Nově používaná média v NRL pro mykobakterie a přehled zpracovaných mykobakteriálních kmenů za r. 2021 v NRLM

New media used at the NRL for Mycobacteria and overview of mycobacterial strains analysed in 2021

Michaela Horníková, Miluše Šperková, Miluše Kučerová, Iveta Adamuščinová, Lucie Rosová, Věra Dvořáková

Souhrn • Summary

Národní referenční laboratoř pro mykobakterie (NRLM) prošla od roku 2019 výraznými personálními a metodickými změnami, především došlo k revizi používaných metod a k zavedení nových tak, aby portfolio činností NRLM odpovídalo nejnovějším evropským i světovým standardům a výsledky z NRLM bylo možné porovnávat a interpretovat na mezinárodní úrovni. V tomto článku tým NRLM prezentuje hlavní změny, ke kterým za uplynulé dva roky v laboratoři došlo jako stručný přehled aktuálních činností NRLM v oblasti diagnostiky *M. tuberculosis* a netuberkulózních mykobakterií. Blíže se pak věnujeme nově zavedeným metodám stanovení citlivosti na tuhém médiu Middlebrook 7H11 a stanovení minimální inhibiční koncentrace na tekutém médiu Middlebrook 7H9. Tato média jsou významná především pro stanovení citlivosti u nově zaváděných antibiotik, která se využívají v léčbě pacientů s multirezistentními kmeny *M. tuberculosis*.

The National Reference Laboratory for Mycobacteria (NRLM) has undergone significant personnel and methodological changes since 2019, in particular the revision of the methods used and the introduction of new ones, so that the NRLM's portfolio of activities meets the latest European and global standards in order to generate internationally comparable and interpretable results. In this article, the NRLM team presents the main changes that have taken place in the laboratory over the past two years as a brief review of the current activities in the diagnosis of *M. tuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria. A closer look is taken at the newly introduced methods of susceptibility testing on Middlebrook 7H11 solid medium and minimum inhibitory concentration testing on Middlebrook 7H9 liquid medium. These media are particularly important for susceptibility testing of newly introduced antibiotics intended for patients with multidrug-resistant TB.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2022; 31(4): 152–154.

Klíčová slova: *Mycobacterium tuberculosis*, netuberkulózní mykobakterie, Middlebrook 7H9, Middlebrook 7H11

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, non-tuberculous mycobacteria, Middlebrook 7H9, Middlebrook 7H11

Národní referenční laboratoř pro mykobakterie (NRLM) se věnuje nejen referenční činnosti, spočívající především v konfirmaci výsledků mykobakteriologických laboratoří napříč Českou republikou (ČR), ale provádí pro tyto laboratoře i další potřebná vyšetření, především identifikaci mykobakteriálních kmenů pomocí molekulárních metod nebo stanovení citlivosti na méně běžná antibiotika, a to jak molekulárními tak fenotypovými metodami.

Těžištěm činnosti NRLM jsou stanovení týkající se kmenů spadajících do *M. tuberculosis complex* (MTBC), patogenních acidorezistentních tyčinek rodu *Mycobacterium,* způsobujících tuberkulózu. Tuberkulóza je vysoce nakažlivé infekční onemocnění, na které ve světě stále umírá zhruba 1,5 milionu lidí ročně. V ČR se ročně vyskytne zhruba 350 případů tuberkulózy. Přestože celkový počet nakažených má dlouhodobě spíše sestupnou tendenci, alarmující je zvyšující se výskyt tzv. multirezistentních kmenů, tj. kmenů rezistentních minimálně na 2 antibiotika první volby (isoniazid a rifampicin). NRLM jako jediná laboratoř v ČR nabízí stanovení citlivosti na nová antibiotika delamanid a bedaquilin, která jsou v léčbě pacientů s multirezistentními kmeny zásadní, stanovení citlivosti pomocí těchto metod provádí NRLM od r. 2020.

