

FULL PAPERS

Isolation of different erythromycin-resistance *Streptococcus pneumoniae* phenotypes in Piemonte Region

Valeria Allizond¹, Giuliana Banche¹, Janira Roana¹, Nicolò Li Vigni², Narcisa Mandras¹, Daniela Scalas¹, Vivian Tullio¹, Nicola A. Carlone¹, Dianella Savoia³, Anna Barbui⁴, Anna Maria Cuffini¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica e Microbiologia, Università degli Studi di Torino

²Laboratorio Analisi e Microbiologia, ASL 12, Biella

³Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università degli Studi di Torino

⁴Laboratorio di Microbiologia, ASO S. Giovanni Battista, Torino

Isolation of different erythromycin-resistance *Streptococcus pneumoniae* phenotypes in Piemonte Region

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, Erythromycin resistance, Resistance phenotypes

SUMMARY

The frequency of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates from human specimens, in different Piemonte Region hospitals between 2005-2007, has been studied. Erythromycin-susceptible isolates were 137/198 and erythromycin-resistant 61/198. Among resistant *S. pneumoniae* isolates 26/61 belonged to constitutive resistance phenotype, 26/61 to M phenotype and 9/61 to inducible resistance phenotype.

Received December 19, 2007

Accepted January 18, 2008

INTRODUZIONE

Streptococcus pneumoniae è un ospite frequente delle prime vie respiratorie da dove, in presenza di concause predisponenti (infezioni respiratorie virali, traumi toracici e/o cranici, insufficienza cardiaca, età avanzata, ecc.), può raggiungere le vie respiratorie profonde provocando la polmonite. Dalle prime vie aeree il batterio può diffondersi e determinare vari quadri patologici tra cui batteriemie, endocarditi, meningiti, sinusiti ed otiti medie (1, 6, 12, 14).

Nonostante i β -lattamici siano considerati farmaci di elezione, una valida alternativa in caso di allergia o resistenza è rappresentata dai macrolidi il cui utilizzo clinico è stato recentemente ristretto a causa della crescente incidenza di resistenza batterica anche a questi antibiotici (8, 9, 13, 14). Due sono i meccanismi responsabili della resistenza ai macrolidi in *S. pneumoniae*: il primo è dovuto all'efflusso attivo dell'antibiotico attraverso la membrana cellulare mediante pompa protonica (fenotipo M, geni *mef*) e, in tal caso, la resistenza si esplica verso macrolidi con 14-15 atomi (eritromicina, claritromicina, azitromicina); il secondo è dovuto a mutazioni, in proteine ribosomiali o nei geni per il 23S rRNA, legate alla pro-

duzione di una metilasi, con conseguente blocco del legame di macrolidi, lincosamidi e streptogramina B al ribosoma batterico (fenotipo MLS_B, geni *erm*) (2, 3, 5). L'espressione di quest'ultimo fenotipo di resistenza può essere di tipo costitutivo (fenotipo cMLS_B) od inducibile (fenotipo iMLS_B). Nella resistenza cMLS_B il batterio produce una metilasi sempre attiva, mentre per quella iMLS_B la metilasi, per essere attiva, necessita della presenza del macrolide che agisca da induttore (6, 8, 11).

PRESENTAZIONE DELLO STUDIO

Nel presente studio è stato valutato il fenotipo di resistenza ai macrolidi su 198 ceppi di *S. pneumoniae* isolati, nel biennio 2005-2007, da differenti campioni biologici (tabella 1) provenienti da pazienti afferenti agli Ospedali San Giovanni Battista di Torino, San Luigi Gonzaga di Orbassano e degli Infermi di Biella. I campioni venivano seminati su agar Columbia con aggiunta del 5% di sangue di montone (Biolife Italiana, Milano, Italia); dopo incubazione in CO₂ al 5% per 18-24 ore alla temperatura di 37°C, le colonie con i caratteristici aloni di α -emolisi sono state

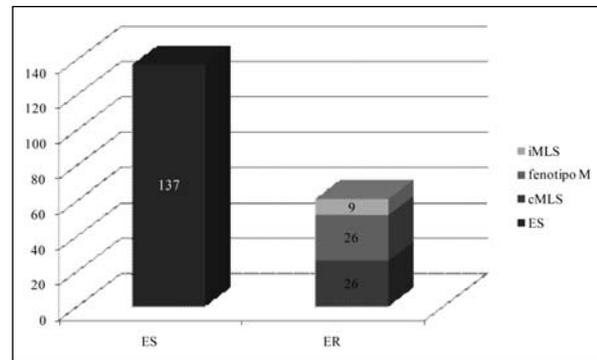
Corresponding author: Anna Maria Cuffini

