adhezine** se ubrajaju pneumokokni površinski antigen A (PsaA) (*engl.* Pneumococcal surface antigen A) i fibronektin vezujući protein PavA (*engl.* Pneumococcal adhesion and virulence A) (slika 2). Pneumokokni površinski antigen A (PsaA) je

po sastavu lipoprotein koji se nalazi na površini bakterijske ćelije, a deo je ABC transportnog sistema pneumokoka. Uloga ovog sistema je da snabdeva bakterijsku ćeliju jonima  $Mn^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  (31). Dokazano je da svi serotipovi pneumokoka poseduju *psaA* gen (31-33).

Fibronektin vezujući protein PavA ima takođe ulogu adhezina i nalazi se na površini pneumokoka. Njegova uloga je da se vezuje za imobilisanu formu humanog fibronektina (34), glikoproteina koji je sastavni deo membrane epitelnih ćelija. Kodiran je od strane *pavA* gena (35).

Pored ovih proteina, za adheziju pneumokoka je vezan i holin vezujući protein pneumokoka A (CbpA) (*engl.* Choline-binding protein A), ali i enzimi IgA1 proteaza i neuraminidaza, koji cepajući imunoglobulin A i mucin, ogoljuju proteinske receptore na površini bakterijske ćelije.

Iako se, kao i druge streptokoke, smatra ekstracelularnom bakterijom, ustanovljeno je da pneumokok može da ulazi i prolazi kroz ćelije respiratornog epitela i vaskularnog endotela, što ima veliki značaj u širenju pneumokoka (36, 37).

Najbolje proučeni proteinski faktori virulencije su pneumolizin (Ply), autolizin LytA, holin-vezujući proteini (CBPs) PspA i PspC ili CbpA, neuraminidaze NanA i NanB i hijaluronidaza.

**Pneumolizin** je ekstracelularni produkt pneumokoka. Pripada familiji toksina koji formiraju pore. Reaguje sa holesterolom u ćelijskoj membrani eukariotskih ćelija, stvara pore u membrani ćelija i dovodi do njihove lize (38, 39). Osim litičke aktivnosti, pneumolizin ima brojne efekte na ćelije i tkiva. Inhibira baktericidnu aktivnost fagocita, usporava pokretljivost cilija, stimuliše produkciju citokina, posebno IL-1, IL-8 i TNF, od strane makrofaga, stimuliše aktivnost fosfolipaze i aktivira klasičnim putem komplement, vezujući Fc fragment antitela (40). Pospešuje intraalveolarnu replikaciju pneumokoka, penetraciju iz alveola u intersticijum kao i diseminaciju u krvne sudove (41). Tokom meningitisa, doprinosi gubitku neurona (42).

**LytA** (N-acetilmuramil-L-alaninamidaza) je glavni autolizin pneumokoka čiju sintezu kodira *lytA* gen (43, 44). Pripada ekstracelularnim holin-vezujućim proteinima koji na kraju eksponencijalne faze rasta dovodi do uništenja mikroorganizma. Tokom većeg dela životnog ciklusa bakterije je neaktivan, a aktivira se pod određenim okolnostima (zaustavljanje biosinteze ćelijskog zida, terapija penicilinom). Kada je aktivan, specifično cepa kovalentne veze



peptidoglikana ćelijskog zida pneumokoka i dovodi do autolize bakterijske ćelije (45, 46). Autoliza indirektno doprinosi virulenciji, zbog oslobađanja degradacionih produkata ćelijskog zida kao što su pneumolizin, alfa-hemolizin, delovi peptidoglikana i dr. Osim LytA, u autolizine (murein hidrolaze) pneumokoka se ubrajaju i glukozidaze LytB (47) i LytC ( $\beta$ -N-acetilglukozaminidazu i  $\beta$ -N-acetilmuramidaza (lizozim)), kao i Pce (fosforilholin esteraza) (48, 49). Detekcija *lytA* gena se koristi za identifikaciju *S.pneumoniae*.

Važna karakteristika pneumokoka je da za svoj rast zahteva prisustvo **holina**. U sastavu teihoinske i lipoteihoinske kiseline ćelijskog zida pneumokoka se nalazi holin. To je aminoalkohol koji igra ključnu ulogu u fiziologiji pneumokoka (50). Pneumokok koristi fosforilholin da bi se vezao za PAF receptor (51, 52, 36). Holinske rezidue ćelijskog zida deluju kao ligandi familije pneumokoknih proteina poznatih kao holin-vezujući proteini (9). Prvi otkriveni holin-vezujući protein je bio pneumokokni površinski protein A (PspA) (53, 54) a potom PspC (CbpA) (55) i holin-vezujući protein A (CbpA).

**Neuraminidaza** je enzim koji cepa N-acetil neuraminsku kiselinu iz mucina, glikolipida, glikoproteina i oligosaharida na površini epitelnih ćelija i u telesnim tečnostima (56, 31). Na taj način olakšava adherenciju pneumokoka. Pneumokok poseduje najmanje dve neuraminidaze, NanA i NanB, od kojih NanA ima znatno veću aktivnost (57). Novija istraživanja genoma pneumokoka ukazuju na prisustvo i treće NanC neuraminidaze (58).

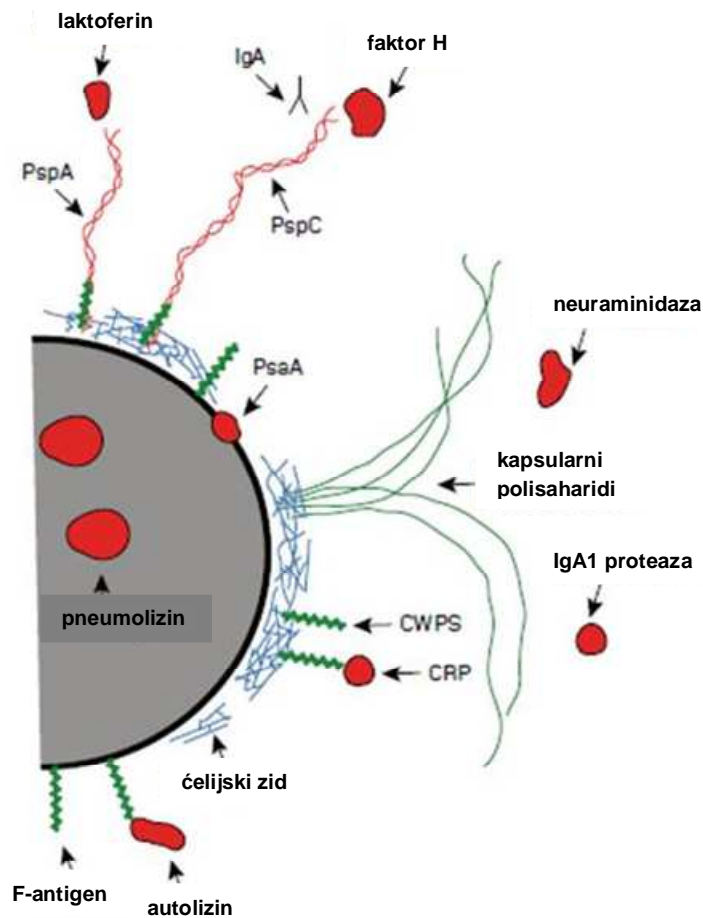
Čak 99% sojeva pneumokoka luči enzim **hijaluronidazu**, koja razgrađuje hijaluronsku kiselinu vezivnog tkiva i ekstracelularnog matriksa. Na taj način omogućava kolonizaciju, invaziju i širenje pneumokoka u tkivo (59).

Pneumokok ostvaruje bolju kolonizaciju zahvaljujući lučenju i **IgA1 proteaze**. Ovaj enzim razgrađuje najznačajniji imunoglobulin sluznica – IgA, te i na taj način oštećuje imunitet domaćina.

Ostali faktori virulencije pneumokoka su LPXTG površinski proteini vezani sortaza enzimom (60), piruvat oksidaza (20), superoksid dismutaze MnSOD i FeSOD (61), NADH oksidaza (62), cinkmetalo proteaze ZmpB, ZmpC itd. (63).

Od svih navedenih struktura, ćelijski zid pneumokoka ima najveći kapacitet da aktivira inflamatorni odgovor domaćina. Teihoiniska i lipoteihoiniska kiselina efikasno aktiviraju komplement alternativnim putem, vezuju C-reaktivni protein, podstiču stvaranje citokina, azotnog oksida i doprinose prilivu neutrofila (64).

**Slika 2: Shematski model ćelijskog zida i površinskih proteina pneumokoka**



(Izvor: *Streptococcus pneumoniae*; Textbook in Serotyping, Virulence Factors and Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Measuring Pneumococcal Antibodies (65))

#### 1.4 Transformacija kod pneumokoka

*Streptococcus pneumoniae* ima sposobnost prirodne transformacije, odnosno preuzimanja i inkorporisanja u sopstveni genom, slobodne DNK, iz okolnog medijuma. Donori ove DNK su, pored samog pneumokoka i brojne druge srodne vrste iz grupe viridans streptokoka, posebno mitis grupe - *Streptococcus mitis* i *Streptococcus oralis* (66, 67). Ovo je kod pneumokoka ujedno

i jedini način razmene genskog materijala (68, 69). Pnumokok može preuzeti oko 10% svog ćelijskog DNK sadržaja (70). Geni pneumokoka koji su najviše podložni transformaciji su geni koji kodiraju sintezu penicilin vezujućih proteina i geni koji kodiraju sintezu faktora virulencije (71, 72). Klinički izolati pneumokoka se mogu razlikovati u čak 20% genskog materijala (73).

Pored transformacije, pneumokok može da razmenjuje genski materijal putem konjugativnih transpozona (npr. Tn 916), koji obično nose gene rezistencije na makrolide. S obzirom da se inkorporacija DNK, koja je prenetna transformacijom, u hromozom donorske ćelije, obavlja mehanizmom homologe rekombinacije, neophodno je da postoji visok stepen homologije između donora i recijepijenta. Sa druge strane, za prenos gena putem konjugativnih transpozona nije neophodno da postoji visoka srodnost između bakterija koje ih razmenjuju.

## 1.5 Kliconoštvo i bolesti koje izaziva *S.pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae* kolonizuje gornje respiratorne puteve zdravih osoba, već nakon par meseci od rođenja. Procenat kliconoštva varira u zavisnosti od uzrasta, sezone, geografske lokacije. Najveći je kod dece mlađe od 5 godina i može iznositi i do 60% (20, 74-83). Da li će kolonizacija prerasti u oboljenje zavisi od brojnih faktora, prvenstveno od virulencije pneumokoka kao i od stanja imuniteta domaćina. U gornjem respiratornom traktu zdrave dece može istovremeno biti prisutno i do četiri različita serotipa pneumokoka (84, 85). Pojedini serotipovi (14, 6B, 9V, 19F, 23F, 18C, 7F, 1, 6A i 4) se obično nalaze kod kliconoša, a s obzirom da je kliconoštvo često kod dece, nazivaju se i “pedijatrijski”. Transmisija pneumokoka se ostvaruje kapljičnim putem sa kliconoša ili sa obolele na zdravu osobu. Rizik da kolonizacija progredira u infekciju je najveći ubrzo nakon ekspozicije, ali se bolest može razviti i nakon nekoliko meseci. Smatra se da infekcija nastaje ubrzo nakon kolonizacije novim serotipom pneumokoka (86-88). Oboljevanje je češće tokom zimskih meseci kada je nivo transmisije najveći (89, 90). Povećan rizik od oboljevanja među decom mlađom od 2 godine je povezan sa nezrelim imunskim odgovorom na polisaharide kapsule i visokom prevalencom kolonizacije (91).

Pneumokokne bolesti nastaju kada pneumokok sa mesta kolonizacije dospe u nišu koja nije fiziološki kolonizovana, npr u Eustahijevu tubu, paranazalne sinuse, bronhiole, alveole ili

jajovode. Ukoliko odbrambeni mehanizmi ne uspeju da odstrane pneumokok, dolazi do njegove proliferacije i do razvoja infekcije.

### 1.5.1 Neinvazivne pneumokokne bolesti

*S.pneumoniae* je čest izazivač neinvazivnih oboljenja, lokalizovanih na površini sluznica. Kod male dece je veoma često pneumokokno zapaljenje srednjeg uha, a ova vrsta je poznata i kao najčešći uzročnik vanbolničkih pneumonija u svim starosnim grupama (92).

Zapaljenje srednjeg uha je najčešća manifestacija pneumokokne bolesti (93, 94). Ukoliko se neadekvatno leči, bolest može progredirati u mastoiditis. U slučaju prolongirane infekcije moguće je širenje pneumokoka preko mastoidnog sinusa, u cerebrospinalnu tečnost, dovodeći do meningitisa. Bakterija može do meningealnih stići i krvotokom. Serotipovi koji najčešće izazivaju otitis su oni koji kolonizuju nazofarings, a u zemljama u kojima se primenjuje vakcina, to je serotip 19A, koji je kod 23% slučajeva multirezistentan (95).

Pneumokok se ubraja među najčešće bakterijske izazivače akutnog sinuzitisa i uzročnik je oko jedne trećine bakterijskih konjunktivitisa (96). Kod dece mlađe od pet godina, infekcija sinusa je uglavnom ograničena na etmoidne i maksilarne sinuse. Kod pneumokoknog konjunktivitisa značajnu ulogu igraju nekapsulirani sojevi (97, 98).

Ova bakterija je, takođe, i najčešći uzročnik vanbolničke pneumonije (*engl.* Community Acquired Pneumonia, CAP).

Komplikacije pneumokokne pneumonije su efuzija, empijem, nekrotizirajuća pneumonija i apsces pluća. Iako do 40% pacijenata sa pneumokoknom pneumonijom ima efuziju pleure, samo 10% tih pacijenata ima dovoljnu količinu izliva za aspiraciju a samo 2% njih razvije empijem. *Streptococcus pneumoniae* je idalje najčešći uzročnik empijema među pedijatrijskom populacijom (99-101). U retkim slučajevima pneumokokna pneumonija može uzrokovati apsces pluća (102, 103). Kod oko 20% pacijenata pneumokok prodire iz pluća u krvotok, dovodeći do bakterijemije, koja se dalje može komplikovati meningitisom (90, 104- 108).

## 1.5.2 Invazivne pneumokokne bolesti

Ukoliko dođe do prodora pneumokoka u primarno sterilne regije, obično krv i likvor, nastaju invazivne pneumokokne bolesti (IPB). Prema Evropskom centru za prevenciju i kontrolu bolesti (*engl.* European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) sva navedena klinička stanja se mogu proglasiti invazivnom bolešću jedino ukoliko je pneumokok izolovan iz primarno sterilne regije, i/ili je u njoj dokazano prisustvo njegovog antigena i/ili nukleinske kiseline (109).

Bakterijemija je najčešća manifestacija IPB. U većini slučajeva je u pitanju primarna bakterijemija koja se uglavnom javlja kod dece mlađe od 3 godine. Ustanovljeno je da je, nakon uvođenja Hib vakcine, pneumokok registrovan kao uzročnik 90% slučajeva okultne bakterijemije kod dece (110, 111). Bakterija se kod ove populacije može, direktno iz nazofaringsa, translocirati kroz epitel, invadirati submukozu, preneti kroz endotel kapilara, prodreti u krvotok i dovesti do bakterijemije. Kod odraslih pacijenata, pneumokokna bakterijemija je češće povezana sa ustanovljenom fokalnom infekcijom, kao što je hronični otitis, pneumonija i meningitis. U većini slučajeva okultna bakterijemija spontano prolazi. Komplikacije se razvijaju kod oko 10% pacijenata i vrlo su teške - meningitis, osteomijelitis, pneumonija, infekcija zglobova i mekih tkiva, i sepsa. Pacijenti sa visokim brojem leukocita i temperaturom, a koji nisu prethodno primali antibiotsku terapiju, kao i deca mlađa od 20 meseci su u visokom riziku za nastanak perzistentne bakterijemije ili razvoja fokalnih infekcija (99, 100).

Pneumokokni meningitis je najčešća i najteža supurativna komplikacija pneumokokne bakterijemije. Čak i uprkos adekvatnoj antibiotskoj terapiji, stopa mortaliteta se kreće od 15 do 30% (112-115). Pneumokokni meningitis nosi veći rizik od smrtnog ishoda i značajnih neuroloških sekvela nego meningitisi uzrokovani drugim bakterijama (npr. *Haemophilus influenzae* tip B, *Neisseria meningitidis*).

Druge manifestacije invazivnih infekcija, kao što su endokarditis, perikarditis, septični artritis, osetomijelitis i apsces mozga, se retko susreću (116-119). Uglavnom nastaju kao komplikacija pneumokokne bakterijemije. U dečijem uzrastu pneumokok je uzročnik 4% slučajeva osteomijelitisa i 20% slučajeva septičnog artritisa. Pneumokokni endokarditis se retko

javlja u antibiotskoj eri. Osler je još 1881. godine opisao klinički trijas: pneumokokni endokarditis, meningitis i pneumoniju, (tzv. Austrianov sindrom), koji se češće javljao kod alkoholičara. Pneumokokni tenosinovitis, horioamnionitis i apsces mišića, jetre, pankreasa, slezine i bubrega - se javljaju veoma retko (119). Abdominalne infekcije uzrokovane pneumokokom, kao što su peritonitis, apendicitis i terminalni ileitis, se takođe javljaju kod malog broja pacijenata (120-122). Pneumokok može iz spoljnjih genitalija preko jajovoda dospeti do peritoneuma i izazvati peritonitis. Peritonitis je jedina IPB koja se češće javlja kod osoba ženskog pola. Infekcije mekih tkiva, celulitisi i miozitisi, se češće javljaju kod osoba sa komorbiditetima i HIV infekcijom (99).

## 1.6 Epidemiologija

*Streptococcus pneumoniae* se ubraja među najvažnije bakterijske uzročnike povezane sa značajnim morbiditetom i mortalitetom, prvenstveno kod dece ali i kod odraslih (123). Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije od pneumokoknih bolesti godišnje umre od 0,7-1 milion dece uzrasta do 5 godina (124). Smrtnost od IPB kod dece iznosi oko 11% (2).

U SAD se godišnje registruje približno 4 miliona slučajeva teških oblika pneumonija, koje zahtevaju hospitalizaciju. U svim uzrasnim grupama je pneumokok najčešći uzročnik (125). Najviša incidencija IPB je prisutna kod dece mlađe od 2 godine i starijih od 65 godina (126). Faktori rizika za nastanak pneumokokne pneumonije su infekcija virusom influence (127), alkoholizam (128), pušenje (129), hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP) (130), astma (131), splenektomija (132), HIV infekcija (133), multipli mijelom (134), sistemski lupus (135), transplantacija (136), ciroza, hronična bubrežna insuficijencija, hematološki maligniteti, kardiovaskularne bolesti, socio-ekonomski status i prethodna primena antibiotika (137-141). Stopa mortaliteta pneumokokne pneumonije se kreće od 16 do 55% (142-145). Pneumokokna pneumonija može biti praćena sepsom i kod tih pacijentata je stopa smrtnosti iznad 25% (142).

Decenijama je incidencija pneumokokne pneumonije sa bakterijemijom iznosila 9-18/100 000 slučajeva među odraslim pacijentima (125, 146, 147). U 2010. godini u SAD je incidencija IPB kod dece < 1 godine iznosila 34,2/100 000 stanovnika, kod osoba  $\geq 65$  godina 36,4/100 000 stanovnika, dok je kod osoba uzrasta od 18 do 34 godine iznosila 3,8 slučajeva na 100 000 (148).

Sa druge strane među osobama sa HIV infekcijom, incidencija je 2010. godina bila 173 na 100 000 stanovnika (149). Uočeno je da postoji veza između određenih kapsularnih serotipova pneumokoka i težine IPB kao i uzrasta (37, 150). Pored “pedijatrijskih” serotipova - 6B, 9V, 14, 19F i 23F (151) i tipovi 18C, 7F, 1, 6A i 4 se nalaze među 10 serotipova odgovornih za oko 80% slučajeva IPB kod dece uzrasta do 5 godina (152). Mortalitet od IPB u razvijenim zemljama se kreće od 1% do 30% u zavisnosti od uzrasta i faktora rizika (153-155, 137), a može dostići i do 50% u zemljama u razvoju (156).

## 1.7 Prevencija pneumokoknih bolesti – vakcine

Postoji dva tipa vakcina koje se koriste u prevenciji pneumokoknih infekcija: pneumokokna polisaharidna vakcina (*engl.* Pneumococcal Polysaccharide Vaccine, PPSV) i konjugovana vakcina (*engl.* Pneumococcal Conjugate Vaccine, PCV) (157). Pneumokokna polisaharidna vakcina sadrži polisaharide 23 najčešća tipa pneumokoka: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F i 33F (157). Navedeni serotipovi prisutni u vakcini su odgovorni za 85% invazivnih pneumokoknih bolesti u SAD (158). S obzirom da je polisaharid tzv. timus nezavisni antigen, polisaharidna vakcina indukuje samo B-ćelijski imunski odgovor kod domaćina, te nema razvoja memorijskih limfocita. Različite studije su pokazale da je efekat vakcine u prevenciji IPB 48%-81% kod odraslih osoba sa zreлим imunskim sistemom (157). Ova vakcina je pokazala efikasnost u preveniranju posledica pneumonije i mortaliteta kod starijih od 65 godina ako se daje zajedno sa vakcinom protiv influence (159). Ciljna grupa za upotrebu ove vakcine su stariji od 65 godina kao i deca starija od 5 godina koja su u riziku da obole od teške pneumokokne infekcije (157). Međutim, polisaharidna vakcina je slabo imunogena kod dece mlađe od 2 godine, koja predstavljaju najugroženiju populaciju za IPB (160, 161).

Zbog toga je razvijen drugi tip vakcine koji se primenjuje od 2000. godine - konjugovana pneumokokna vakcina. Kapsularni polisaharidi pneumokoka su konjugovani sa visoko imunogenim nepneumokoknim proteinskim nosačem. Konjugovanje proteina i polisaharida se radi da bi se polisaharid preveo iz timus nezavisnog u timus zavisni antigen, koji indukuje bolji imunski odgovor. Do sada su razvijena tri oblika vakcine: PCV7, PCV10 i PCV13, koje se međusobno razlikuju prema broju serotipova pneumokoka koje obuhvataju. U sastavu PCV7 se

nalaze serotipovi: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F i 23F. PVC10 pored navedenih serotipova sadrži i serotipove 1, 5 i 7F, dok su u PCV13 pridodati serotipovi 3, 6A i 19A. Kod PCV7 i PCV13 proteinski nosač je difterijski toksoid CRM 197 (162), dok PCV10, pored difterijskog i tetanusnog toksoida, sadrži i protein D „netipabilnog“ *Haemophilus influenzae*. Ove vakcine indukuju i humoralni i celularni imunski odgovor, aktiviraju memoriju a podstiču i stvaranje mukoznog imuniteta. Delotvorna je kod odojčadi i dece mlađe od 2 godine, kao i u drugim starosnim grupama. Veoma je efikasna u smanjenju incidencije invazivnih i drugih pneumokoknih bolesti kod dece (163-165). U SAD je konjugovana vakcina uvedena 2000. godine i od tada je zabeležen pad incidencije IPB za 60% do 90% kod dece mlađe od dve godine (166-171). Vakcina je pokazala i pozitivan efekat na smanjenje incidencije pneumokokne pneumonije, kao i akutnog zapaljenja srednjeg uha u vakcinisanoj populaciji, ali i u ostalim uzrasnim grupama, što se tumači sticanjem kolektivnog imuniteta (172-175). Ukupna rezistencija pneumokoka na antibiotike je, takođe, smanjena, zahvaljujući uvođenju ove vakcine. Uočeni su, međutim i negativni efekti vakcinacije - kolonizacija nevakcinalnim serotipovima i blag porast incidence IPB izazvanih nevakcinalnim serotipovima.

Zbog svih navedenih mana polisaharidnih vakcina, kao i zbog tehničke nemogućnosti da se konjuguje veliki broj serotipova za proteine, u pripremi su nove generacije pneumokoknih vakcina, koje sadrže neke od najznačajnijih proteina pneumokoka: pneumokokni površinski protein A (PspA), pneumokokni površinski antigen A (PsaA) i pneumolizin (Ply) (90).

## **1.8 Antibiotici koji se koriste u lečenju pneumokoknih infekcija**

### **1.8.1 Makrolidi, linkozamidi i streptogramini**

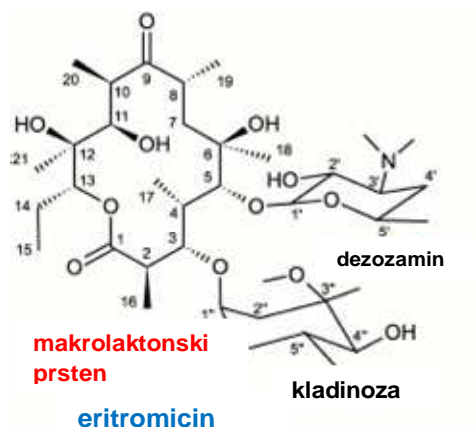
Makrolidi, linkozamidi i streptogramini su klinički značajna grupa antibiotika. Mada se hemijski razlikuju, imaju slične mehanizme antimikrobne aktivnosti kao i mehanizme rezistencije pa se smatraju istom MLSb funkcionalnom grupom. Njihova funkcija se osvaruje inhibicijom sinteze proteina u bakterijskom ribozomu (176).



Makrolidi su antibiotici koji u svojoj strukturi sadrže makrociklični laktonski prsten povezan glikozidnim vezama sa delovima dva šećera, deozaminom i kladinozom. Antibiotici unutar klase se međusobno razlikuju na osnovu veličine makrocikličnog prstena (od 14 do 16 ugljenikovih atoma) i zamenama u njemu.

Eritromicin je prirodni i prvi otkriveni antibiotik iz grupe makrolida koji je uveden u kliničku upotrebu. Izolovan je 1952. godine iz aktinomicete *Streptomyces erythreus* (danas *Saccharopolyspora erythraea*) (177). Eritromicin A se sastoji od 14-članog laktonskog prstena za koji su vezani neutralni šećer L-kladinoza i amino-šećer D-deozamin.

**Slika 3: Hemijska struktura eritromicina**

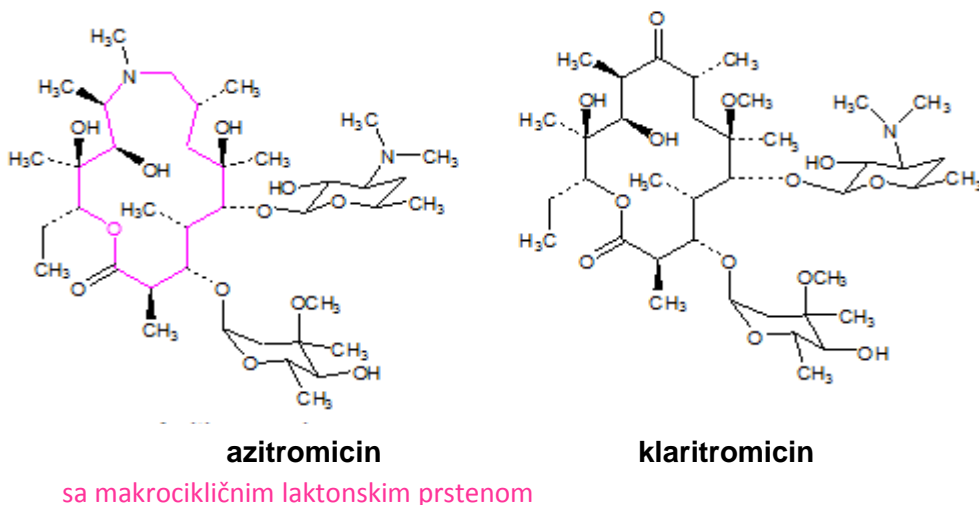


(Izvor: Gaynor M, 2005 (178))

Noviji makrolidi predstavljaju polusintetske derivate baze eritromicina, napravljene sa ciljem da se proširi spektar delovanja, postigne bolja farmakodinamika, administracija jednom dnevno i dobra tolerancija. Drugi 14-člani makrolidi su: roksitromicin, diritromicin i klaritromicin. Klaritromicin je nastao metilacijom hidroksilne grupe eritromicina na 6. poziciji laktonskog prstena (179). Azitromicin je 15-člani semisintetski derivat eritromicina i pripada azalidima. Izveden je od eritromicina dodatkom metilisanog azota u laktonski prsten (180).

Spiramicin, rokitamicin, tilosin, josamicin, midekamicin i miokamicin poseduju 16-člani laktoski prsten (181).

**Slika 4: Razlike u hemijskoj strukturi novijih makrolida**

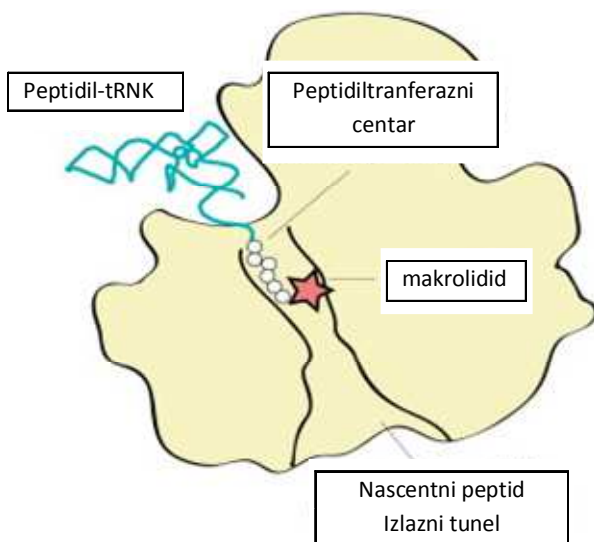


(Izvor: [webmaster@pharmacorama.com](mailto:webmaster@pharmacorama.com). (182))

### 1.8.1.1 *Mehanizam delovanja makrolida, linkozamida i streptogramina (MLS grupa antibiotika)*

MLS antibiotici ostvaruju svoj antibakterijski efekat reverzibilnim vezivanjem za ribozom bakterijske ćelije. Oni inhibišu RNK-zavisnu sintezu proteina vezivanjem za 50S podjedinicu ribozoma (183, 184). Postoji kompeticija između različitih makrolida za vezno mesto na ribozomu, kao i između makrolida i drugih antibiotika (npr. hloramfenikola i linkomicina) čije je ciljno mesto vezivanja takođe 50S podjedinica ribozoma.

### Slika 5: Shematski prikaz 50S podjedinice ribozoma i mesta vezivanja antibiotika iz grupe makrolida



(Izvor: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867412011257> (185))

Eritromicin i drugi makrolidi pokazuju visoku specifičnost za 50S subjedinicu ribozoma, za koju se vezuju sa visokim afinitetom u prisustvu jona  $Mg^{2+}$  i  $K^{+}$  (186). Unutar ribozoma reaguju sa nukleotidima u domenima II i V 23S rRNK, koji grade tunel kroz koji nascentni polipeptidi napuštaju ribozom. Vezivanje makrolida se dešava u blizini peptidiltransferaznog centra, kao i ribozomalnih proteina L22 i L4 (187). Kao posledica ove reakcije dolazi do prekida rasta nascentnog polipeptidnog lanca, odnosno prekida sinteze proteina, kao i sprečavanja sklapanja ribozoma u ranom stadijumu sinteze proteina (181, 184). Četrnaesto- i petnaesto člani makrolidi u manjoj meri inhibiraju i translaciju. Makrolidi uglavnom deluju bakteriostatski, ali mogu delovati i baktericidno u zavisnosti od osetljivosti bakterija i koncentracije antibiotika (179). Kod pneumokoka makrolidi postižu baktericidan efekat (188, 189).

Linkozamidi predstavljaju grupu antibiotika u kojoj su dva najznačajnija člana, linkomicin i njegov derivat, klindamicin. Linkomicin je izolovan iz fermentacionog filtra bakterije *Streptomyces lincolnensis*. Molekul linkomicina je izgrađen od jednog aminokiselinskog ostatka (trans-1-metil-4-propil-L-prolin) i derivata monosaharida  $\alpha$ -metil-tioglikozida, koji se naziva linkozamin. Iako su strukturno veoma različiti od makrolida, linkozamidi imaju isto vezno mesto na ribozomu i sličan mehanizam delovanja kao makrolidi i streptogramini (190).

Streptogramini su prirodni ciklični peptidi koje proizvodi *Streptomyces spp* (191). Sačinjeni su od dve komponente, streptogramina A (dalfopristin, pristinamicin II, virginiamicin M) i streptogramina B (kvinopristin, pristinamicin I, virginiamicin S). Pojedinačno ove komponente imaju slabu bakteriostatsku aktivnost, ali zajedno deluju sinergistički i baktericidno. Vezivanje komponente A za bakterijski ribozom dovodi do konformacionih promena unutar peptidiltransferaza centra što povećava afinitet komponente B (192). Streptogramin B interferira sa formacijom rastućeg polipeptidnog lanca na sličan način kao makrolidi (193).

### 1.8.2 Ketolidi

Ketolidi čine novu grupu antibiotika čiji je prvi i najznačajniji predstavnik telitromicin (194, 195). Njegov antimikrobni spektar je sličan novijim makrolidima i značajno je aktivniji protiv mnogih bakterijskih vrsta. Telitromicin je polusintetski derivat eritromicina A. Građen je od 14-članog laktonskog prstena kod koga je neutralni šećer L-kladinoza zamenjen keto grupom na poziciji C3 (196). Poput makrolida, i telitromicin se vezuje za domene II i V 23S rRNK ribozoma, ali za razliku od njih, telitromicin ima i dodatno mesto vezivanja na poziciji A752 domena II (186, 194, 197, 198). Zahvaljujući vezivanju za više veznih mesta, veza telitromicina sa ribozomom bakterija je i do 10 puta jača nego veza makrolida. Ketolidi se odlikuju i niskim afinitetom za proteine efluks pumpe, tako da su delotvorni i kod sojeva kod kojih rezistencija na makrolide nastaje na ovaj način. Telitromicin se koncentriše unutar neutrofila i makrofaga, te je koncentracija leka nekoliko puta viša intracelularno u odnosu na ekstracelularne tečnosti (199). Glavna indikacija za korišćenje telitromicina je tretman vanbolničke pneumonije (CAP) (200).

### 1.8.3 Beta laktamski antibiotici (BLA)

U klasi beta laktamskih antibiotika su četiri grupe antibiotika: penicilini, cefalosporini, karbapenemi i monobaktami. Penicilin je prvi predstavnik ove klase i otkriven je 1929. godine, kao produkt gljivice *Penicillium notatum*, dok su cefalosporini pronađeni 1948. godine, a poreklom su od gljivice *Cephalosporium acremonium*.

Strukturnu osnovu penicilina i drugih beta-laktamskih antibiotika (BLA) čini beta-laktamski prsten. Penicilini poseduju biciklično jezgro – penam, koje predstavlja fuzionisani  $\beta$ -laktamski i

tiazolidinski prsten. Supstitucijama na C<sub>6</sub>-atomu β-laktamskog prstena dobijaju se derivati penicilina (191). I cefalosporini imaju biciklično jezgro-cefem, koje se sastoji od fuzionisanog β-laktamskog prstena i dihidrotiazidnog prstena. Karbapenemi su strukturno vrlo slični penicilinima, ali je kod njih atom sumpora na poziciji 1 zamenjen ugljenikom, te otud i ime – karba-penemi.

Ovi antibiotici se ireverzibilno vezuju za penicilin-vezujuće proteine (PVP), enzime bakterijske ćelije, koji imaju važnu ulogu u završnim fazama sinteze peptidoglikana. Veza je kovalentna, a ostvaruje se procesom acilacije aktivnog mesta PVP od strane BLA. Kao posledica ovih izmena, PVP postaju neaktivni i dolazi do prestanka sinteze peptidoglikana ćelijskog zida, a potom i osmotske hidrolize bakterijske ćelije (201). Pneumokok poseduje šest PVP: tri PVP velike molekularne težine, klase A: PVP1A, PVP1B i PVP2A; dva PVP velike molekulske težine klase B: PVP2X i PVP2B i jedan PVP niske molekularne težine, PVP3 (202). Smatra se da PVP2X i PVP2B imaju esencijalnu ulogu u procesu rasta ćelije (203, 204). Svaki PVP ima različit afinitet za različite beta laktame.

Beta-laktamski antibiotici su u širokoj upotrebi u lečenju infekcija uzrokovanih pneumokokom. Penicilini i aminopenicilini su lekovi prvog izbora u lečenju akutnog zapaljenja srednjeg uha i vanbolnički stečene pneumonije (27, 205-212). Cefahlor i cefuroksim su predstavnici druge generacije cefalosporina i lekovi su drugog i trećeg izbora u lečenju pomenutih infekcija. Predstavnici treće generacije cefalosporina, ceftriakson i cefotaksim, kao i karbapenemi (meropenem) se koriste u lečenju ozbiljnijih, životno-ugrožavajućih pneumokoknih infekcija, poput meningitisa i sepse (213).

#### 1.8.4 Ostali antibiotici koji se koriste u lečenju pneumokoknih infekcija

**Fluorohinoloni** su sintetski antibiotici, odnosno hemioterapeutici. Derivati su 1,4-dihidro-4-okso-3-hinolinkarboksilne kiseline (191). Ciljno mesto delovanja fluorohinolona je topoizomeraza II (DNK giraza) i/ ili topoizomeraza IV. Navedeni enzimi su neophodni za replikaciju i transkripciju, odnosno spiralizaciju i despiralizaciju dvostrukog lanca DNK (176). Fluorohinoloni stupaju u interakciju sa kompleksom enzim-DNK i inhibiraju delovanje enzima, te nema superuvrtanja bakterijske DNK, a samim tim ni replikacije hromozoma. Kao posledica ovih događaja dolazi do smrti bakterijske ćelije (baktericidni efekat) (214, 215). Ovi lekovi

imaju širok spektar delovanja. Danas postoje četiri generacije fluorohinolona, a noviji preparati, predstavnici treće i četvrte generacije, moksifloksacin, levofloksacin i gatifloksacin se koriste u lečenju pneumokoknih pneumonija kod odraslih osoba.

**Tetraciklini** vrše inhibiciju sinteze proteina bakterijske ćelije tako što se vezuju za 16S rRNK, deo 30S subjedinice bakterijskog ribozoma (216). To dovodi do blokade pristupa aminoacil-tRNK na kompleks RNK-ribozom, čime se sprečava sinteza polipeptida (176). Danas se više ne koriste u lečenju pneumokoknih infekcija, zbog vrlo visokog nivoa rezistencije. Međutim, s obzirom da se geni rezistencije na tetracikline kod streptokoka često nalaze na istim genskim elementima kao i geni rezistencije na makrolide, iz epidemioloških razloga se i dalje prati osetljivost pneumokoka na ove antibiotike.

Predstavnici **glikopeptida** su vankomicin i teikoplanin, koji vrše inhibiciju sinteze ćelijskog zida Gram pozitivnih bakterija. Molekuli glikopeptida se vezuju za D-alanil-D-alanin na krajevima prekursora peptidoglikana, što dovodi do inhibicije transglikozidacije (176). Vankomicin se koristi za lečenje teških infekcija izazvanih rezistentnim sojevima pneumokoka.

**Oksazolidini** su sintetisani 70-ih godina. Ometaju formiranje inicijalnog kompleksa u sintezi proteina, tako što se vezuju za 30S subjedinicu ribozoma (191). U tom pogledu su jedinstveni tako da ne postoji ukrštena rezistencija sa drugim antibioticima. Linezolid je prvi antibiotik iz klase oksazolidina koji je odobren za kliničku upotrebu 2000.godine za lečenje intrahospitalnih i vanbolnički stečenih pneumonija. Koriste se, poput vankomicina, za lečenje teških infekcija izazvanih rezistentnim Gram pozitivnim bakterijama, uključujući pneumokok.

**Hloramfenikol** inhibira sintezu proteina vezujući se reverzibilno za peptidiltransferazu na 50S ribozomalnoj subjedinici. Na taj način sprečava proces transpeptidacije prilikom elongacije peptidnog lanca (176, 217). Hloramfenikol ima sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru i ranije se dosta koristio u terapiji infekcija centralnog nervnog sistema kod pacijenata alergičnih na penicilin.

## 1.9 Mehanizmi rezistencije *Streptococcus pneumoniae* na antibiotike

Dok je većina beta hemolitičkih streptokoka idalje osetljiva na penicilin i druge beta laktame, *S.pneumoniae* je uspešno razvio rezistenciju na ovu klasu antibiotika. Prvi rezistentni sojevi pneumokoka na BLA su se pojavili još krajem 60-tih godina u Australiji, a potom i u Južnoj Africi (218-220), da bi tokom devedesetih i dvehiljaditih godina incidencija rezistencije pneumokoka na ove antibiotike u velikom broju zemalja sveta dostigla alarmantne razmere. Takođe je vremenom došlo i do razvoja rezistencije pneumokoka na makrolide, što je dovelo do pojave sojeva koji pokazuju udruženu rezistenciju na obe klase antibiotika, koji predstavljaju lekove izbora za terapiju pneumokoknih bolesti.

### 1.9.1 Rezistencija na MLS<sub>B</sub> antibiotike

Rezistencija pneumokoka na makrolide je posredovana putem dva glavna mehanizma: modifikacijom ciljnog mesta delovanja leka i aktivnim efluksom (221). Mehanizam enzimske inaktivacije antibiotika iz grupe makrolida nije opisan kod pneumokoka.

#### 1.9.1.1 Modifikacija ciljnog mesta delovanja leka

Izmena ciljnog mesta delovanja leka obično nastaje zbog metilacije adenina u ribozomu, a znatno ređe kao posledica ribozomalnih mutacija (222).

##### 1.9.1.1.1 Metilacija adenina u 50S podjedinici ribozoma

Ovaj mehanizam rezistencije na makrolide je prvi put opisan 70-ih godina (223). Uočeno je da Gram pozitivne bakterije mogu da sintetišu enzim metilazu (adenin N<sup>6</sup> metiltransferaza), koja katališe mono ili dimetilaciju specifične rezidue adenina A2058 domena V peptidiltransferaznog centra 23S rRNK, veznog mesta MLS antibiotika, te lekovi ne prepoznaju svoje ciljno mesto vezivanja. Navedeni tip rezistencije se ispoljava kao MLS<sub>B</sub> fenotip (224) i karakteriše ga visok nivo rezistencije na makrolide, sa vrednošću MIK eritromicina  $\geq 64$  mg/L (222). Povećanje doze leka ima mali efekat. Geni koji kodiraju enzime metilaze su nazvani *erm* (erythromycin ribosome methylase) geni i otkriveni su kod brojnih Gram pozitivnih bakterija (225).

Kod pneumokoka postoje dva gena koji kodiraju metilazu, znatno češći - *ermB* gen (226) i vrlo redak - *ermA* gen. *ErmB* gen je prvobitno označen kao *ermAM*. Otkriven je na plazmidu pAM77 *Streptococcus sanguis* (181, 223). Drugi gen koji kodira metilazu, kod pneumokoka je *ermA*. On je prvo otkriven kod sojeva *Streptococcus pyogenes* i tada je bio označen kao *ermTR* (227). Budući da je *ermTR* veoma srodan sa *ermA* genima opisanim kod sojeva *Staphylococcus aureus*, kao i da bi se prevazišla složenost nomenklature, predloženo je da se za pomenute gene koristi jedinstveno ime *ermA* (226). Između *ermA* i *ermB* postoji 58% sličnosti na nivou nukleotida (227).

*ErmB* gen pneumokoka može biti lociran na brojnim transpozonomima koji se šire procesima konjugacije. Konjugativni transpozoni pneumokoka većinom pripadaju dvema klasama: Tn916-Tn1545 tip elemenata i Tn5252 kompozitni element koji uključuje Tn3701 i Tn3951 (228-233). Tn916-Tn1545 familija konjugativnih transpozona je ubikvitarna i ima više od 10 članova. Ovi transpozoni se takođe mogu naći kao delovi većih genskih elemenata. Pored delova genoma transpozona koji su uključeni u njegovu konjugaciju, isecanje, integraciju, regulaciju i sl., u sastavu transpozona mogu biti i manji mobilni elementi koji nose gene rezistencije na antibiotike, živu itd. Tako, se npr. na transpozonomima iz familije Tn916/Tn1545 nalaze geni rezistencije na eritromicin – *ermB* (Tn917) i *mefA*, tetracikline – *tetM*, kanamicin- *aphA-3* (234, 235).

Osim na Tn917/Tn1545 familiji transpozona, *ermB* i *tetM* geni se kod pneumokoka mogu naći i na: Tn3872, Tn6002, Tn6003, Tn2010 (236). Znatno ređi *ermA* gen kod pneumokoka je nađen na nekonjugativnom transpozonu Tn1806 koji se ne prenosi transformacijom.

Kod izolata koji nose *erm* gene, rezistencija na MLS<sub>b</sub> antibiotike se može ispoljavati kao konstitutivna ili inducibilna (224). Fenotip sa konstitutivnom MLS<sub>b</sub> rezistencijom je visoko rezistentan na sve tri klase antibiotika (181), što se lako uočava u disk difuzionom testu. Kod inducibilne ekspresije, međutim, bakterija produkuje neaktivnu mRNK za enzim metilazu. Tek u prisustvu antibiotika induktora, ova mRNK biva rearanžirana i aktivna, te dolazi do njenog prepisivanja na ribozomu, odnosno do sinteze metilaze. Sojevi sa ovim tipom rezistencije su rezistentni na makrolidni antibiotik koji je induktor, ali su osetljivi na druge lekove MLS klase. S obzirom da način ispoljavanja ovog tipa rezistencije zavisi od više faktora (gena koji regulišu ekspresiju *erm* gena tzv. atenuatora, građe ribozoma i sl.), moguće je da se inducibilna rezistencija



ekprimira na više načina. Većina antibiotika iz MLS grupe mogu da budu induktori u različitom stepenu. To objašnjava kod streptokoka, posebno kod pneumokoka, veliku raznolikost fenotipova, te se mogu naći inducibilni MLS fenotipovi sa niskim ili visokim nivoom rezistencije na 14, 15 i 16-člane makrolide i osetljivošću ili rezistencijom na klinadimicin i streptogramine (221).

