

576.851.214.097.31:576.851.252.097.31 615.779.9:616-092.4

DLOUHODOBÁ STUDIE ZMĚN CITLIVOSTI STAFYLOKOKŮ, PYOGENNÍCH STREPTOKOKŮ A PNEUMOKOKŮ NA LINKOMYCIN IN VITRO

M. HEJZLAR, M. PAROUBEK, M. ŠAFRÁNKOVÁ, L. HÁJKOVÁ, V. SEDMIDUBSKÝ,
L. LANGŠÁDL, J. ŠTEFCOVÁ, V. ŠIMERKOVÁ, V. JERÁBKOVÁ, A. ŠÍMOVÁ, J. VLTAVSKÁ,
H. MOUDRÁ

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie, Praha
(náčelník: plk. MUDr. Vladimír Kotlář, CSc.)

Úvod

Systematické sledování citlivosti a rezistence mikroorganismů na antibiotika je součástí racionální antibiotické politiky každého většího nemocničního zařízení. Jedním z nesporných úspěchů československého socialistického zdravotnictví je postupné vybudování sítě antibiotických středisek v šedesátých letech na území České socialistické republiky, počín ve své době ojedinělý v celém světě. Tato střediska velmi pomohla při provádění racionální antibiotické terapie, standardizaci laboratorních metod a v neposlední řadě právě při dlouhodobém sledování účinku antibiotik na mikroorganismy. V Ústřední vojenské nemocnici v Praze-Střešovicích pracuje Antibiotické středisko od počátku šedesátých let jako jedno z prvních čtyř v celém státě (Plzeň, České Budějovice, ÚEM a VÚHEM Praha). Sledování citlivosti mikroorganismů vůči antibiotikům patřilo vždy k předním úkolům střešovického pracoviště. Když se v polovině šedesátých let dostal do ČSSR linkomycin, byla mu pro mimořádnou kvalitu, která spočívala ve vynikajícím účinku na grampozitivní mikroorganismy (včetně stafylokoků rezistentních na řadu ji-

ných antibiotik), neobvykle nízké toxicitě a výborné tkáňové distribuci, věnována soustavná pozornost, zvláště na pražských pracovištích. Protože ve spektru linkomycinu zauímají stafylokoky, pyogenní streptokoky a pneumokoky čelné místo, věnovali jsme jim od roku 1965 systematickou pozornost a velkou část kmenů zachycených od pacientů Ústřední vojenské nemocnice v Praze jsme mimo jiné testovali také na citlivost vůči linkomycinu. Výsledky předkládáme v této práci.

Materiál a metody

Testované mikroorganismy

Z denního klinického materiálu jsme průběžně izolovali kmeny *Staphylococcus aureus*, zpravidla na krevním agaru standardního složení. Identifikační testy se opíraly o stanovení koagulázy, fosfatázy, pigmentaci, utilizaci manitolu, někdy i o další testy v souladu s Cowanovou klasifikací (1). Podobně byly určovány i pyogenní streptokoky, u nichž byl vždy proveden bacitracinový a CAMP test, kolem 38 % bylo ověřeno i sérotypizací. Pneumokoky byly verifikovány testem rozpustnosti ve žluči a optochinovým testem. Převážná většina

všech kmenů byla testována na citlivost vůči antibiotikům (včetně linkomycinu) v první nebo druhé subpasáži po izolaci z klinického materiálu.

