

EHK – 843 Bakteriologická diagnostika

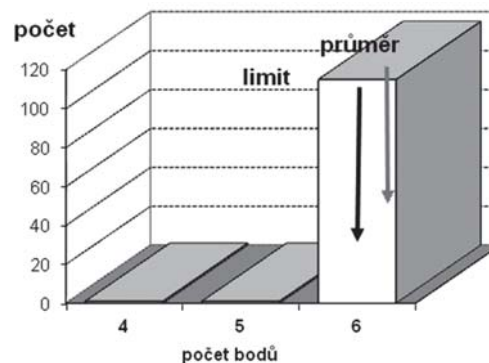
Renáta Kolínská, Daniela Dědičová, Petr Petráš, Pavla Urbášková

HODNOCENÍ

Celkem byly vzorky rozeslány 117 laboratořím, všechny laboratoře odeslaly výsledek do závěrečného termínu. Za identifikaci signifikantního patogena ve 3 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 6 bodů (vzorek 1 byl edukativní); za vyšetření citlivosti mohly laboratoře obdržet celkem 4 body (vzorek 4 a 5). Hodnocení vyšetření citlivosti je pouze orientační a toto bodové ohodnocení se nezapočítává do limitu nutného pro úspěšné absolvování série EHK. Bodování pro identifikaci bylo provedeno ve stupnici 2, 1, 0 a –1 bodů.

Maximálního počtu bodů při identifikaci dosáhlo 115, tj. 98,3% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 5,562 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $5,974 - (2 \times 0,206) = 5,562$). Tohoto limitu dosáhlo 115 laboratoří, 2 laboratoře tento limit nesplnily.

Graf 1: POČET BODŮ ZA SPRÁVNOU IDENTIFIKACI



VÝSLEDKY ZÚČASTNĚNÝCH LABORATOŘÍ

Vzorek 1: Edukativní vzorek
Odpověď: <i>Staphylococcus petrasii</i>

Staphylococcus petrasii je dalším „českým“ stafylokokem, který byl popsán kolegy z brněnské sbírky CCM a z Ústavu experimentální biologie PřF MU. Jedná se o typického koagulázanegativního stafylokokoka (KNS), který může být zachycen v humánním klinickém materiálu. Podobně jako jiné KNS je podmíněným patogenem, tj. může vyvolat u oslabených jedinců infekci. Svědčí o tom dosaďadní nálezy: často se jednalo o kmeny z hemokultur a ze zhnisaných ran. Obvykle byly pacienti starší osoby, nebo naopak malé děti. K původním 9 kmenům z českých nemocnic se přidaly 4 kmeny, které byly izolovány z otitid v americkém Texasu. Podrobná genotypová a fenotypová analýza rozdělila kmeny do dvou poddruhů. České kmeny byly pojmenovány *S. petrasii* subsp. *petrasii*, americké *S. petrasii* subsp. *croceilyticus*.

Biochemické vlastnosti mají kmeny *S. petrasii* nejbližší k druhu *S. warneri*, od kterého jdou dobře oddělit pozitivním PYRtestem. Snadno lze diferencovat i oba poddruhy: kmeny subsp. *petrasii* mají negativní GLRtest a okyselují manózu, kmeny poddruhu *croceilyticus* mají GLRtest pozitivní a manózu neokyselují. U kmenů subsp. *petrasii* je důležitou vlastností možná pozitivní reakce s latexovými testy 3. generace na clumping faktor, nejvýraznější se setem Pastorex Staph Plus. Kmeny *S. petrasii* je možné zachytit i pomocí hmotnostní spektrometrie, přístrojem Microflex LT (Bruker Daltonics). Při použití software Maldi Biotyper (DB-5627) vyjde identifikace jako *Staphylococcus* sp.(1).

V současnosti má NRL pro stafylokoky ve sbírce potvrzených 49 kmenů druhu *S. petrasii* (nejvíce ze Strakonice: 11), takže se zřejmě nejedná o vzácný druh KNS. Do EHK byl zařazen typový kmen *S. petrasii* subsp. *petrasii* (CCM 8418^T = CNCTC 7436^T), který byl původně izolo-

ván v prosinci 2009 z hemokultury 59letého muže v Oblastní nemocnici Trutnov.