Kada se takvi izolati inkubiraju u prisustvu niskih koncentracija 14 i 15-članih makrolida, koji deluju kao induktori, može se uočiti porast vrednosti MIK klindamicina i streptogramina B (224). U dvostrukom ili trostrukom disk difuzionom testu se inducibilni fenotip prepoznaje po zaravnjenju zone inhibicije rasta oko diska linkozamida i/ili streptogramina na strani okrenutoj eritromicinu, koji je induktor (tzv. zona D) (224). Ipak, mora se naglasiti da se, za razliku od *S.pyogenes*, kod pneumokoka, zbog velike raznolikosti MLS fenotipova, dvostruki disk test sa eritromicinom i klindamicinom, uglavnom koristi samo za diferenciranje M od MLS fenotipa.

#### 1.9.1.2 Aktivni efluks leka

Pre nego što je Helena Seppala 1993.godine opisala novi M-fenotip rezistencije na makrolide kod *Streptococcus pyogenes*, (237), smatralo se da je rezistencija streptokoka na makrolide isključivo posredovana *ermB* genom (238). Međutim, M fenotip kod piogenog streptokoka je ispoljavao rezistenciju na 14 i 15-člane makrolide ali ne i na 16-člane makrolide, linkozamide i streptogramin B (237). Nešto kasnije ovaj fenotip je takođe opisan kod pneumokoka. Tri godine posle otkrića M fenotipa je uočeno da je ovaj tip rezistencije povezan sa aktivnim efluksom leka. Konačno je molekularnim kloniranjem dokazano da je za mehanizam eflukasa kod *Streptococcus pyogenes* odgovoran *mef(A)* gen (GenBank accession number U70055) (239). Ubrzo nakon toga, 1997.godine, Tait-Kamradt je opisao prisustvo sličnog *mef(E)* gena kod *Streptococcus pneumoniae* (GenBank accession number U83667) (240).

Kod pneumokoka su pronađena oba podtipa *mef* gena, *mef(A)* i *mef(E)* (241-243). Sekvenciranjem je utvrđeno da su ova dva gena veoma srodna, i da postoji 90% srodnosti na nivou DNK i 88% sličnosti na proteinskom nivou (240, 244). Sugerisano je da se oba gena izveštavaju kao *mefA* gen, da bi se izbegla kompleksnost nomenklature (226).

Produkt *mef* gena je protein čija je uloga da olakšava izbacivanje antibiotika iz bakterijske ćelije i pripada glavnoj superfamiliji efluks pumpi (*engl.* Major facilitator superfamily of efflux pumps), a specifičan je za 14- i 15-člane makrolide.

Rezistencija posredovana aktivnim efluksom leka se ispoljava kao M fenotip, koji se karakteriše niskim nivoom rezistencije na 14 i 15-člane makrolide (vrednost MIK za eritromicina <16 mg/L), dok postoji osetljivost na 16-člane makrolide, linkozamide i streptogramin B (240, 245, 239). Povećanjem doze leka se može nadmašiti efekat efluks pumpe.

*MefA* i *mefE* geni su lokalizovani na elementima sličnim konjugativnim transpozonomima. *MefE* gen je smešten na 5,4 ili 5,5 –kb mega (*engl.* Macrolide efflux genetic assembly) elementu, a *mefA* na srodnim transpozonomima, Tn1207.1 i Tn 1207.3. Kasnije su identifikovani sojevi pneumokoka koji nose oba gena, *ermB* i *mefA*, i ispoljavaju se kao MLS<sub>B</sub> fenotip (246).

### 1.9.1.3 Ribozomalne mutacije

Rezistencija pneumokoka na makrolide može biti posredovana i ribozomalnim mutacijama. Mutacije se javljaju u regionu peptidiltransferaza u domenima V i II 23S rRNK kao i u genima koji kodiraju sintezu ribozomalnih proteina 50S subjedinice, L4 i L22 (247, 248). Mutacije u ovom području sprečavaju vezivanje antibiotika za ciljno mesto (181, 223, 249-251). Fenotipovi mutiranih sojeva su varijabilni, u zavisnosti od mesta mutacije, broja mutiranih alela i verovatno nivoa ekspresije gena (247, 249, 252-255.). Azitromicin se smatra jednim od najpotentnijih makrolida za selekciju mutanata (253). Najčešća ribozomalna mutacija među kliničkim izolatima pneumokoka je A2059G (28, 249, 250). Ispoljava se kao makrolid-linkozamid rezistentni fenotip (ML fenotip). Mutacija na A2058G se ređe javlja kod pneumokoka ali je zato uobičajena među sojevima *Streptococcus pyogenes*. Kod ovog fenotipa, označenog kao M<sub>16</sub>S fenotip, postoji rezistencija na 16-člane makrolide i streptogramin (256-259, 247).

## 1.9.2 Mehanizmi rezistencije na telitromicin

Telitromicin se pokazao veoma efikasnim protiv sojeva pneumokoka rezistentnih na makrolide, budući da ima dodatno mesto vezivanja na domenu II 23S rRNK, za koje se

makrolidi ne vezuju (198, 260-264). Takođe, ketolidi imaju nizak afinitet prema proteinima efluks pumpe, tako da *mefA* pozitivni sojevi pneumokoka nisu rezistentni na telitromicin.

Za sada je oseljivost pneumokoka, uključujući *erm* pozitivne i *mef* pozitivne izolate, na telitromicin vrlo visoka (254, 260, 262-267). Ipak, izolati pneumokoka koji su rezistentni na makrolide (nose *erm* ili *mef* gene) pokazuju više vrednosti MIK telitromicina u odnosu na sojeve osetljive na makrolide. Mutacije u mestu vezivanja telitromicina, domenu II i V 23S rRNK i u ribozomalnim proteinima L4 i L22, kao i mutacije u *ermB* genu dovode do povećanja vrednosti MIK telitromicina (268, 269). Iako je rezistencija pneumokoka na ketolide izuzetno retka, ipak su opisani rezistentni izolati. Rezistencija na telitromicin je opisana kod izolata kod kojih je došlo do sticanja *erm* gena rezistencije i do istovremenih mutacija u domenu II 23S rRNK (197, 269). Nažalost, može se očekivati da će povećana upotreba ketolida u budućnosti dovesti do porasta nivoa rezistencije pneumokoka na ovaj lek.

### 1.9.3 Mehanizmi rezistencije na beta laktamske antibiotike

Rezistencija pneumokoka na beta-laktamske antibiotike nastaje usled akumulacija mutacija u genima koji kodiraju penicilin-vezujuće proteine. Kao posledica promena PVP dolazi do smanjenja njihovog afiniteta za BLA, te se antibiotik ne vezuje, a bakterija nastavlja normalno da sintetiše peptidoglikan (270). Generalno govoreći, rezistencija na penicilin nastaje usled promena u genima za PVP1A, PVP2X i PV2B dok je smanjena osetljivost na cefotaksim i ceftriakson posledica izmene PVP1A i PVP2X. Multiple izmene u genima za PVP često dovode do visokog nivoa rezistencije. Geni za PVP kod rezistentnih sojeva pneumokoka imaju mozaičku građu, gde su delovi gena zamenjeni njihovim alelskim varijantama, koje kod kliničkih izolata potiču iz penicillin rezistentnih sojeva srodnih vrsta, uglavnom viridans streptokoka (*Streptococcus mitis*). Prenos gena nastaje procesom transformacije između osetljivih sojeva pneumokoka i rezistentnih sojeva viridans streptokoka, a potom se mehanizmom homologe rekombinacije ubacuje gen koji nosi rezistenciju u hromozom pneumokoka. Nukleotidi *pbp* gena rezistentnih sojeva pneumokoka se razlikuju i do 25% u odnosu na osetljive. Ove genetičke izmene favorizuje selektivni pritisak spoljne sredine, odnosno prisustvo antibiotika. Kojim će se redom menjati geni za PVP zavisi od vrste BLA koja vrši selektivni pritisak. U laboratoriji je, kontinuiranim izlaganjem pneumokoka subinhibitornim dozama penicilina, moguće indukovati mutacije u

genima za PVP. Time su kod mutanata pneumokoka dobijene slične izmene gena za PVP kao kod kliničkih izolata, koje su, međutim, bile posledica akumulacije mutacija, a ne dobijanja gena iz spoljne sredine (176, 271-275). Dokazano je, takođe, da su za rezistenciju pneumokoka na BLA, pored izmena u *pbp* genima zaslužne i izmene u drugim genima, koji kodiraju druge komponente ćelijskog zida (276).

Izolati pneumokoka sa smanjenom osetljivošću na penicilin često pokazuju smanjenu osetljivost i na druge beta-laktamske antibiotike, uključujući novije cefalosporine (277, 278). Mutacije u genima za PVP2X uzrokuju nizak nivo rezistencije na penicilin koji može biti praćen rezistencijom na oralne cefalosporine. Alteracije u *pbp2b* dovode do umerenog porasta vrednosti MIK penicilina (270) dok izmene u *pbp1a* dovode do visokog nivoa rezistencije na penicilin (279, 280) kao i do rezistencije na cefalosporine proširenog spektra (281, 282).

Većina sojeva koji su rezistentni na cefalosporine proširenog spektra su takođe rezistentni na penicilin i ampicilin, ali su vrednosti MIK za ceftriakson i cefotaksim uglavnom niže od vrednosti MIK penicilina.

Za razliku od stafilokoka i enterokoka, kod pneumokoka nije dokazana produkcija beta laktamaza.

#### 1.9.4 Mehanizmi rezistencije na fluorohinolone

Rezistencija *S.pneumoniae* na fluorohinolone se javlja kao posledica mutacija u hromozomskim genima koji kodiraju sintezu topoizomeraze IV (*parC* ili *parE*) i/ili giraze (*gyrA* ili *gyrB*). Na ovaj način može nastati visok nivo rezistencije na fluorohinolone. Drugi opisani mehanizam rezistencije je aktivni efluks antibiotika iz ćelije, koji dovodi do niskog nivoa rezistencije.

Mutacije gena se mogu javiti pojedinačno ili kombinovano. Mutacije se javljaju postepeno, pri čemu primena antibiotika dovodi do selekcije rezistencije. Kod pneumokoka prvo dolazi do mutacija u genima za *parC*, što dovodi do niskog nivoa rezistencije, da bi sekundarne mutacije u *gyrA* dovele do potpune rezistencije na fluorohinolone. Postepene promene u genima se ogledaju u postepenom porastu vrednosti MIK fluorohinolona (283-290).

## 1.9.5 Mehanizmi rezistencije na ostale antibiotike

Rezistencija pneumokoka na tetracikline je najčešće posredovana sticanjem *tetM* ili ređe *tetO* gena, koji kodiraju ribozomalne zaštitne proteine (291-294). TetM i TetO zaštitni proteini sprečavaju vezivanje tetraciklina za 30S subjedinicu ribozoma (294-296). *TetM* i *tetO* geni dele približno 77% sličnosti u sastavu aminokiselina (295). Kod streptokoka se determinante rezistencije na tetracikline često nalaze na mobilnim konjugativnim transpozonom *Tn916-Tn1545* kao i velikim kompozitnim strukturama kao što su *Tn5253* i *Tn3872*. Navedeni transpozoni često nose i gene rezistencije na druge antibiotike, kao što je *erm(B)* gen ili gene rezistencije na hloramfenikol (*cat*). Zbog toga je rezistencija na tetracikline često povezana sa rezistencijom na makrolide, linkozamide i streptogramin B (297).

*S.pneumoniae* je uspešno razvio rezistenciju i na druge antibiotike ranijih generacija, poput hloramfenikola, rifampicina, trimetoprim-sulfametoksazola, ali i na novije – linezolid, kvinopristin – dalfopristin (298-305). Nije zabeležena rezistencija na vankomicin, ali je zapaženo da neki sojevi mogu da preživljavaju, ali ne i da rastu u prisustvu ovog antibiotika, što je označeno kao tolerancija.

## 1.10 Razvoj rezistencije pneumokoka na antibiotike

### 1.10.1 Rezistencija na antibiotike iz grupe makrolida

Antibiotici iz grupe makrolida se decenijama koriste širom sveta, posebno u lečenju vanbolnički stečenih infekcija respiratornog trakta. U poslednje vreme je, usled nekritične upotrebe, došlo do zabrinjavajućeg porasta rezistencije pneumokoka na makrolide, koja danas predstavlja veći problem nego rezistencija na penicilin (306).

Rezistencija pneumokoka na eritromicin je prvi put zabeležena 1967. godine u Kanadi a potom u Francuskoj 1976.godine (307-309). Ipak, nivo rezistencije tokom sedamdesetih godina nije prelazio 5%. U sledećoj deceniji je došlo do značajnog porasta rezistencije pneumokoka na eritromicin. Tako je u SAD rezistencija tokom osamdesetih sa 0,3% porasla na 6,3%. U Španiji je do 1990. godine dostigla 9,4% (308), dok je u Francuskoj 1985. godine nađeno 26% sojeva rezistentnih, a već 1994. godine čak 40,9% (310). Ovako brz porast prevalencije makrolidne

rezistencije je povezan sa povećanom upotrebom makrolida, posebno dugodelujućih, kao što su klaritromicin i azitromicin.

### 1.10.2 Rezistencija na penicilin

Od samog uvođenja u terapiju 1940. godine, penicilin G je bio lek izbora u terapiji pneumokoknih infekcija i mortalitet od pneumonija je značajno opao (311). Do 1967. godine pneumokok je bio osetljiv na penicilin i druge antibiotike. Prvi soj pneumokoka neosetljiv na penicillin (MIK 0,6 mg/L) je izolovan 1967. godine u Australiji iz sputuma pacijenta sa hipogamaglobulinemijom, koji je bio na dugotrajnoj antibiotskoj terapiji (218, 312). Poznata je epidemija izazvana penicilin-rezistentnim pneumokokom u Južnoj Africi 1977.godine, a godinu dana kasnije su u toj zemlji od pedijatrijskih pacijenata izolovani i prvi multirezistentni sojevi (219-221), koji su pripadali serotipovima 6A i 19A. Sedamdesetih i osamdesetih godina prevalencija rezistencije pneumokoka na penicillin prelazi 10% u mnogim delovima sveta, uključujući Španiju, SAD, Novu Gvineju, Južnu Afriku, Izrael i Poljsku (313). Ovaj porast rezistencije je doveo do ozbiljnih problema u lečenju pneumokoknih infekcija, posebno meningitisa. Devedesetih godina je procenjeno da je neosetljivost pneumokoka na penicillin na globalnom nivou iznosila 37%, od čega je 23% sojeva bilo potpuno rezistentno (314).

Istovremeno je je zapažen porast učestalosti sojeva sa udruženom neosetljivošću na penicilin i eritromicin. Ovaj porast je bio povezan sa širenjem penicilin-rezistentnih klonova koji su stekli determinante rezistencije na makrolide, uglavnom posredstvom transpozona *Tn916* familije.

S obzirom da su najzastupljeniji serotipovi pneumokoka koji dovode do neinvazivnih i invazivnih bolesti kod dece u eri pre uvođenja vakcine bili 6B, 9V, 14, 19F i 23F, kao i da je pedijatrijska populacija, zbog čestih respiratornih infekcija, najviše izložena antibioticima, među ovim serotipovima su se selekcionisali rezistentni klonovi.

Uvođenje pneumokokne konjugovane vakcine u obavezni kalendar vakcinacije u razvijenim zemljama sveta je, pored pada incidencije IPB, dovelo i do smanjenja rezistencije pneumokoka na antibiotike, jer je dovelo do “uklanjanja” rezistentnih serotipova. Kao posledica ove mere, kao i izmena koje je 2008. godine napravio CLSI u graničnim vrednostima kategorija osetljivosti *S.pneumoniae* na penicilin, u današnjim studijama nadzora nad rezistencijom pneumokoka na antibiotike se uočava trend smanjenja procenta rezistentnih sojeva na beta laktamske antibiotike. Na osnovu podataka EARS-Net (*engl.* European Antimicrobial Resistance Surveillance System) iz 2012. godine, većina evropskih zemalja ima procenat PNSP (penicilin neosetljivi pneumokok) ispod 10%, dok 4 zemlje južne i istočne Evrope imaju PNSP iznad 25% (Bugarska, Malta, Rumunija, Španija). Svega 8,7% izolata pokazuje kombinovanu neosetljivost na penicilin i makrolide (315).

Rezistencija pneumokoka na novije fluorohinolone, linezolid, telitromicin, kvinopristin-dalfopristin je još retka, i ne dostiže alarmantne nivoe, dok je na vankomicin zabeležena samo pojava tolerancije.

## 2 CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su sledeći:

1. Odrediti učestalost rezistencije na makrolide među invazivnim i neinvazivnim sojevima *Streptococcus pneumoniae* koji su izolovani od odraslih osoba, kao i od dece mlađe od 18 godina u periodu 2010. do 2012. godine u Srbiji
2. Odrediti učestalost istovremene rezistencije na penicilin, kao i multirezistencije kod sojeva *Streptococcus pneumoniae*, rezistentnih na makrolide
3. Odrediti fenotip rezistencije na makrolide kod izolata *Streptococcus pneumoniae*
4. Ispitati gensku osnovu rezistencije na makrolide kod sojeva *Streptococcus pneumoniae*, detektovanjem prisustva *ermB* i *mefA* gena metodom PCR
5. Odrediti serotip invazivnih izolata *Streptococcus pneumoniae* koji su rezistentni na makrolide

Hipoteze koje ova doktorska disertacija ima za cilj da evaluira su:

1. Rezistencija na makrolide je više zastupljena kod neinvazivnih izolata *Streptococcus pneumoniae* u odnosu na invazivne, a rezistentni sojevi se češće izoluju od dece mlađe od 18 godina nego od odraslih osoba
2. Približno jedna trećina sojeva *Streptococcus pneumoniae* koji su rezistentni na makrolide su istovremeno multirezistentni
3. Među sojevima *Streptococcus pneumoniae* rezistentnim na makrolide MLSb fenotip rezistencije je zastupljeniji u odnosu na M fenotip
4. Kod sojeva *Streptococcus pneumoniae* koji su rezistentni na makrolide je češće prisustvo *ermB* gena u odnosu na *mefA* gene rezistencije, iz čega se zaključuje da je kod ovih izolata metilacija ribozoma češći mehanizam rezistencije u odnosu na efluks leka
5. Serotipovi invazivnih izolata su 19F i 14



### 3 MATERIJAL I METODE

Istraživanje je izvedeno kao prospektivna studija u koju je uključeno 326 sojeva *Streptococcus pneumoniae*, rezistentnih na makrolide (MRSP), koji su izolovani od hospitalizovanih i ambulantno lečenih pacijenata u periodu od januara 2010. godine do decembra 2012. godine. Ispitivanje je obuhvatilo izolate iz briseva nosa i nazofaringealnih eksudata (sekret sinusa) (n=212), sputuma (n=41), briseva spoljašnjeg ušnog kanala (n=14), bronhoaspirata i bronholavata (n=3), briseva konjunktive (n=7) i vulve (n=1) i kao i invazivne sojeve poreklom iz krvi (n=26), likvora (n=19) i pleuralnih punktata (n=3). Ukoliko su od istog pacijenta izolovana dva ista soja pneumokoka, a iz različitih materijala, u istraživanje je uključen samo jedan. Od ukupno 326 obrađenih izolata, neinvazivnih sojeva je izolovano 278 (85,3%), a invazivnih 48 (14,7). Od toga je 247 (75,8%) sojeva izolovano od dece mlađe od 18 godina a 79 (24,2%) od odraslih pacijenata.

**Tabela 1: Učestalost vrste materijala u odnosu na uzrast**

Vrsta materijala	deca	odrasli	ukupno
nos/nazofaringelalni eksudat/sekret sinusa	206	6	212
sputum	0	41	41
bris spoljašnjeg ušnog kanala/sadržaj srednjeg uha	12	2	14
bronholavat, bronhoaspirat	1	2	3
bris vulve	0	1	1
bris konjunktive	5	2	7
krv	13	13	26
likvor	10	9	19
pleuralni punktata	0	3	3
ukupno	247	79	326

Izolati su sakupljeni sa cele teritorije Republike Srbije. Nakon izolacije i identifikacije u matičnim mikrobiološkim laboratorijama, sojevi su transportovani u Amies transportnom medijumu (Copan, Italija) do Nacionalne referentne laboratorije (NRL) za streptokok na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Uz svaki uzorak je poslata i propratna dokumentacija koja je obuhvatala sledeće podatke: laboratorijski identifikacioni broj, vrstu uzorka, datum uzorkovanja, uzrast i pol pacijenta, dijagnozu kao i rezultate testa osetljivosti.

U ispitivanje su uključeni sojevi pneumokoka izolovani u mikrobiološkim laboratorijama: Instituta za plućne bolesti Vojvodine, Instituta za kardiovaskularne bolesti Vojvodine, Instituta za onkologiju Vojvodine (Sremska Kamenica), Instituta za javno zdravlje Vojvodine (Novi Sad), Zavoda za laboratorijsku dijagnostiku „Paster“, Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Beograd, Laboratorije Marković, Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta „dr Vukan Čupić“, Opšte bolnice Šabac, Opšte bolnice „Sveti Luka“ Smederevo, Opšte bolnice Valjevo, kao i u mikrobiološkim laboratorijama Zavoda za javno zdravlje Sombor, Kikinda, Zrenjanin, Subotica, Valjevo, Užice, Niš i Čačak.

### 3.1.1 Identifikacija

U NRL je urađena ponovna identifikacija poslatih izolata, na osnovu morfoloških karakteristika bakterija (Gram pozitivne koke, raspoređene u lancima), kulturelnih osobina (prisustva alfa hemolize) kao i biohemijsko-fizioloških osobina: negativan katalaza test, pozitivan test osetljivost na optohin (BioRad, SAD), pozitivan test lize u prisustvu natrijum-dezoksiholata i reakcije aglutinacije sa polivalentnim antiserumom (Slidex PneumoKit, bioMerieux, Francuska). Sojevi su inkubirani na krvnom kolumbija (Columbia) (Oxoid, Velika Britanija) agaru uz dodatak 5% ovčje krvi, 18- 24h, na temperaturi od 37°C, u prisustvu 5% CO<sub>2</sub>.

Nakon izolacije, prekonoćna kultura pneumokoka je suspendovana u moždano-srčanom bujonu (Biolife, Italy) i inkubirana 18-24h u prethodno opisanim temperaturnim i atmosferskim uslovima. Sojevi su konzervirani sa 10% sadržajem glicerola u plastičnim mikro-epruvetama zapremine 1,5 ml, na temperaturi od -80°C.

Za invazivne sojeve pneumokoka je urađena potvrda identifikacije i detekcijom gena za autolizin (*lytA*), u reakciji lančanog umnožavanja nukleinskih kiselina (*engl.* Polymerase Chain Reaction, PCR), prema protokolu Nagai i saradnika (316).

### 3.1.2 Ekstrakcija DNK pneumokoka

Izolacija DNK pneumokoka je izvedena metodom termičke ekstrakcije. U sterilnim plastičnim epruvetama, zapremine 1,5 ml (Eppendorf, Nemačka) je napravljena suspenzija sveže prekonoćne kulture pneumokoka u 200 µl puferisanog fiziološkog rastvora (*engl.* phosphate-

buffered saline, PBS), koja je potom vorteksirana i u nju je dodato 800 µl PBS. Posle centrifugiranja na 20 000xg (Eppendorf, Nemačka) u trajanju od 2 min je odbačen supernatant, a u vorteksirani pelet je dodato 200 µl sterilne destilovane vode. Ovaj sadržaj je stavljan u pećnicu na 95-100°C u trajanju od 10 min. Zatim su mikroeprove stavljan na led (4°C) i centrifugirane na 16 000xg u trajanju od 15 min. Dobijeni supernatant, koji sadrži izolovanu DNK pneumokoka, je prebacivan u novu sterilnu plastičnu mikroeprovu, zapremine 1,5 ml. Izolovana DNK je odmah bila korišćena za izvođenje daljeg ispitivanja. Ukoliko se nije odmah koristila, čuvana je u frižideru na temperaturi +4°C u periodu do 7 dana ili u zamrzivaču na -20°C u periodu od mesec dana.

Merenje prinosa DNK, odnosno DNK kvantitacija je obavljena pomoću spektrofotometra (Biophotometer 8,5 Light Center Height, Eppendorf, Nemačka). Koncentracija izolovane DNK je izračunavana prema Lambert Beer zakonu, na osnovu absorpcije svetlosti određene talasne dužine (260 nm).

Za reakciju dokazivanja *lytA* gena su korišćeni prajmeri, čije su sekvence prethodno publikovane (316), a prikazane su u tabeli br 2.

**Tabela 2: Prajmeri koji su korišćeni za amplifikaciju *lytA* gena MRSP sojeva**

Prajmer	Sekvenca 5'→3'	Produkt (bp)	Referenca
<i>lytA</i> -sense	5'-CAA CCG TAC AGA ATG AAG CGG-3'	308 (319)bp	<a href="#">Nagai et al. (2001)</a>
<i>lytA</i> -antisense	5'-TTA TTC GTG CAA TAC TCG TGC G-3'		

Za izvođenje reakcije lančanog umnožavanja, korišćene su sterilne plastične mikroeprovete, zapremine 0,2 ml (Eppendorf, Nemačka). Reakcionu smešu su sačinjavali Taq PCR MasterMix zapremine 12  $\mu$ l (Qiagen, Nemačka), po 2  $\mu$ l 20  $\mu$ M rastvora odgovarajućih prajmera (Invitrogen, SAD), 5  $\mu$ l bakterijske DNK i 4  $\mu$ l dejonizovane vode (Qiagen, Nemačka). Zapremina reakcione smeše je iznosila 25  $\mu$ l. U reakcionu smešu negativne kontrole dodavana je odgovarajuća zapremina destilovane vode umesto bakterijske DNK. Pozitivnu kontrolu je predstavljao uzorak čiji je odgovarajući ampikon, prethodno već umnožen PCR metodom i naknadno vizualizovan.

Mikroeprovete sa reakcionim smešama su stavljane u termoblok aparata (Mastercycler Gradient, Eppendorf).

Amplifikacija se odvijala pod sledećim uslovima: inicijalna denaturacija je izvedena na temperaturi od 95°C u trajanju od 10 minuta, praćena sa 35 ciklusa, od kojih se svaki sastojao od denaturacije na temperaturi od 95°C u trajanju 60 sekundi, reakcije sparivanja prajmera na 58°C u trajanju od 60 sekundi i ekstenzije na 72°C u trajanju od 60 sekundi. Finalna elongacija je izvedena na temperaturi od 72°C u trajanju od 10 minuta.

Prisustvo amplifikacionih produkata je vizualizovano horizontalnom elektroforezom u agaroznom gelu pri naponu struje od 100V u trajanju od 60min. Vizualizacija je obavljena prosvetljavanjem gelova korišćenjem UV transiluminatora (Kodak Gel Logic 200 Imaging System, SAD).

### 3.1.3 Tipizacija

Tipizacija invazivnih sojeva je izvedena reakcijom bubrenja kapsule (Quellung reakcijom) sa serogrupnim i serotipskim antiserumima na kapsularne polisaharide (Statens Serum Institute, Kopenhagen, Danska) (317).

## 3.2 Detekcija determinanti rezistencije na makrolide

### 3.2.1 Ispitivanje fenotipova rezistencije pneumokoka na makrolide

Fenotipska ekspresija rezistencije na makrolide kod sojeva *S.pneumoniae* je ispitana pomoću eritromicin-klindamicin dvostrukog disk difuzionog testa (ECDD test), prema protokolu Montanari i saradnika (318). Na ploče miler hinton (Mueller Hinton -MH) agara (bioMerieux, Francuska) sa dodatkom 5 % ovčje krvi je naneta bakterijska suspenzija gustine 0,5 McFarland, a potom i diskovi eritromicina (15 µg) i klindamicina (2 µg) (bioRad, SAD) na rastojanju od 15-20 mm. Očitavanje testa je vršeno nakon 18 sati inkubacije na 35-37°C u prisustvu 5% CO<sub>2</sub>. Rezultati su očitavani na osnovu prečnika i izgleda zone inhibicije rasta oko antibiotika. Odsustvo zone inhibicije oko oba diska je ukazivalo na ukrštenu rezistenciju na makrolide, linkozamide i streptogramine, odnosno konstitutivni – cMLS<sub>b</sub> fenotip. Inducibilni MLS fenotip (iMLS<sub>b</sub>) je prepoznat po pojavi zaravnjenjene zone inhibicije rasta oko diska klindamicina na strani okrenutoj eritromicinu (D zona) i odsustvu zone inhibicije rasta oko eritromicina. Osetljivost na klindamicin, uz rezistenciju na eritromicin je ukazivalo na M fenotip (181, 318-321).

### 3.2.2 Određivanje vrednosti MIK eritromicina i klindamicina

Vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) eritromicina i klindamicina su određene kombinovanim difuziono-dilucionim metodom antibiograma, pomoću E test traka (bioMerieux, Francuska). Nakon zasejavanja bakterijske suspenzije turbiditeta 0,5 McFarland na MH agar sa dodatkom 5% ovčje krvi i 18 – 24 časovne inkubacijena 35-37°C u prisustvu 5% CO<sub>2</sub>, očitavana je vrednost MIK antibiotika, koja se nalazi na preseku E test trake i granice zone inhibicije rasta. Rezultati su interpretirani u skladu sa preporukama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (*engl.* Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) iz 2013. godine (322).

### 3.3 Test osetljivosti na ostale antibiotike

#### 3.3.1 Ispitivanje osetljivosti difuzionom metodom

Disk difuzionom metodom antibiograma je ispitivana osetljivost na sledeće antibiotike: oksacilin (1 µg), azitromicin (15 µg), tetraciklin (30 µg), hloramfenikol (30 µg), norfloksacin (10 µg), gentamicin (10 µg) i trimetoprim – sulfametoksazol (23,75/1,25 µg) (bioRad,SAD). Korišćena je bakterijska suspenzija turbiditeta 0,5 McFarlanda (McF) koja je pravljena od sveže prekonocne kulture pneumokoka u sterilnom fiziološkom rastvoru i potom zasejavana na MH agar, sa dodatkom 5% ovčje krvi. Nakon aplikacije diskova impregniranih antibiotikom, zasejane podloge su inkubirane na 35-37°C, u periodu od 18-24 sata u prisustvu 5 % CO<sub>2</sub>.

Prečnik zone inhibicije rasta je meren u milimetrima a kategorije osetljivosti na antibiotike su interpretirane prema preporukama CLSI (322). Za kontrolu kvaliteta je korišćen referentni soj *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

Ukoliko je soj ispoljavao rezistenciju na tri ili više antibiotika različitih klasa, smatralo se da je multirezistentan (323, 324).

#### 3.3.2 Ispitivanje osetljivosti na antibiotike automatizovanim sistemom Vitek 2

Ispitivanje osetljivosti na antibiotike je izvedeno automatizovanim VITEK 2 sistemom za brzu izradu testa osetljivosti (VITEK 2, bioMerieux, Francuska). Ispitana je osetljivost 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 osetljivosti je korišćen *S.pneumoniae* ATCC 49619.

Rezultati osetljivosti su tumačeni u skladu sa preporukama CLSI iz 2013. godine. Prema navedenim preporukama definisane su različite granične vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija penicilina i cefalosporina treće generacije za sojeve pneumokoka izolovane iz likvora i/ili krvi pacijenata sa dijagnozom meningitisa (tzv.meningealni sojevi - MS) i sojeve izolovane od osoba sa drugim dijagnozama pneumokokne bolesti (tzv. nemeningelani sojevi -

NMS). Granične vrednosti penicilina za MS su: S  $\leq$  0,06  $\mu$ g/ml, R  $\geq$  2  $\mu$ g/ml, a za NMS su: S  $\leq$  2  $\mu$ g/ml, R  $\geq$  8  $\mu$ g), dok su za cefalosporine treće generacije granične vrednosti za MS bile S  $\leq$  0,5  $\mu$ g/ml, R  $\geq$  2  $\mu$ g/ml, a za NMS S  $\leq$  1  $\mu$ g/ml, R  $\geq$  4  $\mu$ g/ml.

Vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) penicilina i cefotaksima su potvrđene kombinovanim difuziono-dilucionim metodom antibiograma, pomoću E test traka na način opisan u poglavlju 3.2.2. Rezultati su interpretirani na dva načina: u skladu sa CLSI standardom, 2013., koji se i dalje koristi u našoj zemlji, i u većini zemalja, kao i sa standardom EUCAST (*engl.* European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) iz 2013. godine, koji je od skoro preporučan kao standard za evropske zemlje (325).

### 3.4 Detekcija gena rezistencije na makrolide, PCR metodom

Geni rezistencije na eritromicin, *ermB* i *mefA*, kod izolovanih sojeva pneumokoka su detektovani reakcijom lančanog umnožavanja (PCR) prema protokolu Farrell-a (255, 268, 318, 320, 326, 327). Za vizualizaciju dobijenih produkata je upotrebljen metod horizontalne elektroforeze u agaroznom gelu kao i UV transiluminator (Kodak Gel Logic 200 Imaging System, SAD). Korišćen je sistem za fotodokumentaciju (Kodak, 1D 3.6, SAD).

#### 3.4.1 Izolacija i kvantitacija DNK

Izolacija i kvantitacija DNK su urađene metodom termičke ekstrakcije, odnosno spektrofotometrijskim merenjem opisanim u poglavlju 3.1.2.

#### 3.4.2 Prajmeri koji su korišćeni za umnožavanje gena rezistencije pneumokoka na makrolidne antibiotike

Geni koji determinišu rezistenciju na makrolide (*mefA* i *ermB*) su detektovani PCR metodom, korišćenjem prajmera čije su sekvence prethodno objavljene (326) (Tabela 3).

**Tabela 3: Prajmeri koji su korišćeni za umnožavanje gena rezistencije na eritromicin, PCR metodom**

Prajmer	Sekvenca 5'→3'	Produkt (bp)	Referenca
<i>mefA</i> Fw	5'TATGGGCAGGGCAAGCAGTATC3'	202	Farrell <i>at al.</i> (2001)
<i>mefA</i> Rev	5'TCRGCACCAATCATTATCTTCTTC3'		
<i>ermB</i> Fw	5'TTTTGAAAGCCATGCGTCTGA3'	201	Farrell <i>at al.</i> (2001)
<i>ermB</i> Rev	5'ATCTGTGGTATGGCGGGTAAGTT3'		

### 3.4.3 Protokol za izvođenje reakcije lančanog umnožavanja *mefA* i *ermB* gena

Za izvođenje reakcije lančanog umnožavanja, korišćene su sterilne plastične mikropruvete, čija zapremina iznosi 0,2 ml (Eppendorf, Nemačka). Reakcionu smešu su sačinjavali Taq PCR MasterMix zapremine 12 µl (Qiagen, Nemačka), po 2 µl 20 µM rastvora odgovarajućih prajmera (Invitrogen, SAD), 5 µl bakterijske DNK i 4 µl dejonizovane vode (Qiagen, Nemačka). Zapremina reakcione smeše je iznosila 25 µl. U reakcionu smešu negativne kontrole dodavana je odgovarajuća zapremina destilovane vode umesto bakterijske DNK. Pozitivnu kontrolu je predstavljao uzorak čiji je odgovarajući amplikon, prethodno već umnožen PCR metodom i naknadno vizualizovan.

Mikropruvete sa reakcionim smešama su stavljanje u termoblok aparata (Mastercycler Gradient, Eppendorf).

Temperature topljenja (*engl.* melting temperature, TM) prajmera su određene na osnovu dužine sekvenci i procentualne zastupljenosti različitih nukleotida, korišćenjem Perlprimer programa. U zavisnosti od TM Fw i Rev prajmera, dizajnirana je temperatura vezivanja prajmera (*engl.* annealing temperature, TA) koja je korišćena u protokolima za PCR (TA~TM-5°C). Korišćenjem web servera OligoCalc proverena je eventualna međusobna komplementarnost prajmera.



Amplifikacija se odvijala pod sledećim uslovima: inicijalna denaturacija je izvedena na temperaturi od 95°C u trajanju od 10 minuta, praćena sa 40 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije na temperaturi od 95°C u trajanju 15 sekundi, reakcije vezivanja prajmera na 59°C u trajanju od 30 sekundi i elongacije na 72°C u trajanju od 30 sekundi. Finalna elongacija je izvedena na temperaturi od 72°C u trajanju od 10 minuta.

#### 3.4.4 Elektroforeza u agaroznom gelu

Elektroforetsko razdvajanje PCR produkata, na osnovu veličine produkta i naelektrisanja, obavljeno je u 1,5% agaroznom gelu. Smeša TAE pufera (40mM TRIS, 20 mM sirćetne kiseline, 1 mM EDTA, pH7,6) i agaroze je više puta kuvana do tačke ključanja radi homogenizacije, a do postizanja bezbojnosti. U tečnu agarozu je sipan 0,01% etidijum bromid, interkalirajuća boja, radi vizualizacije produkta. Smeša je zatim razlivana u kalup za gel, u koji je prethodno učvršćen plastični češalj, koji služi za formiranje bunarčića. Nakon stezanja gela, češalj je vađen, a ceo sistem unosen u kadicu za elektroforezu u koju je sipan TAE pufer do granične linije. Bunarčići su punjeni mešavinom 8 µl PCR produkta i 2 µl 10X pufera za punjenje (*engl.* loading buffer), odnosno rastvora bromfenol plavog (Fermentas, SAD). Pored ispitivanih PCR produkata na gel je nanošen i DNK standard (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas, SAD), odnosno smeša DNK fragmenata poznatih veličina (*engl.* ladder) u zapremini od 5 µl. Elektroforeza je obavljena pri naponu struje od 100V u trajanju od 60min.

#### 3.4.5 Vizualizacija PCR produkata

Vizualizacija je obavljena prosvetljavanjem gelova korišćenjem UV transiluminatora (Kodak Gel Logic 200 Imaging System, SAD). Pojava trake odgovarajućeg broja baznih parova ukazivala je na postojanje datog gena u ispitivanom uzorku, a odsustvo trake nepostojanje istog. Sistem za fotodokumentaciju (Kodak, 1D 3.6, SAD) je korišćen za slikanje gelova i skladištenje dobijenih fotografija.

### 3.5 Statistička obrada rezultata

U statističkoj obradi rezultata korišćene su metode deskriptivne statistike. Za procenu značajnosti razlike korišćen je Hi kvadrat test. Statistički značajnom razlikom smatralo se P manje od 0,05, a visoko statistički značajnom razlikom smatralo se P manje od 0,01

## 4 REZULTATI ISTRAŽIVANJA

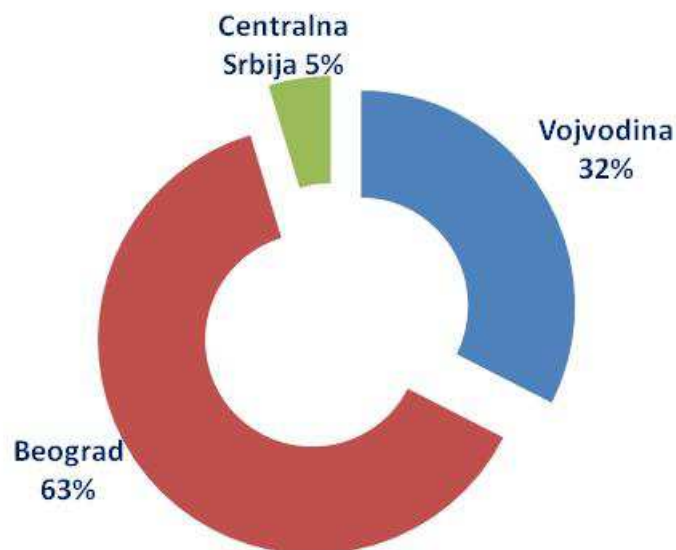
### 4.1 Osnovne osobine uzorka

U periodu od januara 2010. do decembra 2012. godine je u Srbiji, u laboratorijama koje su učestvovala u slanju MRSP izolovano ukupno 958 (175 invazivnih i 783 neinvazivnih) sojeva *S.pneumoniae*. Od toga je 326 (34%) bilo rezistentno na makrolide (MRSP). Od ukupno 175 invazivnih izolata, 48 (27,4%) je bilo rezistentno na makrolide, dok je od 783 neinvazivnih izolata, 278 (35,5%) bilo MRSP. Veća učestalost MRSP sojeva među neinvazivnim u odnosu na invazivne materijale je bila statistički značajna ( $\chi^2=4,2$ ;  $df=1$ ;  $p=0,04$ ). Od ukupno 958 sojeva, pedijatrijskih je bilo 686, od čega je 247 sojeva (36%) bilo MRSP. Broj uzoraka dobijenih od odraslih pacijenata je iznosio 272, među kojima je rezistentnih na makrolide bilo 79 (29%). Veća učestalost MRSP sojeva dobijenih od pedijatrijskih pacijenata u odnosu na sojeve dobijene od odraslih je bila statistički značajna ( $\chi^2=4,15$ ;  $df=1$ ;  $p=0,04$ ) (tabela 4).

**Tabela 4: Učestalost izolacije sojeva *S.pneumoniae* u odnosu na vrstu materijala i uzrast**

Uzrast	neinvazivni		invazivni		ukupno
	MSSP	MRSP	MSSP	MRSP	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
<b>Deca</b>	378	74,9	224	80,6	61
<b>Odrasli</b>	127	25,1	54	19,4	66
<b>Ukupno</b>	505	100,0	278	100,0	127

Ovo istraživanje je obuhvatilo ispitivanje fenotipskih i genotipskih osobina 326 sojeva pneumokoka rezistentnih na makrolide. Od toga je 32,5% izolovano sa teritorije Vojvodine, 62,8% sa područja grada Beograda, dok je 4,7% izolata poticalo iz laboratorija iz centralne Srbije (grafikon 1).

**Grafikon 1: Teritorijalna raspodela izolovanih sojeva**

Procentualna zastupljenost sojeva po uzrastu i polu je prikazana u Tabeli 5. Sojevi *S.pneumoniae* rezistentni na makrolide su bili tri puta češće izolovani od dece (< 18 godina) u odnosu na odrasle osobe. Odnos među polovima pacijenata od kojih su dobijeni uzorci je bio podjednak.

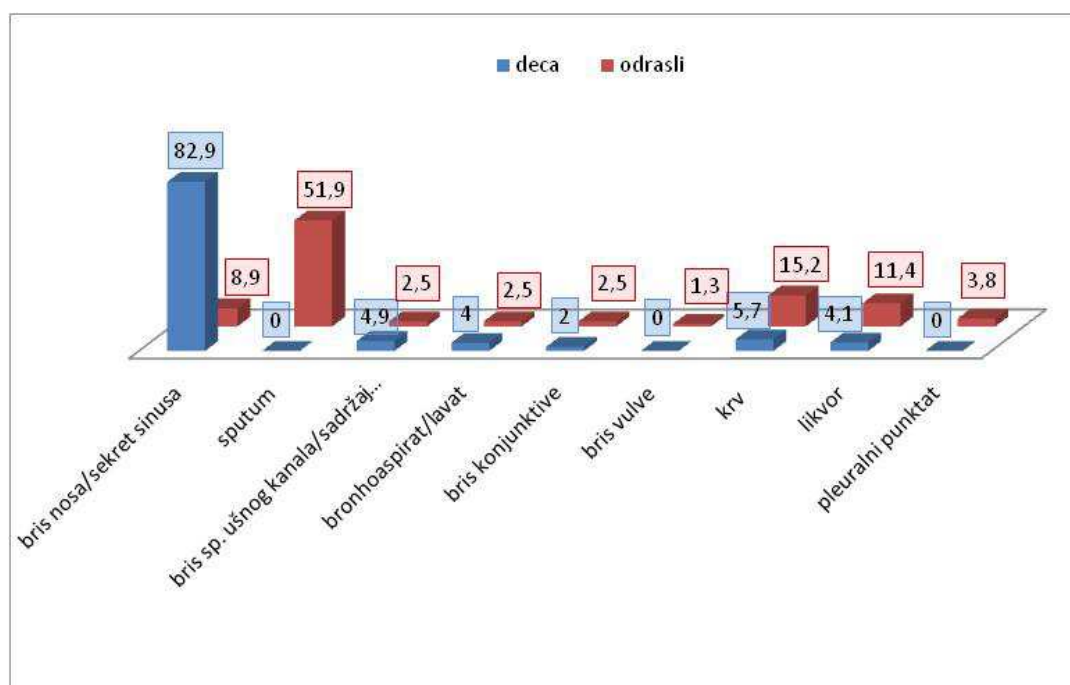
**Tabela 5: Demografske karakteristike pacijenata kod kojih su izolovani sojevi MRSP**

Karakteristika	Podaci	
	N	%
<b>Uzrast</b>		
Deca	247	75,8
Odrasli	79	24,2
<b>Pol</b>		
Muški	164	50,3
Ženski	161	49,4

Od 278 neinvazivnih izolata, najveći broj (226) je poticao iz gornjih delova respiratornog trakta - brisa nosa i sekreta sinusa, kao i iz spoljnog i srednjeg uha, dok je iz donjih disajnih puteva (sputuma i bronhoalveolarnog materijala) izolovano 44 soja. U brisu konjunktive je nađeno 7 sojeva MRSP, a u brisu vulve jedan. Od 48 invazivnih sojeva, 26 (54,2%) je izolovano iz krvi, 19 (39,6%) iz likvora, a svega 3 (6,2%) su izolovana iz pleuralnih punktata.

