

## **Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2009**

### **Oznaczanie wrażliwości *Neisseria meningitidis* i *Haemophilus influenzae***

**Anna Skoczyńska<sup>1</sup>, Dorota Żabicka<sup>1</sup>, Waleria Hryniewicz<sup>1,2</sup>**

**1. Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków**

**2. Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej**

#### **6. Oznaczanie wrażliwości *Neisseria meningitidis***

##### **6.1. Metody**

W przypadku konieczności oznaczenia wrażliwości meningokoków na penicylinę lub ampicylinę nie należy stosować metody dyfuzyjno-krażkowej; należy oznaczyć MIC antybiotyków jedną z metod:

- 1). metodą rozcieńczeń w agarze, stosując podłoże KBMHA (Mueller Hinton agar z 5% krwi baraniej)
  - 2). metodą dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku (wg instrukcji producenta).
- Do oznaczeń wrażliwości na pozostałe antybiotyki stosowane w leczeniu i chemioprophylaktyce można stosować metodę dyfuzyjno-krażkową. Stosowane jest podłoże KBMHA. Zawiesinę bakteryjną o gęstości 0,5 McFarlanda należy przygotować z 20-24 godz. hodowli na podłożu czekoladowym. Należy pamiętać, że w przypadku przygotowywania zawiesiny o gęstości 0,5 McFarlanda z hodowli na agarze krwawym zawiera ona około połowy jednostek tworzących kolonię w porównaniu z podłożem czekoladowym. Antybiogramy oraz płytki do oznaczania MIC należy inkubować 20- 24 godz. w temp.  $35^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ , w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$  [9].

##### **6.2. ANTYBIOGRAM**

Rutynowe oznaczanie wrażliwości na leki szczepów *N. meningitidis* nie jest zalecane

**Tab. 6.1.** Interpretacja wielkości stref zahamowania wzrostu dla *N. meningitidis* [9]

Antybiotyk	Krażek	Średnica strefy (mm)		
		wrażliwy	średniowrażliwy	oporny
Penicylina		NA	NA	NA
Ampicylina		NA	NA	NA
Cefotaksym lub ceftriakson	30 µg	≥ 34	-	-
Chloramfenikol	30 µg	≥ 26	20-25	≤ 19
Ciprofloksacyna*	5 µg	≥ 35	33-34	≤ 32
Rifampicyna*	5 µg	≥ 25	20-24	≤ 19

NA – metoda dyfuzyjno-krażkowa nie może być stosowana w oznaczaniu wrażliwości szczepów *N. meningitidis* na penicylinę i ampicylinę; należy oznaczać wartości MIC

\*antybiotyki używane w chemioprophylaktyce zakażeń o etiologii *N. meningitidis*.

**Tab. 6.2.** Interpretacja wartości MIC antybiotyków dla *N. meningitidis* [9]

Antybiotyk	Wartość MIC (µg/ml)		
	wrażliwy	średniowrażliwy	oporny
Penicylina	≤ 0,06	0,12-0,25	≥ 0,5
Ampicylina	≤ 0,12	0,25-1	≥ 2
Cefotaksym lub ceftriakson	≤ 0,12	-	-
Chloramfenikol	≤ 2	4	≥ 8
Ciprofloksacyna*	≤ 0,03	0,06	≥ 0,12
Rifampicyna*	≤ 0,5	1	≥ 2

\*antybiotyki używane w profilaktyce zakażeń o etiologii *N. meningitidis*.

### 6.3. Szczepy wzorcowe:

*Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 – inkubacja w warunkach tlenowych lub w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>.

*Escherichia coli* ATCC 25922 - szczep służy do kontroli jakości oznaczania wrażliwości na ciprofloksacynę i minocyklinę. Inkubacja powinna być prowadzona w warunkach tlenowych lub w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>.

