

Renáta Šafránková, Ondřej Daniel, Andrea Mančíková, Petr Petráš, Pavla Urbášková

ZPŮSOB PŘÍPRAVY 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. U vzorku 3 bylo připraveno ředění zákalu komenzálních bakterií 10⁻²–středně obtížná izolace až 10⁻³– obtížná izolace. Automatickou pipetou bylo napipetováno 0,7 ml vzniklé suspenze nebo požadovaného ředění do 70 ml lyofilního média. Suspenze byla rozplněna v objemu přibližně 0,5 ml do skleněných lahviček 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.

CHARAKTERISTIKA MATERIÁLU

Simulované klinické vzorky obsahující:

1. *Bordetella paraptussis*
2. *Staphylococcus lugdunensis*
3. *Salmonella* Typhimurium
4. *Streptococcus suis*
5. *Citrobacter freundii*

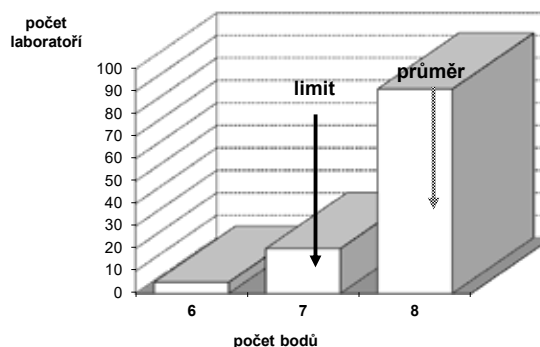
ZPŮSOB HODNOCENÍ

Kvalitativní; dosažení bodového limitu za identifikaci signifikantních patogenů pro danou sérii se vypočítává dle vzorce; u vzorků 1–4 max 2 body za 1 vzorek; limit = aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky.

VYHODNOCENÍ

Celkem byly vzorky rozeslány 117 laboratořím, 116 laboratořím odeslalo výsledek do závěrečného termínu, 1 laboratoř se odhlásila. Za identifikaci signifikantního patogenu 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 se z technických důvodů již neprovádí, k dispozici jsou komentované výsledky (vzorek 4 a 5).

Graf 1: Počet bodů za správnou identifikaci



Maximálního počtu bodů při identifikaci dosáhlo 91, tj. 78,5% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 6,681 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. 7,741 – (2×0,530) = 6,681). Tohoto limitu dosáhlo 111 laboratoří, 5 laboratoří tento limit nesplnilo.

VÝSLEDKY ZÚČASTNĚNÝCH LABORATOŘÍ

| |
|---|
| VZOREK 1: Výtěr z nosohltanu od 3letého dítěte s dlouhotrvajícím kašlem |
| Odpověď: <i>Bordetella paraptussis</i> Vzorek dále obsahoval: <i>Streptococcus oralis</i> |

| Identifikace | frekvence | bodů | procento |
|-------------------------------|-----------|------|----------|
| <i>Bordetella paraptussis</i> | 116 | 2 | 100% |
| Celkem | 116 | | 100% |

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

Identifikace signifikantního patogenu u vzorku 1 nečinila obtíže a všechny zúčastněné laboratoře získaly po dvou bodech.

| |
|---|
| VZOREK 2: Izolát z prsní žlázy od 34leté pacientky s mastitidou |
| ODPOVĚĎ: <i>Staphylococcus lugdunensis</i> |

| identifikace | frekvence | bodů | procento |
|-----------------------------------|-----------|------|----------|
| <i>Staphylococcus lugdunensis</i> | 116 | 2 | 100% |
| Celkem | 116 | | 100% |

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

Staphylococcus lugdunensis je typickým podmíněným patogenem z koaguláza negativních stafylokoků (KNS), který může být

u imunitně oslabených osob, intravenózních narkomanů a dlouhodobě hospitalizovaných pacientů příčinou vážných onemocnění. Podle výsledků NRL pro stafylokoky je jeho výskyt poměrně častý. Z přibližně 2 500 kmenů KNS, které byly do NRL/St v letech 2000–2020 k identifikaci zaslány, je na páté pozici s 6 % záchytů (po *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* a dvou poddruhů *S. hominis*). Z 516 kmenů izolovaných z hnisu, byl dokonce na 3. místě po *S. haemolyticus* a *S. epidermidis* [1].

