

## EHK – 734 Bakteriologická diagnostika

*Renáta Kolínská, Monika Marejková, Pavla Urbášková, Helena Žemličková*

### 1. 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 37 °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 agarů a resuspendovány ve 4 ml fyziologického roztoku tak, aby denzita výsledného zákalu odpovídala McFarlandově standardě 6. U vzorku 3 bylo připraveno ředění zákalu komenzálních 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-03 a SOP-NRL/CNCTC-09). Lahvičky jsou skladovány v chladničce při teplotě 4–8 °C.

### 2. HODNOCENÍ

Celkem byly rozeslány vzorky 121 laboratořím, všechny laboratoře odeslaly výsledek do závěrečného termínu. Za identifikaci signifikantního patogena ve 4 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 8 bodů; za vyšetření citlivosti mohly laboratoře obdržet celkem 3 body (vzorek 4 a 5). Bodování pro identifikaci bylo provedeno ve stupnicích 2, 1, 0 a -1 bodů.

Maximálního počtu bodů při identifikaci dosáhlo 120, tj. 99,2 % laboratořím. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,946 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné

odchyly, tj.  $7,992 - (2 \times 0,091) = 7,946$ ). Tohoto limitu dosáhlo 120 laboratořím, jedna laboratoř tento limit nesplnila.

### 3. VÝSLEDKY ZÚČASTNĚNÝCH LABORATOŘÍ

#### Vzorek 1: Hnis od 4letého dítěte po paracentéze

**Odpověď:** *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*

Vzorek dále obsahoval: *Streptococcus oralis*

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i>	121	2	100%
Celkem	121		100%

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

Všechny laboratoře identifikovaly kmen správně jako *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* a získaly tak po 2 bodech.

#### Vzorek 2: Izolát z likvoru od 70leté pacientky s hnisavou meningitidou

**Odpověď:** *Listeria monocytogenes*

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Listeria monocytogenes</i>	121	2	100%
Celkem	121		100%

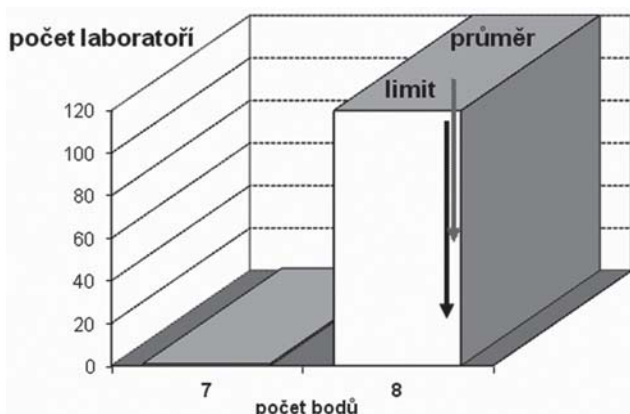
Z 20 laboratořím s nejvyšším dosaženým počtem bodů za minulý rok uvedlo správný výsledek 20 laboratořím. Vzorek je možno hodnotit.

Všechny laboratoře identifikovaly kmen správně jako *Listeria monocytogenes* a získaly tak po 2 bodech.

Rod *Listeria* zahrnuje 6 druhů, z nichž pouze *L. monocytogenes* je patogenní pro člověka. Je to fakultativně anaerobní nesporulující grampozitivní tyčka, kataláza pozitivní, pohyblivá při nízkých teplotách (do 25 °C), roste na žlučeskulinové půdě; intracelulárně přežívá v enterocytech, makrofázích a hepatocytech. *L. monocytogenes* je obávaným patogenem vyskytující se v potravinách, jako např. mléko a mléčné výrobky, tepelně neopracované masné výrobky, syrová zelenina.

U lidí nejčastěji vyvolává febrilní gastroenteritidu [1] a postižení CNS [2]. Velmi nebezpečná je infekce plodu, která se může projevit abortem či narozením mrtvého plo-

**Graf 1: POČET BODŮ ZA SPRÁVNOU IDENTIFIKACI**

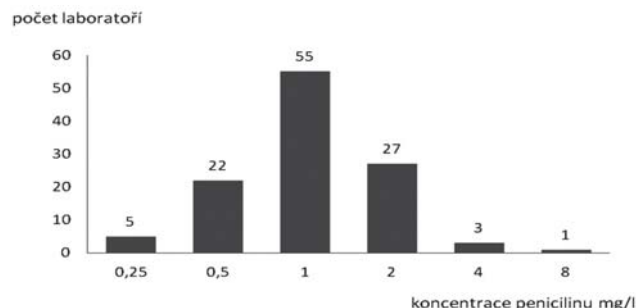




**Vzorek 5: *Streptococcus pneumoniae***

Požadavek byl vyšetřit citlivost k chloramfenikolu, vyšetřit MIC penicilinu a interpretovat výsledek MIC penicilinu pro pacienty s pneumonií a pro pacienty s meningitidou. Celkové výsledky vyšetření citlivosti jsou v tabulce 2, která obsahuje limitní hodnoty průměrů inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) obou antibiotik pro citlivé kmeny *Streptococcus pneumoniae*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky vyšetření citlivosti k chloramfenikolu, které všechny laboratoře udaly správně. MIC penicilinu vyšetřilo 113 laboratoří (93,4 %), které získaly široké rozmezí hodnot (tabulka 3). V grafu 1 je distribuce MIC penicilinu získaná laboratořemi (hodnoty MIC získané Etestem jsou zaokrouhleny na nejbližší vyšší hodnotu MIC v ředění dvojnásobně geometrické řady). Interpretace výsledků MIC podle původu kmeny (onemocnění pacienta) se v této sérii EHK nehodnotí.

