

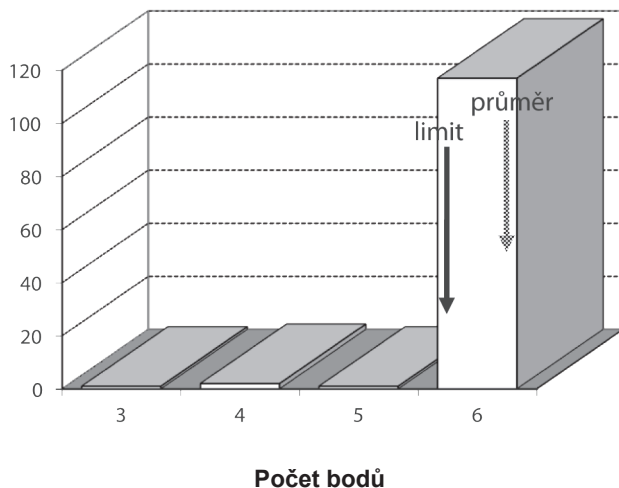
**Renáta Šafránková, Petr Petráš, Pavla Urbášková**

### **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 35 °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 McFarlandovu standardu 6.

**Graf 1: Počet bodů za správnou identifikaci**

**Počet laboratoří**



U vzorku 3 bylo připraveno ředění zákalu komezálních 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-01 a SOP-NRL/CNCTC-09). Lahvičky jsou skladovány v chladničce při teplotě 4–8 °C.

### **HODNOCENÍ**

Celkem byly vzorky rozeslány 121 laboratořím, všechny laboratoře odeslaly výsledek do závěrečného termínu. Za identifikaci signifikantního patogena ve 3 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 6 bodů, jeden vzorek byl edukativní. Bodování pro identifikaci bylo provedeno ve stupnici 2, 1 a 0 bodů. Hodnocení (resp. bodování) vyšetření citlivosti se z technických důvodů již neprovádí (přechod na elektronické výsledky), k dispozici jsou komentované výsledky (vzorek 4 a 5).

Maximálního počtu bodů při identifikaci dosáhlo 117, tj. 96,7% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 5,17 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj.  $5,934 - (2 \times 0,382) = 5,17$ ). Tohoto limitu dosáhlo 117 laboratoří, 4 laboratoře tento limit nesplynily.

### **VÝSLEDKY ZÚČASTNĚNÝCH LABORATOŘÍ**

**VZOREK 1:** Výtěr z krku od pacienta s bolestí v krku a horečkou.

Odpověď: ***Streptococcus* sk. G (β hemolytický) / *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis***

Vzorek dále obsahoval: *Streptococcus oralis*, *Neisseria lactamica*

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Streptococcus</i> sk. G	72	2	59,5 %
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	47	2	38,8 %
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	1	0,8 %
<i>Streptococcus</i> spp.	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.

Většina laboratoří v této sérii vyhověla zadání a získala po 2 bodech. Laboratoře, které označily jako patogena *S. pyogenes* (sk. A), resp. nepřiradily správné druhové jméno ani skupinu, získaly pouze po jednom bodu.

Vzorek 2: Edukativní vzorek (vzorek se nehodnotí) Izolát ze sputa 75letého muže s akutním respiračním selháním
Odpověď: <b><i>Staphylococcus argenteus</i></b>

identifikace	frekvence	procenta
<i>Staphylococcus argenteus</i>	84	69,4 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	27	22,3 %
<i>Staphylococcus intermedius</i>	1	0,8 %
<i>Staphylococcus</i> spp.	8	6,6 %
žádný výsledek	1	0,8 %
Celkem	121	100 %

*Staphylococcus argenteus* je koaguláza pozitivní stafylokok, který je považován za „emerging“ původce vážných lidských infekcí. Může být vybaven stejnými faktory virulence, jako kmeny *S. aureus*. Byl popsán v r. 2015 v Austrálii, kde vyvolal onemocnění u domorodých obyvatel, Aboriginců [1]. Charakteristickou vlastností kmenů tohoto druhu je, že neprodukuje karotenoidní pigment, který je zodpovědný za barvu typických kolonií *S. aureus*. (Proto i název *argenteus* = stříbrný.) V literatuře existuje řada publikací, kde je uveden jako příčina onemocnění, včetně pneumonií vyvolaných Pantonovým-Valentinovým leukocidinem [2], nebo stafylokokových enterotoxikóz [3]. I v naší republice bylo již několik kmenů prokázáno [4,5]. Výsledky prakticky všech diskriminujících testů jsou shodné s druhem *S. aureus*: kmeny produkují volnou i vázanou (clumping-faktor) koagulázu, hyaluronidázu, termorezistentní nukleázu, takže fenotypově je nelze od *S. aureus* odlišit. Kmeny *S. argenteus* lze dobře identifikovat MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií.

