

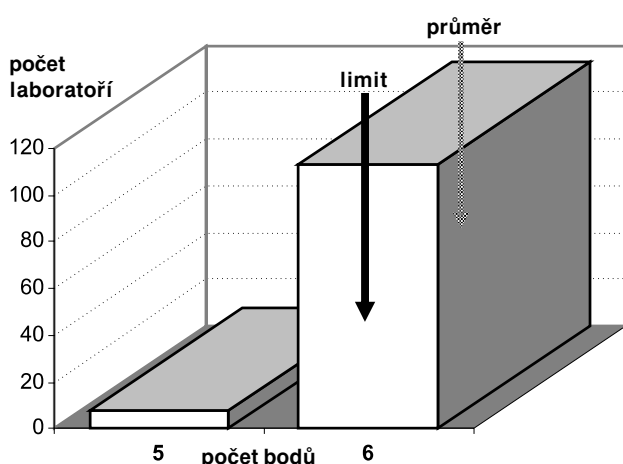
EHK – 646 Bakteriologická diagnostika – vyhodnocení

Helena Žemličková, Renata Kolínská, Monika Marejková, Pavla Urbášková

CELKOVÉ HODNOCENÍ IDENTIFIKACÍ

Celkem byly rozeslány vzorky 121 laboratořím. 121 laboratoří odeslalo výsledek do závěrečného termínu. Za identifikaci signifikantního patogena ve 3 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 6 bodů, za vyšetření produkce širokospektré β -laktamázy (ESBL) mohly laboratoře obdržet celkem 2 body (vzorek 4 a 5). Bodování pro identifikaci bylo provedeno ve stupnici 2, 1, 0 a –1 bodů.

Graf 1: POČET BODŮ ZA SPRÁVNOU IDENTIFIKACI



Maximálního počtu bodů při identifikaci dosáhlo 113, tj. 93,4 % laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 5,434 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $5,934 - (2 \times 0,25) = 5,434$). Tohoto limitu dosáhlo 113 laboratoří, 8 laboratoří tento limit nesplnilo.

VÝSLEDKY U JEDNOTLIVÝCH VZORKŮ

Vzorek 1: Edukativní vzorek
Odpověď: <i>Kingella kingae</i>

Kingella kingae patří do skupiny HACEK. Dalšími bakteriemi patřící do této skupiny jsou *Aggregatibacter aphrophilus* (dříve *Haemophilus aphrophilus* a *H. paraphrophilus*), *Haemophilus parainfluenzae*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (dříve *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Cardiobacterium hominis* a *Eikenella corrodens*.

K. kingae je krátká, nepohyblivá, fakultativně anaerobní G-tyčka. Zřetelné kolonie, mající 1–2 mm v průměru, vyrůstají po 48 hodinách. Kolonie mají nevelkou, ale zřetelnou zónu β -hemolýzy na krevním agaru, okraje jsou roztřepené, korodující. Kultivace při vyšší koncent-

raci CO_2 podporuje růst kolonií. Mikrob je kataláza negativní, oxidáza pozitivní, neprodukuje indol, neredukuje nitráty, negativní je i test na eskulin, arginin a ornitin, pozitivní je test na alkalickou fosfatázu, test okyselování glukózy a maltózy.

K. kingae je součástí faryngeální mikroflóry malých dětí a může být u nich původcem septické artritidy, spondylodiscitidy, osteomyelitidy a okultní bakteriémie. Uvedené infekce se vyskytují i u obvykle imunodeficientních dospělých nebo se manifestují jako endokarditida.

LITERATURA

- [1] Brouqui P. and Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 177–207.
- [2] Nørskov-Lauritsen N and Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; 56: 2135–2146.
- [3] Yagupsky P. *Kingella kingae*: from medical rarity to an emerging paediatric pathogen. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 358–367.

Vzorek 2: Izolát z krve od pacienta s onkologickým onemocněním.

Odpověď: *Enterococcus faecium*

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Enterococcus faecium</i>	115	2	95%
<i>Enterococcus durans</i>	3	1	2,5%
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	1	0,8%
<i>Enterococcus gallinarum</i>	1	1	0,8%
<i>Enterococcus hirae</i>	1	1	0,8%
Celkem	121		100%

Z 20 laboratoří s nejvyšším dosaženým počtem bodů za minulý rok uvedlo správný výsledek 18 laboratoří. Vzorek je možno hodnotit.

