

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

Oznaczanie wrażliwości ziarniaków Gram-dodatnich z rodzaju *Staphylococcus* spp.

Dorota Żabicka¹, Waleria Hryniewicz^{1,2}

- 1. Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków**
- 2. Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej**

8. Oznaczanie wrażliwości *Staphylococcus* spp.

8.1. Metody

Stosowane podłoże MHA, zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda inkubacja w atmosferze tlenowej 16-18h w temp. 33-35°C, nie przekraczać 35°C. **W przypadku cefoksytyny i wankomycyny inkubacja 24h.** Metody wykonania oznaczeń opisano dokładnie w tym opracowaniu w rozdziale 8.5: „Metody oznaczania lekowrażliwości i mechanizmów oporności u *Staphylococcus* spp.”.

8.2. Najważniejsze mechanizmy oporności

8.2.1 Mechanizmy oporności na antybiotyki β -laktamowe

Z klinicznego i epidemiologicznego punktu widzenia najważniejszym mechanizmem oporności u *Staphylococcus* spp. jest oporność na metycylinę, która oznacza brak wrażliwości klinicznej na wszystkie antybiotyki β -laktamowe. Gronkowce odporne na metycylinę określane są skrótami: MRSA w przypadku metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* oraz MRCNS w przypadku metycylinopornych szczepów gronkowców koagulazo-ujemnych. Oporność na metycylinę warunkowana jest obecnością nowego białka wiążącego penicylinę zwanego PBP2a lub PBP2', kodowanego przez gen *mecA* zlokalizowany w chromosomie i stanowiący część regionu noszącego nazwę SCC*mec* (gronkowcowa kasetta chromosomalna *mec*, ang. staphylococcal cassette chromosome *mec*). W odróżnieniu od pozostałych białek

PBP, białko PBP2a nie ulega hamowaniu przez antybiotyki β -laktamowe z powodu obniżonego powinowactwa do tych antybiotyków. Białko PBP2a zachowuje swoją funkcję enzymatyczną i uczestniczy w syntezie ściany komórkowej, ale jego ekspresja zachodzi tylko w obecności β -laktamu. Oporność na metycylinę może mieć charakter homogeny, gdy wszystkie komórki danej populacji gronkowca oznaczanych w badaniach *in vitro* wykazują fenotyp oporności lub heterogeny, gdy tylko część komórek danej populacji wykazuje fenotyp oporności [1, 2]. Zarówno szczepy o homogennej jak i heterogennej oporności na metycylinę są klinicznie odporne na wszystkie antybiotyki β -laktamowe.

Meticylinooporne *S.aureus* (MRSA) i metycylinooporne gronkowce koagulazo-ujemne (MRCNS) mogą być izolowane zarówno od pacjentów szpitalnych jak i z zakażeń pozaszpitalnych. Szczepy *S.aureus* izolowane od pacjentów szpitalnych (HA-MRSA *ang.* hospital acquired MRSA) są zwykle wielooporne, niewrażliwe na tetracykliny, aminoglikozydy, makrolidy i linkosamidy, a często też na fluorochinolony chloramfenikol, trimetoprim/sulfametoksazol i rifampicynę [1, 10, 11, 18]. Opisano również gronkowce odporne na wankomycynę, linezolid, chinupristynę/dalfopristynę oraz daptomycynę [7, 18, 19, 21, 23]. Natomiast szczepy *S.aureus* izolowane z zakażeń pozaszpitalnych (CA-MRSA *ang.* community acquired MRSA) są z definicji odporne na wszystkie β -laktamy, a dodatkowo na tetracykliny i niekiedy na makrolidy [1, 10, 17, 20]. Szczepy CA-MRSA wywołują najczęściej pierwotne zakażenia skóry i tkanek miękkich oraz rzadziej martwicze zapalenie płuc. Związane jest to z wytwarzaniem toksyny - leukocydyny Panton-Valentine (PVL) [17, 20]. CA-MRSA sprawiają trudności diagnostyczne, ponieważ często wykazują bardzo wysoce heterogenną ekspresję oporności na metycylinę. W ciągu ostatnich lat pojawiły się także doniesienia o występowaniu MRSA u zwierząt gospodarskich i domowych i o nosicielstwie i zakażeniach u ludzi wywoływanych przez metycylino-oporne szczepy *S. aureus* pochodzenia zwierzęcego. Najwięcej badań poświęcono jak dotąd szczepom MRSA izolowanym od świń, bydła i koni. Szczepy izolowane ze środowiska chlewni oraz z przypadków kolonizacji u hodowców świń, pracowników chlewni, rzeźni i lekarzy weterynarii, nazywane FA-MRSA (*ang.* farm-associated MRSA) należały do jednego kompleksu klonalnego ST398 i charakteryzowały się opornością na tetracykliny, a niekiedy również erytromycynę, linkomycynę, kanamycynę i gentamicynę [25].

Oznaczanie wrażliwości na metycylinę u wszystkich gatunków gronkowców wykonuje się z użyciem krążka z cefoksytiną 30 μ g [2, 13, 14, 15]. Interpretację wyników oznaczania wrażliwości na metycylinę z użyciem krążka z cefoksytiną 30 μ g podano w tab. 8.1.

Wynik oznaczania wrażliwości na metycylinę jest jednocześnie wynikiem dla wszystkich beta-laktamów i nie należy oznaczać wrażliwości na inne leki z tej grupy, a wykonanie takiego oznaczenia może prowadzić do uzyskiwania niewiarygodnych wyników. Szczepy odporne na metycylinę są klinicznie odporne na wszystkie antybiotyki β -laktamowe, czyli na penicyliny, aminopenicyliny, penicyliny izoksazolilowe (oksacylina, kloksacylina, dikloksacylina, flukloksacylina), nafcylinę, cefalosporyny, penicyliny z inhibitorami, cefalosporyny z inhibitorami i karbapenemy.