S. lugdunensis byl popsán v r. 1988 francouzskými bakteriology a pojmenován podle původního latinského názvu Lyonu (Lugdunum). Je uváděn i jako příčina infekcí krevního řečiště u nemocí spojených s lékařskou péčí.

Testovaný kmen má pozitivní test na clumping faktor, který je v laboratořích stále často používán ke skriningové identifikaci kmenů *S. aureus*. Tato latexová reakce může být tedy zavádějící. *S. lugdunensis* lze velice snadno odlišit negativním testem na hyaluronidázu a pozitivní reakcí dekarboxylace ornitinu. Také hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF ho umí velice dobře určit.

Všechny laboratoře oznámily správný výsledek.

LITERATURA

- [1] Petráš P, Měřínská T, Hutníková R. Identifikace koaguláza negativních stafylokoků z klinického materiálu v NRL pro stafylokoky v letech 2000–2020. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2021; 30(2): 61–67

| |
|--|
| VZOREK 3: Stolice od 15leté pacientky s průjemem a horečkou |
| Odpověď: <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérotyp Typhimurium 4,12 : i : 1,2 |
| Vzorek dále obsahoval: <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> |

| Identifikace | frekvence | body | procento |
|---|------------|------|-------------|
| <i>Salmonella</i> Typhimurium | 93 | 2 | 80,2% |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium monofázická | 12 | 1 | 10,3% |
| <i>Salmonella</i> sk. B*, <i>Salmonella</i> spp.* | 5 | 1 | 4,3% |
| <i>Salmonella</i> O4* | 1 | 1 | 0,9% |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis | 1 | 0 | 0,9% |
| <i>Salmonella</i> sk. B | 3 | 0 | 2,6% |
| <i>Salmonella</i> spp. | 1 | 0 | 0,9% |
| Celkem | 116 | | 100% |

*pozn. – tyto laboratoře uvedly v komentáři částečnou antigenní strukturu, příp. „zasláno na ověření do NRL“

Z 20 laboratoří s nejvyšším dosaženým počtem bodů za minulý rok uvedlo správný výsledek 18 laboratoří. Vzorek je možno hodnotit.

Jako vzorek byl rozeslán kmen *Salmonella* Typhimurium antigenní struktury 4,12 : i : 1,2. Úplnou antigenní strukturu *Salmonella* Typhimurium 4,12 : i : 1,2 dokázalo určit 93 laboratoří (jedna laboratoř uvedla identifikaci do komentáře) z celkového počtu 116, což je více než tři čtvrtiny ze zúčastněných laboratoří : 80,2 %. Alespoň dvě antigenní determinanty určilo správně 12 laboratoří, viz výsledek *Salmonella* Typhimurium monofázická.

Několik laboratoří určilo pouze somatický antigen a vyhodnotily kmen salmonely jako zástupce skupiny B, případně O:4, případně provedly pouze druhovou identifikaci bez bližší specifikace.

Nesprávně (jak somatické, tak bičíkové antigeny) určila kmen jedna laboratoř a to jako *S. Enteritidis*.

V následující tabulce je uveden přehled nejčastěji hlášených sérotypů za rok 2021. Z tabulky je patrné, že *Salmonella* Typhimurium je druhým nejčastějším sérotypem na území ČR. Stejně jako v předchozích letech největší podíl připadá na *S. Enteritidis* (88 %) a na třetím místě je *S. Typhimurium* monofázická (1 %).

V souvislosti s epidemiologickým šetřením je nutné sérotypy salmonel od sebe důsledně odlišovat. Biochemickými testy je možné rozlišit kmeny na úrovni druhu *S. enterica* nebo *S. bongori*. Druh *S. enterica* je možné dále biochemicky rozdělit do šesti poddruhů [1].

