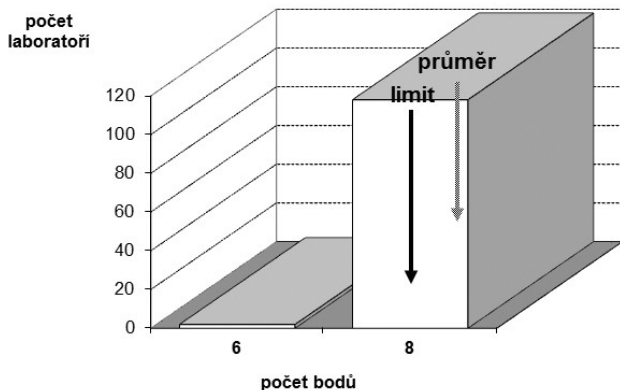


Renáta Šafránková, Petra Klimešová, Helena Žemličková

HODNOCENÍ

Celkem byly vzorky rozeslány 120 laboratořím, všechny laboratoře odeslaly výsledek do závěrečného termínu. Za identifikaci signifikantního patogena ve 4 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 8 bodů. Bodování pro identifikaci bylo provedeno ve stupnici 2, 1 a 0 bodů. Hodnocení (resp. bodování) vyšetření citlivosti, které bylo v předchozích sériích pouze orientační, se z technických důvodů již neprovádí (přechod na elektronické výsledky), k dispozici budou pouze komentované výsledky (vzorek 4 a 5).

Graf 1: Počet bodů za správnou identifikaci



Maximálního počtu bodů při identifikaci dosáhlo 118, tj. 98,3% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl

7,453 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $7,967 - (2 \times 0,257) = 7,453$). Tohoto limitu dosáhlo 118 laboratoří, 2 laboratoře tento limit nesplnily.

VÝSLEDKY ZÚČASTNĚNÝCH LABORATOŘÍ

VZOREK 1: Izolát z krve od pacientky s urosepsí

ODPOVĚĎ: *Klebsiella oxytoca*

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Klebsiella oxytoca</i>	119	2	99,2 %
<i>Klebsiella pneumoniae</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.

Všechny zúčastněné laboratoře s výjimkou jedné identifikovaly signifikantního patogena správně a získaly po 2 bodech.

VZOREK 2: Sputum HIV pozitivního pacienta s kašlem a horečkou

ODPOVĚĎ: *Rhodococcus equi*

Vzorek dále obsahoval: *Streptococcus oralis*

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Rhodococcus equi</i>	119	2	99,2 %
<i>Rhodococcus equi</i> + <i>Streptococcus oralis</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.

Plného počtu bodů dosáhlo 99,2% všech laboratoří, jedna laboratoř připsala do výsledku identifikace komenzální bakterii a získala pouze bod.

Dle aktuální taxonomie je od roku 2014 validní jméno *Rhodococcus hoagii* a jméno *R. equi* zůstává jako synonymum [1].

LITERATURA

- Kämpfer P., Dott W., Martin K., Glaeser SP. *Rhodococcus defluvii* sp. nov., isolated from wastewater of a bioreactor and formal proposal to reclassify [*Corynebacterium hoagii*] and *Rhodococcus equi* as *Rhodococcus hoagii* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014; 64: 755-761.

VZOREK 3: Stoolice od 40letého pacienta s průjmem, křečemi v břiše a horečkou
ODPOVĚĎ: *Shigella sonnei*
Vzorek dále obsahoval: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Shigella sonnei</i>	118	2	98,3 %
<i>Shigella sonnei</i> + <i>Escherichia coli</i>	2	1	1,7 %
Celkem	120		100 %

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

Bakterie rodu *Shigella* jsou původci bacilární úplavice. Jedná se o striktně humánní patogeny s typicky nízkou infekční dávkou (již 10-100 bakterií). Přenos se děje fekálně-orální cestou (vzhledem k nízké infekční dávce často kontaminovanými rukama), v rozvojových zemích je významnou cestou přenosu kontaminovaná voda. V rozvinutých zemích je nejčastěji izolována *Shigella sonnei* (70-84 % infekcí), zatímco *S. flexneri*, *S. boydii* a *S. dysenteriae* jsou vzácné a většinou importované [1].

Shigella sonnei se při růstu na pevných půdách obvykle vyskytuje v koloniích dvojí morfologie – plazivých s vlnitým okrajem (R fáze) a malých vypouklých (S fáze), vyskytuje se tedy ve dvou fázích. Pro shigely je typická inaktivní

biochemie (negativní lysin, arginin, laktóza, produkce plynu) a nepohyblivost. U *S. sonnei* oproti ostatním shigelám většinou odečítáme pozitivní ornitin, β galaktosidázu, maltózu a často i rhamnózu (u 75 % kmenů).

