

EHK – 779 Bakteriologická diagnostika – vyhodnocení

Renáta Kolínská, Daniela Dědičová, Petr Petráš, Pavla Urbášková

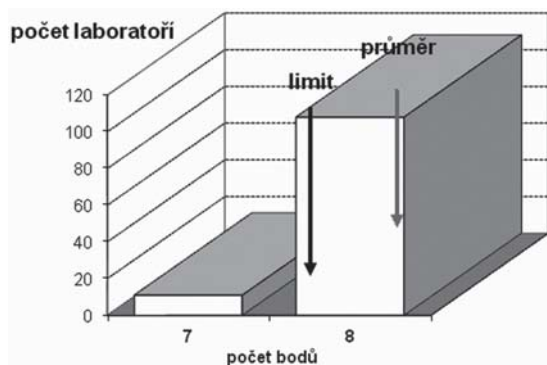
PŘÍPRAVA VZORKU

Kultury bakterií jsou před použitím rozmrazeny, lyofilizované kultury rehydratovány živným bujónem a poté naočkovány na živná média a inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C. U jednotlivých mikroorganismů byla ověřena identifikace (mikroskopie dle Grama, biochemická identifikace, identifikace metodou MALDI-TOF MS, 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 komezálních 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 rozeslány vzorky 120 laboratořím, 119 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 2 body (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 108, tj. 90,8 % laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,326 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. 7,908 – (2 x 0,291) = 7,326). Tohoto limitu dosáhlo 108 laboratoří, 11 laboratoří tento limit nesplnilo.

VÝSLEDKY ZÚČASTNĚNÝCH LABORATOŘÍ

Vzorek 1: Izolát z moče (signifikantní bakteriurie)

Odpověď: *Morganella morganii*

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Morganella morganii</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.

Izolace a identifikace signifikantního patogena nečinila laboratořím obtíže. Všechny laboratoře správně identifikovaly jako původce onemocnění druh *Morganella morganii* a získaly po 2 bodech.

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>	11	2	9,2 %
<i>Pasteurella multocida</i> + <i>Staphylococcus intermedius</i>	92	2	77,3 %
<i>Pasteurella multocida</i> + <i>Staphylococcus intermedius</i> / <i>/pseudintermedius</i>	7	2	5,9 %
<i>Pasteurella multocida</i>	9	1	7,6 %
Celkem	119		100 %

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

Druh *Staphylococcus pseudintermedius* („pseudointermedius“ je překlep) byl popsán v roce 2005 [1] z klinického veterinárního materiálu. Patří do skupiny koagulázopozitivních stafylokoků, fylogeneticky je blíže příbuzný s druhu *S. intermedius* a *S. delphini*. Podobně jako *S. intermedius* vyskytují se kmeny *S. pseudintermedius* na kůži a sliznicích zdravých zvířat, ale v případě oslabení hostitele mohou vyvolat onemocnění. A rovněž mohou být izolovány z humánního klinického materiálu, nejčastěji to bývá

ze zhnisané rány po kousnutí psem, obvykle ve smíšené infekci s pasteurelou. V Journal of Clinical Microbiology byla popsána katérová baktéremie, kterou způsobil *S. pseudintermedius* u hemofilického dítěte v národní Taiwanské nemocnici v Taipei. V anamnéze je zmíněn dlouhodobý kontakt se psem [2].

