MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2018, 70: 49 - 56

Oporność typu MLS_B u klinicznych izolatów *Bacteroides* i *Parabacteroides*

MLS_B resistance in clinical isolates of *Bacteroides* and *Parabacteroides*

Marta Kierzkowska[1,2], Anna Majewska[1,2], Ksenia Szymanek-Majchrzak[1,2], Anna Sawicka-Grzelak[1,2], Andrzej Młynarczyk[2], Grażyna Młynarczyk[1,2]*

[1]Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
[2]Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus w Warszawie

Zgodnie z rekomendacjami EUCAST pałeczki *Bacteroides* sp. fenotypowo wrażliwe na klindamycynę i jednocześnie z wartością MIC erytromycyny >32 mg/L należy raportować jako oporne na klindamycynę. W prowadzonym badaniu 42% izolatów prezentowało w/w profil. Wykazano jednak, że zaledwie 7,2% takich izolatów posiada geny *erm* związane z opornością typu MLS_B. W pozostałych przypadkach oporność na erytromycynę, ale nie na klindamycynę, może być spowodowana aktywnym wypompowywaniem leku z komórki przez pompy błonowe.

Słowa kluczowe: *Bacteroides* sp., beztlenowce, klindamycyna, MLS_B, *Parabacteroides* sp.

ABSTRACT

Introduction: The MLS_B resistance (to macrolides, lincosamides and streptogramin B) is associated with the presence of *erm* genes (*erm*F, *erm*B, *erm*G). The aim of the study was to check the presence of the mechanism MLS_B resistance in *Bacteroides* spp. and *Parabacteroides* spp. isolates originated from clinical specimens.

Methods: The study involved 200 clinical isolates collected from 190 patients hospitalized in the years 2007-2012. The mechanism of resistance was assessed using E-tests, test with two disks (clindamycin 15 μL, and erythromycin 2 μL) and then *erm* genes (*erm*B, *erm*F, *erm*G) have been detected.

Results: Overall 42% of the isolates tested was susceptible to clindamycin (MIC≤ 4 mg/L) but resistant to erythromycin (MIC > 32 mg/L). According to EUCAST recommendations, such strains should be reported as resistant to clindamycin. However, in only 7.2% of them the *erm* genes (mainly *erm*F) were detected. Resistance to clindamycin was present in 31% of all tested isolates. Additionally, it was observed that the proportion of clindamycin resistant strains increased from 20% in 2007 to 40% in 2012.

Conclusions: In our investigations it was shown that the resistance to clindamycin of isolates of *Bacteroides* spp. and *Parabacteroides* spp. obtained from patients of Warsaw hospital has steadily increased. It is in accordance with studies of other European laboratories which show high levels of resistance to clindamycin. In our study, resistance was mainly detected in *B. ovatus*, *P. distasonis*, *B. uniformis*, and *B. fragilis*. The proportion of resistant *B. fragilis* increased more than twice (from 15% to 36.6%) during the period considered. The clindamycin MIC in each case had an extreme value of 256 mg/L. For this reason, empirical therapy should be always implemented on the basis of a clinical assessment of the course of infection and of the antimicrobial drug resistance pattern in the hospital and ward and then modified on the basis of the results of the drug susceptibility tests. Sensitivity to clindamycin should be routinely monitored in medical laboratories.

Key words: *Bacteroides* spp., anaerobes, clindamycin, MLS_B, *Parabacteroides* spp.