## 7. Oznaczanie wrażliwości *Haemophilus influenzae*

### 7.1. Metody

Oznaczanie wrażliwości wykonuje się na podłożu HTM, stosując zawiesinę bakteryjną o gęstości 0,5 McFarlanda (na posiane płytki o średnicy 9-10 cm z podłożem HTM nakładać nie więcej niż 4 krążki) oraz inkubację trwającą 16-18 godz. w temp.  $35^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ , w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. W przypadku oznaczania wartości MIC antybiotyków metodą mikrorozcieńczeń w bulionie HTM, inkubacja powinna trwać 20-24 godz. w warunkach tlenowych. Odczyt strefy zahamowania wzrostu dla szczepów *Haemophilus* spp. wokół krążków z antybiotykami może sprawiać trudności. Ważne jest, aby odczytywać wielkość strefy zahamowania wzrostu zasadniczego bakterii z pominięciem słabego wzrostu bardzo małych kolonii lub wzrostu mgławicowego [9].

### 7.2. Najważniejsze mechanizmy oporności

Oporność na ampicylinę u *Haemophilus influenzae* jest najczęściej związana z produkcją β-laktamazy. Szczepy *H. influenzae* odporne na ampicylinę, β-laktamazo-ujemne (BLNAR) występują na świecie i w Polsce coraz częściej [1, 2, 7, 10]. Szczepy BLNAR powinny być traktowane jako klinicznie odporne na ampicylinę, amoksycylinę, amoksycylinę z kw. klawulanowym, ampicylinę z sulbaktamem, cefaklor, cefprozil, cefuroksym, cefetamet i piperacylinę z tazobaktamem [9], pomimo iż *in vitro* niektóre z tych szczepów mogą wykazywać wrażliwość na wymienione leki. Mechanizm ten wynika ze zmian w białkach wiążących penicylinę, PBP i jest trudny do wykrycia rutynowymi metodami [1, 3, 4]. Obniżona wrażliwość na ampicylinę, amoksycylinę i amoksycylinę z kwasem klawulanowym, brak wytwarzania β-laktamazy w teście cefinazowym, a zwłaszcza niepowodzenie terapeutyczne, powinny skłonić do przypuszczenia, że możemy mieć do czynienia ze szczepem BLNAR. Jak do tej pory nie ma jednolitego schematu wykrywania tej oporności w oparciu o testy fenotypowe [3]. Optymalnym postępowaniem byłoby zastosowanie metod biologii molekularnej (PCR) w celu wykrycia mutacji w genie *ftsI*, kodującym PBP3. Z metod fenotypowych najlepsze wyniki uzyskiwano stosując jednocześnie krążki z ampicyliną (2 µg) oraz z amoksycyliną/kw. klawulanowym (2 µg/1 µg). Strefa zahamowania wzrostu dla szczepów BLNAR (dla obu krążków) wynosi na ogół ≤13 mm, dla szczepów wrażliwych ≥17 mm [8, 11]. MIC ampicyliny lub amoksycyliny dla szczepów BLNAR ma na ogół wartość ≥1 µg/ml, jednak opisywano

szczyepy tzw. lowBLNAR z wartościami MIC=0,5 µg/ml [6, 10]. Dla szczepów wrażliwych MIC ampicyliny ma zazwyczaj wartość 0,25 µg/ml lub mniejszą. Drugą metodą pozwalającą na dobre różnicowanie szczepów wrażliwych od BLNAR, trudną jednak do zastosowania w rutynowej diagnostyce, jest oznaczanie MIC amoksycyliny i amoksycyliny z kw. klawulanowym metodą mikrorozcieńczeń (dla szczepów BLNAR MIC ≥ 1 µg/ml) [3]. Na świecie, a ostatnio w Polsce opisano już także szczepy *H. influenzae* dysponujące jednocześnie dwoma mechanizmami oporności na ampicylinę: zmianami w białkach PBP (BLNAR) i wytwarzające β-laktamazę, tzw. szczepy BLPACR (*ang.* β-lactamase-producing, amoxicillin-clavulanic acid-resistant) [1, 4, 5, 10]. Szczepy BLNAR i BLPACR należy przesyłać do KORLD.

