

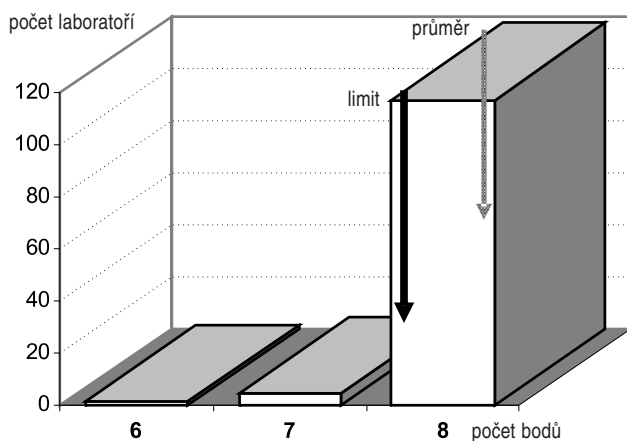
## EHK – 690 Bakteriologická diagnostika

Helena Žemličková, Renáta Kolínská, Daniela Dědičová, Pavla Urbášková, Jana Zavadilová

### HODNOCENÍ

Celkem byly rozeslány vzorky 124 laboratořím. 124 laboratoří odeslalo výsledek do závěrečného termínu. Za identifikaci signifikantního patogena ve 4 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 8 bodů, za vyšetření citlivosti mohly laboratoře obdržet celkem 5 bodů (vzorek 4 a 5). Bodování pro identifikaci bylo provedeno ve stupnici 2, 1, 0 a –1 bodů.

Graf 1: POČET BODŮ ZA SPRÁVNOU IDENTIFIKACI



Maximálního počtu bodů při identifikaci dosáhlo 117, tj. 94,4 % laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,293 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj.  $7,927 - (2 \times 0,317) = 7,293$ ). Tohoto limitu dosáhlo 117 laboratoří, 7 laboratoří tento limit nesplnilo.

### VÝSLEDKY ZÚČASTNĚNÝCH LABORATOŘÍ

**Vzorek 1: Výtěr z tonsil u pacientky s bolestí v krku (podezření na záškrt)**

**Odpověď: *Corynebacterium ulcerans***

Vzorek dále obsahoval: *Streptococcus oralis*

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	123	2	99,2%
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	1	1	0,8%
Celkem	124		100 %

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

Většina laboratoří (123 ze 124, tj. 99,20 %) identifikovala kmen správně jako *C. ulcerans*. Pouze 1 laboratoř kmen označila jako *C. pseudotuberculosis*. *Corynebacterium ulcerans* je fylogeneticky vysoce příbuzné s *Corynebacterium diphtheriae* a může produkovat difterický toxin. Toxigenní kmeny *C. ulcerans* jsou vzácnými původci onemocnění připomínající klasickou diftérii (faryngeální či kožní formu). Kmeny neprodukující toxin se podílí na patogenезi různých zánětů především kožních. Roste na krevním agaru (vytváří malou zónu hemolýzy) a na agaru obohaceném teluričitanem draselným (suché, naředlé, neprůhledné kolonie). *C. ulcerans* lze od *C. diphtheriae* odlišit pozitivní ureázovou reakcí a pozitivním reverzním CAMP testem.

<b>Vzorek 2: Hemokultura od pacientky s pyelonefritidou</b>			
<b>Odpověď: <i>Klebsiella pneumoniae</i> + <i>Escherichia coli</i></b>			
Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Klebsiella pneumoniae</i> + <i>Escherichia coli</i>	121	2	97,6%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	1	2,4%
Celkem	124		100 %

Z 20 laboratoří s nejvyšším dosaženým počtem bodů za minulý rok uvedlo správný výsledek 19 laboratoří. Vzorek je možno hodnotit.

Vzorek obsahující obě agens správně identifikovalo 121 laboratoří, 3 laboratoře uvedly jako vyvolávající agens pouze *K. pneumoniae* a získaly tak pouze 1 bod.

