

Vyšetření citlivosti k antibiotikům u *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* podle EUCAST

EUCAST antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*

Pavla Urbášková, Vladislav Jakubů, Monika Marejková, Helena Žemličková
a členové Pracovní skupiny pro monitorování rezistence*

Souhrn

Bujónovou diluční mikrometodou a standardní diskovou difuzní metodou EUCAST byla vyšetřena citlivost k ciprofloxacinu, tetracyklinu a erytromycinu u konsekutivních klinických izolátů *Campylobacter jejuni* (n = 693) a *C. coli* (n = 75), zaslaných 49 mikrobiologickými laboratořemi v průběhu jednoho měsíce do Národní referenční laboratoře pro antibiotika SZÚ. Při interpretaci výsledků, získaných z 4608 měření kombinací kmen-antibiotikum dvěma metodami a interpretovaných podle klinických breakpointů EUCAST se vyskytly pouze dvě diskrepance (0,043 %) mezi hodnotou minimální inhibice a příslušným průměrem inhibiční zóny. Lze konstatovat, že při pečlivém dodržení postupu vyšetření je standardní disková difuzní metoda EUCAST pro vyšetření antibiotické citlivosti *Campylobacter jejuni* a *C. coli* vysoce reprodukovatelná.

The EUCAST broth dilution micromethod and standard disk diffusion method were used to test susceptibility to ciprofloxacin, tetracycline, and erythromycin in consecutive clinical isolates of Campylobacter jejuni (n=693) and Campylobacter coli (n=75) referred to the National Reference Laboratory for Antibiotics of the National Institute of Public Health from 49 microbiological laboratories within one month. When considering the results obtained in 4608 measurements of strain-antimicrobial combinations by two methods and interpreted according to the EUCAST clinical breakpoints, only two discrepancies (0.043%) were found between the value of the minimal inhibitory concentration and the respective inhibition zone diameter. It can be stated that as long as the protocol is followed carefully, the EUCAST standard disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli shows high reproducibility.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2014; 23(4): 131–136.

Klíčová slova: *Campylobacter* spp., disková metoda, klinické breakpointy EUCAST

Keywords: *Campylobacter* spp., disk diffusion method, EUCAST clinical breakpoints

Kampylobaktery jsou hlavními původci bakteriálních střevních infekcí v České republice od roku 2007, kdy nahradily ve vedoucí pozici salmonely. V roce 2013 způsobily kampylobaktery více než polovinu těchto infekcí, salmonely jen necelou třetinu, a u necelých 20 % se uplatnily shigely a jiní bakteriální původci [1]. Střevní kampylobakteriomy jsou stejně jako salmonelomy samoúdržavné a léčba antibiotiky je nezbytná jen ve vymezených situacích (infekce se závažným průběhem, u malých dětí a těhotných, nebo u osob se závažným základním onemocněním) [2]. Kampylobaktery jsou *in vitro* citlivé k řadě antibiotik, prokazatelný klinický účinek na infekce způsobené těmito bakteriemi mají zejména makrolidy, fluorochinolony a tetracykliny. Pro nízkou prevalenci rezistence, dobrou snášenlivost, použitelnost u dětí a minimum nežádoucích účinků jsou makrolidy preferovanými antibiotiky volby [2].

Vyšetření antibiotické citlivosti původců infekcí je potřebné pro volbu účinné léčby a je jediným zdrojem informací pro epidemiologické monitorování rezistence, která je rozdílná v závislosti na druhu kampylobaktera, druhu antibiotika, a na původu a lokalitě izolátu [3,4,5,6]. Obec-

ně platí, že u druhu *Campylobacter coli* se antibiotická rezistence vyskytuje častěji než u *C. jejuni*, frekvence rezistence k erytromycinu je bez ohledu na druh kampylobaktera poměrně nízká a k fluorochinolonom je častá, izoláty od zvířat jsou častěji rezistentní k antibiotikům než izoláty od lidí a značné rozdíly ve frekvenci antibiotické rezistence jsou mezi zeměmi.

Vyšetření citlivosti k antibiotikům u *Campylobacter* spp.

Metodou volby pro vyšetření citlivosti kultivačně náročných bakterií, ke kterým kampylobaktery patří, je stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) antibiotik. MIC u kampylobakterů lze stanovit klasickou agarovou diluční metodou nebo srovnatelně validní a praktičtější bujónovou diluční mikrometodou [3]. Tyto metody se však vyplatí používat při vyšetření větších souborů kmenů náročných bakterií z důvodů ekonomických (agarová diluční metoda), respektive pro požadavek na zkušenost s odečítáním inhibice růstu náročných bakterií (bujónová diluční mikrometoda).

