

## Determinari cantitative, prin E-test, pentru evaluarea rezistenței *Neisseria gonorrhoeae*

Silvia Filipciuc<sup>1,2</sup>, Luminița Smaranda Iancu<sup>1</sup>

1. UMF "Gr. T. Popa" Iași, Disciplina de Microbiologie
2. Direcția de Sănătate publică Suceava

**Quantitative determination by E-test for evaluating resistance of *Neisseria gonorrhoeae*** (Abstract): **Background:** Thanks of underreported and of difficulties of isolation, antibiotic susceptibility profile of *N. gonorrhoeae* strains circulating is not sufficiently known in our country as well in the Suceava county. In addition, WHO's experts recommended the establishment of MIC (minimum inhibitory concentration) values using E-test strips, completing the database at the European level. **Objective:** to determine the type of resistance of *N. gonorrhoeae* strains by E-test in patients with gonorrhoea in Suceava county, in the 2009 -2010 period. **Material and method.** We tested the sensitivity of 32 strains of *N. gonorrhoeae* isolated using classical algorithm and E-test strips according with CLSI 2008 (*Clinical and Laboratory Standard Institute*) standard. We tested the sensitivity for penicillin, amoxicillin, augmentin, clarytromycin, tetracycline, ceftriaxone, ciprofloxacin, and spectinomycin. Production of  $\beta$ -lactamases was performed using API-NH test (*Neisseria-Haemophilus-Biomerieux*). **Results:** 96.9% strains were sensitive for ceftriaxone and spectinomycin, each 10 strains (31.2%) were resistat for penicillin and tetracycline, 34.5% strains were sensitive for amoxicillin, 37.5% sensitive for ciprofloxacin, and 13/32 strains (40.6%) were sensitive for augmentine. 7 strains were  $\beta$ -lactamases positive and sensitive to all antibiotics, excepting penicillin and tetracyclin. Our results, especially the low rate of sensitivity for penicillin and tetracycline (68.8%) were similar with other from Asia, America or Africa, including Iași region. **Conclusion:** our results demonstrated for first time in the studied aria, using E-test strips, the level of resistance of *N. gonorrhoeae* offering useful informations for clinicians in order to treat the patients with ceftrixone and spectinomycine as empirical treatment, and for other antibiotics, according with antibiogram results. **Key words:** NEISSERIA GONORRHOEAE, E-TEST, MIC, SENSITIVITY, RESISTANCE.

### INTRODUCERE

În prezent, în România, nu se cunosc morbiditatea, incidența, prevalența sau spectrul de sensibilitate la antibiotice și circulația tulpinilor rezistente de *Neisseria gonorrhoeae*. În general, incidența gonoreei este subraportată în România, inclusiv în județul Suceava, în principal prin lipsa de adresabilitate a pacienților care preferă anonimatul sau/și tratarea infecțiilor cu transmitere sexuală prin eludarea sistemului de supraveghere al bolilor transmisibile. Datorită subraportării și dificultăților de izolare binecunoscute, profilul de sensibilitate la antibiotice al tulpinilor circulante de *N. gonorrhoeae* nu este suficient de bine cunoscut. În plus, experții OMS recomandă stabilirea CMI, prin utilizarea benzilor E-test, în vederea completării bazei de date la nivel european (1).

Studiul a avut ca **obiectiv** stabilirea tipului de rezistență a tulpinilor de *N. gonorrhoeae*, prin E-test, la bolnavi cu gonoree din județul Suceava, în perioada 2009-2010.

## MATERIAL SI METODE

În vederea selectării tulpinilor incluse în studiu, prelevarea, transportul și conservarea probelor până la prelucrare s-au realizat ținând cont de sensibilitatea gonococului la factorii de mediu; tampoanele utilizate pentru recoltarea secrețiilor endo-cervicale, la femei și a secreției matinale, la bărbați au fost însămânțate pe medii preîncălzite la 37 °C, cu pH de 7,2-7,8. Am realizat frotiuri colorate Gram și cu albastru de metilen care au fost examinate la microscopul cu obiectiv cu imersie pentru 32 probe (de la 6 femei și 26 bărbați) recoltate în perioada octombrie 2009-august 2010. Am însămânțat produsele patologice pe medii nutritive (GC bază + 1% hemoglobină + 1% supliment nutritiv IsoVtalex, VITOX cu supliment selectiv VCN), plăcile fiind incubate în atmosferă de 5% CO<sub>2</sub> pentru 24-72 h la 37°C, 70% umiditate. Identificarea s-a realizat conform algoritmului clasic, cu truse comerciale API-NH (*Neisseria-Haemophylus - Biomerieux*), care au posibilitatea detectării concomitente și a producerii de β-lactamază. După identificare, tulpinile au fost stocate prin congelare la -25°C în bulion tripticază soia și 20% glicerol (2). Am determinat valorile **concentrațiilor minime inhibitorii** (CMI) prin metoda E-test, tehnică recomandată de O.M.S; suspensia utilizată a fost standardizată din cultura obținută după 18 h cu etalonul 0,5 McFarland. Benzile E-test utilizate au fost: penicilină (CMI: 0,002-32 μg/mL), amoxicilină (CMI: 0,016-256 μg/mL), augmentin (CMI: 0,016-256 μg/mL) claritromicină (CMI: 0,016-256 μg/mL), tetraciclină (CMI μg/mL: 0,016-256), ceftriaxonă (CMI μg/mL: 0,002-32), ciprofloxacina (CMI μg/mL: 0,002-32), respectiv spectinomycină (CMI μg/mL: 0,064-1024); am repartizat câte două benzi pe fiecare placă (Fig. 1).