Dipartimento di Sanità Pubblica e Microbiologia - Università degli Studi di Torino - Via Santena 9, 10126 Torino
Tel.: 011 6705638 - Fax: 011 6705648 - E-mail: annamaria.cuffini@unito.it

isolate e successivamente identificate mediante i test di sensibilità all'optochina, della solubilità nella bile, ed infine con il sistema APISStrept (bioMérieux Italia, Roma, Italia). La determinazione dei fenotipi di resistenza ai macrolidi è stata eseguita mediante il test del triplo disco secondo la metodica di Giovanetti E. et al (5). Sono stati utilizzati dischetti commerciali di eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg) e josamicina [(30 µg) Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England]. I dischetti sono stati posti ad una distanza di 15-20 mm l'uno dall'altro su una piastra di Mueller Hinton agar addizionato con il 5% di sangue di montone (Oxoid), inocolata con una sospensione batterica con torbidità equivalente allo standard 0.5 McFarland. Dopo 18-24 ore d'incubazione a 37°C con il 5% di CO₂, sono stati valutati gli aloni d'inibizione. La crescita batterica attorno all'eritromicina e la presenza di aloni d'inibizione attorno alla clindamicina ed alla josamicina caratterizza il fenotipo M; l'assenza di aloni d'inibizione attorno ai tre dischetti indica un fenotipo di resistenza costitutivo (cMLS_B); la crescita attorno all'eritromicina e presenza di aloni smussati, *D-shaped*, attorno alla clindamicina ed alla josamicina sono propri del fenotipo iMLS_B (figura I).

Tabella I. Numero di ceppi e percentuali di isolamento di *S. pneumoniae* da differenti campioni biologici

CAMPIONI	NUMERO DI CEPPI (TOTALE 198)	%
Emocoltura	87	43.9
Escreato	33	16.7
Tracheo bronco aspirato	18	9.1
Liquor	12	6.1
Tampone auricolare	9	4.5
Tampone congiuntivale	6	3.0
Essudato nasale	6	3.0
Liquido pleurico	3	1.5
Tampone vaginale	3	1.5
Vari	21	10.7



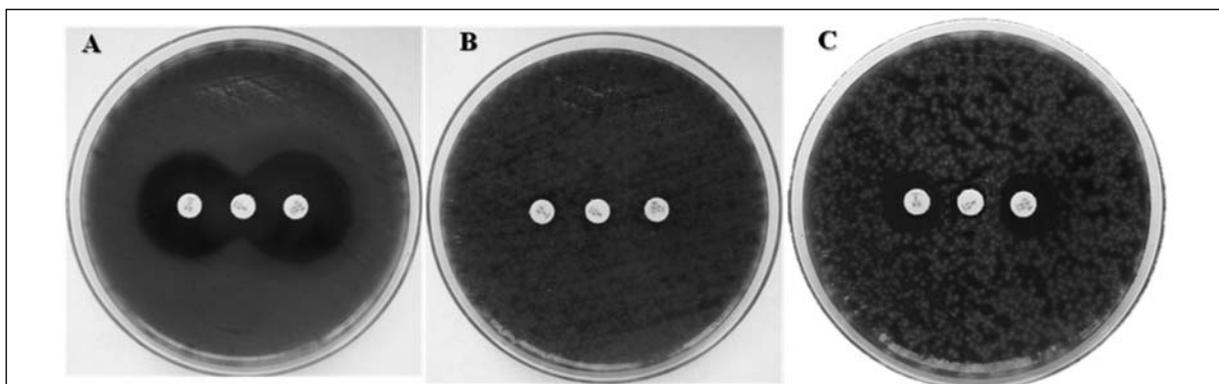
Fenotipo M= fenotipo con pompa di efflusso; cMLS= resistenza costitutiva; iMLS= resistenza inducibile

Figura II. Distribuzione degli isolati di *S. pneumoniae* eritromicina-sensibili (ES) ed eritromicina-resistenti (ER) con i differenti fenotipi di resistenza: cMLS, fenotipo M ed iMLS

CONCLUSIONI

S. pneumoniae deve essere costantemente preso in considerazione nelle ipotesi eziologiche che riguardano tutte le infezioni respiratorie non solo per la frequenza con cui questo microrganismo è coinvolto ma anche per la forte tendenza ad acquisire, attraverso ricombinazione genetica, tratti di antibiotico-resistenza multipli che coinvolgono con grande frequenza anche β-lattamici e macrolidi (13). La gravità del fenomeno è molto variabile in funzione della diversa pressione selettiva operata dalle modalità d'impiego degli antibiotici da parte di ciascuna comunità medica nonché dalla circolazione di particolari cloni sul territorio (9, 12, 13). In Italia un'attenta e continuativa opera di monitoraggio ha rilevato una consistente e consolidata incidenza (intorno al 25-30%) di resistenza a macrolidi (4, 10, 13).

