

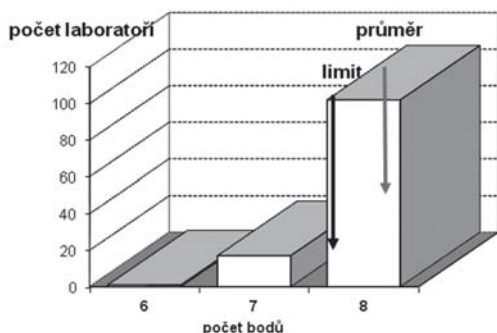
EHK – 774 Bakteriologická diagnostika

Renáta Kolínská, Petr Petráš, Pavla Urbášková

PŘÍPRAVA VZORKU

Kultury bakterií jsou před použitím rozmrazeny, lyofilizované kultury rehydratovány živným bujónem a poté naočkovány na živná média a inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C. U jednotlivých mikroorganismů byla ověřena identifikace (mikroskopie dle Grama, biochemická identifikace, příp. sérologická identifikace). Před lyofilizací je vizuálně ověřen růst a čistota kultury. Narostlé kultury mikroorganismů jednotlivých vzorků (1–5) jsou setřeny sterilním vatovým tamponem z povrchu agaru a resuspendovány ve 4 ml fyziologického roztoku tak, aby denzita výsledného zákalu odpovídala McFarlandově standardě 6. U vzorku 3 bylo připraveno ředění zákalu komenzálních bakterií 10^{-2} – středně obtížná izolace až 10^{-3} – obtížná izolace. Automatickou pipetou je napipetováno 0,7 ml vzniklé suspenze nebo požadovaného ředění do 70 ml lyofilního média. Suspenze je rozplněna v objemu přibližně 0,5 ml do skleněných lahvíček a po zmrazení vzorků provedena vlastní lyofilizace (SOP-NRL/CNCTC-03 a SOP-NRL/CNCTC-09). Lahvičky jsou skladovány v chladničce při teplotě 4 – 8 °C.

Graf 1: POČET BODŮ ZA SPRÁVNOU IDENTIFIKACI



HODNOCENÍ

Celkem byly rozeslány vzorky 120 laboratořím, všechny laboratoře odeslaly 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.

Maximálního počtu bodů při identifikaci dosáhlo 102, tj. 85 % laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,064 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $7,842 - (2 \times 0,389) = 7,064$). Tohoto limitu dosáhlo 102 laboratoří, 18 laboratoří tento limit nesplnilo.

VÝSLEDKY ZÚČASTNĚNÝCH LABORATOŘÍ

Vzorek 1: Výtěr z krku od pacienta s bolestí v krku a horečkou

Odpověď: *Streptococcus pyogenes*

Vzorek dále obsahoval: *Streptococcus mutans*,
Neisseria lactamica

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

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

Izolace a identifikace signifikantního patogena nečinila laboratořím obtíže. Všechny laboratoře správně identifikovaly jako původce onemocnění *Streptococcus pyogenes* a získaly po 2 bodech.

Vzorek 2: Izolát z hemokultury od pacienta z JIP			
Odpověď: <i>Enterococcus casseliflavus</i>			
Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	116	2	96,7%
<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	1	1	0,8%
<i>Enterococcus faecium</i>	2	1	1,7%
<i>Streptococcus faecalis</i>	1	0	0,8%
Celkem	120		100%

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

Většina laboratoří identifikovala správně druh mikroba a získala plný počet bodů. Dvě laboratoře kmen identifikovaly jako *Enterococcus faecium*. Tyto laboratoře obdržely pouze jeden bod, stejně jako laboratoř, která uvedla do výsledku identifikace dva druhy: *E. casseliflavus* a *E. gallinarum*. *E. casseliflavus* je na rozdíl od *E. faecium* pohyblivý; k rozlišení od rovněž pohyblivého druhu *E. gallinarum* slouží u *E. casseliflavus* spolehlivě produkce žlutého pigmentu, která je patrná zejména při prodloužené kultivaci (48 h). Laboratoř, která uvedla druh *Streptococcus faecalis*, nezískala žádný bod. Rod *Enterococcus* byl validně popsán již téměř před 30 lety (v roce 1984), a do tohoto rodu byly přeřazeny druhy *E.* (původně *Streptococcus*) *faecium* a *faecalis* [1] a následně v témže roce i *S. avium*, *S. casseliflavus*, *S. durans*, *S. malodoratus* a *S. gallinarum* [2].

LITERATURA

- [1] Schleifer KH, Kilpper-Balz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1984; 34: 31–34.
- [2] Collins M.D., Jones D., Farrow J.A.E., Kilpper-Balz R., Schleifer K.H. (1984): *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; *E. malodoratus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1984; 34: 220–223.