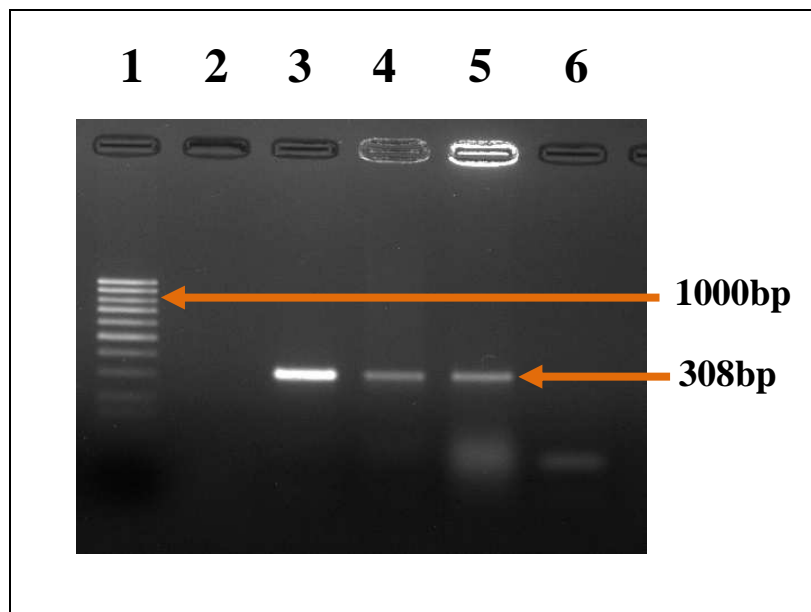
Analiza zastupljenosti pojedinih materijala prema uzrastu je pokazala da su među neinvazivnim materijalima dominirali uzorci izolovani od dece. Oni su činili 80,6% (224 od 278) svih neinvazivnih izolata, odnosno 90,7% (224 od 247) – svih pedijatrijskih MRSP sojeva. Preostalih 19,4% (54 od 278) neinvazivnih sojeva je izolovano od odraslih, što je predstavljalo 68,3% dela adultne kolekcije MRSP. Od 48 invazivnih MRSP sojeva, 47,9% (23) je izolovano od dece, a 52,1% (25) od odraslih. Invazivni dečiji izolati su činili 9,3% kolekcije pedijatrijskih MRSP, dok je 25 invazivnih sojeva izolovanih od odraslih pacijenata predstavljalo 31,5% svih adultnih MRSP izolata (grafikon 2).

**Grafikon 2: Učestalost vrste materijala u odnosu na uzrast izražen u procentima**



Od 326 sojeva, dva soja su bila rezistentna na optohin, dok su ostali bili osetljivi. Međutim, svi su lizirali u prisustvu dezoksiholata. Kod svih 48 invazivnih sojeva pneumokoka je identifikacija potvrđena detekcijom *lytA* gena, metodom PCR (slika 6).

**Slika 6: Gel elektroforeza u agaroznom gelu; detekcija *lytA* gena kod MRSP sojeva PCR metodom**



Traka 1 - DNK standard (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas);

Traka 2 - negativna kontrola

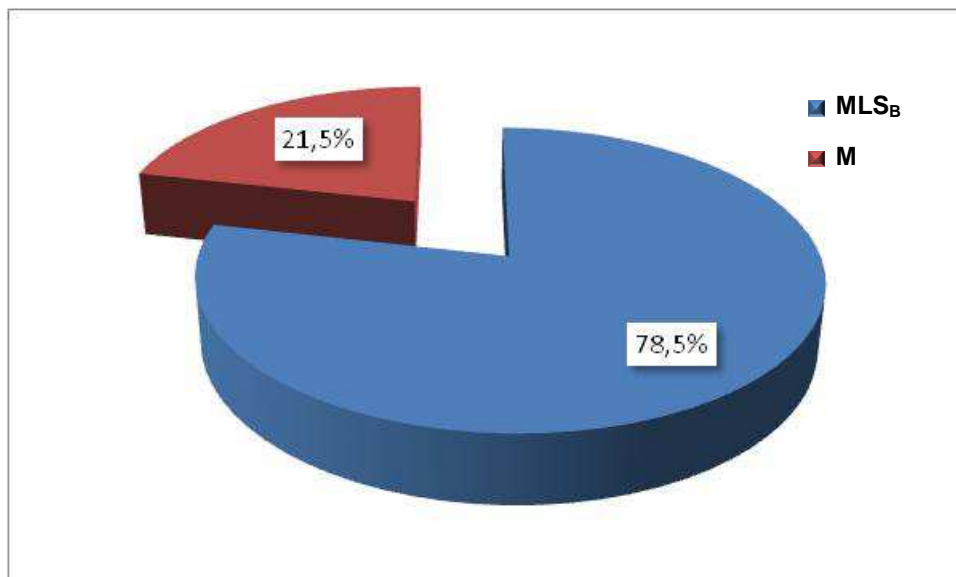
Traka 3 - pozitivna kontrola za *lytA* gen ;

Trake 4 i 5 - pozitivni uzorci za *lytA* gen;

Traka 6 - negativan uzorak za *lytA* gen

#### **4.2 Fenotipovi rezistencije na makrolide sojeva *Streptococcus pneumoniae* izolovanih u Srbiji**

Dominantan fenotip makrolidne rezistencije među analiziranim MRSP izolatima je bio MLS<sub>b</sub>, koji je identifikovan kod 256 (78,5%) sojeva. M fenotip je bio zastupljen kod 70 (21,5%) sojeva. Među sojevima sa MLS<sub>b</sub> fenotipom, 241 (73,9%) je ispoljio konstitutivni MLS fenotip, dok je D zona oko diska klindamicina, označena kao inducibilni MLS fenotip detektovana kod svega 15 (4,6%) sojeva (grafikon 3).

**Grafikon 3: Zastupljenost fenotipova rezistencije pneumokoka na makrolide**

MLS<sub>B</sub> fenotip je dominirao u obe uzrasne grupe (78,5% u ukupnom uzorku). Međutim, zastupljenost MLS<sub>B</sub> fenotipa je bila značajno češća kod dece (83,0%) u odnosu na odrasle pacijente (64,6%), dok je M fenotip bio znatno više zastupljen kod odraslih (35,4%) nego kod dece (17%) i ova razlika je statistički visoko signifikantna ( $\chi^2=12,07$ ;  $df=1$ ;  $p=0,001$ ). Prevalencija MLS<sub>B</sub> fenotipa je bila približno jednaka među invazivnim (77,1%) i neinvazivnim izolatima (78,7%). Takođe je i M fenotip bio podjednako zastupljen kod invazivnih (22,9%) i neinvazivnih izolata (21,3%) (tabela 6).

**Tabela 6: Distribucija fenotipova rezistencije MRSP među invazivnim (n=48) i neinvazivnim (n=278) sojevima pneumokoka izolovanim od dece i odraslih**

Fenotip	Deca (n=247)		Odrasli (n=79)		Ukupno (n)
	Invazivni (n)	Neinvazivni (n)	Invazivni (n)	Neinvazivni (n)	
cMLS	16	178	17	30	241
iMLS	1	10	3	1	15
M	6	36	5	23	70
<b>Ukupno</b>	23	224	25	54	326

Sojevi sa  $MLS_b$  fenotipom rezistencije na makrolide su se odlikovali visokim stepenom rezistencije na eritromicin, pri čemu je vrednost  $MIK_{50}$  iznosila  $\geq 256$   $\mu\text{g/ml}$ . Većina sojeva sa  $MLS_b$  fenotipom je bila rezistentna i na klindamicin sa vrednošću  $MIK_{50} \geq 256$   $\mu\text{g/ml}$ . Najviše vrednosti MIK klindamicina su imali sojevi sa cMLS fenotipom. Od 15 sojeva sa inducibilnom MLS rezistencijom pet je bilo osetljivo na klindamicin, dok su ostali bili rezistentni na ovaj antibiotik. Vrednost  $MIK_{50}$  klindamicina za sojeve sa iMLS fenotipom je bila 0,5  $\mu\text{g/ml}$ .

Sojevi sa M fenotipom rezistencije na makrolide su se odlikovali umerenim stepenom rezistencije na eritromicin, pri čemu je vrednost  $MIK_{50}$  iznosila 4  $\mu\text{g/ml}$ . Svi sojevi sa M fenotipom su bili osetljivi na klindamicin sa vrednošću  $MIK_{50}$  od 0,25  $\mu\text{g/ml}$  (tabela 7).

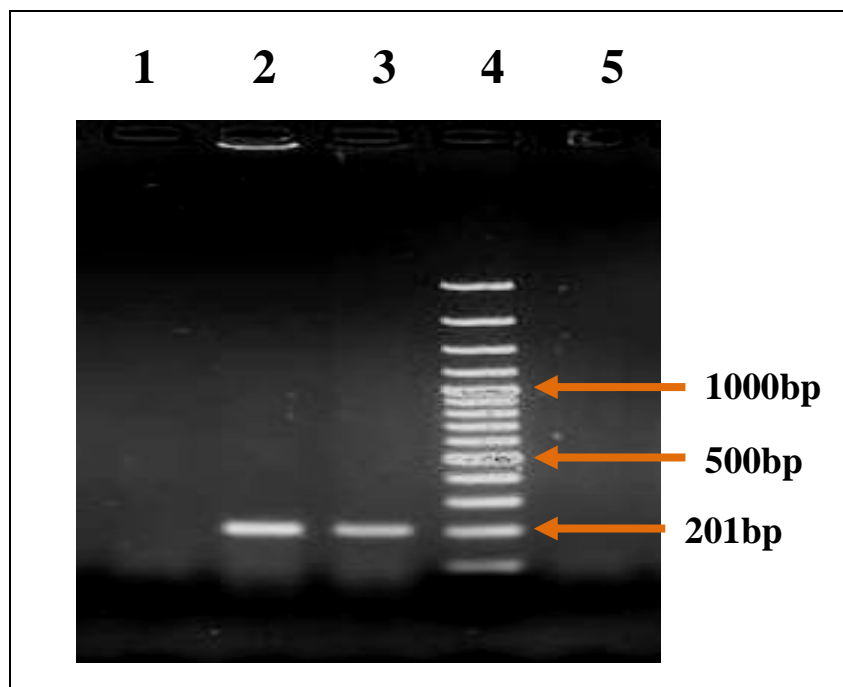
**Tabela 7: Distribucija fenotipova rezistencije na makrolide i vrednosti MIK eritromicina i klindamicina**

Fenotip	n (%)	Antibiotik	MIK ( $\mu\text{g/ml}$ )		
			Rang	50%	90%
cMLS	241 (73,9)	Eritromicin	4- $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
		Klindamicin	4- $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
iMLS	15 (4,6)	Eritromicin	1- $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
		Klindamicin	0,064- $\geq 256$	0,5	48
M	70 (21,5)	Eritromicin	2- $\geq 256$	4	12
		Klindamicin	0.016-0.25	0.25	0.25

### 4.3 Genotipovi rezistencije na makrolide kod sojeva *Streptococcus pneumoniae* izolovanih u Srbiji

Od ukupno ispitanih 326 MRSP sojeva, *ermB* gen (slika 7) je identifikovan kod 256 sojeva (78,5%), dok je prisustvo *mefA* gena (slika 8) dokazano kod 213 (65,3%) sojeva.

**Slika 7: Gel elektroforeza u agaroznom gelu; detekcija *ermB* gena kod MRSP sojeva PCR metodom**



Traka 1 - negativna kontrola za *ermB* gen

Traka 2 - pozitivna kontrola za *ermB* gen

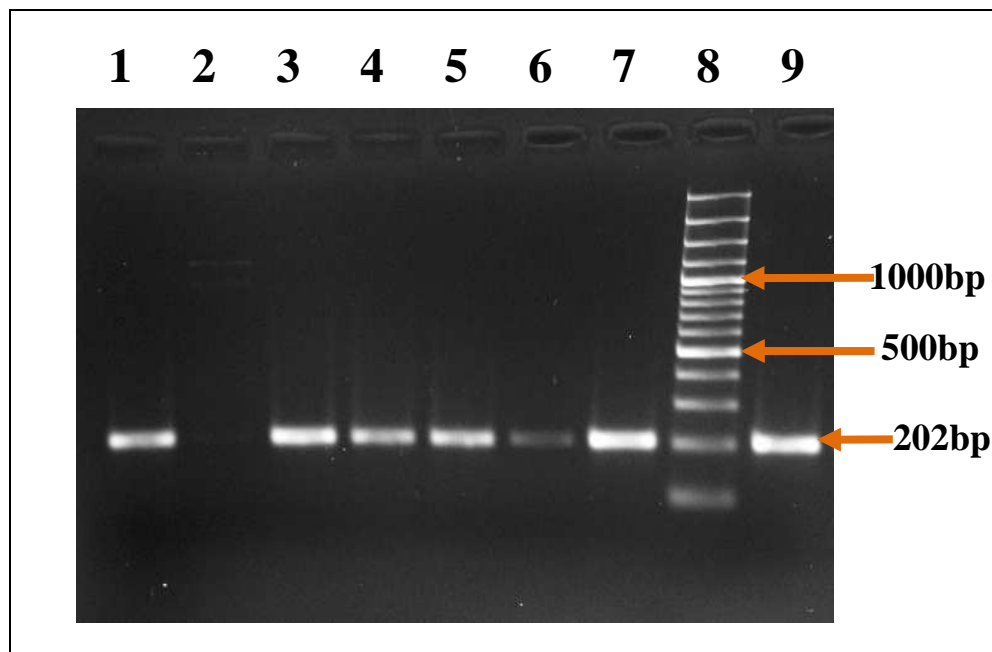
Traka 3 – pozitivan uzorak

Traka 4 - DNK standard (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas)

Traka 5 - negativan uzorak



**Slika 8: Gel elektroforeza u agaroznom gelu; detekcija *mefA* gena kod MRSP sojeva PCR metodom**



Traka 1 – pozitivna kontrola za *mefA* gen

Traka 2 – negativna kontrola za *mefA* gen

Trake 3-7 i 9 – pozitivni uzorci

Traka 8 - DNK standard (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder plus, Fermentas)

Kod svih 70 sojeva sa M fenotipom je identifikovan samo *mefA* gen (21,3%). Kod svih 256 sojeva koji su imali MLS<sub>b</sub> fenotip je dokazano prisustvo *ermB* gena (slika 8). Prisustvo samo *ermB* gena je dokazano kod 113 (34,7 %) izolata. Prisutvo oba gena rezistencije (*ermB+mefA*) je potvrđeno kod 143 (43,9%) izolata. Svi sojevi kod kojih su potvrđena oba gena rezistencije su imali MLS<sub>b</sub> fenotip (tabela 8).

**Tabela 8: Distribucija gena rezistencije kod 326 ispitanih MRSP**

Fenotipovi	samo <i>ermB</i>	samo <i>mefA</i>	<i>ermB</i> + <i>mefA</i>
cMLS	104	0	137
iMLS	9	0	6
M	0	70	0

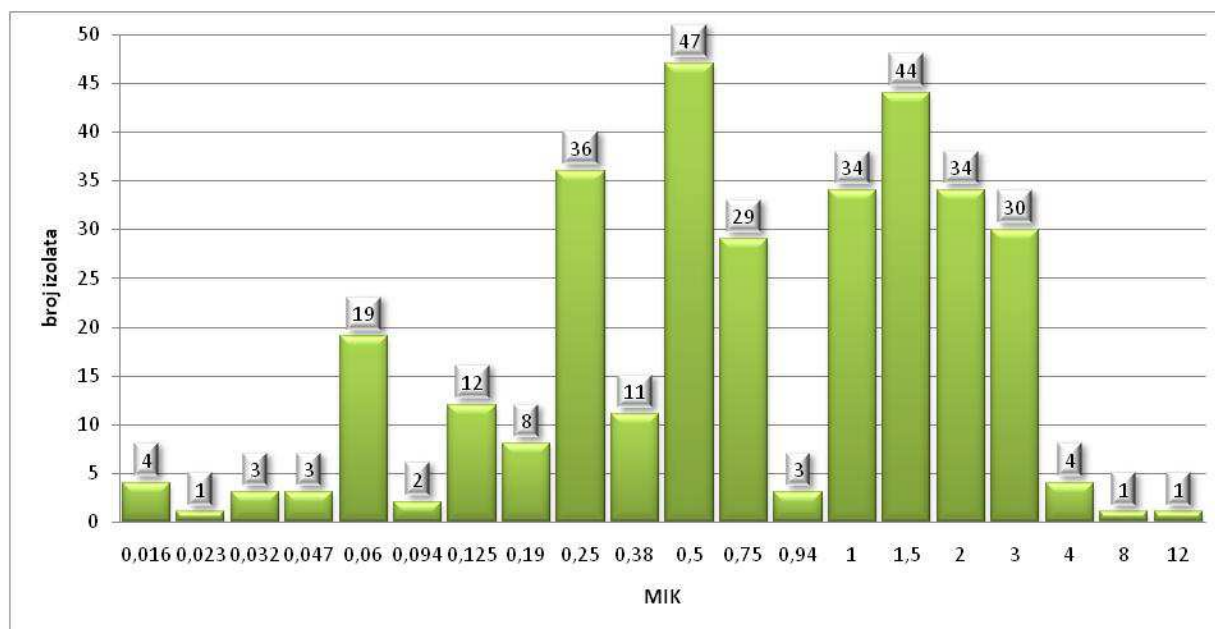
Sojevi koji poseduju oba ispitivana gena (*ermB* i *mefA*) češće su bili prisutni kod dece (49,0%) u odnosu na uzorke dobijene od odraslih (27,8%) i ova razlika je statistički visoko signifikantna ( $\chi^2=10,863$ ;  $df=1$ ;  $p=0,001$ ). Izolati koji poseduju oba ispitivana gena (*ermB* i *mefA*) su češće bili prisutni među neinvazivnim (47,1%) nego među invazivnim uzorcima (25,0%) i ova razlika je statistički visoko signifikantna ( $\chi^2=8,135$ ;  $df=1$ ;  $p=0,004$ ).

#### 4.4 Učestalost rezistencije sojeva MRSP na druge antibiotike u Srbiji

Osetljivost MRSP sojeva na penicilin i cefotaksim je ispitana automatizovanim sistemom (VITEK) i E testom. Interpretacija rezultata osetljivosti na penicilin i cefotaksim je analizirana korišćenjem dva kriterijuma: CLSI (2013) i EUCAST (2013).

Vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija penicilina su se kretale od 0,016  $\mu\text{g/ml}$  do 12  $\mu\text{g/ml}$ . Vrednost  $\text{MIK}_{50}$  penicilina je iznosila 0,75  $\mu\text{g/ml}$  dok je vrednost  $\text{MIK}_{90}$  iznosila 3  $\mu\text{g/ml}$ . Na grafikonu 4 je prikazana zastupljenost vrednosti MIK penicilina kod svih analiziranih sojeva.

**Grafikon 4: Distribucija vrednosti MIK penicilina MRSP sojeva (n=326)**



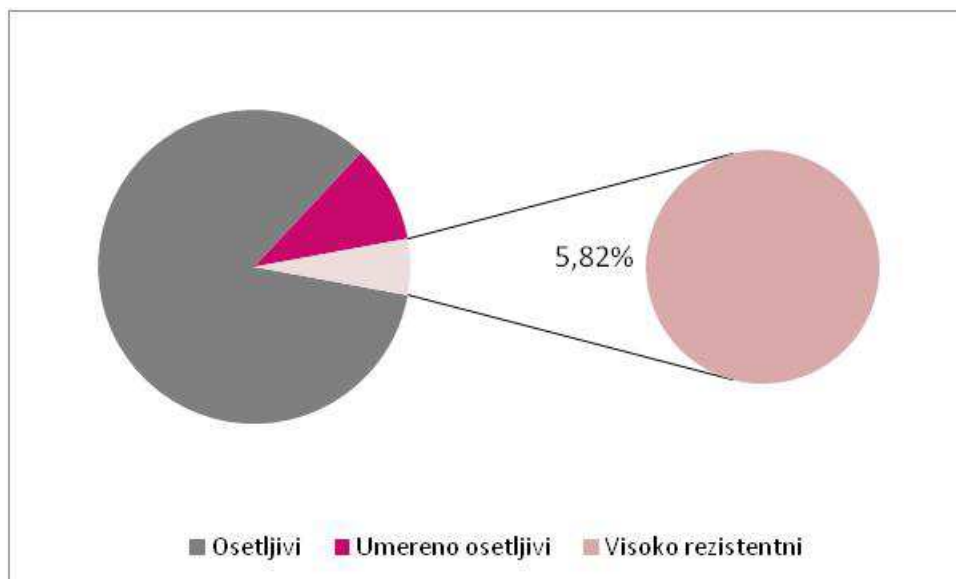
**Tabela 9: Granične vrednosti MIK penicilina prema kriterijumima CLSI i EUCAST za 2013.godinu**

Poreklo izolata pneumokoka	CLSI MIK( $\mu\text{g/ml}$ )			EUCAST MIK( $\mu\text{g/ml}$ )	
	S	I	R	S	R
Pacijenti sa meningitisom	$\leq 0,06$	-	$\geq 0,12$	$\leq 0,06$	$> 0,06$
Pacijenti sa infekcijama drugih sistema i organa	$\leq 2$	4	$\geq 8$	$\leq 1^*$	$> 1$

\*granične vrednosti se odnose na doziranje od 2,4g 4 puta dnevno ili 1,2g 6 puta dnevno

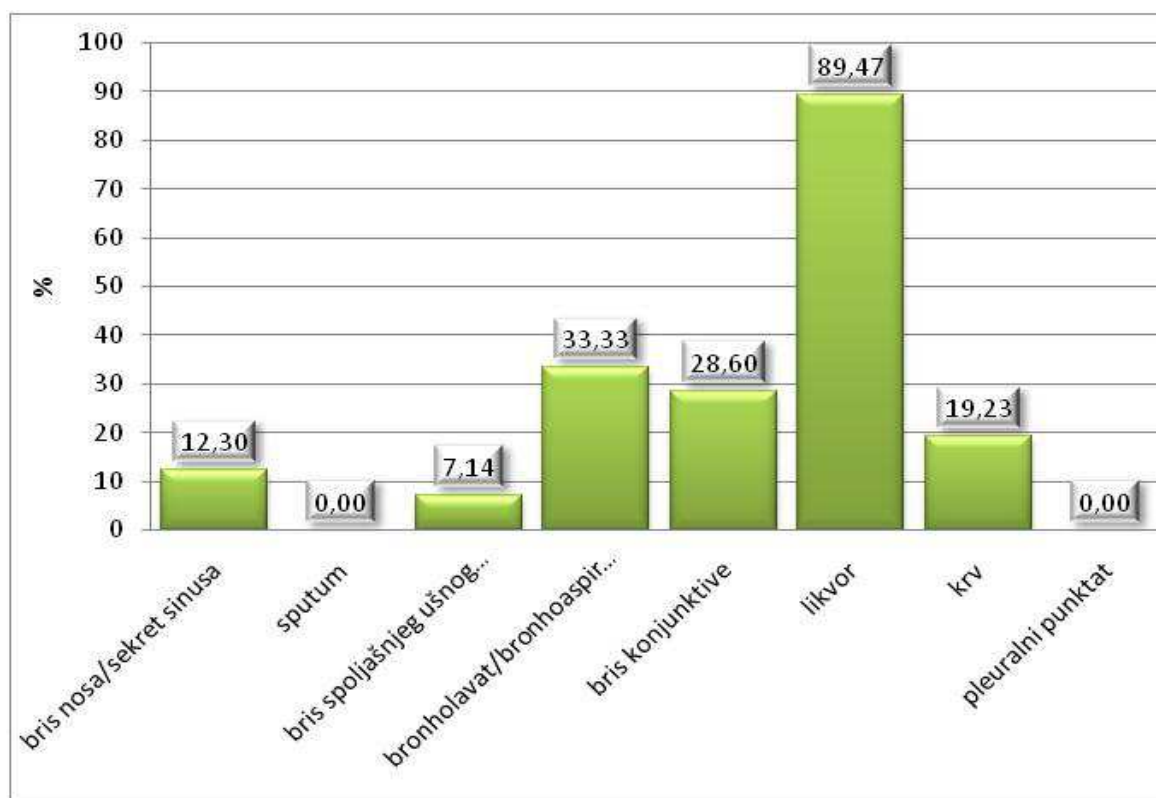
Kada smo koristili kriterijume CLSI za 2013. god. (tabela 9), našli smo da je među MRSP sojevima bilo 52 od ukupno 326 (16%) intermedijarno osetljivih i rezistentnih (penicilin neosetljivih sojeva pneumokoka - PNSP), dok je 274 (84%) sojeva bilo osetljivo. Od 52 PNSP, 34 (65,4%) izolata su bila umereno osetljiva na penicilin, dok je visok nivo rezistencije imalo svega 18 (34,6%) sojeva, što čini 5,82% celokupnog uzorka (grafikon 5).

**Grafikon 5: Zastupljenost rezistencije MRSP sojeva na penicilin prema kriterijumima CLSI**



Viši nivo neosetljivosti na penicilin je bio prisutan kod dece (17,8%) u odnosu na odrasle (10,1%) ali razlika nije bila statistički značajna ( $\chi^2=1,887$ ;  $df=1$ ;  $p=0,17$ ). Zastupljenost rezistencije je bila veća među invazivnim u odnosu na neinvazivne sojeve, i razlika je bila statistički značajna ( $\chi^2=37,491$ ;  $df=1$ ;  $p=0,000$ ). Tako su od 48 invazivnih izolata, 22 (45,8%) izolata bila penicilin neosetljiva, dok je od 278 neinvazivnih sojeva 30 (10,8%) njih pokazivalo smanjenu osetljivost na penicilin. Među invazivnim izolatima, značajno viši stepen neosetljivosti na penicilin je bio prisutan među izolatima dobijenim iz likvora (89,47%) u odnosu na izolate dobijene iz krvi (19,2%) (grafikon 6). Izolati koji poseduju oba gena rezistencije (*ermB* + *mefA*) su češće prisutni kod PNSP (CLSI kriterijumu) (50,0%) nego kod sojeva koji su osetljivi na penicilin (42,7%) ali ova razlika nije statistički značajna.

**Grafikon 6: Neosetljivost na penicilin MRSP prema vrsti materijala, CLSI**



S obzirom da su granične vrednosti prema kriterijumima EUCAST restriktivnije u odnosu na CLSI, prilikom ispitivanja osetljivosti na penicilin, korištene su granične vrednosti kojima se postiže slično doziranje. Naime doze od 2,4 gm 4 puta dnevno ili 1,2 gm 6 puta dnevno prema kriterijumima EUCAST odgovaraju dozi od 2 miliona jedinica 6 puta dnevno prema kriterijumima CLSI (328). Korištenjem dozama prilagođenim graničnih vrednosti (tabela 9), prema kriterijumima EUCAST među MRSP je učestalost penicilin neosetljivih sojeva pneumokoka (PNSP) iznosila 39%, dok je 61% izolata bilo osetljivo. Viši nivo rezistencije na penicilin je bio prisutan kod dece (46,6%) u odnosu na odrasle (15,2%) a razlika je bila statistički visoko signifikantna ( $\chi^2=24,767$ ;  $df=1$ ;  $p<0,000$ ).

Zastupljenost rezistencije je bila veća među invazivnim (54,2%) u odnosu na neinvazivne (36,3%) izolate i razlika je bila statistički značajna ( $\chi^2=5,476$ ;  $df=1$ ;  $p=0,019$ ). Među invazivnim izolatima je, kao i u prethodnoj analizi (CLSI), veoma visok stepen neosetljivosti na penicilin je bio prisutan među izolatima dobijenim iz likvora (89,47%).

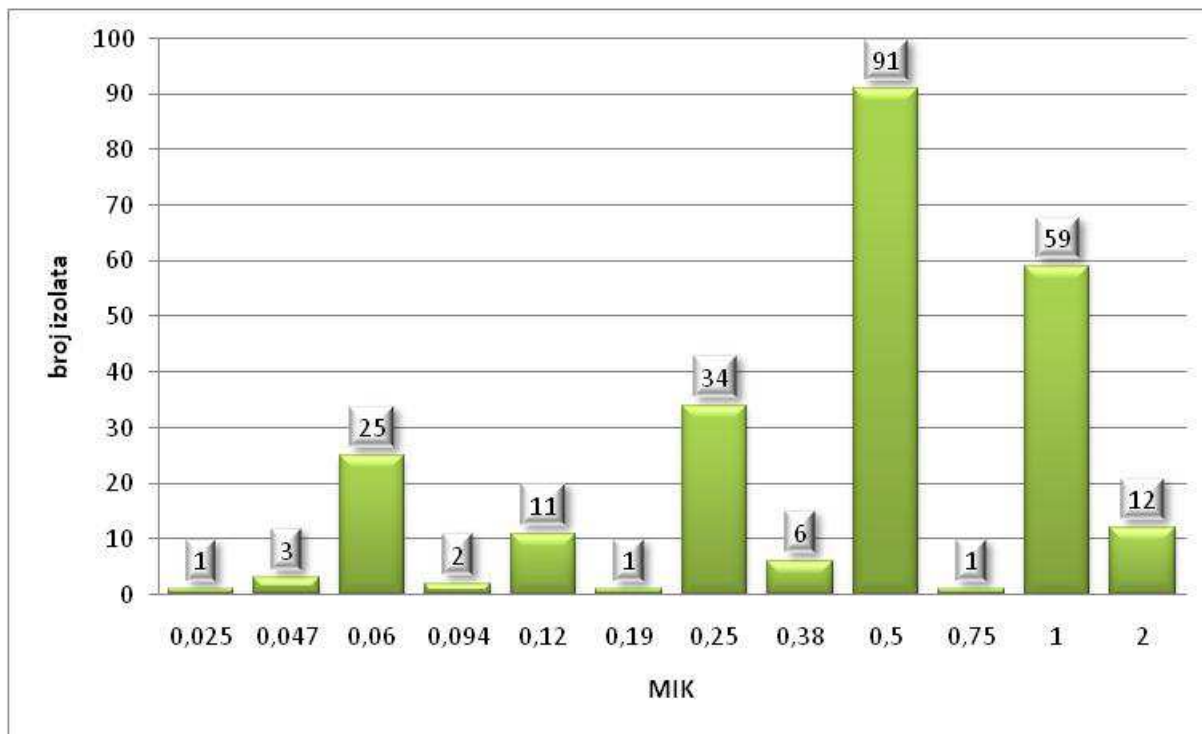
**Tabela 10: Razlike u interpretaciji rezistencije izolata MRSP na penicilin prilikom korišćenja dva različita standarda (CLSI i EUCAST) za 2013. godinu**

Kriterijum	Penicilin neosetljivi sojevi				Diskrepanca %
	CLSI		EUCAST		
	%	N	%	n	
<b>Deca</b>	17,8	44	46,6	115	28,8 („very major“)
<b>Odrasli</b>	10,1	8	15,2	12	5,1 („minor“)
<b>Invazivni</b>	45,8	22	54,2	26	8,4 („minor“)
<b>Neinvazivni</b>	10,8	30	36,3	101	25,5 („very major“)
<b>Ukupno</b>	<b>16</b>	<b>52</b>	<b>39</b>	<b>127</b>	<b>23 („major“)</b>

Neusaglašenost između kategorija osetljivosti, odnosno rezistencije na penicilin, dobijenih prema kriterijumima CLSI u odnosu na EUCAST je kod MRSP iznosila 23%, što predstavlja tzv. „major“ diskrepancu (10-<25%) (tabela 10) (328).

Vrednosti minimalnih inhibičnih koncentracija (MIK) cefotaksima su se kretale od 0,025  $\mu\text{g/ml}$  do 2  $\mu\text{g/ml}$ . Vrednost  $\text{MIK}_{50}$  cefotaksima je bila 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , dok je vrednost  $\text{MIK}_{90}$  iznosila 1  $\mu\text{g/ml}$ . Zastupljenost vrednosti MIK cefotaksima je prikazana na grafikonu 7.

**Grafikon 7: Distribucija vrednosti MIK cefotaksima kod MRSP sojeva**



**Tabela 11: Granične vrednosti MIK cefotaksima prema kriterijumima CLSI i EUCAST za 2013. god.**

Poreklo izolata pneumokoka	CLSI MIK( $\mu\text{g/ml}$ )			EUCAST MIK( $\mu\text{g/ml}$ )	
	S	I	R	S	R
Pacijenti sa meningitisom	$\leq 0,5$	1	$\geq 2$	$\leq 0,5$	$> 0,5$
Pacijenti sa infekcijama drugih sistema i organa	$\leq 1$	2	$\geq 4$	$\leq 0,5$	$> 0,5$

Kada smo koristili kriterijume CLSI za 2013. godinu (tabela 11), našli smo da je učestalost rezistencije MRSP na treću generaciju cefalosporina (cefotaksim i ceftriakson) iznosila 6,5%.

Razlika u rezistenciji među izolatima dobijenim od dece (5,9%) u odnosu na odrasle (8,3%) nije bila statistički značajna ( $\chi^2=0,437$ ;  $df=1$ ;  $p=0,509$ ). Učestalost sojeva neosetljivih na cefotaksim je bila veća među invazivnim (25,5%) nego među neinvazivnim izolatima (2%) i ova razlika je bila statistički visoko značajna ( $\chi^2=34,592$ ;  $df=1$ ;  $p<0,000$ ). Visok nivo neosetljivosti na cefotaksim je bio prisutan među izolatima dobijenim iz likvora (52,63%). Sa druge strane, zastupljenost sojeva osjetljivih na cefotaksim, izolovanih iz krvi je iznosila svega 8%.

Prema kriterijumima EUCAST, među MRSP je učestalost sojeva neosetljivih na cefotaksim iznosila 29,4%, dok je 70,6% izolata bilo osjetljivo. Viši nivo rezistencije na cefotaksim je bio prisutan kod dece (34%) u odnosu na odrasle (15%) i ova razlika je bila statistički visoko signifikantna ( $\chi^2=7,941$ ;  $df=1$ ;  $p=0,005$ ). Učestalost rezistencije na cefalosporine treće generacije je bila statistički značajno veća ( $\chi^2=13,060$ ;  $df=1$ ;  $p<0,001$ ) među invazivnim (51,1%) u odnosu na neinvazivne (24,4%) izolate. Visok stepen neosetljivosti na cefotaksim je, kao i kod interpretacije prema kriterijumima CLSI, bio prisutan među izolatima dobijenim iz likvora (47,36%). Međutim, kada su korišćeni kriterijumi po EUCAST-u, rezistencija sojeva izolovanih iz krvi je bila znatno veća nego kod interpretacije po CLS i iznosila je čak 52%.

Diskrepanca između vrednosti koje definišu osjetljivost, dobijenih prema kriterijumima CLSI u odnosu na EUCAST je kod cefotaksima iznosila 22,9%, što se kategorizuje kao velika („major“) diskrepanca ( $\geq 25\%$ ) (tabela 12) (332).

**Tabela 12: Razlike u interpretaciji neosetljivosti izolata MRSP na cefotaksim prilikom korišćenja dva različita standarda (CLSI i EUCAST) za 2013.godinu**

Kriterijum	Cefotaksim neosetljivi sojevi				Diskrepanca %
	CLSI		EUCAST		
	%	N	%	n	
<b>Deca</b>	5,9	11	34	64	28,1 („very major“)
<b>Odrasli</b>	8,3	5	15	9	6,7 („minor“)
<b>Invazivni</b>	25,5	12	51,1	24	25,6 („very major“)
<b>Neinvazivni</b>	2	4	24,4	49	24,2 („major“)
<b>Ukupno</b>	<b>6,5</b>	<b>16</b>	<b>29,4</b>	<b>73</b>	<b>22,9 („major“)</b>

Prema kriterijumima CLSI, 25,5% MRSP sojeva je bilo rezistentno na amoksicilin (tabela 13). Zastupljenost neosetljivosti na amoksicilin je bila veća kod invazivnih (34%) u odnosu na neinvazivne (23,6%) izolate, ali razlika nije bila statistički značajna ( $\chi^2=2,219$ ;  $df=1$ ;  $p=0,136$ ).

Učestalost amoksicilin neosetljivih sojeva među decom (29,5%) je bila veća u odnosu na odrasle (10,9%) i ova razlika je bila statistički visoko značajna ( $\chi^2=7,850$ ;  $df=1$ ;  $p=0,005$ ).

Među MRSP smo našli 81,3% rezistentnih na tetracikline (tabela 13). Dečiji izolati su bili statistički značajno češće rezistentni na ovaj antibiotik u odnosu na izolate od odraslih pacijenata ( $\chi^2=4,996$ ;  $df=1$ ;  $p=0,025$ ). Takođe su i neinvazivni izolati bili rezistentniji na tetraciklin (84,7 %) u odnosu na invazivne (66,7 %) i ova razlika je bila visoko statistički signifikantna ( $\chi^2=8,347$ ;  $df=1$ ;  $p=0,004$ ).

Rezistencija na trimetoprim-sulfametoksazol je iznosila 74,3%. Ovi sojevi su bili znatno više prisutni kod dece (79,2%) u odnosu na odrasle (56,4%) i ova razlika je bila visoko statistički signifikantna ( $\chi^2=11,820$ ;  $df=1$ ;  $p=0,001$ ). Učestalost rezistencije na trimetoprim-sulfametoksazol je bila veća među neinvazivnim izolatima (75,1%) u odnosu na invazivne (70,8%) ali razlika nije bila statistički značajna ( $\chi^2=0,376$ ;  $df=1$ ;  $p=0,540$ ).

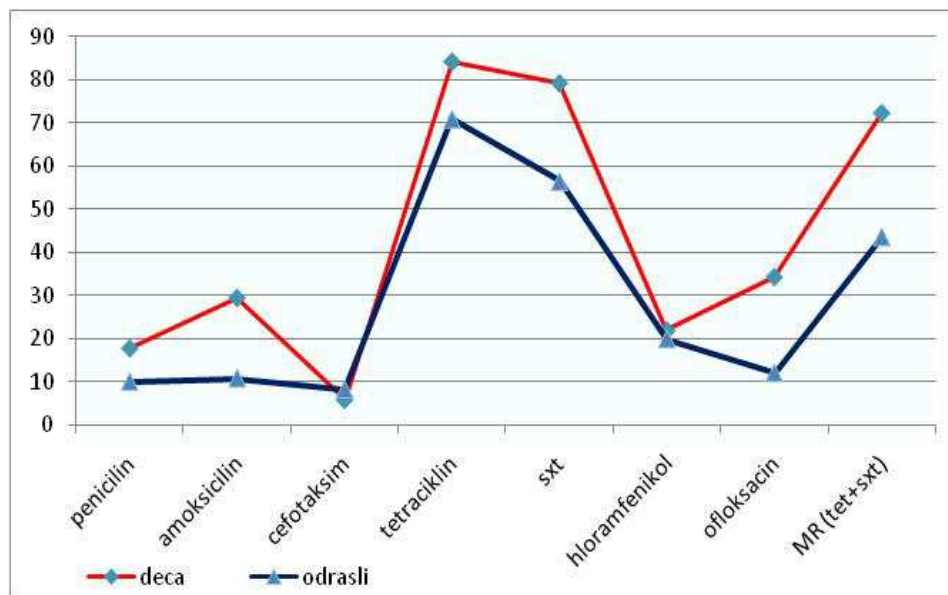
Među izolatima MRSP udruženu rezistenciju na penicilin, tetraciklin i trimetoprim-sulfametoksazol je ispoljilo 15,6% sojeva. Multirezistentni (MDR) sojevi su bili visoko statistički ( $\chi^2=8,310$ ;  $df=1$ ;  $p=0,004$ ) više zastupljeni među invazivnim (29,2%) nego među neinvazivnim izolatima (12,4%). Multirezistencija je statistički značajno bili zastupljenija kod dece (17,7%) u odnosu na odrasle (7,4%) ( $\chi^2=3,461$ ;  $df=1$ ;  $p=0,043$ ). Među sojevima sa MLS fenotipom, učestalost istovremene rezistencije na penicilin, teraciklin i trimetoprim-sulfametoksazol je iznosila 16,3%, a kod sojeva sa M fenotipom 12,2%, ali ova razlika nije bila statistički značajna.

Među sojevima pneumokoka rezistentnim na makrolide, istovremenu rezistenciju na tetraciklin i trimetoprim/sulfametoksazol (multirezistenti sojevi, MR) je ispoljilo čak 66,1% sojeva. Zastupljenost istovremene rezistencije na ova tri antibiotika je bila statistički značajno ( $\chi^2=15,836$ ;  $df=1$ ;  $p=0,000$ ) veća kod pedijatrijske populacije (72,3%) u odnosu na odrasle (43,6%) (grafikon 8). Iako su ovi multirezistentni sojevi bili više zastupljeni među neinvazivnim izolatima (68,4%) u odnosu na invazivne (56,3%), razlika nije bila statistički značajna. Zastupljenost istovremene rezistencije na tetraciklin i trimetoprim-sulfametoksazol je bila veća kod sojeva sa MLS fenotipom (73,1%), nego kod sojeva sa M fenotipom (36,7%) i ova razlika je bila visoko statistički značajna ( $\chi^2=23,391$ ;  $df=1$ ;  $p<0,000$ ). Izolati koji istovremeno nose oba



gena rezistencije, *ermB* i *mefA*, su češće prisutni među multirezistentnim sojevima (tetraciklin, trimetoprim-sulfametoksazol) (58,2%) u odnosu na sojeve osetljive na ova dva leka (17,2%) i ova razlika je statistički visoko signifikantna ( $\chi^2=39,13$ ;  $df=1$ ;  $p<0,001$ ).

**Grafikon 8: Razlike u rezistenciji MRSP prema uzrastu (%)**



Rezistencija na hloramfenikol je iznosila 21,5%. Nema statistički značajne razlike u zastupljenosti sojeva rezistentnih na hloramfenikol među decom (21,9%) i odraslima (20,0%) ( $\chi^2=0,091$ ;  $df=1$ ;  $p=0,762$ ). Učestalost rezistencije je neznatno bila veća među neinvazivnim izolatima (21,6%) u odnosu na invazivne (20,8 %), bez statističke značajnosti ( $\chi^2=0,015$ ;  $df=1$ ;  $p=0,903$ ).

**Tabela 13: Učestalost rezistencije i multirezistencije MRSP sojeva prema uzrastu i vrsti materijala**

Antibiotik	Rezistencija MRSP na druge antibiotike (%)			Statistička značajnost	Rezistencija MRSP na druge antibiotike (%)		Statistička značajnost
	Ukupno	Deca	Odrasli	<i>p</i> *	Invazivni	Neinvazivni	<i>p</i> *
<b>Amoksicilin</b>	25,5	29,5	10,9	<b>0,005</b>	34	23,6	0,136
<b>Tetraciklin</b>	81,3	84,2	70,9	<b>0,025</b>	66,7	84,7	<b>0,004</b>
<b>SXT</b>	74,3	79,2	56,4	<b>0,001</b>	70,8	75,1	0,54
<b>tetraciklin+SXT</b>	66,1	72,3	43,6	<b>0,000</b>	56,3	68,4	0,108
<b>pen+tet+SXT</b>	15,6	17,7	7,4	<b>0,043</b>	29,2	12,4	<b>0,004</b>
<b>Hloramfenikol</b>	21,5	21,9	20,0	0,762	20,8	21,6	0,903

\* $\chi^2$ -test

Sa druge strane, skoro svi ispitivani sojevi su bili osetljivi na novije hinolone odnosno na levofloksacin (99,6%), moksifloksacin (100%) i sparfloksacin (100%) (tabela 14). Zastupljenost sojeva osetljivih na ofloksacin je iznosila 68,8%. Preostalih 31,2% sojeva su bili umereno osetljivi, dok nijedan soj nije bio rezistentan. Sojevi izolovani od odraslih su bili osetljiviji (87,9%) u odnosu na sojeve izolovane od dece (65,7%) ali razlika nije bila statistički značajna. Invazivni sojevi ofloksacina su bili statistički značajno ( $\chi^2=21,153$ ;  $df=1$ ;  $p=0,000$ ) više osetljivi (95,9%) u odnosu na neinvazivne (61,8%) (grafikon 9).