WSTĘP

Mechanizm oporności typu MLS_B (na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B) związany jest z obecnością genów *erm* (*erm*F, *erm*B, *erm*G) kodujących adenylo-N-metylotransferazy. Metylazy *erm* powodują metylację pojedynczej adeniny w podjednostce 23S rRNA rybosomu będącym wspólnym miejscem docelowym wymienionych antybiotyków. Oporność tego typu polega zatem na zablokowaniu syntezy bakteryjnych białek i określana jest jako oporność krzyżowa typu MLS_B. Ekspresja oporności może być konstytutywna lub indukowalna (1, 8, 13). Indukcyjny mechanizm oporności występuje, gdy produkcja metylaz jest wynikiem indukcji translacji mRNA przepisanego z genów *erm* przez 14- lub 15-członowe makrolidy, takie jak erytromycyna, azytromycyna, klarytromycyna. Klindamycyna nie jest induktorem tego mechanizmu oporności, jednak jej stosowanie może prowadzić do niepowodzenia terapeutycznego wskutek selekcji mutantów z konstytutywnym mechanizmem oporności typu MLS_B. Ekspresja genów *erm* może być aktywowana w wyniku wbudowania sekwencji insercyjnej w pobliżu początkowej sekwencji genu *erm*, np. *erm*F przez IS*4351* (6, 19).

Oporność na erytromycynę, ale nie na klindamycynę, może być spowodowana mechanizmem aktywnego wypompowywania leku z komórki przez pompy błonowe ABC lub MFS (np. białka MefA, MsrSA) (1, 8, 19). Gen *msr*SA został opisany po raz pierwszy u *Staphylococcus aureus*, ale jest również wykrywany u szczepów *Bacteroides* sp. (15, 19).

Należąca do linkozamidów klindamycyna jest antybiotykiem powszechnie stosowanym w szpitalnej i ambulatoryjnej profilaktyce antybiotykowej, również w leczeniu zakażeń wywoływanych przez bakterie beztlenowe. Ze względu na swoje korzystne parametry farmakokinetyczne stosowana jest zwłaszcza w chirurgii urazowo-ortopedycznej (3, 9). Współcześnie, istotnym problemem jest oporność pałeczek *Bacteroides* sp. i *Parabacteroides* sp. na klindamycynę w wyniku jej częstego stosowania. W ciągu ostatnich kilku dekad odsetek szczepów opornych izolowanych od chorych systematycznie wzrasta w Europie i dotyczy około 30% izolatów *Bacteroides* sp. (2, 10, 14, 15, 16). Uznaje się, że oporność ta jest spowodowana obecnością i określonym poziomem ekspresji fenotypowej głównie genu *erm*F (6).

Celem badania była analiza szczepów *Bacteroides* sp. i *Parabacteroides* sp. izolowanych z próbek materiału klinicznego pod kątem występowania oporności na klindamycynę, związanej głównie z mechanizmem oporności typu $MLS_{B.}$

MATERIAŁ I METODY

Badane szczepy: Do badań zakwalifikowano 200 izolatów: *B. fragilis* (111), *B. thetaiotaomicron* (38), *B. ovatus* (12), *B. vulgatus* (11), *B. uniformis* (7), *B. stercoris* (2), *B. caccae* (1) oraz *Parabacteroides distasonis* (18). Szczepy te pochodziły ze 191 próbek materiału klinicznego, pobranych od 190 pacjentów hospitalizowanych w różnych klinikach SKDJ w latach 2007-2012. Wyhodowane zostały z wymazów z ran/ropni, płynów z jamy brzusznej, wymazów z kanału szyjki macicy, fragmentów tkanek miękkich, krwi, żółci.

Izolacja i identyfikacja. Próbki materiału klinicznego, w trybie rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej, posiewano na podłoże Schaedler Agar (SCS, bioMérieux, Francja) z 5% krwią baranią i witaminą K_1 i inkubowano w temperaturze 37°C w anaerostatach (85% N_2, 10% H_2, 5% CO_2). Okres inkubacji trwał 48 godzin. Po tym czasie dokonywano izolacji kolonii na podłoże SCS i jednocześnie na podłoże Columbia Agar (COS) z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej (bioMérieux) w celu przeprowadzenia kontroli wzrostu bakterii w warunkach tlenowych. Identyfikacji izolatów dokonano przy użyciu spektrometrii masowej MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry) w systemie VITEK MS (bioMérieux).

