

## EHK – 761 Bakteriologická diagnostika

*Renáta Kolínská, Monika Marejková, Pavla Urbášková, Jana Zavadilová*

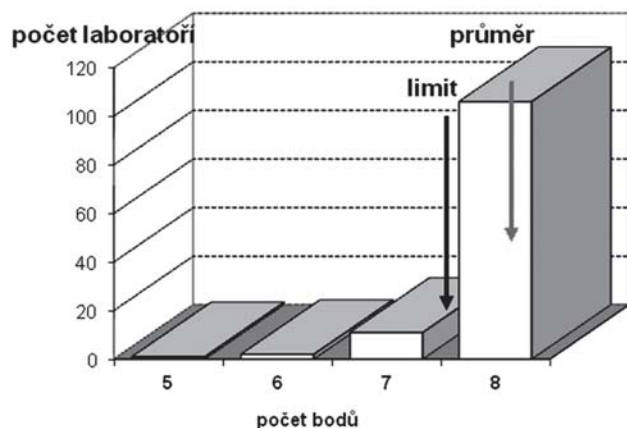
### PŘÍPRAVA VZORKU

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 lahviček 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.

### HODNOCENÍ

Celkem byly rozeslány vzorky 121 laboratořím, 120 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 106, tj. 88,3 % laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 6,928 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné

odchylky, tj.  $7,85 - (2 \times 0,461) = 6,928$ ). Tohoto limitu dosáhlo 117 laboratoří, 3 laboratoře tento limit nesplnily.

### VÝSLEDKY ZÚČASTNĚNÝCH LABORATOŘÍ

#### Vzorek 1: Nasofaryngeální výtěr od dítěte se štěkavým kašlem

**Odpověď:** *Bordetella pertussis*

Vzorek dále obsahoval: *Streptococcus oralis*

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Bordetella pertussis</i>	111	2	92,5%
<i>Bordetella sp.</i>	4	1	3,3%
<i>Bordetella parapertussis</i>	2	1	1,7%
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	2	1	1,7%
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	1	0	0,8%
Celkem	120		100%

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

Většina laboratoří (111 ze 120, tj. 92,5 %) identifikovala kmen správně jako *Bordetella pertussis*. Nesprávně identifikovalo kmen 5 laboratoří, z nichž dvě určily kmen jako *Bordetella parapertussis*, dvě další jako *Bordetella bronchiseptica*, 1 laboratoř jako *Corynebacterium ulcerans*. 4 laboratoře kmen nedourčily a označily vzorek jako *Bordetella sp.*

Pokud se jedná o nedourčení kmene (*Bordetella sp.*) a záměnu *Bordetella pertussis* s *Bordetella parapertussis* lze předpokládat, že laboratoře nepoužily ke konečné identifikaci patřičná diagnostická séra (aglutinační séra *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*; Remel).

Identifikační postup není obtížný. Vyžaduje použití vhodných kultivačních půd: Charcoal agar nebo Bordet-Gengou agar. Důležité je pH půdy, které má být upraveno na  $7,4 \pm 0,2$  a minimálně 7denní kultivace v termostatu při 35–36 °C. Diferenciální diagnostika rodu *Bordetella* je uvedena v tabulce 1.

#### Vzhled kolonií na Bordet-Gengou agaru:

*Bordetella pertussis* vyrůstá za 48 hodin, častěji však za 72 hodin v drobných (do 0,5 mm) hladkých, stříbřitých koloniích, které se nepohybují při dotyku kličkou, ale rozetrou se. Po delší inkubaci se kolonie zvětšují až na 2 mm, někdy může být viditelná slabá zóna hemolýzy.

*Bordetella parapertussis* vyrůstá za 48 hodin, kolonie jsou větší (1–2 mm), šedostříbrné s výraznou zónou he-

molýzy a tmavým černohnědým pigmentem v okolí kolonie. Po delší inkubaci kolonie narůstají až do velikosti 3 mm a vypadají jako vpadlé do půdy. Nepohybují se po plotně při doteku kličkou.