Pentru stabilirea rezultatelor am utilizat criteriile de interpretare și control, conform CLSI (*Clinical and Laboratory Standard Institute*) 2008 (Tabel I) (3). Pentru asigurarea calității am utilizat tulpinile de referință de *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 și *Proteus mirabilis* ATCC 43071 pentru verificarea calității nutritive a mediilor de cultură și a rezultatelor antibiogramei; prelucrarea datelor, pentru cazurile de gonoree depistate și confirmate s-a realizat utilizând programele EpiData și EpiInfo.

## REZULTATE

Am izolat 32 tulpini de *N. gonorrhoeae* de la 26 bărbați (81%) și 6 femei (19%), respectiv de la cazuri suspecte de gonoree, pe baza definiției de caz (clinic și epidemiologic); 5 cazuri au fost confirmate numai prin frotiu.

Valorile CMI pentru penicilină, ampicilină, augmentin, tetraciclină, claritromicină, ceftriaxonă, ciprofloxacina, au fost transformate în **procente** (rate) de rezistență (Tabel II) (51). În vederea **exprimării** rezultatelor obținute este necesar să precizăm următoarele: producerea de penicilinază de către *N. gonorrhoeae* (PPNG - *Penicilinase Producing Ng*) este specifică tulpinilor β-lactamază pozitive; rezistența cromosomală a *N. gonorrhoeae* (CMRNG – *Chromosomal Resistance Ng*) se definește pentru tulpinile care au CMI >2 μg/mL și sunt β-lactamază negative, iar CMI pentru tetraciclină este cuprinsă între 2-8 μg/mL; rezistența la tetraciclină a *N. gonorrhoeae* (TRNG – *Tetracycline Resistante Ng*) se definește astfel: tulpinile au CMI >16 μg/mL și sunt β-lactamază negative.

Tabelul I  
**Valorile CMI, conform CLSI 2008 ( )**

Antibiotic	Tulpină sensibilă CMI (µg/mL)	Tulpină intermediar sensibilă CMI (µg/mL)	Tulpină rezistentă CMI (µg/mL)
<b>Penicilină</b>	0,06	0,12-1	> 2
<b>Ceftriaxonă</b>	0,25	Nu există limite	Nu există limite
<b>Ciprofloxacin</b>	0,06	0,12-05	> 1
<b>Spectinomycină</b>	32	64	128
<b>Tetraciclina</b>	0,25	0,5-1	2-32

*N. gonorrhoeae* cu rezistența cromosomală la tetraciclina (*tetR*) are CMI pentru tetraciclina cuprinsă între 2-8 µg/mL și CMI a penicilinei <1 µg/mL; rezistența la quinolone a *N. gonorrhoeae* (QRNG-*Quinolone Resistant Ng*) se definește pentru tulpinile care au CMI pentru ciprofloxacin > 1µg/mL; în ceea ce privește ceftriaxona, valoarea CMI > 0,125µg/mL definește rezistența pentru tulpinile de *N. gonorrhoeae*, iar rezistența la spectinomycină este definită pentru tulpinile care au CMI > 128 µg/mL. Rezultatele testării prin utilizarea benzilor E-test, pentru cele 32 de tulpini de gonococ studiate sunt prezentate în tabelul II, iar criteriile de interpretare, conform CLSI 2008 sunt redată în tabelul III.



**Fig. 1.** E-test pe mediu GC agar bază completat cu 1% IsoVitaleX, fără hemoglobină pentru penicilină și tetraciclina.

Dintre tulpinile studiate, șapte au fost β-lactamază pozitiv. Un număr de 17 tulpini au fost rezistente la penicilină (17/32), iar 19 dintre ele, la tetraciclina (19/32) (Tabelul II). La testarea sensibilității pentru penicilină, 7 tulpini (21,8%) au avut rezistență de nivel înalt, corelată cu rezistența plasmidică PPNG, iar 8 tulpini (25%) au fost definite CMRNG, deoarece mecanismul rezistenței a fost mediat cromosomal (CMI >1 µg/mL) (Tabel IV).