LITERATURA

- [1] Grimont PAD and Weill FX: Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 9th ed. Institute Pasteur, Paris, 2007. [dostupné též on-line: https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf]

Zastoupení sérotypů hlášených v roce 2021 na území ČR (data k 23. 03. 2022, zdroj ISIN):

| | | počet | zastoupení z celkového počtu hlášených salmonel |
|-----|-----------------------------------|--------------|---|
| 1. | <i>S. Enteritidis</i> | 9 034 | 88,36 % |
| 2. | <i>S. Typhimurium</i> | 508 | 4,97 % |
| 3. | <i>S. Typhimurium</i> monofázická | 94 | 0,92 % |
| 4. | <i>S. Infantis</i> | 74 | 0,72 % |
| 5. | <i>S. Coeln</i> | 57 | 0,56 % |
| 6. | <i>S. Newport</i> | 19 | 0,19 % |
| 7. | <i>S. Oranienburg</i> | 18 | 0,18 % |
| 8. | <i>S. Hadar</i> | 15 | 0,15 % |
| 9. | <i>S. Kentucky</i> | 13 | 0,13 % |
| 10. | <i>S. Stanley</i> | 13 | 0,13 % |
| | celkem tyto sérotypy | 9 845 | 96,29 % |

| |
|---|
| VZOREK 4: Izolát z kloubu od pacienta se septickou artritidou |
| ODPOVĚĎ: <i>Streptococcus suis</i> |

| Identifikace | frekvence | body | procento |
|----------------------------|------------|------|-------------|
| <i>Streptococcus suis</i> | 114 | 2 | 98,3% |
| <i>Streptococcus bovis</i> | 1 | 1 | 0,9% |
| <i>Streptococcus</i> spp. | 1 | 1 | 0,9% |
| Celkem | 116 | | 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 penicilinu a ke klindamycinu. Izolát je citlivý k oběma antibiotikům při standardním dávkování (C). Ze 116 zúčastněných laboratoří dvě chybovaly v druhovém určení izolátu, jedna z nich identifikovala *S. bovis* a druhá uvedla pouze rodové jméno. Všechny laboratoře správně vyhodnotily citlivost izolátu k oběma požadovaným antibiotikům. Celkové výsledky vyšetření citlivosti izolátu ze vzorku 4 jsou v tabulce 1, která obsahuje breakpointy minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro citlivé a rezistentní izoláty skupiny viridujících streptokoků, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

VZOREK 5: *Citrobacter freundii* (izolát z moči)

Izolát z moči č. 5 je při standardním dávkování citlivý (C) ke gentamicinu a při zvýšené expozici je citlivý (I) k meropenemu. Všechny laboratoře správně vyhodnotily citlivost kmene ke gentamicinu avšak pouze dvě pětiny laboratoří správně označily u tohoto kmene citlivost k meropenemu

při zvýšené expozici (I). Celkové výsledky vyšetření citlivosti izolátu 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a MIC gentamicinu a meropenemu pro *Enterobacteriales*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

ZÁVĚR

Všechny laboratoře vyhodnotily správně citlivost při standardním dávkování (C) u izolátu ze vzorku 4 *Streptococcus suis* k penicilinu a ke klindamycinu a u izolátu ze vzorku 5 *Citrobacter freundii* z moči ke gentamicinu. U toho izolátu však byly zjištěny neuspokojivé výsledky vyšetření citlivosti k meropenemu: správně vyšetřily toto antibiotikum pouze dvě pětiny laboratoří (40,5 %). Fenotyp citlivosti k meropenemu u tohoto kmene byl vyhodnocen podle diskové metody i vyšetření MIC jako citlivý při zvýšené expozici (I), přestože produkoval karbapenemázu. Výsledek je v souladu s doporučeními EUCAST, podle nichž „samotná přítomnost nebo absence karbapenemáz nemá vliv na kategorizaci citlivosti“, doporučuje se však provádět detekci a analýzu vlastností karbapenemáz pro účely veřejného zdravotnictví a kontrolu infekcí“ [1,2].