W rutynowych oznaczeniach w laboratorium mikrobiologicznym można pominąć oznaczanie wrażliwości na penicylinę, ponieważ jak się ocenia 80-90% szczepów gronkowców jest zdolnych do wytwarzania β -laktamaz. Produkcja β -laktamaz ma najczęściej charakter indukowalny, a więc zachodzi w obecności antybiotyku. Szczepy produkujące penicylinazę są odporne na penicylinę, ampicylinę, amoksyycynę, oraz ureidopenicyliny (np. piperacylinę) i tikarcylinę. Sposób wykonania oznaczenia wrażliwości na penicylinę omówiono w punkcie 8.5.1. Szczepy wytwarzające β -laktamazę, ale wrażliwe na metycylinę są wrażliwe na: tzw. penicyliny przeciwgronkowcowe, które są odporne na działanie penicylinazy gronkowcowej, takie jak metycylina oraz penicyliny izoksazolilowe (oksacylina, kloksacylina, dikloksacylina, flukloksacylina), nafcylinę, a także na cefalosporyny (największą aktywność wykazują cefalosporyny I i II generacji), penicyliny z inhibitorami i karbapenemy. Szczepy wrażliwe na metycylinę oznaczane są skrótem MSSA (metycylinowrażliwe *S.aureus*) i MSCNS (metycylinowrażliwe gronkowce koagulazo-ujemne).

Tab. 8.1. Interpretacja wyników oznaczenia wrażliwości na metycylinę izolatów *Staphylococcus* spp. w metodzie dyfuzyjno-krażkowej (średnica strefy w mm). **Odczyt po 24h inkubacji w temp. 33-35°C, nie przekraczać 35°C [15].**

Krażek z antybiotykiem	<i>Staphylococcus aureus</i> i <i>Staphylococcus lugdunensis</i>		Koagulazo-ujemne gronkowce, (CNS <i>ang.</i> coagulase- negative staphylococci) (z wyjątkiem <i>S. lugdunensis</i>)	
	oporny	wrażliwy	oporny	wrażliwy
Cefoksytyna 30 μ g	≤ 21	≥ 22	≤ 24	≥ 25

Uwaga!

Do identyfikacji oporności na metycylinę zarówno u *S.aureus* jak i u gronkowców koagulazo-ujemnych spośród metod dyfuzyjno-krażkowych zalecana jest obecnie metoda z użyciem krążka z cefoksytiną 30 µg [2,15].

Metoda przeglądowa z oksacyliną w podłożu może być stosowana jako metoda wykrywania oporności na metycylinę jedynie u *S.aureus*. W przypadku niejednoznacznych wyników w metodzie przeglądowej z oksacyliną w podłożu, wynik należy potwierdzić stosując testy wykrywające białko PBP2a, produkt genu *mecA*. Należy pamiętać, że dostępne testy oparte o metodę aglutynacji lateksowej wykrywające białko PBP2a dają miarodajne wyniki jedynie w przypadku izolatów *S aureus*.

Wykrywanie obecności genu *mecA* metodą PCR jest nadal uznawane za "złoty standard" i powinno być stosowane w przypadku uzyskania niejednoznacznych wyników w metodach fenotypowych, zarówno w przypadku *S.aureus* jak i gronkowców koagulazo-ujemnych. Izolaty z ciężkich zakażeń inwazyjnych podejrzane o fenotyp MRSA i sprawiające trudności diagnostyczne należy przesłać w celu potwierdzenia do KORLD.

8.3. ANTYBIOGRAM PODSTAWOWY

W przypadku izolacji bakterii z rodzaju *Staphylococcus spp.* obowiązkowe jest wykonanie oznaczenia wrażliwości na metycylinę dla wszystkich szczepów wyhodowanych z przypadków zakażeń oraz dla szczepów *S.aureus* izolowanych w badaniach na nosicielstwo.

Tab. 8.2. ANTYBIOGRAM PODSTAWOWY

Antybiotyk	Krażek	Uwagi
Cefoksytyna	30 µg	Krażek z cefoksytiną najlepiej wykrywa oporność na metycylinę, która jest warunkowana obecnością genu <i>mecA</i> zarówno u <i>S.aureus</i> jak i u gronkowców koagulazo-ujemnych [2, 14, 15]. Jednak w wyniku oznaczania lekowrażliwości należy podawać informację o oporności szczepu na metycylinę, czyli wszystkie antybiotyki β-laktamowe. Interpretacja wyników oznaczania lekowrażliwości patrz tab. 8.1.
Erytromycyna	15 µg	Wynik oznaczania wrażliwości na erytromycynę jest reprezentatywny dla roksytromycyny, klarytromycyny i azytromycyny. Metoda dwóch krążków i interpretacja fenotypów oporności patrz punkt 8.5.2.
Klindamycyna	2 µg	Oznaczenie indukcyjnej oporności na klindamycynę metodą dwóch krążków. Metoda i interpretacja fenotypów oporności patrz punkt 8.5.2

Tab. 8.3. ANTYBIOGRAM PODSTAWOWY DLA SZCZEPÓW IZOLOWANYCH Z MOCZU

Antybiotyk	Krażek	Uwagi
Cefoksytyna	30 µg	Oznaczenie wrażliwości na antybiotyki β-laktamowe - patrz tabela 8.1.
Norfloksacyna	10 µg	
Nitrofurantoina	300 µg	
Trimetoprim	5 µg	
Trimetoprim/sulfametoksazol	1,25/23,75 µg	

Uwaga: Dla *Staphylococcus saprophyticus* izolowanego z moczu nie jest konieczne rutynowe oznaczanie lekowrażliwości, ponieważ zakażenie to dobrze odpowiada na leczenie standardowymi dawkami leków stosowanych w leczeniu ostrych zapaleń pęcherza moczowego (np. nitrofurantoina, fluorochinolony, trimetoprimu/sulfametoksazol, trometamol fosfomycyny).