#### LITERATURA

- 1) Tong SY, Schaumburg F, Ellington MJ, et al. Novel staphylococcal species that form part of a *Staphylococcus aureus*-related complex: the non-pigmented *Staphylococcus argenteus* sp. nov. and the non-human primate-associated *Staphylococcus schweitzeri* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015; 65(Pt1):15–22.

- 2) Dupieux C, Blonde R, Bouchiat C, et al. Community-acquired infections due to *Staphylococcus argenteus* lineage isolates harbouring the Panton-Valentine leucocidin, France. 2014. *Eurosurveillance.* 2015; 20: 6–8.
- 3) Suzuki Y, Kubota H, Ono HK, et al. Food poisoning outbreak in Tokyo, Japan caused by *Staphylococcus argenteus*. *Int J Food Microbiol.* 2017; 262: 31–37.
- 4) Petráš P, Kekláková J, Hutníková R. *Staphylococcus argenteus* – nový druh koaguláza pozitivního stafylokoka. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha).* 2019; 28(7): 262–263.
- 5) Kukla R, Neradová K, Petráš P, Kekláková J, Ryšková L, Žemličková H. První potvrzený záchyt kmene *Staphylococcus argenteus* v České republice. *EMI.* 2020; 69(1): 48–52.

VZOREK 3: Stolica od 40letého pacienta s akutním průjmem vzniklým po požití kuřecího masa
Odpověď: <b><i>Campylobacter jejuni</i></b> Vzorek dále obsahoval: <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Campylobacter jejuni</i>	110	2	90,9 %
<i>Campylobacter</i> spp.	8	2	6,6 %
(signifikantní) patogen nenalezen	3	0	2,5 %
Celkem	121		100 %

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

Signifikantního patogena správně určilo 118 laboratoří, což je 97,5 %. K získání plného počtu bodů postačovalo rodové jméno. Biochemické testy na určení *C. jejuni* nejsou spolehlivé, např. test hydrolyzy hippurátu, který se používá na rozlišení *C. jejuni* a *C. coli*, může někdy poskytovat falešně negativní výsledky (některé kmeny *C. jejuni* hippurát nehydrolyzují). Spolehlivé rozlišení obou druhů poskytuje pouze PCR a metoda MALDI-TOF MS, založená na analýze hmotových spekter druhově specifických proteinů [1].

#### LITERATURA

- 1) Kolínská R, Dřevínek M, Jakubů V, Žemličková H: Species identification of *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* and *C. coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and PCR. *Folia Microbiol.* 2008; 53: 403-411.

VZOREK 4: Izolát z krve pacienta se sepsí, dlouhodobě hospitalizovaného pro pneumokoniózu uhlokopů
Odpověď: <b><i>Enterobacter cloacae</i></b>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Enterobacter cloacae</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 určit signifikantního patogena a vyšetřit jeho citlivost k cefotaximu a k meropenemu. Všechny

Tabulka 1: Výsledky vyšetření citlivostí<sup>1</sup> kmene 4 *Enterobacter cloacae*.

Antibiotikum	Obsah disku µg	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky			
		breakpoint <sup>2</sup>		rozmezí hodnot naměřených v NRL <sup>*</sup>	breakpoint <sup>2</sup>		rozmezí hodnot naměřených v NRL <sup>**</sup>	kategorie <sup>3</sup> / absolutní počet laboratoří <sup>4</sup>			správné
		C	R		C	R		C	I	R	%
cefotaxim	5 µg	≥ 20	< 17	6–6	≤ 1	> 2	> 4–> 4	0	0	121	100,0
meropenem	10 µg	≥ 22	< 16	19–20	≤ 2	> 8	2–4	7	7	107	5,8

<sup>1</sup> metoda vyšetření a interpretace výsledků podle EUCAST 2020 [1]; <sup>2</sup> hodnoty mezi breakpointy pro kategorie C a R jsou hodnoty pro kategorii I (citlivý při zvýšené expozici); <sup>3</sup> kategorie C: citlivý při standardním dávkování, I: citlivý při zvýšené expozici; R: rezistentní i při zvýšené expozici; <sup>4</sup> správné výsledky jsou zvýrazněny; IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; \* 5 měření diskovou difuzní metodou, \*\* 5 měření diluční mikrometodou

zúčastněné laboratoře správně identifikovaly kmen 4 jako *Enterobacter cloacae*.

