

Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2010

Oznaczanie wrażliwości pałeczek Gram-ujemnych z rodzaju *Corynebacterium* spp.

Iwona Łętowska¹, Alina Olender²

- 1. Zakład Profilaktyki Zakażeń i Zakażeń Szpitalnych, Narodowy Instytut Leków**
- 2. Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie**

9. Oznaczanie wrażliwości *Corynebacterium* spp.

Gatunki z rodzaju *Corynebacterium* wchodzą w skład mikroflory skóry i błon śluzowych i mogą stanowić kontaminację niewłaściwie pobranego materiału klinicznego. Oznaczanie lekowrażliwości powinno dotyczyć tylko izolatów uznanych za pewny czynnik etiologiczny zakażenia, izolowanych w ilości znamiennej z krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego, rany, moczu, miejsc jałowych (oko, tkanki, płyny). Oznaczenie lekowrażliwości jest wskazane w przypadku, gdy nie można przewidzieć wrażliwości wyizolowanego drobnoustroju i zastosowania terapii empirycznej, albo należy on do gatunku, o którym wiadomo, że może być odporny na powszechnie stosowane antybiotyki. Oznaczanie lekowrażliwości powinno być wykonane przez laboratorium mikrobiologiczne po konsultacji z klinicystą, który nie tylko oceni, czy takie badanie jest konieczne w konkretnym przypadku, a także będzie uczestniczył w klinicznej interpretacji wyników.

9.1 Najważniejsze mechanizmy oporności

Gatunki oportunistyczne zaliczane do rodzaju *Corynebacterium* należą do drobnoustrojów, które w ostatnich latach nabierają coraz większego znaczenia w zakażeniach u ludzi. Informacje o wysokiej oporności na antybiotyki oportunistycznych gatunków z rodzaju *Corynebacterium* oparte są głównie na badaniach fenotypowych, na podstawie których scharakteryzowano izolaty hodowane z różnych materiałów klinicznych [4, 5, 6, 7, 8, 12, 18]. Opisywane wielooporne szczepy *C. jeikeium* [14], *C. amycolatum* [20], *C. striatum* [1, 12]

i *C. resistens* [11] potwierdzają występowanie u *Corynebacterium* spp. zarówno różnych mechanizmów oporności jak i odpowiedzialnych za nie genów.

Mechanizm oporności na makrolidy, linkosamidy i streptograminy B (MLSB), stwierdzony u szczepów *Corynebacterium* spp. jest związany przede wszystkim z obecnością genów *erm*, które zostały zakwalifikowane do klasy X [13]. Geny *ermX* izolowane z różnych gatunków rodzaju *Corynebacterium* (*C. diphtheriae*, *C. jeikeium*, *C. xerosis*) mimo wysokiego stopnia homologii wykazywały różną lokalizację (transpozon, plazmid, chromosom). U szczepów *Corynebacterium* grupa A posiadających również mechanizm oporności MLSB został wykryty gen - *ermB* [8], natomiast u szczepów *Corynebacterium* spp. opornych na makrolidy i streptograminy B stwierdzono obecność genu *msrA* [10] i wytwarzanie układu aktywnego transportu wypompowywania antybiotyku z komórki (*ang.* macrolide efflux proteins). Gen *mef* został wykryty u szczepów *Corynebacterium* grupa A, *C. jeikeium* oraz innych *Corynebacterium* spp. [8].

Oporność na fluorochinolony (ciprofloksacyne, norfloksacyne, lewofloksacyne) związana jest z mutacjami w obrębie obszaru genu strukturalnego podjednostki A gyrazy, który określany jest jako obszar warunkujący oporność na chinolony (*ang.* QRDR – quinolone resistance determining region). Szczególnie wysoki poziom oporności stwierdzono w wyniku podwójnych mutacji, prowadzących do zmiany dwóch aminokwasów [3, 15].

Oporność na tetracykliny jest związana z obecnością genu *tetM* determinującego oporność na wszystkie tetracykliny, co jest związane z ochronnym działaniem na rybosom białka o masie około 72-72,5 kDa [16]. U *C. striatum* M82B oporność na tetracyklinę jest determinowana przez geny *tetA* i *tetB* oraz mechanizm czynnego wypompowywania leku z komórki [17].

Rekomendowanym antybiotykiem w empirycznym leczeniu zakażeń o charakterze inwazyjnym wywołanych przez gatunki z rodzaju *Corynebacterium* jest wankomycyna. Wiąże się to z powszechną wrażliwością na ten antybiotyk nawet wysokoodpornych gatunków takich jak *C. jeikeium*, *C. resistant*, *C. amycolatum*, *C. striatum*. Fernandez-Roblas i wsp. w 2009r. [4] przeprowadzili badanie wrażliwości na antybiotyki z użyciem pasków z gradientem antybiotyku Etest® dużej grupy szczepów z gatunków *C. urealyticum*, *C. amycolatum*, *C. jeikeium*, *C. coyleae*, *C. striatum*, *C. aurimucosum* i *C. afermentans*. Autorzy stwierdzili, że wszystkie z tych gatunków były wrażliwe na glikopeptydy, linezolid, chinupristynę/dalfopristynę i daptomycynę.