8.4 ANTYBIOGRAM ROZSZERZONY

8.4.1. Oporność na glikopeptydy

W przypadku izolacji szczepów *S.aureus* z ciężkich zakażeń lub nadwrażliwości na β-laktamy antybiogram powinien uwzględniać oznaczenie wrażliwości na wankomycynę. Należy zawsze wykonać oznaczenie MIC (minimalnego stężenia hamującego), ponieważ metoda dyfuzyjno-krażkowa nie daje wiarygodnych wyników. Szczepy *S.aureus* izolowane w Polsce charakteryzują się wartościami MIC wankomycyny w zakresie 0,5-2,0 µg/mL [10, 11]. Sporadycznie pojawiają się szczepy o obniżonej wrażliwości na wankomycynę i teikoplaninę nazywane VISA (*ang.* vancomycin-intermediate *S.aureus*) lub bardziej prawidłowo GISA (*ang.* glycopeptide-intermediate *S.aureus*). Szczepy takie charakteryzują się homogeną (GISA) lub heterogeną ekspresją oporności (hGISA) oraz wartościami MIC wankomycyny w zakresie 2-8 µg/mL i teikoplaniny ≥ 8 µg/mL w przypadku szczepów GISA oraz wartościami MIC wankomycyny w zakresie 1-4 µg/mL i teikoplaniny w zakresie 0,5-8 µg/mL w przypadku hGISA. **Wszystkie szczepy *S.aureus* o wartościach MIC wankomycyny ≥ 2 µg/mL należy badać w kierunku obniżonej wrażliwości na glikopeptydy (metodyka punkt 8.5.5.) i przesłać w celu potwierdzenia do KORLD.**

Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów, Narodowy Instytut Leków
Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej

Jak dotąd rejestrowano jedynie sporadycznie i to wyłącznie w USA zakażenia wywoływane przez szczepy *S.aureus* odporne na wankomycynę (VRSA – *ang.* vancomycin-resistant *S.aureus*). W kilku przypadkach udało się ustalić, że oporność na wankomycynę była u tych szczepów warunkowana obecnością genu *vanA*, przeniesionego od enterokoków. Szczepy *S. aureus* posiadające gen *vanA* charakteryzowały się wysokimi wartościami MIC wankomycyny (128-256 µg/mL) oraz w badaniu metodą dyfuzyjno-krażkową brakiem strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z wankomycyną 30 µg (strefa = 6 mm) [12]. W przypadku kilku szczepów VRSA systemy automatyczne nie wykryły u nich oporności na wankomycynę. Biorąc to pod uwagę **zaleca się oznaczanie MIC wankomycyny metodą mikrorozcieńczeń w bulionie lub metodą dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku dla wszystkich szczepów izolowanych z ciężkich zakażeń od pacjentów z długo stosowaną terapią wankomycyną lub teikoplaniną.**

Gronkowce koagulazo-ujemne charakteryzują się wyższymi wartościami MIC glikopeptydów niż *S. aureus*. CLSI dla gronkowców koagulazo-ujemnych proponuje następujące graniczne punkty odcięcia: wankomycyna wrażliwy ≤4 µg/mL, oporny ≥32 µg/mL; teikoplanina wrażliwy ≤8 µg/mL, oporny ≥32 µg/mL [15].

We wszystkich ciężkich zakażeniach oraz w przypadku niepowodzeń terapeutycznych należy bezwzględnie oznaczać MIC (minimalne stężenie hamujące leku). Ośrodki III stopnia referencyjności powinny przechowywać szczepy MRSA jako patogenów alarmowych w przypadku ich izolacji z zakażeń inwazyjnych. Wskazane jest również przechowywanie szczepów MRSA izolowanych z innych ciężkich zakażeń.

Tab. 8.4. ANTYBIOGRAM ROZSZERZONY

Antybiotyk	Krażek	Uwagi
Wankomycyna	wyłącznie oznaczanie MIC	Należy zawsze wykonać oznaczenie MIC. Metoda dyfuzyjno-krażkowa nie pozwala na odróżnienie wrażliwych izolatów <i>S.aureus</i> i gronkowców koagulazo-ujemnych od średniowrażliwych i z obniżoną wrażliwością na glikopeptydy (GISA). Schemat oznaczania wrażliwości na wankomycynę dla <i>S.aureus</i> – patrz punkt 8.5.5. Szczepy o wartościach MIC ≥ 2 µg/mL należy przesłać do KORLD.
Teikoplanina	wyłącznie oznaczanie MIC	Należy zawsze wykonać oznaczenie MIC. Metoda dyfuzyjno-krażkowa może dawać niewiarygodne wyniki. Teikoplanina jest mniej aktywna od wankomycyny wobec szczepów gronkowców koagulazo-ujemnych zwłaszcza <i>S.haemolyticus</i> .
Daptomycyna	wyłącznie oznaczanie MIC	Należy zawsze wykonać oznaczenie MIC. Metoda dyfuzyjno-krażkowa nie jest wiarygodna. Aktywność leku jest zależna od obecności jonów wapnia w podłożu; metodyka wykonania oznaczenia patrz punkt 8.5.3. Szczepy o wartościach MIC ≥ 1 µg/mL należy przesłać do KORLD.