Kmen je i při zvýšené expozici rezistentní (R) k cefotaximu a při zvýšené expozici citlivý (I) k meropenemu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti kmene ze vzorku 4 jsou v tabulce 1, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro *Enterobacteriales*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

**VZOREK 5: *Proteus mirabilis***

Kmen 5 je citlivý (C) při standardním dávkování k meropenemu a k ciprofloxacinu je rezistentní (R) i při zvýšené expozici. Všechny laboratoře udaly správné výsledky u ciprofloxacinu, u meropenemu chybovala 1 laboratoř.

Celkové výsledky vyšetření citlivosti u kmene 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a MIC meropenemu a ciprofloxacinu pro *Enterobacteriales*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

**ZÁVĚR**

Správné výsledky interpretace kategorie klinické citlivosti k meropenemu u kmene 4 *Enterobacter cloacae* uvedlo pouze 7 ze 121 laboratoří. Pokud laboratoře vyšetřovaly citlivost diluční metodou, pak příčinou mohl být výsledek MIC v citlivé kategorii. Diskrepance mezi výsledky vyšetření MIC a difuzní diskové metody jsou časté u kmenů s citlivostí k meropenemu sníženou v důsledku produkce karbapenemázy, přičemž disková difuzní metoda se pro rutinní záchyt takových kmenů jeví jako dostatečně robustní [2].

Otázka EHK–1143 se týkala vyšetření (fenotypové) citlivosti kmene 4 k meropenemu rutinními metodami, nikoli vyšetření mechanismu rezistence. Není-li jiná volba a při respektování lokální epidemiologické situace může sloužit výsledek vyšetření citlivosti v kategorii C nebo I jako podklad k léčebnému použití daného antibiotika bez ohledu na to, zda je původce infekce producentem destruuujícího enzymu, neboť některé mechanismy rezistence neudělují vždy rezistenci fenotypu, a detekce širokospektrých β-laktamáz a karbapenemáz gramnegativních tyčků nevede sama o sobě k označení klinické rezistence [3].

Tabulka 2: Výsledky vyšetření citlivostí<sup>1</sup> kmene 5 *Proteus mirabilis*.

Antibiotikum	Obsah disku µg	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky			
		breakpoint <sup>2</sup>		rozmezí hodnot naměřených v NRL <sup>*</sup>	breakpoint <sup>2</sup>		rozmezí hodnot naměřených v NRL <sup>**</sup>	kategorie <sup>3</sup> / absolutní počet laboratoří <sup>4</sup>			správné
		C	R		C	R		C	I	R	%
meropenem	10 µg	≥ 22	< 16	29–30	≤ 2	> 8	≤ 0,06–0,125	120	0	1	99,9
ciprofloxacín	5 µg	≥ 25	< 22	6–6	≤ 0,25	> 0,5	> 4–> 4	0	0	121	100,0

<sup>1</sup> metoda vyšetření a interpretace výsledků podle EUCAST 2020 [1]; <sup>2</sup> hodnoty mezi breakpointy pro kategorie C a R jsou hodnoty pro kategorii I (citlivý při zvýšené expozici); <sup>3</sup> kategorie C: citlivý při standardním dávkování, I: citlivý při zvýšené expozici; R: rezistentní i při zvýšené expozici; <sup>4</sup> správné výsledky jsou zvýrazněny; IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; \* 5 měření diskovou difuzní metodou, \*\* 5 měření diluční mikrometodou

## LITERATURA

- 1) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, valid from 2020-01-01 [on-line]. Dostupný z WWW: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/), český překlad <http://www.szu.cz/klinicke-breakpointy>
- 2) Haldorsen B, Giske CG, Hansen DS, et al. Performance of the EUCAST disc diffusion method and two MIC methods in detection of Enterobacteriaceae with reduced susceptibility to meropenem: the NordicAST CPE study. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73(10): 2738–2747.
- 3) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.1, July 2017 [on-line]. Dostupný z WWW:

[http://www.eucast.org/resistance\\_mechanisms/](http://www.eucast.org/resistance_mechanisms/), český překlad <http://www.szu.cz/detekce-mechanismu-rezistence-eucast>

Dne: 20. 11. 2020

*Koordinátor:*

*Mgr. Renáta Šafránková*

*Zprávu vypracovali:*

*Mgr. Renáta Šafránková, RNDr. Petr Petráš, CSc.,*

*RNDr. Pavla Urbášková, CSc.*