

EXTERNÍ HODNOCENÍ KVALITY

EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT

EHK – 933 Bakteriologická diagnostika

Renáta Šafránková, Monika Marejková, Petr Petráš, Pavla Urbášková

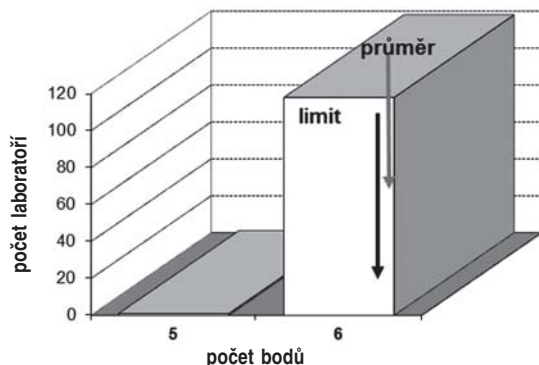
PŘÍPRAVA VZORKU

Kultury bakterií jsou před použitím rozmrazeny, lyofilizované kultury rehydratovány živným bujónem a poté naočkovány na živná média a inkubovány v termostatu při teplotě 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 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 zmražení vzorků provedena vlastní lyofilizace (SOP-NRL/CNCTC-03 a SOP-NRL/CNCTC-09). Lahvičky jsou skladovány v chladničce při teplotě 4–8 °C.

HODNOCENÍ

Celkem byly vzorky rozeslány 119 laboratořím, všechny laboratoře odeslaly výsledek do závěrečného termínu. Za identifikaci signifikantního patogena ve 3 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 6 bodů, jeden vzorek byl edukativní; za vyšetření citlivosti mohly laboratoře obdržet celkem 6 bodů (vzorek 4 a 5). Hodnocení vyšetření citlivosti je pouze orientační a toto bodové ohodnocení se nezapočítává do limitu nutného pro úspěšné absolvování série EHK. 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 118, tj. 99,2 % laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl

5,81 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $5,99 - (2 \times 0,092) = 5,81$). Tohoto limitu dosáhlo 118 laboratoří, 1 laboratoř tento limit nesplnila.

VÝSLEDKY ZÚČASTNĚNÝCH LABORATOŘÍ

Vzorek 1: Hnis od 5letého dítěte po paracentéze

Odpověď: *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*

Vzorek dále obsahoval: *Streptococcus oralis*

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i>	118	2	99,2 %
<i>Branhamella catarrhalis</i> + <i>Streptococcus</i> sp.	1	1	0,8 %
Celkem	119		100 %

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

Všechny laboratoře vyjma jedné odpověděly správně a získaly po dvou bodech. Jedna laboratoř do výsledku identifikace zahrnula i komenzála a získala jeden bod.

Vzorek 2: Izolát z moče od pacienta z JIP

Odpověď: *Serratia marcescens*

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Serratia marcescens</i>	119	2	100 %
Celkem	119		100 %

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

Všechny zúčastněné laboratoře identifikovaly signifikantního patogena správně a získaly tak po 2 bodech.

**Vzorek 3: Edukativní vzorek (vzorek se nehodnotí).
Stolice od 20letého muže s bolestmi břicha
a febriliemi**

Odpověď: *Yersinia pseudotuberculosis*

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	112	-	94,1 %
žádný výsledek	7	-	5,9 %
Celkem	119		100 %

Yersinia pseudotuberculosis a patogenní biotypy *Y. enterocolitica* patří k původcům zoonóz. Humánní onemocnění vyvolaná těmito dvěma druhy yersinií se primárně manifestují jako gastroenteritida po konzumaci kontaminované vody či potravin. *Y. pseudotuberculosis* může způsobovat mezenterická lymfadenitida a terminální ileitidu klinicky imitující apendicitidu; u imunitně oslabených jedinců může mít infekce systémový charakter s klinickými příznaky sepse. Dlouhodobé následky zahrnují erythema nodosum, Reiterův syndrom, nefritidu [1].