Tetracyklina	30 µg	Szczepy wrażliwe na tetracyklinę należy uważać za wrażliwe na doksycyklinę. Szczepy średniowrażliwe lub odporne na tetracyklinę mogą być wrażliwe na doksycyklinę, minocyklinę lub tigecyklinę.
Tigecyklina	15 µg	Oznaczanie metodą dyfuzyjno-krażkową i oznaczanie MIC metodą rozcieńczeniową zgodnie ze standardową metodyką CLSI, oznaczanie MIC metodą dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku wg instrukcji producenta [3, 14, 15]. Metodyka oznaczenia MIC metodą rozcieńczeń w bulionie lub w agarze patrz punkt 8.5.4. Szczepy wrażliwe strefa zahamowania wzrostu ≥ 22 mm, niewrażliwe < 22 mm [16]. Zgodnie z zaleceniami EUCAST i FDA szczepy wrażliwe MIC $\leq 0,5$ µg/mL, niewrażliwe MIC $> 0,5$ µg/mL [4, 5]. Wszystkie szczepy o wartościach MIC $\geq 0,5$ µg/mL należy przesłać do KORLD.
Chloramfenikol	30 µg	Stosować wyjątkowo (ze względu na działania niepożądane) wobec szczepów izolowanych z płynu mózgowo-rdzeniowego lub niewrażliwych na wszystkie inne antybiotyki (należy oznaczyć MIC).
Ciprofloksacyna lub Ofloksacyna	5 µg 5 µg	Należy pamiętać o możliwości szybkiego narastaniu oporności na fluorochinolony u gronkowców w ciągu trzech do czterech dni od rozpoczęcia terapii; nie stosować w przypadku MRSA.
Rifampicyna	5 µg	Stosować wyjątkowo, wyłącznie w ciężkich zakażeniach wobec szczepów wieloopornych; nie stosować w monoterapii.
Gentamicyna lub Amikacyna Tobramycyna Netilmycyna Kanamycyna	10 µg 30 µg 10 µg 30 µg 30 µg	Oporność na gentamicynę oznacza kliniczną oporność na wszystkie aminoglikozydy (niezależnie od wyników uzyskanych <i>in vitro</i> dla pozostałych preparatów) z wyjątkiem streptomycyny. Wrażliwość na gentamicynę nie oznacza wrażliwości na pozostałe aminoglikozydy. W takim przypadku można oznaczać wrażliwość dla innych niż gentamicyna aminoglikozydów. Oporność na kanamycynę oznacza także oporność na amikacynę (używać krążka z kanamycyną). Oporność na tobramycynę zawsze oznacza oporność na kanamycynę i amikacynę [4].
Trimetoprim/ sulfametoksazol	1,25/23,75 µg	
Mupirocyna	200 µg	Służy do likwidacji nosicielstwa MRSA w nosie (preparat na bazie parafiny), należy wyeliminować stosowanie w szpitalach we wskazaniach dermatologicznych (preparat na bazie glikolu polietylenowego) ze względu na zidentyfikowanie w Polsce epidemicznego, szpitalnego szczepu MRSA o wysokiej oporności na mupirocynę. Brak strefy zahamowania wzrostu wokół krążka świadczy o wysokiej oporności.
Kwas fusidowy	10 µg	Szczepy odporne - strefa zahamowania < 15 mm, średniowrażliwe 15-21 mm, wrażliwe ≥ 22 mm [16]. Nie stosować w monoterapii.
Chinupristyna/ dalfopristyna	15 µg	Lek może być zastosowany do leczenia zakażeń o etiologii GISA, VRSA. Wobec szczepów opornych na makrolidy w mechanizmie MLS _B nie wykazuje działania bakteriobójczego.
Linezolid	30 µg	Lek może być skuteczny w leczeniu zakażeń o etiologii GISA, VRSA. Szczepy zidentyfikowane jako niewrażliwe należy przesłać do KORLD. Odczyt wyników w świetle przechodzącym. Oznaczając MIC linezolidu metodą dyfuzji w agarze z paska nasączonego gradientem antybiotyku należy pamiętać o prawidłowym odczycie strefy zahamowania wzrostu (strefa jest rozmyta i odczyt MIC wykonuje się biorąc pod uwagę wzrost 80% kolonii z zawiesiny)

8.5. Metody oznaczania lekowrażliwości i mechanizmów oporności *Staphylococcus spp.*

8.5.1 Wykrywanie oporności na antybiotyki β -laktamowe

8.5.1.1. Oznaczanie wrażliwości na penicylinę

Oznaczanie wrażliwości na penicylinę wykonuje się stosując krążek z penicyliną 10 UI (dla wszystkich wrażliwych szczepów gronkowców wielkość strefy ≥ 29 mm). **Wrażliwość na penicylinę** należy potwierdzić u szczepów o wielkości strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z penicyliną 10 UI ≥ 29 mm lub wartości MIC penicyliny $\leq 0,12$ $\mu\text{g/mL}$ wykonując test cefinazowy wykrywający produkcję indukowalnej β -laktamazy. Materiał do wykonania testu zbiera się z krawędzi strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z penicyliną. Jako kontrole stosuje się szczepy: *S.aureus* ATCC 29213 jako kontrolę dodatnią oraz *S.aureus* ATCC 25923 jako kontrolę ujemną [14, 15].

8.5.1.2. Oznaczanie wrażliwości na meticylinę. Metoda dyfuzyjno-krążkowa z cefoksytyną [15]

- Podłoże: MHA (Muller Hinton agar)
- Zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda
- Nanieść zawiesinę na podłoże jałową wymazówką
- Nanieść krążek z cefoksytyną 30 μg
- Inkubacja: 24h w temp. 33-35°C, w atmosferze tlenowej.

Odczyt: wykonać pomiar strefy zahamowania wzrostu (zwrócić szczególną uwagę na pojedyncze kolonie w strefie). Odczyt przeprowadzić w świetle odbitym,. Interpretować wg zaleceń CLSI - patrz tabela 8.1.

8.5.1.3. Oznaczanie wrażliwości na meticylinę. Metoda przeglądowa z oksacyliną w podłożu dla *S aureus* [15].

- Podłoże: MHA z oksacyliną w stężeniu 6 $\mu\text{g/mL}$ i dodatkiem 4% NaCl.
- Zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda.
- Sposób wykonania:
 - 1. zanurzyć wykalibrowaną eżę (1 μL) w zawieszynie bakteryjnej, a następnie nanieść ją na podłoże i rozprowadzić w postaci plamki o średnicy 10-15 mm; **lub**

- 2. zanurzyć wymazówkę w zawieszynie bakteryjnej i rozprowadzić w postaci plamki o średnicy 10-15 mm lub na całej płytce.
- Inkubacja: 24h w 35°C, w atmosferze tlenowej.
- Odczyt: wzrost więcej niż jednej kolonii oznacza oporność na metycylinę; odczytywać w świetle przechodzącym.