Grafikon 9: Razlike u rezistenciji MRSP među invazivnim i neinvazivnim izolatima (%)

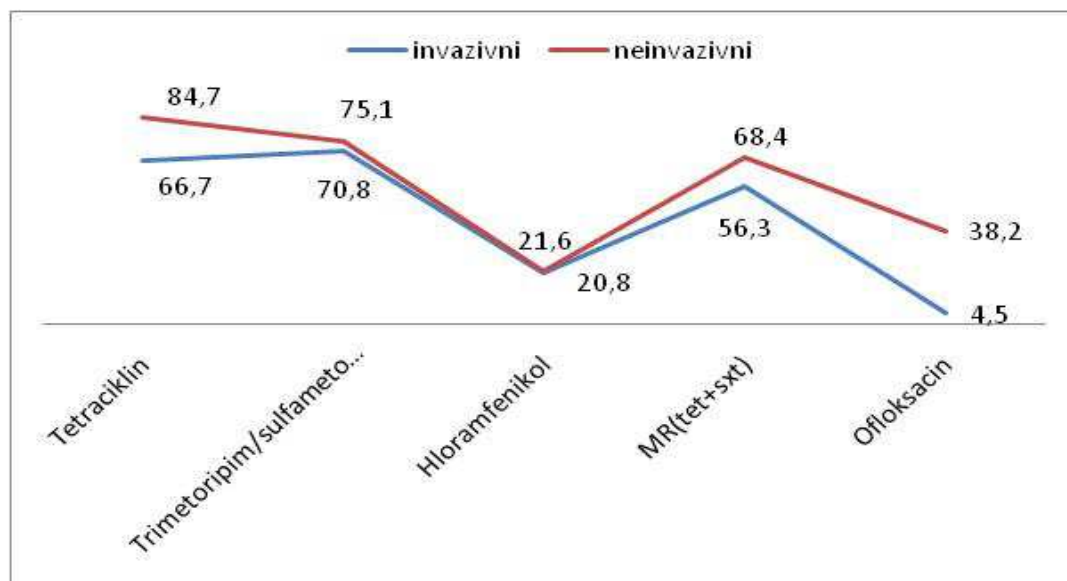
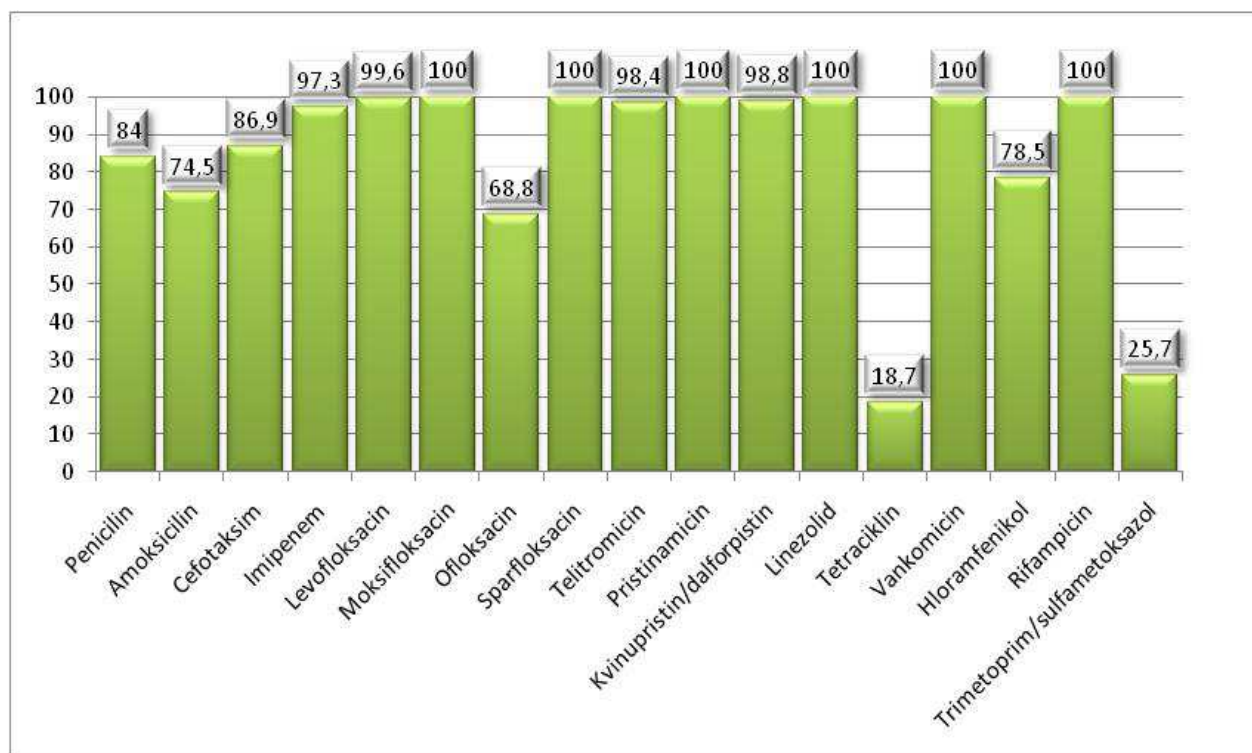


Tabela 14: Procentualna zastupljenost sojeva MRSP prema kategorijama osjetljivosti na sve ispitujuće antibiotike; granične vrednosti prema kriteriumima CLSI iz 2013.godine

Antibiotik	Osetljivo %	Intermedijerno %	Rezistentno %	Neosetljivo (I+R) %
<b>Penicilin</b>	84	10,2	5,8	16
<b>Amoksicilin</b>	74,5	15,7	9,8	25,5
<b>Cefotaksim</b>	93,5	4,5	2	6,5
<b>Imipenem</b>	97,3	1,95	0,75	2,7
<b>Levofloksacin</b>	99,6	0,4	0	0,4
<b>Moksifloksacin</b>	100	0	0	0
<b>Ofloksacin</b>	68,8	31,2	0	31,2
<b>Sparfloksacin</b>	100	0	0	0
<b>Telitromicin</b>	98,4	1,6	0	1,6
<b>Pristinamicin</b>	100	0	0	0
<b>kvinupristin/dalfopristin</b>	98,8	0,8	0,4	1,2
<b>Linezolid</b>	100	0	0	0
<b>Vankomicin</b>	100	0	0	0
<b>Tetraciklin</b>	18,7	0	81,3	81,3
<b>Hloramfenikol</b>	78,5	0	21,5	21,5
<b>Rifampicin</b>	100	0	0	0
<b>Trimetoprim/sulfametoksazol</b>	25,7	3,9	70,4	74,3

Svi ispitivani sojevi MRSP su bili osetljivi na vankomicin, linezolid, pristinamicin i rifampicin, a najveći broj izolata je pokazivao osetljivost i na imipenem (97,3%), telitromicin (98,4%) i kvinupristin-dalfopristin (98,8%) (tabela 14). Ipak, ne sme se zanemariti činjenica da je u populaciji naših MRSP bilo sojeva sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme, ketolide i streptogramine (grafikon 10).

**Grafikon 10: Antimikrobni profil MRSP sojeva izolovanih u Srbiji**



#### 4.5 Serotipizacija invazivnih sojeva MRSP

Serotipizacija je urađena za sve invazivne sojeve (n=48). Među sojevima pneumokoka rezistentnim na makrolide, izolovanim iz krvi i likvora, je bilo zastupljeno 12 različitih serotipova: 19F, 14, 6A, 23F, 6B, 3, 19A, 8, 12F, 15B, 23A i 31. Najzastupljeni serotipovi su bili 19F (25%) i 14 (23%), koji su bili prisutni kod polovine svih invazivnih izolata, dok su sledeći po učestalosti bili 6A (10,41%) i 23F (8,3%).

Među izolatima dobijenim od dece je bilo prisutno šest različitih serotipova: 19F, 14, 6A, 6B, 23F i 19A. Najzastupljeniji su bili serotipovi 19F i 14, koji su nađeni kod više od polovine pedijatrijskih izolata (56,5%). Sledeći po učestalosti, 6A, 6B i 23F, su bili podjednako zastupljeni - svaki je bio prisutan kod 13,63% izolata. Samo je jedan dečiji soj ispoljio serotip 19A.

Kod odraslih je bila veća distribucija serotipova nego kod dece. Među MRSP je nađeno 11 različitih serotipova: 19F, 14, 3, 6A, 19A, 8, 31, 23A, 12F, 15B i 23F. Najzastupljeniji su takođe bili serotipovi 19F (20%) i 14 (20%). Njihova zastupljenost u celokupnom uzorku dobijenom od odraslih osoba je iznosila 40%. Sledeći po učestalosti su bili serotipovi 3, 6A, 23A i 19A, sa po 2 izolata, dok je ostalih pet serotipova bilo zastupljeno samo sa po jednim izolatom (tabela 15).

**Tabela 15: Zastupljenost serotipova među invazivnim MRSP sojevima, prema uzrastu**

Serotipovi	Deca	Odrasli	Ukupno
<b>3</b>	0	2	2
<b>6A</b>	3	2	5
<b>6B</b>	3	0	3
<b>8</b>	0	1	1
<b>12F</b>	0	1	1
<b>14</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>11</b>
<b>15B</b>	0	1	1
<b>19A</b>	1	2	3
<b>19F</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>12</b>
<b>23A</b>	0	2	2
<b>23F</b>	3	1	4
<b>31</b>	0	1	1
<b>NT</b>	0	2	2
<b>Ukupno</b>	23	25	48

Među izolatima dobijenim iz likvora su dominirali serotipovi 19F, 14 i 23F; iz krvi serotipovi 19F i 14, dok su dva od tri soja iz pleuralnih punktata pripadala serotipu 3 (tabela 16).

**Tabela 16: Zastupljenost serotipova među invazivnim MRSP sojevima prema vrsti materijala**

Serotip	Likvor	Krv	Pleuralni punktat	Ukupno
<b>3</b>	0	0	<b>2</b>	2
<b>6A</b>	2	3	0	5
<b>6B</b>	1	2	0	3
<b>8</b>	0	1	0	1
<b>12F</b>	0	1	0	1
<b>14</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	0	11
<b>15B</b>	0	1	0	1
<b>19A</b>	0	3	0	3
<b>19F</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	0	12
<b>23A</b>	1	1	0	2
<b>23F</b>	<b>4</b>	0	0	4
<b>31</b>	1	0	0	1
<b>Netipibilan</b>	1	0	1	2
<b>Ukupno:</b>	19	26	3	48

Među MRSP sojevima koji su istovremeno bili manje osjetljivi na penicilin su dominirali serotipovi 19F, 14 i 23F. Isti serotipovi su najčešće ispoljavali rezistenciju i na tetraciklin i trimetoprim-sulfametoksazol. Od svih MRSP koji su pripadali serotipu 19F, 58,3% sojeva je bilo neosjetljivo na penicilin, 100% na tetraciklin i 83,3% na trimetoprim-sulfametoksazol. Procenat MRSP sojeva serotipa 14 koji su bili istovremeno rezistentni na penicilin je iznosio 45,45%; 54,5% sojeva ovog tipa je ispoljavalo rezistenciju na tetraciklin, dok je čak 100% bilo rezistentno na trimetoprim-sulfametoksazol.

Sva 4 soja koji su ispoljili serotip 23F su bili multirezistentni, odnosno istovremeno rezistentni na penicilin, tetraciklin i trimetoprim-sulfametoksazol. Sa druge strane, sojevi koji su ispoljili serotip 6A su bili osjetljivi na većinu ispitujućih antibiotika (tabela 17).

**Tabela 17: Rezistencija izolovanih serotipova MRSP na pojedine antibiotike**

Antibiotici		Pen	amoksi	Cefo	imip	oflok	tetra	hlor	tri/sulf
Serotipovi	Ukupno	broj neosetljivih (I+R) izolata							
19F	12	7	6	5	5	1	12	1	10
14	11	5	4	4	3	1	6	2	11
6A	5	2	0	0	0	0	0	0	0
23F	4	4	3	3	0	0	4	3	4
6B	3	2	0	0	0	0	2	2	2
19A	3	1	2	0	0	0	2	0	1
3	2	0	1	0	0	0	1	1	1
23A	2	0	0	0	0	0	2	2	2
8	1	0	0	0	0	0	1	0	0
12F	1	0	0	0	0	0	0	0	0
15B	1	0	0	0	0	0	1	0	0
31	1	0	0	0	0	0	0	0	0

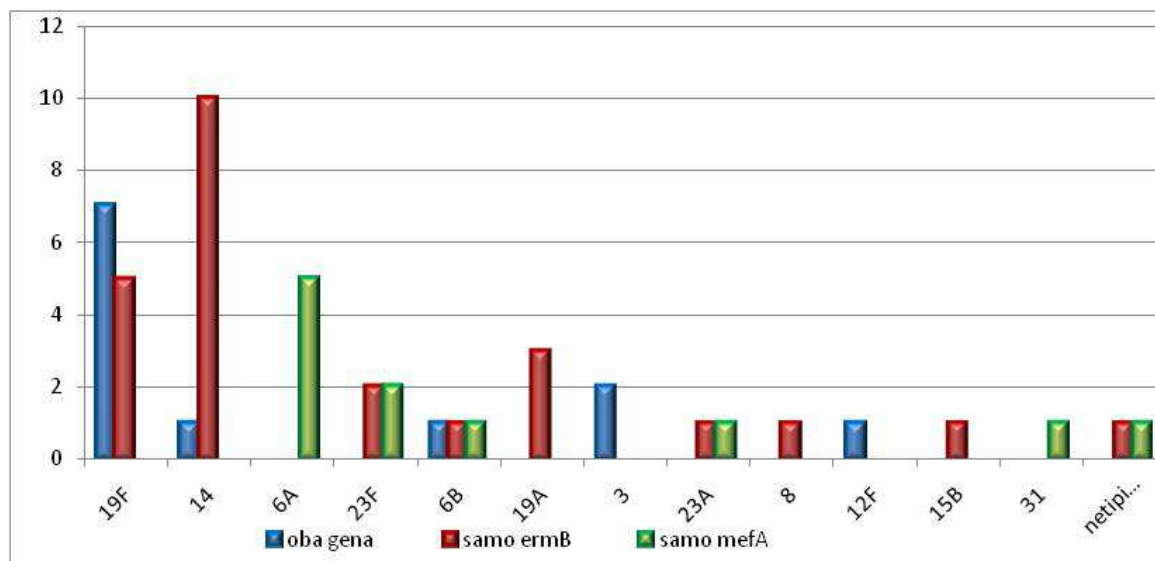
Serotipovi 19F i 14 među su ispoljili isključivo MLS<sub>b</sub> fenotip rezistencije na makrolide, dok su svi serotipovi 6A ispoljili M fenotip. Zastupljenost serotipova među invazivnim MRSP sojevima prema pojedinim fenotipovima je prikazana u tabeli 18.

**Tabela 18: Zastupljenost serotipova invazivnih MRSP sojevima prema fenotipovima**

Fenotipovi		cMLS	iMLS	M
Serotipovi	ukupno	Broj izolata		
19F	12	12	0	0
14	11	10	1	0
6A	5	0	0	5
23F	4	2	0	2
6B	3	2	0	1
19A	3	1	2	0
3	2	1	1	0
23A	2	2	0	0
8	1	1	0	0
12F	1	1	0	0
15B	1	1	0	0
31	1	0	0	1

Kod većine izolata serotipa 19F je dokazano prisustvo oba gena rezistencije. Skoro svi sojevi koji su ispoljili serotipove 14 i 19A su posedovali isključivo *ermB* gen. Sa druge strane, kod svih sojeva serotipa 6A je dokazano prisustvo samo *mefA* gena. Distribucija gena rezistencije u odnosu na serotipove invazivnih izolata je prikazana u grafikonu 11.

**Grafikon 11: Distribucija gena rezistencije u odnosu na serotipove invazivnih MRSP izolata**





## 5 DISKUSIJA

### 5.1 Učestalost rezistencije pneumokoka na makrolidne antibiotike u Srbiji

*Streptococcus pneumoniae* zauzima vodeće mesto među bakterijskim uzročnicima neinvazivnih bolesti respiratornog trakta, ali i teškim, invazivnim bolestima, kao što su sepsa i meningitis. Prepoznat je kao najčešći izazivač vanbolničke pneumonije u svim uzrasnim grupama, a smatra se i primarnim uzročnikom akutnog zapaljenja srednjeg uha, posebno kod male dece. U SAD je oko 31% AOM uzrokovano pneumokokom, a incidenca iznosi 3 100 000 slučajeva godišnje (329). Često se, međutim, nalazi i kod rekurentnih i hroničnih otitisa, obično u kombinaciji sa drugim patogenima. Od 14,5 miliona slučajeva oboljevanja od pneumokoknih bolesti širom sveta, čak 95,6% su pneumonije (2). Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, pneumonija je kod dece, širom sveta, vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta. Svake godine 156 miliona dece oboli od pneumonije, a oko 1,8 miliona dece mlađe od 5 godina i umre (330). Incidencija oboljevanja od pneumokokne pneumonije globalno iznosi 2 228/100 000, a stopa smrtnosti 15% (2). Od približno 4 miliona slučajeva pneumonija u svim uzrasnim grupama, koje se registruju godišnje u SAD, najčešće pneumokokne dovode do hospitalizacije. Pneumokokne bolesti su odgovorne za 445 000 hospitalizacija u SAD na godišnjem nivou (331). Iako znatno ređa, invazivna pneumokokna oboljenja, od kojih su najčešća bakterijemija i meningitis, predstavljaju i dalje veliki medicinski problem. U SAD incidenca meningitisa iznosi oko 2000 slučajeva na godišnjem nivou (332). Stopa mortaliteta je 13,7% (333), a i u slučajevima izlečenja kod 20% do 40% dece ostaju neurološke sekvele (334). U zemljama u kojima je uvedena obavezna vakcinacija protiv pneumokoka je došlo do značajnog pada incidencije pneumokoknih meningitisa i drugih invazivnih bolesti izazvanih ovom bakterijom (335, 336). No, istraživanja govore da u zemljama kao što je naša, *S.pneumoniae* je i dalje vodeći izazivač bakterijskog meningitisa dece (337), s obzirom da se vakcinacija protiv pneumokoka ne sprovodi sistematski, dok je u kalendaru obavezne imunizacije vakcina protiv hemofilusa tipa B.

Antibiotici iz grupe makrolida se širom sveta mnogo koriste u lečenju vanbolničkih infekcija izazvanih pneumokokom. Izrazit porast prevalencije rezistencije pneumokoka na makrolide u većini zemalja je doveo do problema u lečenju pneumokoknih infekcija (338).

U našem ispitivanju smo našli da je ukupna rezistencija pneumokoka na makrolide, u period od 2010-2012. godine u Srbiji iznosila 34%. Ovo se može smatrati visokom prevalencijom na koju su ukazali i drugi autori. Prema podacima koje su objavili Gajić i saradnici, smanjenu osetljivost na makrolide ispoljava 36% invazivnih sojeva pneumokoka u Srbiji (339). Neznatno bolja situacija je zabeležena u zemljama u regionu. U Hrvatskoj je 28,6% izolata pneumokoka rezistentno na makrolide (315, 340, 341). U Sloveniji je učestalost rezistencije među invazivnim sojevima pneumokoka na makrolide 2007. godine iznosila 17%, (342). Prema poslednjim podacima iz 2012. godine, u Sloveniji je 21,2% invazivnih sojeva pneumokoka bilo rezistentno na ove antibiotike (315). I u drugim evropskim zemljama je takođe prisutan visok nivo rezistencije pneumokoka na makrolidne antibiotike. Prema podacima EARS-Net (*engl.* European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) iz 2012. godine, prosečna rezistencija invazivnih sojeva pneumokoka na makrolide u Evropi je iznosila 14,6% a kretala se od 3,5% u Litvaniji do 50% u Malti. U periodu od 2009-2012. godine je značajan porast rezistencije *S.pneumoniae* zabeležen u Danskoj, Litvaniji, Italiji, Španiji i Velikoj Britaniji, dok je signifikantan trend opadanja zabeležen u Finskoj (315). Najniže stope rezistencije pneumokoka na makrolide u Evropi su zabeležene u severnim zemljama (Holandija 4,4%, Švedska 4,9%) a najviše stope su zabeležene u mediteranskom i jugoistočnom regionu (Rumunija 37,2%, Italija 34,2%, Francuska 28,9%).

Pojava rezistencije pneumokoka na makrolide datira od pre četiri decenije. Prvi sojevi MRSP su izolovani u Kanadi, a potom i u Francuskoj 1976. godine (307-309). Međutim nivo rezistencije je ostao nizak (<5%) širom sveta tokom sedamdesetih godina (308). Ranih osamdesetih visoka prevalencija pneumokoka, rezistentnog na eritromicin je detektovana među izolatima kliconoša u Južnoj Africi (63%). Prevalencija rezistencije pneumokoka među invazivnim izolatima je u Južnoj Africi 1983. godine iznosila 8,3% (343). U Francuskoj nije bilo pneumokoka rezistentnih na makrolide pre 1976. godine, da bi taj procenat 1984. godine dostigao 20%, a već sledeće godine 26% (310). U Španiji je zapažen porast rezistencije sa 0% 1979-1980. godine na 9,4% 1990. godine (308). Naime, devedesetih godina dolazi do brzog porasta prevalencije rezistencije na makrolide, što se dovodi u vezu sa povećanom upotrebom, posebno dugodelujućih makrolida kao što su klaritromicin i azitromicin (314, 344-346). U Francuskoj 1994. godine rezistencija pneumokoka na makrolide dostiže čak 40,9% (310), a u

Belgiji raste sa 11,5% koliko je iznosila 1988. na 31% 1998. godine (347). Interesantno je da su se u nekim zemljama smenjivali trendovi porasta i padova rezistencije pneumokoka na makrolide. Tako je npr. u Portugalu u periodu od 1994. do 1998. godine neosetljivost na eritromicin bila 7,1%, da bi potom porasla na 18,2% tokom narednih godina (2002-2004.god). Nakon toga je u Portugalu zabeležen trend opadanja na 14,9% 2011. godine (348, 349) a zatim opet porast na 18,5% 2012.godine (315). U periodu od 1979-1984. godine u SAD rezistencija *S.pneumoniae* na eritromicin se kretala od 0,3% do 6,3% (350). Trend porasta rezistencije je zabeležen i u drugim delovima sveta, kao što su Južna Afrika i Kanada (300, 351-354).

Na brz porast prevalencije makrolidne rezistencije pneumokoka 90-tih godina širom sveta su ukazale brojne globalne studije.

Aleksandar projekat (*engl.* Alexander Project) je sproveden u periodu od 1992-2000.godine, sa ciljem da se ispita antimikrobna osetljivost najčešćih uzročnika infekcija respiratornog trakta, stečenih u vanbolničkoj sredini (*engl.* Community-acquired respiratory tract infections, CARTI) kod odraslih osoba. Rezultati ovog projekta su pokazali da je globalni nivo rezistencije invazivnih i neinvazivnih sojeva pneumokoka na makrolide bio u rasponu od 16,5-21,9% tokom 1996-1997.godine, sa tendencijom rasta u narednom periodu – od 1998. do 2000. godine, na 24,6% (354). Rezultati su pokazali kontinuirani porast i geografske varijacije kada je u pitanju antimikrobna rezistencija, i ukazali na potrebu za prepisivanjem adekvatne antibiotske terapije, bazirane na lokalnim podacima o rezistenciji.

U SAD je od 2001-2004. godine sprovedena prospektivna, longitudinalna studija ispitivanja antimikrobne osetljivosti respiratornih patogena, pod nazivom PROTEKT US (*engl.* Prospective Resistant Organism Tracking and Epidemiology for the Ketolide Telithromycin in the United States). Studija je dala podatke o prevalenciji rezistencije na makrolide i mehanizmima rezistencije među izolatima pneumokoka, kao i o aktivnosti telitromicina (355). U drugoj godini ove studije (2001-2002.god) rezistencija pneumokoka je iznosila 27,9% sa velikim varijacijama među regionima (najviša vrednost 48,2%, a najniža vrednost 15,2%). U periodu od 2001-2003. godine rezistencija na eritromicin je iznosila 31%, da bi u periodu od 2003-2004. godine neznatno porasla na 37,2% (356). Dalja ispitivanja su pokazala da se u SAD rezistencija pneumokoka na makrolide održavala na nivou od 30%, koliko je iznosila 2004-2005. godine, do 35 % tokom 2005-2006. godine (357-360). Bila je veća u jugoistočnom delu SAD (40%,) dok je

na jugozapadu i severozapadu rezistencija iznosila oko 25% (345, 360, 361). Prema rezultatima prve tri godine (2008-2010.god) programa AWARE (*engl.* Assessing Worldwide Antimicrobial Resistance Evaluation), rezistencija pneumokoka na eritromicin u SAD je iznosila 39,2% (362). Podaci iz SENTRY (*engl.* Antimicrobial Surveillance Program) studije za nadzor nad rezistencijom bakterija na antimikrobne preparate su pokazali da je rezistencija pneumokoka na makrolide u SAD u 2011. godini dostigla 44,8% (363).

Nivo rezistencije pneumokoka na makrolide u Kanadi je niži nego u Americi. Međutim, i u Kanadi je zabeležen značajan porast rezistencije pneumokoka na makrolide, što su pokazali rezultati dve studije. Studija CROSS (*engl.* Canadian Respiratory Organism Susceptibility Study) je sprovedena u periodu 1998-2006. godine, a nakon toga studija CANWARD (*engl.* Canadian Ward Surveillance Study) koja je sprovedena od januara 2007. do decembra 2008.godine. Rezultati su pokazali porast rezistencije sa 8%, koliko je iznosila 1998. godine na 22%, koliko je zabeleženo 2008. godine (364-366).

Slična situacija je prisutna i u zemljama Latinske Amerike. U Argentini u periodu 2009-2010. godina rezistencija sojeva pneumokoka izolovanih od dece sa prvom epizodom AOM je iznosila 20,6% (367). U Brazilu je u periodu 2004-2005. godina prevalencija MRSP iznosila 15% (368). Znatno viša prevalencija rezistencije pneumokoka od 43% je prisutna u Meksiku (369).

Armed projekat (*engl.* The Antibiotic Resistance Surveillance & Control in the Mediterranean Region) je obuhvatio zemlje mediteranskog regiona u periodu od 2003-2005. godine. Rezultati su pokazali visok nivo rezistencije na makrolide. Najviša prevalencija rezistencije je bila zabeležena na Malti 46%, Tunisu 39% i u Turskoj 10% (370).

Prema podacima multicentrične studije za praćenje antimikrobne rezistencije u Australiji, pod nazivom AGAR (*engl.* The Australian Group on Antimicrobial Resistance), tokom 2007. godine rezistencija na makrolide među invazivnim izolatima je iznosila 13,9% a među neinvazivnim izolatima 21,7% (371).

Podaci sa Bliskog istoka pokazuju regionalne varijacije. U Iranu je tokom 2010-2011. godine prevalencija MRSP bila visoka i iznosila 54% (372), dok je u Libanu 2008. godine iznosila 33,4% (373). Na afričkom kontinentu, u Alžiru je u periodu od 2005-2011. godine prevalencija MRSP među invazivnim izolatima bila 22% (374).

Sa druge strane, zemlje Dalekog Istoka su poznate po izuzetno visokoj rezistenciji pneumokoka na eritromicin u Aziji. Prema podacima azijske ANSORP studije (*engl.* Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens), koja je ispitivala antimikrobnu osetljivost rezistentnih patogena tokom 2008-2009. godine, prosečna prevalencija rezistencije pneumokoka na makrolide u Aziji je iznosila 72,7%. Najviša prevalencija od 96,4% je zabeležena u Kini, 84,9% na Tajvanu i 80,7% u Vijetnamu (375). Sa druge strane, u Rusiji je znatno bolja situacija. Prema najnovijim podacima (2009-2013.god) među neinvazivnim dečijim izolatima rezistencija pneumokoka na makrolide u Rusiji iznosi 26% (376).

U zaključku se može reći da naši rezultati pokazuju da, u evropskim uslovima, Srbija, slično susednim državama, pripada zemljama sa visokom prevalencijom rezistencije pneumokoka na makrolide. Međutim, globalno posmatrano, u odnosu na azijske zemlje, Srbija pokazuje srednje visoku prevalenciju rezistencije pneumokoka na makrolide. Tako da možemo reći da se u Srbiji makrolidi još uvek mogu obazrivo koristiti u lečenju pneumokoknih infekcija, u zavisnosti od rezultata testa osetljivosti.

U našoj studiji smo zapazili da su neinvazivni sojevi bili rezistentniji na makrolide u odnosu na invazivne. Među sojevima izolovanih iz gornjih delova respiratornog trakta rezistencija je iznosila 35,5%, dok je 27,4% sojeva izolovanih iz krvi i likvora bilo neosetljivo na makrolide. Viši nivo rezistencije pneumokoka na makrolide među neinvazivnim izolatima su opisali i drugi autori. Istraživanje sprovedeno u Kanadi je pokazalo razliku u rezistenciji, sa značajno višim nivoom rezistencije među neinvazivnim izolatima (22,4%) u odnosu na invazivne (14,6%) (264). U našoj studiji smo takođe zapazili da su pedijatrijski sojevi bili rezistentniji na makrolide (36%) u odnosu na sojeve dobijene od odraslih pacijenata (29%). I istraživanje sprovedeno u Portugalu je pokazalo da se sojevi pneumokoka rezistentni na eritromicin i klindamicin najčešće izoluju u dečijem uzrastu (348). Slovenački autori su takođe pokazali da je viši nivo rezistencije (17%) prisutan među pedijatrijskim izolatima (342). To su potvrdili i rezultati ANSORP studije u Aziji. Oni su našli da je rezistencija na eritromicin značajno češće zastupljena među sojevima dobijenim od dece mlađe od 5 godina (44,8%) u odnosu na starije od 65 godina (21,5%). Među pedijatrijskim pacijentima mlađim od 5 godina u Pekingu, tokom 2010. godine, prevalencija MRSP je iznosila 96,4% (377). Rezultati studije sprovedene u Japanu, takođe, pokazuju da je

rezistencija češće zastupljena kod dece mlađe od 2 godine, kao i da je nivo rezistencije vrlo visok. Naime, polovina izolata pneumokoka je imala MIK eritromicina veći od 16 µg/ml (378).

Jedan od najznačajnijih faktora koji doprinose nastanku i širenju rezistencije pneumokoka na makrolide je njihova preterana i neadekvatna upotreba (379, 380). Naime, prekomerna i nekritična upotreba antibiotika dovodi do selektivnog pritiska i stvaranja rezistencije bakterija na različite klase antibiotika (381). Drugi faktori rizika za sticanje infekcije rezistentnim sojem pneumokoka su uzrast pacijenta, ranija upotreba makrolida i istovremeno postojanje hroničnih i teških bolesti (382). Makrolidi su antibiotici, koji su često korišćeni u ambulantnim uslovima, posebno za lečenje infekcija disajnih puteva. Prekomerna upotreba ovih antibiotika je upravo najraširenija u dečijoj populaciji, budući da su pneumokokne i uopšte respiratorne infekcije najzastupljenije u toj uzrasnoj grupi. Naročito se kao uzrok porasta rezistencije pneumokoka navodi nekritična upotreba dugodelujućih makrolida, kao što je azitromicin (338, 383). Analize potrošnje antibiotika pokazuju da su 2001. godine u 22 evropske zemlje makrolidi činili 15% od ukupne količine potrošenih antibiotika (384). Slovenija je 1998. godine u grupi od 17 evropskih zemalja, zauzimala vodeće mesto po korišćenju makrolida sa dugim dejstvom (azitromicin) (385). Mnoge studije su pokazale povezanost između prekomerne upotrebe makrolida i razvoja rezistencije pneumokoka (177, 306, 386-388). U Portugalu je porast prevalencije MRSP u periodu od 1994-2002. godine povezan sa povećanom upotrebom azitromicina u tom periodu (383). S druge strane, na Islandu je, nakon smanjenja upotrebe makrolida i trimetoprim-sulfametoksazola za 30%, došlo i do smanjenja incidencije PNSP sa 20% na 13% u četvorogodišnjem periodu (389). U Kanadi je u period od 1995-2002. godine sprovedena prospektivna kohort studija na 3339 pacijenata sa invazivnim pneumokoknim infekcijama koja je ukazala na moguće faktore rizika za sticanje pneumokoka rezistentnog na makrolide (390). Faktori rizika uključuju raniju upotrebu azitromicina, klaritromicina, penicilina i trimetoprim-sulfametoksazola. Istraživanje kojim su obuhvaćeni bolesnici sa pneumokoknom bakterijemijom je pokazalo da je kod 24% pacijenata koji su uzimali makrolide, izolovan MRSP, dok je kod pacijenata koji nisu uzimali makrolide izolovan soj pneumokoka, koji je bio osetljiv (391). Opisani su i smrtni slučajevi pneumokokne pneumonije nastali kao posledica rezistencije na makrolide i monoterapije azitromicinom (392). Međutim, da se za razvoj rezistencije pneumokoka na makrolide ne može okriviti samo preterana potrošnja ovih antibiotika, ukazuje

primer Slovenije, u kojoj je, i pored smanjenja upotrebe makrolida u periodu između 1999-2007. godine za 36%, došlo do porasta rezistencije pneumokoka na ove antibiotike sa 4,7% na 16,8% (342). Očigledno je da na trendove izmene rezistencije *S.pneumoniae* na makrolide, pored povećane upotrebe ovih lekova, utiču i druge pojave, npr. propagacija rezistentnih klonova i serotipova pneumokoka. Klonalna diseminacija MRSP u sredinama kao što su bolnice, zatvori i drugi kolektivi, je jedan od glavnih faktora koji doprinose širenju rezistencije pneumokoka na makrolide. Ukupna populacija rezistentnog pneumokoka se povećala sa dominacijom malog broja klonova uspešnih u preživljavanju (393). Razumevanje genske osnove rezistencije pomenutih klonova, sticanja i širenja rezistencije, može doprineti stvaranju strategije za smanjenje transmisije multirezistentnih pneumokoka.

Do 2010. godine pacijenti u Srbiji su mogli da kupuju antibiotike u apotekama bez lekarskog recepta. U periodu od 1998-2008. godine dnevno definisana doza makrolida na 1000 stanovnika (DDD/1000 stanovnika) je u Srbiji porasla sa 1,3 na 5,8 (394). DDD/1000 stanovnika na dan je 2009. godine iznosila 4,42255 a 2011. godine je porasla na 4,76563 (395). Ovakav porast i nekritična potrošnja su posledica uvođenja novijih makrolida kao što su azitromicin i klaritromicin, koji se bolje podnose i imaju komforniju, jednodnevnu administraciju. Iako ima brojne prednosti u odnosu na eritromicin, zbog dugog poluvremena eliminacije, rizik od nastanka rezistencije i ukrštene rezistencije na druge makrolide se povećava 2,7 puta. Kao posledica toga selektuju se rezistentni sojevi (396). U Australiji su objavljeni radovi koji ukazuju da je prekomerna upotreba azitromicina u cilju eradikacije trahoma povezana sa selekcijom sojeva pneumokoka rezistentnih na makrolide izolovanih iz nazofarinksa (397) i iz brisa konjunktive (398).

Dakle, incidencija rezistencije pneumokoka na makrolide je veoma dinamična pojava. Zbog toga je neophodno praćenje incidencije MRSP u Srbiji da bi se ustanovilo da li je došlo do promene učestalosti rezistencije pneumokoka na makrolide. Jedino se, na taj način može proceniti efekat novosprovedenih mera kontrole propisivanja antibiotika i njihove kupovine.

## 5.2 Fenotipovi i genotipovi rezistencije na makrolide sojeva *S. pneumoniae*

Poznato je da je rezistencija pneumokoka na makrolide najčešće posredovana putem dva glavna mehanizma, modifikacijom ciljnog mesta delovanja leka i/ili aktivnim efluksom leka (399). Navedeni mehanizmi rezistencije uzrokuju ispoljavanje različitih fenotipova rezistencije. Postoje razlike u geografskoj distribuciji mehanizama rezistencije, odnosno MLS<sub>b</sub> i M fenotipova rezistencije pneumokoka (400).

Mi smo u našem istraživanju ustanovili da među sojevima pneumokoka rezistentnim na makrolide, izlovanim tokom trogodišnjeg (januar 2010-decembar 2012.god) perioda u Srbiji, dominira konstitutivni MLS<sub>b</sub> fenotip. Skoro 80% naših izolata pneumokoka je ekspiriralo MLS<sub>b</sub> fenotip, odnosno ukrštenu rezistenciju na makrolide, linkozamide i streptogramine. Ovi sojevi pokazuju visok stepen rezistencije na makrolide, sa vrednostima MIK eritromicina i klindamicina iznad 256 µg/ml (401). Slične rezultate su, u skorašnjoj prošlosti, objavili i italijanski autori, sa podacima da je 76,5% MRSP izolata sakupljenih u periodu od 1998-2000. godine ispoljilo cMLS fenotip (320). Primenom testa dvostruke difuzije, ustanovili smo da je među sojevima sa MLS rezistentncijom, 4,6% ispoljio inducibilnu rezistenciju. Kod inducibilnog MLS fenotipa vrednosti MIK klindamicina su bile niske (MIK<sub>50</sub>=0,5 µg/ml), dok je MIK eritromicina iznosio ≥ 256 µg/ml. U ovom istraživanju smo koristili test dvostruke disk difuzije, koji CLSI standard preporučuje kod beta hemolitičkih streptokoka, ali ne daje smernice za pneumokok. Ipak, ovaj test je preporučen od strane EUCAST za detekciju inducibilne rezistencije na klindamicin, koji se opisuje kao test antagonizma aktivnosti klindamicina, posredovanog eritromicinom. Visoku osetljivost (98,5%) ovog testa u detekciji inducibilne MLS rezistencije kod pneumokoka su potvrdili i Jorgensen i saradnici, koji su uporedno ispitali test dvostruke difuzije, eritromicin – klindamicin bujonski test i PCR za detekciju *ermB* gena (402). Ovi autori ukazuju na značaj primene testa dvostruke difuzije, kojim bi se ispitala inducibilna rezistencija na klindamicin, s obzirom da je, kod sojeva sa iMLS, opisan razvoj konstitutivne rezistencije, tokom davanja klindamicina. Klindamicin se, u indikovanim slučajevima, koristi u lečenju pneumokoknih infekcija, posebno kod osoba alergičnih na penicilin, npr. kao druga ili treća linija za terapiju infekcija kostiju i zglobova, akutnog otitisa i sinusitisa, izazavnih ovom



bakterijom, a u kombinaciji sa rifampicinom, i kao profilaktička terapija za prevenciju pneumokoknog meningitsa u slučaju epidemija (402).

MLS<sub>b</sub> fenotip rezistencije pneumokoka na makrolide je dominantan i u Južnoafričkoj Republici, kao i u većini evropskih zemalja, kao što su Španija, Italija i Belgija (293, 403-407). U Belgiji je cMLS<sub>b</sub> zastupljen sa 63,6%, iMLS<sub>b</sub> sa 27,7% a M fenotip kod svega 9,1% (404). U Portugalu je među invazivnim MRSP izolatima MLS<sub>b</sub> fenotip zastupljen kod 67,4%, dok 32,6% sojeva ispoljava M fenotip (348). U Sloveniji u periodu od 1998-2007. godine 59% invazivnih izolata je ispoljilo cMLS<sub>b</sub> fenotip, nijedan soj nije imao iMLS<sub>b</sub>, a 41% izolata je pripadalo M fenotipu (342). U zemljama Dalekog istoka je takođe dominantan MLS<sub>b</sub> fenotip. U Kini je MLS<sub>b</sub> fenotip zastupljen kod 89,2% sojeva, od čega cMLS<sub>b</sub> kod 85,1% a inducibilni MLS<sub>b</sub> kod 4,1% sojeva, dok je M fenotip zastupljen kod svega 10,8% sojeva (408). U Alžiru svi MRSP sojevi pripadaju MLS<sub>b</sub> (374). U Meksiku dve trećine MRSP sojeva ispoljava MLS<sub>b</sub> fenotip (409). U Australiji takođe dominira MLS<sub>b</sub>, koji je zastupljen kod 72,9% sojeva MRSP (371).

M fenotip rezistencije je kod naših sojeva pneumokoka bio znatno manje zastupljen (21,5%) u odnosu na MLS<sub>b</sub> fenotip. Sojevi sa M fenotipom su umereno rezistentni na eritromicin i druge 14-člane i 15-člane makrolide a osetljivi na 16-člane makrolide, linkozamide i streptogramine (237, 353). Vrednosti MIK eritromicina kod sojeva sa M fenotipom se kreću od 4 do 32 µg/ml (239, 246). Kod naših MRSP sojeva sa M fenotipom, vrednost MIK<sub>50</sub> eritromicina je iznosila 4 µg/ml, dok je vrednosti MIK<sub>50</sub> klindamicina bila u kategoriji osetljivih, što odgovara podacima iz literature (320). M fenotip je dominantno zastupljen u SAD i Kanadi, sa prevalencijom koja se kreće od 41% do 85% (240, 398, 352). U Argentini čak 76,9% sojeva ispoljava M fenotip (367). M fenotip je takođe dominantan u nekim evropskim zemljama kao što su Velika Britanija (327), Norveška (355) i Nemačka (410). U Nemačkoj je devedesetih godina došlo do promene dominacije fenotipa. Naime, od 1992-1995. godine je dominirao MLS<sub>b</sub> fenotip, da bi od 1996.godine M fenotip postao zastupljeniji (321). U Grčkoj je M fenotip zastupljen kod 52,6% sojeva, cMLS kod 28,9% a iMLS kod 18,4% sojeva pneumokoka (411).

Dobijeni rezultati ukazuju da se kod MRSP sojeva izolovanih u našoj sredini, ne bi mogla primenjivati empirijska terapija sa 14, 15 i 16-članim makrolidima, linkozamidima i streptograminima. Nekoliko studija je pokazalo povezanost rezistencije na makrolide sa

terapijskim neuspehom. Sprovedena je studija koja je obuhvatila pacijente sa pneumokoknom infekcijom, praćenom bakterijemijom, koji su lečeni makrolidima, u 4 bolnice u Španiji, tokom 1989-2000. godine. Rezultati su pokazali da se češće razvija pneumokokna bakterijemija prilikom terapije makrolidima među pacijentima kod kojih je izolovan pneumokok rezistentan na makrolide, te da je rezistencija na makrolide detektovana *in vitro*, klinički relevantna (412). To je argument koji govori protiv empirijske upotrebe makrolida u terapiji pneumokokne pneumonije u zemljama sa visokom rezistencijom na makrolide (413).

U osnovi rezistencije pneumokoka na makrolide postoje tri različita genotipa: *mefA*, *ermB* i kombinovani *ermB* i *mefA* genotip. Dok se *mefA* genotip fenotipski ispoljava kao tzv.M fenotip, dotle je *ermB*, kao i kombinovani *ermB* i *mefA* genotip ekspimiran kao MLS fenotip. Kao i kod fenotipova, prevalencija genotipova *ermB* i *mefA* koji kodiraju rezistenciju pneumokoka na makrolide značajno varira među državama. U našem istraživanju je analiza gena rezistencije pokazala da je *ermB* gen, koji kodira metilaciju 23S rRNK prisutan kod većine (78,5%) sojeva. Ustanovljeno je da kod naših MRSP sojeva postoji visoko statistički značajna povezanost između genotipova i fenotipova rezistencije na makrolide. Naime, kod svih naših sojeva sa MLS<sub>b</sub> fenotipom je dokazano prisustvo *ermB* gena, što je u skladu sa podacima iz literature (320, 414). Istovremeno, svi naši sojevi sa M fenotipom poseduju *mefA* gen, što se, takođe, podudara sa literaturnim podacima (320, 414). Vrednost MIK<sub>50</sub> eritromicina kod MLS/*ermB* pozitivnih izolata je bila MIK<sub>50</sub> ≥ 256 µg/ml, dok je kod M/*mefA* sojeva znatno niža – 4 µg/ml. Očekivano, i vrednosti MIK<sub>90</sub> eritromicina, odnosno vrednosti MIK eritromicina koje su zabeležene kod 90% ispitivanih sojeva su bile znatno veće kod MLS/*ermB* (≥ 256 µg/ml) u odnosu na M/*mefA* (12 µg/ml) izolate pneumokoka. Slične rezultate su dobili i drugi istraživači (408). Slovenački autori su objavili da su vrednosti MIK<sub>50</sub> eritromicina kod *ermB* pozitivnih izolata pneumokoka ≥ 256 µg/ml, dok su se kod *mefA* pozitivnih izolata ove vrednosti kretale od 2 do 32 µg/ml (342). *ErmB* gen je najraširenija determinanta makrolidne rezistencije kod pneumokoka širom sveta (222, 314). U Evropi je visoka prevalencija *ermB* gena prisutna u Belgiji (91%), Francuskoj (90%), Mađarskoj (82%), Poljskoj (80%), dok je u Sloveniji i Italiji oko 55%. U Španiji je takođe dominantan gen rezistencije *ermB*, koji je prisutan kod 74,3% MRSP sojeva, dok je prisustvo samo *mefA* gena detektovano kod 7,7% MRSP sojeva (414). U Bugarskoj je *ermB* gen prisutan kod 56,7% rezistentnih sojeva (415). U Rusiji je *ermB* gen zastupljen kod 54% MRSP,

dok 13% sojeva nosi samo *mefA* gen rezistencije (376). U pojedinim latinoameričkim zemljama, kao što je Brazil, takođe dominira *ermB* gen (368). U nekim azijskim zemljama, kao što je Liban, *ermB* gen je prisutan kod čak 85,3% sojeva pneumokoka rezistentnog na makrolide (373). Visoka prevalencija *ermB* gena se sreće i u zemljama Dalekog istoka. Prema podacima ANSORP studije, u azijskim zemljama 49,2% MRSP nose samo *ermB* gen, 19,6% sojeva poseduje samo *mefA* gen, dok 29,6% sojeva ima oba gena rezistencije. Visok procenat izolata koji nose samo *ermB* gen je prisutan u Šri Lanki (73,3%), Japanu (63,3%) i Vijetnamu (56,9%).

*MefA* gen, koji kodira aktivni efluks leka (240) je prevalentna determinanta makrolidne rezistencije u SAD (66%), Kanadi (51%) (364), Nemačkoj (63,5%), ali i u Grčkoj, Finskoj, Irskoj i Velikoj Britaniji (416, 321). Veoma visok procenat sojeva koji nose *mefA* gen je prisutan u Indiji (75%) (417). Zapaženo je, međutim, da je MIK eritromicina kod sojeva koji poseduju *mefA* gen poslednjih godina u porastu širom sveta, što se dovodi u vezu sa povećanom upotrebom makrolida.