19 tulpini au fost rezistente la tetraciclină (Tabel II): 11 tulpini (37,5%) au avut rezistență înaltă, mediată cromosomal *tetR* (CMI >8 µg/mL), iar 4 tulpini (12,5%) au fost TRNG (CMI>16 µg/mL), cu rezistență mediată plasmidic (CMI >1 µg/mL) (Tabel IV). CMI 90 cu valoarea 32 µg/mL a indicat o rezistență de nivel înalt (Tabel III).

În ceea ce privește rezultatele testării pentru ciprofloxacina: 11 tulpini (34,4%) **au fost rezistente** (Tabel II), fiind QRNG (CMI >1 µg/mL) (Tabel IV), iar 9 tulpini (28,1%) au prezentat o reducere a sensibilității la ciprofloxacina. CMI 90 cu valoarea 32 µg/mL a indicat o rezistență de nivel înalt, iar pentru CMI 50 am obținut valoarea de 0,06 µg/mL (Tabel III). O singură tulpină (3,1%) a prezentat o reducere a sensibilității la testarea pentru ceftriaxonă (Tabel II). Deoarece concentrația care definește reducerea sensibilității este o valoare CMI > 0,125 µg/mL (Tabelul I), nicio tulpină nu a fost rezistentă la ceftriaxonă. Rezultate similare s-au obținut pentru spectinomycină: o singură tulpină (3,1%) a prezentat reducerea a sensibilității (Tabel II). Nu am izolat nicio tulpină rezistentă la spectinomycină (respectiv cu CMI > 128 µg/mL). CMI 90 cu valoarea 64 µg/mL, indică o rezistență de nivel înalt, ceea ce corespunde unui CMI 50 de 8 µg/mL (Tabel III).

## TABELUL II

Rezultatele testării cu benzi E-test pentru tulpini de *Neisseria gonorrhoeae* izolate în perioada 2009-2010

Antibiotic	Rezistent % (pozitiv/total)	Intermediar % (pozitiv/total)	Sensibil % (pozitiv/total)
Ceftriaxona	0 (0/32)	3,1 (1/32)	96,9 (31/32)
Penicilina	53,1 (17/32)	15,6 (5/32)	31,2 (10/32)
Tetraciclina	59,4 (19/32)	9,4 (3/32)	31,2 (10/32)
Amoxicilina	43,7 (14/32)	21,9 (7/32)	34,4 (11/32)
Augmentin	40,6 (13/32)	18,8 (6/32)	40,6 (13/32)
Claritromicina	34,4 (11/32)	40,6 (13/32)	25 (8/32)
Ciprofloxacina	34,4 (11/32)	28,1 (9/32)	37,5 (12/32)
Spectinomycină	0 (0/32)	3,1 (1/32)	96,9 (31/32)

- Criterii de interpretare conform CLSI (2008)

## DISCUȚII

Multirezistența a fost definită pentru următoarele asocieri: QRNG - PPNG; QRNG – TRNG; QRNG, PPNG și TRNG. În timp ce pentru penicilină, tetraciclină, ceftriaxonă și ciprofloxacina sunt criterii clare în ghidul pentru interpretarea sensibilității (43), pentru amoxicilina, augmentin și claritromicina acestea nu sunt bine definite. Toate cele 7 tulpini β-lactamază pozitive au fost rezistente la penicilină; producerea de β-lactamază nu a fost corelată cu reducerea sensibilității la alte antibiotice, exceptând tetraciclina.

**TABELUL III**

Valorile CMI 50 și CMI 90 și limitele CMI de sensibilitate pentru antibioticele testate prin E-test la 32 izolate de *Neisseria gonorrhoeae*

Antibiotic	CMI (μg/mL) Limite	CMI (μg/mL) 50%	CMI (μg/mL) 90%
Ceftriaxona	<b>0,02-0,25</b>	<b>0,08</b>	0,25
Penicilina	<b>0,03-16</b>	<b>0,03</b>	16
Tetraciclina	<b>0,25-4</b>	<b>2</b>	32
Amoxicilina	<b>0,047-16</b>	<b>0,25</b>	16
Augmentin	<b>0,02-32</b>	<b>0,25</b>	8
Claritromicina	<b>0,016-12</b>	<b>0,38</b>	12
Ciprofloxacina	<b>0,02-32</b>	<b>0,06</b>	32
<b>Spectinomycină</b>	<b>0,064-64</b>	<b>8</b>	64

**TABELUL IV**

Rata de rezistență la antibiotice și gradele de comparație cu alte state Europene, Japonia și Australia pentru tulpini de *Neisseria gonorrhoeae* testate prin metoda E-test<sup>a</sup>