Kmeny *S. pseudintermedius* rostou v nepigmentovaných koloniích, v testu volné zkušavkové koagulázy mají opožděný pozitivní výsledek (tj. až po 3 i více hodinách) a produkují termorezistentní nukleázu. Latexový test na clumping-faktor je obvykle negativní. Negativní je test na hyaluronidázu. Kmeny produkují beta-hemolysin (sflingomyelinázu), částečná hemolýza po prvním dnu kultivace v 36 °C přejde chladovým efektem při 4°C do 1–2 dnů v hemolýzu úplnou. Podle původní práce v IJSEM [1] by se měly kmeny *S. pseudintermedius* odlišovat od *S. intermedius* pozitivní maltózou a pozitivním VPtestem, ale podle zkušeností NRL/St se nedají fenotypově rozlišit a k přesné identifikaci je nutné použít genetické metody [3]. Tyto dva druhy neodliší ani MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Podle výsledků NRL bude asi většinu záchytů *S. intermedius* nutné reklasifikovat jako *S. pseudintermedius*, pravý *S. intermedius*, kterého popsal v roce 1976 prof. Václav Hájek jako druhého koagulázapozitivního stafylokokka [4], bude zřejmě velmi vzácný.

LITERATURA

- [1] Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M, et al: *Staphylococcus pseudintermedius* sp.nov., a coagulase-positive species from animals. Int J Syst Evol Microbiol. 55: 1569–1573 (2005).
- [2] Chuang CY, Yang YL, Hsueh PR, Lee PI: Catheter-related bacteremia caused by *Staphylococcus pseudintermedius* refractory to antibiotic-lock therapy in a hemophilic child with dog exposure. J Clin Microbiol 48(4): 1497–1498 (2010).
- [3] Petráš P, Švec P, Machová I: První záchyt *Staphylococcus pseudintermedius* z humánního klinického materiálu v České republice. Zprávy EM (SZÚ, Praha) 19(3): 65–67 (2010).
- [4] Hájek V: *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals.. Int J Syst Bacteriol. 26: 401–408 (1976).

Vzorek 3: Stolice od pacienta s vodnatým průjmem a bolestmi břicha

Odpověď: *Salmonella enterica*
subsp. *enterica* serovar **Hadar**

Vzorek dále obsahoval: *Escherichia coli*,
Klebsiella oxytoca

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Salmonella</i> Hadar	116	2	97,5 %
<i>Salmonella</i> Hadar 6,8:z10:e,n,x	2	2	1,7 %
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> group C	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.

Salmonella Hadar byla od roku 2002 zaslána k identifikaci již počtvrté. Postupně se úspěšnost identifikace zúčastněných laboratoří zvyšovala, až dosáhla téměř maxima – 99,2 % v letošním roce. Jedna laboratoř (0,8 %) zařadila kmen podle somatického antigenu pouze do skupiny C. Serotypizace kmene byla pro naprostou většinu zúčastněných laboratoří snadná, neboť se jednalo o izolát vykazující typické biochemické i sérologické vlastnosti.

Prevalence *S. Hadar* v posledních dvou letech klesá, přesto je její výskyt významný. Patří k hlavním nositelům rezistencí, zejména v důsledku běžného terapeutického používání antibiotik u drůbeže chované na maso.

Vzorek 4: Izolát z krve od pacientky se sepsí

Odpověď: *Salmonella enterica*
subsp. *enterica* serovar **Typhimurium**

Identifikace	Frekvence	Body	Procento
<i>Salmonella</i> Typhimurium	106	2	89,1 %
<i>Salmonella</i> Typhimurium 1,4,[5],12:i:1,2	1	2	0,8 %
<i>Salmonella</i> Typhimurium-like	4	2	3,4 %
<i>Salmonella</i> Typhimurium-like 1,4,[5],12:i:-	1	2	0,8 %
<i>Salmonella</i> Typhimurium-like 4,[5],12:i:-	1	2	0,8 %
<i>Salmonella</i> Typhimurium-like 4,12:i:-	2	2	1,7 %
<i>Salmonella</i> Typhimurium- monofázická	1	2	0,8 %
<i>Salmonella</i> Typhimurium- monofázická „like“	1	2	0,8 %
<i>Salmonella</i> Typhimurium (like susp)	1	2	0,8 %
<i>Salmonella enterica</i> sk. B	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.

Požadavek byl identifikovat druh zaslání kmene a zjistit jeho citlivost k ciprofloxacinu a k cefotaximu. Kmen 4 je *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5],12:i:1,2 rezistentní k ciprofloxacinu a citlivá k cefotaximu.