Pro většinu mikrobiologických laboratoří, jejichž hlavním úkolem je rychle prokázat původce infekce a v případě bakterie vyšetřit citlivost k příslušným antibiotikům, je metodou volby vyšetření citlivosti disková difuze. Disková difuzní metoda je odvozená od stanovení MIC, na rozdíl od ní má však větší počet omezení. Je určena k vyšetření citlivosti rychle rostoucích nenáročných bakterií a její

použitelnost pro vyšetření některých náročných bakterií je možné jen u některých druhů a za přesně definovaných podmínek. V roce 2006 sice vydala americká instituce Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) první metody pro vyšetření citlivosti náročných bakterií, ale disková difuzní metoda pro *Campylobacter jejuni* a *C. coli* zahrnovala jen skřínink ciprofloxacinu a erytromycinu [7]. Systematická analýza opakovaného měření průměrů inhibičních zón vytvářených kolem erytromycinu a ciprofloxacinu při použití breakpointů CLSI prokázala u 174 kmenů *C. jejuni* a *C. coli* poměrně nízkou reprodukcibilitu této metody pro vysoký počet nepřesností, které dosáhly 10 % [8].

Evropská instituce European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) zveřejnila 1.1.2013 metodu pro vyšetření citlivosti a interpretaci výsledků MIC a diskové difuzní metody pro druhy *Campylobacter jejuni* a *C. coli* [9]. Tuto metodu jsme použili k ověření, zda disková difuzní metoda je vhodná pro získání reprodukovatelných výsledků vyšetření antibiotické citlivosti těchto bakterií v rutinní praxi.

Kmeny kampylobakterů a metody vyšetření

Kmeny byly získány v rámci studie prevalence antibiotické rezistence u kampylobakterů v České republice, která je podrobně popsána v jiné publikaci [6]. V průběhu jednoho měsíce roku 2013 zasílalo 49 laboratoří sdružených v Pracovní skupině pro monitorování rezistence kmeny kampylobakterů do Národní referenční laboratoře (NRL) pro antibiotika, z nichž 693 bylo v NRL pro *E. coli* a shigely identifikováno jako *C. jejuni* a 75 jako *C. coli*. Citlivost k ciprofloxacinu, tetracyklinu a erytromycinu byla vyšetřena bujónovou diluční mikrometodou [10] v Mueller-Hinton bujónu s 5 % defibrinované koňské krve a 20 mg/l β -NAD a diskovou difuzní metodou na Mueller Hinton agaru s 5 % defibrinované koňské krve a 20 mg/l β -NAD s disky ciprofloxacinu (5 mg), tetracyklinu (30 mg) a erytromycinu (15 mg) [9]. Inkubace probíhala při 41 °C v anaerostatu v mikroaerofilní atmosféře (CampyGen Oxoid). Po 24 hodinách inkubace (při nedostatečném růstu po dalších 24 hodinách) byly odečítány hodnoty MIC a průměry inhibičních zón. Naměřené hodnoty byly interpretovány podle klinických breakpointů EUCAST [9]. Ke kontrole kvality byl použit kmen *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 [11].

Porovnání výsledků vyšetření citlivosti kampylobakterů bujónovou diluční metodou a diskovou difuzní metodou

Na obrázcích 1–3 jsou scattergramy porovnávající průměry inhibičních zón s MIC ciprofloxacinu, tetracyklinu a erytromycinu s vyznačenými breakpointy pro odlišení citlivých a rezistentních kmenů *C. jejuni* a *C. coli*. U obou druhů kampylobakterů jsou breakpointy identické pro ciprofloxacin (MIC 0,5 mg/l, průměr inhibiční zóny 26 mm), i pro tetracyklin (MIC 2 mg/l, průměr inhibiční zóny 30 mm), odlišný breakpoint pro erytromycin mají *C. jejuni* (MIC 4 mg/l, průměr inhibiční zóny 20 mm) a *C. coli* (MIC 8 mg/l, průměr inhibiční zóny 24 mm). Z celkového počtu 4608 měření MIC a průměrů inhibičních zón tří antibiotik u 768 kmenů byly diskrepance zaznamenány pouze ve dvou