Kromě *M. tuberculosis* NRLM pracuje také s kmeny netuberkulózních mykobakterií (NTM). Tyto mykobakterie se nacházejí v okolním prostředí a bývají původci zánětlivých onemocnění u zvířat. Některé druhy NTM však při oslabené imunitě mohou způsobit netuberkulozní mykobakteriózy i u lidí. Nejčastěji se projevují jako chronické zánětlivé onemocnění v plicích, na kůži či v lymfatických uzlinách. U NTM na rozdíl od MTBC nedochází k přenosu mezi lidmi, ale protože jsou klinické příznaky plicních infekcí způsobených NTM velmi podobné tuberkulóze a obecně bývají kmeny NTM rezistentnější vůči mnoha antibiotikům první i druhé volby, je včasná identifikace mykobakteriálního kmene zásadní jak pro léčbu pacienta, tak pro epidemiologii. Tuberkulóza, na rozdíl od netuberkulózních mykobakterióz, podléhá v ČR povinnému hlášení a pacient musí být izolován.

Za rok 2021 NRLM zpracovala celkem 691 kmenů k vyšetření. Z toho 541 kmenů bylo MTBC, 150 NTM. Z 541

MTBC bylo 21 multirezistentních kmenů. Pro každý kmen byla provedena vyšetření dle požadavku zasílající laboratoře (buď na antibiotika první linie, a/nebo druhé linie, stanovení minimální inhibiční koncentrace, molekulární stanovení, mikroskopie). Podrobný přehled je uveden v **Tabulce 1**. Ze všech zaslaných mykobakteriálních kmenů NRLM vytváří sbírky pro potřeby současně běžících nebo budoucích studií.

NRLM se také intenzivně zabývá zaváděním nových metodik a rozvíjením těch stávajících tak, aby odpovídaly evropským a světovým trendům a výsledy pocházející z NRLM tak bylo možné srovnávat a interpretovat pomocí světových vyhlášek a norem. Za nejvýznamnější lze považovat především kritické koncentrace pro testování citlivosti léčiv využívaných pro léčbu rezistentní tuberkulózy zveřejněné v technické zprávě Světové zdravotnické organizace (World Health Organization, WHO, Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis, https://apps.who.int/iris/handle/10665/260470), dokumenty M24 a M62 vydané Institutem pro klinické a laboratorní normy (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) a breakpointy zveřejněné na webu Evropského výboru pro testování antimikrobiální citlivosti (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST; https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/).

V letech 2020-2021 NRLM provedla rozsáhlou revizi používaných metod a stanovovaných antibiotik. V ČR se tradičně stanovení citlivosti k antibiotikům na tuhých médiích provádí na Löwenstein-Jensenově vaječné půdě a stanovení minimální inhibiční koncentrace mikrometodou v tekutém médiu na půdě Šulově. Löwenstein-Jensenova vaječná půda se používá k diagnostice běžně i v zahraničí a pro antibiotika první linie (isoniazid, rifampicin, streptomycin, etambutol a pyrazinamid) i některá antibiotika druhé linie (zejména levofloxacin, moxifloxacin, etionamid, či kanamycin) existují mezinárodně uznávané hodnoty kritické koncentrace pro použití v tomto médiu. Pro nová antibiotika (delamanid, bedaquilin) či antibiotika opětovně používaná (linezolid) jsou však hodnoty kritické koncentrace pro tuhá média dostupné pouze pro médium Middlebrook 7H10 či 7H11, která se liší pouze přídavkem kaseinu v médiu Middlebrook 7H11, který by měl zajistit lepší růst *M. tuberculosis*.

NRLM se v roce 2020 rozhodla zavést testování delamanidu, bedaquilinu a linezolidu, antibiotik zásadních pro léčbu pacientů s multirezistentními kmeny, na médiu 7H11. Šulova půda, tekuté médium běžně využívané ke stanovení minimální inhibiční koncentrace v mnoha laboratořích v ČR, je na rozdíl od Löwenstein-Jensenovy vaječné půdy spíše lokální, resp. národní záležitostí. Ve světě se pro diagnostiku na tekutém médiu využívá Middlebrook 7H9, doporučené kritické koncentrace či breakpointy se vždy vztahují k tomuto médiu a referenční metody pro stanovení na tekutém médiu, které by měly sloužit ke kalibraci metod využívaných v konkrétní laboratoři, jsou také popsány na médiu Middlebrook 7H9. Z tohoto důvodu se NRLM rozhodla jednak zavést testování delamanidu a bedaquilinu na tomto médiu a zároveň porovnat výsledky u ostatních stanovovaných antibiotik (amikacin, rifabutin, ciprofloxacin, clarithromycin, linezolid, moxifloxacin, clofazimin, capreomycin, azitromycin, ofloxacin) získané na Šulově půdě s výsledky na médiu 7H9. Vzhledem k tomu, že se NRLM pravidelně účastní mezinárodních zkoušek EQA (externí hodnocení kvality) a panely týkající se stanovení citlivosti jak pro MTBC, tak pro NTM vždy plní s úspěšností 100 %, očekávalo se, že výsledky na obou médiích by měly být srovnatelné. Do testování byly zařazeny jak vzorky rezistentní, tak vzorky citlivé a přestože data je ještě nutno statisticky zpracovat, lze předběžně říci, že tato hypotéza se skutečně potvrdila a výsledky získané na Šulově půdě jsou srovnatelné s výsledky na Middlebrooku 7H9.

