

EHK – 753 Bakteriologická diagnostika

Renáta Kolínská, Daniela Dědičová, Pavla Urbášková

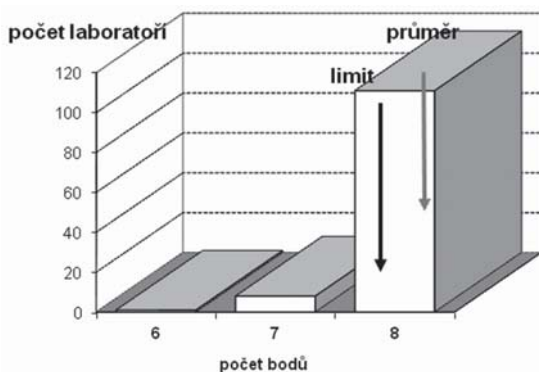
1. PŘÍPRAVA VZORKU

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 agaru 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 122 laboratořím, 120 laboratořím 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 111, tj. 92,5 % laboratořím. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,305 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $7,917 - (2 \times 0,306) = 7,305$). Tohoto limitu dosáhlo 111 laboratořím, 9 laboratořím tento limit nespĺnilo.

4. VÝSLEDKY ZÚČASTNĚNÝCH LABORATOŘÍ

Vzorek 1: Izolát ze sputa od pacienta s cystickou fibrózou

Odpověď: *Stenotrophomonas maltophilia*

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	119	2	99,2%
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	1	2	0,8%
Celkem	120		100%

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

Všechny laboratoře s výjimkou jedné označily kmen validním jménem *Stenotrophomonas maltophilia*, 1 laboratoř použila nesprávné (resp. dnes již nepoužívané) rodové jméno. Tato bakterie byla poprvé popsána v 60. letech minulého století jako *Pseudomonas maltophilia*, v roce 1983 byla přerazena do rodu *Xanthomonas*, následně pak v roce 1993 do rodu *Stenotrophomonas* jako jediný jeho zástupce [1]. Je pozoruhodné, že ani po 19 letech některé laboratoře toto rodové jméno dosud nezaznamenaly. Nicméně všem laboratořím byly přiznány 2 body.

LITERATURA

- [1] Borriello S.P., Murray P.R., Funke G. (eds): Topley & Wilsons Bacteriology, Volume 2, 10th edition, ASM Press, Washington, DC, 2005

Vzorek 2: Stěr z kůže od diabetika s bérčovým vředem

**Odpověď: *Staphylococcus aureus*
+ *Streptococcus pyogenes***

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Streptococcus pyogenes</i>	116	2	96,7%
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	1	1,7%
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	1	1,7%
Celkem	120		100%

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

116 laboratořím označilo správně oba patogeny a získalo plný počet bodů, 2 laboratoře určily jako původce pouze *Staphylococcus aureus*, 2 laboratoře označily jako vyvolávající agens pouze *Streptococcus pyogenes*, tyto laborato-

ře získaly po bodu. *S. aureus* a pyogenní streptokok jsou obvyklými původci kožních infekcí a bývají často izolováni i ve smíšených kulturách.

Vzorek 3: Stoolice od pacienta s vodnatým průjemem a zvracením
Odpověď: <i>Salmonella Infantis</i> 6,7:r:1,5
Vzorek dále obsahoval: <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Salmonella Infantis</i>	115	2	95,8%
<i>Salmonella</i> 6,7,8:H:r	1	1	0,8%
<i>Salmonella</i> sp. O antig 6,7	1	1	0,8%
<i>Salmonella</i> sk. C1	1	1	0,8%
<i>Salmonella</i> spp.	1	1	0,8%
<i>Salmonella</i> sp.	1	1	0,8%
Celkem	120		100%

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

Systém národního hlášení EPIDAT vykazuje sérotyp *Salmonella Infantis* nepřetržitě od roku 1994 jako třetí nejčastější v prevalenci (na prvním místě je trvale *S. Enteritidis*, na druhém *S. Typhimurium* včetně monofázické varianty). Jeho identifikace klinickými laboratořemi je proto rutinní záležitostí a často je rovněž zařazován do EHK. Spolehlivě jej identifikovalo 95,8 % zúčastněných laboratoří, což je o 6 % resp. 8,5 % více, než v roce 2004 a 2008. Podobný výsledek byl však zaznamenán v rámci EHK v roce 2001 (97 %).

Pouze pět laboratoří nedospělo tentokrát k detailní typizaci. Dvě laboratoře se spokojily s rodovým zařazením, další tři se somatickou O antigenní skupinou C (O 6,7,8) a jedna laboratoř došla k požadovanému zařazení ke konkrétní O skupině 6,7.