Testy citlivosti

K určení citlivosti jsme zkoušené kmeny inokulovali na standardní Petriho misky rozměrů 100 × 20 mm, plněné půdou Brain Heart Infusion Agar Difco, s přídavkem 7,5% defibrinované beraní krve, od roku 1971 půdou Müller-Hinton Agar Difco se stejnou přísadou. Obě média jsme plnili v množství 20 ml na jednu misku. Testy inkubovány při teplotě 36,5 až 37 °C 20 hodin a poté odečítány. V běžném rutinním testu jsme používali papírové disky syčené antibiotiky (průměr disků 6 mm, Whatman No. 3 papír). Užívali jsme převážně antibiologické disky, připravované v n. p. Lachema, v letech 1965–1968 jsme si sami připravovali linkomycinové disky. Měření průměrů inhibičních zón odpovídalo údajům publikovaným ve Zprávách technicko-poradenské služby n. p. Spolana 1964, č. 6, s. 15–28. Kritéria pro linkomycin byla do značné míry podobná kritériím pro erytromycin. Rezistentní kmeny byly ověřovány plotnovým dilučním testem na půdách stejného složení a při inokulu kolem $2-7 \times 10^6/\text{ml}$ (obdobně jako u diskového testu). Kmeny určené diskovým testem jako rezistentní měly MIC přes 32,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, v několika případech u streptokoků a pneumokoků přes 16,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Pro diluční kvantitativní test jsme užívali komerční injekční Lincocin firmy Upjohn, jehož aktivitu jsme kontrolovali standardním kmenem *Staphylococcus aureus* 771/V a linkomycinovou bází od firmy Upjohn šarže U-10149 A, TH-026 o aktivitě 895 μg báze/mg. Od roku 1976 jsme používali rovněž sovětský injekční linkomycin kontrolovaný stejným způsobem.

V posledních letech byl rovněž zkoušen původ rezistence u izolovaných kmenů. Rezistence podmíněná plazmidickými R-faktory byla ověřována pokusy o vyřazení plazmidické DNK z funkce akridinovou oranží, ethidium bromidem a rifampicinem.

Výsledky

V průběhu let 1965 — do srpna 1979 bylo testováno 11 124 kmenů *Staphylococcus aureus* na citlivost vůči linkomycinu. V prvním roce sledování bylo všech 112 kmenů dobře citlivých. V letech 1966 a 1967 byly izolovány ojedinělé rezistentní kmeny. Rok 1968 je atypický, protože z relativně malého počtu 201 kmenů byla plná polovina speciálně vybraných multi-rezistentních stafylokoků. Vyskytlo se celkem 8 % kmenů rezistentních na linkomycin, z toho 14 (87,5 %) rezistentních současně na erytromycin, penicilin G, tetracyklin, oleandomycin, streptomycin. Šlo zřejmě o plazmidicky mediovanou rezistenci, kmeny se však nedochovaly do pozdější doby a průkaz plazmidické

DNK může být u nich jen předpokládán. Velká sestava kmenů z roku 1969 zahrnuje kolem 1800 kmenů izolovaných přímo v ÚVN Praha, zbytek pochází z různých míst ČSSR [7].

Dokumentuje se příznivá situace — pouhých 1,5 % rezistentních kmenů. V dalších letech nebyl pozorován žádný strmý vzestup rezistence, přestože počet kmenů postupně mírně narůstal do roku 1977. V roce 1979 zachyceno 5,6 % stafylokoků rezistentních na linkomycin. Od roku 1975 ověřován původ rezistence. Ve všech případech současné rezistence na erytromycin a linkomycin byla tato zprostředkována plazmidickou DNK, pouze u tří kmenů rezistentních na linkomycin (nikoliv na erytromycin) lze předpokládat chromozomální původ rezistence. Podrobnosti dokládá tab. 1.

Tab. 1

Přehled výskytu rezistentních kmenů Staphylococcus aureus v Ústřední vojenské nemocnici v Praze-Střešovicích v letech 1965–1979

Rok	Počet testovaných kmenů	Procento kmenů rezistentních na		
		linkomycin	erytromycin	obě antibiotika
1965	112	0	0,9	0
1966	229	0,4	4,5	0
1967	895	0,5	7,5	0,3
1968	201	8,0	16,0	7,0
1969	5 000	1,5	9,0	0,2
1970	622	2,5	11,5	1,5
1971	593	3,9	11,3	1,4
1973	947	4,0	15,3	1,6
1975	570	4,6	16,3	4,0
1977	732	8,1	17,2	6,7
1978	845	5,3	16,6	4,1
1979	378	5,6	18,8	4,0
Celkem	11 124			

Analogicky byla ve stejném údobí sledována citlivost pyogenních streptokoků skupiny A. Za celých 15 let byly zachyceny pouze dva kmeny *Streptococcus pyogenes* rezistentní na linkomycin (20,0 a 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$), z toho první v listopadu 1973, druhý v květnu 1979. Oba kmeny byly současně rezistentní na erytromycin, nikoliv na penicilin G nebo ampicilin. Rezistence je velmi pravděpodobně podmíněna informací zabudovanou v plazmidické DNK. První kmen rezistentní na erytromycin se objevil v roce 1969. O deset let později bylo izolováno sedm kmenů rezistentních na erytromycin (viz tab. 2).