Identifikace a způsob vykazování dvou příbuzných serotypů – Typhimurium (s definovanou plně kompletní antigenní strukturou) známou od r.1889 a její genotypově blízkou variantu 4,[5],12:i:-, popisovanou teprve od konce 80. let (s charakteristickou delecí druhé bičkové fáze) – je často odbornou veřejností diskutována. Jednak pro četnost výskytu, ale také pro možnou klinickou závažnost onemocnění. Tomuto problému se věnovala i EHK–690 v roce 2011. Pro monofázickou variantu se neustálil definitivní název, postupně se přechází na epiteton Monofázická Typhimurium, a to z důvodu kompatibility s hlášením do TESSy a potažmo i do Epidat.

Tabulka 1: VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ CITLIVOSTI KMENE 4 *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

Antibiotikum	Zdroj	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)		Správné výsledky		
		obsah disku µg	limit pro citlivé izoláty salmonel ***	rozmezí hodnot naměřených v NRL *	limit pro citlivé izoláty salmonel ***	rozmezí hodnot naměřených v NRL **	kategorie	počet laboratoří	%
ciprofloxacín	EUCAST [1]	5	ND	26 - 27	≤ 0,063	0,25 - 0,25	R	97/119	81,5
	CLSI [2]		≥ 31						
cefotaxim	EUCAST [1]	5	≥ 20	27 - 28	≤ 1	≤ 0,25 - ≤ 0,25	C	118/119	99,2
	CLSI [2]	30	≥ 26	33 - 34					

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

Signifikantního patogena správně určilo 107 laboratoří (89,9 %); vzhledem k příbuznosti obou sérotypů byl plný počet bodů přiznán i za odpověď *S. Typhimurium*-like resp. monofázická.

Všechny laboratoře s výjimkou jedné označily správně kmen 4 jako citlivý k cefotaximu, avšak jen 81,5 % laboratoří správně vyhodnotilo rezistenci k ciprofloxacínu. Vzhledem k tomu, že se jedná o relativně novou interpretaci výsledku vyšetření citlivosti k ciprofloxacínu týkající se mimostřevních izolátů salmonel, v této sérii EHK se ciprofloxacín u jednotlivých laboratoří nehodnotí. Celkové výsledky vyšetření citlivosti jsou v tabulce 1, která obsahuje limitní hodnoty průměrů inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro citlivé mimostřevní izoláty salmonel, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Vzorek 5: *Haemophilus influenzae*

Požadavek byl odpovědět ANO nebo NE na otázku, zda je kmen 5 *Haemophilus influenzae* (*H.i.*) citlivý k ampicilinu, a uvést podmínky, které laboratoře použily pro vyšetření citlivosti (půda, druh disku a jeho obsah).

Výsledky odpovědí laboratoří na otázku o citlivosti kmene 5 jsou v tabulce 2. Kmen 5 jako citlivý k ampicilinu správně označilo 97,5 % laboratoří.

Tabulka 2: ODPOVĚDI LABORATOŘÍ NA OTÁZKU O CITLIVOSTI KMENE 5 *H. INFLUENZAE* K AMPICILINU

Otázka u kmene 5:	Odpovědi laboratoří	Počet laboratoří	%
Je kmen citlivý k ampicilinu?	ANO	116	97,5
	NE	2	1,7
	0	1	0,8

Tabulka 3 uvádí referenční rozmezí průměrů inhibičních zón (IZ) pro ampicilin a penicilin u nového kontrolního kmene *H.i.* NCTC 8468 pro kontrolu kvality vyšetření citlivosti hemofilů, které deklaruje EUCAST, limitní IZ a MIC těchto antibiotik pro kmeny citlivé k ampicilinu pod-

le EUCAST, limitní hodnoty IZ a MIC ampicilinu pro citlivé kmeny podle CLSI, a hodnoty průměrů IZ a MIC naměřené u tohoto kmene v NRL pro antibiotika.