Druh *Enterococcus faecium* správně identifikovalo 95 % laboratoří. *E. faecium* má proti *E. durans* a *E. hirae* pozitivní test okyselování arabinózy a manitolu (vyskytují se však aberantní kmeny, které mají manitol negativní, stejně jako nyní zaslaný kmen), kolonie *E. durans* jsou na krevním agaru obvykle β -hemolytické. *E. faecalis* je stejně jako *E. faecium* manitol pozitivní, ale na rozdíl od *E. faecium* má *E. faecalis* negativní test arabinózy. Z dalších testů lze využít i test tvorby kyseliny v mediu

s pyruvátém sodným, který je u *E. faecalis* pozitivní, u *E. faecium* negativní. Oproti *E. faecium* okyseluje *E. gallinarum* methyl- α -D-glukosopyranosid a je, narozdíl od většiny enterokoků, pohyblivý (mezi pohyblivé enterokoky patří též *E. casseliflavus*).

Vzorek 3: Stoličky od 2letého dítěte s krvavým průjmem a bolestmi břicha.
Odpověď: <i>Escherichia coli</i> O26
Vzorek dále obsahoval: <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Morganella morganii</i>

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Escherichia coli</i> O26	119	2	98,3%
<i>Escherichia coli</i> O1	1	1	0,8%
<i>Escherichia coli</i>	1	1	0,8%
Celkem	121		100%

Z 20 laboratoří s nejvyšším dosaženým počtem bodů za minulý rok uvedlo správný výsledek 20 laboratoří. Vzorek je možno hodnotit.

Escherichia coli séro skupiny O26 se klasifikují jako atypická enteropatogenní *E. coli* O26 (aEPEC O26) a enterohemoragická *E. coli* O26 (EHEC O26). Kmeny aEPEC O26 jsou původci gastroenteritid převážně u malých dětí, zatímco kmeny EHEC O26 jsou izolovány především od pacientů s hemoragickou kolitidou a hemolyticko-uremickým syndromem. Enterohemoragická *E. coli*, na rozdíl od EPEC, produkuje cytotoxiny Shiga toxin 1 a Shiga toxin 2. EHEC O26 je nejfrekventovanější séro skupinou non-O157 kmenů EHEC izolovaných ve světě, ale i v ČR. Vedle EHEC O157:H7 a O26:H11 jsou ve světě nejčastěji popisovány tyto séro skupiny enterohemoragických *E. coli*: O103, O145, O91 a O111.

Izolaci kmenů EHEC usnadňuje kultivace stolice na selektivně-diagnostických půdách sorbitol MacConkey Agar (SMAC) a cefixime-tellurite-sorbitol MacConkey Agar (CT SMAC). Kmeny EHEC O157:H7 rostou na půdě SMAC v bílých (tj. sorbitol negativních) koloniích, na půdě CT SMAC tvoří bílé kolonie s černým středem. Také většina hlavních non-O157 sérotypů EHEC, včetně O26, je telurit rezistentní a rostou na CT SMAC v rů-

žových (tj. sorbitol pozitivních) koloniích. Dále je vhodná kultivace na Enterohemolyzinovém agaru, kde se využívá schopnosti většiny sérotypů EHEC produkovat EHEC-hemolysin. K účelu EHK byl zaslán netoxigenní kmen *E. coli* O26:H11. Jsme velice rádi, že většina laboratoří určila séro skupinu významného patogena správně.

Vzorek 4: Izolát z krve od pacienta léčeného pro malignitu.
Odpověď: <i>Escherichia coli</i>

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Escherichia coli</i>	121	2	100%
Celkem	121		100%

Z 20 laboratoří s nejvyšším dosaženým počtem bodů za minulý rok uvedlo správný výsledek 20 laboratoří. Vzorek je možno hodnotit.

Požadavek byl identifikovat druh zasláního kmene, zjistit zda produkuje širokospektrou β -laktamázu ESBL, a uvést hodnoty minimálních inhibičních koncentrací (MIC), respektive průměry inhibičních zón ceftazidimu a piperacilinu/tazobaktamu. Kmen 4 je *Escherichia coli* produkující relativně nízké koncentrace ESBL. Ze 121 zúčastněných laboratoří označilo 117 laboratoří správně kmen jako producenta ESBL. Celkové výsledky vyšetření produkce ESBL laboratořemi jsou v tabulce 1. Interpretace výsledků vyšetření citlivosti ceftazidimu a piperacilinu/tazobaktamu nebyla požadována, pro tato antibiotika jsou uvedeny v tabulce 2 klinické breakpointy CLSI [1] a EUCAST [2].