U více než 5,5 tisíce pneumokoků byla prokázána rezistence na linkomycin teprve u kmenů izolovaných v roce 1977 (první kmen vůbec v červnu). Jen u jediného kmene z tohoto roku jsme prokázali současnou rezistenci na erytro-

Tab. 2

Přehled výskytu rezistentních kmenů Streptococcus pyogenes skupiny A v Ústřední vojenské nemocnici v Praze-Střešovicích v letech 1965–1979

Rok	Počet testovaných kmenů	Procento kmenů rezistentních na		
		linko-mycin	erytro-mycin	obě antibiotika
1965	83	0	0	0
1966	100	0	0	0
1967	882	0	0	0
1978	291	0	0	0
1969	1 950	0	0,5	0
1970	375	0	0,35	0
1971	663	0	0,9	0
1973	501	0,2	2,0	0,2
1975	494	0	1,0	0
1977	735	0	1,8	0
1979	200	0,5	3,5	0,5
Celkem	6 274			

mycin a také jen u tohoto kmene šlo o extrachromozomálně mediovanou necitlivost. V roce 1979 izolovány tři kmeny rezistentní na linkomycin, z toho dva současně i na erytromycin. U obou kmenů se sdruženou rezistencí prokázány plazmidické R-faktory. Jeden kmen monorezistentní na linkomycin vzdoroval průkazu extrachromozomálních R-faktorů. První pneumokok rezistentní na erytromycin byl prokázán v září 1967. V roce 1969 z 399 kmenů bylo pouhých 12 rezistentních na erytromycin. U osmi testovaných prokázány ve třech případech plazmidy. Podrobněji lze situaci sledovat v tab. 3.

Tab. 3

Přehled výskytu rezistentních kmenů Streptococcus pneumoniae v Ústřední vojenské nemocnici v Praze-Střešovicích v letech 1965–1979

Rok	Počet testovaných kmenů	Procento kmenů rezistentních na		
		linko-mycin	erytro-mycin	obě antibiotika
1965	49	0	0	0
1966	102	0	0	0
1967	611	0	1,0	0
1968	400	0	0,5	0
1969	1 864	0	1,1	0
1970	296	0	0,7	0
1971	398	0	1,0	0
1973	411	0	1,5	0
1975	502	0	2,0	0
1977	614	0,5	1,8	0,16
1979	399	0,75	3,0	0,50
Celkem	5 646			

Diskuse

Získané výsledky ukazují velmi dobrou situaci po téměř patnáctiletém používání linkomycinu v terapii nemocných v ÚVN Praha. Jedním z důležitých faktorů je přitom nesporně výborná spolupráce klinických a mikrobiologických pracovníků nemocnice. V šedesátých letech byl jak linkomycin, tak i erytromycin dosti přísně obhospodařován a používán k léčení jasně indikovaných případů po konzultaci. Do současné doby to platí o linkomycinu, který byl používán hojněji při léčbě stafylokokových osteomyelitid, při různých kostních a kloubních operacích, ve stomatochirurgii, v kombinaci s aminoglykosidy u chirurgických komplikací, v individuálních případech v neurochirurgii, při stafylokokové endokarditidě, u streptokokových a pneumokokových infekcí při přecitlivělosti pacienta na peniciliny aj. Do současné doby bylo v ÚVN Praha léčeno linkomycinem více než 1500 pacientů, v jasně indikovaných případech s 80–90 % úspěchu.

Pokud se týče porovnání situace v ÚVN Praha, bude zřejmě obdobná u stafylokoků jako v celé ČSSR, jak o tom svědčí publikace Zahradnického z roku 1978 na téměř 14 000 kmenech [17, 18], publ. Grunta aj. z roku 1977 [5] na 33 700 kmenech. V různých zemích světa nepřesahoval počet rezistentních stafylokoků do roku 1970 pět procent, až na určité málo početné výjimky. V sedmdesátých letech udávají větší počet kmenů rezistentních na linkomycin sovětsí autoři: Sobolev aj. [14] v roce 1971 57 %, Speranskaja v roce 1976 26,8 % [15]. Podobně v roce 1978 udávají turečtí pracovníci [16] 16–20 % kmenů rezistentních na linkomycin.