	Ceftriaxona %	QRNG %	CMRNG %	PPNG %	TRNG %	Tet R %
Austria	0	53,1	3,1	<b>15,6</b>	1	46,9
Belgia	0	46,9	10,9	4,7	<b>12,5</b>	<b>35,9</b>
Danemarca	0	46	11,2	1	5,1	43,9
Anglia	0	12	8	1	6	20
Franța	0	<b>32,7</b>	10,9	<b>15</b>	6,7	57,4
Grecia	0	7,6	3,8	8,9	6,3	40,5
Italia	4,8	<b>33,3</b>	9,5	9,5	0	42,9
<b>Olanda</b>	0	16	0	8,6	8,6	33,3
Portugalia	0	17,6	0	<b>11,8</b>	35,3	<b>35,3</b>
Scoția	0	30,3	<b>17,2</b>	7,1	1	25,3
Spania	0	15,2	2,2	6,5	6,5	43,5
Suedia	1	48	7,3	9,6	8,3	<b>40,6</b>
Japonia	30,3	78,3	59,3	1	2,2	68,8
Australia	-	<b>38</b>	<b>34</b>	-	<b>12</b>	-
România (județul Suceava)	0	<b>34,4</b>	<b>25</b>	<b>21,8</b>	<b>12,5</b>	<b>37,5</b>

<sup>a</sup>Rezistența înaltă a fost corelată cu rezistența mediată plasmidic iar rezistența moderată/intermediară a fost corelată cu rezistența mediată cromosomal. Criteriile utilizate sunt cele ale CLSI (43)

Un număr mare de tulpini (20/32), respectiv 62,5%, au prezentat o reducere a sensibilității la ciprofloxacin. Scăderea sensibilității la antibiotice, în special pentru penicilină și tetraciclina (68,7%) este comparabilă cu scăderea sensibilității tulpinilor

raportată în Asia (74,3% pentru penicilină și 98,4%, pentru tetraciclină); America (90% la penicilină și 100% la tetraciclină); Africa (100% la penicilină și 91,7% la tetraciclină) (44); Rusia (76% la penicilină și 92% la tetraciclină) (46, 49) (48). Pentru zona de NE a țării, în Iași studii recente au determinat că 100% dintre tulpini sunt rezistente la penicilină și 92,6% la tetraciclină (47).

CMI 50 pentru penicilină a fost de 0,03 μg/mL, iar CMI 90, 16 μg/mL; valorile CMI 90 pentru tetraciclină (32 μg/mL), respectiv CMI 50 (2 μg/mL) sunt comparabile cu țările din vestul Europei (Tabel V). CMI 50 și CMI 90 (Tabel III) sunt concentrațiile care inhibă 50%, respectiv 90% dintre tulpinile testate (concentrația cea mai mică de antibiotic inhibitorie pentru un anumit procent din tulpinile testate).

Determinarea CMI este o necesitate practică, deoarece permite nu numai decizii terapeutice mai subtile, ci facilitează analiză epidemiologică a rezistenței la agenții antimicrobieni. Aceste valori permit orientarea rapidă către cel mai indicat medicament și alegerea antibioticoterapiei de primă intenție.

#### TABELUL V

Valorile CMI 50 și CMI 90 și limitele CMI de sensibilitate la antibioticele testate pentru *Neisseria gonorrhoeae* în Europa de Vest (13)

	CMI (μg/mL )	CMI (μg/mL	CMI (μg/mL
Antibiotic	Limite	50%	90%
Ceftriaxona	0,02-0,25	0,002	0,015
Penicilina	0,03-3,4	0,125	1
Tetraciclina	0,25-32	2	32
Ciprofloxacina	0,02-32	0,015	32
Spectinomiciina	0,064-64	8	64

Criterii de interpretare conform CLSI (2008)

#### CONCLUZII

În zona noastră penicilina, tetraciclina, ciprofloxacina, claritromicina, amoxicilina și augmentinul, nu pot fi folosite în tratamentul gonoreei, decât după rezultatul testării la antibiotice.

Continuarea la nivel regional și național a supravegherii sensibilității la antibiotice este crucială în detectarea emergenței noilor fenotipuri de rezistență, dublată de monitorizarea variației *pattern*-urilor de sensibilitate, în vederea adaptării schemelor terapeutice.

Evoluția sensibilității la cefalosporine trebuie monitorizată obligatoriu, fiind singura clasă de antibiotice disponibilă în momentul de față pentru terapia sindromică în uretrita gonococică, pentru surprinderea apariției tulpinilor rezistente.

În continuare sunt necesare studii microbiologice extinse, inclusiv prin utilizarea markerilor de epidemiologie moleculară, pentru stabilirea mecanismelor de rezistență și a modului lor de transmitere.

#### BIBLIOGRAFIE