8.5.1.4. Testy wykrywające białko PBP 2a (PBP2') u *S.aureus*

Stosowane są testy aglutynacji lateksowej umożliwiające wykrywanie białka PBP2a, produktu genu *mecA* warunkującego oporność na metycylinę. Dostępne testy różnych producentów (np. Slidex® MRSA Detection - BioMerieux, Oxoid PBP2' Test - Oxoid) umożliwiają wykonanie oznaczenia jedynie u izolatów *S. aureus*. Wykonanie testu zgodnie z zaleceniami producenta.

8.5.1.5. Oznaczanie MIC (minimalnego stężenia hamującego) oksacyliny

Stosowana jest metoda mikrorozcieńczeń w bulionie [12] lub metoda dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku [3, 22].

- **Metoda mikrorozcieńczeń w bulionie:**
 - Seryjne rozcieńczenia oksacyliny w bulionie Mueller-Hinton z odpowiednim stężeniem kationów (CAMHB) i z dodatkiem 2% NaCl.
 - Zalecane inokulum wynosi 5×10^5 CFU/mL
 - Inkubacja 24h w 35°C, w atmosferze tlenowej
- **Metoda dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku** – wykonanie zgodnie z zaleceniami producenta [3, 22].
 - Do oznaczenia stosuje się podłoże MHA (Mueller Hinton agar) z dodatkiem 2% NaCl
 - Zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda
 - Nanieść zawiesinę wymazówką na płytkę rozprowadzającą w trzech kierunkach; stosować jedną wymazówkę na płytkę
 - Nanieść pasek nasączony gradientem antybiotyku.
 - Inkubacja 24h w 35°C, w atmosferze tlenowej.
 - Odczyt w świetle przechodzącym z użyciem lupy. Obecność pojedynczych kolonii i podrost w strefie zahamowania wzrostu wokół paska traktować jako oporność na dane stężenie antybiotyku.

- W przypadku oznaczania MIC u *Staphylococcus epidermidis* odczytu należy dokonać po 48 godzinach inkubacji.

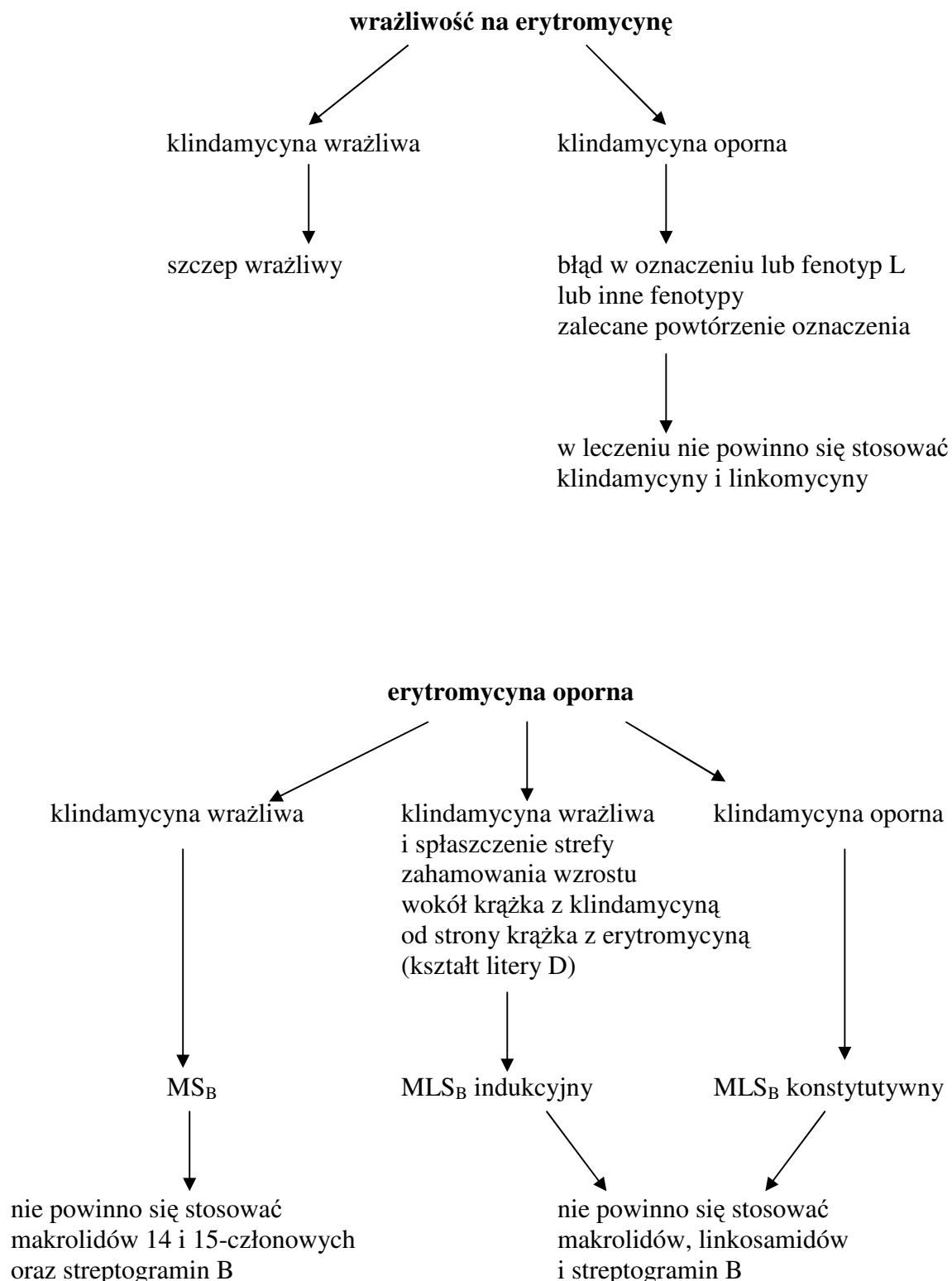
8.5.2. Oznaczanie wrażliwości na makrolidy i linkosamidy

Zawsze należy wykonać oznaczenie metodą dwóch krążków, bo jedynie metoda dyfuzyjno-krążkowa pozwala wykryć indukcyjny mechanizm oporności na makrolidy, linkosamidy i streptograminy B.

