



Streptokoky - průkaz fenotypu rezistence k antibiotikům ze skupiny makrolidů, linkosamidů a streptograminů B

Revize 27. 1. 2014

A. Klinické vzorky pro vyšetření citlivosti

- Citlivost k antibiotikům (včetně průkazu indukované rezistence ke klindamycinu) se vyšetřuje pouze u izolátů *Streptococcus spp.* (včetně *S. pneumoniae*) izolovaných z relevantních vzorků, odebraných v souvislosti s klinicky manifestní infekcí.
- U pacientů s tonzilitidou je kultivace a vyšetření citlivosti kmenů *Streptococcus pyogenes* izolovaných z výtěru z krku metodou volby.

B. Rezistence ke skupině MLS_B /1/

- Antibiotika ze skupiny MLS_B, ke kterým patří 14- a 16-členné makrolidy (erytromycin, klaritromycin, spiramycin), 15-členný azalid azitromycin, linkosamidy linkomycin a klindamycin, a streptograminy skupiny B, mají stejný nebo velmi podobný mechanismus účinku na grampozitivní koky.
- U rodu *Streptococcus spp.* je rezistence k antibiotikům ze skupiny MLS_B nejčastěji řízena geny *erm* (erythromycin ribosomal methylase).
- Geny *ermB* a *ermA* determinují produkci ribozomální metylázy inaktivující všechny 14-, 15- a 16-členné makrolidy, azalidy a streptogramin_B (MLS_B).
- Méně často se uplatňují geny *mef*, které řídí eflux 14- a 15-členných makrolidů a azalidů z buňky, nikoli však linkosamidů a streptograminu. U kmenů s tímto typem rezistence je účinek klindamycinu zachován.
- Geny *erm* i *mef* jsou schopny rychle se šířit horizontálně, prostřednictvím transpozonů, nebo vertikálně, jako klony rezistentních kmenů.
- Bodové mutace v genech na chromozomu kódujících ribozomální proteiny se jako příčina rezistence streptokoků vyskytují vzácně.

C. Fenotyp rezistence k antibiotikům MLS_B

- Fenotypová exprese rezistence u *Streptococcus spp.* k antibiotikům skupiny MLS_B závisí na tom, zda je rezistence způsobena metylázou syntetizovanou konstitutivně (gen *ermB*) nebo indukovaně (geny *ermA*), nebo zda je způsobena efluxem (geny *mef*).
 - ◆ Konstitutivní fenotyp (cMLS): je snadno rozpoznatelný, neboť inhibiční zóny (IZ) nebo minimální inhibiční koncentrace (MIC) erytromycinu a klindamycinu jsou v kategorii rezistence.
 - ◆ Indukovaný fenotyp (iMLS): IZ nebo MIC erytromycinu jsou v kategorii rezistence, MIC klindamycinu (a obvykle i IZ) jsou v citlivé kategorii. K odhalení indukované rezistence ke klindamycinu lze použít například diskovou difuzní metodu s předepsaným uspořádáním



disků, tzv. D-test, (viz dále).

- ◆ M fenotyp (eflux): IZ nebo MIC erytromycinu jsou v kategorii rezistence, IZ nebo MIC klindamycinu jsou v kategorii citlivosti.
- Kmeny *Streptococcus* spp. mohou obsahovat kombinaci různých genů, inaktivujících antibiotika skupiny MLS_B, a fenotyp rezistence se může projevit nejednoznačně (např. růstem kolonií uvnitř IZ v rozdílné kvantitě).

D. Průkaz indukované rezistence (D - test)

- Indukovanou rezistenci nelze prokázat vyšetřením MIC, neboť distribuce MIC klindamycinu u kmenů citlivých k antibiotikům skupiny MLS_B a kmenů s iMLS je téměř identická.
- Klindamycin je špatný induktor ribozomální metylázy, erytromycin však produkci tohoto enzymu indukuje. K vyšetření indukované rezistence lze proto použít rutinní diskovou difuzní metodu za předpokladu, že disk s klindamycinem je umístěn v sousedství disku s erytromycinem.
- Vzdálenost mezi okraji disků erytromycinu a klindamycinu u stafylokoků musí být v rozmezí 12-16 mm. Při dodržení této podmínky lze k vyšetření použít dispensor disků.

Tabulka 1. Podmínky pro vyšetření fenotypu rezistence stafylokoků k antibiotikům MLS_B /2,3/.

Půda	Mueller Hinton agar s 5% defibrinované koňské krve a 20 mg/l (MH-F agar)
Objem inokula	2 - 5 ml ve fyziologickém roztoku
Příprava inokula	Přímá metoda roztěrem kolonií z kultury na agaru vyrostlé na MH-F agaru přes noc
Koncentrace inokula	0,5 dle McFarlandova zákalu
Disky	Erytromycin 15 ug, klindamycin 2 ug
Uspořádání disků	Vzdálenost 12-16 mm mezi okraji disků erytromycinem a klindamycinem
Inkubace	5 % CO ₂ , 35+/-1oC, 18+/-2 h
Hodnocení	V misce s odkrytým víčkem se při pohledu zřepředu v odraženém světle změří průměr mezi okraji inhibiční zóny nevykazujícími žádný růst
Kontrolní kmen	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619*

* Kopie *S. pneumoniae* ATCC 49619 v českých sbírkách kmenů: *S. pneumoniae* CNCTC 5043, *S. pneumoniae* CCM 4501.