**Graf 1: MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE PENICILINU (MIC) NAMĚŘENÉ VE 113 LABORATOŘÍCH \***



\* Hodnoty MIC získané Etestem jsou zaokrouhleny na nejbližší vyšší hodnotu MIC v ředění dvojnásobně geometrické řady.

**Tabulka 2: VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ CITLIVOSTI KMENE 5 *STREPTOCOCCUS PNEUMONIE***

Antibiotikum	Zdroj	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)		Správné výsledky		
		obsah disku µg	limit pro citlivé kmeny	rozsmezí hodnot naměřených v NRL*	limit pro citlivé kmeny	rozsmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie	počet laboratoří	%
chloramfenikol	EUCAST [1]	30	≥ 21	21 - 22	8	4 - 4	C	121/121	100,0
	CLSI [2]				4				
penicilin	EUCAST [1]	ND	ND	NV	***	1 - 1	nehodnotí se		
	CLSI [2]								
oxacilin	EUCAST [1]	1	≥ 20	7 - 8	ND	NV			
	CLSI [2]								

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; \* 5 měření diskovou difúzní metodou, \*\* 5 měření diluční mikrometodou;; ND: neudáno; NV: nevyšetřeno; C: citlivý.

\*\*\* není-li udán původ kmene, pak kmeny s MIC ≤ 0,063 mg/l jsou citlivé, s MIC 0,125 - 2 mg/l jsou intermediárně rezistentní a kmeny s MIC > 2 mg/l jsou rezistentní; je-li znám původ kmene, pak citlivé jsou kmeny z meningitid s MIC ≤ 0,063 mg/l a z pneumonií s MIC ≤ 2 mg/l.

**Tabulka 3: MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE (MIC) PENICILINU VYŠETŘENÉ LABORATOŘEMI**

Penicilin	Počet laboratoří		rozsmezí MIC penicilinu naměřená laboratořemi
	absolutní	%	
MIC	113	93,4	0,25 – 8 mg/l
MIC nevyšetřeno	8	6,6	–
Celkem	121	100,0	–

**ZÁVĚR**

Chybné výsledky u kmene 4, který pět laboratoří označilo jako citlivý k ceftazidimu, mohly být způsobeny použitím disku s obsahem 30 µg, kolem kterého kmen vytvářel inhibiční zóny větší než limit (tabulka 1, data NRL). Vyšetření MIC, nebo použití disku s obsahem 10 µg (jak doporučuje EUCAST) však jednoznačně kategorizovalo kmen jako rezistentní k tomuto antibiotiku.

Osm laboratoří nevyšetřilo MIC kmene 5 *Streptococcus pneumoniae*. **Toto vyšetření je naprosto nezbytné u kmenů z validních vzorků od pacientů s pneumonií, které vytvářejí inhibiční zóny kolem disku s 1 µg oxacilinu menší než 20 mm** (u meningitid jsou všechny tyto kmeny rezistentní). **Nevyšetřením MIC penicilinu se zbytečně ztrácí informace o použití tohoto antibiotika volby i u pneumonií způsobených tzv. intermediárně rezistentními kmeny, které jsou inhibovány koncentracemi penicilinu v rozsmezí 0,125 – 2 mg/l.**

Podle NRL i 49 % laboratoří (n = 55) byl růst kmene 5 inhibován 1 mg/l penicilinu. Ostatní laboratoře naměřily široké rozsmezí MIC (0,25 – 8 mg/l). I když žádná laboratoř nenaměřila koncentraci penicilinu v citlivé kategorii (MIC ≤ 0,063 mg/l), laboratoře které naměřily extrémní hodnoty, by se měly důrazně zaměřit na vnitřní kontrolu kvality. Čtyři laboratoře získaly dokonce výsledek MIC > 2 mg/l (tři laboratoře 4 mg/l, jedna 8 mg/l), a tím chybně vyloučily možnost použití penicilinu v příslušných dávkách

(nebo amoxicilin) u pneumonie. Další chybou zjištěnou u jedné laboratoře je uvedení nesprávné koncentrace antibiotika v µg/l místo mg/l.

#### LITERATURA

[1] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0, valid from 1.1.2012; dostupné na [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/Breakpoint\\_table\\_v\\_2.0\\_120221.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_2.0_120221.pdf)

[2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. CLSI Document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, Pa, 2012.

*Mgr. Renáta Kolínská*  
*ing. Monika Marejková*  
*RNDr. Pavla Urbášková, CSc.*  
*MUDr. Helena Žemličková, PhD.*  
*SZÚ – CEM*