Sojevi pneumokoka mogu da sadrže i oba gena rezistencije istovremeno, i *ermB* i *mefA*. U našem istraživanju dvojni mehanizmi rezistencije su detektovani kod čak 43,9% sojeva rezistentnih na makrolide, što ukazuje na visoku prevalenciju sojeva sa dualnim genotipom rezistencije u Srbiji. Svi sojevi kod kojih je detektovano prisustvo oba gena rezistencije su ispoljili MLS<sub>b</sub> fenotip, što se slaže sa podacima iz literature (246, 414, 418). Poslednjih godina broj sojeva koji nose oba gena rezistencije je u porastu širom sveta. U SAD je u razdoblju od 1996-1997. godine prevalencija takvih sojeva iznosila 7% (419). Na veliki značaj dualnog genotipa kod MRSP je ukazano 1999. godine u Južnoj Africi, gde je dokazano da čak 31% pneumokoka rezistentnih na makrolide nosi oba gena rezistencije (406). Globalna prevalencija ovakvih sojeva se skoro udvostručila u petogodišnjem periodu, sa 7% koliko je iznosila 1999. godine (416) je dostigla 12% 2004. godine (420). U Španiji je istovremeno prisustvo *ermB* i *mefA* gena dokazano kod 17,9% izolata (414). Zemlje sa visokom prevalencijom dvojnih mehanizama rezistencije na makrolide kod pneumokoka su Južnoafrička Republika, Rusija (31%) i Australija (222, 376). Prema podacima ANSORP studije, porast prevalencije sojeva pneumokoka koji ekspimiraju oba gena rezistencije je posebno izražen u azijskim zemljama. Tako je npr. u Hong Kongu, prevalencija ovih sojeva porasla sa 8,9%, koliko je iznosila 2000-2001. godine, na 26,4% tokom 2008-2009. godine. Na Tajvanu 2000-2001. godine nije bilo

sojeva sa oba gena rezistencije, da bi tokom 2008-2009. godine njihova prevalencija dostigla 21,4%. U Koreji je u istom periodu zabeležen porast sa 38,6% na 43,3% (375, 421). Na Novom Zelandu 62,1% izolata nosi oba gena rezistencija (418). U SAD je zabeležen porast prevalencije izolata sa dvojnim mehanizmima rezistencije sa 9,7% tokom 2000-2001. godine na 16,4% tokom 2002-2003. godine (422). Danas, čak četvrtina izolata u SAD nose oba gena (360). Većina sojeva koji nose oba gena rezistencije ispoljava multirezistentni fenotip i klonalno su povezani te je njihovo širenje zabrinjavajuće (356, 406). Naime većina sojeva sa dvojnim mehanizmima rezistencije pripada klonalnom kompleksu Taiwan<sup>19F-14</sup>, koji je globalno rasprostranjen (222, 356, 358, 406). Zabrinjavajuća je i činjenica da se ovakvi sojevi češće izoluju kod dece uzrasta do 2 godine, što povećava rizik od terapijskog neuspeha u toj uzrasnoj grupi. Zemlje kod kojih, za sada, nisu detektovani sojevi koji nose oba gena rezistencije su Belgija, Švedska, Francuska i Argentina (356). Efikasan horizontalni transfer *ermB* ili *mefA* gena rezistencije među sojevima pneumokoka može doprineti održavanju visokog nivoa rezistencije na makrolide.

Kod svih sojeva MRSP iz naše kolekcije je dokazano prisustvo jednog ili oba gena rezistencije. Iako nije ispitano prisustvo ribozomalnih mutacija, fenotipske karakteristike sugerišu da one nisu prisutne. U razdoblju od 2001-2003. godine prema podacima evropske multicentrične studije "PneumoWorld Study", prevalencija ribozomalnih mutacija među izolatima pneumokoka rezistentnim na makrolide je iznosila svega 1% (423). Studija je obuhvatila osam zemalja, a imala je za cilj da ispita osetljivost sojeva pneumokoka iz Latinske Amerike i Evrope. Početkom dvehiljaditih je zastupljenost ribozomalnih mutacija među MRSP u Holandiji iznosila 5% (424) a u Belgiji 0,4% (425). Istraživanje sprovedeno tokom 1999-2000. godine u 10 zemalja centrale i istočne Evrope (Poljska, Litvanija, Slovenija, Mađarska, Latvija, Rumunija, Bugarska, Hrvatska, Slovačka i Češka Republika) su dala podatak da oko 15% eritromicin-rezistentnih izolata nose mutacije na ribozomalnom proteinu L4 (254). U SAD su tokom 1999-2000.godine ribozomalne mutacije bile zastupljene kod 6,5% (251) MRSP. Rezultati CROSS studije su pokazali da su u Kanadi u periodu od 1998-2004.god ribozomalne mutacije nađene kod 4% izolata (426).

### 5.3 Osetljivost MRSP sojeva na penicilin

Od samog uvođenja u terapiju 1940. godine, penicilin G je bio lek izbora u lečenju pneumokoknih infekcija (311). Već tada je primećena pojava rezistencije na penicilin među laboratorijskim mutantima pneumokoka (308). Tek se 20 godina kasnije javljaju prvi klinički sojevi pneumokoka kod kojih se zapaža porast vrednosti MIK penicilina, u Bostonu, SAD (427). Prvi penicilin neosetljivi soj pneumokoka je izolovan 1967. godine u Australiji (218, 312). Nakon toga dolazi do pojave rezistencije pneumokoka na penicilin u mnogim delovima sveta. U SAD prvi PNSP je izolovan 1974. godine (428).

Interesantno je da su prvi sojevi pneumokoka rezistentni na penicilin, ali i druge antibiotike, u to vreme izolovani i u našoj zemlji. Već je 1977. godine u Beogradu kod pedijatrijskih pacijenata je izolovano 38 invazivnih i neinvazivnih sojeva pneumokoka koji su istovremeno bili rezistentni na penicilin, eritromicin i linkomicin, ali osetljivi na hloramfenikol (429). Autorke Mraović M. i Laban J. su pokazale da je vrednost MIK penicilina kod većine sojeva bila visoka i iznosila je do 4 µg/ml (429). Krajem osamdesetih godina prošlog veka je u Beogradu kod deteta obolelog od bakterijskog meningitisa izolovan soj pneumokoka serotipa 23F, koji je bio rezistentna na penicilin i hloramfenikol (430). Početkom 1990-tih su Opavski i saradnici ukazali na visok procenat sojeva pneumokoka koji su ispoljavali smanjenu osetljivost na penicilin (40%) u Srbiji (431). Sojevi su pokazivali vrednost MIK<sub>50</sub> penicilina od 0,25 µg/ml. Istraživanja sprovedena u Srbiji sredinom devedesetih su pokazala da kod pneumokoka dolazi do porasta rezistencije na penicilin. Naime, rezultati istraživanja sprovedenog na Vojno medicinskoj akademiji u Beogradu među 114 sojeva pneumokoka, izolovanih pretežno od odraslih osoba, su pokazali da je 44% sojeva imalo smanjenu osetljivost na penicilin, od čega je 11% sojeva imalo vrednostima MIK penicilina preko 1,5 µg/ml (432). U periodu 1999-2003. godine i 2005-2006. godine u Zavodu za zdravstvenu zaštitu u Nišu je ispitano 523 izolata pneumokoka, različitog porekla, većinom izolovanih od dece mlađe od 15 godina. U prvom ispitujućem periodu je prevalencija PNSP iznosila 68% (21% R , 47% I), a u drugom periodu čak 79% (27% R , 52% I) (433).

Sedamdesetih i osamdesetih godina prevalencija rezistencije *S.pneumoniae* na penicilin prelazi 10% u mnogim delovima sveta, uključujući Španiju, SAD, Novu Gvineju, Južnu Afriku, Izrael i

Poljsku (313). To je vodilo ozbiljnim terapijskim problemima, naročito u lečenju pneumokoknog meningitisa.

Devedesetih godina neosetljivost pneumokoka na penicilin je, na globalnom nivou, dostigla 37%, od čega je 23% sojeva bilo potpuno rezistentno (314). Aleksandar projekat je pokazao porast rezistencije na penicilin u mnogim delovima sveta. U SAD u desetogodišnjem periodu (1992-2001.god) 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% (354). U periodu od 2001-2004. godine najviša prevalencija PNSP je zabežena na Dalekom istoku i Južnoafričkoj Republici sa vrednostima preko 70% (314).

Nakon uvođenja konjugovane pneumokokne vakcine početkom dvehiljadite 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 (356).

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 zabeležen u periodu 2005-2008. godine, što je povezano sa uvođenjem PCV7 vakcine za decu (434).

Podaci ABCs programa (*engl.* The Active Bacterial Core Surveillance) ukazuju da je u SAD 2007. godine neosetljivost *S.pneumoniae* na penicilin iznosila 25,6%, da bi 2008. godine pala na 24,8% a već 2010. godine na 10,6% (329).

Na izveštavanje o osetljivosti pneumokoka na penicilin su uticale promene u graničnim vrednostima. Prema starim graničnim vrednostima, soj pneumokoka se smatrao osetljivim ukoliko mu je vrednost MIK penicilina iznosila  $\leq 0,06 \mu\text{g/ml}$ , bez obzira na vrstu materijala iz kojeg je soj izolovan i način davanja leka. Uprkos porastu rezistencije pneumokoka na penicilin u mnogim delovima sveta, zapažen je nedostatak korelacije između rezistencije *in vitro* sa kliničkim odgovorom kod ne-meningealnih pneumokoknih infekcija (435). Zbog toga je CLSI 2008.godine objavio nove granične vrednosti koje definišu kategoriju osetljivosti pneumokoka na penicilin. Stare granične vrednosti za penicilin su bile bazirane na koncentraciji leka koja se

postiče u cerebrospinalnoj tečnosti tokom lečenja meningitisa. Međutim, nivo penicilina u likvoru predstavlja malu frakciju njegovog nivoa u plazmi ili u alveolama. Soj pneumokoka koji je rezistentan na nivo leka dostignut u likvoru, može biti osetljiv kada su u pitanju pneumonije, otitisi ili sinuzitisi (436). Nove granične vrednosti su rezultat nagomilanih dokaza o uspešnom lečenju pneumokoknih infekcija penicilinom kod izolata koji su imali smanjenu osetljivost *in vitro* (437). Prema novim preporukama, prilikom parenteralne primene penicilina, postoje razlike između graničnih vrednosti u zavisnosti da li se radi o izolatima pneumokoka iz likvora, izazivačima meningitisa ili iz drugih regija, kada je *S.pneumoniae* uzočnik infekcija tih organa. Kod tih, tzv “ne-meningealnih izolata” pneumokoka, granične vrednosti MIK penicilina su u vezi sa dozom antibiotika. Prema revidiranim kriterijumima, soj se smatra osetljivim ako mu je vrednost MIK penicilina  $\leq 2 \mu\text{g/ml}$  (daje se doza od 2 mil IU/4h tj. 12 mil. IU/dnevno). Kod umereno osetljivih izolata, kada je MIK=4  $\mu\text{g/ml}$ , infekcija se može lečiti sa dozom od 18-24 mil. IU/dnevno. Soj se smatra rezistentnim kada je vrednost MIK  $\geq 8 \mu\text{g/ml}$  (437).

U slučajevima meningitisa, zadržane su stare, strožije granične vrednosti, te se izolati kategorišu kao osetljivi, ukoliko im je MIK  $\leq 0,06 \mu\text{g/ml}$ , a rezistentni ako je MIK penicilina  $\geq 0,12 \mu\text{g/ml}$  (437). Ove izmene su uticale na izveštavanja o padu rezistencije pneumokoka na penicilin. U skladu sa revidiranim CLSI graničnim vrednostima, izveštaji su pokazali veoma nisku prevalenciju PNSP među nemeningealnim izolatima (438-440).

Kada smo primenili revidirane CLSI kriterijume iz 2013. godine, stopa rezistencije naših MRSP sojeva na penicilin je iznosila 16%. Visok nivo rezistencije (MIK penicilina preko  $2\mu\text{g/ml}$ ) je dokazan kod svega 5,82% MRSP sojeva. Slična prevalencija je zabeležena u zemljama u regionu, kao što su Hrvatska (16,3%), Bugarska (20%), Slovenija (14,8%) ali i u drugim evropskim zemljama, kao što su Poljska (16,4%) i Francuska (17,2) (315). Autorka Gajić i saradnici su objavili da Srbija sa stopom od 21% sojeva pneumokoka koji su istovremeno rezistentni na penicilin i makrolide, pripada grupi evropskih zemalja sa visokim nivoom kombinovane rezistencije (339).

Prema podacima ANSORP studije, sprovedene tokom 2008-2009. godine i prilikom korišćenja redigovanih kriterijuma CLSI, prema kojima se razlikuju granične vrednosti za „meningealne“ i „ne-meningealne“ izolate, u azijskim zemljama je ukupna rezistencija na penicilin iznosila 0,7% kod „ne-meningelanih“ izolata i 57,5% kod „meningealnih“ izolata. U poređenju sa ranijom

ANSORP studijom sprovedenom u azijskim zemljama u periodu od 1996-2001. godine, dobijeni rezultati pokazuju pad prevalencije PNSP. Međutim, ukoliko bi se primenile stare granične vrednosti, sadašnji podaci bi ukazali na perzistentnu visoku prevalenciju PNSP u Aziji. Korišćenjem revidiranih graničnih vrednosti CLSI za procenu osetljivosti na penicilin je ustanovljeno da je prevalencija PNSP ne-meningealnih uzoraka u Kini iznosila 13,2%, a u Vijentnamu 0,9%. Meningealni izolati su pokazali daleko viši procenat neosetljivosti na penicilin. U Južnoj Koreji je iznosi 83,3% a u Kini 60% (375).

U Evropi je, u periodu od 2008-2011. godine primećen 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 neosetljivosti *S.pneumoniae* na penicilin je zabeležen u Bugarskoj (37%), Irskoj (20%) i Luksemburgu (19%) (441). U južnoevropskim zemljama je zabeležen viši nivo rezistencije nego u zapadnoevropskim zemljama (356). U južnim i istočnim zemljama Mediterana zastupljenost PNSP je idalje bila visoka. U proseku je 26% invazivnih izolata pneumokoka bilo neosetljivo na penicilin, sa najvišom rezistencijom u Alžiru 44% i Libanu 40% (370).

Naši rezultati su pokazali da je zastupljenost rezistencije bila statistički značajno viša među invazivnim izolatima (45,8%) u odnosu na neinvazivne (10,8%). Za tumačenje osetljivosti invazivnih izolata pneumokoka iz likvora na penicilin se koriste strožiji kriterijumi, što objašnjava više nivo rezistencije kod invazivnih izolata iz likvora. S druge strane, invazivni „ne-meningealni“ sojevi od odraslih pacijenata su bili uglavnom osetljivi na penicilin. Nemački autori su objavili da je, prilikom korišćenja novih graničnih vrednosti, viši nivo neosetljivosti pneumokoka bio prisutan među „meningealnim“ u odnosu na „ne-meningealne“ izolate (442). Naši rezultati su pokazali znatno viši stepen rezistencije na penicilin među izolatima dobijenim iz likvora (89,47%) u odnosu na izolate dobijene iz krvi (19,2%). Ovako visok stepen rezistencije izolata iz likvora u odnosu na izolate dobijene iz krvi je posledica različite interpretacije kategorija osetljivosti kod meningealnih izolata, a ne razlika u vrednostima MIK penicilina.

Brojni invazivni sojevi pneumokoka u slučajevima meningitisa se izoluju upravo kod dece. Zbog toga pedijatrijski pacijenti pokazuju značajno viši nivo rezistencije na penicilin nego odrasli (339, 443). U našoj studiji su pedijatrijski izolati pokazali veću neosetljivost (17,8%) u



odnosu na izolate dobijene od odraslih (10,1%). I druga istraživanja su pokazala da su sojevi izolovani od dece rezistentniji na antibiotike od sojeva izolovanih od odraslih (339, 443). Primena novih graničnih vrednosti je dovela do smanjenja ukupne rezistencije pneumokoka na penicilin, usled brojčane predominacije „ne-meningealnih“ uzoraka. Uticaj izmene interpretacije graničnih vrednosti penicilina kod pneumokoka se može videti i na primeru SAD. Naime, početkom 2000-ih godina, dok su još korišćene stare granične vrednosti, u SAD je registrovano oko 40% sojeva pneumokoka neosetljivih na penicilin (346, 357). Deceniju kasnije, pošto su usvojene nove granične vrednosti koje je izbacio CLSI, u SAD je registrovano oko 15% sojeva pneumokoka neosetljivo na penicilin (10% umereno osetljivo a svega 5% sojeva visoko rezistentno) (444, 445). Sličan scenario se ponovio i u Evropi, posle primene revidiranih kriterijuma CLSI (446).

Krajem 2012. godine je, u nekoliko evropskih zemalja, vodič za ispitivanje antimikrobne rezistencije prema CLSI zamenjen vodičem koji preporučuje EUCAST. Prema kriterijumima EUCAST definisane su strožije granične vrednosti osetljivosti pneumokoka na penicilin. Korišćenje kriterijuma EUCAST se odrazilo na izveštavanje o porastu rezistencije pneumokoka na penicilin i cefotaksim, a samim tim i na korišćenje povećanih doza antibiotika i na povećanu upotrebu lekova druge i treće linije u lečenju infekcija respiratornog trakta. Naime, oba korištena standarda (CLSI i EUCAST) baziraju svoje granične vrednosti u odnosu na dozu leka i vreme davanja leka. Istražujući klinički ishod pneumokokne pneumonije, EUCAST-a predlaže da se koriste više doze intravenskog benzil-penicilina, koje će delovati i na sojeve pneumokoka čija je vrednost MIK penicilina  $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ . Prilikom korišćenja preporuka po EUCAST-u, kriterijumi se prilagođavaju dozama penicilina u lečenju pneumonija. Sojevi pneumokoka kod kojih je vrednost MIK  $\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$  su osetljivi ukoliko se daju niže doze penicilina (1,2 g svakih 4 sata); soj čija je vrednost MIK  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ , se smatra osetljivim uz doze penicilina od 2,4 g na svakih 4 sata. Izolati sa MIK  $\leq 2 \mu\text{g/ml}$  se smatraju osetljivim ukoliko se daju visoke doze penicilina (2,4 g svakih 6 sati). Uočeno je da trenutne razlike u interpretaciji osetljivosti za “ne-meningealne izolate” pneumokoka, koje postoje između CLSI i EUCAST mogu dovesti do češćeg izveštavanja o rezistenciji respiratornih izolata pneumokoka kada se koristi EUCAST ili o povećanju doziranja lekova (328).

U našem istraživanju smo se odlučili da rezultate osetljivosti pneumokoka na penicilin analiziramo i prema preporukama po EUCAST-u, koje se odnose na slične doze penicilina (2,4g 4 puta dnevno ili 1,2g 6 puta dnevno prema EUCAST-u i 2 miliona IU 6 puta dnevno po CLSI-u). U odnosu na takve doze, prema EUCAST-u soj se smatra osetljivim kada je vrednosti MIK  $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$ , dok je granična vrednost prema CLSI MIK  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$ . Naime, autorka Marchese i saradnici su, koristeći navedene granične vrednosti, pokazali malu neusaglašenost u kategorizaciji osetljivosti između dva korištena standarda (CLSI i EUCAST).

Kada smo u našem istraživanju primenili navedene kriterijume po EUCAST-u, našli smo da je među našim MRSP učestalost sojeva neosetljivih na penicilin iznosila 39%, što je znatno više u odnosu na CLSI (16%). Kao i u prethodnoj analizi (po CLSI), kategorizacija osetljivosti prema kriterijumima EUCAST-a, je pokazala da su pedijatrijski sojevi statistički značajno rezistentniji (46,6%) u odnosu na sojeve dobijene od odraslih (15,2%), kao i da je statistički značajno viši nivo rezistencije nađen među invazivnim izolatima (54,2%) u odnosu na neinvazivne (36,2%). Najviši stepen rezistencije je, i ovde nađen kod sojeva izolovanih u slučajevima meningitisa (89,47%). Prema autorki Marchese razlike u interpretaciji osetljivosti pneumokoka na antibiotike, koje postoje između CLSI i EUCAST-a su kategorisane kao male („minor“) (1- <10%), velike („major“) (10- <25%) ili veoma velike („very major“) ( $\geq 25\%$ ) (328). Naši rezultati su pokazali da između tumačenja osetljivosti *S.pneumoniae* na penicilin, kada se koriste različiti kriterijumi (CLSI/EUCAST), postoji velika - „major“ (23%) razlika. S obzirom da su granične vrednosti prema EUCAST-u strožije, predlaže se korištenje viših doza penicilina od 2,4 g 6 puta dnevnom, da bi se delovalo i na sojeve koji ispoljavaju MIK =2  $\mu\text{g/ml}$ . Dakle, na podatke o rezistenciji pneumokoka, osim prakse korišćenja antibiotika i sprovođenja vakcinacije, utiču i granične vrednosti koje laboratorije koriste u rutinskom radu.

Prema poslednjim podacima EARS-Neta iz 2012. godine, zastupljenost invazivnog PNSP u Evropi iznosi 11,6%. Najviše vrednosti su zabeležene 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 zabeležen u Belgiji, Danskoj, Finskoj, Norveškoj i Velikoj Britaniji, dok je značajan pad rezistencije zabeležen u Francuskoj, Luksemburgu i Portugalu (315).

Rezistencija pneumokoka na penicilin je često povezana sa rezistencijom na druge klase antibiotika, tzv korezistancija. Istovremena rezistencija pneumokoka na makrolide i penicilin (MRPNP) se poslednjih godina sve raširenija širom sveta. Prevalencija takvih sojeva značajno varira među državama (314). U periodu od 2003-2005. godine u zemljama Mediterana je zapažena visoka prevalencija kombinovane rezistencije na ova dva antibiotika, sa najvišim vrednostima u Tunisu 24%, dok je u Egiptu iznosila svega 3% (370). 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 (413). U Kanadi je rezistencija na penicilin MRSP sojeva sakupljenih u periodu 1998-2008. godine iznosila čak 37,5%, ali treba imati u vidu da je interpretacija kategorija osetljivosti bila bazirana na graničnim vrednostima koje CLSI daje za „meningealne“ izolate (rezistentni sojevi  $MIK \geq 0,12 \mu\text{g/ml}$ ).

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 MRPNP sojeva zabeležen u Danskoj, Litvaniji, Norveskoj, Španiji, Švedskoj i Velikoj Britaniji. Međutim, u zemljama poput Francuske i Portugala uočen je pad (315).

#### 5.4 Osetljivost MRSP sojeva na cefalosporine

Rezistencija pneumokoka na cefalosporine treće generacije je relativno retka širom sveta. Sojevi PNSP su idalje, uglavnom, osetljivi na treću generaciju cefalosporina, iako su vrednosti MIK cefalosporina kod njih više u poređenju sa vrednostima MIK cefalosporina sojeva osetljivih na penicilin (277, 447). Neosetljivost na cefalosporine treće generacije je češća u zemljama sa visokom prevalencijom PNSP (448, 449).

Početak 90-tih godina su u SAD izolovani prvi sojevi pneumokoka sa visokim nivoom rezistencije na cefalosporine (450). U Kanadi su, međutim, tokom 2002. godine, samo dva, od ukupno dve i po hiljade testiranih izolata pneumokoka, bila rezistentna na ceftriakson (451). Prema izveštajima IMPACT (*engl.* Canadian Pediatric Society's Immunization Program, Active) programa sprovedenog u Kanadi u periodu od 1998-2003. godine među pedijatrijskim invazivnim izolatima neosetljivost na ceftriakson je iznosila 5% sojeva, a većina tih sojeva je

ispoljavala visok stepen rezistencije na penicilin (452). Prevalencija neosetljivosti sojeva pneumokoka na cefotaksim, izolovanih od odraslih osoba tokom 2001-2003. godine u osam evropskih zemalja se kretala od 5,1-11,1%, dok je prevalencija neosetljivosti na cefuroksim bila viša i kretala se između 17,75 i 43,9% (423).

U Grčkoj je u periodu od 2004-2006. godine sprovedena nacionalna studija sa ciljem da se ispita antimikrobna osetljivost i seroprevalenca pneumokoka kod dece i odraslih. Rezultati su pokazali da je 1% sojeva pneumokoka izolovanih od kliconoša uzrasta do 6 godina bilo neosetljivo na ceftriakson, dok je među kliničkim izolatima dobijenim od odraslih pacijenata neosetljivost na ceftriakson iznosila 5,6% (453).

Nakon implementacije konjugovane vakcine, u Španiji je među izolatima iz likvora zabeleženo smanjenje učestalosti rezistencije pneumokoka na cefotaksim u odnosu na eru pre vakcinacije (21,7% u 2000.god na 10,5% u 2008.god) (434), što govori u prilog pozitivnog efekta vakcine na smanjenje rezistencije. Ovakva zapažanja su dali i autori studije sprovedene u 33 američka medicinska centra. Oni su našli da je neosetljivost pneumokoka na ceftriakson, nakon implementacije PCV7, pala sa 14,4% (1999-2000.god) na 5,9% (2004-2005.god) (361).

Rezultati SENTRY studije sprovedene u SAD nisu bile u skladu sa gore navedenim, jer su pokazali da je nivo neosetljivosti pneumokoka na ceftriakson od 1998. godine porastao sa 3% na 11,7% u 2011. godini (363). Međutim, većina sojeva je bila umereno rezistentna na ceftriakson, a svega 2% visoko rezistentni (359, 454, 455).

Treba naglasiti da su promene u izveštavanju osetljivosti pneumokoka na cefalosporine, između ostalog, posledica izmena u graničnim vrednostima. Do izmena u graničnim vrednostima za cefalosporine (cefotaksim i ceftriakson) prema kriterijumima CLSI je došlo 2002. godine. Od tada se razlikuju granične vrednosti za „meningealne“ i „ne-meningealne“ izolate. Kod „meningealnih“ izolata soj se smatra osetljivim ukoliko je vrednost MİK  $\leq 0,5$   $\mu\text{g/ml}$ , umereno osetljiv ako je MİK = 1  $\mu\text{g/ml}$  a rezistentan ako je MİK  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$ . Kod „ne-meningealnih“ izolata soj se smatra osetljivim ukoliko je vrednost  $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$ , umereno osetljiv ako je MİK = 2  $\mu\text{g/ml}$  a rezistentan kada je MİK = 4  $\mu\text{g/ml}$  (442). Različite granične vrednosti kod „meningealnih“ i „ne-meningealnih“ izolata su prisutne i prema kriterijumima EUCAST.

Prema podacima ANSORP studije, sprovedene tokom 2008-2009. godine u azijskim zemljama prosečna neosetljivost na ceftriakson je među „ne-meningealnim“ izolatima iznosila 8,6% (3,7% rezistentno) a među „meningelanim“ čak 30,1%, od čega je samo 0,1% bilo visoko rezistentno. Neosetljivost „ne-meningealnih“ izolata je u Kini iznosila 19,5% (8% je bilo rezistentno) a u Vijetnamu 4,4% (1,8% rezistentno). „Meningealni“ izolati su ispoljili daleko veću neosetljivost na cefalosporine treće generacije, te je 40% izolata u Kini bilo u ovoj kategoriji (20% je bilo visoko rezistentno), dok je u Vijetnamu taj procenat dostigao vrednost od 83,3% (ali nije bilo visoko rezistentnih sojeva) (375).

Kada smo primenili kriterijume prema CLSI, našli smo da je rezistencija naših MRSP sojeva na treću generaciju cefalosporina iznosila 6,5%. Učestalost sojeva neosetljivih na cefotaksim je statistički značajno bila veća među invazivnim (25,5%) nego među neinvazivnim izolatima (2%). Treba naglasiti da je najviša vrednost MIK cefotaksima iznosila 2 µg/ml, tako da među „ne-meningealnim“ izolatima nije bilo visoko rezistentnih sojeva. Ali je, zbog strožijih kriterijuma u proceni osetljivosti „meningelanih“ izolata, nađen visok nivo neosetljivosti na cefotaksim u ovoj grupi sojeva, čak 52,63%.

Autori iz Portugalije su takođe zapazili da su sojevi neosetljivi na cefotaksim češće zastupljeni među izolatima dobijenim iz cerebrospinalne tečnosti nego iz krvi (348). Gajić i saradnici su objavili podatak da je u Srbiji 14% invazivnih izolata neosetljivo na treću generaciju cefalosporina (cefotaksim i ceftriakson) (339).

Kada smo primenili kriterijume po EUCAST-u, našli smo da je 29,4% naših sojeva neosetljivo na cefotaksim, što je znatno više u odnosu na neosetljivost dobijenu prilikom korišćenja CLSI (6,5%). Statistički značajno viši nivo rezistencije na cefotaksim je bio prisutan kod dece (34%) u odnosu na odrasle (15%). Kao i prilikom korišćenja kriterijuma po CLSI, našli smo da je viši stepen neosetljivosti na cefotaksim bio prisutan među „meningelanim“ izolatima (47,36%). Diskrepanca u interpretaciji osetljivosti prilikom korišćenja dva različita kriterijuma, CLSI i EUCAST, kod cefotaksima je u našem radu iznosila 22,9% i kategorisala se kao velika („major“) diskrepanca. Marchese i saradnici su u njihovom istraživanju diskrepancu u interpretaciji osetljivosti kod cefotaksima kategorisali kao minornu (328).

## 5.5 Osetljivost MRSP sojeva na ostale antibiotike

Rezistencija sojeva MRSP na tetraciklin u našem istraživanju je bila izuzetno visoka i iznosila je 81,3%. Tetraciklin je stari antibiotik, koji je, često nekritički, korišćen decenijama unazad. Ima širok spektar delovanja, a pokazao se delotvornim protiv pneumokoka. Doksiciklin, koji ima najbolje karakteristike među svim tetraciklinima, je bio početkom šezdesetih godina lek izbora u lečenju infekcija respiratornog trakta. Istraživanje sprovedeno u "Boston City Hospital" u to vreme, je pokazalo da su svi sojevi pneumokoka bili osetljivi na doksiciklin, sa vrednošću  $MIK_{50} = 0,39 \mu\text{g/ml}$  (456). Rezistencija na tetraciklin se pojavila sredinom šezdesetih godina. U periodu 1963-1964. godina u Australiji je 25% bolničkih izolata pneumokoka bilo rezistentno na tetraciklin. U Engleskoj je 1967. godine 18% bolničkih i 12% ambulantnih izolata pneumokoka bilo rezistentno na tetracikline (308, 457). Tokom narednih godina je rezistencija rasla, posebno u zemljama istočne Evrope, u kojima su se više nego u ostatku Evrope, koristili stariji antibiotici. Tako je u Rusiji 2001. godine više od polovine sojeva pneumokoka, izolovanih od kliconoša mlađih od 5 godina, bilo rezistentno na ovaj antibiotik (458). U Evropi se u periodu od 2004-2005. godine rezistencija pneumokoka na tetracikline kretala oko 20% (459).

Prema rezultatima AWARE programa (2008-2010.god) rezistencija pneumokoka na tetraciklin u SAD iznosi 24,1% (362). Usled prevelike upotrebe, u nekim zemljama izveštaji o rezistenciji pneumokoka pokazuju da je najčešći tetraciklin-rezistentni fenotip (314, 460).

Kod naših MRSP izolata smo našli da je statistički značajno više bilo tetraciklin rezistentnih izolata u pedijatrijskoj u odnosu na adultnu populaciju, kao i među neinvazivnim u odnosu na invazivne izolate. Rezistencija na tetraciklin je među neinvazivnim izolatima iznosila 84,7%, dok je među invazivnim bila 66,7%. Sličan nivo rezistencije MRSP sojeva na tetraciklin od 80,7% su našli i španski autori (416). Budući da se determinante rezistencije na tetraciklin mogu naći na istom transpozonu kao i *ermB* gen, rezistencija pneumokoka na tetracikline je često povezana sa rezistencijom na makrolide (226). Oba gena rezistencije na eritromicin (*ermB* i *mefA*) kao i determinanta rezistencije na tetraciklin (*tetM*) se nalaze na istom transpozonu, *Tn2010*, koji je posebno čest kod multirezistentnih izolata serotipa 19A klonalnog kompleksa 320 (461). Zapaženo je da je visok nivo rezistencije na tetraciklin prisutan u zemljama u kojima postoji visok nivo rezistencije na makrolide, posredovane *ermB* genima (462, 463). Ovako visoka

rezistencija naših sojeva na tetraciklin od 81,3% se može objasniti činjenicama da je u Srbiji prisutan visok nivo rezistencije na makrolide, da su svi sojevi u našem istraživanju rezistentni na makrolide, kao i da je *ermB* gen dominantna determinanta makrolidne rezistencije kod nas. Također i povećana upotreba tetraciklina može uticati na povećanje rezistencije na makrolide (464). Glicilciklini, kao što je tigeciklin, su noviji tetraciklini koji bi mogli da budu uspešni u lečenju infekcija uzrokovanih respiratornim patogenima, uključujući pneumokok (465). Zbog dobre penetracije u plućno tkivo, pokazao se efikasnim u lečenju hospitalizovanih pacijenata sa vanbolničkom pneumonijom (466). Američka Agencija za hranu i lekove (*engl.* Food and Drug Administration, FDA) je 2009.godine odobrio upotrebu tigeciklina u lečenju vanbolnički stečenih bakterijskih pneumonija (*engl.* Community acquired bacterial pneumonia, CABP) uzrokovanih sojevima *S.pneumoniae*, koji su osetljivi na penicilin. Davanje ovog antibiotika se preporučuje kod pacijenata alergičnih na penicilin. Multicentrična randomizovana studija sprovedena na području SAD, Kanade, Evrope, Azije i južne Afrike, sa ciljem da se uporedi efikasnost tigeciklina sa levofloksacinom kod hospitalizovanih pacijenata sa CAP, je pokazala sličnosti u efikasnost ta dva leka, ali i bolji ishod kod pacijenata sa komorbiditetima koji su lečeni tigeciklinom (467). Naše ispitivanje nije uključilo testiranje MRSP na tigeciklin. Međutim rezultati globalne TEST studije (*engl.* Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial) sprovedene u 560 centara Severne Amerike i Evrope u periodu od 2004-2012. godine na 14438 sojeva pneumokoka su pokazali da je 99,9% sojeva pneumokoka osetljivo na tigeciklin (465).

Mi smo, u našem istraživanju, našli da su MRSP sojevi u visokom procentu (74,3%) bili rezistentni na trimetoprim-sulfametoksazol. Statistički značajno je bila prisutna veća zastupljenost rezistentnih izolata u dečijoj populaciji (79,2%) u odnosu na odrasle (56,4%).

Trimetoprim-sulfametoksazol je kombinacija dva leka koji su se kasnih šezdesetih godina dosta koristili za lečenje pneumokoknih infekcija, naročito kod dece, zbog efikasnosti i niske cene. Rezistencija na trimetoprim-sulfametoksazol je prvi put zabeležena 1972. godine (308). Nešto kasnije, 1986. godine je u Bruklinu uočeno da su izolati pneumokoka koji su bili rezistentni na penicilin, takođe ispoljavali rezistenciju i na trimetoprim-sulfametoksazol (468). Nakon toga dolazi do značajnog porasta rezistencije pneumokoka na ovu kombinaciju lekova u pojedinim delovima sveta. Nešto kasnije je u SAD zabeležena rezistencija pneumokoka na trimetoprim-sulfametoksazol, izolovanog od 30% zdrave dece iz dnevnog boravka. Najviša

prevalencija rezistencije pneumokoka na trimetoprim-sulfametoksazol, od oko 50% je zabeležena u Africi kod pacijenata sa HIV infekcijom, a čak preko 60% u delovima Azije (469, 470). Smatra se da su širenje i selekcija klonova *S.pneumoniae* rezistentnih na trimetoprim-sulfametoksazol posledica prekomerne upotrebe ovog antibiotika u lečenju zapaljenja srednjeg uha kod dece (471), kao i njegova profilaktička upotreba kod odraslih pacijenata sa AIDS-om (472). Takođe je zapaženo da je upotreba fansidara u lečenju falciparum malarije u Africi dovela do porasta rezistencije pneumokoka na trimetoprim-sulfametoksazol (473). Naime, fansidar (sulfadoksin/pirimetamin) ima slične mehanizme delovanja (analog PABA/inhibicija sinteze tetrahidrofolne kiseline) i mehanizme rezistencije kao i trimetoprim-sulfametoksazol. Rezistencija je uzrokovana alteracijama vezanim za dihidrofolat reduktazu i dihidropteroat sintetazu, enzime koji su odgovorni za sintezu folne kiseline (298, 299). Alteracije DHFR i DHPS gena koji kodiraju enzime nastaju kao posledice mutacija na hromozomima ili sticanjem egzogenih gena (474, 475). Ukrštena rezistencija dovodi do selektivnog pritiska i stvaranja rezistentnih mutanti pneumokoka.

Devedesetih godina je zabeležen izuzetan porast rezistencije pneumokoka na trimetoprim-sulfametoksazol u SAD. 1992. godine je rezistencija iznosila 8%, da bi 2001. godine dostigla 28,5% (354). Kao i u slučaju tetraciklina, rezistencija pneumokoka na trimetoprim-sulfametoksazol je bila znatno veća u zemljama istočne u odnosu na zapadnu Evropu. U Rusiji je tokom 2001-2002. godine zabeležena vrlo visoka rezistencija, od 65% među decom mlađom od 5 godina iz kolektiva kao što su dnevni boravci i sirotišta (458). Našto kasnije, u periodu od 2009-2013. godine je među dečijim izolatima u Rusiji, rezistencija na trimetoprim-sulfametoksazol neznatno opala i iznosila 57% (376). U zemljama zapadne Evrope u periodu od 2004-2005. godine je rezistencija pneumokoka na trimetoprim-sulfametoksazol iznosila 26,7% (459). Slična situacija je bila i u SAD, gde je rezistencija pneumokoka na trimetoprim-sulfametoksazol 2010. godine iznosila 22,4% (329). U periodu od 1995-2002. godine u Torontu, Kanada, je sprovedena prospektivna kohort studija na 3339 pacijenata sa, u okviru koje su identifikovani faktori rizika za sticanje rezistencije pneumokoka na trimetoprim-sulfametoksazol. Utvrđeno je da su to ranija upotreba trimetoprim-sulfametoksazol, azitromicina i penicilina (390). Prema rezultatima ANSORP studije (2008-2009.god) rezistencija na trimetoprim-sulfametoksazol u azijskim zemljama je iznosila 74,3% Najviša rezistencija



pneumokoka na trimetoprim-sulfametoksazol je bila prisutna u Indiji sa 91,3% visoko rezistentnih sojeva (375).

Nakon široke primene konjugovane vakcine PCV7, dolazi do pada rezistencije pneumokoka na trimetoprim-sulfametoksazol, budući da su vakcinalni serotipovi pneumokoka bili najrezistentniji na ovaj lek.

Visok procenat (66,1%) naših MRSP sojeva pripada kategoriji multirezistentnih. Oni su ispoljavali udruženu rezistenciju na tetraciklin i trimetoprim-sulfametoksazol (multirezistentni sojevi, *engl.* Multi-drug-resistant, MDR). Zastupljenost multirezistentnih sojeva je bila statistički značajno veća u pedijatrijskoj populaciji, kao i kod sojeva sa MLS fenotipom rezistencije na makrolide (73,1%), u odnosu na M fenotip (36,7%), što se objašnjava istovremenim sticanjem determinantni rezistencije. Naime, *ermB* gen rezistencije na eritromicin se može naći na istim transpozonomima sa genima rezistencije na druge antibiotike (npr. *tetM*) i prenositi zajedno procesima konjugacije. Istovremenu rezistenciju na penicilin, tetraciklin i trimetoprim-sulfametoksazol je ispoljilo 15,6% sojeva a na amoksicilin, tetraciklin i trimetoprim-sulfametoksazol 22%.

Zastupljenost multirezistentnih sojeva pneumokoka od čak 82% su opisali španski autori (319). Najviša prevalencija multirezistentnih sojeva je prisutna na Dalekom istoku, u Kini 83,3%, Vijetnamu 75,5%, Južnoj Koreji 63,9% i Hong Kongu 62,2%. U Rusiji je u periodu 2009-2013. godina zastupljenost MDR sojeva među dečijim izolatima iznosila 22% (376) a u azijskim zemljama 59,3%. Kao i u našem istraživanju, i druga istraživanja su pokazala da su multirezistentni sojevi češće zastupljeni među neinvazivnim izolatima u odnosu na invazivne (375).

Sa druge strane, ohrabrujuća je činjenica da su svi ispitivani sojevi bili osetljivi na **vankomicin, linezolid, moksifloksacin, sparfloksacin, pristinamicin i rifampicin**. Takođe u veoma visokom procentu je bila prisutna osetljivost sojeva MRSP na **imipenem** (97,3%), **levofloksacin** (99,6%) i **telitromicin** (98,4%).

Uслед porasta rezistencije pneumokoka na penicilin i makrolide, **fluorohinoloni i telitromicin** se preporučuju za empirijsko lečenje pneumonija kod odraslih pacijenata. Takozvani „respiratorni“ hinoloni, koji pripadaju novijim generacijama fluorohinolona, npr. levofloksacin i

moksifloksacin su aktivniji protiv pneumokoka u poređenju sa starijim generacijama ovih lekova (ciprofloksacin i ofloksacin) (476). Međutim, njihova povećana i neadekvatna upotreba je vremenom dovela do pojave rezistencije pneumokoka i do terapijskih neuspeha u lečenju pneumokoknih infekcija. Porast rezistencije pneumokoka na ove antibiotike je zabeležen u Kanadi i Španiji (477, 478). Rezistencija na fluorohinolone u Kanadi je 1997. godine iznosila manje od 1%, 2005. godine je porasla na 4,2% a već 2006. godine je iznosila 7,3% (284, 479, 480). U Evropi je sprovedena multicentrična studija u periodu od 2004-2005. godine koja je obuhvatila pacijente sa vanbolnički stečenim infekcijama respiratornog trakta. Studija je pokazala nizak nivo rezistencije na hinolone u većini evropskih zemalja. Najviša rezistencija je zabeležena u Italiji 7,2%. U Španiji je 2006. godine rezistencija iznosila 2,3%. U Hrvatskoj rezistencija pneumokoka iznosi 4% (481). Prema podacima EARS-a iz 2012. godine rezistencija na hinolone u Evropi iznosi 5,2% (315). Zemlje u kojima je upotreba antibiotika ograničena, kao što je Nemačka, pojava rezistencije na hinolone nije zabeležena (482).

Prema podacima SENTRY studije u SAD je 2011. godine svega 1,2% sojeva pneumokoka bilo rezistentno na levofloksacin, moksifloksacin ili gemifloksacin (483, 363). Čak ni među zamenjenim serotipovima kao što su 19A, 35B i 11A, rezistencija pneumokoka na ciprofloksacin ne dostiže 2% (484, 485). Rezistencija na gatifloksacin je približna rezistenciji na levofloksacin, dok je rezistencija na moksifloksacin obično niža, zbog njegovog većeg potencijala u dejstvu protiv pneumokoka (486).

Tokom 2009. i 2010. godine sprovedena je studija na azijskom kontinentu, kojom je utvrđeno da je najviši nivo rezistencije pneumokoka na novije hinolone 4% (487). Pojedina područja, kao npr. Hong Kong, beleže nešto više nivoe rezistencije od 13% (488, 489).

Rezultati našeg ispitivanja pokazuju da je osetljivost naših izolata na „respiratorne“ hinolone bila izuzetno visoka (levofloksacin 99,6%, moksifloksacin 100%, sparfloksacin 100%) i da je njihova osetljivost bila viša u odnosu na stariju generaciju hinolona, kao što je ofloksacin (68,8%). Dobijeni podaci ukazuju na to da se noviji fluorohinoloni, mogu koristiti u lečenju pneumokoknih infekcija kod odraslih u Srbiji. Izuzetno visoka osetljivost sojeva pneumokoka izolovanih u Srbiji na ove lekove je od velikog značaja, s obzirom na činjenicu da se noviji fluorohinoloni mogu upotrebljavati u lečenju infekcija izazvanih sojevima MRSP kod pacijenata alergičnih na penicilin. Multicentrična studija, sproveden početkom 2000-tih godina na odraslim

hospitalizovanim pacijentima sa pneumonijom je pokazala bolju efikasnost levofloksacina u poređenju sa tretmanom ceftriaksonom u kombinaciji sa makrolidima (489). Studije koje su pratile efekte delovanja drugih „respiratornih“ hinolona (moksifloksacin i gemifloksacin), su pokazale njihovu uspešnost u 90% slučajeva (491-493). Sprovedena su brojna istraživanja u kojima se u lečenju akutne egzacerbacije hroničnog bronhitisa (AEHB) poredio efekat delovanja cirpofloksacina (494), levofloksacina (495) i moksifloksacina (496) sa drugim lekovima koji se koriste u terapiji AEHB (cefuroksimom, amoksilinom sa klavulanskom kiselinom ili klaritromicinom). Pokazalo se da je terapija fluorohinolonima u trajanju 5 do 7 dana davala isti efekat u poređenju sa navedenim lekovima u lečenju AEHB. Faktori rizika za sticanje rezistencije na hinolone su ranija upotreba hinolona, smeštaj u domove i bolnice (497). Sojevi pneumokoka rezistentni na fluorohinolone se mnogo češće izoluju od starijih osoba i od pacijentima koji boluju od hroničnih oboljenja pluća (489).