V tabulce 4 je přehled podmínek, které použily laboratoře pro vyšetření citlivosti kmene 5 k ampicilinu. Pouze 3 laboratoře (2,5 %) použily skřínkové vyšetření na půdě MH-F s diskem o obsahu 1 J penicilinu (jedna z nich použila také disk s 2 µg ampicilinu). Další 48 ze 119 laboratoří (40,3 %) vyšetřilo citlivost k ampicilinu na půdě MH-F diskem s obsahem 2 µg ampicilinu. Další 11 laboratoří (9,2 %) použilo půdu HTM a disk s obsahem 10 µg ampicilinu. Ostatní laboratoře (52,1 %) použily k vyšetření citlivosti k ampicilinu jiný způsob.

Tabulka 4: PŮDY, DISKY A JEJICH OBSAHY, použité 119 laboratořemi pro vyšetření citlivosti k ampicilinu u kmene 5

Půda*	Počet laboratoří	%
HTM	56	47,1
MH-F	50	42,0
Jiná půda	6	5,0
MH-F+HTM	2	1,7
Čoko agar	2	1,7
Č/HAAL (DVLAB)	1	0,8
Chocolate agar+PVS+Bacitracin	1	0,8
Levintal	1	0,8
Disky**	Počet laboratoří	%
AMP2	99	83,2
AMP10	15	12,6
PEN1	2	1,7
AMP2,AMC2/1	1	0,8
AMP2,AMP10	1	0,8
AMP2,PEN1	1	0,8

* Zkratky půd jak je uvedly laboratoře; ** AMP: ampicilin; PEN: penicilin; AMC: amoxicilin/klavulanová kyselina, čísla označují obsah disků v µg.

Tabulka 3: REFERENČNÍ HODNOTY EUCAST U KONTROLNÍHO KMENE *H. INFLUENZAE* NCTC 8468 PRO AMPICILIN A PENICILIN, hodnoty naměřené v NRL/ATB, limity IZ a MIC ampicilinu udané EUCAST a CLSI u citlivých kmenů *Haemophilus* spp. a limitní průměry IZ kolem disku s 1 J penicilinu pro skrínink citlivosti k ampicilinu

Antibiotikum	Zdroj	Průměry IZ (mm)				MIC (mg/l)		Kategorie
		obsah disku	limit pro citlivé kmeny	referenční rozmezí pro <i>H.i.</i> NCTC 8468	rozmezí hodnot naměřených v NRL*	limit pro citlivé kmeny	rozmezí hodnot naměřených v NRL**	
penicilin ***	EUCAST [1]	1 J	≥ 12	13 - 19	15 - 16	ND	NT	C
ampicilin		2 µg	≥ 16	19 - 25	20 - 21	≤ 1	0,19 - 0,25	
ampicilin	CLSI [2]	10 µg	≥ 22	ND	24 - 26			

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; * 5 měření diskovou difúzní metodou; ** 5 měření Etestem; *** skrínink; ND: neudáno; NT: nevyšetřeno; C: citlivý.

ZÁVĚR

Kmen 4

Podle EUCAST i CLSI je žádána nebo špatná odpověď na léčbu ciprofloxacinem u invazivních infekcí, způsobených kmeny *Salmonella* spp. s MIC fluorochinolonů > 0,063 mg/l. CLSI rozšiřuje komentář o možném selhání ciprofloxacinu i na ostatní mimostřevní infekce způsobené takovými kmeny. Zatímco EUCAST uvádí jen limitní MIC ≤ 0,063 mg/l pro kmeny *Salmonella* spp. citlivé k ciprofloxacinu, CLSI udává pro tyto kmeny – kromě MIC shodné s EUCAST – i limitní průměr IZ ≥ 31 mm. Hodnota IZ ciprofloxacinu ≥ 22 mm pro citlivé kmeny *Enterobacteriaceae*, kterou uvádí EUCAST, **neplatí pro invazivní kmeny *Salmonella* spp., pro které EUCAST udává pouze limitní MIC ≥ 0,063 mg/l.** To je zřejmě příčinou, proč zhruba 1/5 laboratoří chybně vyhodnotila kmen 4, pravděpodobně podle výsledku diskové difúzní metody, jako citlivý k ciprofloxacinu. Lze doporučit, aby laboratoře, které u invazivních izolátů nevyšetřují MIC antibiotik, používaly u všech mimostřevních salmonelových infekcí limit CLSI ≥ 31 mm pro IZ kmenů citlivých k ciprofloxacinu.