Základní rozdíl mezi shigelami a většinou kmenů *E. coli* je schopnost intracelulární invaze, přežívání a množení shigel dané především virulencím plazmidem pINV. Ten se ale vyskytuje i u tzv. enteroinvazivních *E. coli*, které, na rozdíl od ostatních kmenů *E. coli*, mají též schopnost intracelulární invaze a sdílejí se shigelami také nepohyblivost a inaktivní biochemii. Tato podobnost odráží fakt, že ačkoli pro klinické a epidemiologické účely rozlišujeme *E. coli* a jednotlivé shigely, z hlediska taxonomického se vlastně jedná o jeden druh, *Escherichia coli* [2].

Celkem 118 laboratoří (tj. 98,3 %) správně určilo jako patogena *S. sonnei*. Dvě laboratoře uvedly *S. sonnei* společně s *E. coli*, za což jim byl odebrán jeden bod.

LITERATURA

- Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G, Pfaller MA, Landry ML, Richter SS, Warnock DW. Manual of clinical microbiology 11th Edition. ASM press, Washington, DC 2015.
- Sedláček I. *Escherichia* a *Shigella* – pro klinickou bakteriologii dva dlouho známé rody, přesto taxonomicky stále problematické. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2011; 20(3): 100-103.

VZOREK 4: Izolát ze sputa od pacienta s akutní exacerbací chronické obstrukční bronchopulmonální nemoci
ODPOVĚĎ: *Streptococcus pneumoniae*

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Streptococcus pneumoniae</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 určit signifikantního patogena izolovaného ze sputa a vyšetřit jeho citlivost k penicilinu a cefotaximu. Kmen je rezistentní k penicilinu a citlivý, zvýšená expozice k cefotaximu.

Celkové výsledky vyšetření citlivosti kmene ze vzorku 4 jsou v tabulce 1, která obsahuje breakpointy minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro citlivé a rezistentní izoláty

Tabulka 1: Výsledky vyšetření citlivosti kmene 4 *Streptococcus pneumoniae* ze sputa od pacienta s akutní exacerbací chronické obstrukční bronchopulmonální nemoci podle metody a breakpointů EUCAST [1].

Antibiotikum	MIC (mg/l)			Výsledek			
	Breakpoint*		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie/abs. počet laboratoří			
	C ≤	> R		C	I	R	ND
penicilin***	0,06	2	4-8	4 (3,3)	84 (70)	32 (26,7)	0
cefotaxim	0,5	2	2-2	8 (6,7)	100 (83,3)	10 (8,3)	2 (1,7)

MIC: minimální inhibiční koncentrace; *breakpoint pro indikace jiné než meningitida; ** 5 měření bujónovou diluční mikrometodou EUCAST; *** pro skriningové vyšetření citlivosti k betalaktamům použit disk s oxacilinem (1 μ g disk); C: citlivý; I: Citlivý, zvýšená expozice; R: rezistentní; ND: neudáno; správné výsledky jsou šedě zvýrazněny.*** výsledky vztaheny na trimetoprim; ND: neudáno; NH: nehodnoceno; C: citlivost; R: rezistence; správné výsledky jsou šedě zvýrazněny.

Tabulka 2: Výsledky vyšetření citlivosti kmene 5 *Streptococcus pneumoniae* podle metody a breakpointů EUCAST [1].

Antibiotikum	MIC (mg/l)			Výsledky			
	Breakpoint*		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie/abs. počet laboratoří			
	C ≤	> R		C	I	R	ND
penicilin***	0,06	2	0,25–0,25	9 (7,5)	98 (81,7)	3 (2,5)	10 (8,3)
cefotaxim	0,5	2	0,125–0,125	117 (97,5)	0	0	3 (2,5)

MIC: minimální inhibiční koncentrace; *breakpoint pro indikace jiné než meningitida; ** 5 měření bujónovou diluční mikrometodou EUCAST; *** pro skriningové vyšetření citlivosti k betalaktamům použit disk s oxacilinem (1 µg disk); C: citlivý; I: Citlivý, zvýšená expozice, R: rezistentní, ND: neudáno; správné výsledky jsou šedě zvýrazněny.

S. pneumoniae, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří. Správné výsledky jsou označeny šedou barvou

VZOREK 5: *Streptococcus pneumoniae*

Kmen 5 je citlivý, zvýšená expozice k penicilinu a citlivý k cefotaximu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti u kmene 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy MIC pro citlivé a rezistentní izoláty *S. pneumoniae*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří. Správné výsledky jsou označeny šedou barvou.