Ještě příznivější je situace u pyogenních streptokoků skupiny A, ačkoliv již v červenci 1968 v Kanadě zachytil Dixon [3] od ambulantního pacienta první rezistentní kmen. Byl citlivý na penicilin a tetracyklin, rezistentní na erytromycin a linkomycin (350,0 a 200,0 µg MIC!!). Byl to první rezistentní izolát v Kanadě a druhý v Severní Americe. V témže roce publikovali nálezy birezistentního kmeny Kohn aj. [9] v Anglii. Kohn a Evans [10] referovali v roce 1970 o nálezu streptokoků necitlivých na předchozí antibiotika a navíc i klindamycin. V letech 1971–1972 stoupla incidence hemolytických streptokoků skupiny A rezistentních k linkomycinu a erytromycinu ve státě Alberta v Kanadě. Dixon a Lipinski [4] udávají 1,38 % rezistentních kmenů z celkového počtu 9100. Zatímco v naší práci udáváme první výskyt streptokoků rezistentních na linkomycin v roce 1973, Mitsuhashi aj. [11] publikovali v roce 1974 zprávu o výskytu kmenů se sdruženou rezistencí na erytromycin a linkomycin v Japonsku. O tři roky později též autor [12] uvádí, že z více než tisíce kmenů bylo přes 50 % rezistentních na linkomycin a řadu dalších antibiotik. Ve většině zemí světa je ale zatím

situace z hlediska citlivosti velmi příznivá jako v ČSSR.

Jeden z prvních kmenů *Streptococcus pneumoniae* rezistentních na linkomycin popsal Dixon (2) v roce 1967. Podobně jako pyogenní streptokoky i tento kmen byl necitlivý současně na erytromycin. MIC linkomycinu byla 15,0 µg/ml. V téže roce popsal obdobný kmen Kislak (8). V roce 1972 a později se objevují rezistentní pneumokoky v Austrálii, jak uvádí Hansman (6). V roce 1978 jsou popsány multirezistentní kmeny z jižní Afriky, přičemž MIC linkomycinu i klindamycinu přesahovala 128,0 µg/ml (13). Ve stejném roce uvádějí Töreci aj. (16) 6 % rezistentních pneumokoků v Turecku. My sami jsme zachytili první rezistentní kmen v červnu 1977 a do současné doby máme takových kmenů z mnohatisícové sestavy pouze šest.

Závěrem lze říci, že dobrá antibiotická politika směřující k přesně indikovanému a uváženému užívání těchto preparátů nese své ovoce v příznivé situaci z hlediska rezistence, jak se to ukázalo také v našem nemocničním zařízení. Otázka rezistence mikroorganismů je zatím zcela nedořešená, a proto nelze v budoucnosti vyloučit nepříznivý zvrat. Nutí nás to k velké opatrnosti a trvalému pozornému sledování trendu rezistence u důležitých mikroorganismů.

Souhrn

V průběhu let 1965–1979 sledována citlivost 11 124 stafylokoků, 6274 pyogenních streptokoků a 6646 pneumokoků na linkomycin in vitro. Všechny kmeny byly získány z klinického materiálu od pacientů z Ústřední vojenské nemocnice v Praze-Střešovicích. V letech 1970–1979 kolísal počet stafylokoků rezistentních na linkomycin mezi 2,5–8,1 %. Rezistence byla většinou zprostředkována plazmidickou DNK. První kmen rezistentní na linkomycin *Streptococcus pyogenes* skupiny A byl zachycen v roce 1973, druhý v květnu 1979. Rezistentní kmeny pneumokoků byly izolovány teprve v roce 1977 (celkem tři), další tři kmeny pak v roce 1979. Kmeny určené diskovým testem jako rezistentní měly MIC většinou přes 32,0 µg/ml.