Oznaczenie lekowrażliwości. Kolonie zawieszano w podłożu Brucella Broth (Graso Biotech, Polska) do uzyskania zmętnienia 1 w skali McFarlanda Zawiesinę rozprowadzano na podłożu Brucella Agar z krwią (bioMérieux). Następnie układano paski E-test impregnowane gradientem stężeń: erytromycyny (EM; 0,016-256 mg/L) i klindamycyny (CM; 0,016-256 mg/L). Odczytu dokonywano po 48-godzinnej inkubacji w atmosferze beztlenowej, w temp. 35ºC.

W celu wykrycia oporności typu MLS_B zastosowano krążki z erytromycyną (15 µl) i klindamycyną (2 µl), które umieszczano (w odległości 15 mm od krawędzi krążków) na podłożu Brucella Agar (zawiesina bakteryjna o zmętnieniu 1,0 McFarlanda). Podłoża inkubowano w atmosferze beztlenowej, w temp. 35°C przez 24 godz. Interpretacji wyniku dokonywano zgodnie z zaleceniami Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST) (7).

W dalszym etapie badań wykrywano, związane z tą opornością, geny *erm*: *erm*F, *erm*B, *erm*G. Przeprowadzono reakcje PCR na matrycach DNA 200 izolatów klinicznych z zastosowaniem par starterów dla każdego z 3 genów kodujących oporność na klindamycynę (*erm*F- GGACCTACCTCATAGACAAG, CGGGTCAGCACTTTACTATTG, *erm*B--CTATCTGATTGTTGAAGAAGGATT, GTTTACTCTTGGTTTAGGATGAAA, *erm*G--ACATTTCCTAGCCACAATC, CGCTATGTTTAACAAGC) (5, 12, 18). Wszystkie startery zsyntetyzowano w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB, PAN w Warszawie.

WYNIKI

W prowadzonym badaniu fenotypowa oporność na klindamycynę (MIC>4 mg/L) występowała u 62 (31%) badanych izolatów; 75% izolatów zidentyfikowanych jako *B. ovatus*, 50% jako *P. distasonis* oraz 42,86% jako *B. uniformis* charakteryzowała się opornością na ten antybiotyk (Tabela I). Jednocześnie zaobserwowano, że odsetek szczepów opornych na klindamycynę zwiększył się z ok. 20% w 2007 do ok. 40% w 2012 roku.

Tabela I. Zakresy wartości MIC klindamycyny, MIC_{50}, MIC_{90} dla *Bacteroides* spp. i *Parabacteroides* spp. oraz odsetek szczepów opornych na klindamycynę (%R).

Gatunek (n)	klindamycyna			
	zakres MIC	MIC_{50}	MIC_{90}	% R
B. fragilis group (182)	0,016-256	1	256	29,12
B. fragilis (111)	0,016-256	0,5	256	22,52
B. thetaiotaomicron (38)	0,25-256	2	256	26,32
B. ovatus (12)	0,125-256	256	256	75
B. vulgatus (11)	0,016-256	0,5	256	27,27
B. uniformis (7)	0,016-256	0,5	256	42,86
B. stercoris (2)	256-256	256	256	100
B. caccae (1)	256	256	256	100
P. distasonis (18)	0,75-256	4	256	50
RAZEM (200)	0,016-256	1,5	256	31

Należy zauważyć, że zgodnie z rekomendacjami EUCAST, jeśli w rutynowym badaniu wartość MIC erytromycyny wynosi >32 mg/L dla pałeczek *Bacteroides* sp. oraz jednocześnie występuje fenotypowa wrażliwość na klindamycynę, szczepy takie należy raportować jako oporne na klindamycynę. W prowadzonym badaniu taka sytuacja dotyczyła 84 (42%) badanych izolatów (Tabela II). Wykonując badania molekularne gen *erm*F wykryto u 62 izolatów, gen *erm*B u jednego - *B. caccae* (łącznie u 31%; Tabela III), wśród nich 6 (9,7%) izolatów było opornych na erytromycynę, a wrażliwych na klindamycynę (Tabela II).