*Bordetella bronchiseptica* vyrůstá za 24 hodin v drobných koloniích podobných druhu *Bordetella pertussis*.

#### Vzhled kolonií na Charcoal agaru:

*Bordetella pertussis* vyrůstá za 48 hodin, častěji však za 72 hodin v drobných, hladkých, šedých a velmi lesklých koloniích, které vypadají jako „kapky rosy“.

*Bordetella parapertussis* vyrůstá za 48 hodin, kolonie jsou podobné druhu *Bordetella pertussis*, ale jsou větší a šedivější. Po delší inkubaci vypadají kolonie jako vpadlé do půdy.

*Bordetella bronchiseptica* vyrůstá za 24 hodin ve větších koloniích, pro které je charakteristický nepříjemný – „hnilobný“ zápach.

Tabulka 1: DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTIKA RODU *BORDETELLA*

	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>
Pohyblivost	-	-	+
Oxidázový test	+	-	+
Produkce ureázy	-	+	+
Redukce nitrátů	-	-	+

- negativní + pozitivní

<b>Vzorek 2: Izolát z excidované tkáně od veterinárního pracovníka s rannou infekcí</b>
<b>Odpověď: <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i></b>

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	119	2	99,2%
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	1	0	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.

Většina laboratoří identifikovala správně druh mikroba a získala tak plný počet bodů.

Rod *Erysipelothrix* v současnosti sestává z 3 druhů: *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *E. tonsillarum* a *E. inopinata*.

*E. rhusiopathiae* je grampozitivní nesporulující nepohyblivá tyčka, kataláza i oxidáza negativní, nehydrolyzuje eskulin, produkuje H<sub>2</sub>S; lépe roste v prostředí s 5–10 % CO<sub>2</sub>. Je znám jako příčina nemoci zvané červenka u prasat (*rhusiopathia suis*), u lidí se projevuje jako erysipeloid - kožní infekce nejčastěji prstů nebo rukou (nutno odlišit od erysipelu způsobeného *Streptococcus pyogenes*).

*E. tonsillarum* byl izolován z krčních mandlí zdravých prasat. Jako třetí druh pak byl v roce 2004 popsán *Erysipelothrix inopinata*, který se podařilo izolovat během sterilní filtrace rostlinného peptonového media [1].

#### LITERATURA

- [1] Verborg S, Rheims H, Emus S, Frühling A, Kroppenstedt RM, Stackebrandt E, Schumann P. *Erysipelothrix inopinata* sp. nov., isolated in the course of sterile filtration of vegetable peptone broth, and description of *Erysipelotrichaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54(Pt 1):221-5 (2004).

#### Vzorek 3: Stoličky od 4letého dítěte s průjmem s příměsí krve, hlenu a horečkou

#### Odpověď: *Yersinia enterocolitica*

Vzorek dále obsahoval: *Escherichia coli*,  
*Enterococcus faecalis*

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Yersinia enterocolitica</i>	120	2	100%
Celkem	120		100%

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

Rod *Yersinia* patří do čeledě *Enterobacteriaceae*. Je známých 17 druhů, z toho dva enteropatogenní pro člověka – *Y. pseudotuberculosis* a *Y. enterocolitica*. (Hlavním patogenem rodu je samozřejmě *Yersinia pestis*, původce moru.) Yersiniózy se nejčastěji vyskytují jako sporadické případy, ale byly popsány i klastry případů či epidemie [1]. Aktuálně byl v ČR zaznamenán hromadný výskyt gastroenteritidy, vyvolané kmenem *Y. enterocolitica* v Dětské psychiatrické léčebně, kde onemocnělo 62 osob po konzumaci zkontaminované masové pomazánky [2]. Zdrojem nákazy yersinií bývá kontaminované jídlo či voda, méně často přímý kontakt s infikovaným zvířetem. Typickým klinickým obrazem je enterokolitida, nejběžnější sekundární komplikací je reaktivní artritida a erythema nodosum. *Yersinia enterocolitica* je třetím nejčastějším bakteriálním původcem průjmů v Evropě s incidencí 1,65 na 100 000 obyvatel [1].