Vzorek 3: Stoličky od pacienta s vodnatým průjmem vzniklým po návratu z Thajska			
Odpověď: <i>Vibrio cholerae non O1/non O139</i>			
Vzorek dále obsahoval: <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>			

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Vibrio cholerae non O1/non O139</i>	11	2	9,2%
<i>Vibrio cholerae non O1</i>	42	2	35,0%
<i>Vibrio cholerae</i>	53	2	44,2%
<i>Vibrio cholerae O1</i>	1	1	0,8%

<i>Vibrio cholerae O1 El Tor</i>	1	1	0,8%
<i>Vibrio cholerae El Tor</i>	4	1	3,3%
<i>Vibrio sp.</i>	1	1	0,8%
<i>Vibrio albensis</i>	2	1	1,7%
<i>Vibrio cholerae bv. albensis</i>	3	1	2,5%
<i>Vibrio cholerae (Vibrio albensis)</i>	1	1	0,8%
<i>Vibrio cholerae (bv. albensis non O1)</i>	1	1	0,8%
Celkem	120		100%

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

Pravou epidemickou cholera vyvolávají kmeny *Vibrio cholerae* séroskupiny O1 (resp. sérotypu O139, který se vyskytuje pouze v zemích kolem Bengálského zálivu). Kmeny jiných sérotypů vyvolávají rovněž průjmová onemocnění, nikoliv epidemického charakteru. Mohou být snadno importována i do naší republiky. Charakteristickou indicií je vodnatý průjem po návratu z tropických oblastí. Je potřeba, aby laboratoře byly pro diagnostiku vibrií vybaveny. Ta je jednoduchá, vibria dobře roste na běžných neselektivních půdách pro střevní bakterie a k dispozici je i selektivní půda TCŽS (thiosíran-citrát-žluč-sacharóza). *V. cholerae* lze prokázat základními testy (oxidáza +, laktóza –, sirovodík –, glukóza + bez plynu; pozitivní string-test, gramnegativní jemně zahnuté tyčinky). Laboratoř by měla mít skupinové sérum O1 k identifikaci pravé epidemické cholery. Ke confirmaci se posílá každý kmen *V. cholerae*, jako vysoce rizikové agens, do SZÚ–CEM.

Ve vzorku 3 byl jako signifikantní patogen kmen *V. cholerae non O1/non O139*. Správně jej určilo 106 laboratoří (uznáváme i výsledek non O1, včetně odpovědi *Vibrio cholerae*).

Celkem 6 laboratoří se nesprávně domnívalo, že se jednalo o pravou cholera, tj. *V. cholerae O1* (El Tor je biovar séroskupiny O1).

U laboratoří, které nahlásily výsledek *V. albensis*, je zřejmé, že jsou vybaveny hmotnostním spektrometrem MALDI-TOF (Brucker Daltonic). *V. albensis* má velmi podobné spektrum jako *V. cholerae* a při diagnostice pomocí software IVD MALDI Biotyper vyjde výsledek *Vibrio albensis*. Je to ale z důvodu, že v databázi nejsou spektra vysoce rizikových agens zařazena. Teprve když se použije k identifikaci zvláštní databáze Security Relevant Library, vyjde identifikace *V. cholerae*.

Vibrio albensis (někdy se uvádí jako biovar *V. cholerae*) bylo popsáno již v roce 1894 a pojmenováno podle latinského názvu Labe. Jedná se o světelnou bakterii, která se nalézá v řekách, ale i ve stolici a v žluči. Byla popsána jako patogen pro morčata a holuby, ale není uváděna mezi patogeny pro člověka.

LITERATURA

- [1] Skerman VBD, McCowan V, Sneath PHA. Approved List of Bacterial Names. *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30(1): 225–420.
- [2] Hendrie MS, Hodkiss W, Shewan JM. The Identification,

Taxonomy and Classification of Luminous Bacteria. *Journ of General Microbiol* 1970; 64(1): 151–169.

livé kmeny platné pro *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus lugdunensis*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Vzorek 4: Izolát z krve od pacienta s podezřením na endokarditidu			
Odpověď: <i>Staphylococcus lugdunensis</i>			
Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	120	2	100%
Celkem	120		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 a vyšetřit jeho citlivost k oxacilinu a ke gentamicinu. Kmen 4 je *Staphylococcus lugdunensis*, rezistentní k oběma antibiotikům. EHK 774 se zúčastnilo 120 laboratoří, a všechny správně identifikovaly druh stafylokoka. Čtyři laboratoře chybně označily kmen jako citlivý k oxacilinu, rezistenci ke gentamicinu správně rozpoznaly všechny laboratoře. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 4 jsou v tabulce 1, která obsahuje limitní hodnoty průměrů inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro cit-