Występowanie oporności indukowanej ($iMLS_B$) w tych szczepach badano wykonując test dyfuzji z krążkami nasączonymi erytromycyną i klindamycyną. Pomimo, że metoda dyfuzyjno-krążkowa nie jest zalecana do oznaczania lekowrażliwości u bakterii beztlenowych, uzyskano charakterystyczną strefę zahamowania wzrostu od strony krążka z erytromycyną (w kształcie litery D) potwierdzającą występowanie mechanizmu $iMLS_B$ u 5 szczepów *Bacteroides* sp. i u jednego *P. distasonis*.

Genów *erm* nie wykryto u 78 izolatów opornych *in vitro* na erytromycynę, a wrażliwych na klindamycynę. Oporność na erytromycynę, ale nie na klindamycynę może być spowodowana mechanizmem aktywnego wypompowywania leku z komórki przez białka transportowe w błonie komórkowej (produkty genów *mef* lub *msr*SA).

Tabela II. Występowanie genów *erm*F, wśród *Bacteroides* spp. i *P. distasonis* wrażliwych na klindamycynę (MIC≤ 4 mg/L) i opornych na erytromycynę (MIC >32 mg/L).

Gatunek (n)	CLI	ERY	geny	
	MIC ≤ 4mg/L	MIC > 32mg/L	*erm*F (+)	*erm*F (-)
B. fragilis group (182)	129	78	5	73
B. fragilis (111)	86	66	3	63
B. thetaiotaomicron (38)	28	11	2	9
B. ovatus (12)	3	1	0	1
B. vulgatus (11)	8	0	0	0
B. uniformis (7)	4	0	0	0
B. stercoris (2)	0	0	0	0
B. caccae (1)	0	0	0	0
P. distasonis (18)	9	6	1	5
RAZEM (200)	138	84	6	78

CLI - klindamycyna, ERY – erytromycyna, *erm*F (+) - obecność genu *erm*F, *erm*F (-) - brak genu *erm*F

Tabela III. Występowanie genów *erm* u szczepów *Bacteroides* spp. i *Parabacteroides* spp. izolowanych z próbek materiałów klinicznych.

Gatunek (n)	geny	
	ermF	ermB
	n (%)	n (%)
B. fragilis group (182)	53 (29,12)	1 (0,55)
B. fragilis (111)	28 (25,23)	0 (0)
B. thetaiotaomicron (38)	9 (23,68)	0 (0)
B. ovatus (12)	8 (66,67)	0 (0)
B. vulgatus (11)	4 (36,36)	0 (0)
B. uniformis (7)	4 (57,14)	0 (0)
B. stercoris (2)	0 (0)	0 (0)
B. caccae (1)	0 (0)	1 (100)
P. distasonis (18)	9 (50)	0 (0)
RAZEM (200)	62 (31)	1 (0,5)

W przypadku 51 (82,3%) izolatów, u których stwierdzono obecność genu *erm*F i jednego izolatu *B. caccae* z genem *erm*B zaobserwowano oporność fenotypową na erytromycynę i klindamycynę. Szczepy te cechuje oporność konstytutywna ($cMLS_B$). Natomiast u 5 (8,1%) izolatów, pomimo detekcji genu *erm*F wykazano wrażliwość na erytromycynę i klindamycynę. U 10 izolatów występowała oporność fenotypowa na erytromycynę i klindamycynę, przy braku genu *erm.* Pozostałe 49 szczepy (24,5%) były wrażliwe na te antybiotyki i nie posiadały genów oporności *erm*. W żadnym izolacie nie wykryto genu *erm*G.

DYSKUSJA

Zasadność oznaczania wrażliwości na antybiotyki bakterii bezwzględnie beztlenowych była przedmiotem dyskusji mikrobiologów i lekarzy przez wiele lat (4, 14). Badanie mikrobiologiczne w kierunku beztlenowców może trwać nawet kilka dni, więc w przypadku podejrzenia zakażenia o tej etiologii istnieje konieczność zastosowania leczenia empirycznego, lekami z wyboru są najczęściej metronidazol i klindamycyna.