Tabulka 1: Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 4 *Streptococcus suis*

| Antibiotikum | Obsah disku | Průměry IZ (mm) | | | MIC (mg/l) | | | Výsledky laboratoří (n = 116) | | | |
|--------------|-------------|-------------------------|-----|--|-------------------------|-----|---|---|---|---|-----------|
| | | breakpoint ² | | rozmezí hodnot naměřených v NRL [*] | breakpoint ² | | rozmezí hodnot naměřených v NRL ^{**} | kategorie ³ / absolutní počet ⁴ | | | správné % |
| | | C ≥ | R < | | C ≤ | R > | | C | I | R | |
| penicilin | 1 J | 18 | 12 | 20–21 | 0,25 | 2 | 0,03–0,03 | 116 | 0 | 0 | 100,0 |
| klindamycin | 2 µg | 19 | 19 | 16–18 | 0,5 | 0,5 | 0,06–0,125 | 116 | 0 | 0 | 100,0 |

¹ metoda vyšetření a interpretace výsledků podle EUCAST 2022 [1]

² hodnoty mezi breakpointy pro kategorie C a R jsou hodnoty pro kategorii I (citlivý při zvýšené expozici)

³ kategorie: C: citlivý při standardním dávkování, I: citlivý při zvýšené expozici; R: rezistentní i při zvýšené expozici

⁴ správné výsledky podle kategorie jsou zvýrazněny

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace

* 5 měření diskovou difuzní metodou, ** 5 měření diluční mikrometodou

Tabulka 2: Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 5 *Citrobacter freundii*

| Antibiotikum | Obsah disku µg | Průměry IZ (mm) | | | MIC (mg/l) | | | Výsledky laboratoří | | | |
|-------------------------|----------------|-------------------------|------|--|-------------------------|-----|---|--|----|----|-----------|
| | | breakpoint ² | | rozmezí hodnot naměřených v NRL [*] | breakpoint ² | | rozmezí hodnot naměřených v NRL ^{**} | kategorie ³ / absolutní počet laboratoří ⁴ | | | správné % |
| | | C | R | | C | R | | C | I | R | |
| gentamicin ⁵ | 10 µg | ≥ 17 | < 17 | 17–19 | ≤ 2 | > 2 | 1–1 | 116 | 0 | 0 | 100,0 |
| meropenem | 10 µg | ≥ 22 | < 16 | 18–19 | ≤ 2 | > 8 | 8–8 | 7 | 40 | 69 | 40,5 |

¹ metoda vyšetření a interpretace výsledků podle EUCAST 2022 [1]

² hodnoty mezi breakpointy pro kategorie C a R jsou hodnoty pro kategorii I (citlivý, zvýšená expozice)

³ kategorie C: citlivý při standardním dávkování, I: citlivý při zvýšené expozici; R: rezistentní i při zvýšené expozici

⁴ správné výsledky podle kategorie jsou zvýrazněny

⁵ izoláty z moči

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace

* 5 měření diskovou difuzní metodou, ** 5 měření diluční mikrometodou

LITERATURA

- [1] EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, valid from 2022-01-01 [on-line]. Dostupný z WWW: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (český překlad <http://www.szu.cz/klinicke-breakpointy>)
- [2] EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. The EUCAST guideline on detection of resistance mechanisms v 2.0. Dostupný z WWW: https://www.eucast.org/resistance_mechanisms/ (český překlad

<http://www.szu.cz/detekce-mechanismu-rezistence-eucast>)

Zprávu vypracovali:

*Mgr. Renáta Šafránková, Ph.D., Mgr. Ondřej Daniel,
RNDr. Andrea Mančíková, Ph.D., RNDr. Petr Petráš,
CSc., RNDr. Pavla Urbášková, CSc.*

Zprávu autorizovala:

*Mgr. Renáta Šafránková, Ph.D.
Dne: 9. 5. 2022*