Vzorek 5: *Haemophilus influenzae*

Požadavek byl vyšetřit citlivost k ampicilinu a uvést, zda je kmen producent beta-laktamázy. Kmen 5 byl citlivý k ampicilinu a neprodukoval beta-laktamázu. Všechny 120 laboratoří uvedlo, že kmen beta-laktamázu neprodukuje, avšak jen 113 z nich zvolilo požadovanou správnou formu odpovědi na tuto otázku „NE“, jedna laboratoř odpověděla „neg“, další „negativní“, a pět laboratoří odpovědělo „není“. Kmen chybně jako rezistentní označilo pět laboratoří, dvě laboratoře uvedly místo požadované zkratky C zkratku S. Celkové výsledky vyšetření citlivosti jsou v tabulce 2, která obsahuje limitní hodnoty průměrů inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) ampicilinu pro citlivé kmeny hemofilů, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

ZÁVĚR

EHK–774 poskytlo poměrně uspokojivé výsledky externí kontroly kvality, které se zúčastnilo 120 laboratoří. Vzhle-

Tabulka 1: VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ CITLIVOSTI KMENE 4 STAPHYLOCOCCUS LUGDUNENSIS

Antibiotikum	Zdroj	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)		Správné výsledky		
		obsah disku µg	limit pro citlivé kmeny	rozmezí hodnot naměřených v NRL*	limit pro citlivé kmeny	rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie	počet laboratoří	%
cefoxitin	EUCAST [1]	30	≥ 22	18 - 20	ND	NT	R	116/120	96,7
	CLSI [2]								
oxacilin	EUCAST [1]	ND	ND	NT	≤ 2	8 - 8			
gentamicin	EUCAST [1]	10	≥ 22	10 - 12	≤ 1	16 - 16	R	120/120	100,0
	CLSI [2]		≥ 15		≤ 4				

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; ND: neudáno u oxacilinového disku pro nízkou spolehlivost, u cefoxitinu se u stafylokoků obecně nevyšetřuje; NT: nevyšetřeno; * 5 měření diskovou difúzní metodou, ** 5 měření diluční mikrometodou; R: rezistentní.

Tabulka 2: VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ CITLIVOSTI KMENE 5 HAEMOPHILUS INFLUENZAE

Antibiotikum	Zdroj	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)		Správné výsledky		
		obsah disku µg	limit pro citlivé kmeny	rozmezí hodnot naměřených v NRL*	limit pro citlivé kmeny	rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie	počet laboratoří	%
ampicilin	EUCAST [1]	2	≥ 16	22 - 23	≤ 1	0,19 - 0,19	C	115/120	95,8
	CLSI [2]	10	≥ 22	26 - 27					
Je kmen producent beta-laktamázy***?							NE****	120/120	100

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; * 5 měření diskovou difúzní metodou; ** 3 měření Etetem, *** nitrocefínová metoda; C: citlivý; **** viz komentář ke kmeni 5.

dem k různým odpovědím na kladené dotazy se však účastníci EHK vyzývají, aby pro usnadnění vyhodnocování své odpovědi uváděli **v požadované formě předeepsané na protokolu** (např. ANO, NE, C, R atd.). Breakpointy pro kategorizaci citlivosti a rezistence, které vydává a aktualizuje EUCAST [1], jsou evropským standardem pro klinické breakpointy používané pro hodnocení klinické účinnosti antibiotik evropskou institucí EMA (European Medicine Agency). Tyto dokumenty jsou postupně zaváděny do rutinní praxe mikrobiologických laboratoří v evropských i některých mimoevropských zemích (např. Austrálie, Kanada a další) místo doposud používaných breakpointů CLSI [2]. Jejich česká verze je na stránkách NRL pro antibiotika (<http://www.szu.cz/eucast-dokumenty>), a další dokumenty EUCAST v češtině, vztahující se k vyšetření citlivosti, budou zveřejňovány postupně. Aktualizovaná verze tabu-

lek klinických breakpointů 3.0 [1], rozšířená o klinické breakpointy antibiotik u dalších druhů bakterií, platí od ledna 2013.

LITERATURA

- [1] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.0, valid from 1. 1. 2013; dostupné na http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty two informational supplement. CLSI Document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, Pa, 2012.

*Renáta Kolínská
Petr Petráš
Pavla Urbášková
SZÚ - CEM*