Tabulka 1: Přehled zpracovaných mykobakteriálních kmenů pro fenotypová a/nebo genotypová stanovení v roce 2021 v NRL pro mykobakterie

Celkový počet kmenů přijatých do NRLM	**691**
Mycobacterium tuberculosis complex	541
M. tuberculosis	539
z toho MDR	21
M. africanum	1
M. bovis BCG	1
Netuberkulózní mykobakterie	150
M. avium complex	93
M. abscessus	10
M. chelonae	1
M. fortuitum	7
M. gordonae	3
M. kansaii	2
M. malmoense	4
M. marinum	2
M. species	9
M. szulgai	1
M. xenopi	18

MDR = multirezistentní (multiple drug resistance)

Obecně lze po roce testování tuhých a tekutých médií Middlebrook říci, že jak s tuhým médiem 7H11, tak s tekutým médiem 7H9 se pracuje velmi dobře a mykobakterie na těchto médiích často vykazují lepší a rychlejší růst, rozdíl je patrný především na tuhých půdách. Middlebrook 7H11 je, na rozdíl od Löwenstein – Jensenovy vaječné půdy, médium čiré a průhledné – odečet růstu je tak nejlepší provádět ze zadní strany, pohledem skrze šikmou půdu. Čirost média umožňuje rychleji odhalit případnou přítomnost

kontaminantu a včas tak provést nápravná opatření, což je vzhledem k délce kultivace mykobakterií poměrně výhodné. U tekutého média 7H9 zůstává mechanismus odečtu stejný jako u Šulovy půdy.

Middlebrook 7H9 obsahuje anorganické složky dodávající draslík, síru, hořčík a fosfor potřebné pro růst mykobakterií. Stimulátorem růstu je zde anorganická měď, železo, zinek a vápník. Zdrojem dusíku je síran amonný, biotin hraje významnou roli při karboxylaci a dekarboxylaci, pyridoxin je prekurzorem enzymatické aktivity. K médiu je při přípravě třeba přidat tzv. ADC enrichment, který obsahuje zdroj energie a katalázu minimalizující toxické účinky.

Middlebrook 7H11 obsahuje anorganické soli potřebné pro růst mykobakterií, jako růstový stimulant zde figuruje hydrolyzát kaseinu. Malachitová zeleň zajišťuje inhibici růstu jiných bakterií. Biotin pomáhá stimulovat růst poškozených mykobakterií. Glycerol se k médiu přidává jako zdroj energie a uhlíku, OADC enrichment poskytuje živiny potřebné pro růst mykobakterií – albumin, kyselinu olejovou, chlorid sodný, katalázu a dextrózu.

Příprava médií Middlebrook 7H9 i 7H11 je velmi jednoduchá. Média lze objednat u komerčních dodavatelů jako prášek, potřebné enrichmenty pak jako tekutinu.

PŘÍPRAVA MÉDIA 7H9:

1. 4,7 g média rozpustíme v 900 ml demineralizované vody obsahující 2 ml glycerolu
2. Zahřejeme k varu, za stálého míchání tak, aby došlo ke kompletnímu rozpuštění média.
3. Médium sterilizujeme v autoklávu při 121 °C na 10 min., nebo dle zavedeného postupu v laboratoři.
4. Médium zchladíme na 45–50°C a asepticky přidáme 100 ml ADC enrichmentu.