Jen v jednom z pěti výše uvedených případů laboratoř navíc vyhodnotila téměř bezchybně bičíkové antigeny 1. i 2. fáze a doplnila dostatečným komentářem, přesto 2 body nebyly přiznány, protože zároveň nedošlo ke specifikaci antigenu O 7 (jen k obecnému přiřazení do skupiny 6,7,8).

Celkový výsledek svědčí o dlouhodobě dobré úrovni typizace běžných salmonel klinickými laboratořemi, alespoň co se týká „top 5“ sérotypů v prevalenci v ČR.

Pětici nejčastějších salmonel za pětileté období 2007 až 2011 doplňují ještě *S. Newport* a *S. Kentucky*, těsně následovány *S. Virchow* a *S. Hadar*. Všechny tyto sérotypy čítají za uvedené období 101 až 115 hlášených případů. Pořadí sérotypů tudíž mohou ovlivnit nepřesnosti v hlášení a konkrétní epidemiologická situace.

Vzorek 4: Izolát z hemokultury od pacienta z JIP

Odpověď: *Staphylococcus epidermidis*

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	119	2	99,2%
<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	1	1	0,8%
Celkem	120		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 oxacilinu a ke ko-trimoxazolu. Kmen 4 je *Staphylococcus epidermidis*, rezistentní k oxacilinu a citlivý ke ko-trimoxazolu. Všechny laboratoře s výjimkou jedné identifikovaly kmen 4 správně. Celkové výsledky vyšetření citlivosti jsou v tabulce 1, která obsahuje limitní hodnoty průměrů inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro citlivé kmeny koaguláza-negativních stafylokoků, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 1: VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ CITLIVOSTI KMENE 4 *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

Antibiotikum	Zdroj	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)		Správné výsledky		
		obsah disku µg	limit pro citlivé kmeny	rozmezí hodnot naměřených v NRL*	limit pro citlivé kmeny	rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie	počet laboratoří	%
oxacilin	EUCAST [1]	ND	ND	NV	<= 0,25	8 - 16	R	120	100,0
	CLSI [2]								
cefoxitin	EUCAST [1]	30	>= 25	17 - 19	ND	NV	C	120	100,0
	CLSI [2]								
ko-trimoxazol	EUCAST [1]	25	>= 17	28 - 29	<= 2*** (<= 32)	0,063 - 0,063*** (2 - 2)	C	120	100,0
	CLSI [2]		>= 16						

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; * 5 měření diskovou difúzní metodou; ** 5 měření diluční mikrometodou;

*** vztaženo na trimethoprim (poměr trimethoprimu a sulfonamidu v ko-trimoxazolu je 1:19; v závorce je výsledek při vztažení na sulfonamid);

C: citlivý; R: rezistentní.

Vzorek 5: *Acinetobacter baumannii*

Požadavek byl vyšetřit citlivost k meropenemu, kolistinu a amikacinu. Kmen 5 byl citlivý k meropenemu a amikacinu a rezistentní ke kolistinu. Laboratoře správně vyšetřily citlivost k amikacinu, jedna laboratoř chybovala u meropenemu a sedm u kolistinu. 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 acinetobakterů, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

ZÁVĚR

V této sérii EHK dosáhly laboratoře velmi dobré výsledky vyšetření citlivosti u obou kmenů a příslušných antibiotik s výjimkou kolistinu. Chybné výsledky byly pravděpodobně způsobeny použitím diskové difuzní metody, která **není spolehlivá** pro vyšetření citlivosti ke kolistinu a proto ji EUCAST ani CLSI neuvádí.

Tabulka 2: VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ CITLIVOSTI KMENE 5 ACINETOBACTER BAUMANNII

Antibiotikum	Zdroj	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)		Správné výsledky		
		obsah disku µg	limit pro citlivé kmeny	rozmezí hodnot naměřených v NRL*	limit pro citlivé kmeny	rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie	počet laboratoří	%
meropenem	EUCAST [1]	10	>= 21	25 - 26	<= 2	0,5 - 0,5	C	119	99,2
	CLSI [2]		>= 16		<= 4				
kolistin	EUCAST [1]	ND	ND	NV	<= 2	>32 - >32	R	113	94,2
	CLSI [2]								
amikacin	EUCAST [1]	30	>= 18	27 - 28	<= 8	0,5 - 0,5	C	120	100,0
	CLSI [2]		>= 17		<= 16				

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

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
- [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.

Renáta Kolínská
CNCTC, SZÚ - CEM

Pavla Urbášková
NRL pro ATB, SZÚ - CEM

Daniela Dědičová
NRL pro salmonely, SZÚ - CEM