W wyniku powszechnego stosowania klindamycyny, coraz częściej u pałeczek *Bacteroides* sp. i *Parabacteroides* sp. stwierdza się brak wrażliwości na ten antybiotyk (2, 14, 16). W wieloośrodkowych badaniach prowadzonych w laboratoriach europejskich i opublikowanych przez *Nagy* i wsp. (15) wykazano wysoki poziom oporności na klindamycynę (28,5% - 60%). Trend ten potwierdzają wyniki badań prowadzonych w Holandii i w Belgii (20, 21). Zaprezentowane wyniki wskazują, że oporność na klindamycynę występuje u 31% izolatów, które wyizolowano od pacjentów hospitalizowanych na oddziałach warszawskiego szpitala. Stosowanie klindamycyny w leczeniu empirycznym zakażeń (szczególnie w obrębie jamy brzusznej lub na oddziałach urazowo-ortopedycznych) może prowadzić zatem do braku sukcesu terapeutycznego (11, 17, 21). Racjonalna terapia empiryczna powinna być wdrożona na podstawie klinicznej oceny przebiegu zakażenia oraz wzoru oporności na leki przeciwbakteryjne w szpitalu i oddziale oraz modyfikowana na podstawie wyniku lekowrażliwości (11, 16).

W rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej, zgodnie z rekomendacjami EUCAST w przypadku otrzymania wartości MIC erytromycyny >32 mg/L dla pałeczek *Bacteroides* sp. oraz jednocześnie wrażliwości na klindamycynę, szczepy należy raportować jako oporne na klindamycynę (15). *Eitel* i wsp. (6) wykazali, że wśród 161 izolatów *Bacteroides* sp. 24,8% prezentowało fenotypową oporność na klindamycynę. Geny związane z opornością tj. *erm*F, *mef*A, *erm*G, *msr*SA i *erm*B były obecne u odpowiednio: 24,2%, 12,4%, 5,6%, 5,6% oraz 0,6% spośród wszystkich badanych izolatów *Bacteroides* sp. oraz u odpowiednio: 75,0%, 27,5%, 22,5%, 22,5% oraz 2,5% izolatów *Bacteroides* sp. opornych na klindamycynę (6). W prezentowanej pracy wykrywano geny *erm*F, *erm*B i *erm*G. Gen *erm*F obecny był u 31%, *erm*B u 0,5% badanych izolatów, *erm*G nie wykryto w ogóle. Z kolei częstość występowania *erm*F i *erm*B wśród izolatów opornych na klindamycynę (MIC>4 mg/L) wynosiła odpowiednio 82,26% i 1,61%.

Z doświadczeń innych badaczy wiadomo, że gen *erm*F jest najczęściej występującym genem oporności na klindamycynę u pałeczek z rodzaju *Bacteroides* (15). Wyniki prezentowane przez *Eitel* i wsp. (6) wskazują, że był on obecny u 74,2% z 31 opornych na klindamycynę izolatów *B. fragilis* i u 77,8% z 9 opornych izolatów należących do gatunków innych niż *B. fragilis* (non-*B. fragilis*; NFB). W prowadzonym badaniu otrzymano podobne wyniki, gen *erm*F wykryto u 81,13% izolatów *B. fragilis* i u 74,07% NFB opornych na klindamycynę. Wykazano również obecność genu *erm*F u 10 izolatów, które charakteryzowały się wrażliwością na klindamycynę (MIC≤4 mg/L), co związane jest z ekspresją genu na niskim poziomie.

Podsumowując, można stwierdzić, że szczepy wrażliwe na klindamycynę albo nie posiadają jakichkolwiek genów oporności albo mogą mieć gen *erm*F, którego ekspresja się nie ujawnia. Głównym czynnikiem oporności na klindamycynę może być sam gen *erm*F lub w połączeniu z innymi genami (*erm*G, *mef*A i *msr*SA) znajdującymi się na transpozonie CTnGERM1 (6).

