



Návod na vyšetření antibiotické citlivosti u *Legionella pneumophila* květen 2021

Úvod

Legionella pneumophila je fakultativně intracelulární, aerobní, gramnegativní tyčka a je původcem legionářské nemoci. Náročné kultivační podmínky znesnadňují vyšetření citlivosti a korelace mezi výsledky získanými *in vitro* a klinickými výsledky je nejistá.

Antibiotická rezistence

Získaná antimikrobní rezistence je u *L. pneumophila* vzácná [1–6]. Byl však popsán klinický izolát rezistentní vůči ciprofloxacinu v důsledku jediné bodové mutace v genu *gyrA* [7] a rezistence na fluorochinolony byla popsána u pacientů během terapie [8]. Bylo prokázáno, že za zvýšenou MIC azitromycinu (0,125–2 mg/l) je zodpovědná efluxní pumpa (LpeAB) [1]. Efluxní pumpa se nachází u klinických izolátů *L. pneumophila* se specifickými typy sekvencí [1,4,9]. Žádný klinický význam snížené citlivosti na azithromycin nebyl prokázán. Tato zjištění také naznačují, že erytromycin je špatným prediktorem snížené citlivosti na makrolidy způsobené touto efluxní pumpou. Získaná antibiotická rezistence se u *L. pneumophila* vyskytuje velmi vzácně [1-4]. Nicméně byl oznámen výskyt klinického izolátu rezistentního k ciprofloxacinu v důsledku jednobodové mutace v genu *gyrA* [5] a byly izolovány další kmeny rezistentní k fluorochinolonom, některé z nich v průběhu léčby [6].

Léčba

Za účinná antibiotika pro léčbu legionelózy jsou pokládány makrolidy, fluorochinolony a rifampicin, z nichž všechny dosahují dostatečné intracelulární koncentrace [10-12]. U imunokompromitovaných pacientů však léčba může probíhat pomalu nebo nedostatečně, přestože izolát se *in vitro* jeví jako citlivý [13]. Antibiotika se špatnou intracelulární penetrací (např. beta-laktamy a aminoglykosidy) nejsou terapeuticky účinná navzdory dobré aktivitě *in vitro*.

Vyšetření antibiotické citlivosti

V současné době není k dispozici žádný zlatý standard pro vyšetření antibiotické citlivosti *L. pneumophila*. Výsledky MIC vyšetřených různými metodami, a zejména na různých půdách, jsou odlišné [14]. Z dlouhodobé diskuse, věnované půdám s obsahem aktivního uhlí vyplynulo, že přidání aktivního uhlí zvyšuje hodnoty MIC většiny relevantních antibiotik [6, 15]. Nové pevné půdy bez aktivního uhlí [16] nebo mikrometoda v kapalně půdě [1,2] poskytují adekvátní růst legionel a shodné výsledky vyšetření citlivosti [16]. Mezinárodní skupina zastoupená spoluautory z různých mezinárodních referenčních laboratoří a kliniků z různých zemí zabývajících se diagnostikou a léčbou legionelózy vydala doporučení pro standardizaci metod testování antimikrobní citlivosti včetně referenčních kmenů a pokynů pro usnadnění a zlepšení detekce antimikrobní rezistence [14].

Korelace mezi MIC a klinickým výsledkem je sice nejistá, antibiotická citlivost by se však měla vyšetřit pro zjištění mechanismů rezistence, jejichž přítomnost indikuje



MIC vyšší, než jsou epidemiologické předěly (ECOFFs- epidemiological cut off) vyšetřovaných antibiotik. V současné době nejsou dostatečné údaje ke stanovení příslušných ECOFFs, ale v tabulkách 1 a 2 jsou uvedeny publikované distribuce MIC u izolátů divokého typu, získané dvěma metodami uvedenými v tomto dokumentu. První metoda využívá gradientní testy na pufrovaném agaru s kvasničným extraktem doplněném α -ketoglutarátem (BCYE- α) a je pro rutinní laboratoře snadno proveditelná, reprodukovatelná a dostupná [5,6,15]. Časově náročnější než gradientní test je bujónová mikrodiluční metoda bez aktivního uhlí [1,2], která poskytuje nezkreslené výsledky MIC.

1. Gradientní test

1. Vyšetřovaný kmen se subkultivuje na půdě BCYE- α a inkubuje po dobu 48 hodin při 35-37°C ve vlhké atmosféře (relativní vlhkost 50-70 %).
2. Kolonie se suspendují ve sterilní vodě do koncentrace odpovídající 0,5 McFarlandova standardu.
3. Plotny s BCYE- α se naočkují rovnoměrným rozetřením inokula po celém povrchu a na každou plotnu o průměru 9 cm se klade jeden gradientní proužek.
4. Inkubace probíhá 48 hodin při 35°C ve vlhké atmosféře. Pokud po 48 hodinách není růst dostatečný, lze plotny inkubovat dalších 24 hodin.
5. MIC se odečítá v průsečíku elipsy s gradientním proužkem.
6. MIC pro izolát se porovná s distribucí MIC v tabulce. Pravděpodobná citlivost izolátu může být hlášena na základě toho, zda je MIC nižší nebo rovna předběžné nejvyšší MIC pro populaci divokého typu.
7. Izoláty s MIC nad nejvyšší MIC v tabulce pro divoké typy by měly být zaslány do referenční laboratoře k potvrzení.

