

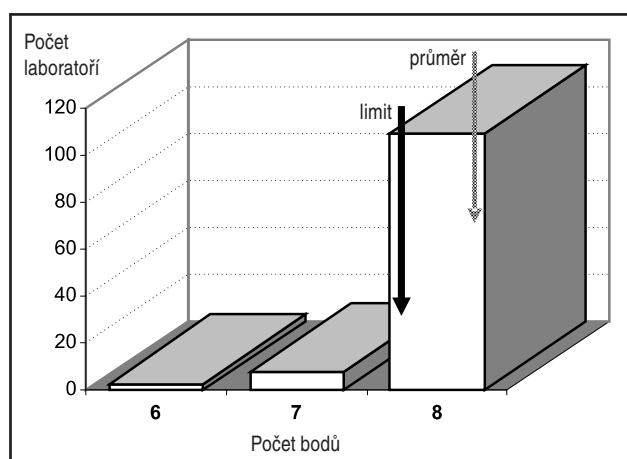
EHK – 673 Bakteriologická diagnostika – vyhodnocení

Helena Žemličková, Jana Zavadilová, Věra Lebedová, Daniela Dědičová, Pavla Urbášková

HODNOCENÍ

Celkem byly rozeslány vzorky 120 laboratořím. 120 laboratoří odeslalo výsledek do závěrečného termínu. Za identifikaci signifikantního patogena ve 4 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 8 bodů, za vyšetření citlivosti mohly laboratoře obdržet celkem 4 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 109, tj. 90,8% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,097 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $7,883 - (2 \times 0,393) = 7,097$). Tohoto

limitu dosáhlo 109 laboratoří, 11 laboratoří tento limit nesplnilo.

Z 20 laboratoří s nejvyšším dosaženým počtem bodů za minulý rok uvedlo správný výsledek 20 laboratoří u všech 4 vzorků. Vzorky je možno hodnotit.

VÝSLEDKY ZÚČASTNĚNÝCH LABORATOŘÍ

Vzorek 1: Výtěr z nasopharyngu od 4letého dítěte s dlouhotrvajícím kašlem

Odpověď: *Bordetella parapertussis*

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Bordetella parapertussis</i>	111	2	92,5 %
<i>Bordetella pertussis</i>	4	1	3,3 %
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	3	1	2,5 %
<i>Bordetella species</i>	2	1	1,7 %
Celkem	120		100 %

Většina laboratoří (111 ze 120, tj. 92,5 %) identifikovala kmen správně jako *Bordetella parapertussis*. Nesprávně identifikovalo kmen 7 laboratoří, z nichž 4 určily vzorek jako *B. pertussis*, 3 další jako *B. bronchiseptica*. Pouze 2 laboratoře kmen nedourčily a označily vzorek jako *Bordetella sp.*

Pokud se jedná o nedourčení kmene (*Bordetella sp.*) a záměnu *B. parapertussis* s *B. pertussis* lze předpoklá-

dat, že laboratoře nepoužily ke konečné identifikaci patřičná diagnostická séra (aglutinační séra *B. pertussis*, *B. parapertussis*; Oxoid).

Identifikační postup není obtížný. Vyžaduje použití vhodných kultivačních půd: Charcoal agar (Oxoid) nebo Bordet-Gengou (B-G) (Difco). Důležité je pH půdy, které má být upraveno na 7.4 ± 0.2 a kultivace v termostatu při 35-36 °C. *B. parapertussis* vyrůstá do 48 hodin, kolonie jsou větší (1-2 mm), šedostříbrné s výraznou zónou hemolýzy a tmavým černohnědým pigmentem v okolí kolonie. Po delší inkubaci kolonie narůstají až do velikosti 3 mm. Nepohybují se po plotně při doteku kličkou. Roste i na krevním agaru. *B. pertussis* vyrůstá za 48 hodin, častěji však za 72 hodin v drobných (do 0,5 mm) stříbrných koloniích, které se nepohybují při doteku kličkou, ale rozetřou se. Po delší inkubaci se kolonie zvětšují až na 2 mm, se slabou zónou hemolýzy. *B. bronchiseptica* na B-G půdě vyrůstá v koloniích podobných *B. pertussis*, v subkulturách jsou kolonie plošší, ale mají zvednutý prostředek. Roste i na běžných agarových živných půdách. *B. bronchiseptica* se může jen zřídka podílet na etiologii syndromu dáivého kašle.

Mikroskopicky se bordetely od sebe skoro neliší. Jsou to gramnegativní kokobacily, v subkulturách mívají sklon k pleomorfii. Identifikace se potvrdí pomocí skličkové aglutinace s diagnostickými séry (aglutinační séra *B. pertussis*, *B. parapertussis*; Oxoid).