<b>Vzorek 3: Stoličky od pacienta s horečkou, průjemem a bolestmi břicha</b>	
<b>Odpověď: <i>Salmonella</i> I. 1,4,[5],12:i:- Typhimurium-like</b>	
Vzorek dále obsahoval: <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i>	

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Salmonella</i> Typhimurium	98	2	79%
<i>Salmonella</i> 4,[5],12:i	2	2	1,6%
<i>Salmonella</i> 4,[5],12:i:-	6	2	4,8%
<i>Salmonella</i> 4,12:i	2	2	1,6%
<i>Salmonella</i> 4,12:i:-	9	2	7,3%
<i>Salmonella</i> 4,5:i:-	2	2	1,6%
<i>Salmonella</i> O4, Hi	1	2	0,8%
<i>Salmonella</i> sk B 4,5,12	2	1	1,6%
<i>Salmonella</i> sk B	1	1	0,8%
<i>Salmonella</i> spp.	1	1	0,8%
Celkem	124		100 %

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

K sérotypizaci byl rozeslán kmen salmonely, označovaný jako Typhimurium-like. Jedná se o v EU v posledních letech velmi rozšířený sérotyp označovaný antigenní strukturou 4,[5],12:i:-. Identifikace této monofázické varianty není technicky náročná, spočívá pouze v precizním postupu při sérotypizaci a v důsledném uplatňování zjištěné antigenní formule při zařazení podle White-Kauffmann-Le Minor schématu.

Pro potvrzení této monofázické salmonely lze doplnkově použít antibiogram (typická multirezistence AmpS-

SuTe). Z dalších, již specializovaných metod lze použít fágovou typizaci (převažující příslušnost k typu DT193) nebo PCR pro průkaz genu kódujícího nespecifickou (2. bičíkovou) fázi.

Tento typ monofázické salmonely se v posledních letech šíří zejména v chovech prasat a v zahraničí vyvolal i několik významných epidemií. Evropská legislativa pro vyšetřování potravin a surovin rozlišuje *S. Typhimurium* a monofázickou variantu, podobně i ECDC (systém TESSy) vyžaduje jejich oddělené vykazování. Celoevropská data za 3. čtvrtletí roku 2010 vykazovala dvojnásobný vzestup onemocnění vyvolané salmonelou 4,[5],12:i proti předchozímu. V ČR na základě analýzy laboratorních dat odhadujeme prevalenci mezi 15–30 % ročně, což odpovídá 3.–4. místu v pořadí nejčastějších sérotypů.

Protože se jedná o poměrně „nové“ etiologické agens, byl tentokrát plný počet bodů přiznán i za identifikaci *S. Typhimurium* (98 laboratoří = 79 %). Úvahu o slabé expresi druhé bičíkové fáze učinila pouze jediná laboratoř. Ocenění si zaslouží i pracovníci 26 laboratoří (21 %), kteří se zamýšleli nad přítomností jednotlivých antigenních struktur, 6 z nich správně uvedlo, že v rutinním postupu by požádali o dourčení NRL. Pouze jedna laboratoř ukončila identifikaci na úrovni rodu, tři zařadily kmen do skupiny (O:4). Z výsledků tohoto kola jsou patrné obtíže kolegů s vyjádřením antigenní charakteristiky kmene. Typizace by měla směřovat k formulaci antigenního vzorce podle zásad Kauffmannova schématu (vzor: 1,4,[5],12 : i : -), nemá být výčet provedených aglutinačních reakcí.

