



Co se záškrtem v laboratoři?

Mgr. Jana Zavadilová

Národní referenční laboratoř pro pertusi a difterii

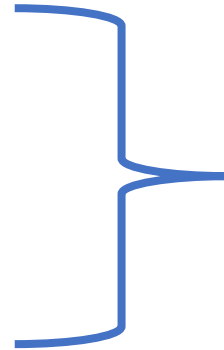
Státní zdravotní ústav, Praha

XVIII. Hradecké vakcinologické dny
5.-7. 10. 2023

Fotografie v prezentaci jsou z archivu NRL.

Kmeny které nás zajímají?

- ✓ *C. diphtheriae*
- ✓ *C. ulcerans*
- ✓ *C. pseudotuberculosis*



produkují difterický toxin?



**WHO laboratory
manual for the
diagnosis of
diphtheria and
other related
infections**

DOPORUČENÝ POSTUP

při výskytu případu onemocnění záškrtem (difterií)

v. 01 (leden 2023)

Cíle doporučeného postupu a dotčené subjekty

Doporučený postup byl přijat v zájmu nastavení jednotného systému pro zajištění prevence vzniku a dalšího šíření nákazy záškrtem a v souvislosti s výskytem vyššího počtu případů daného onemocnění aktuálně hlášených v některých evropských zemích, včetně České republiky.

Tento doporučený postup je určen všem poskytovatelům zdravotních služeb včetně laboratoří provádějících příslušná vyšetření a dále orgánům ochrany veřejného zdraví (OOVZ), popř. dalším subjektům dotčeným při řešení výskytu onemocnění záškrtem.

V návaznosti na nové poznatky může být doporučený postup v budoucnu modifikován.

Subjekty zúčastněné na zpracování doporučeného postupu:

- Státní zdravotní ústav (SZÚ)
- Ministerstvo zdravotnictví (MZ)
- Společnost pro epidemiologii a mikrobiologii ČLS JEP (SEM ČLS JEP)
- Společnost infekčního lékařství ČLS JEP (SIL ČLS JEP)
- Poradní sbor hlavního hygienika pro epidemiologii

**Terénní
mikrobiologické
laboratoře**

NRL

Klinický vzorek



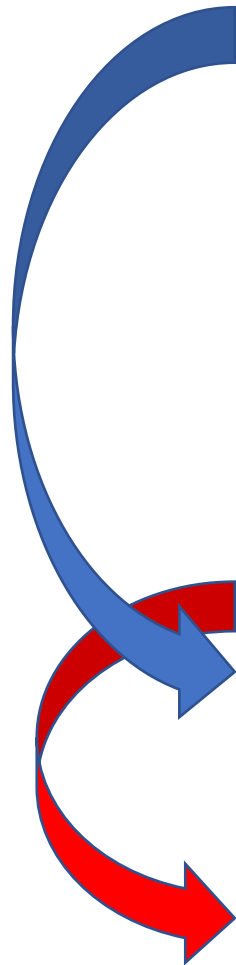
Kultivace



Identifikace agens



Testování toxigenicity



Kultivace I

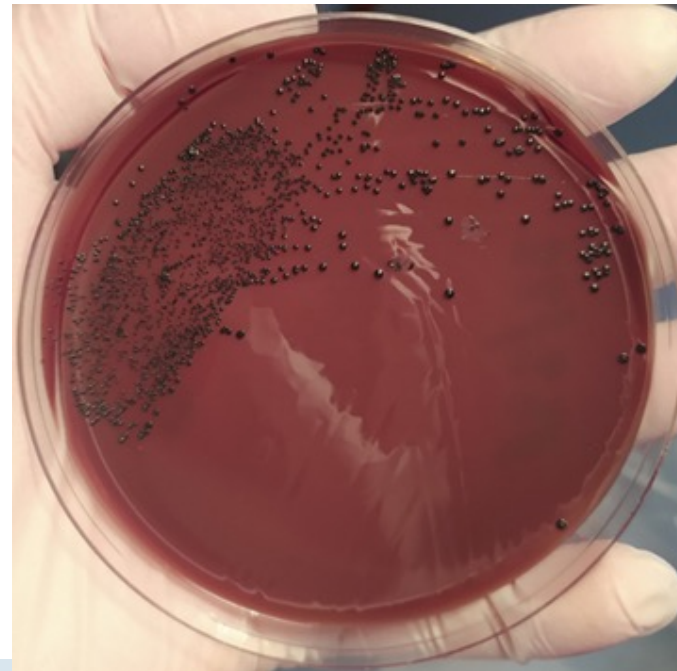
Krevní agar

- ✓ kolonie podobné koagulázanegativním stafylokokům



Teluritový agar

- ✓ selektivně dg půda, typický vzhled kolonií



Kolonie *C. ulcerans*

Kultivace II

- Podmínky kultivace: V normální atmosféře při teplotě 37 °C. **Doporučená doba kultivace je 3 dny**, *C. diphtheriae* biotyp *intermedius* vyrůstá za 48 až 72 hodin.
- Odečítá se za 24, 48 a 72 hodin.

