



## 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<sub>B</sub> /1/

- Antibiotika ze skupiny MLS<sub>B</sub>, 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 gram pozitivní koky.
- U rodu *Streptococcus spp.* je rezistence k antibiotikům ze skupiny MLS<sub>B</sub> 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<sub>B</sub> (MLS<sub>B</sub>).
- 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<sub>B</sub>

- Fenotypová exprese rezistence u *Streptococcus spp.* k antibiotikům skupiny MLS<sub>B</sub> 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<sub>B</sub>, 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<sub>B</sub> 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<sub>B</sub> /2,3/.

<b>Půda</b>	Mueller Hinton agar s 5% defibrinované koňské krve a 20 mg/l (MH-F agar)
<b>Objem inokula</b>	2 - 5 ml ve fyziologickém roztoku
<b>Příprava inokula</b>	Přímá metoda roztěrem kolonií z kultury na agaru vyrostlé na MH-F agaru přes noc
<b>Koncentrace inokula</b>	0,5 dle McFarlandova zákalu
<b>Disky</b>	Erytromycin 15 ug, klindamycin 2 ug
<b>Uspořádání disků</b>	Vzdálenost 12-16 mm mezi okraji disků erytromycinem a klindamycinem
<b>Inkubace</b>	5 % CO <sub>2</sub> , 35+/-1oC, 18+/-2 h
<b>Hodnocení</b>	V misce s odkrytým víčkem se při pohledu zepředu v odraženém světle změří průměr mezi okraji inhibiční zóny nevykazujícími žádný růst
<b>Kontrolní kmen</b>	<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<sub>B</sub>.
- Vytvoření deformované IZ, uvnitř které rostou kolonie (D<sup>+</sup> zóna), může být způsobena přítomností různých genů MLS<sub>B</sub> rezistence.
- Tabulka 3 obsahuje fenotypy rezistence *Streptococcus* spp. k antibiotikům skupiny MLS<sub>B</sub>, 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<sub>B</sub> 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*	



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

\* a k dalším antibiotikům skupiny MLS<sub>B</sub>

#### 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<sub>B</sub> 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