Y. pseudotuberculosis je Gram-negativní tyčka dobře rostoucí na většině běžných kultivačních médií, včetně Columbia, MacConkey a čokoládového agaru, při teplotách 25 a 35 °C za 24–48 hodin. Je spolehlivě identifikovatelná do druhu, jak použitím MALDI-TOF MS, tak pomocí komerčních biochemických sestav ENTEROtest 24 a ENTEROtest 24 new (Erba Lachema). ENTEROtest inkubován dle návodu při 37 °C může vykazovat velmi slabou pozitivitu až negativitu u testu trehalóza, inkubace při pokojové teplotě dává pozitivní reakci odpovídající typické vlastnosti druhu [1,2]. Zasláný kmen správně určilo do druhu všech 112 laboratoří, které edukativní vzorek hodnotily.

Yersiniózy vyvolané *Y. enterocolitica* a *Y. pseudotuberculosis* jsou hlášeny do evropského systému TESSy, kde patří k prioritám programu surveillance Food-and waterborne diseases. Více než 95 % enterických forem yersinióz v EU je spojováno s nálezem *Y. enterocolitica*. V letech 2010 až 2012 bylo do TESSy nahlášeno celkem 298 případů infekce *Y. pseudotuberculosis*, přičemž až 85 % pacientů patřilo do věkové kategorie starších než 25 let [3]. V roce 2015 byl v České republice zaznamenán jeden případ infekce *Y. pseudotuberculosis*.

LITERATURA

[1] Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G, Pfaller MA, Landry ML, Richter SS, Warnock DW. Manual of clinical microbiology 11th Edition. ASM press, Washington, DC 2015. doi:10.1128/9781555817381.

[2] AHM, příloha č. 17/1982. Standardní metoda laboratorní diagnostiky nálezů vyvolaných *Yersinia pseudotuberculosis*.

[2] Surveillance of seven priority food- and waterborne diseases in the EU/EEA 2010-2012. ECDC surveillance report, Stockholm, April 2015.

Poděkování ing. H. Šebestové (Odd. biostatistiky, SZÚ) za poskytnutí dat z EPIDATu a MUDr. V. Jindrákovi (NRC HAI, SZÚ) za kritické připomínky ke komentáři tohoto vzorku.

Vzorek 4: Izolát z krve od pacientky s komunitní pneumonií

Odpověď: *Staphylococcus aureus*

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Staphylococcus aureus</i>	62	2	52,1%
<i>Staphylococcus aureus</i> ssp. <i>aureus</i>	1	2	0,8%
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	52	2	43,7%
<i>Staphylococcus aureus</i> ssp. <i>aureus</i> (MRSA)	1	2	0,8%
<i>Staphylococcus aureus</i> (komunitní MRSA)	1	2	0,8%
MRSA	2	2	1,7%
Celkem	119		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 oxacilinu, klindamycinu a kotrimoxazolu. Kmen 4 *Staphylococcus aureus* je rezistentní k oxacilinu a citlivý ke klindamycinu a kotrimoxazolu. Z celkového počtu 119 zúčastněných laboratoří jich 117 jako výsledek identifikace správně uvedlo *Staphylococcus aureus*, dvě laboratoře označily tento kmen pouze jako MRSA.

Jeden z hlavních humánních patogenů, *Staphylococcus aureus*, se celým taxonomickým názvem jmenuje *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. Protože se však druhý, anaerobní poddruh, *S. aureus* subsp. *anaerobius*, nalézá jako patogen pouze u ovcí, používá se v lékařské mikrobiologii běžně jen druhový název.

Velice často se vyskytuje i zkratka MRSA pro meticylin-rezistentní kmeny *S. aureus*. Je to historické označení, v dnešní době se antibiotikum meticylin nepoužívá ani v terapii, ani v diagnostice MRSA.

Identifikace „zlatého stafylokoka“ nečinila problém, nicméně pro příště bude v identifikaci akceptován pouze správný druhový název, nikoliv zkratka.

