



Stafylokoky - průkaz indukované rezistence ke klindamycinu (D - test)

Revize 27. 1. 2014

A. Klinické vzorky pro vyšetření citlivosti

- Citlivost k antibiotikům (včetně průkazu indukované rezistence ke klindamycinu) se vyšetřuje pouze u izolátů *Staphylococcus spp.* izolovaných z relevantních vzorků, odebraných v souvislosti s klinicky manifestní infekcí, případně u kmenů MRSA, izolovaných z výtěrů od nosičů.
- Nevyšetření indukované rezistence ke klindamycinu u kmenů stafylokoků může být příčinou selhání klindamycinu v léčbě /1/.

B. Rezistence ke skupině antibiotik MLS_B /1/

- Antibiotika ze skupiny MLS_B , ke kterým patří 14- a 16-členné makrolidy, 15-členný azalid azitromycin, linkosamidy linkomycin a klindamycin, a streptograminy skupiny B, mají stejný nebo velmi podobný mechanismus účinku na grampozitivní koky.
- Rezistence k antibiotikům skupiny MLS_B může být způsobena různými mechanismy. Nejčastěji je řízena geny *erm* (u stafylokoků jsou to geny *ermA*, *ermB* a *ermC*). Tyto geny determinují produkci ribozomální metylázy (erythromycin ribosomal methylase), která modifikuje cílové místo účinku všech antibiotik skupiny MLS_B na ribozomu methyloací 23S rRNA.
- Geny *msrA*, které u stafylokoků řídí eflux makrolidů a azalidů z buňky, se jako příčina rezistence uplatňují méně často. U kmenů s tímto typem rezistence je účinek klindamycinu zachován.
- Geny *erm* i *msr* jsou schopny rychle se šířit horizontálně, prostřednictvím transpozonů, nebo vertikálně, jako klony rezistentních kmenů.
- Bodové mutace, v genech kódujících ribozomální proteiny, se na chromozomu stafylokoků jako příčina rezistence vyskytují vzácně. Mohou být například příčinou samostatné rezistence kmene k linkosamidům při zachování citlivosti k ostatním antibiotikům skupiny MLS_B .

C. Fenotyp rezistence k antibiotikům MLS_B /1/

- Fenotypová exprese rezistence stafylokoků k antibiotikům skupiny MLS_B závisí na tom, zda je rezistence způsobena metylázou syntetizovanou konstitutivně (gen *ermB*) nebo indukovaně (geny *ermA* a *ermC*), nebo zda je způsobena efluxem (geny *msrA*).
 - ◆ 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.
- Buňka stafylokoka může 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) /2/

- 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 12-20 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 (MH)
Objem inokula	2 - 5 ml ve fyziologickém roztoku
Příprava inokula	Přímá metoda roztěrem kolonií z kultury vyrostlé MH agaru přes noc
Koncentrace inokula	0,5 dle McFarlandova zákalu
Disky	Erytromycin (obsah 15 ug), klindamycin (obsah 2 ug)
Uspořádání disků	Vzdálenost 12-20 mm mezi okraji disků s erytromycinem a klindamycinem
Inkubace	35°C +/- 1°C v normální atmosféře po 18+/-2 h
Odečítání	Průměr inhibiční zóny od okrajů nevykazujících růst se měří v odraženém světle na spodní straně misky, umístěné na tmavém pozadí
Kontrolní kmen	<i>S. aureus</i> ATCC 29213*

Kopie *S. aureus* ATCC 29213 v českých sbírkách kmenů: *S. aureus* CNCTC 5480, *S. aureus* CCM 4223.

E. Hodnocení výsledků

- Změří se průměr inhibiční zóny (IZ) od jejího okraje se zřetelnou inhibicí růstu.
- Průměry IZ kontrolního kmene 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 stafylokoků 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 stafylokoků a přípustné rozmezí inhibičních zón kontrolního kmene *S. aureus* ATCC 29213*.

Antibiotikum	Obsah disku	Hraniční průměry IZ	Přípustné rozmezí IZ
		pro citlivé kmeny /3/	<i>S. aureus</i> ATCC 29213*/4/
Erythromycin (ERY)	15 ug	≥ 21 mm	23 - 29 mm
Klindamycin (CLI)	2 ug	≥ 22 mm	23 - 29 mm

* Kopie *S. aureus* ATCC 29213 v českých sbírkách kmenů: *S. aureus* CNCTC 5480, *S. aureus* CCM 4223; IZ: inhibiční zóna.

Tabulka 3. Fenotyp rezistence stafylokoků 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 něž nevytváří IZ žádné, nebo o menším průměru než je limit pro citlivé kmeny*	
M (eflux)	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 (eflux)	Kmen je rezistentní k erytromycinu* a citlivý ke klindamycinu

* a k dalším antibiotikům skupiny MLS_B

F. Sdělování výsledků

- Klindamycin je alternativa oxacilinu u některých infekcí, způsobených citlivými kmeny stafylokoků, zejména u osob přecitlivělých k penicilinu.
- U infekcí kůže a měkkých tkání, způsobených komunitními kmeny MRSA (kmeny *S. aureus* rezistentními k oxacilinu a citlivými k většině dalších antibiotik), je klindamycin (vedle kotrimoxazolu) jednou z prioritních terapeutických alternativ.
- Interpretace testů pro sdělování výsledků 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/.**

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