EUCAST nestanovil pro kontrolu kvality přípustné rozmezí a cílové (target) MIC. Nicméně, MIC antibiotik vyšetřené u *L. pneumophila* ATCC 12821 a ATCC 33152 a CIP 107629T by měly být v oblasti MIC divokého typu [1,6] a měly by být použity k ověření, zda jsou podmínky růstu dostatečné. Ke kontrole kvality gradientních proužků s antibiotiky je zapotřebí postupovat podle pokynů výrobce s příslušnými kmeny nenáročných bakterií pro kontrolu kvality.

Tabulka 1. Distribuce MIC u *L. pneumophila* (gradientní metoda vyšetření MIC)

Antibiotikum	n	≤0.008	0.016	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	≥32	Reference ¹
Azitromycin	183			3	43	108	18	7	3			1			[6]
	100		8	31	43	1	8	6			3				[5]
	122			13	45	41	2	16	5						[4]
Klaritromycin	183				1	110	70	1	1						[6]
	100		1	57	20	16	3	1						2	[5]
Erytromycin	183			2	30	119	25	5	1	1					[6]
	100			2	32	57	6	1					2		[5]
	122				12	46	31	30	3						[4]
Ciprofloxacin	183						2	177	3	1					[6]
	100				3	35	57	2	1	2					[5]
	122						24	90	8						[4]
Levofloxacin	183				2	1	177	2	1						[6]
	100			24	63	10		1	2						[5]
	122					43	79								[4]
Moxifloxacin	183						2	176	5						[6]
	100					8	87	2	1		2				[5]
	122						9	70	43						[4]
Rifampicin	183	7	132	39											[6]
	100		97	1						1	1				[5]
	122	57	60	5											[4]
Doxycyklin	183								5	48	106	24			[6]
	100			1			1	4	20	69	3	2			[5]
Tigecyklin	183								1	15	82	80	5		[6]
	100						1	14	57	21	7				[5]

Poznámka 1: Reference 15 zahrnuje pouze séroskupinu 1, reference 19 zahrnuje séroskupiny 1, 6, 8 a 10, reference 19 zahrnuje séroskupiny 1, 3, 4 5, 6 a 10. MIC u séroskupiny 1 může být vyšší než MIC u ostatních séroskupin [4,5].

Poznámka 2: Šedě zvýrazněné hodnoty = orientační nejvyšší MIC pro populaci divokého typu

2. Bujónová mikrodiluční metoda

1. Vyšetřovaný kmen se subkultivuje na půdě BCYE- α a inkubuje po dobu 48 hodin při 35-37°C ve vlhké atmosféře (relativní vlhkost 50-70 %).
2. Kolonie se suspendují ve sterilní vodě do koncentrace odpovídající 0,5 McFarlandova standardu.
3. Do jamek s obsahem 40 μ l roztoku antibiotika se naočkují 160 μ l bakteriální suspenze k dosažení konečné bakteriální koncentrace $4 \cdot 10^5$ až $5 \cdot 10^5$ /ml
4. Inkubuje se 48 hodin při 35 °C ve vlhké atmosféře.
5. Při odečítání MIC se postupuje podle doporučení EUCAST (EUCAST Reading guide, v 3.0, leden 2021, český překlad Bujonová mikrodiluce, návod k odečítání EUCAST dostupné na <http://www.szu.cz/vysetreni-mic>).
6. MIC pro izolát se porovná s distribucí MIC v tabulce. Pravděpodobná citlivost izolátu může být hlášena na základě toho, zda je MIC nižší nebo rovna předběžné nejvyšší MIC pro populaci divokého typu.

7. Izoláty s MIC nad nejvyšší MIC v tabulce pro divoké typy by měly být zaslány do referenční laboratoře k potvrzení.

EUCAST nestanovil pro kontrolu kvality přípustné rozmezí a cílové (target) MIC. Nicméně, MIC antibiotik vyšetřené u *L. pneumophila* ATCC 12821 a ATCC 33152 by měly být v oblasti MIC divokého typu [1,6] a měly by být použity k ověření, zda jsou podmínky růstu dostatečné. MIC pro *Escherichia coli* ATCC 25922 a *Staphylococcus aureus* ATCC 29313 v kapalně půdě by měly být podobné jako v Mueller-Hintonově bujónu.