ZÁVĚR

Breakpointy EUCAST pro benzylpenicilin u *S. pneumoniae* jsou C ≤ 0,06 mg/l; R > 2 mg/l pro indikace jiné než meningitida. Kmeny, které mají pozitivní skriningový test na rezistenci vůči betalaktamům (diskový difúzní test za použití 1 µg disku s oxacilinem) mají hodnoty MIC benzylpenicilinu nad 0,06 mg/l a jsou kategorizovány buď „citlivé, zvýšená expozice“, v tomto případě mohou být pacienti léčeni benzylpenicilinem, pokud je dávkování upraveno podle MIC (viz breakpointy EUCAST) nebo rezistentní (MIC > 2 mg/l), kdy nelze benzylpenicilin v terapii použít. S ohledem na správné dávkování a vlastní použití penicilinu v terapii pneumokokových infekcí musí být laboratoře schopny provést správné stanovení MIC penicilinu.

U penicilin-rezistentního pneumokoka (vzorek 4) označilo správně kmen jako rezistentní pouze 26,7 % laboratoří, u vzorku č. 5 uvedlo správný výsledek 81,7 % laboratoří. Chybný výsledek byl zapříčiněn zejména nesprávným výsledkem testování MIC, některé laboratoře ovšem chybovaly i v interpretaci výsledku vyšetření, (kategorie C je vyhrazena pouze pro kmeny s MIC ≤ 0,06 mg/l; hodnoty v rozmezí 0,125–2 mg/l jsou v indikacích jiných než meningitida označovány jako I, tj. citlivý, zvýšená expozice).

Celkem 105 laboratoří uvedlo hodnotu MIC penicilinu u obou vzorků. U hodnot naměřených gradientovým testem, které se pohybují mimo klasickou geometrickou řadu, je třeba výsledek vždy zaokrouhlit směrem k nejbližší hodnotě MIC (tedy např. hodnota MIC 1,5 mg/l bude uváděna jako 2 mg/l). U vzorku č. 4 se rozmezí MIC penicilinu pohybovalo od 0,5–8 mg/l, nadpoloviční většina laboratoří naměřila MIC o řád (MIC 2 mg/l; 56 laboratoří; 53,3 %)

až dva nižší (MIC 1 mg/l; 23 laboratoří; 21,9 %), než byla hodnota zjištěná v NRL pro ATB (4–8 mg/l). U vzorku č. 5 byly naměřené hodnoty v rozmezí 0,125–2 mg/l. Ve srovnání se vzorkem č. 4 byl rozptyl hodnot MIC nižší, pouze 2 laboratoře uvedly hodnotu MIC vyšší o dvě ředění, než byla hodnota zjištěná v NRL pro ATB (0,25 mg/l). Většina (102) laboratoří také uvedla použitou metodu testování, 80 laboratoří i výrobce testu. Laboratoře nejvíce použily gradientový test (BioMérieux [30], Liofilchem [22], Oxoid CZ/Thermo Fisher Scientific [13]), dále pak automatizovaný systém Vitek (11) a bujónovou mikrodiluční metodu (4). Zatímco při použití standardní diluční metody byla u vzorku 4 shoda testování nejvyšší (50 %), u ostatních metod byla shoda nižší (Vitek – 27,3 %; gradientové testy – 20,7 %).

Opakované problémy s výsledky stanovení citlivosti pneumokoků v externím hodnocení kvality v rámci EARS-Net byly podkladem pro ověření přesnosti stanovení MIC pomocí gradientových testů, které se k vyšetření MIC penicilinu u pneumokoků nejvíce používají. Testování probíhalo ve vývojové laboratoři EUCAST, jeho výsledky jsou dostupné na webových stránkách EUCAST. Výsledky testování dvou výrobků (BioMérieux, Liofilchem) prokázaly opakovanou neshodu ve vyšetření MIC, směrem ke stanovení nižších hodnot v řádu až dvou ředění v porovnání se standardní bujónovou diluční metodou, hodnoty byly rovněž ovlivněny použitými kultivačními médii. Výsledky EHK-1100 ukazují, že problém činí zejména průkaz vyšších MIC penicilinu. Je vhodné, aby laboratoře, které používají pro stanovení MIC k penicilinu gradientové testy, konfirmovaly hodnotu MIC standardní bujónovou mikrodiluční metodou.

LITERATURA

1. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019-01-01. Dostupné na: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/; český překlad <http://www.szu.cz/eucast-dokumenty>
2. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Warning against the use of gradient tests for benzylpenicillin MIC in *Streptococcus pneumoniae*. 21st of November 2019. Dostupné na: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Warnings/Warnings_docs/Warning_-_gradient_for_benzyl_and_pnc_21nov2019.pdf

Zprávu vypracovaly:
 Mgr. Renáta Šafránková, Mgr. Petra Klimešová,
 doc. MUDr. Helena Žemličková, PhD.