<b>Vzorek 4: Izolát z krve od pacienta léčeného pro hemoblastózu</b>			
<b>Odpověď: <i>Enterococcus faecium</i></b>			
Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Enterococcus faecium</i>	123	2	99,2%
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	1	0,8%
Celkem	124		100 %

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

Požadavek byl identifikovat druh zaslaného kmene a zjistit jeho citlivost k ampicilinu a ke gentamicinu. Kmen 4 je *Enterococcus faecium*, rezistentní k ampicilinu i k vysokým koncentracím gentamicinu. Jedna ze 124 zúčastněných laboratoří kmen 4 chybně identifikovala jako *Enterococcus faecalis*, a jedna laboratoř chybně označila kmen 4 jako citlivý k ampicilinu. Všechny laboratoře správně uvedly, že kmen 4 je rezistentní ke gentamicinu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti jsou v tabulce 1, která obsahuje limitní hodnoty průměrů inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro citlivé kmeny *E. faecium*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 1: VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ CITLIVOSTI KMENE 4 *ENTEROCOCCUS FAECIUM*

Antibiotikum	Zdroj	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)		Správné výsledky		
		obsah disku $\mu\text{g}$	limit pro citlivé kmeny	rozsmezí hodnot naměřených v NRL**	limit pro citlivé kmeny	rozsmezí hodnot naměřených v NRL***	kategorie	počet laboratoří	%
ampicilin	EUCAST [1]	2	$\geq 10$	6 - 6	$\leq 4$	$> 64 - > 64$	R	123/124	99,2
	CLSI [2]	10	$\geq 17$	6 - 6	$\leq 8$				
gentamicin	EUCAST [1]	30	$\geq 8$	6 - 6	$\leq 128$	$> 128 - > 128$	R	124/124	100,0
	CLSI [2]	120	$\geq 10$	8 - 8	$\leq 500$				

\*\* 5 měření diskovou difuzní metodou; \*\*\* 5 měření diluční mikrometodou; R: rezistentní.

Tabulka 2: VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ CITLIVOSTI KMENE 5 *ESCHERICHIA COLI*

Antibiotikum	Zdroj	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)		Správné výsledky		
		obsah disku $\mu\text{g}$	limit pro citlivé kmeny	rozsmezí hodnot naměřených v NRL**	limit pro citlivé kmeny	rozsmezí hodnot naměřených v NRL***	kategorie	počet laboratoří	%
ampicilin	EUCAST [1]	10	$\geq 14$	6 - 6	$\leq 8$	$> 32 - > 32$	R	124/124	100,0
	CLSI [2]		$\geq 17$						
gentamicin	EUCAST [1]	10	$\geq 17$	11 - 12	$\leq 2$	$> 32 - > 32$	R	123/124	99,2
	CLSI [2]		$\geq 15$		$\leq 4$				

\*\* 5 měření diskovou difuzní metodou; \*\*\* 5 měření diluční mikrometodou; R: rezistentní.

#### Vzorek 5: *Escherichia coli*

Požadavek byl zjistit citlivost kmene 5 k ampicilinu a ke gentamicinu a uvést, zda tento kmen produkuje širokospektrovou  $\beta$ -laktamázu (ESBL). Kmen byl rezistentní k oběma antibiotikům a neprodukoval ESBL. Ze 124 zúčastněných laboratoří všechny správně označily kmen 5 jako rezistentní k ampicilinu, jedna chybně uvedla jeho citlivost ke gentamicinu a 107 laboratoří (86,3 %) uvedlo správně, že tento není producent ESBL. Celkové výsledky vyšetření citlivosti jsou v tabulce 2, která obsahuje limitní hodnoty průměrů inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro citlivé kmeny *E. coli*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

#### ZÁVĚR

Pouze dvě ze 124 laboratoří, zúčastněných v této sérii EHK, chybovaly ve výsledcích vyšetření citlivosti kmenů

*Enterococcus faecium* a *Escherichia coli* k ampicilinu a gentamicinu. Jen 107 (86,3 %) laboratoří však správně odpovědělo na otázku, zda kmen *E. coli* produkuje širokospektrovou  $\beta$ -laktamázu. Většina (n=14) z těchto celkem 17 chybných odpovědí byla způsobena skutečně chybou při vyšetření, nikoli špatnou formulací odpovědi na otázku (n=3).

#### LITERATURA

- [1] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1,3 January 2011; dostupné na [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. CLSI Document M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, Pa, 2010.

MUDr. Helena Žemličková, PhD.  
Česká národní sbírka typových kultur  
OML CLČ SZÚ  
hzemlickova@szu.cz