Kmen 5

Při vyšetření citlivosti hemofilů zahrnuje standardní postup EUCAST půdu MH-F (Mueller-Hinton agar s 5 % koňské krve a 20 mg/l β-NAD), pro vyšetření ampicilinu pak skrínink s diskem o obsahu 1 J penicilinu, respektive diskovou difúzní metodu s 2 µg ampicilinu. Vytváří-li na této půdě kmen kolem disku s 1 J penicilinu IZ o průměru ≥ 12 mm, označí se **bez dalšího vyšetření** jako citlivý k ampicilinu; vytváří-li IZ o menším průměru, postupuje se dále podle výsledku vyšetření produkce beta-laktamázy.

Standardní půdou CLSI pro vyšetření hemofilů k ampicilinu je *Haemophilus* test medium se suplementem (HTM) a disk s obsahem 10 µg ampicilinu. Základním předpokladem pro dosažení správných výsledků je **pečlivé a důsledné dodržení standardní metody EUCAST, respektive CLSI včetně příslušné interpretace.** Nelze tedy použít disky o obsahu 10 µg ampicilinu na půdě MH-F, stejně jako nelze použít disky o obsahu 2 µg na půdě HTM, stejně jako je chybné použít jakoukoli jinou půdu než MH-F nebo HTM, neboť **chybí kritéria** deklarovaná EUCAST, resp. CLSI pro interpretaci získaných výsledků.

Pro vyšetření citlivosti k ampicilinu u kmene 5 použily laboratoře celkem 7 různých půd, které různě kombinovaly s druhem a obsahem disků. Standardní postup EUCAST zvolilo celkem 51 laboratoří (42,8 %), pouze 3 laboratoře však u tohoto kmene citlivého k ampicilinu použily prakticky a ekonomicky výhodný skrínink s diskem penicilinu. 48 laboratoří použilo další standardní podmínky požadované EUCAST (MH-F a 2 µg disk ampicilinu). Podmínky standardního vyšetření podle CLSI (půdu HTM a disk s obsahem 10 µg) zvolilo 11 (9,2 %) laboratoří. Zbývající laboratoře, jejichž počet převýšil polovinu (52,1 %) všech zúčastněných laboratoří, zvolily nestandardní způsoby vyšetření citlivosti k ampicilinu (půdy nevhodné pro diskovou difúzní metodu, nevhodná kombinace půdy a obsahu disků, apod.). Příkladem zvláště závažné chyby jedné laboratoře je použití půdy s antibiotiky (Chocolate agar+PVS+Bacitracin), která interferují s dalším antibiotikem (v tomto případě s ampicilinem).

LITERATURA

- [1] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1, valid from 2013-02-11. Dostupné na http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf, český překlad tohoto dokumentu je na: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/Tabulka_breakpointu_EUCAST_v_3.1.xls
- [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.
- [3] EUCAST Quality Control. Dostupné na: http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/qc_tables/, český překlad tohoto dokumentu je na: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/Tabulky_pro_rutinni_kontrolu_kvality_3.1.pdf

Renáta Kolínská
Daniela Dědičová
Petr Petráš
Pavla Urbášková
Oddělení bakteriální rezistence
a alimentárních bakteriálních nákaz
CEM-SZÚ