Pojava rezistencije pneumokoka na linezolid je, za sada, izuzetno retka (267, 301, 498, 499). Wolter i saradnici su 2005. godine opisali dva klinička izolata pneumokoka sa smanjenom osetljivošću na linezolid sa vrednošću MİK =4 µg/ml (301). I rezistencija na kvinupristin-dalfopristin među Gram pozitivnim kokama je veoma retka. U periodu od 2001-2002. godine izolovano je svega 0,02% rezistentnih sojeva pneumokoka čiji je MİK iznosio 4 µg/ml (302). Rezistencija pneumokoka u ovom trenutku, na kvinupristin-dalfopristin je izuzetno retka (1,1%) Međutim prevalencija neosetljivih sojeva pneumokoka je daleko veća među pacijenima sa srpustom anemijom (30%) (500). Treba naglasiti da je kod pacijenata sa srpustom anemijom prisutan 600 x veći rizik da obole od IPB u odnosu na ostalu populaciju (501). Naši rezultati su pokazali veoma visok procenat osetljivosti izolata pneumokoka na kvinupristin-dalfopristin (98,8%). Međutim, bez obzira na rezultate *in vitro* osetljivosti na streptogramine (VITEK), podaci o čestoj MLS rezisitenciji među našim izolatima pneumokoka ukazuju na mogućnost ukrštene rezistencije na njih. Ovi lekovi još uvek nisu u upotrebi u Srbiji.

Svi sojevi MRSP u našem istraživanju su bili osetljivi na **telitromicin**. Visoka osetljivost pneumokoka na telitromicina je verovatno posledica toga što pomenuti antibiotik nije prisutan na tržištu u Srbiji. Telitromicin je ketolid koji je razvijen sa ciljem da se prevaziđe rezistencija pneumokoka na makrolidne antibiotike. Studija sprovedena u periodu 1999-2000. godine, koja je obuhvatila 10 zemalja centralne i istočne Evrope, je pokazala da je u Hrvatskoj, gde je prisutna

visoka prevalencija MRSP, 99,8% sojeva pneumokoka osetljivo na telitromicin (254). Prema izveštaju globalnog PROTEKT projekta u četvorogodišnjem periodu (2001-2004.god), rezistencija na telitromicin je iznosila 0,1%, a sojevi su pokazali nizak nivo rezistencije (502). Nekoliko studija sprovedenih u različitim državama ukazuju da je prevalencija rezistencije u periodu 2005-2006. godine na globalnom nivou ispod 1% (314, 502, 503). Sa druge strane izveštaji Hsueh-a i saradnika nam daju podatak da je prevalencija rezistencije pneumokoka na telitromicin na Tajvanu 2001. godine iznosila 16% (504). Većina izolata pneumokoka sa smanjenom osetljivošću na telitromicin je imala vrednost MIK eritromicina >256 µg/ml. Taj podatak sugerise na prisustvo *ermB* gena rezistencije u genomu sojeva rezistentnih na telitromicin. Tajvan je zemlja sa veoma visokom prevalencijom rezistencije pneumokoka na makrolide, oko 85% (375). Istraživanje sprovedeno na u ovoj zemlji u periodu 2008-2012. godina je dalo podatak da je 5,4% invazivnih sojeva pneumokoka bilo neosetljivo na telitromicin (505). I druge studije su pokazale postojanje rezistencije pneumokoka na telitromicin (268, 506). Telitromicin se preporučuje za lečenje zapaljenja srednjeg uha, sinuzitisa, AEHB i pneumonije kod odraslih pacijenata, ali ne i kod dece. Efekat lečenja vanbolničke pneumonije telitromicinom se pokazao jednakim kao i efekat lečenja amoksicilinom ili klaritromicinom (507, 508).

Još uvek nije ustanovljeno postojanje rezistencije pneumokoka na **vankomicin**. Međutim opisani su sojevi tolerantni na vankomicin (509-513). Tolerantni sojevi su sposobni da izbegnu liziranje i uništenje od strane leka, ali mehanizmi rezistencije nisu poznati (509, 513). Zabeležen je porast stope smrtnosti pacijenata sa meningitisom uzrokovanim sojevima pneumokoka koji su tolerantni na vankomicin (512).

Rifampicin može da se koristi u kombinaciji sa vankomicinom ili cefalosporinima u lečenju meningitisa uzrokovnog penicilin rezistentnim pneumokokom (202). Takođe se koristi u terapiji tuberkuloze i rezistentnih stafilokoknih infekcija (514). Prevalencija rezistencije na rifampicin među izolatima pneumokoka je mala i kreće se od 0,1 do 1,5% (515). Svi naši sojevi su bili osetljivi na rifampicin.

**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% (516). Veoma slični rezultati su dobijeni u našem istraživanju, gde rezistencija na hloramfenikol iznosi 21,5%. U periodu od 2008-2012. godine rezistencija invazivnih sojeva

pneumokoka na Tajvanu je iznosila 26,2% (505), a u nekim zemljama je dostigla čak 40% (517). Sa druge strane, u Brazilu je, tokom 2010. godine rezistencija pneumokoka na hloramfenikol iznosila svega 3,3% (518). U Grčkoj je rezistencija pneumokoka na hloramfenikol takođe niska ali je zapažen porast rezistencije sa 0,7% (2009.god) na 3,2% (2012.god) (411). 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.

## 5.6 Lečenje pneumokoknih infekcija

Poznato je da je *Streptococcus pneumoniae* jedan od najčešćih bakterijskih izazivača infekcija respiratornih puteva, u svim uzrasnim populacijama. Kako se ove bolesti uglavnom leče empirijski, napravljeni su brojni vodiči za tretman pacijenata sa respiratornim infekcijama. Američko udruženje infektologa (*engl.* Infectious Diseases Society of America, IDSA) i Američko torakalno udruženje (*engl.* American Thoracic Society, ATS) su 2007.godine objavili vodič za lečenje vanbolničkih pneumonija (519). U empirijskom lečenju ovih oblika pneumonija se preporučuje terapija beta laktamskim antibioticima u kombinaciji sa makrolidima, s obzirom na njihov antiinflamatorni efekat (144, 520, 521). Ti vodiči definišu gornji prag rezistencije pneumokoka na makrolide u određenom regionu, iznad kojeg se ovi antibiotici ne mogu koristiti za lečenje pneumokoknih infekcija. U njima se navodi da se makrolidi ne mogu koristiti kao empirijska monoterapija vanbolnički stečene pneumonije ukoliko procenat visoko rezistentnih sojeva pneumokoka (MIK  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$ ) prelazi 25% u toj sredini. Monoterapija makrolidima je ograničena na pacijente koji ne zahtevaju hospitalizaciju i koji nemaju ozbiljne pridružene bolesti (519). Ako bi se rukovodili preporukama koje daju gore navedeni vodiči, a imajući u vidu rezultate naše sudije o visokoj prevalenciji pneumokoka na makrolide (34%) u Srbiji, kao i činjenicu da je dominantan visoko rezistentan MLS fenotip, mogli bi da kažemo da makrolidi nisu opcija kao empirijska monoterapija vanbolničke pneumonije naših pacijenata. Sa druge strane, oralni oblici azitromicina i klaritromicina su se pokazali efikasni u lečenju mnogih slučajeva vanbolničke pneumonije (522-524).

Kada se dijagnostikuje pneumokokna pneumonija i ukoliko je izolovani soj pneumokoka osetljiv na penicilin (MIK  $< 2$   $\mu\text{g/ml}$ ), prema smernicama IDSA iz 2011. godine, lekovi izbora su penicilin ili ampicilin. Lekovi se daju parenteralno, penicilin u dozi od 200 000–250 000

U/kg/dnevo na svakih 4–6 h ili ampicilin u dozi od 150–200 mg/kg/dnevo na svakih 6 h. Lekovi drugog izbora za parenteralnu terapiju su ceftriakson (50–100 mg/kg/dnevno na svakih 12–24 h) ili cefotaksim (150 mg/kg/dnevno na svakih 8 h). Može se primenjivati i klindamicin, ali samo u područjima sa niskom rezistencijom na ovaj antibiotik, u dozi 40 mg/kg/dnevno na svakih 6–8 h, kao i vankomicin (40–60 mg/kg/dnevno na svakih 6–8 h). Blaže infekcije se mogu lečiti oralno amoksicilinom (90 mg/kg/dnevno podeljeno u 2 doze ili 45 mg/kg/dnevno u 3 doze), koji je lek prvog izbora. Lekovi drugog izbora za oralnu terapiju su druga ili treća generacija cefalosporina (cefpodoksim, cefuroksim, cefprozil); potom oralni levofloksacin, ukoliko je soj osetljiv (16–20 mg/kg/dnevno podeljeno u 2 doze za decu od 6 meseci do 5 godina starosti i 8–10 mg/kg/dnevno, jednom dnevno za decu od 5 do 16 godina starosti; maksimalna dnevna doza 750 mg) ili oralni linezolid (30 mg/kg/dnevno podeljeno u 3 doze za decu uzrasta do 12 godina i 20 mg/kg/dnevno podeljeno u 2 doze za starije od 12 godina) (525).

Ukoliko je soj *S.pneumoniae* rezistentna na penicilin ( $\text{MIK} \geq 4\mu\text{g/ml}$ ), lek izbora je ceftriakson koji se daje parenteralno u dozi 100 mg/kg/dnevno na svakih 12–24 h. Ukoliko je neophodna parenteralna terapija, lekovi drugog izbora su ampicilin (300–400 mg/kg/dnevno na svakih 6 h), levofloksacin (16–20 mg/kg/dnevno na svakih 12 h za decu uzrasta od 6 meseci do 5 godina, 8–10 mg/kg/dnevno jednom dnevno za decu uzrasta od 5–16 godina; maksimalna dnevna doza 750 mg), ili linezolid (30 mg/kg/dnevno na svakih 8 h za decu uzrasta do 12 godina i 20 mg/kg/dnevno na svakih 12 sati za starije od 12 godina); mogu se koristiti i klindamicin, u područjima sa niskom rezistencijom (40 mg/kg/dnevno na svakih 6–8 sati) ili vankomicin (40–60 mg/kg/dnevno/6–8 sati). Kod sojeva rezistentnih na penicilin, ukoliko je potrebna oralna terapija, lek izbora je oralni levofloksacin, ako je soj osetljiv (16–20 mg/kg/dnevno u 2 doze za decu uzrasta od 6 meseci do 5 godina i 8–10 mg/kg/dnevno, jednom dnevno za decu uzrasta od 5–16 godina, maksimalna dnevna doza 750 mg), ili oralni linezolid (30 mg/kg/dnevno podeljeno u 3 doze za decu uzrasta do 12 godina i 20 mg/kg/dnevno podeljeno u 2 doze za starije od 12 godina). Lek drugog izbora za oralnu terapiju je klindamicin, u područjima sa niskom rezistencijom (30–40 mg/kg/dnevno podeljeno u 3 doze).

Svi naši sojevi su bili osetljivi na lekove preporučene od strane IDSA vodiča. Jedino treba biti oprezan prilikom primene klindamicina, zbog dominacije MLS fenotipa rezistencije među našim sojevima, i ukrštene rezistencije na klindamicin. Iako vankomicin deluje na sojeve pneumokoka

rezistentne na penicilin, ovaj lek bi trebalo da se koristi veoma pažljivo i to samo kod visoko rezistentnih sojeva i za terapiju meningitisa.

Kada su u pitanju pneumokokni meningitisi, inicijalna terapija je ceftriakson, kao obavezni lek, a vankomicin se dodaje u kombinaciji sa cefotaksimom ili ceftriaksonom (526, 527). Cefalosporini imaju veću sposobnost penetracije kroz krvno moždanu barijeru, ali se vankomicin dodaje u slučaju da je pneumokok rezistentan na cefalosporine. Vankomicin se u toku lečenja isključuje, ukoliko se testom osetljivosti potvrdi da je izolovani soj osetljiv na cefalosporine. Ukoliko je vrednost MIK penicilina od 0,1 do 1 µg/ml, u kombinaciji sa cefalosporinima, može se dodati meropenem. Međutim, ukoliko se ispostavi da je soj neosetljiv na cefalosporine, nastavlja se lečenje sa vankomicinom. Ukoliko je vrednost MIK ceftriaksona veća od 2 µg/ml, osim vankomicina se dodaje i rifampicin. Lekovi se daju intravenski, cefotaksim u dozi od 2g/ 3 puta dnevno, ceftriakson 2g/2 puta dnevno, a vankomicin 1g/ 2 puta dnevno.

Studije koje su obuhvatile pacijente sa zapaljenjem srednjeg uha su ukazale na usku povezanost između osetljivosti pneumokoka i njegovog odgovora na terapiju makrolidima (528-530). U lečenju akutnog zapaljenja srednjeg uha, preporučuje se lečenje amoksicilinom, ukoliko je soj osetljiv na njega (528). Jedan od preglednih članaka je sumirao brojna klinička iskustva prema kojima terapija azitromicinom rešava oko 95% slučajeva zapaljenja srednjeg uha, kada je izolovan pneumokok osetljiv na makrolide, ali samo u 20% slučajeva kada je pneumokok neosetljiv (530). Slične rezultate je iznela i studija u kojoj je pokazano da azitromicin deluje kod 23 od 25 dece sa zapaljenjem srednjeg uha uzrokovanim pneumokokom osetljivim na makrolide, sa vrednostima MIK eritromicina <0,5 µg/ml, ali samo kod troje od osmoro dece kod kojih je izolovan pneumokok čija je vrednost MIK azitromicina >2µg/ml (528). Neobjavljeni podaci proizvođača azitromicina sugerišu da 30 mg/kg pojedinačne doze leči 85% slučajeva pneumokoknog zapaljenja srednjeg uha. U vreme sprovođenja te studije (2001-2002.god) regionalni procenat *ermB*-posredovane rezistencije pneumokoka na makrolide je iznosio svega 8%. U tom kontekstu, s obzirom na naše rezultate koji ukazuju da je u našoj zemlji rezistencija pneumokoka na makrolide u 78,5% slučajeva izazvana *ermB* pozitivnim sojevima, makrolidni antibiotici ne bi mogli da se preporučuju kao empirijska terapija akutnog zapaljenja srednjeg uha kod nas.

Azitromicin i klaritromicin su se pokazali efikasnim u lečenju akutnog purulentnog sinuzitisa (531). Studija sprovedena u Hrvatskoj je pokazala da se azitromicinom postiže 95% slučajeva izlečenja akutnog sinuzitisa. U vreme sprovođenja studije, u Hrvatskoj je 25% sojeva pneumokoka bilo rezistentno na makrolide (532). Amoksicilin se takođe predlaže u terapiji rinosinuzitisa (533).

Uprkos visokom nivou rezistencije na beta laktame širom sveta, sojevi kod kojih je vrednost MIK penicilina  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  su retko prisutni. U našim istraživanju su samo 4 MRSP imala vrednost penicilina od MIK  $=4 \mu\text{g/ml}$ , po jedan soj je ispoljio MIK  $=8 \mu\text{g/ml}$  i MIK  $=12 \mu\text{g/ml}$ , što je ujedno bila i najviša dobijena vrednost MIK penicilina u ovoj studiji. Svi sojevi koji su ispoljili visok nivo rezistencije na penicilin su izolovani iz regija kolonizovanih normalnom florom (brisevi nosa i spoljašnjeg ušnog kanala), tzv. neinvazivni izolati. Zapazili smo i da nijedan soj izolovan u našem istraživanju nije imao MIK cefalosporina veći od  $2 \mu\text{g/ml}$ , što znači da među „nemeningealnim“ uzorcima nijedan soj nije bio visoko rezistentan na cefalosporine.

S obzirom da se rezistencija pneumokoka na BLA može prevazići povećanjem doze leka, oko 95% pneumokoknih infekcija van centralnog nervnog sistema će imati dobar odgovor na terapiju beta laktamima. Penicilin i cefalosporini bi idalje trebalo da budu prva linija terapije kod infekcija izazvanih pneumokokom (435). U tom kontekstu, situacija u Srbiji nije dramatična, budući da je samo 5,8% MRSP sojeva pneumokoka visoko rezistentno na penicilin. Međutim, rezultati našeg istraživanja ukazuju na retku udruženu visoku rezistenciju pneumokoka na penicilin i makrolide. Značajno bi bilo odrediti kolika je incidencija PNSP u Srbiji, bez obzira na rezistenciju na makrolide. Sa stanovišta rezistencije pneumokoka na antibiotike u Srbiji, penicilin bi trebalo da se koristi u lečenju nekomplikovanih pneumokoknih infekcija van centralnog nervnog sistema. U lečenju pneumokoknog meningitisa adekvatan izbor bi bili cefalosporini i njihova kombinacija sa vankomicinom.

Treba napomenuti da se prilikom tumačenja rezistencije pneumokoka na BLA, mikrobiolozi susreću sa brojnim problemima. Naime, prema preporukama oba standarda (CLSI i EUCAST), u ispitivanju osetljivosti pneumokoka na BLA radi se oksacilin „screen“ test odnosno disk difuzioni test sa diskom oksacilina. Prema kriterijumu CLSI, ukoliko je zona inhibicije oksacilina  $\geq 20 \text{ mm}$ , interpretira se da je soj osetljiv na: penicilin (oralni i parenteralni), ampicilin, amoksicilin sa ili bez inhibitora beta laktamaza, cefahlor, cefepim, cefotaksim,



cefpodoksim, cefprozil, ceftizoksim, ceftriakson, cefuroksim i na karbapeneme. Međutim, ukoliko je zona inhibicije oksacilina  $\leq 19$  mm, ne treba izdavati nalaz da je soj rezistentan na BLA, nego je neophodno je da se odredi vrednost MIK penicilina, ceftriaksona, meropenema, ili drugih relevantnih BLA koji se planiraju u terapiji. Budući da je određivanje MIK vrednosti komplikovano i skupo da se rutinski izvodi u laboratorijama u Srbiji, mikrobiolozi često ove preporuke primenjuju samo kada izveštavaju rezistenciju za "meningealne" izolate. Veliki problem predstavlja tumačenje antibiograma za tzv. „ne-meningealne“ izolate, odnosno sojeve izolovane od pacijenta koji boluju od pneumokoknih infekcija van CNS. EUCAST je 2014. godine dao dodatne smernice koje se odnose na oksacilin „screen“ test. Kao i kod CLSI, ukoliko je zona inhibicije oksacilina  $\geq 20$  mm, soj pneumokoka se smatra osetljivim na sve relevantne BLA. Međutim, ukoliko je zona inhibicije oksacilina  $< 20$  mm, u slučaju meningitisa, soj pneumokoka se smatra rezistentnim na peniciline, dok kod "ne-meningealnih" izolata mora da se odredi vrednost MIK penicilina. Ukoliko je zona inhibicije oksacilina  $\geq 8$  mm, soj se smatra osetljivim na ampicilin, amoksicilin sa ili bez inhibitora beta laktamaza, cefepim, ceftriakson i cefotaksim. Ali ukoliko je zona inhibicije  $< 8$  mm, mora da se odredi MIK ampicilina i drugih BLA (325). Ove, trenutno važeće preporuke EUCAST –a olakšavaju izradu i očitavanje antibiograma za neninvazivne i invazivne, ali „ne-meningealne“ izolate pneumokoka. Iako se u mnogim laboratorijama u Srbiji idalje koriste prepruke po CLSI za ispitivanje antimikrobne osetljivosti, tokom 2015. godine će većina laboratorija i u našoj zemlji preći na preporuke po EUCAST-u.

## 5.7 Distribucija serotipova kod sojeva MRSP izolovanih u Srbiji

U našem istraživanju su tipizirani svi invazivni sojevi pneumokoka rezistentni na makrolide (n=48). Nađeno je ukupno 11 serotipova, ali je polovina izolata pripadala tipovima 19F (25%) i 14 (23%). Sledeći po učestalosti su bili 6A (10,41%) i 23F (8,3%), dok su serotipovi 6B, 19A, 3, 23A, 8, 12F, 15B i 31 bili prisutni kod jedne trećine izolata. Među multirezistentnim sojevima, sa smanjenom osetljivošću na makrolide, penicilin, tetraciklin i trimetoprim-sulfametoksazol su takođe, dominirali serotipovi 19F, 14 i 23F. Slične rezultate su objavili i drugi autori. Istraživanje autorke Gajić i saradnika je pokazalo da su serotipovi 19F i 14 jedini serotipovi kod kojih je nađena istovremena rezistencija na penicilin i eritromicin. Ista dva serotipa su najčešće ispoljavala rezistenciju i na ostale beta laktamske antibiotike, kao i na tetraciklin i trimetoprim-

sulfametoksazol (339). U ovom istraživanju su svi sojevi serotipa 19F i 14 ispoljili MLS<sub>b</sub> fenotip, koji karakteriše visok nivo rezistencije na makrolide i ukrštena rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramine. S' druge strane, svi serotipovi 6A su ispoljili M fenotip, koji pokazuje nizak nivo rezistencije na makrolide, bez ukrštene rezistencije na klindamicin i streptogramine. Među MRSP sojevima u Španiji, u periodu pre uvođenja konjugovane vakcine, bili su najzastupljeniji serotipovi 14, 19A, 6B, 19F, 6A i 4 (414). U Portugaliji su među MRSP sojevima u periodu od 1994-2004.godine najčešće nađene serogrupe 19 i 15 (348). Prema podacima CDC-a (*engl.* Centers for Disease Control and Prevention) među sojevima pneumokoka rezistentnim na antibiotike, u preko 90% slučajeva se izoluju serotipovi: 6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F i 23F (534). Istovremena rezistencija pneumokoka na makrolide i BLA je, takođe, često prisutna među istim serotipovima, tj.6A, 6B, 14, 15A, 19F, 19A, 23F i 23A. Ovi multirezistentni sojevi često pripadaju nekom od internacionalnih klonova (Spain<sup>23F</sup> -1; Spain<sup>6B</sup> - 2; France<sup>9V</sup>-3 (Spain<sup>9V</sup> - 3); Taiwan<sup>23F</sup> - 15; Poland<sup>23F</sup> - 16; Poland<sup>6B</sup> - 20; Sweden<sup>15A</sup> -25) opisanim od strane PMEN (*engl.* Pneumococcal Molecular Epidemiology Network) (410, 535, 536). Među našim sojevima *S.pneumoniae* istovremena rezistencija na makrolide i penicilin je bila prisutna kod tipičnih rezistentnih serotipova: 19F, 14, 6A, 23F, 6B i 19A, dok su serotipovi: 3, 8, 12F, 15B, 23A i 31 bili osetljivi na penicilin. Može se zaključiti da su među našim izolatima sa smanjenom osetljivošću na antibiotike dominirali poznati rezistentni serotipovi. Ovakva epidemiološka slika, kakva je prisutna kod nas je karakteristična za zemlje pre uvođenja pneumokokne konjugovane vakcine u kalendar obavezne imunizacije. Međutim treba naglasiti da je u našem istraživanju tipiziran relativno mali broj izolata i da su svi tipizirani izolati invazivni.

U zemljama u kojima se vrši imunizacija dece konjugovanom pneumokoknom vakcinom redukuje se kliconoštvo vakcinalnim tipovima (VT) *S.pneumoniae*. Serogrupe koje se često izoluju kod kliconoša u pedijatrijskoj populaciji, 6, 19 i 23 (VT), ispoljavaju najvišu rezistenciju na antibiotike. Imunizacijom dece se zapravo smanjuje kolonizacija rezistentnim serotipovima u ovoj populaciji i njihovo prenošenje na drugu decu i odrasle. Na taj način se vakcinacijom, pored smanjenja incidencije invazivnih pneumokoknih bolesti, smanjuje i incidencija rezistencije pneumokoka, naročito kod male dece (126, 537-539). Pneumokokna konjugovana sedmovalentna vakcina PCV7 je na tržištu od 2000.godine u nekim zemljama. Prvobitno je

vakcina razvijena sa ciljem da se smanji incidenca IPB u SAD i Kanadi (126), pa je i pravljen od serotipova koji u tim zemljama izazivaju 85% svih IPB. Međutim, isti serotipovi su uzrokovali 83% slučajeva pneumokoknog meningitisa, ali su istovremeno bili rezistentni na antibiotike, te su nađeni kod 81% infekcija uzrokovanih PNSP (158). Nakon uvođenja PCV7, prema podacima ABCs-a, u SAD je zabeležena redukcija incidence IPB za 76%, među decom mlađom od 5 godina. U SAD se broj hospitalizovanih pacijenata smanjio za 40% kada su u pitanju deca mlađa od dve godine (540). U studijama koje su istraživale seroepidemiologiju IPB evropskih zemalja (2000-2005.god) utvrđeno je da serotipovi sadržani u sedmovalentnoj vakcini uzrokuju 74% slučajeva IPB dece u Evropi (538). U međuvremenu su registrovane nove vakcine, PCV10 i PCV13, koje obuhvataju veći broj serotipova te mogu prevenirati IPB izazvane dodatnim serotipovima, prvenstveno među decom.

U studiji sprovedenoj u Izraelu administracija konjugovane vakcine je redukovala upotrebu antibiotika za 17%, dovela do smanjenja kliconoštva rezistentnim sojevima i redukovala incidencu pneumokoknih respiratornih bolesti (541, 542). Nakon uvođenja PCV7 u kalendar za imunizaciju dece 2001. godine u Španiji, zabeležen je značajan pad rezistencije na makrolide među invazivnim izolatima u ovoj populaciji - sa 42,9% tokom 2003. godine na 20,8% u 2006. godini (413). U Mađarskoj je PCV7 dostupna od 2005. godine, a tek je 2009. godine ušla u nacionalni program imunizacije. Tri godine kasnije, 2010. godine je zamenjena sa PCV13 (543). Obuhvat dece rođene 2010. godine vakcinacijom je bio veoma visok (92,8%). Zabeleženo je da su u periodu pre uvođenja PCV10, do 2010. godine, u Mađarskoj dominirali „stari pedijatrijski“ serotipovi (14, 23F, 6B, 19F). Međutim, posle povećanja broja vakcinisane dece, tokom poslednjih godina, serotip 14 je gotovo iščezao. Sa druge strane došlo je do porasta učestalosti ranije retkih, nevakcinalnih serotipova (11A, 15A, 15B) ali je taj porast znatno manji nego što je bio pad VT (544). U Hrvatskoj su najzastupljeniji serotipovi među invazivnim sojevima: 14, 6B, 18C i 23F. Navedeni serotipovi su obuhvaćeni PCV7 i ova vakcina pokriva 72,7% IPB među decom u Hrvatskoj (545). Međutim, PCV7 je tek od kraja 2010. godine dostupna na hrvatskom tržištu. Među našim izolatima dobijenim od dece je bilo prisutno šest različitih serotipova: 19F, 14, 6A, 6B, 23F i 19A. Od toga se serotipovi 6B, 14, 19F i 23F nalaze u sastavu PCV7 i PCV10, dok su svi serotipovi, uključujući 6A i 19A pokriveni 13 valentnom vakcinom. Uvođenje sedmovalentne konjugovane vakcine je, pored već navedenih izuzetno pozitivnih efekata na

smanjenje incidencije IPB izazvane vakcinalnim serotipovim, kao i na smanjenje rezistencije pneumokoka, imalo i neke neželjene efekte, a to je blag porast prevalencije nevakcinalnih tipova (NVT) 6A i 19A, koji su često bili rezistentni na penicilin. Porast incidence IPB uzrokovanih nevakcinalnim serotipom 19A je posmatran u svim starosnim grupama. U periodu od 1998-1999. godine do 2006-2007. godine incidenca serotipa 19A je porasla sa 2,6% na 47,2% kod dece  $\leq 5$  godina, sa 2,9% na 16,6%, kod osoba od 18-64 godine, i sa 3,7% na 14,9% kod osoba  $\geq 65$  godina (546). U Portugaliji serogrupa 19 nije bila prisutna u periodu 1994-1998. godine, da bi u periodu posle uvođenja PCV7, od 2002-2004. godine, činila čak 43,1% izolata (348). Zbog toga su polisaharidi ova dva serotipa uključena u PCV13, pa se očekuje se da će se vremenom smanjiti njihova zastupljenost.

Na žalost, pneumokokne konjugovane vakcine, iako su prisutne na slobodnom tržištu, nisu uvedene u redovan kalendar imunizacije dece u Srbiji. Na osnovu malog broja tipiziranih invazivnih izolata MRSP u ovoj studiji, mogli smo da uočimo da su serotipovi koji su najčešće izolovani od dece, 14 i 19F, kao i sledeći po učestalosti, 6B i 23F zastupljeni u PCV7 i PCV10. Dodatna 4 rezistentna izolovana soja su pripadala serotipovima 6A i 19A, koje pokriva PCV13.

Upotreba vakcine, pored redukovanja ukupne incidencije pneumokoknih bolesti, dovodi i do smanjenja upotrebe antibiotika. To će dalje smanjiti selektivni pritisak od strane antibiotika i stvaranje rezistencije (što više koristiti vakcinu a što manje antibiotik). Trajanje koristi od vakcinacije će zavisiti od toga da li će rezistentni sojevi ostati u serogrupama koje su uključene u vakcinu. Ukoliko počnu da dominiraju rezistentni sojevi tipova koji nisu uključeni u vakcinu, pozitivan efekat vakcinacije na smanjenje rezistencije pneumokoka će tokom vremena opasti.

## 5.8 Nadzor nad pneumokoknim infekcijama

Naše istraživanje predstavlja prvu detaljnu analizu fenotipskih i genotipskih osobina sojeva pneumokoka rezistentnih na makrolidne antibiotike u Srbiji. Ovi rezultati mogu da predstavljaju osnovu epidemiološke baze podataka, na koju bi se nadovezalo dalje praćenje učestalosti rezistencije pneumokoka na makrolide, kao i promene u distribuciji serotipova i gena rezistencije. Analize izolata pneumokoka rezistentnih na makrolide su od posebnog značaja s obzirom da je prevalencija rezistencije pneumokoka na makrolide u Srbiji visoka. Rezistencija pneumokoka na makrolide je u našoj zemlji premašila rezistenciju na penicilin. U razvijenim

zemljama se već dve decenije sprovodi aktivan epidemiološki nadzor nad IPB i nad rezistencijom pneumokoka. Na taj način je omogućeno praćenje incidencije i prevalencije oboljevanja, rezistencije invazivnih i neinvazivnih izolata, distribucije serotipova i rezistentnih klonova, distribucije mehanizama rezistencije na antibiotike, kao i gena koji determinišu rezistenciju, na osnovu čega se prave strategije za terapiju i vakcinaciju.

U Srbiji je od skoro (2014. godine) započet aktivni nadzor nad IPB, publikovanjem vodiča za nadzor nad IPB i prezentovanjem programa nadzora epidemiolozima u nekoliko centara. Stoga nema još zvaničnih podataka. Međutim, naši rezultati ukazuju na to da izolati u Srbiji imaju slične fenotipske i genotipske osobine – serotipove i antimikrobnu rezistenciju, kao i izolati u evropskim zemljama u kojima nema velikog obuhvata vakcinacijom konjugovanom vakcinom. Sa ciljem unapređenja mera prevencije uvođenjem PCV u nacionalni program imunizacije, poboljšanja dijagnostike i lečenja pneumokoknih infekcija, neophodna je da program aktivnog nadzora i zaživi, da se uspostavi nacionalna mreža laboratorija i popravi epidemiološki nadzor nad prijavom IPB. Očekuje se da bi uvođenje vakcine koja pokriva serotipove zastupljene u našoj populaciji dovelo do smanjenja učestalosti invazivne pneumokokne bolesti i rezistencije na antibiotike u Srbiji. Rezultati budućih istraživanja bi mogli da ukažu na promene u incidenciji rezistencije na makrolide među izolatima *S. pneumoniae*, na eventualne izmene u fenotipovima i genotipovima kod sojeva rezistentnih na ove antibiotike, kao i na izmene u distribuciji, serotipova i klonova izolata MRSP u Srbiji.

## 6 ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- U našem ispitivanju smo našli da je ukupna rezistencija pneumokoka na makrolide, u periodu od 2010-2012. god u Srbiji iznosila 34%
- Sojevi *Streptococcus.pneumoniae* rezistentni na makrolide su češće bili izolovani kod dece (36%) u odnosu na odrasle (29%) osobe
- Sojevi *Streptococcus pneumoniae* rezistentni na makrolide su češće izolovani iz neinvazivnih (35,5%) u odnosu na invazivne (27,4%) materijale
- Dominantan fenotip rezistencije na makrolide je bio MLS<sub>b</sub> fenotip (78,5%). Konstitutivni MLS fenotip je bio zastupljen kod 73,9%, a inducibilni MLS kod 4,6% MRSP izolata
- Potvrđena je udruženost *mefA* gena i M fenotipa; *ermB* gena sa iMLS i cMLS fenotipom.
- Prisustvo oba *ermB* i *mefA* gena rezistencije je potvrđeno kod 43,9 % izolata. Svi izolati koji su imali oba gena rezistencije su ispoljili MLS<sub>b</sub> fenotip
- Istovremena neosetljivost na penicilin je bila zastupljena kod 16% sojeva *Streptococcus pneumoniae* rezistentnih na makrolide, u Srbiji. Visok nivo rezistencije na penicilin je imalo svega 5,82% MRSP izolata
- Među sojevima pneumokoka rezistentnim na makrolide u Srbiji je bio prisutan visok nivo rezistencije na tetraciklin (81,3%) i trimetoprim-sulfametoksazol (74,3%)
- Multirezistenti sojevi, koji su bili rezistentni na tetracikline i trimetoprim-sulfametoksazol su predstavljali dve trećine (66,1 %) izolata MRSP
- Zastupljenost udružene rezistencije MRSP na tetraciklin i trimetoprim-sulfametoksazol je bila veća kod sojeva sa MLS fenotipom (73,1%) u odnosu na sojeve sa M fenotipom (36,7%)
- Zastupljenost istovremene rezistencije na makrolide i druge antibiotike, penicilin, amoksicilin, cefotaksim, tetraciklin, trimetoprim-sulfametoksazol, kao i multirezistentnih sojeva je bila veća kod pedijatrijskih izolata pneumokoka u odnosu na sojeve dobijene kod odraslih
- Učestalost istovremene rezistencije na makrolide i druge antibiotike, tetraciklin i ofloksacin, je bila prisutnija među neinvazivnim u odnosu na invazivne MRSP izolate.

Invazivni izolati MRSP iz likvora su pokazivali veću rezistenciju na beta laktamske antibiotike u odnosu neinvazivne sojeve

- Sojevi pneumokoka rezistentni na makrolide su pokazali veoma visok nivo osetljivosti (>90%) na levofloksacin, telitromicin, cefotaksim, imipenem
- Sojevi MRSP su u potpunosti bili osetljivi na vankomicin, linezolid, moksifloksacin, sparfloksacin, rifampicin i pristinamicin
- Među invazivnim sojevima *S.pneumoniae* rezistentnim na makrolide je nađeno 12 različitih serotipova. Polovina izolata je pripadala serotipovima 19F (25%) i 14 (23%), dok su sledeći po učestalosti bili 6A (10,41%) i 23F (8,3%)
- Istovremena rezistencija na makrolide, penicilin, tetracikline i trimetoprim-sulfametoksazol je nađena kod serotipova 19F, 14 i 23F, dok su serotipovi 12F i 31 bili neosetljivi samo na makrolide

## 7 Literatura

1. O'Brien KL and Santosham M. Potential impact of conjugate pneumococcal vaccines on pediatric pneumococcal diseases. *Am J Epidemiol.* 2004; 159:634–44.
2. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet.* 2009; 374(9693):893–902.
3. Austrian R. *Pneumococcus: the first one hundred years.* *Rev Infect Dis.* 1981;3:183–9.
4. Tomasz A. *Streptococcus pneumoniae: molecular biology & mechanism of disease.* Mary Ann Liebert, Inc. New York; 2000.
5. Watson DA, Musher DM, Jacobson JW, Verhoef J. A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. *Clin Infect Dis.* 1993;17:913–24.
6. Griffith F. The significance of pneumococcal types. *J Hyg.* 1928;27:113–59.
7. Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med.* 1944;89:137–58.
8. The Institute for Genomic Research. 16 December 1998, revision date. (Online.) <http://www.tigr.org>. 25 January 1999; last date accessed.
9. Tettelin H, Nelson KE, Paulsen IT, et al. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science.* 2001;293:498–506.
10. Koneman EW, ASD, Jande WM, Schreckenberger PC. and Washington Jr CW. (ed.). *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 5<sup>th</sup> ed.* Ed. Lippincott, Philadelphia, PA. 1997.
11. Aguiar SI, Frias MJ, Santos L, Melo-Cristino J, and Ramirez M. Emergence of optochin resistance among *Streptococcus pneumoniae* in Portugal. *Microb Drug Resist* 2006;12:239–45.
12. Kontiainen S, Sivonen A. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from blood and middle ear fluid. *Eur J Clin Microbiol.* 1987;6:422–4.
13. Nunes S, Sa-Leao R, De Lencastre H. Optochin resistance among *Streptococcus pneumoniae* strain colonizing healthy children in Portugal. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(1):321–4.
14. Hardy GG, Magee AD, Ventura CL, Caimano MJ, Yother J. Essential role for cellular phosphoglucomutase in virulence of type 3 *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 2001;69:2309–17.
15. Watson DA and Musher DM. Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* type serotype 3 by insertion of Tn916. *Infect Immun.* 1990;58:3135–8.
16. Jin P, et al. 2009. First report of putative *Streptococcus pneumoniae* serotype 6D among nasopharyngeal isolates from Fijian children. *J Infect Dis.* 2000:1375–80.
17. Calix JJ, Nahm MH. A new pneumococcal serotype, 11E, has a variably inactivated *wcjE* gene. *J Infect Dis.* 2010;202(1):29–38.
18. 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;71:218–25.
19. Brown EJ. Interaction of gram-positive microorganisms with complement. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1985;121:159–87.
20. Pericone CD, Overweg K, Hermans PW and Weiser JN. Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect Immun.* 2000;68:3990–7.
21. Lopez R. *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages: one long argument. *Int Microbiol online.* 2004;7(3):163–71.
22. Sorens UBS. Pneumococcal polysaccharide antigens: capsules and C-polysaccharide. *Danish Med Bull.* 1995;42:47–53.
23. Berron S, Fenoll A, Ortega M, Arellano N, Casal J. Analysis of the genetic structure of nontypeable pneumococcal strains isolated from conjunctiva. *J Clin Microbiol.* 2005;43:1694–8.
24. Broome CV, Facklam RR. Epidemiology of clinically significant isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *Rev Infect Dis.* 1981;3:277–81.
25. Finland M, Barnes MW. Changes in the occurrence of capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in Boston City Hospital during selected years between 1935 and 1974. *J Clin Microbiol.* 1977;5:154–66.
26. De Lencastre H, Tomasz A. From ecological reservoir to disease: the nasopharynx, day-care centres and drug-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50:75–81.



27. Takala AK, Vuopio-Varkila J, Tarkka E, Leinonen M, Musser JM. Subtyping of common pediatric pneumococcal serotypes from invasive disease and pharyngeal carriage in Finland. *J Infect Dis.* 1996;173:128–35.
28. Robinson DA, Edwards KM, Waites KB, Briles DE, Crain MJ, Hollingshead SK. Clones of *Streptococcus pneumoniae* isolated from nasopharyngeal carriage and invasive disease in young children in central Tennessee. *J Infect Dis.* 2001;183:1501–7.
29. Llull D, Lopez R, Garcia E. Clonal origin of the type 37 *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist.* 2000;6:269–75.
30. Henrichsen J. The pneumococcal typing system and pneumococcal surveillance. *Pneumococcal pneumonia and vaccines.* 1979;1 Suppl 2:31–4.
31. Dintilhac A, Alloing G, Granadel C, Claverys JP. Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: *Adc* and *PsaA* mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol Microbiol.* 1997;25(4):727–39.
32. Russell H, Tharpe JA, Wells DE, WhUe EH, Johnson JE. Monoclonal antibody recognizing a species-specific protein from *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 1990;28:2191–5.
33. Sampson JS, SP OC, Stinson AR, Tharpe JA, Russell H. Cloning and nucleotide sequence analysis of *psaA*, the *Streptococcus pneumoniae* gene encoding a 37-kilodalton protein homologous to previously reported *Streptococcus* sp. adhesins. *Infect Immun.* 1994;62:319–24.
34. van der Flier M, Chhun N, Wizemann TM, Min J, McCarthy JB, and Tuomanen EI. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to immobilized fibronectin. *Infect Immun.* 1995;63:4317–22.
35. Courtney HS, Li Y, Dale JB, Hasty DL. Cloning, sequencing, and expression of a fibronectin/fibrinogen-binding protein from group A streptococci. *Infect Immun.* 1994;62:3937–46.
36. Ring A, Weiser JN, Tuomanen EI. Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest.* 1998;102:347–60.
37. Brueggemann AB, Peto TE, Crook DW, Butler JC, Kristinsson KG, Spratt BG. Temporal and geographic stability of the serogroup-specific invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children. *J Infect Dis.* 2004 Oct 1;190(7):1203–11. Epub. 2004 Aug 25.
38. Benton K, Paton J, Briles D. Differences in virulence for mice among *Streptococcus pneumoniae* strains of capsular types 2, 3, 4, 5, and 6 are not attributable to differences in pneumolysin production. *Infect Immun.* 1997;65:1237–44.
39. Morgan PJ, Hyman SC, Rowe AJ, Mitchell TJ, Andrew PW, Saibil HR. Subunit organisation and symmetry of pore-forming oligomeric pneumolysin. *FEBS Lett.* 1995;371:77–80.
40. Braun JS, Novak R, Gao G, Murray PJ, Shenep JL. Pneumolysin, a protein toxin of *Streptococcus pneumoniae*, induces nitric oxide production from macrophages. *Infect Immun.* 1999;67:3750–6.
41. Rubins JB, Charboneau D, Paton JC, et al. Dual function of pneumolysin in the early pathogenesis of murine pneumococcal pneumonia. *J Clin Invest.* 1995;95:142–50.
42. Braun JS, Sublett JE, Freyer D, et al. Pneumococcal pneumolysin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest.* 2002;109:19–27.
43. Garcia E, Garcia JL, Ronda C, Garcia P, Lopez R. Cloning and expression of the pneumococcal autolysin gene in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 1985;201:225–30.
44. Diaz E, Garcia JL. Characterization of the transcription unit encoding the major pneumococcal autolysin. *Gene.* 1990;90:157–62.
45. Tomasz A. Building and breaking of bonds in the cell wall of bacteria - the role for autolysin, p. 3–12. In: C. Nombela, (ed.). *Microbial cell wall and autolysins.* Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands. 1984.
46. Ronda C, Garcia JL, Garcia E, Sanchez-Puelles JM, Lopez R. Biological role of the pneumococcal amidase. Cloning of the *lytA* gene in *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Biochem.* 1987;164:621–4.
47. Garcia P, Gonzalez MP, Garcia E, Lopez R, Garcia JL. *LytB*, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol Microbiol.* 1999;31:1275–7.
48. Garcia P, Gonzalez MP, Garcia E, Garcia JL, Lopez R. The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol Microbiol.* 1999;33:128–38.
49. De las Rivas B, Garcia JL, Lopez R, Garcia P. Molecular characterization of the pneumococcal teichoic acid phosphorylcholine esterase. *Microb Drug Resist.* 2001;7:213–22.
50. Tomasz A, Fischer W. The cell wall of *Streptococcus pneumoniae*. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI, (ed.). *Gram-Positive Pathogens.* ASM Press, Washington, DC; 2000. p. 191–200.

51. Barocchi MA, Ries J, Zogaj X, et al. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:2857-62.
52. Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, et al. Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature*. 1995;377:435-8.
53. Yother J, White JM. Novel surface attachment mechanism of the Streptococcus pneumoniae protein PspA. *J Bacteriol*. 1994;176:2976-85.
54. Yother J, Briles DE. Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of Streptococcus pneumoniae, as revealed by sequence analysis. *J Bacteriol*. 1992;174:601-9.
55. Brooks-Walter A, Briles DE, Hollingshead SK. The *pspC* gene of Streptococcus pneumoniae encodes a polymorphic protein, PspC, which elicits cross-reactive antibodies to PspA and provides immunity to pneumococcal bacteremia. *Infect Immun*. 1999;67:6533-42.
56. Camara M, Boulnois GJ, Andrew PW, Mitchell TJ. A neuraminidase from Streptococcus pneumoniae has the features of a surface protein. *Infect Immun*. 1994;62:3688-95.
57. Berry AM, Lock RA, Paton JC. Cloning and characterization of *nanB*, a second Streptococcus pneumoniae neuraminidase gene, and purification of the NanB enzyme from recombinant Escherichia coli. 1996;178(16):4854-60.
58. Berry AM, Paton JC. Additive attenuation of virulence of Streptococcus pneumoniae by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect Immun*. 2000;68(1):133-40.
59. Humphrey JH. Hyaluronidase production by pneumococci. *J Patho Bacteriol*. 1948;55:273-5.
60. Kharat AS, Tomasz A. Inactivation of the *srtA* gene affects localization of surface proteins and decreases adhesion of Streptococcus pneumoniae to human pharyngeal cells in vitro. *Infect Immun*. 2003;71:2758-65.
61. Yesilkaya H, Kadioglu A, Gingles N, Alexander JE, Mitchell TJ, Andrew PW. Role of manganese-containing superoxide dismutase in oxidative stress and virulence of Streptococcus pneumoniae. *Infect Immun*. 2000;68:2819-26.
62. Auzat I, Chapuy-Regaud S, Le Bras G, Dos Santos D, Ogunniyi AD, Le Thomas I, et al. The NADH oxidase of Streptococcus pneumoniae: its involvement in competence and virulence. *Mol Microbiol*. 1999;34:1018-28.
63. Oggioni MR, Memmi G, Maggi T, Chiavolini D, Iannelli F, Pozzi G. Pneumococcal zinc metalloproteinase ZmpC cleaves human matrix metalloproteinase 9 and is a virulence factor in experimental pneumonia. *Mol Microbiol*. 2003;49:795-805.
64. Toumanen EI, Austrian R, Masure HR. Pathogenesis of pneumococcal infection. *N Engl J Med*. 1995;332:1280-4.
65. Streptococcus pneumoniae; Textbook in Serotyping, Virulence Factors and Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Measuring Pneumococcal Antibodies. 1st ed. Statens Serum Institut; 2013.
66. Havarstein LS, Hakenbeck R, Gaustad P. Natural competence in the genus Streptococcus: evidence that streptococci can change serotype by interspecies recombinational exchanges. *J Bacteriol*. 1997;179:6589-94.
67. Whatmore AM, Efstratiou A, Pickerill AP, Broughton K, Woodard G, Sturgeon D, et al. Genetic relationships between clinical isolates of Streptococcus pneumoniae, Streptococcus oralis, and Streptococcus mitis: characterization of "Atypical" pneumococci and organisms allied to S. mitis harboring S. pneumoniae virulence factor-encoding genes. *Infect Immun*. 2000;68(3):1374-82.
68. Lorenz MG, Wackernagel W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev*. 1994;58:563-602.
69. Ottolenghi E, Hotchkiss RD. Release of genetic transforming agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration. *J Exp Med*. 1962;116:491-519.
70. Hotchkiss RD. Cyclical behavior in pneumococcal growth and transformability occasioned by environmental changes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1954;40:49-55.
71. Ubukata K, Asahi Y, Yamane A, Konno M. Combinational detection of autolysin and penicillin-binding protein 2B gene of Streptococcus pneumoniae by PCR. *J Clin Microbiol*. 1996;34:592-6.
72. Overweg K, Bogaert D, Sluijter M, De Groot R, Hermans P. Molecular characteristics of penicillin binding protein genes of penicillin-nonsusceptible Streptococcus pneumoniae isolated in The Netherlands. *Microb Drug Resist*. 2001;7:323-34.
73. Obert C, Sublett J, Kaushal D, et al. Identification of a Candidate Streptococcus pneumoniae core genome and regions of diversity correlated with invasive pneumococcal disease. *Infect Immun*. 2006;74:4766-77.
74. Henrichsen J. Six newly recognized types of Streptococcus pneumoniae. *J Clin Microbiol*. 1995;33:2759-62.
75. Bogaert D, Van Belkum A, Sluijter M, Luijendijk A, De Groot R, Rumke HC, et al. Colonisation by Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus in healthy children. *Lancet*. 2004;363:1871-2.