Identifikace izolátů



MALDI-TOF - identifikace

Biochemický test (API Coryne) – identifikace a určení biotypu

C. ulcerans

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<u>B7</u> (+++)(A)	106/22	Corynebacterium ulcerans	2.3	Corynebacterium ulcerans	2.18



C. diphtheriae biotyp *mitis*



Je kmen toxigenní?



1. krok

Molekulární metoda = **průkaz DNA tox genu**

- Real – Time PCR
 - ✓ pozitivní výsledek neprokazuje produkci difterického toxinu
 - ✓ je popsán výskyt kmenů s *tox* genem, které neprodukují difterický toxin, tzv. non-toxigenic, toxin gene bearing

2. krok

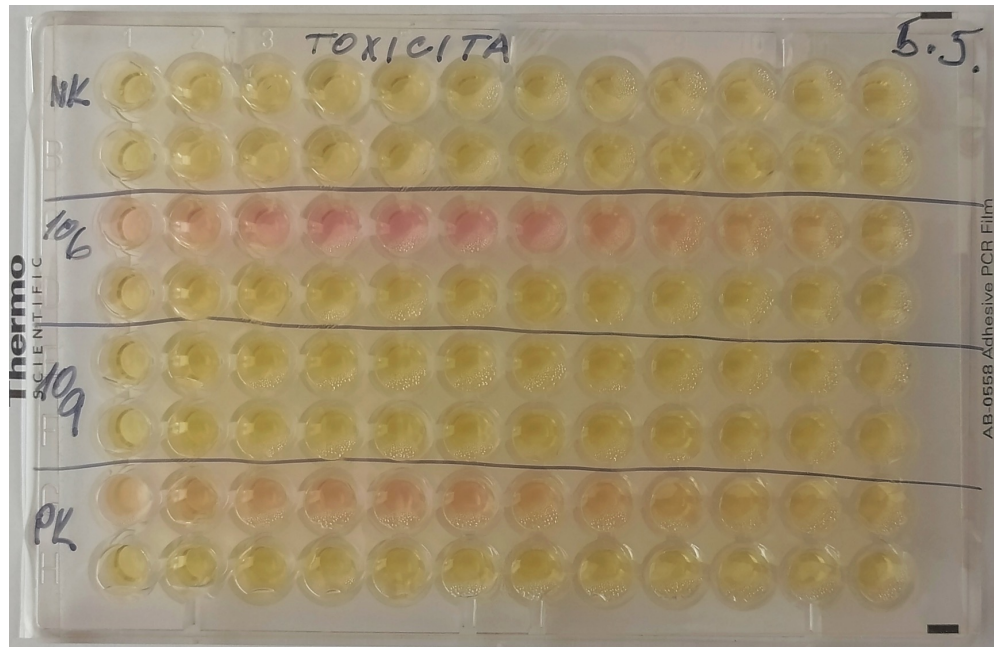
Fenotypový test = **průkaz produkce toxinu**

- Metabolicko – inhibiční kolorimetrický test na tkáňových kulturách – **referenční metoda**
 - ✓ definitivní potvrzení diagnózy
- ELEK test - testovací režim

Průkaz produkce toxinu

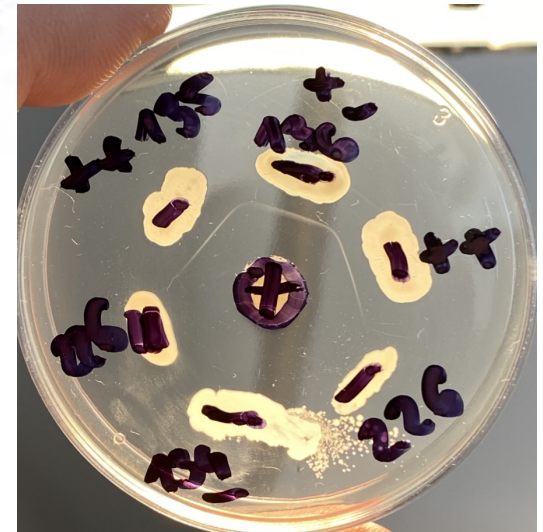
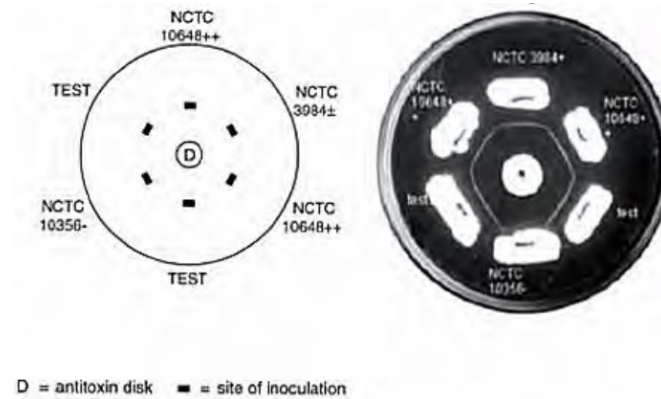
Tkáňové kultury