K specifické izolaci kmenů *Yersinia* z humánních vzorků se využívá semi-selektivní médium známé pod názvem CIN (Cefsulodin-irgasan-novobiocin) agar. Toto médium, kromě inhibice jiných enterobakterií, může potlačovat také nárůst kmenů *Y. pseudotuberculosis*.

Na rozdíl od jiných enterobakterií, yersinie rostou pomaleji, s optimem růstové teploty 28 °C [1]. Při primární izolaci *Y. enterocolitica* z klinických vzorků se proto kultivace na CIN agaru provádí při nižších teplotách, 22–26 °C, 48 hodin nebo 32 °C, 24 hodin. Po 48 hodinách jsou narostlé typické kolonie *Y. enterocolitica* o průměru 1–2 mm s ostře ohraničeným tmavě růžovým středem obklopeným průhlednou bezbarvou zónou s neporušeným okrajem.

Všech 120 laboratoří zařadilo patogena správně.

#### LITERATURA

- [1] Savin C, Leclercq A, Carniel E. Evaluation of a Single Procedure Allowing the Isolation of Enteropathogenic *Yersinia* along with Other Bacterial Enteropathogens from Human Stools. *PLoS ONE* 2012; 7(7) e41176.

- [2] Moravcová R. Epidemie gastroenteritidy, vyvolaná kmenem *Yersinia enterocolitica* v Dětské psychiatrické léčebně Opařany. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2012; 21(10): 342–345.  
 [3] Bockemühl J, Wong JD. *Yersinia* in: Murray PR, et al. 8th Edition Manual of Clinical Microbiology 2003; str. 672–683. ASM Press, Washington, DC 20036-2904

**Vzorek 4: Izolát z hemokultury od pacienta se sepsí**  
**Odpověď: *Enterococcus gallinarum***

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Enterococcus gallinarum</i>	114	2	95%
<i>Enterococcus faecium</i>	2	1	1,7%
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	2	1	1,7%
<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	1	1	0,8%
<i>Enterococcus faecalis</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, vyšetřit jeho citlivost k vankomycinu a zjistit, zda je rezistentní k vysoké koncentraci gentamicinu. Kmen 4 je *Enterococcus gallinarum*, rezistentní k vankomycinu, který není rezistentní k vysoké koncentraci gentamicinu. EHK-761 se zúčastnilo 120 laboratoří, z nich šest chybovalo v dru-

hovém názvu kmene 4 (viz tabulka výše). Dvě laboratoře chybně označily kmen jako citlivý k vankomycinu a jediná laboratoř nevedlo požadovanou správnou odpověď NE na dotaz, zda je kmen rezistentní k vysoké koncentraci gentamicinu. Výsledky vyšetření citlivosti k vankomycinu jsou v tabulce 1, která obsahuje limitní hodnoty průměrů inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro citlivé enterokoky, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří. Tabulka 2 obsahuje limitní průměry inhibičních zón (IZ), minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro kmeny s vysokou rezistencí ke gentamicinu a počet laboratoří se správnou odpovědí.

**Vzorek 5: *Escherichia coli***

Požadavek byl vyšetřit citlivost k cefotaximu, gentamicinu a odpovědět na otázku, zda kmen produkuje širokospektrou beta-laktamázu (ESBL). Kmen 5 byl rezistentní k cefotaximu, citlivý ke gentamicinu a produkoval ESBL. Všechny laboratoře správně hodnotily kmen 5 jako rezistentní k cefotaximu, jedna laboratoř chybně označila kmen jako rezistentní ke gentamicinu, a s výjimkou dvou ostatní laboratoře správně odpověděly ANO na otázku, zda je kmen producentem ESBL. Celkové výsledky vyšetření citlivosti jsou v tabulce 3, která obsahuje limitní hodnoty průměrů inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) obou antibiotik pro kmeny gramnegativních tyčů, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a počet správných odpovědí laboratoří na otázku, zda kmen 5 je producent ESBL.

