

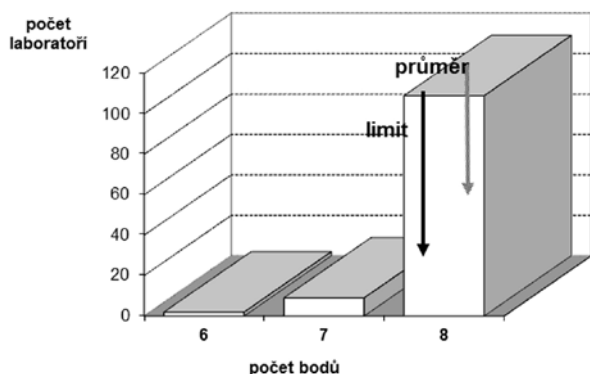
EHK – 1079 Bakteriologická diagnostika

Renáta Šafránková, Ondřej Daniel, Petr Petráš, Pavla Urbášková, Jana Zavadilová

HODNOCENÍ

Celkem byly vzorky rozeslány 120 laboratořím, všechny laboratoře odeslaly výsledek do závěrečného termínu. Za identifikaci signifikantního patogena ve 4 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 8 bodů. Bodování pro identifikaci bylo provedeno ve stupnici 2, 1 a 0 bodů. **Hodnocení (resp. bodování) vyšetření citlivosti, které bylo v předchozích sériích pouze orientační, se z technických důvodů již neprovádí (přechod na elektronické výsledky), k dispozici budou pouze komentované výsledky (vzorek 4 a 5).**

Graf 1: Počet bodů za správnou identifikaci



Maximálního počtu bodů při identifikaci dosáhlo 109, tj. 90,8% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,168 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $7,892 - (2 \times 0,362) = 7,168$). Tohoto limitu dosáhlo 109 laboratoří, 11 laboratoří tento limit nesplnilo.

Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1			
Nasofaryngeální výtěr od 4letého dítěte s dlouhotrvajícím kašlem			
Odpověď: <i>Bordetella pertussis</i> Vzorek dále obsahoval: <i>Streptococcus oralis</i>			
Identifikace	frekvence	body	procento
<i>Bordetella pertussis</i>	118	2	98,3 %
<i>Bordetella pertussis</i> + <i>Pasteurella multocida</i>	1	1	0,8 %
žádný výsledek (v komentáři <i>Strept. oralis</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 (118 ze 120, tj. 98,3 %) identifikovala kmen správně jako *Bordetella pertussis*. Pouze 1 laboratoř vzorek neurčila – nenašla ve vzorku patogena, hlásila pouze záchyt *Streptococcus oralis*. Jedna laboratoř u vzorku č. 1 uvedla, kromě *Bordetella pertussis* i záchyt *Pasteurella multocida*. Pravděpodobně zde došlo k přehození agens ze vzorku č. 2. Pouze 1 laboratoř doplnila, že by izolát *B. pertussis* poslala k ověření do NRL pro pertusi a difterii. Obracíme se proto na všechny diagnostikující mikrobiology, aby izoláty *Bordetella* spp. posílaly do NRL ke konfirmaci.

VZOREK 2

Stěr z rány po pokousání psem

Odpověď: *Pasteurella multocida* +
Staphylococcus pseudintermedius

Identifikace	frekvence	body	procento
<i>Pasteurella multocida</i> + <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	87	2	72,5 %
<i>Pasteurella multocida</i> + <i>Staphylococcus intermedius</i>	27	2	22,5 %
<i>Pasteurella multocida</i>	5	1	4,2 %
<i>Staphylococcus intermedius</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.

Pasteurella multocida je gramnegativní pleomorfní „kokotyčinka“, fakultativně anaerobní, kataláza i oxidáza-pozitivní. Patří mezi komenzály nasofaryngu především u koček a psů, u kterých není patogenní. Po zvířecím kousnutí vyvolává lokální infekce ran, které mohou být komplikovány i abscesy.

Staphylococcus pseudintermedius byl popsán teprve v roce 2005 [1] a je fenotypově i hmotnostní spektrometrií neodlišitelný od původního druhu *S. intermedius*, který popsal v roce 1976 prof. V. Hájek z Olomouce jako druhého koaguláza-pozitivního stafylokoků [2]. Obvykle se uvádí oba druhy ve dvojici *S. pseudintermedius*/*S. intermedius* (SPS/SIN). Kmeny se vyskytují na kůži a sliznicích zdravých zvířat. V případě poranění způsobují ranné infekce. Mohou být izolovány z humánního klinického materiálu – nejčastěji právě ze zhnisaných ran po kousnutí psem.