- Před testem je nutné pomnožení izolátu 48 až 72h v BHI
- Odečet testu za 4 až 6 dní

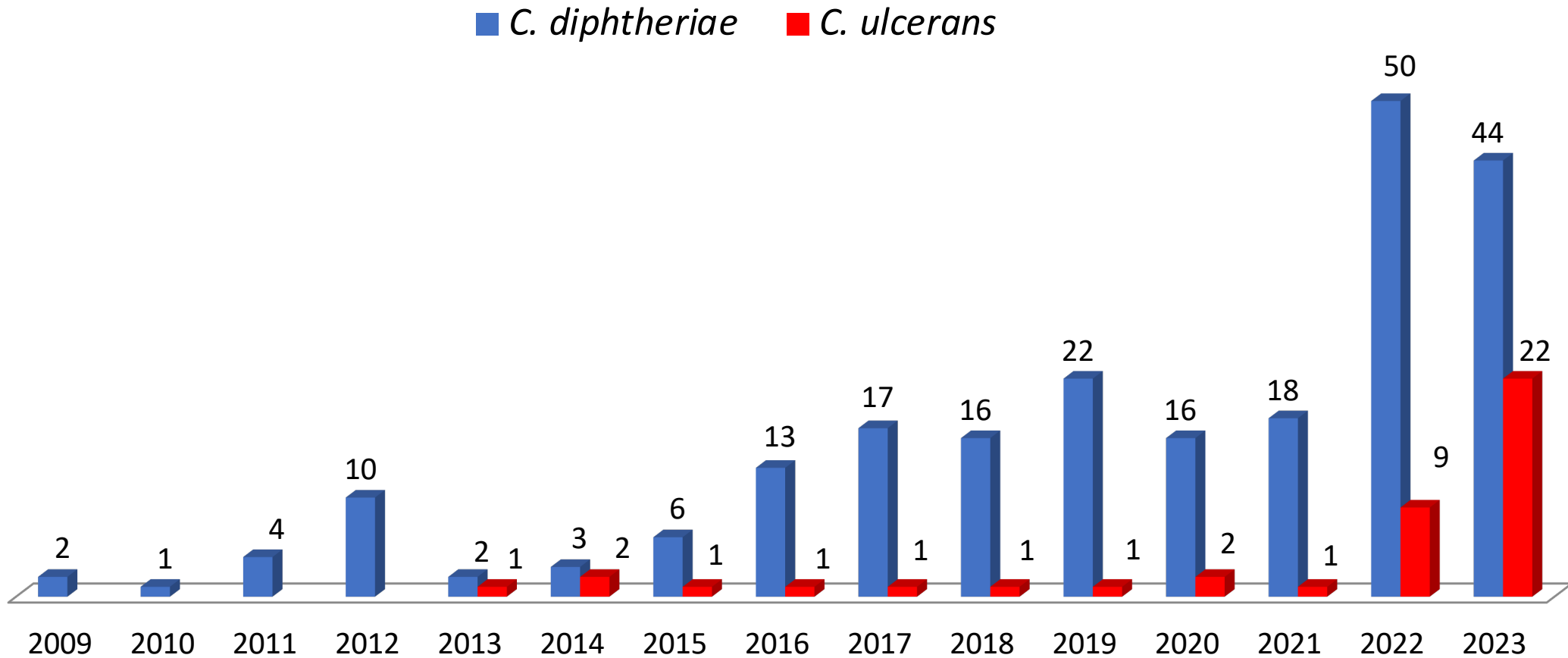


ELEK test

- Odečet testu za 24h
- **Nespecifické precipitační linie**



Konfirmace kmenů *C. diphtheriae* a *C. ulcerans* v NRL, 2009 – 2023 (data k 30.10.2023)



Závěr



- Odeslání izolátu do NRL:
 - ✓ Materiál je vhodné posílat na krevním agaru + tampónu (transportním médiu s Amiesovou půdou).
 - ✓ Odeslání kultury na krevním agaru urychlí vyšetření v NRL až o 3 dny.



Děkuji za pozornost

jana.zavadilova@szu.cz

<http://www.szu.cz/narodni-referencni-laborator-pro-pertusi-a-difterii>