E. Hodnocení výsledků

- Změří se průměr inhibiční zóny (IZ) od jejího okraje se zřetelnou inhibicí růstu.
- Průměry IZ kontrolních kmenů musí být v rozmezí uvedeném v tabulce 2.
- Vyšetřovaný kmen je k antibiotikům rezistentní, vytváří-li IZ o průměru menším, než je hraniční průměr IZ pro citlivé kmeny v tabulce 2.



- Vytvoření deformované IZ ve tvaru písmene D (D zóny) kolem klindamycinu v oblasti sousedící s diskem erytromycinu svědčí o indukované rezistenci k antibiotikům MLS_B.
- Vytvoření deformované IZ, uvnitř které rostou kolonie (D⁺ zóna), může být způsobena přítomností různých genů MLS_B rezistence.
- Tabulka 3 obsahuje fenotypy rezistence *Streptococcus* spp. k antibiotikům skupiny MLS_B, odvozené podle průměru a charakteru inhibičních zón kolem erytromycinu a klindamycinu.

Tabulka 2. Hraniční průměry inhibičních zón (IZ) pro citlivé kmeny *Streptococcus* spp. a přípustné rozmezí inhibičních zón kontrolního kmene *S. pneumoniae* ATCC 49619*.

Antibiotikum	Obsah disku	Bakterie	Hraniční průměry IZ	Přípustné rozmezí IZ
				<i>S. pneumoniae</i> ATCC 29213*/4/ /3/
Erytromycin (ERY)	15 ug	Streptokoky sk. A, B, C, G	>= 21 mm	26 - 32 mm
		<i>S. pneumoniae</i>	>= 22 mm	
		Viridující streptokoky	ND	
Klindamycin (CLI)	2 ug	Streptokoky sk. A, B, C, G	>= 17 mm	22 - 28 mm
		<i>S. pneumoniae</i>	>= 19 mm	
		Viridující streptokoky	>= 19 mm	

* Kopie *S. pneumoniae* ATCC 49619 v českých sbírkách kmenů: *S. pneumoniae* CNCTC 5043, *S. pneumoniae* CCM 4501; IZ: inhibiční zóna; ND: neudáno.

Tabulka 3. Fenotyp rezistence *Streptococcus* spp. k antibiotikům skupiny MLS_B a hodnocení podle výsledků diskové metody.

Fenotyp	Charakter inhibiční zóny	obrázek
citlivý	kmen kolem disků s ERY a CLI vytváří IZ shodné, nebo o větším průměru než je limit pro citlivé kmeny*	
cMLS (konstitutivní rezistence)	kmen kolem disků s ERY a CLI nevytváří IZ žádné, nebo o menším průměru než je limit pro citlivé kmeny*	



iMLS (indukovaná rezistence)	kmen vytváří deformovanou IZ (D zónu) kolem disku s CLI v oblasti, sousedící s diskem s ERY, kolem nějž nevytváří IZ žádné, nebo o menším průměru než je limit pro citlivé kmeny*	
M (efflux)	kmen kolem disku s ERY vytváří IZ menší než je limit pro citlivé kmeny v tabulce 2, IZ kolem disku s CLI není deformována a má průměr stejný nebo větší než je limit pro citlivé kmeny*	

IZ - inhibiční zóna; ERY - erytromycin, CLI - klindamycin

legenda k obrázkům: a) erytromycin (15ug), b) klindamycin (2ug)

* viz tabulka 2

Tabulka 4. Interpretace výsledků/3/.

Fenotyp	Interpretace
citlivý	Kmen je citlivý k erytromycinu* i ke klindamycinu
cMLS (konstitutivní rezistence)	Kmen je rezistentní k erytromycinu* i klindamycinu
iMLS (indukovaná rezistence)	Kmen je rezistentní k erytromycinu* i klindamycinu; krátkodobé použití klindamycinu, viz sdělování výsledků
M (efflux)	Kmen je rezistentní k erytromycinu* a citlivý ke klindamycinu

* a k dalším antibiotikům skupiny MLS_B

F. Sdělování výsledků

- Klindamycin je alternativa penicilinu (případně aminopenicilinu) u některých infekcí, způsobených citlivými kmeny, zejména u osob přecitlivělých k penicilinu.
- Interpretace výsledků vyšetření citlivosti k antibiotikům skupiny MLS_B je v tabulce 4.
- **Při nezbytnosti lze pro krátkodobou léčbu méně závažných infekcí kůže a měkkých tkání použít klindamycin i u kmene s indukovanou rezistencí ke klindamycinu /3/.**



STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV

Literatura

- /1/ Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppälä H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2823-2830.
- /2/ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Disk diffusion methodology. Dostupné na <http://www.eucast.org/>
- /3/ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Dostupné na <http://www.eucast.org/>
- /4/ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Routine QC tables. Dostupné na <http://www.eucast.org/>

NRL pro antibiotika, Centrum epidemiologie a mikrobiologie,

Státní zdravotní ústav Praha