76. Frazao N, Brito-Avo A, Simas C, Saldanha J, Mato R, Sunes S, et al. Effect of the seven-valent conjugate pneumococcal vaccine on carriage and drug resistance of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children attending day-care centers in Lisbon. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24:243–52.
77. Hendley JO, Sande MA, Stewart PM, Gwaltney JM Jr. Spread of *Streptococcus pneumoniae* in families, carriage rates and distribution of types, *J Infect Dis*. 1975;132:55–61.
78. Laval CB, De Andrade AL, Pimenta FC, De Andrade JG, De Oliveira RM, Silva SA, et al. Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12:50–5.
79. Regev-Yochay G, Raz M, Dagan R, et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by adults and children in community and family settings. *Clin Infect Dis*. 2004;38:632–9.
80. Hill PC, Townend J, Antonio M, et al. Transmission of *Streptococcus pneumoniae* in rural Gambian villages: a longitudinal study. *Clin Infect Dis*. 2010; 50:1468–76.
81. Christenson B, Sylvan SP, Noreen B. Carriage of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* among children attending day-care centres in the Stockholm area. *Scand J Infect Dis*. 1997;29:555–8.
82. Borer A, Meirson H, Peled N, Porat N, Dagan R, Fraser D, et al. Antibiotic-resistant pneumococci carried by young children do not appear to disseminate to adult members of a closed community. *Clin Infect Dis*. 2001;33(4):436–44.
83. Greenberg D, Broides A, Blancovich I, Peled N, Givon-Lavi N, Dagan R. Relative importance of nasopharyngeal versus oropharyngeal sampling for isolation of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from healthy and sick individuals varies with ages. *J Clin Microbiol*. 2004;42:4604–9.
84. Austrian R. Some aspects of the pneumococcal carrier state. *J Antimicrob Chemother*. 1986 Jul;18 Suppl A:S35–S45.
85. Arason VA, Sigurdsson JA, Erlendsdottir H, Gudmundsson S and Cristinsson KG. The role of antimicrobial use in the epidemiology of resistant pneumococci: A 10-year follow up. *Microb Drug Resist*. 2006;12:169–76.
86. Faden H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *Tonawanda/Williamsville Pediatrics*. *J Infect Dis*. 1997;175:1440–5.
87. Gray BM, Converse III GM, Dillon Jr. HC. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage and infection during the first 24 months of life. *J Infect Dis*. 1980;142:923–33.
88. Gray BM, Dillon Jr HC. Epidemiological studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: antibody to types 3, 6, 14 and 23 in the first two years of life. *J Infect Dis*. 1988;158:948–55.
89. Kuzman I. *Streptococcus pneumoniae*. U: Begovac J, Božinović B, Lisić M, Baršić B, Schonwald S. ur. *Infektologija*. 1. izd. Zagreb: Profil; 2006;579–88.
90. Bogaert D, De Groot R, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonization: The key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*. 2004;4:144–54.
91. Chudwin DS, Artrip SG, Schiffman G. Immunoglobulin G class and subclass antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides. *Clin Immunol Immunopathol*. 1987;44:144–21.
92. Carroll KC. Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infections: controversy and conundrums. *J Clin Microbiol*. 2002;40:3115–20.
93. Dowell SF, Butler JC, Giebink GS, Jacobs MR, Jernigan D, Musher DM, et al. Acute otitis media: management and surveillance in an era of pneumococcal resistance – a report from the Drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr Infect Dis*. 1999;18:1–9.
94. Schwartz LE, Brown RB. Purulent otitis media in adults. *Arch Intern Med*. 1992;152:2301–4.
95. Xu Q, Pichichero ME, Casey JR, Zeng M. Novel Type of *Streptococcus pneumoniae* Causing Multidrug-Resistant Acute Otitis Media in Children. *Infect Dis*. 2009 April; 15(4):547–51.
96. Gwaltney JMJ, Scheld WM, Sande MA, Sydnor A. The microbial etiology and antimicrobial therapy of adults with acute community-acquired sinusitis: a fifteen-year experience at the University of Virginia and review of other selected studies. *J Allergy Clin Immunol*. 1992;90:457–62.
97. Barker JH, Musher DM, Silberman R, Phan HM, Watson DA. Genetic relatedness among nontypeable pneumococci implicated in sporadic cases of conjunctivitis. *J Clin Microbiol*. 1999;37:4039–41.
98. Martin M, Turco JH, Zegans ME, Facklam RR, Sodha S, Elliott JA, et al. An outbreak of conjunctivitis due to atypical *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med*. 2003;348:1112–21.
99. Dagan R, Greenberg D, Jacobs MR. Pneumococcal Infections. In: Feigin RD, Cherry JD, Demmler GJ, Kaplan SL, editors. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. 5th. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders (Elsevier Science); 2004. p:1204–58/90.

100. Musher DM. Streptococcus pneumoniae. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier, Churchill Livingstone. 2005.p.197.
101. Peter G, Klein JO. Streptococcus pneumoniae. In: Long SS, Pickering LK, Prober CG, eds. Principles and Practices of Pediatric Infectious Diseases. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone (Elsevier); 2002.p:739–46/131.
102. Yangco BG, Deresinski SC. Necrotizing or cavitating pneumonia due to Streptococcus pneumoniae: report of four cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 1980;59:449–57.
103. Isaacs RD. Necrotizing pneumonia in bacteraemic pneumococcal infection. *Br J Dis Chest*. 1986;80(3):295–6.
104. Zisis NP, Syrinopoulou V, Kafetzis D, Daikos GL, Tsilimingaki A, Galanakis E, et al. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of Streptococcus pneumoniae causing invasive infections and acute otitis media in children. *Eur J Pediatr*. 2004;163:364–8.
105. Farha T, Thomson AH. The burden of pneumonia in children in the developed world. *Pediatr Respir Rev*. 2005;6:76–82.
106. Kaplan SL, Mason EO, Wald ER, Tan TQ, Schutze GE, Bradley JS, et al. Six-year multicenter surveillance of invasive pneumococcal infections in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2002;21:141–7.
107. Pineda V, Fontanals D, Larramona H, Domingo M, Anton J, Segura F. Epidemiology of invasive Streptococcus pneumoniae infections in children in an area of Barcelona, Spain. *Acta Paediatr*. 2002;91:1251–6.
108. McIntosh ED. Treatment and prevention strategies to combat pediatric pneumococcal meningitis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2005;5:739–50.
109. European Centres for Disease Prevention and Control. Surveillance report: Surveillance of invasive pneumococcal disease in Europe 2010. Available from: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/invasive-pneumococcal-disease-surveillance-2010.pdf/3/5/2011>.
110. Waddle E, Jhaveri R. Outcomes of febrile children without localising signs after pneumococcal conjugate vaccine. *Arch Dis Child*. 2009;94(2):144–7.
111. Stoll ML, Rubin LG. Incidence of occult bacteremia among highly febrile young children in the era of the pneumococcal conjugate vaccine: a study from a Children's Hospital Emergency Department and Urgent Care Center. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2004;158(7):671–5.
112. Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, Harrison LH, Farley M, Reingold AL, et al. Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. *N Engl J Med*. 1997 Oct 2;337(14):970–6.
113. Aronin SI, Peduzzi P, Quagliarello VJ. Community-acquired bacterial meningitis: risk stratification for adverse clinical outcome and effect of antibiotic timing. *Ann Intern Med*. 1998;129:862–9.
114. Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, Miller SI, Southwick FS, Caviness VS Jr, et al. Acute Bacterial Meningitis in Adults - A Review of 493 Episodes. *N Engl J Med*. 1993;328:21–8.
115. Thiquen MC, Whitney CG, Messonnier NE, et al. Bacterial Meningitis in the United States, 1998–2007. *N Engl J Med*. 2011;364(21):2016–25.
116. Ross JJ, Saltzman CL, Carling P, Shapiro DS. Pneumococcal septic arthritis: review of 190 cases. *Clin Infect Dis*. 2003 Feb 1;36(3):319–27.
117. Turner DP, Weston VC, Ispahani P. Streptococcus pneumoniae spinal infection in Nottingham, United Kingdom: not a rare event. *Clin Infect Dis*. 1999 Apr;28(4):873–81.
118. Grigoriadis E, Gold WL. Pyogenic brain abscess caused by Streptococcus pneumoniae: case report and review. *Clin Infect Dis*. 1997 Nov;25(5):1108–12.
119. Taylor SN, Sanders CV. Unusual manifestations of invasive pneumococcal infection. *Am J Med*. 1999 Jul 26;107(1A):12S–27S.
120. Petti CA, Ignatius Ou SH, Sexton DJ. Acute terminal ileitis associated with pneumococcal bacteremia: case report review of pneumococcal gastrointestinal diseases. *Clin Infect Dis*. 2002;34(10):E50-3.
121. Heltberg O, Korner B, Schouenborg P. Six cases of acute appendicitis with secondary peritonitis caused by Streptococcus pneumoniae. *Eur J Clin Microbiol*. 1984;3:141.
122. Astagneau P, Goldstein FW, Francoal S, et al. Appendicitis due to both Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1992;11:559-60.
123. World Human Organization. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization-WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*. 2007; 82: 93–104.

124. World Health Organization. Available from: [www.who.int/immunization\\_delivery/new\\_vaccines/pneumo./1/8/2011](http://www.who.int/immunization_delivery/new_vaccines/pneumo./1/8/2011).
125. Marrie TJ, Durant H, Yates L. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization: 5-year prospective study. *Rev Infect Dis*. 1989;11:586-99.
126. Robinson KA, Baugman W, Rothrock G, Barrett NL, Pass M, Lexau C, et al. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995–1998: opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. *JAMA*. 2001;285:1729–35.
127. McCullers JA. Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19:571–82.
128. de Roux A, Cavalcanti M, Marcos MA, Garcia E, Ewig S, Mensa J, et al. Impact of alcohol abuse in the etiology and severity of community-acquired pneumonia. *Chest*. 2006;129:1219–25.
129. Nuorti JP, Butler JC, Farley MM, et al. Cigarette smoking and invasive pneumococcal disease. Active Bacterial Core Surveillance Team. *N Engl J Med* 2000;342:681–9.
130. Lee TA, Weaver FM, Weiss KB. Impact of pneumococcal vaccination on pneumonia rates in patients with COPD and asthma. *J Gen Intern Med*. 2007;22:62–7.
131. Talbot TR, Hartert TV, Mitchel E, et al. Asthma as a risk factor for invasive pneumococcal disease. *N Engl J Med*. 2005;352:2082–90.
132. Kobel DE, Friedl A, Cerny T, Mühlemann K, et al. Pneumococcal vaccine in patients with absent or dysfunctional spleen. *Mayo Clin Proc*. 2000 Jul;75(7):749–53.
133. Nuorti JP, Butler JC, Gelling L, Kool JL, Reingold AL. Epidemiologic relation between HIV and invasive pneumococcal disease in San Francisco County, California. *Ann Intern Med*. 2000;132:182–90.
134. Costa DB, Shin B, Cooper DL. Pneumococemia as the presenting feature of multiple myeloma. *Am J Hematol*. 2004 Nov;77(3):277–81.
135. Naveau C, Houssiau FA. Pneumococcal sepsis in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2005;14(11):903–6.
136. de Bruyn G, Whelan TP, Mulligan MS, Raghu G. Invasive pneumococcal infections in adult lung transplant recipients. *Am J Transplant*. 2004 Aug;4(8):1366–71.
137. Parsons HK, Dockrell DH. The burden of invasive pneumococcal disease and the potential for reduction by immunization. *Int J Antimicrob Agents*. 2002;19:85–93.
138. Burman LA, Norrby R, Trollfors B. Invasive pneumococcal infections: incidence, predisposing factors and prognosis. *Rev Infect Dis*. 1985;7:133–42.
139. Dworkin MS, Ward JW, Hanson DL, Jones JL, Kaplan JE. Adolescent Spectrum of HIV Disease Project. Pneumococcal disease among human immunodeficiency virus-infected persons: incidence, risk factors and impact of vaccination. *Clin Infect Dis*. 2001;32:794–800.
140. Wong WY, Powars DR, Chan L, Hiti A, Johnson C, Overturf G. Polysaccharide encapsulated bacterial infection in sickle cell anemia: a thirty year epidemiologic experience. *Am J Hematol*. 1991;39:176–82.
141. Rodriguez-Creixems M, Munoz P, Miranda E, Pelaez T and Alonso R. Recurrent pneumococcal bacteremia. A warning of immunodeficiency. *Arch Intern Med*. 1996;156:1429–34.
142. Potgieter PD, Hammond JM. The intensive care management, mortality and prognostic indicators in severe community-acquired pneumococcal pneumonia. *Intensive Care Med*. 1996;22:1301–6.
143. Tleyjeh IM, Tlaygeh HM, Hejal R, Montori VM, Baddour LM. The impact of penicillin resistance on short-term mortality in hospitalized adults with pneumococcal pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2006 Jul;43(2):261–2.
144. Baddour LM, Yu VL, Klugman KP, Feldman C, Ortqvist A, Rello J, et al. Combination antibiotic therapy lowers mortality among severely ill patients with pneumococcal bacteremia. *Am J Respir Crit Care Med*. Epub 2004 Jun 7. 2004 Aug;170(4):440–4.
145. Aspa J, Rajas O, Rodriguez de Castro F, Huertas MC, Borderias L, Cabello FJ, et al. Impact of initial antibiotic choice on mortality from pneumococcal pneumonia. *Eur Respir J*. 2006 May;27(5):1010–9.
146. Bartlett JG, Mundy LM. Community-acquired pneumonia. *N Engl J Med*. 1995;333:1618–24.
147. Marrie TJ. Community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis*. 1994 Apr;18(4):501–13.
148. Centers for Disease Control and Prevention. Active Bacterial Core Surveillance (ABCs) report: *Streptococcus pneumoniae*, 2010. Emerging Infections Program Network. Available from: <http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/spneu10-orig.pdf>./21/3/2013.
149. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine for adults with immunocompromising conditions:

- recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2012;61(40):816–9.
150. Feikin DR, Klugman KP. Historical changes in pneumococcal serogroup distribution: implications for the era of pneumococcal conjugate vaccines. *Clin Infect Dis.* 2002;35:547–55.
151. Feikin DR., Klugman KP, Facklam RR, Zell ER, Schuchat A, Whitney CG. Increased prevalence of pediatric pneumococcal serotypes in elderly adults. *Clin Infect Dis.* 2005;41:481–7.
152. Harboe ZB, Thomsen RW, Riis A, Valentiner-Branth P, Christensen JJ, Lambertsen L, et al. Pneumococcal serotypes and mortality following invasive pneumococcal disease: a population-based cohort study. *PLoS Med.* 2009; 6:e1000081.
153. Arditi M, Mason EO Jr, Bradley JS, Tan TQ, Barson WJ, Schutze GE, et al. Three-year multicenter surveillance of pneumococcal meningitis in children: clinical characteristics and outcome related to penicillin susceptibility and dexamethasone use. *Pediatrics* 1998;102:1087–97.
154. Feikin DR, Schuchat A, Kolczak M, Barrett NL, Harrison LH, Lefkowitz L, et al. Mortality from invasive pneumococcal pneumonia in the era of antibiotic resistance 1995–1997. *Am J Public Health.* 2000;90:223–9.
155. Johnson AP, Waight P, Andrews N, Pebody R, George RC and Miller E. Morbidity and mortality of pneumococcal meningitis and serotypes of causative strains prior to introduction of the 7-valent conjugate pneumococcal vaccine in England. *J Infect.* 2007;55:394–9.
156. Boisier P, Mainassara HB, Sidikou F, Djibo S, Kairo. K and Chanteau S. Case-fatality ratio of bacterial meningitis in the African meningitis belt: we can do better. *Vaccine.* 2007;1;A24–9.
157. Pletz MW, Maus U, Krug N, Welte T, Lode H. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;32:199–206.
158. Butler JC, Breiman RF, Lipman HB, Hofmann J, Facklam RR. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United States, 1978–1994: implications for development of a conjugate vaccine. *J Infect Dis.* 1995 Apr;171(4):885–9.
159. Christenson B, Lundbergh P, Hedlund J, Ortqvist A. Effects of a large-scale intervention with influenza and 23-valent pneumococcal vaccines in adults aged 65 years or older: a prospective study. 2001;357:1008–11.
160. Ghaffar F, Barton T, Lozano J, et al. Effect of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* in the first 2 years of life. *Clin Infect Dis.* 2004; 39:930.
161. Douglas RM, Paton JC, Duncan SJ, Hansman DJ. Antibody response to pneumococcal vaccination in children younger than five years of age. *J Infect Dis.* 1983;148:31.
162. Zimmerman RK. Pneumococcal conjugate vaccine for young children. *Am Fam Physician.* 2011;63:1991–8.
163. Poehling KA, Lafleur BJ, Szilagyi PG, Edwards KM, Mitchel E, Barth R, et al. Population-based impact of pneumococcal conjugate vaccine in young children. *Pediatrics.* 2004;114:755–61.
164. Shinefield HR, Black S, Ray P, Chang I, Lewis N, Fireman B, et al. Safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal CRM197 conjugate vaccine in infants and toddlers. *Pediatr Infect Dis J.* 1999;18:757–63.
165. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennet NM, Lynfield R, et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polyaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med.* 2003;348:1737–46.
166. Hsu HE, Shutt KA, Moore MR, et al. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. *N Engl J Med.* 2009;360(3):244-56.
167. Pavia M, Bianco A, Nobile CG, et al. Efficacy of pneumococcal vaccination in children younger than 24 months: a meta-analysis. *Pediatrics.* 2009;123:e1103.
168. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med.* 2003;348:1737-46.
169. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on incidence of invasive pneumococcal disease—United States, 1998–2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2005;54:893-7.
170. Poehling KA, Talbot TR, Griffin MR, et al. Invasive pneumococcal disease among infants before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *JAMA* 2006;295(14):1668-74.
171. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Invasive pneumococcal disease in children 5 years after conjugate vaccine introduction—eight states, 1998–2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2008;57:144-8.
172. Jansen AG, Hak E, Veenhoven RH, et al. Pneumococcal conjugate vaccines for preventing otitis media. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;(2):CD001480.
173. Eskola J, Kilpi T, Palmu A, Jokinen J, Haapokoski, Herva E, et al. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med.* 2001;344:403–9.

174. Talbot TR, Poehling KA, Hartert TV, et al. Reduction in high rates of antibiotic-nonsusceptible invasive pneumococcal disease in Tennessee after introduction of the pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Infect Dis*. 2004;39:641.
175. Hampton LM, Farley MM, Schaffner W, et al. Prevention of antibiotic-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* with conjugate vaccines. *J Infect Dis*. 2012; 205:401.
176. Mirović V. Antibiotici i osnovni principi njihove kliničke primene. 1. izd. Beograd: Čigoja štampa; 2003.
177. Zhanel GG, Dueck M, Hoban DJ, Vercaigne LM, Embil JM, Gin AS, et al. Review of macrolides and ketolides focus on respiratory tract infections. *Drugs*. 2001;61:443–98.
178. Gaynor M, Mankin AS. Macrolide Antibiotics: Binding Site, Mechanism of Action, Resistance. *Frontiers in Medicinal Chemistry*. 2005;2:21–35.
179. Pai MP, Graci DM, Amsden GW. Macrolide drug interactions: an update *Ann Pharmacother*. 2000 Apr;34(4):495–513.
180. Ballou C. H and Amsden GW. Azithromycin: the first azalide antibiotic. *Ann Pharmacother*. 1992;26:1253–61.
181. Leclercq R, Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:2727–34.
182. Allain P. Antibiotics targeting the 50S ribosomal subunit [database on the Internet]. *Pharmacorama Charter (US)*. c2000 [ updated 2009 July]. Available from: [webmaster@pharmacorama.com](mailto:webmaster@pharmacorama.com)./8/5/2013.
183. Vázquez D. Inhibitors of protein biosynthesis. In: Kleinzeller A, Springer GF, Wittmann HG, eds. *Molecular biology, biochemistry and biophysics*. Berlin: Springer-Verlag; 1979. p.103–77.
184. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1995 March;39(3):577-85.
185. Kannan K, Vázquez-Laslop N, Mankin AS. Selective Protein Synthesis by Ribosomes with a Drug-Obstructed Exit Tunnel. *Cell*. 2012;151(3):508-20..
186. Douthwaite S, Hansen HL, Mauvais P. Macrolide–ketolide inhibition of MLS-resistant ribosomes is improved by alternative drug interaction with domain II of 23S rRNA. *Molecular Microbiology*. 2000;36(1):183–93.
187. Polacek N, Mankin AS. The ribosomal peptidyl transferase center: structure, function, evolution, inhibition. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2005;40(5):285–311.
188. Visalli MA, Jacobs MR, Appelbaum PC. Susceptibility of twenty penicillin-susceptible and -resistant pneumococci to levofloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, erythromycin, azithromycin, and clarithromycin by MIC and time-kill. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1997 Jul;28(3):131–7.
189. Berry V, Hoover J, Singley C, Woodnutt G. Bacteriological Efficacies of Three Macrolides Compared with Those of Amoxicillin-Clavulanate against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(12):3193–9.
190. Edelstein PH. Pneumococcal resistance to macrolides, lincosamides, ketolides and streptogramin B agents: molecular mechanisms and resistance phenotypes. *Clin Infect Dis*. 2004;4:S322–7.
191. Topisirović Lj, Jovčić B. Antibiotici: molekularni mehanizmi delovanja i rezistencije. 1. izd. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet; 2013.
192. Harms JM, Schlunzen F, Fucini P, Bartels H, Yonath A. Alterations at the peptidyl transferase centre of the ribosome induced by the synergistic action of the streptogramins dalbopristin and quinupristin. *BMC Biol* 2004;2:4.
193. Tenson T, Lovmar M, Ehrenberg M. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol*. 2003;330:1005–14.
194. Bryskier A. Ketolides-telithromycin, an example of a new class of antibacterial agents. *Clin Microbiol Infect*. 2000;6:661–9.
195. Hamilton-Miller JM, Shah S. Activity of ketolide ABT-773 (cethromycin) against erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: correlation with extended MLSK phenotypes. *J Antimicrob Chemoter*. 2002;50:907–13.
196. Denis A, Bretin F, Fromentin C, Bonnet A, Piltan G, Bonnefoy A, et al. Beta-keto-ester chemistry and ketolides. Synthesis and antibacterial activity of 2-halogeno, 2-methyl and 2,3 enol-ether ketolides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2000;10(17):2019–22.
197. Ackermann G and Rodloff AC. Drugs of the 21<sup>st</sup> century: telithromycin (HMR 3647) – the first ketolide. *J Antimicrob Chemoter*. 2003;51:497–511.

198. Xiong L, Shah S, Mauvais P, Mankin AS. A ketolide resistance mutation in domain II of 23S rRNA reveals the proximity of hairpin 35 to the peptidyl transferase centre. *Mol Microbiol.* 1999 Jan;31(2):633–9.
199. Pascual A, Ballesta S, Garcia I, Perea EJ. Uptake and intracellular activity of ketolide HMR 3647 in human phagocytic and non-phagocytic cells. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:65–9.
200. Hagberg L, Carbon C, Van Rensburg DJ, Fogarty C, Dunbar L, Pullman J. Telithromycin in the treatment of community-acquired pneumonia: a pooled analysis. *Respir Med.* 2003;97:625–33.
201. Waxman DJ and Strominger JL. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:825–69.
202. Doern GV, Brueggemann A, Holley HP Jr, and Rauch AM. Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* recovered from outpatients in the United States during the winter months of 1994. to 1995: results of a 30-center national surveillance study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996;40:1208–13.
203. Hakenbeck R, Ellerbrok H, Briese T, Handwerger S, Tomasz A. Penicillin-binding proteins of penicillin-susceptible and -resistant pneumococci: immunological relatedness of altered proteins and changes in peptides carrying the beta-lactam binding site. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986; 30(4): 553–8.
204. Kell CM, Sharma UK, Dowson CG, Town C, Balganesi TS, Spratt BG. Deletion analysis of the essentiality of penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2X of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett.* 1993;106:171–6.
205. Arkins ER, Koehler JM. Use of the observation option and compliance with guidelines in treatment of acute otitis media. *Ann Pharmacother.* 2008;42:726–7.
206. Aspa J, Rajas O, De Castro FR. Pneumococcal antimicrobial resistance: therapeutic strategy and management in community-acquired pneumonia. *Expert Opin Pharmacother.* 2008;9:229–41.
207. File TM Jr, Garau J, Blasi F, Chidiac C, Klugman K, Lode H, et al. Guidelines for empiric antimicrobial prescribing in community-acquired pneumonia. *Chest.* 2004;125:1888–901.
208. Hedlund J, Stralin K, Ortvist A and Holmberg H. Swedish guidelines for the management of community-acquired pneumonia in immunocompetent adults. *Scand J Infect Dis.* 2005;37:791–805.
209. Odenholt I, Bylander-Groth A, Frimodt-Moller N, Rokstad KS and Moltstad S. Differences in antibiotic prescribing patterns between practitioners in Scandinavia: a questionnaire study. *Scand J Infect Dis.* 2002;34:602–9.
210. Peterson LR. Penicillins for treatment of pneumococcal pneumonia: does in vitro resistance really matter? *Clin Infect Dis.* 2006;42:224–33.
211. Quach C, Collet JP and LeLorier J. Acute otitis media in children: a retrospective analysis of physician prescribing patterns. *Br J Clin Pharmacol.* 2004;57:500–5.
212. Rautakorpi UM, Huikko S, Honkanen P, Klaukka T, Makela M, Palva E, et al. The Antimicrobial Treatment Strategies (MIKSTRA) program: a 5-year follow-up of infection-specific antibiotic use in primary health care and the effect of implementation of treatment guidelines. *Clin Infect Dis.* 2006;42:1221–30.
213. Jacobs MR. Drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: rational antibiotic choices. *Am J Med.* 1999;106:19S–25S; discussion 48S–52S.
214. Anderson VE, Gootz TD, Osheroff N. Topoisomerase IV catalysis and the mechanism of quinolone action. *J Biol Chem.* 1998;273:17879–85.
215. Wolfson JS, Hooper DC. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 1989;2:378–424.
216. Moazed D, Noller HF. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature.* 1987;327:389–94.
217. Shaw WV, Leslie AG. Chloramphenicol acetyltransferase. *Annu Rev Biophys Chem.* 1991;20:363–86.
218. Hansman D, Bullen MM. A resistant pneumococcus. *Lancet.* 1967;1:264–5.
219. Jacobs MR, Koornhof HJ, Robins-Browne RM, et al. Emergence of multiply resistant pneumococci. *N Engl J Med.* 1978;299(14):735–40.
220. Appelbaum PC, Bhamjee A, Scragg JN, Hallett AF, et al. *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. *Lancet.* 1977;2(8046):995–7.
221. Charpentier E and Tuomanen E. Mechanisms of antibiotic resistance and tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbes Infect.* 2000;2:1855–64.
222. Farrel DJ, Couturier C, Hryniewicz W. Distribution and antibacterial susceptibility of macrolide resistance genotypes in *Streptococcus pneumoniae*: PROTEKT Year 5 (2003-2004). *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31:245–9.
223. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:577–85.



224. Weisblum B. Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:797–805.
225. Schlunzen F, Zarivach R, Harms J, Bashan A, Tocilj A, Albrecht R, et al. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. 2001;413:814–21.
226. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999;42:2823–30.
227. Seppala H, Skurnik M, Soini H, Roberts MC and Huovinen P. A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:257–62.
228. Ayoubi P, Kilic AO, Vijayakumar MN. Tn5253, the pneumococcal omega (cat tet) BM6001 element, is a composite structure of two conjugative transposons, Tn5251 and Tn5252. *J Bacteriol.* 1991;173:1617–22.
229. David F, De Cespedes G, Delbos F, Horaud T. Diversity of chromosomal genetic elements and gene identification in antibiotic-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus bovis*. *Plasmid.* 1993;29:147–53.
230. Franke AE, Clewell DB. Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of “conjugal” transfer in the absence of a conjugative plasmid. *J Bacteriol.* 1981;145:494–502.
231. Le Bougunc C, De Cespedes G, Horaud T. Molecular analysis of a composite chromosomal conjugative element (Tn3701) of *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.* 1988;170:3930–6.
232. Le Bougunc C, De Cespedes G, Horaud T. Presence of chromosomal elements resembling the composite structure Tn3701 in streptococci. *J Bacteriol.* 1990;172:727–34.
233. Vijayakumar MN, Priebe SD, Guild WR. Structure of a conjugative element in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 1986;166:978–84.
234. Courvalin P, Carlier C. Tn1545: a conjugative shuttle transposon. *Mol Gen Genet.* 1987;206:259–64.
235. Courvalin P, Carlier C. Transposable multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Gen Genet.* 1986;205:291–7.
236. Del Grosso M, Camilli R, Iannelli F, Pozzi G, Pantosti A. The *mef(E)*-carrying genetic element (mega) of *Streptococcus pneumoniae*: insertion sites and association with other genetic elements. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:3361–6.
237. Seppala H, Nissen A, Yu Q and Huovinen P. Three different phenotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Finland. *J Antimicrob Chemoter.* 1993;32:885–91.
238. Sutcliffe J. Resistance to macrolides mediated by efflux mechanisms. *Current Opinion in Anti-infective Investigational Drugs.* 1999;1:403–12.
239. Clancy J, Petitpas J, Dib-Hajj F, Yuan W, Cronan M, Kamath AV, et al. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 1996;22:867–79.
240. Tait-Kamradt A, Clancy J, Cronan M, Dib-Hajj F, Wondrack L, Yuan W. et al. *MefE* is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:2251–5.
241. Daly MM, Doktor S, Flamm R, Shortridge D. Characterization and prevalence of *MefA*, *MefE*, and the associated *msr(D)* gene in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 2004;42:3570–4.
242. Del Grosso M, Iannelli F, Messina C, Santagati M, Petrosillo N, Stefani S, et al. Macrolide efflux genes *mef(A)* and *mef(E)* are carried by different genetic elements in *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 2002;40:774–8.
243. Santagati M, Iannelli F, Oggioni MR, Stefani S and Pozzi G. Characterization of a genetic element carrying the macrolide efflux gene *mef(A)* in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:2585–7.
244. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P. Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(12):2823–30.
245. Sutcliffe J, Tait-Kamradt A, Wondrack L. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1996;40:1817–24.
246. Luna VA, Coates P, Eady EA, Cove JH, Nguyen TT, Roberts MC. A variety of gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 1999;44:9–25.
247. Tait-Kamradt A, Davies T, Appelbaum PC, Depardieu F, Courvalin P, Petitpas J, et al. Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Dec;44(12):3395–401.

248. Musher DM, Dowell ME, Shortridge VD, Flamm RK, Jorgensen JH, Le Maqueres P, et al. Emergence of macrolide resistance during treatment of pneumococcal pneumonia. *N Engl J Med.* 2002 Feb 21;346(8):630–1.
249. Farrell DJ, Douthwaite S, Morrissey I, et al. Macrolide resistance by ribosomal mutation in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the PROTEKT 1999–2000. study. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1777–83.
250. Doktor SZ, Shortridge VD, Beyer JM, Flamm RK. Epidemiology of macrolide and/or lincosamide resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates with ribosomal mutations. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004 May;49(1):47–52.
251. Davies TA, Bush K, Sahm D, Evangelista A. Predominance of 23S rRNA mutants among non-erm, non-mef macrolide-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* collected in the United States in 1999–2000. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Jul;49(7):3031–3.
252. Tait-Kamradt A, Davies T, Cronan M, Jacobs M. R, Appelbaum P. C and Sutcliffe J. Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:2218–25.
253. Canu A, Malbruny B, Coquemont M, Davies TA, Appelbaum PC, Leclercq R. Diversity of ribosomal mutations conferring resistance to macrolides, clindamycin, streptogramin and telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:125–31.
254. Nagai K, Appelbaum PC, Davies TA, Kelly LM, Hoellman DB, Andrasevic AT, et al. Susceptibilities to telithromycin and six other agents and prevalence of macrolide resistance due to L4 ribosomal protein mutation among 992 pneumococci from 10 Central and Eastern European countries. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:371–7.
255. Reinert RR, Wild A, Appelbaum P, Lutticken R, Cil MY, Al-Lahham A. Ribosomal mutations conferring resistance to macrolides in *Streptococcus pneumoniae* clinical strains isolated in Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003;47:2319–22.
256. Bozdogan B, Appelbaum PC, Kelly LM, Hoellman DB, Tambic-Andrasevic A, Drukalska L, et al. Activity of telithromycin compared with seven other agents against 1039 *Streptococcus pyogenes* pediatric isolates from ten centers in central and eastern Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9:741–5.
257. Farrell DJ, Shackcloth J, Barbadora KA and Green MD. *Streptococcus pyogenes* isolates with high-level macrolide resistance and reduced susceptibility to telithromycin associated with 23S rRNA mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:817–8.
258. Jalava J, Vaara M and Houvinen P. Mutation at the position 2058 of the 23S rRNA as a cause of macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2004;3:5.
259. Depardieu F, Courvalin P. Mutation in 23S rRNA responsible for resistance to 16-membered macrolides and streptogramin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:319–23.
260. Jalava J, Kataja J, Sepala H and Houvinen P. In vitro activities of the novel telithromycin (HMR 3647) against erythromycin-resistant *Streptococcus* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:789–93.
261. Kozlov RS, Bogdanovitch TM, Appelbaum PC, Ednie L, Stratchounski LS, Jacobs MR, et al. Antistreptococcal activity of telithromycin compared with seven other drugs in relation to macrolide resistance mechanisms in Russia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:2963–8.
262. Kresken M, Henrichfreise B, Bagel S, Brauers J and Wiedmann B. High prevalence of the ermB gene among erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Germany during the winter of 2000–2001 and in vitro activity of telithromycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:3193–5.
263. Morosini MI, Canton R, Loza E, Negri MC, Galan JC, Almaraz F et al. In vitro activity of telithromycin against Spanish *Streptococcus pneumoniae* isolates with characterized macrolide resistance mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:2427–31.
264. Wiess K, Guilbault C, Cortes L, Restieri C and Low DE. Genotypic characterization of macrolide-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Quebec, Canada and in vitro activity of ABT-773 and telithromycin. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50:403–6.
265. Santagati M, Iannelli F, Cascone C, et al. The novel conjugative transposon tn1207.3 carries the macrolide efflux gene mef(A) in *Streptococcus pyogenes*. *Microb Drug Resist.* 2003;9:243–7.
266. Farrell DJ, Felmingham D. Activities of telithromycin against 13,874 *Streptococcus pneumoniae* isolates collected between 1999. and 2003. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:1882–4.
267. Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Buckridge S, and Felmingham D. In vitro activities of telithromycin, linezolid and quinupristin-dalfopristin against *Streptococcus pneumoniae* with macrolide resistance due to ribosomal mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:3169–71.

268. 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):4180–4.
269. Hisanaga T, Hoban DJ, Zhanel GG. Mechanisms of resistance to telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* Epub 2005 Jul 8. 2005 Sep;56(3):447–50.
270. Grebe T, Hakenbeck R. Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:829–34.
271. Coffey TJ, Dowson CG, Daniels M, Zhou J, Martin C, Spratt BG, et al. Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 1991;5:2255–60.
272. Hakenbeck R, König A, Kern I, Van Der Linden M, Keck W, Billot-Klein D, et al. Acquisition of five high-Mr penicillin-binding protein variants during transfer of high-level beta-lactam resistance from *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 1998;180:1831–40.
273. Hauser C, Aebi S, Muhlemann K. An internationally spread clone of *Streptococcus pneumoniae* evolves from low-level to higher-level penicillin resistance by uptake of penicillin-binding protein gene fragments from nonencapsulated pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:3563–6.
274. Hakenbeck R. Transformation in *Streptococcus pneumoniae*: mosaic genes and the regulation of competence. *Res Microbiol.* 2000;151(6):453 uptake 6.
275. Dowson CG, Hutchison A, Woodford N, Johnson AP, George RC, Spratt BG. Penicillin-resistant viridans streptococci have obtained altered penicillin-binding protein genes from penicillin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1990;87:5858–62.
276. Denapaite D, Chi F, Maurer P, Nolte O, Hakenbeck R. Mechanisms of Penicillin Resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Targets, Gene Transfer, and Mutations. In: Hakenbeck R, Chhatwal S, editors. *Molecular Biology of Streptococci.* Norfolk: Horizon Bioscience; 2007. p 292-303.
277. Bosley GS, Elliott JA, Oxtoby MJ, Facklam RR. Susceptibility of relatively penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* to newer cephalosporin antibiotics. *Diagn Microbiol Dis.* 1987;7:21–7.
278. Fenoll A, Gimenez J, Robledo O, Aguilar L, Tarrago D, Granizo JJ, et al. In vitro activity of oral cephalosporins against pediatric isolates of *Streptococcus pneumoniae* non-susceptible to penicillin, amoxicillin or erythromycin. *J Chemother.* 2008;20:175–9.
279. Reichmann P, König A, Marton A, Hakenbeck R. Penicillin-binding proteins as resistance determinants in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist.* 1996;2(2):177–81.
280. Dowson CG, Johnson AP, Cercenado E, George RC. Genetics of oxacillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* that are oxacillin resistant and penicillin susceptible. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(1):49–53.
281. Muñoz R, Dowson CG, Daniels M, Coffey TJ, Martin C, Hakenbeck R, et al. Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 1992 Sep;6(17):2461–5.
282. Coffey TJ, Daniels M, McDougal LK, Dowson CG, Tenover FC, Spratt BG. Genetic analysis of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Jun;39(6):1306–13.
283. Schmitz FJ, Higgins PG, Mayer S, Fluit AC, Dalhoff A. Activity of quinolones against gram-positive cocci: mechanisms of drug action and bacterial resistance. 2002;21:647–59.
284. Adam HJ, Schurek KN, Nichol KA, Hoban CJ, Baudry TJ, Laing NM, et al. Molecular characterization of increasing fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates in Canada 1997–2005. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:198–207.
285. Harding I, Simpson I. Fluoroquinolones: is there a different mechanism of actions and resistance against *Streptococcus pneumoniae*? *J Chemother.* 2000;4:7–15.
286. Pan XS, Ambler J, Mehtar S, Fisher LM. Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:2321–6.
287. Pan XS, Yague G, Fisher LM. Quinolone resistance mutations in *Streptococcus pneumoniae* GyrA and ParC proteins: mechanistic insights into quinolone action from enzymatic analysis, intracellular levels and phenotypes of wild-type and mutant proteins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:3140–7.
288. Pletz MW, Fugit RV, McGee L, Glasheen JJ, Keller DL, Welte T, et al. Fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1462–3.

289. Pletz MW, McGee L, Jorgensen J, Beall B, Facklam RR, Whitney CG, et al. Levofloxacin-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in the United States: evidence for clonal spread and the impact of conjugate pneumococcal vaccine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:3491–7.
290. Zhanel GG, Walkty A, Nichol K, Smith H, Noreddin A, Hoban DJ. Molecular characterization of fluoroquinolone resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates obtained from across Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;45:63–7.
291. Klugman KP. Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3:171–96.
292. Luna VA, Roberts MC. The presence of tetO gene in a variety of tetracycline-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotypes from Washington State. *J Antimicrob Chemother.* 1998;42:613–19.
293. Schmitz FJ, Perdikouli M, Beeck A, Verhoef J, Fluit AC. Molecular surveillance of macrolide, tetracycline and quinolone resistance mechanisms in 1911 clinical European *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 2001;18:433–6.
294. Widdowson CA, Klugman KP, Hanslo D. Identification of the tetracycline resistance gene, tet(O), in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:2891–3.
295. Widdowson CA and Klugman KP. The molecular mechanisms of tetracycline resistance in the pneumococcus. *Microb Drug Resist.* 1998;4:79–84.
296. Burdett V, Inamine J, Rajagopalan S. Heterogeneity of tetracycline resistance determinants in *Streptococcus*. *J Bacteriol.* 1982 Mar;149(3):995–1004.
297. McDougal LK, Tenover FC, Lee LN, Rasheed JK, Patterson JE, Jorgensen, et al. Detection of Tn917-like sequences within a Tn916-like conjugative transposon (Tn3872) in erythromycin-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* Sep 1998; 42(9): 2312–8.
298. Houvinen P. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clin Infect Dis.* 2001;32:1608–14.
299. Widdowson CA, Klugman KP. Molecular mechanisms of resistance to commonly used non-beta lactam drugs in *Streptococcus pneumoniae*. *Semin Respir Infect.* 1999;14:255–68.
300. Meka VG, Gold HS. Antimicrobial resistance to linezolid. *Clin Infect Dis.* 2004;39:1010–5.
301. Wolter N, Smith AM, Farrell DJ, Schaffner W, Moore M, Whitney CG, et al. Novel mechanism of resistance to oxazolidinones, macrolides, and chloramphenicol in ribosomal protein L4 of the pneumococcus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(8):3554–7.
302. Jones RN, Farrell DJ, Morrissey I. Quinupristin-dalfopristin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: novel L22 ribosomal protein mutation in two clinical isolates from the SENTRY antimicrobial surveillance program. 2003;47(8):2696–8.
303. Padayachee T, Klugman KP. Molecular basis of rifampin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999;43:2361–5.
304. Ferrandiz MJ, Ardanuy C, Linares J, Garcia-Arenzana JM, Cercenado E, Fleites A, et al. The Spanish Pneumococcal Infection Study Network. New mutations and horizontal transfer of rpoB among rifampin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from four Spanish hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49:2237–45.
305. Dang-Van A, Tiraby G, Acar JF, Shaw WV, Bouanchaud DH. Chloramphenicol resistance in *Streptococcus pneumoniae*: enzymatic acetylation and possible plasmid linkage. *Antimicrob Agents Chemother.* 1978 Apr;13(4):577–83.
306. Felmingham D, Reinhart RR, Hirakata Y, Rodloff A. Increasing prevalence of antibiotic resistance among isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the PROTEKT surveillance study, and comparative in vitro activity of the ketolide, telithromycin. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50(Suppl. S1):25–37.
307. Dixon JMS. Pneumococcus resistant to erythromycin and lincomycin. *Lancet.* 1967; i:573.
308. Klugman K. Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3:171–96.
309. Geslin P, Buu-Hoi A, Fremaux A, Acar JF. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* : an epidemiological survey in France, 1970-1990. *Clin Infect Dis.* 1992;15, 95–8.
310. Geslin P, Frémaux A, Sissia G, Spicq C. *Streptococcus pneumoniae*: serotypes, invasive and antibiotic resistant strains. Current situation in France. *Presse Med.* 1998;27(Suppl. 1):21–27.
311. Austrian R, Gold J. Pneumococcal bacteremia with special reference to bacteremic pneumococcal pneumonia. *Ann Intern Med.* 1964;60:759–76.
312. Hansman D, Glasgow H, Sturt J, Devitt L and Douglas R. Increased resistance to penicillin of pneumococci isolated from man. *N Engl J Med.* 1971;284:175–7.
313. Appelbaum PC. World-wide development of antibiotics resistance in pneumococci. *Eur J Clin Microbiol.* 1987;6:367–77.