9.2 Metody

Do oznaczania lekowrażliwości szczepów *Corynebacterium* spp. nie należy stosować metody dyfuzyjno-krażkowej.

Zaleca się oznaczanie minimalnego stężenia hamującego antybiotyku (MIC) jedną z poniższych metod:

9.2.1 Metoda mikrorozcieńczeń w bulionie [2]

- Seryjne rozcieńczenia antybiotyków w bulionie Mueller Hinton z odpowiednim stężeniem kationów (CAMHB) i dodatkiem zlizowanej krwi końskiej (2,5 do 5% v/v)
 - przy oznaczaniu wrażliwości na daptomycynę podłoże wzbogacone jonami wapnia w stężeniu 50 µg/mL
- Inokulum: zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda
- Inkubacja: 35°C w atmosferze tlenowej, 24 do 48 godzin

9.2.2. Metoda dyfuzji z paska nasączonego gradientem antybiotyku [19,20]

- Stosuje się podłoże Mueller Hinton Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej
- Inokulum w bulionie: zawiesina o gęstości 1,0 McFarlanda
- Inkubacja: 35°C w atmosferze tlenowej lub z 5% CO₂ (jeśli jest to wymagane do lepszego wzrostu szczepu), 24 do 48 godzin lub dłużej, jeżeli szczep jest wolnorosnący. W przypadku erytromycyny i klindamycyny dopuszczalna jedynie inkubacja w atmosferze tlenowej.
- Odczytana wartość MIC na pasku powinna odpowiadać całkowitemu zahamowaniu wzrostu, obejmującemu również mikrokolonie i wzrost mgławicowy; dla antybiotyków bakteriostatycznych przy widocznym wzroście mgławicowym należy odczytać wartość MIC w punkcie 80% jego zahamowania.

9.3. Antybiogram podstawowy

Tab. 1. Interpretacja wartości MIC dla *Corynebacterium* spp. [2]

Antybiotyk	Wartość MIC (µg/mL)			Komentarz
	wrażliwy	średnio-wrażliwy	oporny	
Penicylina	≤1	2	≥4	Kryteria interpretacji mogą nie stosować się do zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych

Wankomycyna *	≤ 4	-	-	
Erytromycyna (-CO ₂)	$\leq 0,5$	1	≥ 2	
Gentamicyna	≤ 4	8	≥ 16	Interpretacja wartości MIC tylko dla metody mikrorozcieńczeń

* Dla pewnych układów drobnoustrojów/antybiotyków brak lub rzadkie występowanie szczepów opornych praktycznie wyklucza definiowanie wyników w kategorii innej niż „wrażliwy”. W przypadku szczepów, dla których wyniki sugerują kategorię „niewrażliwy” należy sprawdzić i ewentualnie powtórzyć zarówno badanie lekowrażliwości jak i identyfikację gatunku. Izolaty o potwierdzonej identyfikacji i lekowrażliwości w kategorii „niewrażliwy” należy przesłać do laboratorium referencyjnego celem potwierdzenia wyniku.

9.4. Antybiogram rozszerzony

Tab. 2. Interpretacja wartości MIC dla *Corynebacterium* spp. [2]

Antybiotyk	Wartość MIC (mg/L)			Komentarz
	wrażliwy	średnio-wrażliwy	oporny	
Cefepim	≤ 1	2	≥ 4	Kryteria interpretacji mogą nie stosować się do zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych
Cefotaksym	≤ 1	2	≥ 4	
Ceftriakson	≤ 1	2	≥ 4	
Imipenem	≤ 4	8	≥ 16	
Meropenem	≤ 4	8	≥ 16	
Daptomycyna*	≤ 1	-	-	
Ciprofloksacyna	≤ 1	2	≥ 4	Interpretacja wartości MIC tylko dla metody mikrorozcieńczeń
Doksycyklina	≤ 4	8	≥ 16	Interpretacja wartości MIC tylko dla metody mikrorozcieńczeń
Tetracyklina	≤ 4	8	≥ 16	
Klindamycyna (-CO ₂)	$\leq 0,5$	1 - 2	≥ 4	
Trimetoprim/ sulfametoksazol (1/19)	$\leq 2/38$	-	$\geq 4/76$	Wartości na pasku z gradientem antybiotyku odnoszą się do trimetoprimu
Rifampicyna	≤ 1	2	≥ 4	Stosować wyłącznie w terapii skojarzonej
Chinupristyna/ dalfopristyna	≤ 1	2	≥ 4	
Linezolid*	≤ 2	-	-	

* Dla pewnych układów drobnoustrojów/antybiotyków brak lub rzadkie występowanie szczepów opornych praktycznie wyklucza definiowanie wyników w kategorii innej niż „wrażliwy”. W przypadku szczepów, dla których wyniki sugerują kategorię „niewrażliwy” należy sprawdzić i ewentualnie powtórzyć zarówno badanie lekowrażliwości jak i identyfikację gatunku. Izolaty o potwierdzonej identyfikacji i lekowrażliwości w kategorii „niewrażliwy” należy przesłać do laboratorium referencyjnego celem potwierdzenia wyniku.