LITERATURA

- [1] Pantůček R, Švec P, Dajcs JJ, et al. *Staphylococcus petrasii* sp. nov. including *S. petrasii* subsp. *petrasii* subsp. nov. and *S. petrasii* subsp. *croceilyticus* subsp. nov., isolated from human clinical specimens and human ear infections. *Syst Appl Microbiol* 2013; 36(2): 90–95.
- [2] Pantůček R, Sedláček I, Švec P, et al. *Staphylococcus petrasii*, nový druh stafylokokoka z České republiky. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2013; 22(8): 266–269.

Vzorek 2: Sputum od 50letého pacienta – etylika s progredující respirační insuficiencí
Odpověď: <i>Legionella pneumophila</i>
Vzorek dále obsahoval: <i>Streptococcus mutans</i>

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Legionella pneumophila</i>	106	2	90,6 %
<i>Legionella</i> sp	10	2	8,6 %
patogen nenalezen	1	0	0,8 %
Celkem	117		100 %

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

Plného počtu bodů dosáhlo 99,2 % všech laboratoří, pouze jedna laboratoř patogena nevykultivovala. Druhá identifikace legionel bývá obtížná, proto byla postačující identifikace do rodu. Pro bližší identifikaci (i pro epidemiologické došetření případné legionelózy) je vhodné zaslat kmen do NRL pro legionely.

Vzorek 3: Stoolice pacienta s průměrem a bolestmi břicha
Odpověď: <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérovar Enteritidis
Vzorek dále obsahoval: <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Salmonella</i> Enteritidis	114	2	97,4 %
<i>Salmonella</i> Enteritidis 1,9,12:g,m:-	1	2	0,8 %
<i>Salmonella</i> Enteritidis 9,12:g,m:-	1	2	0,8 %
<i>Salmonella enterica</i>	1	1	0,8 %
Celkem	117		100 %

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

Salmonella Enteritidis 9,12:g,m:- je jednoznačně nejčastěji identifikovaným sérovarem v populaci ČR (v roce 2013 v 85 % hlášených případů salmonelózy), s čitelnou, jednoduchou antigenní strukturou. Pouze jediná laboratoř identifikovala kmen jako *Salmonella enterica*, přičemž není jasné, zda se jedná o název druhu či poddruhu. Zdůrazňujeme, že je nutné uvádět oficiální název podle K-W schématu, tj. název včetně dourčené antigenní struktury (buď v oficiální - 1,9,12:g,m:-, nebo v reálné formě - 9,12:g,m). V letech 1999 až 2010 proběhly 4 okruhy zaměřené na tento sérovar a celkem jen dvě laboratoře nedosáhly plného bodového ohodnocení. Obdobné zkušenosti jsou u sérovarů na několika dalších místech v pořadí frekvence, kde v průběhu let dochází jen k malým změnám. Antigenní vzorec testovacích kmenů je proto snadno předvídatelný, postupně se ztrácí edukativní význam a charakter EHK se stává formálním.

Takový přístup k provádění EHK není žádoucí. Neprospěl by ani menším laboratořím, kterým by byla odepřena možnost rozšířit si zkušenosti s typizací v dané lokalitě méně frekventovaných sérovarů, ani určité části klinických laboratoří s bohatou zkušeností v typizaci salmonel. Tyto laboratoře hlásí data prostřednictvím epidemiologů do EPI-DATu, přičemž není legislativně vyžadována konfirmace

v NRL, a to ani u vzácně či poprvé se vyskytujících sérovarů. Vzhledem k tomu, že zmíněná data jsou předmětem hlášení do evropských systémů, měla by mít odborná pracoviště možnost si prostřednictvím EHK průběžně ověřovat kvalitu činnosti a správnost interpretace svých výsledků.

Technická i odborná úroveň klinických laboratoří v ČR neustále stoupá a tato problematika bude jistě i v budoucnu vděčným tématem k diskusi. Jejím výsledkem by měl být konsenzus v otázkách rozsahu EHK a harmonizace s požadavky NSVP (Národní standardní vyšetřovací postupy). Za účelnější z hlediska efektivity nákladů při výběru anti-sér vidíme jako řešení stanovení konkrétních antigenních komplexů odpovídajících nejfrekventovanějším sérovarům.