I ceppi di *S. pneumoniae* oggetto di questo studio provengono da differenti campioni biologici: la maggior parte di essi è stata isolata da emocoltura (43.9%), escreato (16.7%) e tracheo-bronco



Fenotipo M= fenotipo con pompa di efflusso; cMLS= resistenza costitutiva; iMLS= resistenza inducibile

Figura I. Fenotipi di *S. pneumoniae* ER - fenotipo M (A), cMLS (B), iMLS (C) - come determinato con il test del triplo disco: al centro di ciascuna piastra è posta l'eritromicina (E; 15 µg), sulla sinistra la clindamicina (DA; 2 µg), sulla destra la josamicina (JOS; 30 µg)

aspirato (9.1%) come riportato in tabella 1. Dei 198 ceppi di *S. pneumoniae* isolati, il 69.2% risulta eritromicino-sensibile (ES) ed il 30.8% eritromicino-resistente (ER). Nell'ambito degli ER, sulla base del test del triplo disco, 26 ceppi (42.6%) sono resistenti ai macrolidi per attivazione di un sistema di pompa di efflusso (fenotipo M) mentre 35 ceppi (57.4%) mostrano un fenotipo di resistenza MLS_B: in particolare il 42.6% degli isolati è produttore di una metilasi sempre attiva (fenotipo cMLS_B) mentre il 14.8% necessita del macrolide per l'attivazione della metilasi (fenotipo iMLS_B; figure I e II).

In conclusione, con il presente lavoro, si intende enfatizzare come la continua sorveglianza della distribuzione dei fenotipi di eritromicino-resistenza in *S. pneumoniae*, nelle differenti aree geografiche, sia essenziale al fine di instaurare la più appropriata terapia antibiotica. Infatti, è necessario avvalersi di una strategia terapeutica che escluda l'impiego di tutti gli antibiotici facenti parte del gruppo MLS_B nel caso di isolamento di pneumococchi con fenotipi cMLS_B ed iMLS_B i quali presentano una resistenza allargata nei confronti di tutto lo spettro delle molecole appartenenti a questo gruppo. Al contrario, l'utilizzo di un macrolide a 16 atomi (josamicina e rokitamicina) o di un ketolide (telitromicina) è suggerito qualora vengano isolati ceppi di *S. pneumoniae* con fenotipo a pompa di efflusso in quanto notoriamente resistenti ai macrolidi a 14 e 15 atomi (7, 10, 15).

BIBLIOGRAFIA

1. Drago L, De Vecchi E, Nicola L, Legnani D, Gismondo MR. Kinetic bactericidal activity of telithromycin, azithromycin and clarithromycin against respiratory pathogens. *APMIS* 2005; 113: 655-63.
2. Farrell DJ, File TM, Jenkins SG. Prevalence and antibacterial susceptibility of *mef(A)*-positive macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* over 4 years (2000 to 2004) of the PROTEKT US Study. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 290-3.
3. Felmingham D, Canton R, Jenkins SG. Regional trends in beta-lactam, macrolide, fluoroquinolone and telithromycin resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates 2001-2004. *J Infect* 2007; 55: 111-8.
4. Giovanetti E, Montanari MP, Marchetti F, Varaldo PE. *In vitro* activity of ketolides telithromycin and HMR 3004 against Italian isolates of *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* with different erythromycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 905-8.
5. Giovanetti E, Montanari MP, Mingoia M, Varaldo PE. Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in Italy and heterogeneity of inducibly resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1935-40.
6. Harimaya A, Yokota S, Sato K, Yamazaki N, Himi T, Fujii N. High prevalence of erythromycin resistance and macrolide-resistance genes, *mefA* and *ermB*, in *Streptococcus pneumoniae* isolates from the upper respiratory tracts of children in the Sapporo district, Japan. *J Infect Chemother* 2007; 13: 219-23.
7. Ioannidou S, Tassios PT, Zachariadou L, et al. *In vitro* activity of telithromycin (HMR 3647) against Greek *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates with different macrolide susceptibilities. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 704-7.
8. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 482-92.
9. Marchese A, Schito GC. Resistance patterns of lower respiratory tract pathogens in Europe. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16: S25-9. Review.
10. Mazzariol A, Koncan R, Vitali LA, Cornaglia G. Activities of 16-membered ring macrolides and telithromycin against different genotypes of erythromycin-susceptible and erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 1171-6.
11. Montanari MP, Mingoia M, Giovanetti E, Varaldo PE. Differentiation of resistance phenotypes among erythromycin-resistant Pneumococci. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1311-5.
12. Neuman MI, Kelley M, Harper MB, File TM Jr, Camargo CA Jr. EMNet Investigators. Factors associated with antimicrobial resistance and mortality in pneumococcal bacteremia. *J Emerg Med* 2007; 32: 349-57.
13. Shibl AM. Patterns of macrolide resistance determinants among *S. pyogenes* and *S. pneumoniae* isolates in Saudi Arabia. *J Int Med Res* 2005; 33: 349-55.
14. Tarallo L, Tancredi F, Schito G, Marchese A, Bella A. Italian Pneumonet Group (Società Italiana Pediatria and Associazione Italiana Studio Antimicrobici e Resistenze). Active surveillance of *Streptococcus pneumoniae* bacteremia in Italian children. *Vaccine* 2006; 24: 6938-43.
15. Zhanel GG, Walters M, Noreddin A, et al. The ketolides: a critical review. *Drugs* 2002; 62: 1771-804.