9.5. Szczepy wzorcowe

9.5.1. Metoda mikrorozcieńczeń.

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

Escherichia coli ATCC 25922 (dla gentamycyny)

9.5.2. Metoda dyfuzji z paska z gradientem antybiotyku.

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

Piśmiennictwo

1. Campanile F., Carretto E., Barbarini D., Grigis A., Falcone M., Goglio A., Venditti M., Stefani S. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 75-78 (2009)
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved standard M45-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
3. Eguchi H., Kuwahara T., Miyamoto T., Nakayama-Imahiji H., Ichimura M., Hayashi T., Shiota H. High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J. Clin. Microbiol.* 2, 527-532 (2008)
4. Fernandez-Roblas R., Adames H., Martin-de-Hijas N.Z., Garcia Almeida D., Gadea I., Esteban J.: In vitro activity of tigecycline and 10 other antimicrobials against clinical isolates of the genus *Corynebacterium*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.11.001 (2009)
5. Funke G., Efstratiou A., Kiklinska D., Hutson R., De Zoysa A., Engler K.H., Collins M.D. *Corynebacterium imitans* sp.nov. isolated from patients with suspected diphtheria. *J. Clin. Microbiol.* 8, 1978-1983 (1997)
6. Gomez-Garces J-L., Alos J-I., Tamayo J.: *In vitro* activity of linezolid and 12 other antimicrobials against coryneform bacteria, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 29, 688-692 (2007)
7. Lagrou J., Verhaegen M., Janssens G., Wauters G., Verbist L.: Prospective study of catalase-positive coryneform organisms in clinical specimens: identification, clinical relevance, and antibiotic susceptibility, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 7-15 (1998)

8. Luna V.A., Coates P., Eady A., Cove J.H., Nguyen T.T.H., Roberts M.C. A variety of Gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 44, 19-25 (1999)
9. Martinez-Martinez L., Suarez A.I., Winstanley J., Ortega M.C., Bernard K. Phenotypic characteristics of 31 strains of *Corynebacterium striatum* isolated from clinical sample. *J. Clin. Microbiol.* 9, 2458-2461 (1995)
10. Ojo K.K., Striplin M.J., M., Ulep C.C., Close N.S., Zittle J., Luis H., Bernardo M., Leitao J., Roberts M.C.: *Staphylococcus* efflux *msr(A)* gene characterized in *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, and *Pseudomonas* isolates. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 3, 1089-1091 (2006)
11. Ostuka Y., Kawamura Y., Koyama T., Iihara H., Ohkusu K., Azeki T.: *Corynebacterium resistens* sp.nov., a new multi-resistant coryneform bacterium isolated from human infection. *J. Clin. Microbiol.* 8, 3713-3717 (2005)
12. Otsuka Y., Ohkusu K., Kawamura Y., Baba S., Azeki T., Kiura S. Emergence of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* as a nosocomial pathogen in long-term hospitalized patients with underlying diseases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 54, 109-114 (2006)
13. Roberts M.C., Sutcliffe J., Courvalin P., Jensen L.B., Rood J., Seppala H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2823-2830 (1999)
14. Rosato A.E., Lee B.S., Nash K.A.: Inducible macrolide resistance in *Corunebacterium jeikeium*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 7, 1982-1989 (2001)
15. Sierra J.M., Martinez-Martinez L., Vazquez F., Giralt E., Vila J.: Relationship between mutations in the *gyrA* gene and quinolone resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum*, *Antimicrob. Agents. Chemother.* 5, 1714-1719 (2005)
16. Tauch A., Kassing F., Kalinowski J., Puhler A. The *Corynebacterium xerosis* composite transposon Tn5432 consists of two identical insertion sequences, designated IS1249, flanking the erythromycin resistance gene *ermcx*. *Plasmid*, 34, 119-131 (1995)
17. Tauch A., Krieft S., Pühler A., Kalinowski J. The *tetAB* of the *Corynebacterium striatum* R-plasmid pTP10 encode an ABC transporter and confer tetracycline, oxytetracycline and oxacillin resistance in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiology Letters* , 173, 203-209 (1999)

18. Troxler R., Funke G., von Graevenitz A., Stock I.: Natural antibiotic susceptibility of recently established coryneform bacteria, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20, 315-323 (2001)
19. [www.abbiotest.com/Etest Application Sheet/Fastidious Gram Positive Bacilli EAS 021](http://www.abbiotest.com/Etest%20Application%20Sheet/Fastidious%20Gram%20Positive%20Bacilli%20EAS%20021)
20. www.oxid.com
21. Yague Guirao G., Mora Peris B., Martinez-Toldos M.C., Rodriguez Gonzalez T., Valero Guillen P.L., Segovia Hernandez M.: Implication of *ermX* genes in macrolide- and telithromycin-resistance in *Corynebacterium jeikeium* and *Corynebacterium amycolatum*. *Rev. Esp. Quimioterap.* 3, 136-242 (2005)