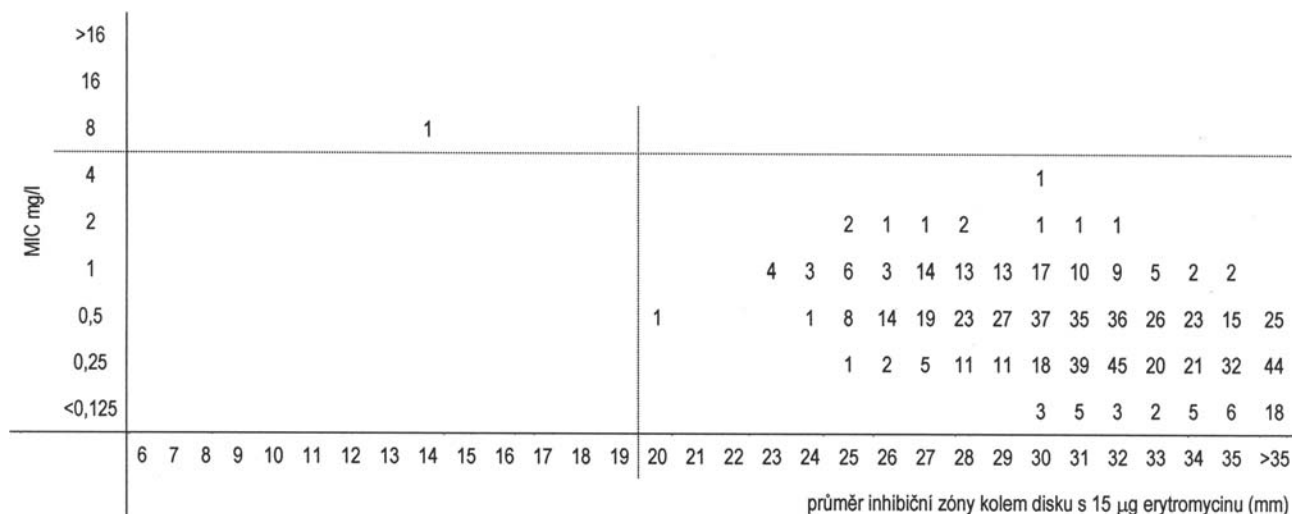
případech (0,043 %), kdy výsledek vyšetření citlivosti diskovou difuzní metodou byl v jiné kategorii citlivosti než při vyšetření MIC. V obou případech se diskrepance potvrdily při opakovaném vyšetření. Úplná shoda výsledků (100 %) v kategorii citlivosti a rezistence byla u obou druhů kampylobakterů a tetracyklinu, u *C. coli* a ciprofloxacinu a u *C. jejuni* a erytromycinu. Shoda výsledků u *C. jejuni* a ciprofloxacinu byla v 99,6 % a u *C. coli* a erytromycinu v 98,7 %. Souhrnné srovnání výsledků vyšetření citlivosti získané bujónovou diluční mikrometodou a diskovou difuzní metodou jsou v tabulce 1.

Chyba, kdy kmen *C. jejuni* rezistentní k ciprofloxacinu (MIC 1 mg/l) byl podle výsledků diskové difuzní metody citlivý (průměr inhibiční zóny 26 mm), se pokládá za velmi závažnou (obrázek 1a). Závažná chyba se vyskytla u jednoho kmene *C. coli*, který byl k erytromycinu citlivý (MIC 2 mg/l) avšak rezistentní podle výsledků diskové difuzní metody (průměr inhibiční zóny 22 mm) (obrázek 3b). Vzhledem k tomu, že v obou případech byly průměry inhibičních zón v těsné blízkosti příslušných breakpointů, a pro celkově nízký počet diskrepancí (0,043 %) lze získané výsledky považovat za velmi příznivé pro podporu zavedení diskové difuzní metody EUCAST pro vyšetření citlivosti u *C. jejuni* a *C. coli* do rutinní praxe mikrobiologických laboratoří.