Tabulka 1. Distribuce MIC u *L. pneumophila* (mikrodiluční bujónová metoda)

Antibiotikum	Izoláty	n	≤0.002	0.004	0.008	0.016	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	Reference	
Azitromycin	WT Lp1 LpeAB-neg	93				1	27	53	12															[1]	
	WT Lp1 LpeAB-pos	16								2	8	5	1												[1]
	Resistant Lp1*	12															1	1	1	3		2	4	[1]	
	WT Lp	40			4	13	8	12	3															[16]	
Klaritromycin	WT Lp1	109		1	3	32	61	13																[1]	
	Resistant Lp1*	12																1	1	6	4			[1]	
Erytromycin	WT Lp1	109					1	20	47	28	9	5												[1]	
	Resistant Lp1*	12																				8	4	[1]	
	WT Lp	92						14	27	24	26	1												[2]	
Ciprofloxacin	WT Lp1	109			9	54	45	2																[1]	
	Resistant Lp1*	7								1			2		4									[1]	
	WT Lp	92		1	23	58	8			2														[2]	
Levofloxacin	WT Lp1	109		1	10	75	24																	[1]	
	Resistant Lp1*	/							1			2		4										[1]	
	WT Lp	40				9	30	1																[16]	
	WT Lp	92					7	62	22	1														[2]	
Moxifloxacin	WT Lp1	109			5	29	67	9																[1]	
	Resistant Lp1*	7							1		1	1		4										[1]	
	WT Lp	92				1	14	75	2															[2]	
Rifampicin	WT Lp1	109	10																					[1]	
	Resistant Lp1*	10									1	1				3	3	2						[1]	
	WT Lp	40	2	28	10																			[16]	
	WT Lp	92	92																					[2]	
Doxycyklin	WT Lp1	109						1	1	7	55	46												[1]	
	WT Lp	40										1		6	26	7								[16]	

Poznámka 1: Lp: *Legionella pneumophila*; Lp1: *Legionella pneumophila* séro skupina 1.

Poznámka 2: * rezistentní mutanty selektované *in vitro* [1,17]

Poznámka 3: Dvě další reference [18, 19] uvádějí distribuční rozmezí, nikoli však MIC pro každé antibiotikum

Poznámka 4: Šedě zvýrazněné hodnoty = orientační nejvyšší MIC pro populaci divokého typu

References

1. Vandewalle-Capo M, et al. Minimum inhibitory concentration (MIC) distribution among wild-type strains of *Legionella pneumophila* identifies a subpopulation with reduced susceptibility to macrolides owing to efflux pump genes. *Int J Antimicrob Agents* 2017; 50(5): 684-9.
2. Wilson RE, et al. Antibiotic susceptibility of *Legionella pneumophila* strains isolated in England and Wales 2007–17. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73(10): 2757-61.
3. Koshkolda T, Lück C. Antibiotic susceptibility of clinical *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains isolated in Germany. *J Antimicrob Chemother*, 2018; 73(1): 541-2.
4. Natås OB, et al. Susceptibility of *Legionella pneumophila* to antimicrobial agents and the presence of the efflux pump LpeAB. *J Antimicrob Chemother* 2019; 74(6): 1545-50.
5. De Giglio O, et al. Antibiotic susceptibility of *Legionella pneumophila* strains isolated from hospital water systems in Southern Italy. *Environ Res* 2015; 142: 586-90.
6. Bruin JP, et al. Wild-type MIC distribution and epidemiological cut-off values in clinical *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 71(1): 103-8.
7. Bruin, J.P. et al. Isolation of ciprofloxacin-resistant *Legionella pneumophila* in a patient with severe pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69(10): 2869-71.
8. Shadoud, L., et al. Hidden Selection of Bacterial Resistance to Fluoroquinolones In Vivo: The Case of *Legionella pneumophila* and Humans. *EBioMedicine*, 2015; 2(9): 1179-85.
9. Mallegol J, et al. Antimicrobial activity of solithromycin against clinical isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(2): 909-15.
10. Sabria M, et al. Fluoroquinolones vs macrolides in the treatment of Legionnaires' disease. *Chest*, 2005;128(3): 1401-5.
11. Diederer BM. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *J Infect*; 2008; 56(1): 1-12.
12. Phin, N., et al. Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect Dis*, 2014. 14(10): p. 1011-21.
13. Poudroux C, et al. Slowly or Nonresolving Legionnaires' Disease: Case Series and Literature Review. *Clin Infect Dis* 2020; 70(9): 1933–40.
14. Portal E., et al. *Legionella* antibiotic susceptibility testing: is it time for international standardisation and evidence-based guidance? *J Antimicrob Chemother*, 2021;76(5):1113-6.
15. García MT, et al. In vitro activities of gemifloxacin versus five quinolones and two macrolides against 271 Spanish isolates of *Legionella pneumophila*: influence of charcoal on susceptibility test results. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(8): 2176-8.
16. Portal E, et al. *Legionella* antimicrobial sensitivity testing: comparison of microbroth dilution with BCYE and LASARUS solid media. *J Antimicrob Chemother* 2021; 76(5):1197-204.
17. Descours G, et al. Ribosomal Mutations Conferring Macrolide Resistance in *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61(3): e02188-16.
18. Gomez-Lus R., et al. Comparative in vitro bacteriostatic and bactericidal activity of trovafloxacin, levofloxacin and moxifloxacin against clinical and environmental isolates of *Legionella* spp. *Int J Antimicrob Agents*, 2001; 18(1): 49-54.
19. Higa F, et al. In vitro activity of pazufloxacin, tosufloxacin and other quinolones against *Legionella* species. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(6): 1053-7.