Faktory, které se mohou podílet na neúspěchu kultivace:

- špatná volba kultivační půdy
- pH půdy (optimální 7.4 ± 0.2)
- stará krev

Vzhledem k tomu, že v současné době zaznamenáváme zvyšující se výskyt pertuse, je nutné věnovat diagnostice tohoto onemocnění patřičnou pozornost. U izolátů *B. pertussis* je žádoucí provádět genotypizaci a proto žádáme mikrobiology o zvýšení úsilí při kultivačním průkazu pertuse a o posílání izolátů *B. pertussis* do NRL pro pertusi a difterii.

Vzorek 2: Izolát z krve od pacienta s chronickým zánětem průdušek

Odpověď: *Haemophilus influenzae*

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Haemophilus influenzae</i>	114	2	95,0 %
<i>Haemophilus influenzae</i> typ b	3	2	2,5 %
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	2	1	1,7 %
patogen neprokázán	1	0	0,8 %
Celkem	120		100 %

Kmen ve vzorku číslo 2, laboratorní číslo NRL/HEM 9/10, je neopouzdržený (= netypovatelný) *Haemophilus influenzae*, biotyp II, spontánně aglutinující s fyziologickým roztokem. 114 laboratoří identifikovalo správně

druh *Haemophilus influenzae*, 3 laboratoře, kromě určitého druhu, uvádí i typ b. Typ nebyl určen správně. Jedná se o netypovatelný kmen *H. influenzae*, který spontánně aglutinuje s fyziologickým roztokem i s aglutinačními séry včetně séra b. Pro správné určení typu je potřeba kmen aglutinovat nejen s fyziologickým roztokem, ale také s celou sadou sér a-f.

Dvě laboratoře chybně určily druh *H. parainfluenzae* místo *H. influenzae*. K tomu může dojít například tehdy, když se používá k určení závislosti na faktoru X (hemin) a V (NAD) disková metoda a půda pro testování obsahuje faktor X.

Po zavedení rutinní vakcinace proti *H. influenzae* b (Hib) došlo v České republice k poklesu celkové nemocnosti Hib invazivních onemocnění. V současnosti se stává nejčastějším původcem závažných hemofilových onemocnění neopouzdržený *H. influenzae* a další typy opouzdržených kmenů *H. influenzae*, především typ e a typ f. Vzhledem k tomu, že všechna invazivní onemocnění způsobená *H. influenzae* podléhají v ČR podle Sbírky zákonů č. 473 / 2008 povinnému hlášení, je správné laboratorní potvrzení etiologie *H. influenzae* nezbytné.

Vzorek 3: Stoolice od pacienta s průjemem a bolestmi břicha

Odpověď: *Salmonella* Enteritidis

Vzorek dále obsahoval: *Escherichia coli*,
Proteus mirabilis

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Salmonella</i> Enteritidis	119	2	99,2%
<i>Salmonella</i> species	1	1	0,8%
Celkem	120		100 %

Vzorek představoval běžného původce alimentárního onemocnění s typickým klinickým nálezem. *Salmonella* Enteritidis (SE) je již od roku 1984 jednoznačně na prvním místě v prevalenci sérovarů v populaci ČR, proto není jeho určení pro terénní laboratoře problémem. Jednalo se o kmen vykazující typické biochemické i sérologické vlastnosti, který správně identifikovalo 99 % zúčastněných laboratoří (2 body). Pouze jediná laboratoř nezařadila kmen ani do skupiny (0,8 %, 1 bod).

Přesto počet komunitních salmonel Enteritidis, který přichází do NRL/Sa se žádostí o identifikaci, se každoročně podílí na celkovém počtu v NRL typizovaných salmonel více jak 4,5 %. Svědčí to o přetrvávajícím problému laboratoří s antigenně méně zdatnými izoláty či nedostatku kvalitních diagnostických sér. Obdobná či ještě komplikovanější situace bude patrně u ostatních „Top 5“ sérotypů a jejich variant (4,5,12:i: - a 6,7:-:1,5)

Vzorek 4: Izolát ze sputa od pacienta s pneumonií

Odpověď: *Streptococcus pneumoniae*

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	120	2	100%
Celkem	120		100 %

Požadavek byl identifikovat druh zaslaného kmene a zjistit jeho citlivost k penicilinu a k ciprofloxacinu. Kmen 4 je *Streptococcus pneumoniae*, citlivý k penicilinu a rezistentní k fluorochinolonům. Všechny 120 zúčastněných laboratoří uvedlo správné výsledky vyšetření citlivosti u obou antibiotikům. Celkové výsledky vyšetření citlivosti jsou v tabulce 1, která obsahuje limitní hodnoty průměrů inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro citlivé kmeny pneumokoků, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Vzorek 5: *Streptococcus pneumoniae*