### 7.3. ANTYBIOGRAM PODSTAWOWY

Amoksycylina, amoksycylina z kwasem klawulanowym, azytromycyna, klarytromycyna, cefaklor i cefuroksym to antybiotyki, które mogą być stosowane w terapii empirycznej zakażeń dróg oddechowych wywoływanych przez *H. influenzae*. Oznaczanie wrażliwości na te leki jest istotne z powodów epidemiologicznych.

**Tab. 7.1. ANTYBIOGRAM PODSTAWOWY**

Antybiotyk	Krażek	Uwagi
Ampicylina	10 µg	U szczepów niewrażliwych na ampicylinę konieczne jest oznaczanie wytwarzania β-laktamaz krążkiem z nitrocefiną (test cefinazowy). Wyniki dla ampicyliny powinny być wykorzystywane do przewidywania wrażliwości na amoksycylinę. Rzadko występujące szczepy odporne na ampicylinę i nie wytwarzające β-laktamazy (BLNAR) należy oznaczać zgodnie ze schematem postępowania opisanym w punkcie 7.2. Szczepy podejrzane o fenotyp BLNAR należy przesyłać do KORLD celem potwierdzenia fenotypu.
Trimetoprim/sulfametoksazol	1,25/23,75 µg	

Uwaga!

W sytuacji, gdy nie jest możliwe wykonanie antybiogramu należy wykonać przynajmniej test cefinazowy, w celu wykluczenia produkcji β-laktamazy u wyhodowanych izolatów *H. influenzae*.

#### 7.4. ANTYBIOGRAM ROZRZERZONY

Stosować do oznaczeń lekowrażliwości izolatów pochodzących z płynu mózgowo-rdzeniowego, krwi oraz od pacjentów z zagrożeniem życia. Dla izolatów z płynu mózgowo-rdzeniowego należy rutynowo raportować wyniki badania lekowrażliwości jedynie dla ampicyliny, jednej z cefalosporyn III-generacji, chloramfenikolu i meropenemu [9].

**Tab. 7.2. ANTYBIOGRAM ROZSZERZONY**

Antybiotyk	Krażek	Uwagi
Cefotaksym lub ceftriakson	30 µg	
Ceftazydym	30 µg	
Chloramfenikol	30 µg	Szczepy izolowane z płynu mózgowo-rdzeniowego.
Aztreonam	30 µg	
Meropenem	10 µg	
Azytromycyna lub klarytromycyna	15 µg	Ze względu na brak szczepów opornych ustalono dla azytromycyny jedynie kategorię "wrażliwy" przy strefie zahamowania wzrostu $\geq 12$ mm. Interpretacja dla klarytromycyny jest następująca: $\leq 10$ mm oporny; 11-12 mm - średniowrażliwy; $\geq 13$ mm - wrażliwy. Leki z tej grupy stosować jako leki drugiego rzutu, np. dla pacjentów uczulonych na penicyliny.
Rifampicyna	5 µg	Stosować wyjątkowo, jedynie w ciężkich zakażeniach wieloopornymi szczepami, nie powinna być stosowana w monoterapii.
Tetracyklina	30 µg	Szczepy wrażliwe na tetracyklinę są także wrażliwe na doksycyklinę.
Ciprofloksacyna	5 µg	Oporność na fluorochinolony występuje niezwykle rzadko; szczepy odporne należy przesać do KORLD.