PIŚMIENNICTWO

1. *Abbas A, Srivastava P, Nirwan PS*. Prevalence of MLS_B resistance and observation of *ermA* & *ermC* genes at a tertiary care hospital. JCDR 2015, 9: 8-10.
2. *Brook I, Wexler HM, Goldstein EJ*. Antianaerobic antimicrobials: spectrum and susceptibility testing. Clin Microbiol Rev 2013, 26:526-46.
3. Brook I. Spectrum and treatment of anaerobic infections. J Infect Chemother 2016, 22:1-13.
4. *Boyanova L, Kolarov R, Mitov I.* Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades. Anaerobe 2015; 31: 4-10.
5. *Boente RF, Ferreira LQ, Falcão LS* i inni. Detection of resistance genes and susceptibility patterns in *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains. Anaerobe 2010;16: 190-4.
6. *Eitel Z, Sóki J, Urbán E* i inni. The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries. Anaerobe 2013; 21: 43-9.
7. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints (dostęp 02.08.2017).
8. *Kaczmarek A, Budzyńska A, Gospodarek E.* Występowanie w latach 2002-2004 szczepów *Staphylococcus aureus* z fenotypem oporności MLSB w próbkach materiału klinicznego. Med Dośw Mikrobiol 2006; 58: 103-11.
9. *Kierzkowska M, Majewska A, Sawicka-Grzelak A* i inni. Specyfika zakażeń bakteriami beztlenowymi na oddziałach chirurgicznych i ortopedycznych. Med Dośw Mikrobiol 2012; 64: 29-34
10. *Kierzkowska M, Majewska A, Sawicka-Grzelak A* i inni. Antibiotic resistance profiles of strictly anaerobic Gram-negative *Bacteroides* spp. and *Parabacteroides* spp. bacilli isolated from infected inpatients on surgical wards. J Glob Antimicrob Resist 2016; 7: 128-9.
11. *Kierzkowska M, Pedzisz P, Babiak I* i inni. Orthopedic infections caused by obligatory anaerobic Gram-negative rods: report of two cases. Med Microbiol Immunol 2017; 206:363-6.
12. *Martineau F, Picard FJ, Grenier L* i inni. Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. The ESPRIT Trial. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 527-34.
13. *Reig M, Galan JC, Baquero F, Perez-Diaz JC*. Macrolide Resistance in *Peptostreptococcus* spp. mediated by *erm*TR: possible source of macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance in *Streptococcus pyogenes*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 630–2.
14. *Nagy E.* Anaerobic infections: update on treatment considerations. Drugs 2010; 70: 841-58.
15. *Nagy E, Urbán E, Nord CE*; ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. Clin Microbiol Infect 2011; 17: 371-9.

16. *Schuetz AN*. Antimicrobial resistance and susceptibility testing of anaerobic bacteria. Clin Infect Dis 2014; 59: 698-705.
17. *Sheikh SO, Jabeen K, Qaiser S* i inni. High rate of non-susceptibility to metronidazole and clindamycin in anaerobic isolates: Data from a clinical laboratory from Karachi, Pakistan. Anaerobe 2015; 33: 132-6.
18. *Shoemaker NB, Vlamakis H, Hayes K, Salyers AA*. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 561-8.
19. *Sóki J, Hedberg M, Patrick S* i inni. Emergence and evolution of an international cluster of MDR *Bacteroides fragilis* isolates. J Antimicrob Chemother 2016;71: 2441-8.
20. *Veloo AC, van Winkelhoff AJ*. Antibiotic susceptibility profiles of anaerobic pathogens in The Netherlands. Anaerobe 2015; 31: 19-24.
21. *Wybo I, Van den Bossche D, Soetens O* i inni. Fourth Belgian multicentre survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. J Antimicrob Chemother 2014; 69: 155-61.

Otrzymano: 13 XI 2017 r.
Adres Autora: 02-004 Warszawa, ul. Chałubińskiego 5, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Warszawski Uniwersytet Medyczny
e-mail: anna.majewska@wum.edu.pl