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

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	%
vankomycin	EUCAST [1]	5	≥ 12	11 - 11	≤ 4	4 - 4	R (IR)	118	98,3
	CLSI [2]	30	≥ 17	15 - 16					

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; \* 5 měření diskovou difúzní metodou, \*\* 5 měření diluční mikrometodou; R: rezistentní; IR: intermediárně rezistentní.

Tabulka 1: LIMITNÍ HODNOTY PRO KMENY ENTEROKOKŮ S VYSOKOU REZISTENCÍ KE GENTAMICINU A VÝSLEDKY LABORATOŘÍ

Antibiotikum	Zdroj	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)		Správné výsledky		
		obsah disku µg	limit pro GEH	rozmezí hodnot naměřených v NRL*	limit pro GEH	rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie	počet laboratoří	%
gentamicin	EUCAST [1]	30	< 8	19 - 19	> 128	NV			
	CLSI [2]	120	6	21 - 22	> 500	≤ 500**			
Je kmen vysoce rezistentní ke gentamicinu?							NE	109	90,8

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; GEH: vysoká rezistence ke gentamicinu; \* 5 měření diskovou difúzní metodou, \*\* 3 krát skřínink na půdě s obsahem 500 mg/l gentamicinu; NV: nevyšetřeno.

Tabulka 3: 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	rozmezí hodnot naměřených v NRL*	limit pro citlivé kmeny	rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie	počet laboratoří	%
cefotaxim	EUCAST [1]	5	$\geq 20$	9 - 9	$\leq 1$	8 - 8	R	120	100,0
	CLSI [2]	30	$\geq 26$	17 - 18					
gentamicin	EUCAST [1]	10	$\geq 17$	15 - 16	$\leq 2$	1 - 2 mg/l	C	119	99,2
	CLSI [2]		$\geq 15$		$\leq 4$				
Je kmen producent ESBL?							ANO	118	98,3

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; \* 5 měření diskovou difuzní metodou, \*\* 5 měření diluční mikrometodou;

C: citlivý; R: rezistentní; ESBL: širokospektrá beta-laktamáza.

## ZÁVĚR

Ve snaze eliminovat potíže, které vznikají s interpretací citlivosti enterokoků k vankomycinu, zejména u kmenů s inherentní sníženou citlivostí k vankomycinu (jako je např. kmen 4), vypustil EUCAST ve své poslední verzi intermediární kategorii pro toto antibiotikum. Kmeny, které vytvářejí inhibiční zóny (IZ) < 12 mm kolem disku s 5  $\mu\text{g}$  vankomycinu, zařazuje EUCAST do kategorie rezistence, zatímco kmeny vytvářející IZ  $\geq 12$  mm jsou citlivé k tomuto antibiotiku [1]. Podobně je tomu u interpretace výsledků MIC, pro které EUCAST rovněž neuvádí rezistentní kategorii [1]. Výsledky laboratoří, které uvedly intermediární rezistenci, jsou **pro tuto sérii EHK** zařazeny do správných odpovědí.

Rezistence ke gentamicinu (a dalším aminoglykosidům) **v nízkém stupni je přirozená** u všech druhů enterokoků, neinterferuje však se synergickým účinkem při podávání kombinace aminoglykosidů s beta-laktamovými antibiotiky při léčbě závažných enterokokových infekcí. Proto se u enterokoků pátrá po vysoké rezistenci ke gentamicinu, která ve výše uvedené souvislosti vylučuje použití gentamicinu a ostatních aminoglykosidů (kromě streptomycinu) [1].

Správná odpověď je NE na otázku, zda je kmen rezistentní k vysoké koncentraci gentamicinu.

Vyšetření citlivosti a interpretace výsledků u kmene 5 nečinilo laboratořím potíže, ani správná odpověď ANO na otázku zda kmen produkuje ESBL, s výjimkou dvou laboratoří, z nichž jedna uvedla místo vyžádané formy odpovědi křížek.

## 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 two informational supplement. CLSI Document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, Pa, 2012.

*Mgr. Renáta Kolínská  
Ing. Monika Marejková  
RNDr. Pavla Urbášková, CSc.  
Mgr. Jana Zavadilová  
SZÚ - CEM*