Literatura

1. Cowan, S. T. - Steel, K. J.: Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University Press 1965.
2. Dixon, J. M. S.: Pneumococcus resistant to erythromycin and lincomycin. *Lancet*, 1, 1967, s. 573.
3. Dixon, J. M. S.: Group A Streptococcus resistant to erythromycin and lincomycin. *Can. Med. Ass. J.*, 99, 1968, č. 22, s. 1093–1094.
4. Dixon, J. M. S. - Lipinski, A. E.: Infection with beta-hemolytic Streptococcus resistant to lincomycin and erythromycin and observations on zonal pattern resistance to lincomycin. *J. Infect. Dis.*, 130, 1974, č. 4, s. 351–356.
5. Grunt, J. - Krémery, V. - Rosival, L. - Výmola, F.: Antibiotic policy—an all-nation computer-assisted model. In: *Plasmids medical and theoretical aspects*, s. 11–16, Praha, Avicenum 1977.
6. Hansman, D.: Multiple drug resistance in *Pneumococcus* (*Diplococcus pneumoniae*). *Current Chemotherapy*, vol. I, s. 540–543, Amer. Soc. Microbiology 1978.
7. Hejzlar, M. - Vacek, V. - Kyntera, F.: LINKOMYCIN. I. Přehled antibakteriálního účinku in vitro. Systematická studie citlivosti mikroorganismů na linkomycin. Sborník věd. prací VLVDÚ Hradec Králové, 48, 1970, s. 57–92.
8. Kislak, J. W.: Type 6 pneumococcus resistant to erythromycin and lincomycin. *N. Engl. J. Med.*, 276, 1967, s. 852.
9. Kohn, J. - Hewitt, J. H. - Fraser, C. A.: Group A streptococci resistant to lincomycin. *Brit. Med. J.*, 1, 1968, s. 703.
10. Kohn, J. - Evans, A. J.: Group A streptococci resistant to clindamycin. *Brit. Med. J.*, 2, 1970, s. 423.
11. Mitsuhashi, S. - Inoue, M. - Fuse, A. - Kaneko, Y. - Oba, T.: Drug resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Jpn. J. Microbiol.*, 19, 1974, s. 98–99.
12. Mitsuhashi, S.: Biological significance of drug resistance plasmids. In: *Plasmids medical and theoretical aspects*, s. 3–9, Praha, Avicenum 1977.
13. Morbid. Mortal, *Wkly Rep.* 27, 1978, 1, s. 1–2: Follow-up on multiple antibiotic resistant pneumococci. South Africa.
14. Sobolev, V. P. - Vlasova, I. V. - Sovolověva, V. E. - Bogdanova, L. F.: Sravnitel'noje izučeniye čuvstvitel'nosti stafylokokkov, vydělnnykh ot bolnykh i obslužujuščego personala, k različnym antibiotikam. *Antibiotiki* (Moskva), 16, 1971, č. 2, s. 162–167.
15. Speranskaja, O. N. - Fomina, I. P. - Mordvinova, N. B. - Bykov, V. A.: Fenotip ustojčivosti k antibiotikam kliničeských štammov stafylokokkov, vydělnnykh u bolnykh so stafylokokkovoj děstruktivnoj pnevmonijej. *Antibiotiki* (Moskva), r. 21, 1976, č. 6, s. 523–527.
16. Töreci, K. - Cetin, E. T. - Ang, Ö.: Antibiotic susceptibility of 7726 bacterial strains isolated from clinical specimens. *Current Chemotherapy*, vol. I, s. 540–543, Amer. Soc. Microbiology 1978.
17. Zahradnický, J.: Přehled citlivosti vybraných bakteriálních druhů k antibiotikům ve fakultní nemocnici v Plzni (1964–1976). *ČsEMI*, 27, 1978, č. 6, s. 342–354.
18. Zahradnický, J. - Výmola, H. - Jelínek, J.: Současný stav citlivosti některých bakteriálních druhů k antibiotikům a chemoterapeutikům v ČR. *Čas. Lék. čes.*, 117, 1978, č. 6, s. 164–169.

Klíčová slova: Linkomycin; Citlivost; Stafylokoky; Pyogenní streptokoky; Pneumokoky