Obrázek 1: *Mycobacterium tuberculosis* na Šůlově půdě

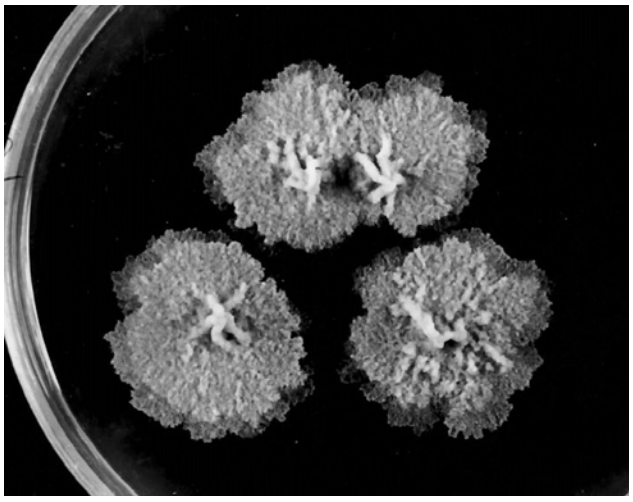
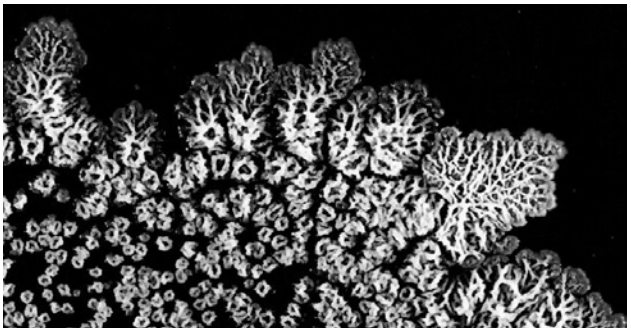
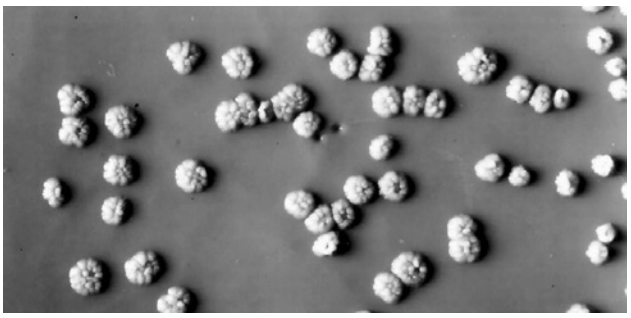


Foto 3×: A. Winter, archiv NRLM

Obrázek 2: *Mycobacterium smegmatis* na půdě dle Matouškové



Obrázek 3: *Mycobacterium phlei* na půdě Ogawa



5. Dobře promícháme a asepticky rozpipetujeme do připravených zkumavek pro přípravu ředících řad.
6. Připravíme ředící řady zavedeným způsobem pro požadovaná antibiotika a asepticky rozpipetujeme do připravených destiček.

PŘÍPRAVA MÉDIA 7H11:

1. 20 g média rozpustíme v 900 ml demineralizované vody obsahující 5 ml glycerolu
2. Zahřejeme k varu, za stálého míchání tak, aby došlo ke kompletnímu rozpuštění média.
3. Médium sterilizujeme v autoklávu při 121 °C na 15 min., nebo dle zavedeného postupu v laboratoři.
4. Médium zchladíme na 45–50°C a asepticky přidáme 100 ml OADC enrichmentu.
5. Dobře promícháme, asepticky rozlijeme do připravených nádob a přidáme potřebné množství antibiotika.
6. Znovu dobře promícháme a asepticky rozplníme do připravených zkumavek. Pro přípravu šikmých půd je třeba zkumavky umístit na šikmou podložku a po uzavření nechat dobře zatuhnout před tím, než jsou zkumavky umístěny do krabic.

Poděkování: *NRLM děkuje všem mikrobiologům, epidemiologům a klinickým lékařům za spolupráci, stejně jako Pracovní skupině pro mykobakterie SLM ČLS JEP.*

Ing. Věra Dvořáková, Ph.D.
NRL pro mykobakterie CEM SZÚ