Oba druhy patří do skupiny koaguláza-pozitivních stafylokoků. Od nejdůležitějšího druhu *S. aureus* jdou fenotypově nejsnáze oddělit negativním testem na průkaz

hyaluronidázy. Latexový test na clumping-faktor je obvykle negativní. Výhodným morfologickým znakem je produkce beta-hemolyzinu, která se projevuje částečnou hemolýzou po prvním dnu kultivace v 36 °C. Po přechovávání při 4 °C přejde do 1–2 dnů v hemolýzu úplnou.

Oba druhy lze odlišit pouze pomocí genetických metod, jako jsou repetitivní PCR s primerem (GTG)₅ a PCR-RFLP. Ve spolupráci s brněnskou sbírkou CCM [3] a naší sbírkou CNCTC [4] byla provedena genotypizace téměř stovky kmenů SPS/SIN. Identifikace *S. intermedius* byla potvrzena pouze u 6 kmenů, z těch byl pouze jediný z humánního materiálu.

LITERATURA

- Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M, et al. Staphylococcus pseudintermedius sp.nov., a coagulase-positive species from animals. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005; 55: 1569–1573.
- Hájek V. Staphylococcus intermedius, a new species isolated from animals. *Int J Syst Bacteriol.* 1976; 26: 401–408.
- Petráš P, Švec P, Machová I. První záchyt Staphylococcus pseudintermedius z humánního klinického materiálu v České republice. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha).* 2010; 19(3): 65–67.
- Mališová L, Šafránková R, Kečliková J, Petráš P, Žemličková H, Jakubů V. Correct species identification (reclassification in CNCTC) of strains of Staphylococcus intermedius – group can improve an insight into their evolutionary history. *Fol. Microbiol.* 008; doi.org/10.1007/s12223-018-0647-7.

VZOREK 3
Stolice od 45letého pacienta s horečkou, průjemem a bolestmi břicha
Odpověď: <i>Salmonella enterica</i> susp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium monofázická 1,4,[5],12:i:- Vzorek dále obsahoval: <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>

Identifikace	frekvence	body	procento
<i>Salmonella</i> Typhimurium	79	2	65,8 %
<i>Salmonella</i> Typhimurium monofázická	34	2	28,3 %
<i>Salmonella</i> sp. sk. B 4,5 : i :-	1	2	0,8 %
<i>Salmonella</i> 4,5 : i :-	1	2	0,8 %
<i>Salmonella</i> group O:4 (B) tz. 4,5,12 : i	1	2	0,8 %
<i>Salmonella</i> sp. sk. B (4, 12: i : ?)	1	2	0,8 %
<i>Salmonella</i> sp.	3	1	2,5 %
Celkem	120		100 %

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

K sérotypizaci byla zvolena monofázická varianta *Salmonella* Typhimurium [antigenní struktura 1,4,[5],12:i:-].

Za období 2011–2017 je evidován významný vzestup této monofázické varianty. V roce 2017 byla třetím nejčastěji hlášeným sérotypem v EU [1]. V ČR na základě analýzy laboratorních dat odhadujeme četnost této monofázické varianty mezi 10–20 % ročně, což odpovídá 3.–4. místu v pořadí nejčetnějších sérotypů.

Pro tuto monofázickou variantu je typické, že postrádá druhou fázi flagelárního antigenu. Tato monofázická varianta vyvolala v posledních letech i několik významných epidemií (např. Francie, Itálie, Španělsko). Z tohoto důvodu je důležité rozlišovat mezi *Salmonella* Typhimurium a její monofázickou variantou a hlásit je odděleně.

Mimo to, kmeny monofázické varianty vykazují multirezistenci, kdy v ČR se nejčastěji vyskytuje rezistence k ampicilinu, sulfametoxazolu a tetracyklinu [2].

Dourčení antigenní struktury monofázické varianty *Salmonella* Typhimurium, lze úspěšně dosáhnout precizní sérotypizací. V případě, kdy se narazí na kmen postrádající druhou fázi flagelárního antigenu, je potřeba opakovaně ověřit (optimálně třikrát) nepřítomnost výše zmíněného flagelárního antigenu a následně striktně uplatňovat zjištěnou antigenní strukturu.

Další možnou variantou je provést pouze jedno testování flagelárního antigenu druhé fáze, a pokud je výsledek negativní, následně využít možnosti dourčení v Národní referenční laboratoři pro salmonely nebo sami provést PCR pro průkaz genu kódujícího druhou fázi flagelárního antigenu a mezigenové oblasti v rámci flagelinového genového klastru.