#### **Uwaga!**

**Oznaczanie lekowrażliwości *H. parainfluenzae* należy wykonać jedynie w przypadku zakażeń inwazyjnych i wyhodowania z materiałów fizjologicznie jałowych. Dobór antybiotyków i interpretacja wyników taka sama jak dla *H. influenzae*.**

#### 7.5. Szczepy wzorcowe:

*Haemophilus influenzae* ATCC 49766 - służy do kontroli jakości oznaczania wrażliwości na wybrane cefalosporyny (cefaklor, cefamandol, cefprozil, cefuroksym) w metodzie dyfuzyjno-krażkowej oraz karbapenemy w metodach rozcieńczeniowych (oznaczenie MIC).

*Haemophilus influenzae* ATCC 49247 - szczep BLNAR, służy do kontroli jakości oznaczania wrażliwości na pozostałe antybiotyki.

*Haemophilus influenzae* ATCC 10211 –służy do kontroli, czy stosowane podłoże HTM jest wystarczająco bogate w składniki odżywcze, by umożliwić wzrost wymagających szczepów *Haemophilus* spp.

*Escherichia coli* ATCC 35218 – szczep służy do kontroli jakości oznaczania wrażliwości na amoksycylinę/ kw. klawulanowy również na podłożu HTM [9].

### **Piśmiennictwo do rozdziałów 6-7:**

1. Doern G. V., A. B. Brueggemann, G. Pierce, H. P. Holley, Jr., A. Rauch.. Antibiotic resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and detection of  $\beta$ -lactamase-positive strains resistant to amoxicillin-clavulanate: results of a national multicenter surveillance study. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41, 292–297 (1997)
2. Fluit A. C., A. Florijn, J. Verhoef, D. Milatovic. Susceptibility of European  $\beta$ -lactamase-positive and -negative *Haemophilus influenzae* isolates from the periods 1997/1998 and 2002/2003. *J. Antimicrob. Chemother.*, 56, 133–138 (2005)
3. Garcia-Cobos S., J. Campos, F. Roman, C. Carrera, M. Perez-Vazquez, B. Aracil, J. Oteo. Low  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains are best detected by testing amoxicillin susceptibility by the broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother.*, 52, 2407-2414 (2008)
4. Garcia-Cobos S., J. Campos, E. Lazaro, F. Roman, E. Cercenado, C. Garcia-Rey, M. Perez-Vazquez, J. Oteo, F. de Abajo. Ampicillin-resistant non- $\beta$ -lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, 2564–2573 (2007)

5. Gazagne L., Delmas C., Bingen E., Dabernat H. Molecular epidemiology of ampicillin-resistant non- $\beta$ -lactamase-producing *Haemophilus influenzae*. J. Clin. Microbiol., 36, 3629-3635 (1998)
6. Hasegawa K., Chiba N., Kobayashi R., Murayama S. Y., Iwata S., Sunakawa K., Ubukata K. Rapidly increasing prevalence of  $\beta$ -lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b in patients with meningitis. Antimicrob. Agents Chemother., 48, 1509-1514 (2004)
7. Jansen W. T., A. Verel, M. Beitsma, J. Verhoef, D. Milatovic. Longitudinal European surveillance study of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae*. J. Antimicrob. Chemother., 58, 873–877 (2006)
8. Karpanoja P., A. Nissinen, P. Huovinen, H. Sarkkinen. Disc diffusion susceptibility testing of *Haemophilus influenzae* by NCCLS methodology using low-strength ampicillin and co-amoxiclav discs. J. Antimicrob. Chemother., 53, 660–663 (2004)
9. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. CLSI M100-S19, Vol. 29, No.3 (2009)
10. Skoczyńska A., M. Kadłubowski, I. Waśko, J. Fiett, W. Hryniewicz. Resistance patterns of selected respiratory tract pathogens in Poland. Clin Microbiol Infect., 13, 377-383 (2007)
11. Zerva L., Biedenbach D. J., Jones R. N. Reevaluation of interpretive criteria for *Haemophilus influenzae* by using meropenem (10-microgram), imipenem (10-microgram), and ampicillin (2- and 10-microgram) disks. J. Clin. Microbiol., 34, 1970-1974 (1996).