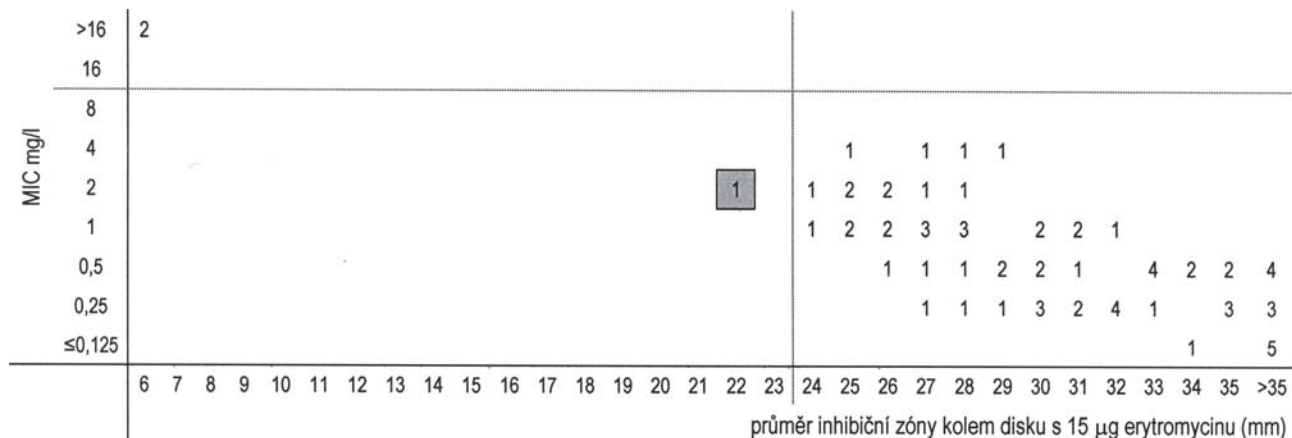
LITERATURA

1. Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2004–2013. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2013; 22: 392–393. (dostupné také na <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2003-2012-absolute>).
2. Allos BM, Blaser MJ. *Campylobacter jejuni* and related species. In: GL Mandell, JE Bennett, R Dolin (eds.). *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, Elsevier, 2010.
3. Beilei G, Wang F, Sjölung-Karlsson M, McDermott PF. Antimicrobial resistance in *Campylobacter*: Susceptibility testing methods and resistance trends. *J Microbiol Methods* 2013; 95: 57–67.
4. de Jong A, Thomas V, Simjee S, et al. Pan-European monitoring of susceptibility to human-use antimicrobial agents in enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 638–651.
5. Iovine NM, Blaser MJ. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* [letter]. *Emerg Infect Dis* 2004. Dostupné na: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/10/7/04-0580.htm>
6. Žemličková H, Jakubů V, Marejková M, Urbášková P a Pracovní skupina pro monitorování rezistence. Rezistence k erytromycinu, ciprofloxacinu a k tetracyklinu u *Campylobacter spp.* v České republice. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2014; 63 v tisku.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline. CLSI Document M45-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, Pa, 2006.
8. Lehtopolku M, Pirkko K, Puukka P, et al. Inaccuracy of the disk diffusion method compared with the agar dilution method for susceptibility testing of *Campylobacter spp.* *J Clin Microbiol* 2012;560:52–56.
9. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Test-

Obrázek 3a): *CAMPYLOBACTER JEJUNI*



Obrázek 3b): *CAMPYLOBACTER COLI*



Obrázek 3. Scattergram minimálních inhibičních koncentrací (MIC) erytromycinu a odpovídajících průměrů inhibičních zón kolem disků s 15 mg erytromycinu u konsektivních izolátů *Campylobacter jejuni* (3a) a *C. coli* (3b)

Klinické breakpointy oddělující citlivé a rezistentní kmeny k erytromycinu podle MIC a průměrů inhibičních zón [9] jsou vyznačeny vodorovnou, resp. svislou přerušovanou čarou. Na obrázku 3b) je zvýrazněn jeden citlivý kmen *C. coli* (MIC erytromycinu 2 mg/l), který vytvářel inhibiční zónu o průměru 22 mm (v rezistentní kategorii).

Tabulka 1: KORELACE MEZI MIC A PRŮMĚREM INHIBIČNÍCH ZÓN U 693 KMENŮ *CAMPYLOBACTER JEJUNI* A 75 KMENŮ *C. COLI*

Druh	Antibiotikum	Bujónová diluční mikrometoda (BDM)			Disková difuzní metoda (DDM)			Shoda BDM a DDM	Typ chyby DDM
		Breakpoint*	C	R	Breakpoint**	C	R		
<i>C. jejuni</i>	ciprofloxacin	0,5 mg/l	264	429	26 mm	265	428	99,6 %	velmi závažná
<i>C. coli</i>			21	54		21	54	100,0 %	–
<i>C. jejuni</i>	tetracyklin	2 mg/l	471	222	30 mm	471	222	100,0 %	–
<i>C. coli</i>			51	24		51	24	100,0 %	–
<i>C. jejuni</i>	erytromycin	4 mg/l	692	1	20 mm	692	1	100,0 %	–
<i>C. coli</i>		8 mg/l	73	2	24 mm	72	3	98,7 %	závažná

Vysvětlivky: * – rezistentní kmeny mají vyšší MIC; ** – rezistentní kmeny mají menší průměr inhibiční zóny; C – citlivý, R – rezistentní; velmi závažná chyba: rezistentní kmen označen jako citlivý, závažná chyba: citlivý kmen označen jako rezistentní.

Poděkování

Autoři děkují za vysoce precizní práci pracovnícím Oddělení bakteriální rezistence a alimentárních střevních nákaz SZÚ Ivetě Vrbové, Michaele Horákové a Elišce Malíkové při vyšetřování citlivosti a Miluši Vašákové, Veronice Chytilové a Elišce Křížové při přípravě kmenů kampylobakterů pro vyšetření.

*Pavla Urbášková
Vladislav Jakubů
Helena Žemličková
Národní referenční laboratoř pro antibiotika*

*Monika Marejková
Národní referenční laboratoř pro E. coli a shigely
Státní zdravotní ústav Praha*

Kontaktní adresa:

RNDr. Pavla Urbášková, CSc.

NRL pro antibiotika, SZÚ, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

e-mail: purbaskova@centrum.cz