Všechny laboratoře měly správné výsledky vyšetření citlivosti ke všem třem požadovaným antibiotikům. Celkové výsledky vyšetření citlivosti u kmene ze vzorku 4 jsou v tabulce 1, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) cefoxitinu, oxacilinu, klindamycinu a kotrimoxazolu pro citlivé kmeny *S. aureus*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika, a výsledky laboratoří.

Vzorek 5: *Haemophilus influenzae*

Požadavek byl vyšetřit citlivost kmene ze vzorku 5 k ampicilinu a k tetracyklinu a odpovědět na otázku, zda kmen produkuje beta-laktamázu. Kmen byl k ampicilinu rezistentní, k tetracyklinu citlivý a neprodukoval beta-laktamázu. Správné výsledky vyšetření citlivosti k ampicilinu uvedlo 116 laboratoří a k tetracyklinu 118 laboratoří. Jed-

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

Antibiotikum	Zdroj	Obsah disku μg	Průměry IZ (mm)		MIC (mg/l)		Správné výsledky		
			breakpoint pro citlivé kmeny	rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint pro citlivé kmeny	rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie	počet laboratoří	%
cefoxitin	EUCAST [1]	30	≥ 22	6-6	≤ 4	NT	R	119/119	100,0
	CLSI [2]								
oxacilin	EUCAST [1]	ND	NT	≤ 2	$> 8 - > 8$				
	CLSI [2]								
klindamycin	EUCAST [1]	2	≥ 22	28-28	$\leq 0,25$	0,125 - 0,125			
	CLSI [2]		≥ 21		$\leq 0,5$				
kotrimoxazol	EUCAST [1]	25	≥ 17	31-32	$\leq 2^{***}$	$\leq 0,25 - \leq 0,25^{***}$	C	119/119	100,0
	CLSI [2]		≥ 16						

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; * 5 měření diskovou difúzní metodou; ** 5 měření diluční mikrometodou; *** vztaženo na trimethoprim; ND: neudáno; NT: nevyšetřeno; R: rezistentní; C: citlivý.

Tabulka 2: VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ CITLIVOSTI KMENE 5 *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*

Antibiotikum	Zdroj	Obsah disku μg	Průměry IZ (mm)		MIC (mg/l)		Správné výsledky		
			breakpoint pro citlivé kmeny	rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint pro citlivé kmeny	rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie	počet laboratoří	%
penicilin	EUCAST [1]	1 J	≥ 12	6-6	ND	NT	R	116/119	97,5
	CLSI [2]								
ampicilin	EUCAST [1]	2	≥ 16	6-6	≤ 1	2 - 4			
	CLSI [2]	10	≥ 22	21-22					
tetracyklin	EUCAST [1]	30	≥ 25	30-31	≤ 1	0,25 - 0,25	C	118/119	99,2
	CLSI [2]		≥ 29		≤ 2				

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

na laboratoř nesprávně označila kmen 5 jako producenta beta-laktamázy. Celkové výsledky vyšetření citlivosti u kmene 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) penicilinu, ampicilinu a tetracyklinu pro citlivé kmeny hemofilů, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika, a výsledky laboratoří.

ZÁVĚR

Výsledky vyšetření citlivosti ke třem požadovaným antibiotikům u kmene *Staphylococcus aureus* ze vzorku 4 uvedly všechny laboratoře správně. Chybné výsledky vyšetření citlivosti kmene 5 se vyskytly ojediněle. Je třeba zdůraznit, že disk s 1 J penicilinu odhaluje spolehlivější neenzymatickou rezistenci k ampicilinu než vyšetření MIC ampicilinu nebo disk ampicilinu.

LITERATURA

- [1] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, valid from 2016-01-01 [online]. Dostupný z WWW: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/, český překlad dostupný z WWW: <http://www.szu.cz/tabulky-breakpointu-eucast>
- [2] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, Pa. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.

Mgr. Renáta Šafránková
CNCTC – SZÚ, CEM
Ing. Monika Marejková PhD.
RNDr. Petr Petráš CSc.
Oddělení SABI. SZÚ-CEM
RNDr. Pavla Urbášková CSc.
NRL pro ATB