Tabulka 1: VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ PRODUKCE ESBL u KMENŮ *ESCHERICHIA COLI* - 4 a *E. COLI* - 5 ve 121 laboratořích

Produkce ESBL	Počet laboratoří	
	<i>E. coli</i> - 4	<i>E. coli</i> - 5
ano	117 (96,7 %)	2 (1,6 %)
ne	0 (0,0 %)	115 (95,0 %)
neudáno	4 (3,3 %)	4 (3,3 %)

Tabulka 2: KLINICKÉ BREAKPOINTY CLSI [1] a EUCAST [2] PRO INTERPRETACI CITLIVOSTI ENTEROBAKTERIÍ PODLE PRŮMĚRŮ INHIBIČNÍCH ZÓN (IZ) a MINIMÁLNÍCH INHIBIČNÍCH KONCENTRACÍ (MIC) CEFTAZIDIMU a PIPERACILINU/TAZOBAKTAMU

Antibiotikum	citlivý podle CLSI [1]			citlivý podle EUCAST [2]		
	obsah disku	průměr IZ	MIC	obsah disku	průměr IZ	MIC
ceftazidim	30 μ g	≥ 18 mm**	≤ 8 mg/l **	10 μ g	≥ 20 mm	≤ 1 mg/l
piperacilin/tazobaktam	100/10* μ g	≥ 21 mm	≤ 32 mg/l ***	30/6* μ g	≥ 18 mm	≤ 8 mg/l ***

* poměr antibiotika a inhibitoru; ** kmeny vytvářející IZ o průměru ≤ 22 mm nebo inhibované MIC > 1 mg/l se dále vyšetřují speciálními testy pro průkaz produkce ESBL; *** vztaženo na piperacilin.

Vzorek 5: *Escherichia coli*

Požadavek byl zjistit, zda kmen produkuje širokospektrou β -laktamázu ESBL, a uvést hodnoty MIC, respektive průměry inhibičních zón ceftazidimu a piperacilinu/tazobaktamu. Kmen 5 *Escherichia coli* neprodukuje ESBL. Ze 121 zúčastněných laboratoří uvedlo 115 (95,0 %) laboratoří správný výsledek. Celkové výsledky vyšetření produkce ESBL laboratořemi jsou v tabulce 1. Interpretace výsledků vyšetření citlivosti ceftazidimu a piperacilinu/tazobaktamu nebyla požadována, pro tato antibiotika jsou uvedeny v tabulce 2 klinické breakpointy CLSI [1] a EUCAST [2].

ZÁVĚR

Externí kontrola kvality EHK-646 prokázala, že vyšetření produkce ESBL nečiní laboratořím potíže. Bylo však zjištěno, že část laboratoří chybuje v označení hodnot MIC, které jsou mimo rozmezí vyšetřovaných koncentrací antibiotik. Sedmnáct laboratoří uvedlo nesprávně znaménko pro nejnižší naměřené hodnoty MIC, které mohou být nižší nebo rovny nejnižší koncentraci testovaného rozmezí (místo správného znaménka „<=“ pro hodnoty „nižší nebo rovno“ použily znaménko „<“, které označuje pouze hodnoty „nižší“ než je nejnižší vyšetřovaná koncentrace). U kmene 5 použila jedna laboratoř ne-

správné označení pro hodnoty MIC obou antibiotik (místo správného znaménka „<=“ pro hodnoty „nižší nebo rovno než“ použila znaménko „>“, které označuje hodnoty „vyšší“ než je nejvyšší vyšetřovaná koncentrace).

V této sérii EHK nebyla interpretace výsledků vyšetření citlivosti ceftazidimu a piperacilinu/tazobaktamu požadována, neboť v prosinci 2009 vydaná interpretační kritéria evropské instituce EUCAST [1] se u těchto antibiotik odlišují od doposud univerzálně akceptovaných kritérií CLSI [2]. Tyto dokumenty a vlastní výsledky budou podkladem pro odbornou diskusi v otázkách volby laboratorních metod vyšetření citlivosti a kritérií pro interpretaci výsledků.

LITERATURA

- [1] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. CLSI Document M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, Pa, 2009.
- [2] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1,0 December 2009; dostupné na http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/

*Helena Žemličková
Renata Kolínská
Monika Marejková
Pavla Urbášková
OML, CLČ, SZÚ*