- Podłoże MHA.
- Zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda.
- Nanosimy zawiesinę na podłoże jałową wymazówką, nakładamy krążki z erytromycyną 15 µg i klindamycyną 2 µg w odległości 15-26 mm od krawędzi krążków.
- Inkubacja: 16-18 h w temp. 33-35°C, w atmosferze tlenowej.
- Odczyt i interpretacja kliniczna – patrz rycina 8.1 W przypadku oporności na erytromycynę należy zwracać uwagę na spłaszczenie strefy zahamowania wzrostu dookoła krążka z klindamycyną od strony krążka z erytromycyną (kształt litery D) świadczące o indukcyjnym mechanizmie oporności MLS_B [4, 6, 9].

8.5.3. Oznaczanie MIC tigecykliny

Oznaczanie MIC tigecykliny metodą rozcieńczeniową wykonuje się zgodnie ze standardową metodyką CLSI [12]. Oznaczając MIC tigecykliny metodą mikrorozcieńczeń w bulionie lub rozcieńczeń w agarze, standard tigecykliny należy dodać do podłoża w dniu badania. Ponadto, jeśli oznaczamy MIC metodą mikrorozcieńczeń w bulionie podłoże musi być przygotowane nie wcześniej niż w ciągu 24 godz. przed badaniem lub, jeśli jest starsze, powinno zostać zagotowane (i ostudzone) tuż przed dodaniem tigecykliny w celu usunięcia tlenu z podłoża [8]. Oznaczanie MIC tigecykliny metodą dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku wykonuje się zgodnie z zaleceniami producenta. Należy pamiętać o stosowaniu świeżego podłoża Mueller-Hinton agar, nie należy stosować podłoża na granicy terminu ważności. Odczyt strefy zahamowania wzrostu może być utrudniony ze względu na niewyraźną granicę zahamowania wzrostu, podobnie jak w przypadku linezolidu i innych leków bakteriostatycznych. Odczytu wartości MIC należy dokonywać przy zahamowaniu wzrostu 80% komórek z wyjściowej zawiesiny.



Ryc. 8.1. Identyfikacja i interpretacja fenotypów oporności na makrolidy, linkosamidy i streptograminy B u gronkowców [6, 9].

8.5.4. Oznaczanie wrażliwości *Staphylococcus spp.* na daptomycynę

Daptomycyna do swojej aktywności wymaga odpowiedniego stężenia jonów wapnia. Z tego względu podłoża wzrostowe stosowane do oznaczania wartości MIC daptomycyny *in vitro* metodą rozcieńczeniową są wzbogacane jonami Ca^{2+} do uzyskania stężenia 50 $\mu\text{g/mL}$. Obecnie zalecane są jedynie dwie metody oznaczania MIC daptomycyny: metoda Etest® i metoda rozcieńczeń w bulionie [3, 4, 12]. Metoda dyfuzyjno-krążkowa nie powinna być stosowana, ponieważ nie pozwala w sposób wiarygodny odróżnić szczepów wrażliwych od opornych [15].

8.5.4.1. Metoda rozcieńczeń w bulionie

- Seryjne rozcieńczenia daptomycyny w bulionie Mueller-Hinton z odpowiednim stężeniem kationów (CAMHB) wzbogaconym jonami wapnia w stężeniu 50 $\mu\text{g/mL}$.
- Zalecane inokulum wynosi 5×10^5 CFU/mL
- Inkubacja 16-20 h w 35°C, w atmosferze tlenowej

8.5.4.2. Metoda Etest®

- W metodzie z zastosowaniem Etest® nie ma potrzeby dodatkowego wzbogacania gotowych podłoży Mueller-Hinton w jony wapnia, ze względu na fakt, że pasek Etest® oprócz gradientu antybiotyku został dodatkowo nasączony jonami wapnia w stężeniu odpowiadającym 40 $\mu\text{g/mL}$.
- Podłoże MHA (używać tylko podłoży z zawartością jonów wapnia 25-40 $\mu\text{g/mL}$)
- Zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda.
- Nanieść zawiesinę na podłoże jałową wymazówką, nałożyć Etest® z daptomycyną
- Inkubacja 16-20 h w 35°C, w atmosferze tlenowej. Obecność pojedynczych kolonii i podrost w strefie zahamowania wzrostu wokół paska traktować jako oporność na dane stężenie antybiotyku.

8.5.5. Oznaczanie wrażliwości *S.aureus* na glikopeptydy.

8.5.5.1. Metoda przeglądowa z wankomycyną [15].

- Podłoże: BHIA (BHI agar) z wankomycyną o stężeniu 6 $\mu\text{g/ml}$.
- Zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda.

- Nanieść punktowo 10 µl zawiesiny na agar z antybiotykiem, lub zanurzyć jałową wymazówkę w zawiesinie bakteryjnej i rozprowadzić w postaci plamki o średnicy 10-15 mm lub na całej płytce.
- Inkubować: 24h, w temp. 35°C, w atmosferze tlenowej.

Odczyt: oceniać w świetle przechodzącym, wzrost więcej niż jednej kolonii **lub delikatny wzrost** - podejrzenie VISA/VRSA

8.5.5.2. Oznaczanie MIC glikopeptydów

Stosowana jest metoda mikrorozcieńczeń w bulionie [12] lub metoda dyfuzji w agarze z paska nasączonego gradientem antybiotyku. [3, 22].