Vzorek 4: Izolát z hnisu od pacienta s ulcerací na dolní končetině
Odpověď: <i>Corynebacterium</i> spp. (<i>C. striatum</i>)

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Corynebacterium striatum</i>	60	2	51,3 %
<i>Corynebacterium</i> spp.	57	2	48,7 %
Celkem	117		100 %

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

Požadavek byl identifikovat rod zaslaného kmene a zjistit jeho citlivost k penicilinu a k vankomycinu. Kmen 4 *Corynebacterium striatum* je rezistentní k penicilinu a citlivý k vankomycinu. Všechny laboratoře identifikovaly kmen 4 správně, více než polovina laboratoří uvedla i druhový název. Rezistenci k penicilinu potvrdilo 115 laboratoří, dvě kmeny označily jako citlivé. Citlivost k vankomycinu uvedlo správně 115 laboratoří, jedna označila kmen jako rezistentní a výsledek jedné laboratoře nebylo možno hodnotit, neboť místo vyžadovaných zkratk (R, resp. C) uvedla písmeno V. Celkové výsledky vyšetření citlivosti u kmene 4 jsou v tabulce 1, která obsahuje limitní hodnoty průměrných inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro citlivé kmene korynebakterií, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 1: VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ CITLIVOSTI KMENE 4 *CORYNEBACTERIUM STRIATUM*

Antibiotikum	Zdroj	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)		Správné výsledky		
		obsah disku	limit pro citlivé kmene	rozmezí hodnot naměřených v NRL*	limit pro citlivé kmene	rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie	počet laboratoří	%
penicilin	EUCAST [1]	1 J	≥ 29	6 - 6	≤ 0,12	1 - 1	R	115/117	98,3
	CLSI [2]	ND			≤ 1				
vankomycin	EUCAST [1]	30 µg	≥ 17	17 - 18	≤ 2	0,5 - 0,5	C	115/117	98,3
	CLSI [2]	ND			≤ 4				

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; * 5 měření diskovou difúzní metodou; ** 5 měření diluční mikrometodou; ND: neudáno; C: citlivý; R: rezistentní.

Tabulka 2: VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ CITLIVOSTI KMENE 5 *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Antibiotikum	Zdroj	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)		Správné výsledky		
		obsah disku	limit pro citlivé kmeny	rozmezí hodnot naměřených v NRL*	limit pro citlivé kmeny	rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie	počet laboratoří	%
erytromycin	EUCAST [1]	15 µg	≥ 25	25 - 25	≤ 1	0,12 - 0,2	C	117/117	100,0
	CLSI [2]	ND							
kotrimoxazol	EUCAST [1]	25 µg	≥ 29	31 - 32	≤ 0,06***	≤ 0,032***	C	115/117	98,3
	CLSI [2]	ND			≤ 0,5***				

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; * 5 měření diskovou difuzní metodou; ** 5 měření diluční mikrometodou; ND: neudáno; C: citlivý.
*** MIC kotrimoxazolu je vztažena na trimetoprim; při vztažení na sulfamethoxazol by byla MIC ≤ 0,5 mg/l.

Vzorek 5: *Listeria monocytogenes*

Požadavek byl vyšetřit citlivost k erytromycinu a kotrimoxazolu. Kmen 5 byl k oběma antibiotikům citlivý. Citlivost k erytromycinu potvrdily všechny laboratoře, dvě chybovaly u kotrimoxazolu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti u kmene 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje limitní hodnoty průměrů inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro citlivé kmeny listerií, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Závěr

Kmen 5 *Listeria monocytogenes* byl poslán již v roce 2013 jako součást EHK–798, v němž 9 laboratoří chybovalo při hodnocení citlivosti ke kotrimoxazolu (7,6 %). V této sérii EHK–843 všechny laboratoře s výjimkou dvou správně vyšetřily citlivost ke kotrimoxazolu u *Listeria monocytogenes* a dosáhly velmi dobré výsledky i při hodnocení citlivosti kmenů 4 a 5 i k dalším antibiotikům.

LITERATURA

- [1] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, valid from 2014-01-01. Dostupné na http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/breakpoints/, český překlad tohoto dokumentu je na: <http://www.szu.cz/eucast-dokumenty?highlightWords=dokumenty+EUCAST>
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline. CLSI Document M45-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, Pa, 2006.

Zprávu vypracovali:

Mgr. Renáta Kolínská
MUDr. Daniela Dědičová, CSc.
RNDr. Petr Petráš, CSc.
RNDr. Pavla Urbášková, CSc.
Oddělení bakteriální rezistence
a alimentárních bakteriálních nákaz, SZÚ-CEM