314. 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;55:111–8.
315. 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-surveillance-europe-2012.pdf>./8/3/2013/.
316. Nagai K, Shibasaki Y, Hasegawa K, Davies TA, Jacobs MR, Ubukata K, Evaluation of PCR primers to screen for *Streptococcus pneumoniae* isolates and beta-lactam resistance, and to detect common macrolide resistance determinants. *J Antimicrob Chemother.* 2001 Dec;48(6):915–8.
317. Sorens UB. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. *J Clin Microbiol.* 1993;31:2097–100.
318. Montanari MP, Cochetti I, Mingoia M, Varaldo PE. Phenotypic and molecular characterization of tetracycline and erythromycin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;7(47):2236–41.
319. Calatayud L, Ardanuy C, Cercenado E, et al. Serotypes, clones and mechanisms of resistance of erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates collected in Spain. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2007;9(51):3240–6.
320. Montanari MP, Mingoia M, Giovanetti E, Varaldo PE. Differentiation of Resistance Phenotypes among Erythromycin-Resistant Pneumococci. *J Clin Microbiol.* 2001;4(39):1311–5.
321. Van der Linden M, Al-Lahham A, Hauptus S, Reinert RR. Clonal spread of *mef*-positive macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates causing invasive disease in adults in Germany. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;5(51):1830–4.
322. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement M100–S23. Wayne, PA, USA: CLSI; 2013.
323. Van Bambeke F, Reinert R, Appelbaum P, et al. Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* infections. *Drugs.* 2007;67:2355–82.
324. Jenkins S, Brown S, Farrell D. Trends in antibacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA: update from PROTEKT US Years 1–4. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2008;11;7:1.
325. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Versions 1.3 and 2.0. Available from: [http://www.eucast.org/antimicrobial\\_susceptibility\\_testing/previous\\_versions\\_of\\_tables/](http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/previous_versions_of_tables/)23/5/ 2013.
326. Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Felmingham D. Detection of macrolide resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* using a multiplex rapid cycle PCR with microwell-format probe hybridization. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48:541–4.
327. Amezaga MR, Carter PE, Cash Ph, McKenzie H. Molecular epidemiology of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates from blood and noninvasive sites. *J Clin Microbiol.* 2002;9(40):3313–8.
328. 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.
329. 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.
330. Rudan I, Boschi-Pinto C, Biloglav Z, Mulholland K, Campbell H. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia *Bull World Health Organ.* 2008;86(5):408–16.
331. Huang SS, Johnson KM, Ray GT, Wroe P, Lieu TA, Moore MR, et al. Healthcare utilization and cost of pneumococcal disease in the United States. *Vaccine.* 2011;29(18):3398–412.
332. Thigpen MC, Whitney CG, Messonnier NE, Zell ER, Lynfield R, Hadler JL, et al. Bacterial meningitis in the United States, 1998–2007. *N Engl J Med.* 2011;364(21):2016–25.
333. Erdem H, Elaldi N, Oztoprak N, et al. Mortality indicators in pneumococcal meningitis: therapeutic implications. *International Journal of Infectious Diseases.* 2014;19:13–19.
334. Stockmann C, Ampofo K, Byngton CL, Filloux F, Hersh AL, Blaschke AJ, et al. Pneumococcal meningitis in children: epidemiology, serotypes, and outcomes from 1997–2010. in *Utah. Pediatrics.* 2013;132(3):421–8.
335. Lexau CA, Lynfield R, Danila R, Pilishvili T, Facklam R, et al. Changing epidemiology of invasive pneumococcal disease among older adults in the era of pediatric pneumococcal conjugate vaccine. *JAMA.* 2005;294(16):2043–51.

336. Moore MR, Pilishvili T, Bennett N, et al. Trends in invasive pneumococcal disease among adults, 1998-2004: Implications for conjugate vaccine development. International Conference on Emerging Infectious Diseases; 2006; Atlanta, GA:2006.
337. Al Bekairy AM, Al Harbi S, Alkatheri AM, Al Dekhail S, Al Swaidan L, Khalidi N. Bacterial meningitis: An update review. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2014;8(18):469–78.
338. Klugman KP, Lonks JR. Hidden epidemic of macrolide-resistant pneumococci. Emerg Infect Dis. 2005;11:802–7.
339. Gajić I, Mijač V, Ranin L, Anđelković D, Radičević M, Opavski N. Invazivni sojevi *Streptococcus pneumoniae* u Srbiji: osetljivost na antibiotike i serotipovi. Srp Arh Celok Lek. 2013;141(1–2):48–53.
340. Beekmann SE, Heilmann KP, Richter SS, Garcia-de-Lomas J, Doern GV. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella Catarrhalis* and  $\beta$ -haemolytic streptococci in 2002–2003. Results of the multinational GRASP surveillance program. Int J Antimicrob agents. 2005;25:148–56.
341. Čizman M, Beovič B, Krcmery V, Bašić B, Tamm E, Ludwig E, et al. Antibiotic policies in Central Eastern Europe. Int J Antimicrob Agents. 2004;24(3):199–204.
342. Kastrin T, Gubina M, Paragi M, Kolman J, Cizman M, Kraigher A, et al. Macrolide resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* in Slovenia. J Antimicrob Chemother. 2008;62:628–9.
343. Oppenheim B, Koornhof HJ, Austrian R. Antibiotic-resistant pneumococcal disease in children at Baragwanath Hospital, Johannesburg. Pediatr Infect Dis. 1986;5:520–4.
344. Doern GV, Brown SD. Antimicrobial susceptibility among community-acquired respiratory tract pathogens in the USA: data from PROTEKT US 2000–01. J Infect 2004;48:56–65.
345. Perez-Trallero E, Fernandez-Mazarrasa C, Garcia-Rey C, et al. Antimicrobial susceptibilities of 1,684 *Streptococcus pneumoniae* and 2,039 *Streptococcus pyogenes* isolates and their ecological relationships: results of a 1-year (1998–1999.) multicenter surveillance study in Spain. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45:3334–40.
346. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. N Engl J Med. 2000;343:1917–24.
347. Ducoffre, G. Surveillance van Infectieuzen Aandoeningen door een Netwerk van Laboratoria voor Microbiologie 1997 and Epidemiologische Trends 1983–1996. (Institute of Public Health– Louis Pasteur), Ministry of Social Services, Public Health and Environment, Brussels, 1998..
348. Dias, R, Louro D, Canica M. Antimicrobial susceptibility of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Portugal over an 11-year period. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:2098–105.
349. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011, Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Available from: [http:// www.ecdc.europa.eu/18/3/2013](http://www.ecdc.europa.eu/18/3/2013).
350. Tarpay MM, Welch DF, Salari H, Marks MI. In vitro activity of antibiotics commonly used in the treatment of otitis media against *Streptococcus pneumoniae* isolates with different susceptibilities to penicillin. Antimicrob. Agents Chemother. 1982. 22:145–7.
351. Gay K, Baughman W, Miller Y, Jackson D, Whitney CG, Schuchat A, et al. The emergence of *Streptococcus pneumoniae* resistant to macrolide antimicrobial agents: a 6-year population-based assessment. J Infect Dis. 2000;182:1417–24.
352. Johnston NJ, De Azavedo JC, Kellner JD, Low DE. Prevalence and characterization of the mechanisms of macrolide, lincosamide, and streptogramin resistance in isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42:2425–6.
353. Sutcliffe J, Tait-Kamradt A, Wondrack L. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. Antimicrob Agents Chemother. 1996;40:1817–24.
354. Felmingham D, White AR, Jacobs MR, et al. The Alexander Project: the benefits from a decade of surveillance. J Antimicrob Chemother. 2005;56(suppl 2):ii3–ii21.
355. Farrell DJ, Jenkins SG. Distribution across the USA of macrolide resistance and macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* isolates collected from patients with respiratory tract infections: PROTEKT US 2001–2002. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2004;54, Suppl. S1,117–122.
356. 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.
357. Thornsberry C, Sahm DF, Kelly LJ, et al. Regional trends in antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in the United States: results from the TRUST Surveillance Program, 1999–2000. Clin Infect Dis. 2002;34 Suppl 1:S4–S16.

358. Farrell DJ, Jenkins SG, Brown SD, et al. Emergence and spread of *Streptococcus pneumoniae* with erm(B) and mef(A) resistance. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11(6):851-8.
359. Doern G.V, Richter S.S, Miller A, et al. Antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae* in the United States: have we begun to turn the corner on resistance to certain antimicrobial classes? *Clin Infect Dis.* 2005;41(2):139-48.
360. Jenkins SG, Farrell DJ. Increase in pneumococcus macrolide resistance, United States. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(8):1260-4.
361. Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, et al. Changing epidemiology of antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 2004-2005. *Clin Infect Dis.* 2009; 48(3):e23-33.
362. Michael AP, Farrell DJ, Sader HS, Jones RN. AWARE Ceftaroline Surveillance Program (2008-2010.): Trends in Resistance Patterns Among *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the United States. *Clinical Infectious Diseases.* 2012;55(S3):S187-93.
363. Jones RN, Sader HS, Mendes RE, Flamm RK. Update on antimicrobial susceptibility trends among *Streptococcus pneumoniae* in the United States: report of ceftaroline activity from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2011). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;75(1):107-9.
364. Wierzbowski AK, Nichol K, Laing N, et al. Macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* isolated over 6 years of Canadian Respiratory Organism Susceptibility Study (CROSS) (1998-2004.). *J Antimicrob Chemother.* 2007;60:733-40.
365. Zhanel GG, Palatnick L, Nichol KA, et al. Antimicrobial resistance in respiratory tract *Streptococcus pneumoniae* isolates: results of the Canadian Respiratory Organism Susceptibility Study, 1997. to 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:1867-74.
366. Zhanel GG, Adam HJ, Low D, et al. Antimicrobial susceptibility of 15,644 pathogens from Canadian hospitals: results of the CANWARD 2007-2009 study. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;69:291-306.
367. Reijtman V, Gagetti P, Faccione D, Fossati S, et al. Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolated from Argentinian pediatric patients suffering from acute otitis media. *Rev Argent Microbiol.* 2013;45(4):262-6.
368. Weber FT, Dias C, Da Costa M. antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* and genotypic characterization of erythromycin-resistant strains in Porto Alegre, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2010;41:1-5.
369. Arredondo-García JL, Calderón E, Echániz-Aviles G, Soto-Noguerón A, Arzate P, Amábile-Cuevas CF. Serotypes and antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolates causative of invasive diseases in Mexican children. *Infect Dev Ctries* 2011; 5(2):119-22.
370. Borg MA, Tiemersma E, Scicluna E, 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;15:232-7.
371. Gottlieb T, Collignon P, Robson J, Pearson J, Bell J; the Australian Group on Antimicrobial Resistance (AGAR). Prevalence of antimicrobial resistances in *Streptococcus pneumoniae* in Australia, 2005: report from the Australian Group on Antimicrobial Resistance. . *Commun Dis Intell Q Rep.* 2008;32:242-9.
372. Kargar M, Baghernejad M, Ghorbani-Dalini S, Najafi A. Multi-drug resistance and molecular pattern of erythromycin and penicillin resistance genes in *Streptococcus pneumoniae*. *African Journal of Biotechnology.* 2012;11(4):968-73.
373. Daoud Z, Kourani M, Saab R, Abi Nader M, Hajjar M. Resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated from Lebanese patients between 2005 and 2009. *Rev Esp Quimioter.* 2011;24(2):84-90.
374. Hecini-Hannachi A, Bentchouala C, Lezzar A, Belabed K, Laouar H, Smati F. Serotypes and antimicrobial resistance of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from East Algeria (2005-2011.). *African Journal of Microbiology Research.* 2014;8(2):167-77.
375. Kim SH, Song JH, Chung DR, Thamlikitkul V, Yang Y, Wang H, et al. Changing Trends in Antimicrobial Resistance and Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Asian Countries: an Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) Study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2012;56(3):1418-26.
376. Mayanskiy N, Alyabieva N, Ponomarenko O, Lazareva A, Katosova L, Ivanenko A, et al. Serotypes and antibiotic resistance of non-invasive *Streptococcus pneumoniae* circulating in pediatric hospitals in Moscow, Russia. *International Journal of Infectious Diseases.* 2014;20:58-62.
377. Zhou L, Ma X, Gao W, Yao K, Shen A, Yu S, et al. Molecular characteristics of erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from pediatric patients younger than five years in Beijing, 2010. *BMC Microbiol.* 2012;12:228.

- 378.Hotomi M, Billal DS, Shimada J, et al. Increase of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae*-expressing *mefE* or *ermB* gene in the nasopharynx among children with otitis media. *Laryngoscope*. 2005;115:317–20.
- 379.Hyde TB, Gay K, Stephens DS, Vugia DJ, Pass M, Johnson S, et al. Macrolide resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates. *JAMA*. 2001;286:1857–62.
- 380.Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M. ESAC Project Group. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet*. 2005;365:579–87.
- 381.Doern GV. Antimicrobial use and the emergence of antimicrobial resistance with *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *Clin Infect Dis*. 2001;33(Suppl. 3): S187–S192.
- 382.Jacobs MR. Drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: rational antibiotic choice. *Am J Med*. 1999; 106:19–25.
- 383.Dias R, Canica M. Emergence of invasive erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains in Portugal: contribution and phylogenetic relatedness of serotype 14. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54:1035–9.
- 384.World Health Organization. The World health report 2004-changing history. Available from: [http://www.who.int/whr/2004/en/report04\\_en.pdf?ua=1./10/9/2011](http://www.who.int/whr/2004/en/report04_en.pdf?ua=1./10/9/2011).
- 385.Klugman KP. Bacteriological evidence of antibiotic failure in pneumococcal lower respiratory tract infections. *Eur Respir J*. 2002;20(Suppl):36:3–8.
- 386.Jacobs MR. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and patterns of resistance. *Am J Med*. 2004;117(Suppl 3A):3–15S.
- 387.Metlay JP, Hofmann J, Cetron MS, Fine MJ, Farley MM, Whitney C, et al. Impact of penicillin susceptibility on medical outcomes for adult patients with bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2000;30:520–8.
- 388.Iannelli F, Santagat M, Doquier JD, Cassone M, Oggioni MR, Rossolini G, et al. Type M resistance to macrolides in streptococci is not due to the *mef(A)* gene, but to *mat(A)* encoding and ATP-dependent efflux pump [Abstract C1-1188]. In: Abstracts of the 44<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; Washington; 2004 Oct 30–Nov 2.
- 389.Wierzbowski AK, Swedlo D, Nichol K, Hisanaga T, Rusen J, Hoban D, et al. Resistance genotypes among macrolide resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated in Canada between 1997. and 2003. (Abstract C2-821). In: Abstracts of the 44<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; Washington; 2004 Oct 30–Nov 2.
- 390.Vanderkooi OG, Low DE, Green K, et al. Predicting antimicrobial resistance in invasive pneumococcal infections. *Clin Infect Dis*. 2005;40:1288–97.
- 391.Lonks JR, Garau J, Medeiros AA. Implications of antimicrobial resistance in the empirical treatment of community-acquired respiratory tract infections: the case of macrolides. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 50(Suppl. S2):87–92.
- 392.Waterer GW, Wunderink RG, Jones CB. Fatal pneumococcal pneumonia attributed to macrolide resistance and azithromycin monotherapy. *Chest*. 2000;118:1839–40.
- 393.Klugman KP. The successful clone: the vector of dissemination of resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2002;50(Suppl.S2):1–5.
- 394.Mijač V, Opavski N, Marković M, Gajić I, Vasiljević Z, Šipetić T, et al. Trends in macrolide resistance of respiratory tract pathogens in pediatric population in Serbia from 2004. to 2009. *Epidemiology and Infection*. Published online: 09 May 2014.
- 395.Agencija za lekove. Promet i potrošnja gotovih lekova za humanu upotrebu u republici Srbiji u 2011.godini. Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije-ALIMS. Izdavač: Helicon Publishing, Pančevo. Štampa: Grafolik, Beograd, 2012 godina.
- 396.Granizio JJ, Aguilar L, Casal J, et al *Streptococcus pyogenes* resistance to erythromycin in relation to macrolide consumption in Spain (1986-1997). *J Antimicrob Chemother*. 2000; 46:959–64.
- 397.Gaynor BD, Chidambaram JD, Cevallos V, Miao Y, Miller K, Jha HC, et al. Topical ocular antibiotics induce bacterial resistance at extraocular sites. *Br. J. Ophthalmol*. 2005;89:1097–9.
- 398.Chern KC, Shrestha SK, Cevallos V, Dhami HL, Tiwari P, Chern L, et al. Alterations in the conjunctival bacterial flora following a single dose of azithromycin in a trachoma endemic area. *Br J Ophthalmol*. 1999;83:1332–5.
- 399.Shortridge VD, Doern GV, Brueggemann AB, et al. Prevalence of macrolide resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* isolates from a multicenter antibiotic Resistance surveillance study conducted in the United States in 1994–1995. *Clin Infect Dis*. 1999;29:1186–8.
- 400.Hoban DJ, Wierzbowski AK, Nichol K, et al. Macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Canada during 1998–1999: prevalence of a *mef(A)* and *erm(B)* and susceptibilities to ketolides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:2147–50.



401. Leclercq R. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clinical Infectious Diseases*. 2002;34:482–92.
402. Jorgensen JH, McElmeel ML, Fulcher LC, McGee L, Glennen A. Evaluation of Disk Approximation and Single-Well Broth Tests for Detection of Inducible Clindamycin Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2011;49(9):3332–3.
403. Perez-Trallero E, Garcia-de-la-Fuente, Garcia-Rey, Baquero F, Aguilar L, Dal-Re R, et al. and Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Geographical and ecological analysis of resistance, coresistance and coupled resistance to antimicrobials in respiratory pathogenic bacteria in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:1965–72.
404. Descheemaeker P, Chapelle S, Lammens C, Hauchecorne M, Wijdooghe M, Vandamme P, et al. Macrolide resistance and erythromycin resistance determinants among Belgian *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2000;45(2):167–73.
405. Marchese A, Tonoli E, Debbia EA, Schito GC. Macrolide resistance mechanism and expression of phenotypes among *Streptococcus pneumoniae* circulating in Italy. *J Antimicrob Chemother*. 1999;44:461–4.
406. McGee L, Klugman K.P, Wasas A, Capper T, Brink A. Serotype 19F multiresistant pneumococcal clone harboring two erythromycin resistance determinants [erm(B) and mef(A)] in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1595–8.
407. Perez-Trallero E, Fernandez-Mazarrasa C, Garcia-Ray C, Bouza E, Aguilar L, Garcia-de-Lomas J, et al. The Spanish surveillance Group for Respiratory Pathogens. Antimicrobial susceptibilities of 1,684 *Streptococcus pneumoniae* and 2,039 *Streptococcus pyogenes* isolates and their ecological relationships: results of a 1-year (1998–1999.) multicenter surveillance study in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:3334–40.
408. Tiemei Z, Xiangqun F, Youning L. Resistance phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Beijing and Shenyang, China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(10): 4040–1.
409. Arredondo-García JL, Calderón E, Echániz-Aviles G, Soto-Noguerón A, Arzate P, Amábile-Cuevas CF. Serotypes and antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolates causative of invasive diseases in Mexican children. *J Infect Dev Ctries*. 2011;5(2):119–22.
410. Reinert RR, Ringelstein A, Van der Linden M, Cil MY, Al-Lahham A, Schmitz FJ. Molecular epidemiology of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Europe. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1294–300.
411. 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>.
412. Lonks JR, Garau J, Gomez L et al. Failure of macrolide antibiotic treatment in patients with bacteremia due to erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* *Clin Infect Dis*. 2002;35:556–64.
413. 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.
414. Gomez G. de la Pedrosa E, Baquero F, Loza E, Nadal-Serrano J.M, Fenoll A, Del Campo R, Canton R. High clonal diversity in erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* invasive isolates in Madrid, Spain (2000–07). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009;64:1165-9.
415. Setchanova LP, Alexandrova A, Dacheva D, Mitov I, Kaneva R, Mitev V. Dominance of multidrug-resistant denmark14-32 (ST230) clone among *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A isolates causing pneumococcal disease in Bulgaria from 1992 to 2013. *Microb Drug Resist*. In press. 2014.(Epub ahead of print).
416. Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Morris L, Buckridge S, Felmingham D. Molecular epidemiology of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* with both erm(B)- and mef(A)-mediated macrolide resistance. *J Clin Microbiol*. 2004;42:764-8.
417. Chawla K, Gurung B, Mukhopadhyay C, Bairy I. Reporting Emerging Resistance of *Streptococcus pneumoniae* from India. *J Glob Infect Dis*. 2010 Jan-Apr; 2(1): 10–14.
418. Bean D.C, Klena J.D. Prevalence of erm(A) and mef(B) erythromycin resistance determinants in isolates of *Streptococcus pneumoniae* from New Zealand. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002; 50:597-9.
419. Corso A, Severina E.P, Petruk VF, Mauriz Y.R, Tomasz A. Molecular Characterisation of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates causing respiratory disease in the United States. *Microbial Drug Resistance*. 1998; 4(4):325-37.
420. Farrell DJ, Couturier C, Hryniewicz W. Distribution and antibacterial susceptibility of macrolide resistance genotypes in *Streptococcus pneumoniae*: PROTEKT Year 5 (2003-2004). *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 31: 245-9.

421. Song J.H, Chang H.H, Suh J.Y, et al. Macrolide resistance and genotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: a study of the Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP). *J Antimicrob.Chemother.* 2004;53(3),457–63.
422. Jenkins SG, Farrell DJ, Patel M, et al. Trends in anti-bacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA, 2000-2003: PROTEKT US years 1-3. *J Infect.* 2005; 51:355-63.
423. Reinert RR, Reinert S, Van der Linden M, Cil M.Y, Al-Lahham A, Appelbaum P. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in eight European countries from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2903-13.
424. Neeleman C, De Valk JA, Klaassen CH, Meijers S, Mouton JW. 2005. In-vitro susceptibility and molecular characterisation of macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* isolates in The Netherlands: the DUEL 2 study. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11:312-8.
425. Van Eldere J, Meekers E, Lagrou K, Massonet C, Canu A, Devenyns I, et al. Macrolide-resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* isolates from Belgium. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11:332-4.
426. Wierzbowski AK, Nichol K, Laing N, Hisanaga T, Nikulin A, Karlowsky JA, Hoban D.J, Zhanel G.G. Macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* isolated over 6 years of Canadian Respiratory Organism Susceptibility Study (CROSS) (1998-2004). *J Antimicrob Chemother.* 2007;60:733-40.
427. Kislak JW, Razavi LM, Daly A.K, Finland M. Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. *Am J Med Sci.* 1965;250:261-8.
428. Naraqi S, Kirpatrick GP, Kabins S. Relapsing pneumococcal meningitis: isolation of an organism with decreased susceptibility to penicillin G. *J Pediatr.* 1974;85:671-3.
429. Mraovic M, Laban I. Antimicrobial susceptibility of penicillin resistant Pneumococci. Book of abstracts, second Mediterranean Congress of Chemotherapy, Nica 1980.
430. Marković M, Marjanović B, Mraović M, Sarjanović Lj, Vlajić B, Zečević B. Meningitis caused by penicillin and chloramphenicol resistant type 23F *Streptococcus pneumoniae*. Book of Abstracts. IX Convencio Jugoslavo – Italiano di Malattie Infettive. Beograd, 1988.
431. Opavski VN. Rezistencija *Streptococcus pneumoniae* na antibiotike. *Acta Infectologica Yugoslavica.* 1999; 4: 1-13.
432. Tomanovic B, Rezistencija sojeva *S. pneumoniae* na penicilin, *Vojno sanitetski pregled.* 1996; 53(5): 383-5.
433. Mladenović – Antić S, Kocić B, Stojanović P, Ivić S, Mladenović V. Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains to penicillin and ceftriaxone, isolated in the Niš district, Serbia during 1999-2006. Book of Abstracts. 25 th International Congress of Chemotherapy and 17 th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Munich, 2007.
434. Fenoll A, Granizo JJ, Aguilar L, et al. Temporal trends of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antimicrobial resistance patterns in Spain from 1979 to 2007. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 1012-20.
435. 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):1596–600.
436. Musher DM, Bartelett .G, Doern GV. A fresh look at the definition of susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to beta-lactam antibiotics. *Arch Intern Med.* 2001;161(21):2538-44.
437. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighteenth informational supplement. Document M100-S18. Wayne, PA:CLSI;2008.
438. Mera RM, Miller LA, Amrine-Madsen H, Sahm DF. Impact of new Clinical Laboratory Standards Institute *Streptococcus pneumoniae* penicillin susceptibility testing breakpoints on reported resistance changes over time. *Microb. Drug Resist.* 2011;17(1), 47–52.
439. Centers for Disease Control and Prevention. Effects of new penicillin susceptibility breakpoints for *Streptococcus pneumoniae* – United States, 2006–2007. *MMWR Morb.Mortal. Wkly. Rep.* 2008;57(50), 1353–5.
440. Su L.H, Wu T.L, Kuo A.J, Chia J.H, Chiu C.H. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* at a university hospital in Taiwan, 2000–07: impact of modified non-meningeal penicillin breakpoints in CLSI M100-S18. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009;64(2), 336–42.
441. European Antimicrobial Resistance Surveillance System. (EARSS, 2010). Available from: [http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111\\_SUR\\_AMR\\_data.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111_SUR_AMR_data.pdf)/12/5/2012.
442. Imohl M, Reinert R.R, Van der Linden M. New penicillin susceptibility breakpoints for *Streptococcus pneumoniae* and their effects on susceptibility categorisation in Germany (1992-2008). *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2009; 34(3):271-3.

443. Kempf M, Baraduc R, Bonnabau H, Brun M, Chabanon G, Chardon H, et al. Epidemiology and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in France in 2007: data from the pneumococcus surveillance network. *Microb Drug Resist.* 2011; 17(1):31-6.
444. Center for disease control and prevention. Active bacterial core surveillance report, emerging infections program network, *Streptococcus pneumoniae*, 2009. Available from: <http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/spneu09.pdf> /28/6/2012.
445. Jacobs MR, Good CE, Windau AR, et al. Activity of ceftaroline against recent emerging serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:2716–9.
446. Goossens MC, Catry B, Verhaegen J. Antimicrobial resistance to benzilpenicillin in invasive pneumococcal disease in Belgium, 2003-2010: the effect of altering clinical breakpoints. *Epidemiol Infect.* 2013; 141:490-495.
447. Pankuch GA, Visalli MA, Jacobs MR, Appelbaum PC. Susceptibilities of penicillin- and erythromycin-susceptible and –resistant pneumococci to HMR 3647 (RU 66647), a new ketolide, compared with susceptibilities to 17 other agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:624-30.
448. Chong CY, Koh-Cheng T, Yee-Hui M, Nancy TW. Invasive pneumococcal disease in Singapore children. *Vaccine.* 2008;26:3427-31.
449. Kim BN, Bae LG, Kim MN, Park SJ, Woo JH, Ryu J, Kim YS. Risk factors for penicillin resistance and mortality in Korean adults with *Streptococcus pneumoniae* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002;21:35-42.
450. McDougal LK, Rasheed JK, Biddle JW, Tenover FC. Identification of multiple clones of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39(10): 2282–8.
451. Powis J, McGeer A, Green K, Vanderkooi O, Weiss K, Zhanel G, et al. In vitro antimicrobial susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates obtained in Canada in 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:3305-11.
452. Bettinger JA, Scheifele DW, Halperin SA, Kellner JD, Tyrrell G. Invasive pneumococcal infections in Canadian children, 1998-2003: implications for new vaccination programs. *Can J Public Health.* 2007;98:111-5.
453. Poulakou G, Katsarolis I, Matthaopoulou I, Tsioufas S, Kanavaki S, Hatzaki D, et al. Nationwide surveillance of *Streptococcus pneumoniae* in Greece: patterns of resistance and serotype epidemiology. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:3305-11.
454. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Effect of new susceptibility breakpoints on reporting of resistance in *Streptococcus pneumoniae*-United States, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2004;53:152.
455. Karlowski JA, Thornsberry C, Jones ME, et al. Factors associated with relative rates of antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae* in the United States: results from the TRUST Surveillance Program (1998-2002). *Clin Infect Dis.* 2003;36:963-70.
456. Steigbigel NH, Reed CW, Finland M. Susceptibility of common pathogenic bacteria to seven tetracycline antibiotics in vitro. *Am J Med Sci.* 1968;255:179-95.
457. Holt R, Evans TN, Newman RL. Tetracycline-resistant pneumococci. *Lancet.* 1969;2:545.
458. Strachounski LS, Kozlov RS, Appelbaum PC, Kretchikova OI, Kosowska-Shick K. Antimicrobial resistance of nasopharyngeal pneumococci from children from day-care centres and orphanages in Russia: results of a unique prospective multicentre study. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:853-66.
459. Riedel S, Beekmann SE, Heilmann KP, Richter SS, Garcia-de-Lomas J, Ferech M, Goossens H, Doern G.V. Antimicrobial use in Europe and antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007;26:485-90.
460. Feldman C. Clinical relevance of antimicrobial resistance in the management of pneumococcal community-acquired pneumonia. *J Lab Clin Med.* 2004;143:269-83.
461. Ardanuy C, Rolo D, Fenoll A, Tarrago D, Calatayud L, Linares J. Emergence of a multi-resistant clone (ST320) among invasive serotype 19A pneumococci in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64:507-10.
462. Cochetti I, Tili E, Mingoia M, Valardo P.E, Montanari M.P. Erm(B)-carrying elements in tetracycline-resistant pneumococci and correspondence between Tn1545 and Tn6003. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 1285-90.
463. Seral C, Castillo FJ, Rubio-Calvo MC, Fenoll A, Garcia C, Gomez-Lus R. Distribution of resistance genes tet(M), aph3'-III, catpC194 and the integrase gene of Tn1545 in clinical *Streptococcus pneumoniae* harbouring erm(B) and mef(A) genes in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2001;47: 863-6.

464. Malhotra-Kumar S, Lammens C, Coenen S, Van Herck K, Goossens H. Effect of azithromycin and clarithromycin therapy on pharyngeal carriage of macrolide-resistant streptococci in healthy volunteers: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet*. 2007; 369:482–90.
465. Hoban DJ, Bouchillon SK, Johnson BM, et al. In vitro activity of tigecycline against 6792 Gram-negative and Gram-positive clinical isolates from the global Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST Program, 2004). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005; 52:215-227.
466. Bergallo C, Jasovich A, Teglia O, Oliva ME, Lentnek A, de Wouters L. Safety and efficacy of intravenous tigecycline in treatment of community-acquired pneumonia: results from a double-blind randomized phase 3 comparison study with levofloxacin. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;63(1):52-61.
467. Dartois N, Cooper CA, Castaing N, et al. Tigecycline versus levofloxacin in hospitalized patients with community acquired pneumonia: an analysis of risk factors. *Open Respir Med J*. 2013;7:13-20.
468. Simberkoff MS, Lukaszewski M, Cross A, et al. Antibiotic-resistant of *Streptococcus pneumoniae* from clinical specimens: a cluster of serotype 19A organisms in Brooklyn New York. *J Infect Dis*. 1986; 153:78-82.
469. Madhi SA, Petersen K, Madhi A, Wasas A, Klugam KP. Impact of human immunodeficiency virus type 1 on the disease spectrum of *Streptococcus pneumoniae* in South African children. *Pediatr Infect Dis J*. 2000; 19(12):1141-7.
470. Johnson DM, Stilwell MG, Fritsche TR, Jones RN. Emergence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1999-2003). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006; 56(1):69-74.
471. Henderson FW, Gilligan PH, Wait K, Goff DA. Nasopharyngeal carriage of antibiotic-resistant pneumococci by children in group day care. *J Infect Dis*. 1988; 157:256-63.
472. Reeves RR, Musher DM. Antibiotic-resistant pneumococcus in a hemophiliac with AIDS. *Hosp Pract*. 1991; 26:81.
473. Feikin DR, Dowell SF, Nwanyanwu OC, et al. Increased carriage of trimethoprim/sulfamethoxazole-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Malawian children after treatment for malaria with sulfadoxine/pyrimethamine. *J Infect Dis*. 2000; 181(4):1501-5.
474. Maskell JP, Sefton AM, Hall LM. Mechanism of sulfonamide resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41:2121-6.
475. Lopez P, Espinosa M, Greenberg B, Lacks SA. Sulfonamide resistance in *Streptococcus pneumoniae*: DNA sequence of the gene encoding dihydropteroate synthase and characterization of the enzyme. *J Bacteriol*. 1987; 169(9):4320-6.
476. Fuller JD, Low DE. A review of *Streptococcus pneumoniae* infection treatment failures associated with fluoroquinolone resistance. *Clin Infect Dis*. 2005; 41(1):118-21.
477. Chen DK, McGeer A, De Azavedo JC, Low DE, and Canadian Bacterial Surveillance Network. Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. *N Engl J Med*. 2001; 341:233-239.
478. Richter SS, Heimann KP, Coffman HK, et al. The molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 1994-2000. *Clin Infect Dis*. 2002; 34:330-9.
479. Camilli R, Del Grosso M, Iannelli F, Pantosti A. New genetic element carrying the erythromycin resistance determinant *erm*(TR) in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52:619-25.
480. Karlowsky J A, Nealy L, Sahn DF, Thornsberry C, Jones ME. Trends in ciprofloxacin nonsusceptibility and levofloxacin resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates in North America. *J Clin Microbiol*. 2001; 39:2748-50.
481. Pankuch GA, Bozdogan B, Nagai K, et al. Incidence, epidemiology, and characteristics of quinolone-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* in Croatia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46:2671-5.
482. Pletz MW, van der Linden M, von Baum H, et al. Low prevalence of fluoroquinolone resistant strains and resistance precursor strains in *Streptococcus pneumoniae* from patients with community-acquired pneumonia despite high fluoroquinolone usage. *Int J Med Microbiol*. 2011; 301(1):53-7.
483. Jones RN, Jacobs MR, Sader HS. Evolving trends in *Streptococcus pneumoniae* resistance: implications for therapy of community-acquired bacterial pneumonia. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 36:197-204.
484. Patel SN, McGeer A, Melano R, et al. Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55:3703-8.
485. Thornsberry C, Brown NP, Draghi DC, et al. Antimicrobial activity among multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated in the United States, 2001-2005. *Postgrad Med*. 2008; 120:32.
486. Saravolatz L, Manzor O, Check C, Pawlak J, Belian B. Antimicrobial activity of moxifloxacin, gatifloxacin and six fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2001; 47:875-7.

487. Wang H, Chen M, Xu Y, et al. Antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens associated with community-acquired respiratory tract infections in Asia: report from the Community-Acquired Respiratory Tract Infection Pathogen Surveillance (CARTIPS) study, 2009-2010. *Int J Antimicrob Agents*. 2011; 38:376-83.
488. de la Campa AG, Ardanuy C, Balsalobre L et al. Changes in fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* after 7-valent conjugate vaccination, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:905-11.
489. Ho PL, Yung RW, Tsang DN, et al. Increasing resistance of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones: result of a Hong Kong multicentre study in 2000. *J Antimicrob Chemother*. 2001; 48:659-65.
490. Frank E, et al. A multicenter, open-label, randomized comparison of levofloxacin and azithromycin plus ceftriaxone in hospitalized adults with moderate to severe community-acquired pneumonia. *Clin Ther*. 2002 Aug;24(8):1292-308.
491. Jones RN, Andes DR, Mandell LA, Gothelf S, Ehrhardt AF, Nicholson SC. Gatifloxacin used for therapy of outpatient community-acquired pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;44:93-100.
492. Nicholson SC, Wilson WR, Naughton BJ, et al. Efficacy and safety of gatifloxacin in elderly outpatients with community-acquired pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002; 44:117.
493. Lode H, File TM Jr, Mandell L, et al. Oral gatifloxacin versus sequential therapy with intravenous ceftriaxone/oral cefuroxime with or without a macrolide in the treatment of patients hospitalized with community-acquired pneumonia: a randomized, open-label, multicenter study of clinical efficacy and tolerability. *Clin Ther*. 2002; 24:1915-36.
494. Chodosh S, McCarty J, Farkas S, et al. Randomized, double-blind study of ciprofloxacin and cefuroxime axetil for treatment of acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis. The Bronchitis Study Group. *Clin Infect Dis*. 1998; 27:722-9.
495. Masterton RG, Burley CJ. Randomized, double-blind study comparing 5- and 7-day regimens of oral levofloxacin in patients with acute exacerbation of chronic bronchitis. *Int J Antimicrob Agents*. 2001;18:503-12.
496. Schaberg T, Ballin I, Huchon G, et al. A multinational, multicentre, non-blinded, randomized study of moxifloxacin oral tablets compared with amoxicillin-clavulanate oral tablets in the treatment of acute exacerbation of chronic bronchitis. *J Int Med Res*. 2001;29:314-28.
497. Scheld WM Maintaining fluoroquinolone class efficacy: review of influencing factors. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:1-9.
498. Velissariou IM. Linezolid in children: recent patents and advances. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc*. 2007; 2:73-7.
499. Draghi DC, Sheehan DJ, Hogan P, Sahm DF. In vitro activity of linezolid against key gram-positive organisms isolated in the United States: results of the LEADER 2004 surveillance program. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2005; 49:5024-5032.
500. Obert CA, Miller ML, Montgomery J, Adamkiewicz T, Tuomanen EI. Quinupristin-dalfopristin nonsusceptibility in pneumococci from sickle cell disease patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007; 51:386-389.
501. Pearson HA. Sickle cell anemia and severe infections due to encapsulated bacteria. *J Infect Dis*. 1977;136(Suppl.):S25-S30.
502. Farrell DJ, Felmingham D. The PROTEKT global study (year 4) demonstrates a continued lack of resistance development to telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56:795-7.
503. Mazzariol A, Koncan R, Bahar G, Cornaglia G. Susceptibilities of *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* to macrolides and telithromycin: data from an Italian multicenter study. *J Chemother*. 2007; 19:500-7.
504. Hsueh PR, Teng LJ, Wu TL, Yang D, Huang WK, Shyr JM, et al. Telithromycin- and fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Taiwan with high prevalence of resistance to macrolides and b-lactams: SMART program 2001 data. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47:2145-51.
505. Chen YY, Yao SM, Chen YH, Jiang SF, Kuo TL, et al. Antimicrobial susceptibility of invasive *Streptococcus pneumoniae* in Taiwan, 2008-2012. *Taiwan Epidemiol Bull*. 2013; 29(19):232-51.
506. Bingen E, Doit C, Loukil C, et al. Activity of telithromycin against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates recovered from French children with invasive and noninvasive infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(7): 2345-7.

507. Hagberg L, Torres A, van Rensburg D, Leroy B, Rangaraju M, Ruuth E. Efficacy and tolerability of once-daily telithromycin compared with high-dose amoxicillin for treatment of community-acquired pneumonia. *Infection*. 2002;30(6):378-86.
508. Tellier G, Niederman MS, Nusrat R, Patel M, Lavin B. Clinical and bacteriological efficacy and safety of 5 and 7 day regimens of telithromycin once daily compared with a 10 day regimen of clarithromycin twice daily in patients with mild to moderate community-acquired pneumonia. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(2):515-23.
509. Henriques Normark B, Novak R, Ortqvist A, Kallenius G, Tuomanen E, Normark S. Clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* that exhibit tolerance of vancomycin. *Clin Infect Dis*. 2001; 32:552-8.
510. McCullers JA, English BK, Novak R. Isolation and characterization of vancomycin-tolerant *Streptococcus pneumoniae* from the cerebrospinal fluid of a patient who developed recrudescence meningitis. *J Infect Dis*. 2000; 181:369-73.
511. Novak R, Henriques B, Charpentier E, Normark S, Tuomanen E. Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. 1999; *Nature* 399:590-3.
512. Rodriguez CA, Atkinson R, Bitar W, Whitney CG, Edwards KM, Mitchell L, Li J, Sublett J, Li CS, Liu T, Chesney PJ, Tuomanen EI. Tolerance to vancomycin in pneumococci: detection with a molecular marker and assessment of clinical impact. *J Infect Dis*. 2004;190:1481-7.
513. Sung H, Shin HB, Kim MN, Lee K, Kim EC, Song W, Jeong SH, Lee WG, Park YJ, Eliopoulos GM. Vancomycin tolerant *Streptococcus pneumoniae* in Korea. *J Clin Microbiol*. 2006; 44:3524-8.
514. Brueggemann AB, Griffiths DT, Meats E, Peto T, Crook DW, Spratt BG. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. *J Infect Dis*. 2003;187(9):1424-32.
515. Marchese A, Mannelli S, Tonoli E, Gorlero F, Toni M, Schito GC. Prevalence of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* circulating in Italy: results of the Italian Epidemiological Observatory Survey (1997-1999). *Microb Drug Resist*. 2001;7(3):277-87.
516. 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):456-61.
517. 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):4454-6.
518. Neves FPG, Castro Abreu Pinto T, Alves Corrêa A, 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.
519. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines in the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2007; 44 Suppl 2:S27-72.
520. Musher DM. New modalities in treating pneumococcal pneumonia. *Hosp Pract (1995)*. 2011; 39(2):89.
521. Corrales-Medina VF, Musher DM. Immunomodulatory agents in the treatment of community-acquired pneumonia: a systematic review. *J Infect*. 2011; 63:187-99.
522. Kogan R, Martinez MA, Rubilar L, et al. Comparative randomized trial of azithromycin versus erythromycin and amoxicillin for treatment of community-acquired pneumonia in children. *Pediatr Pulmonol*. 2003; 35:91-98.
523. Plouffe J, Schwartz DB, Kolokathis A, et al. Clinical efficacy of intravenous followed by oral azithromycin monotherapy in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. The Azithromycin Intravenous Clinical Trials Group. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:1796-802.
524. Paladino JA, Gudgel LD, Forrest A, Niederman MS. Cost-effectiveness of IV-to-oral switch therapy: azithromycin vs cefuroxime with or without erythromycin for the treatment of community-acquired pneumonia. *Chest*. 2002; 122:1271.
525. Bradley JS, Byington CL, Shah SS, Alverson B, Carter ER, Harrison C. The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. [Clin Infect Dis](#). 2011 Oct;53(7):e25-76.
526. Kaplan SL. Management of pneumococcal meningitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2002; 21(6):589.
527. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, et al. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis*. 2004; 39(9):1267-84.

528. Dagan R, Johnson CE, McLinn S, et al. Bacteriologic and clinical efficacy of amoxicillin/clavulanate vs. azithromycin in acute otitis media. *Pediatr Infect Dis*. 2000; 19:95-104.
529. Dagan R, Leibovitz E, Fliss DM, Leiberman A, Jacobs MR, Craig W, Yagupsky P. Bacteriologic efficacies of oral azithromycin and oral cefaclor in treatment of acute otitis media in infants and young children. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2000; 44:43-50.
530. Dagan R, Leibovitz E, Leiberman A, Yagupsky P. Clinical significance of antibiotic resistance in acute otitis media and implication of antibiotic treatment on carriage and spread of resistant organisms. *Pediatr Infect Dis J*. 2000; 19:S57-S65.
531. Murray JJ, Solomon E, McCluskey D, et al. Phase III, randomized, double-blind study of clarithromycin extended-release and immediate-release formulations in the treatment of adult patients with acute maxillary sinusitis. *Clin Ther*. 2000; 22:1421-32.
532. Tambic Andrasevic A, Tambic T, Kalenic S, et al. Surveillance for antimicrobial resistance in Croatia. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8:14-8.
533. Ahovuo-Saloranta A, Rautakorpi UM, Borisenko OV, et al. Antibiotics for acute maxillary sinusitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014; 2:CD000243.
534. Centers for Disease Control and Prevention. Drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* disease. Available from: [http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/drugresisstreppneum\\_t.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/drugresisstreppneum_t.htm). 3/11/2014.
535. Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN). Available from: <http://www.sph.emory.edu/PMEN>. 18/10/2014.
536. McGee L, McDoughal L, Zhou J, Spratt BG, Tenover FC, George R, Hakenbeck R, Hryniewicz W, Lefevre JC, Tomasz A, Klugman KP. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. *J Clin Microbiol*. 2001; 39:2565-71.
537. Jefferson T, Ferroni E, Curtale F, Rossi PG, Borgia P. *Streptococcus pneumoniae* in Western Europe: serotype distribution and incidence in children less than 2 years of life. *Lancet Infect Dis*. 2006; 6:405-10.
538. Reinert RR. Pneumococcal conjugate vaccines-a European perspective. *Int J Med Microbiol*. 2004; 294:277-94.
539. World Health Organization. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization-WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*. 2007; 82:93-104.
540. Beall BW, Gertz RE Jr, Hulkower RL, Whitney CG, Moore MR, Brueggemann AB. Shifting genetic structure of invasive serotype 19A pneumococci in the United States. *J Infect Dis*. 2011; 203(10): 1360-8.
541. Dagan R, Sikuler-Cohen M, Zamir O, Janco J, Givon-Lavi N, Fraser D. Effect of a conjugate pneumococcal vaccine on the occurrence of respiratory infections and antibiotic use in day-care center attendees. *Pediatr Infect Dis J*. 2001; 20:951-8.
542. Dagan R, Givon-Lavi N, Zamir O, Fraser D. Effect of a nonavalent conjugate vaccine on carriage of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in day-care centers. *Pediatr Infect Dis J*. 2003; 22:532-40.
543. National Center for Epidemiology (NCE). Magyarország 2009. évi járványügyi helyzete [Annual Epidemiological report 2009]. *Epinfo*. 2011;7. Special issue. Hungarian. Available from: <http://www.oek.hu/oek.web?to=.839,1890&nid=964&pid=1&lang=hun/12/2/2012> .
544. A Tóthpál, K Laub, S Kardos, K Nagy, O Dobay. Changes in the serotypes of Hungarian pneumococci isolated mainly from invasive infections: a review of all available data between 1998 and 2011. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 2012; 59(3):423-33.
545. Gužvinec M, Tešović G, Tambić-Andrašević A, Židovec-Lepej S, Trošelj Vukić B, Begovac J. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* disease in Croatian children. *Med Sci Monit*. 2008; 14(12):59-64.
546. Pilishvili T, Lexau C, Farley MM et al. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *J Infect Dis* 2010; 201: 32-41.