Z výsledků tohoto kola je patrné, že přesné dourčení monofázické varianty *Salmonella* Typhimurium je stále problematické.

LITERATURA

- FSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal.* 2018;16(12):5500, 262 pp.
- Žemličková a kol. Antibiotická rezistence u netyfových sérovarů *Salmonella* spp. v České republice. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie.* 2013; 62 (2):43, 7 pp.

VZOREK 4
Izolát z krve od pacienta s endokarditidou
Odpověď: <i>Enterococcus faecalis</i>

Identifikace	frekvence	body	procento
<i>Enterococcus faecalis</i>	119	2	99,2 %
<i>Enterococcus</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.

Požadavek byl určit signifikantního patogena izolovaného z krve od pacienta s endokarditidou, a vyšetřit jeho citlivost ke gentamicinu a k vankomycinu. Všechny laboratoře měly správné výsledky u vankomycinu a 103 laboratoří u gentamicinu; 14 laboratoří chybně uvedlo výsledek v kategorii "R" a tři v kategorii "I".

Celkové výsledky vyšetření citlivosti kmene ze vzorku 4 jsou v tabulce 1, která obsahuje breakpointy inhibičních

Tabulka 1: Výsledky vyšetření citlivosti kmene 4 *Enterococcus faecalis* z krve od pacienta s endokarditidou podle metody a breakpointů EUCAST [1]

Antibiotikum	Obsah disku µg	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky		
		breakpoint		rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie/abs.počet laboratoří		správné %
		C	R		C	R		C	R	
gentamicin***	30 µg	≥ 8	< 8	12–13	≤ 128	> 128	≤ 128–≤ 128	103	14	85,8
vankomycin	5 µg	≥ 22	< 16	6–6	≤ 4	> 4	> 32–> 32	0	120	100,0

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; * 5 měření diskovou difuzní metodou EUCAST, ** 5 měření diluční mikrometodou EUCAST; C: citlivost; R: rezistence; *** u gentamicinu se C a R se vztahuje k vysokým koncentracím; tři další laboratoře uvedly chybně kategorii "I"; správné výsledky jsou šedě zvýrazněny.

zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro citlivé a rezistentní izoláty enterokoků hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

VZOREK 5
<i>Staphylococcus aureus</i>

Kmen 5 je rezistentní k erytromycinu a podle výsledku D-testu má indukovanou rezistenci ke klindamycinu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti u kmene 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a MIC pro citlivé a rezistentní izoláty *S. aureus*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 2: Výsledky vyšetření citlivosti kmene 5 *Staphylococcus aureus* podle metody a breakpointů EUCAST [1]

Antibiotikum	Obsah disku µg	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky		
		breakpoint		rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie/abs.počet laboratoří		správné %
		C	R		C	R		C	R	
erytromycin	15 µg	≥ 21	< 18	6–6	≤ 1	> 2	> 8–> 8	0	120	100,0
klindamycin	2 µg	≥ 22	< 19	26–28	≤ 0,25	> 0,5	0,25–0,25	3	117	97,5

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; * 5 měření diskovou difuzní metodou EUCAST, ** 5 měření diluční mikrometodou EUCAST; C: citlivost; R: rezistence; správné výsledky jsou šedě zvýrazněny.

ZÁVĚR

Vzorek 4 obsahoval *Enterococcus faecalis* z krve od pacienta s endokarditidou. Předpokládalo se tudíž vyšetření přítomnosti vysoké rezistence ke gentamicinu, která inaktivuje synergickou aktivitu tohoto antibiotika s beta-laktamy nebo s vankomycinem používanou k léčbě enterokokových endokarditid. Příčinou poměrně značného počtu chybných výsledků vyšetření citlivosti u gentamicinu bylo pravděpodobně přehlédnutí uvedené diagnózy, která jednoznačně určuje metodu vyšetření citlivosti ke gentamicinu.

LITERATURA

1. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019-01-01. Dostupný z WWW:

http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/, český překlad <http://www.szu.cz/eucast-dokumenty?highlightWords=dokumenty+EUCAST>

Dne: 16. 8. 2019

Koordinátor:
Mgr. Renáta Šafránková
Tel: 267 082 124

Zprávu vypracovali:
Mgr. Renáta Šafránková,
Mgr. Ondřej Daniel,
RNDr. Petr Petráš CSc,
RNDr. Pavla Urbášková CSc,
Mgr. Jana Zavadilová