- **Metoda mikrorozcieńczeń w bulionie:**
 - Seryjne rozcieńczenia wankomycyny lub teikoplaniny w bulionie Mueller-Hinton z odpowiednim stężeniem kationów (CAMHB)
 - Zalecane inokulum wynosi 5×10^5 CFU/ml
 - Inkubacja 24 H w 35°C, w atmosferze tlenowej
- **Metoda dyfuzji w agarze z paska nasączonego gradientem antybiotyku** – wykonanie zgodnie z zaleceniami producenta [3, 22].
 - Podłoże MHA
 - Zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda
 - Nanieść 100 µl zawiesiny na płytkę i rozprowadzić w trzech kierunkach lub nanieść zawiesinę wymazówką na płytkę rozprowadzając w trzech kierunkach; stosować jedną wymazówkę na jedną płytkę.
 - Nanieść pasek z wankomycyna lub teikoplaniną.
 - Inkubować w 35°C w atmosferze tlenowej przez 48 godzin
 - Odczyt w świetle przechodzącym z użyciem lupy po 24 i 48 godzinach. Obecność pojedynczych kolonii i podrost w strefie zahamowania wzrostu wokół paska traktować jako oporność na dane stężenie antybiotyku.

8.5.5.3. Metoda identyfikacji szczepów o obniżonej wrażliwości na glikopeptydy GISA (ang. Glycopeptide Intermediate *Staphylococcus aureus*) i hGISA (ang. hetero-Glycopeptide Intermediate *Staphylococcus aureus*)

Potwierdzenie fenotypu GISA należy wykonać u wszystkich izolatów *S.aureus* o wartościach MIC wankomycyny ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$. Przed wykonaniem oznaczenia należy sprawdzić czystość hodowli i potwierdzić identyfikację. Do oznaczeń fenotypu GISA stosowane są dwie metody; tzw. makrometoda Etest® [3, 24] i metoda z zastosowaniem Etest®GRD [3, 26]. Wykonanie oznaczenia fenotypu GISA z zastosowaniem każdej z tych metod opisano poniżej. Metoda Etest®GRD zgodnie z danymi literaturowymi daje wyniki porównywalne z wynikami uzyskanymi metodą analizy populacyjnej [26]. **Wyniki uzyskiwane z zastosowaniem Etest®GRD lub makrometody Etest® nie są prawdziwymi wartościami MIC danego izolatu, a tylko wskaźnikami, że dany izolat może prezentować fenotyp GISA [24, 26].** Wszystkie szczepy podejrzane o fenotyp GISA lub hGISA powinny być przesłane do KORLD w celu potwierdzenia fenotypu.

- **Makrometoda Etest®**
 - Podłoże BHIA (BHI agar)
 - Zawiesina bakteryjna o gęstości 2,0 McFarlanda
 - Nanieść 100 μl zawiesiny na płytkę i rozprowadzić w trzech kierunkach lub nanieść zawiesinę wymazówką na płytkę rozprowadzając w trzech kierunkach; stosować jedną wymazówkę na jedną płytkę.
 - Nanieść Etest® z wankomycyna lub teikoplaniną.
 - Inkubować w 35°C w atmosferze tlenowej przez 48 godzin
 - Odczyt w świetle przechodzącym z użyciem lupy po 24 i 48 godzinach. Obecność pojedynczych kolonii i podrost w strefie zahamowania wzrostu wokół paska traktować jako oporność na dane stężenie antybiotyku.
 - Interpretacja wyników:
 - szczep GISA lub hGISA:
 - MIC wankomycyny ≥ 6 $\mu\text{g/ml}$ oraz
 - w oznaczeniu z użyciem makrometody: teikoplanina MIC ≥ 12 $\mu\text{g/ml}$ lub wankomycyna MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ i teikoplanina MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$
 - szczep GRSA:
 - wankomycyna MIC ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ oraz

- w oznaczeniu z użyciem makrometody teikoplanina MIC \geq 12 μ g/ml lub wankomycyna MIC \geq 8 μ g/ml i teikoplanina MIC \geq 8 μ g/ml
- **Metoda z zastosowaniem Etest®GRD**
 - Podłoże MHA z 5% krwi
 - Zawiesina bakteryjną o gęstości 0,5 McFarlanda w bulionie Mueller-Hinton Broth
 - Nanieść zawiesinę wymazówką na płytkę rozprowadzając w trzech kierunkach; stosować jedną wymazówkę na jedną płytkę.
 - Nanieść Etest®GRD
 - Inkubować w 35°C w atmosferze tlenowej przez 48 godzin
 - Odczyt w świetle przechodzącym z użyciem lupy po 24 i 48 godzinach Obecność pojedynczych kolonii i podrost w strefie zahamowania wzrostu wokół paska traktować jako oporność na dane stężenie antybiotyku.
 - Interpretacja wyników:
 - szczep GISA:
 - wankomycyna MIC \geq 6 μ g/ml oraz
 - w oznaczeniu z użyciem Etest®GRD wankomycyna MIC \geq 8 μ g/ml i teikoplanina MIC \geq 8 μ g/ml
 - szczep hGISA:
 - wankomycyna MIC \leq 4 μ g/ml oraz
 - w oznaczeniu z użyciem Etest®GRD wankomycyna MIC \geq 8 μ g/ml i teikoplanina MIC \geq 8 μ g/ml

8.6. Szczepy wzorcowe:

8.6.1. Metoda dyfuzyjno-krażkowa:

Staphylococcus aureus ATCC 25923 - wrażliwy na metycylinę

8.6.2. Metoda przeglądowa z oksacyliną w podłożu:

Staphylococcus aureus ATCC 29213 - wrażliwy na metycylinę

Staphylococcus aureus ATCC 43300 - oporny na metycylinę lub

Staphylococcus aureus MIKROBANK 14.001 - służy do kontroli jakości oznaczania wrażliwości na metycylinę w metodzie przeglądowej z oksacyliną w podłożu, szczep o heterogennej ekspresji oporności na metycylinę (kontrola dodatnia)