Požadavek byl zjistit citlivost kmene 5 k penicilinu a k ciprofloxacinu. Kmen byl intermediárně rezistentní k penicilinu a intermediárně rezistentní k ciprofloxacinu. Ze 120 zúčastněných laboratoří uvedlo 52 (43,0 %) labo-

ratoří správný výsledek vyšetření citlivosti k antibiotikům, výsledek vyšetření citlivosti k ciprofloxacinu nebyl hodnocen. Celkové výsledky vyšetření citlivosti jsou v tabulce 2, která obsahuje limitní hodnoty průměrů inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro citlivé kmeny pneumokoků, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

ZÁVĚR

Z výsledků vyšetření u kmene 4 vyplývá, že laboratoře nemají problém s interpretací výsledků u kmenů, které jsou velmi dobře citlivé (nízká MIC penicilinu) nebo jednoznačně rezistentní (vysoká MIC ciprofloxacinu). MIC penicilinu u kmene 5 (0,25 mg/l) byla vyšší než je MIC u divoké populace pneumokoků ($\leq 0,063$ mg/l). Takové kmeny se zařazují do kategorie intermediární rezistence, která zahrnuje kmeny pneumokoků u nichž je MIC penicilinu 0,125 – 2 mg/l. Jen pokud by byl v protokolu uveden původ kmene pneumokoka z likvoru, bylo by možno interpretovat výsledek jako rezistentní, u původce pneumonie interpretace výsledku závisí na vyšší dávky penicilinu nebo amoxicilinu, který je pacientovi podáván. Původ kmene udán nebyl a kmen měl být správně označen jako intermediárně rezistentní k penicilinu. Respirační fluorochinolony jsou poměrně špatnými substráty pro vyšetření citlivosti pneumokoků *in vitro* a proto se používají náhradní vyšetření. Velmi spolehlivým vyhledáva-

Tabulka 1: VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ CITLIVOSTI KMENE 4 *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Antibiotikum	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)		Správné výsledky		
	limit pro citlivé pneumokoky		rozmezí hodnot naměřených v NRL*	limit pro citlivé pneumokoky [2]	hodnoty naměřené v NRL**	kategorie [1,2]	počet laboratoří	%
	[1,2]	[2]						
oxacilin	≥ 20	≥ 20	23 - 24	ND	NV	C	120/120	100,0
penicilin	ND	ND	NV	$\leq 0,063$	0,008 - 0,016			
norfloxacin	≥ 12	ND	6 - 6	ND	NV	R	120/120	100,0
ciprofloxacin	ND	ND	NV	$\leq 0,125$	> 16			

* 3 měření diskovou difuzní metodou, obsah disků oxacilin 1 µg, norfloxacin 10 µg;

** 3 měření diluční mikrometodou; C: citlivý, R: rezistentní; ND – neudáno; NV: nevyšetřeno.

Tabulka 2: VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ CITLIVOSTI KMENE 5 *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Antibiotikum	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)		Správné výsledky		
	limit pro citlivé pneumokoky		rozmezí hodnot naměřených v NRL*	limit pro citlivé pneumokoky [2]	hodnoty naměřené v NRL**	kategorie [1,2]	počet laboratoří	%
	[1,2]	[2]						
oxacilin	≥ 20	≥ 20	10 - 10	ND	NV	IR	52/120	43,0
penicilin	ND	ND	NV	$\leq 0,063$	0,25 - 0,25			
norfloxacin	≥ 12	ND	17 - 17	ND	NV	IR	NH	NH
ciprofloxacin	ND	ND	NV	$\leq 0,125$	0,5 - 0,5			

* 3 měření diskovou difuzní metodou, obsah disků oxacilin 1 µg, norfloxacin 10 µg;

** 3 měření diluční mikrometodou; IR: intermediárně rezistentní; ND: neudáno; NV: nevyšetřeno, NH: nehodnoceno

cím testem je disková difuzní metoda a následné vyšetření MIC ciprofloxacinu u kmenů, které mají průměr inhi-
biční zóny < 12 mm kolem disku s 10 mg norfloxacinu. Pneu-
mokoky jsou – s velmi vzácnými výjimkami – k ci-
profloxacinu inherentně intermediárně rezistentní, vyšet-
ření MIC tohoto antibiotika se používá k odhalení rezis-
tence k moxifloxacinu nebo levofloxacinu, která se před-
pokládá u kmenů s MIC ciprofloxacinu > 2 mg/l. Pro
velké množství chybných odpovědí nebyly výsledky
u kmene 5 hodnoceny.

LITERATURA

- [1] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. CLSI Document M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, Pa, 2010.
- [2] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1,1 April 2010; dostupné na http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/

*Kontakt: MUDr. Helena Žemličková, PhD.
Česká národní sbírka typových kultur
OML CLČ SZÚ
e-mail: hzemlickova@szu.cz*