Staphylococcus aureus MIKROBANK 14.002 – służy do kontroli jakości oznaczania wrażliwości na metycylinę w metodzie przeglądowej z oksacyliną w podłożu, szczep o homogennej ekspresji oporności na metycylinę (kontrola dodatnia)

8.6.3. Metoda dwóch krążków – oznaczanie wrażliwości na makrolidy i linkosamidy:

Staphylococcus aureus ATCC BAA-977

Staphylococcus aureus ATCC BAA-976 lub

Streptococcus pyogenes MIKROBANK 15.001 – służy do kontroli jakości oznaczania wrażliwości na makrolidy metodą dwóch krążków, szczep o fenotypie iMLS_B

Streptococcus pyogenes MIKROBANK 15.002 - służy do kontroli jakości oznaczania wrażliwości na makrolidy metodą dwóch krążków, szczep o fenotypie kMLS_B

8.6.4. Metoda przeglądowa z wankomycyną w podłożu oraz oznaczanie MIC wankomycyny:

Enterococcus faecalis ATCC 29212 - wrażliwy na glikopeptydy

Enterococcus faecalis ATCC 51299 - oporny na glikopeptydy

Piśmiennictwo

1. Boucher H. W., G. R. Corey. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Infect. Dis.,1;46, Suppl 5, S344-349, (2008)
2. Broekema N. M., T. T. Van, T. A. Monson, S.A. Marshall, D. M. Warshauer. Comparison of cefoxitin and oxacillin disk diffusion methods for detection of *mecA*-mediated resistance in *Staphylococcus aureus* in a large-scale study. J. Clin. Microbiol., 47, 217-219, (2009)
3. ETM, Etest Technical Manual www.abbiotest.com
4. EUCAST documents www.esmid.org/research_projects/eucast/
5. FDA charakterystyka leków www.fda.gov
6. Fiebelkorn K. R., S. A. Crawford, M. L. McElmeel, J. H. Jorgensen. Practical disc-diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus*

- aureus* and coagulase-negative *Staphylococci*. J. Clin. Microbiol., 41, 4740-4744 (2003)
7. Hayden M. K., K. Rezai., R. A. Hayes, K. Lolans, J. P. Quinn, R. A. Weinstein. Development of daptomycin resistance *in vivo* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol., 43, 5285-5287 (2005)
 8. Hope R., M. Warber, S. Mushtaq, M. E. Ward, T. Parsons, D. M. Livermore. Effect of medium type, age and aeration on the MICs of tigecycline and classical tetracyclines. J. Antimicrob. Chemother., 56, 1042-1046 (2005)
 9. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and linkosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin. Infect. Dis., 34, 482-492 (2002)
 10. Łuczak-Kadłubowska A., A. Sulikowska, J. Empel, A. Piasecka, M. Orczykowska, A. Kozińska, W. Hryniewicz. Countrywide molecular survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Poland. J. Clin. Microbiol., 46, :2930-2937 (2008)
 11. Łuczak-Kadłubowska A, J. Krzysztoń-Russjan, W. Hryniewicz. Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated in Poland in 1996 to 2004 that were deficient in species-specific proteins. J. Clin. Microbiol., 44, 4018-2404 (2006)
 12. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard – eighth edition. M07-A8, Vol. 29, No. 2 (2009)
 13. Perazzi B., M. R. Fermepin, A. Malimovka, S. D. García, M. Orgambide, C. A. Vay CA, R. de Torres, A. M. Famiglietti. Accuracy of cefoxitin disk testing for characterization of oxacillin resistance mediated by penicillin-binding protein 2a in coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol., 44, 3634-3639 (2006)
 14. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard – tenth edition. CLSI M02-A10, Vol. 29, No. 1 (2009)
 15. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. CLSI M100-S19, Vol. 29, No.3 (2009)
 16. Rekomendacje Francuskiego Towarzystwa Mikrobiologii. www.sfm.asso.fr
 17. Rybak M. J., D. K. L. Pharm. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a review. Pharmacotherapy, 25, 74-85 (2005)
 18. Sakoulas G., R. C. Moellering, Jr. Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Clin. Infect. Dis., 1;46, Suppl 5, S360-367 (2008)

19. Srinivasan A, J. D. Dick, T. M. Perl. Vancomycin resistance in staphylococci. Clin. Microbiol. Rev., **15**, 430-438 (2002)
20. Stryjewski M.E., H. F. Chambers. Skin and soft-tissue infections caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Infect. Dis., 1;46, Suppl 5, S368-375 (2008)
21. Tsiordas S., Gold H. S., Sakoulas G. Linezolid resistance in clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. Lancet., **358**, 207-208 (2001)
22. www.oxid.com
23. Werner G., C. Cuny, F. J. Schmitz, W. Witte. Methicillin-resistant, quinupristin-dalfopristin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced sensitivity to glycopeptides. J. Clin. Microbiol., 39, 3586-3590 (2001)
24. Wootton M, A. P. MacGowan AP, T. R. Walsh, R. A. Howe. A multicenter study evaluating the current strategies for isolating *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides. J. Clin. Microbiol., 45, 329-332 (2007)
25. van Belkum A, D. C. Melles, J. K. Peeters, W. B. van Leeuwen, E. van Duijkeren, X. W. Huijsdens, E. Spalburg, A. J. de Neeling, H. A. Verbrugh, Dutch Working Party on Surveillance and Research of MRSA-SOM. Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans. Emerg. Infect. Dis., 14, 479-483 (2008)
26. Yusof A, A. Engelhardt, A. Karlsson, L. Bylund, P. Vidh, K. Mills, M. Wootton, T. R. Walsh. Evaluation of a new Etest vancomycin-teicoplanin strip for detection of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* (GISA), in particular, heterogeneous GISA. J. Clin. Microbiol., 46, 3042-3047 (2008).