



Nepodkročitelné minimum diagnostiky mykóz v laboratoři lékařské mykologie

Dokument NMM20110218v.1

Vypracovali: Doc. RNDr. Vladimír Buchta, CSc. Doc. MUDr. Petr Hamal, Ph.D.
Mgr. Iva Kocmanová MUDr. Nad'ea Mallátová MUDr. Karel Menci, CSc., členové
Pracovní skupiny pro lékařskou mykologii.

**Základní dokument schválený výborem Společnosti pro lékařskou
mikrobiologii České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně na 3.
výročním zasedání dne 18. – 19. února 2011**

Stav:

Schváleno SLM ČLS JEP jako její oficiální odborné stanovisko.

K veřejné oponentuře na webu SLM ČLS JEP do 13. 5. 2011.

Připomínky, návrhy a námítky posílejte na: buchta@fnhk.cz (doc. V. Buchta)

Výchozí dokumenty:

Nepodkročitelné meze odborností 802 – Lékařská mikrobiologie, 804 – Lékařská parazitologie, 805 – Lékařská virologie a 822 – Laboratoř lékařské mykologie. *Národní autorizační středisko pro klinické laboratoře*, 2010:

(<http://www.naskl.cz/vzdelavani/oborove-prispevky/doc/Nepodkrocitelne%20meze%20-%20802%20804%20805%20822%20Mikrobiologie-v2.doc>)

Buchta, V., Hamal, P., Mallátová, N., Kocmanová, I., Chrenková, V., Roubalová, M., Olišarová, P. Nepodkročitelné minimum laboratorní diagnostiky invazivních mykotických infekcí – doporučení odborníků s podporou CELL a SLM JEP. *Postgraduální medicína*, 2010, roč. 12, příl. 5, s. 76-81.

Definice:

Nepodkročitelná minima je soubor podmínek, které musí laboratoř bezvýhradně splnit, aby mohla být považována z hlediska přílohy k vyhlášce MZ ČR č. 134/1998 Sb., kterým se vydává seznam zdravotních výkonů s bodovými hodnotami, za specializované pracoviště v odbornosti 822-Laboratoř lékařské mykologie, resp. 802 – Lékařská mikrobiologie.

Bazální mykologická diagnostika (BMD) – laboratoř zajišťující základní diagnostickou péči pro praktické lékaře, ambulantní specialisty a klinické lékaře v malých/okresních nemocnicích, provádějící vyšetření na běžné původce kožních a slizničních mykóz, případně některých systémových mykóz.

Specializovaná mykologická diagnostika (SMD) – laboratoř zajišťující specializovanou diagnostickou péči pro klinické lékaře velkých krajských a fakultních nemocnic, provádějící detekci a identifikaci širokého spektra původců povrchových i systémových mykóz včetně vysoce specializované diagnostické péče pro hemato-onkologická oddělení a transplantační centra.

Tabulka 1. Minimální požadavky na přístroje a pomůcky

| Přístroj | BMD | SMD | Účel |
|--|------------|------------|--|
| Laminární bezpečnostní box třídy II. | ANO | ANO | zpracování materiálu k mykologickému vyšetření, práce s houbovými kulturami |
| Inkubátor 36±1 °C | ANO | ANO | kultivace původců slizničních a systémových mykóz, inkubace testů citlivosti k antimykotikům |
| Inkubátor 26±1 °C | ANO | ANO | kultivace původců dermatomykóz |
| Inkubátor 30 °C | NE | ANO | inkubace biochemických testů |
| Chladnička 2-8 °C („infekční“) | ANO | ANO | skladování a uchovávání houbových kultur a suspenzí |
| Chladnička 2-8 °C („čistá“)* | ANO | ANO | skladování mykologických médií a diagnostických souprav |
| Mrazicí box -20 °C* | ANO | ANO | uchovávání biologických materiálů a některého spotřebního materiálu |
| Hlubokomrazicí box -80 °C* | ANO | ANO | uchovávání biologických materiálů a houbových kmenů |
| Centrifuga* | ANO | ANO | zpracování biologických materiálů |
| Mikroskop optický (zvětšení objektivů 10x, 20x, 40x, 100x) | ANO | ANO | detekce a identifikace hub |
| Mikroskop fluorescenční* | NE | ANO | detekce a identifikace hub |
| Třepačka* | ANO | ANO | homogenizace biologických materiálů |
| Spektrofotometr/turbidimetr* | ANO | ANO | standardizace inokula |
| Promývačka + spektrofotometr* | NE | ANO | provádění sérologických metod - ELISA |
| Hemokultivační systém* | NE | ANO | hemokultivace (zejména speciálních mykologických hemokultur) |
| Mikropipety | ANO | ANO | inokulace mikrotitračních destiček, ředění, provádění sérologických testů ap. |
| Běžné laboratorní pomůcky (kahan, bakteriologické kličky a jehly, skalpely, pinzety, laboratorní plast ap.) | ANO | ANO | zpracování materiálu k mykologickému vyšetření, práce s houbovými kulturami |

*Ize sdílet s jinými mikrobiologickými laboratořemi

Tabulka 2. Minimální požadavky na provádění mikroskopických technik

| Technika | BMD | SMD | Význam |
|--|---------|-----|---|
| Nativní preparát | ANO | ANO | vyšetření vaginálního sekretu (dif. dg. mykotické kolpitydy) modifikace v dif. dg. kvasinek a vláknitých hub (klíční hyfy, laktofenol, čínská tuš ap.) |
| Louhový preparát (včetně modifikace obarvením např. pomocí Myco-Ink) | ANO | ANO | vyšetření dermatologických a gynecologických vzorků vyšetření bioptických a nekroptických vzorků |
| Barvení podle Grama | ANO | ANO | vyšetření vzorků ze sliznic, vzorků z DCD a primárně sterilních materiálů |
| Barvení podle Giemsy | ANO | ANO | vyšetření vaginálního sekretu (dif. dg. mykotické kolpitydy) dg. <i>Pneumocystis jiroveci</i> (trofozoity)** |
| Barvení pouzder | NE/ANO* | ANO | dg. <i>Cryptococcus neoformans</i> |
| Barvení podle Grocota nebo Gram-Weigertovo barvení** | NE | ANO | dg. <i>Pneumocystis jiroveci</i> (cysty) |
| Fluorescence (včetně imunofluorescence) | NE | ANO | vyšetření dermatologických, bioptických a nekroptických vzorků dg. <i>Pneumocystis jiroveci</i> (trofozoity i cysty) |

*ANO pokud laboratoř vyšetřuje mozkomíšni mok

**mikroskopický průkaz *Pneumocystis jiroveci* nutno konfirmovat PCR; u specializovaných laboratořích lze akceptovat smluvní spolupráci s jinou laboratořích (např. patologickou), která detekci DNA provádí

Tabulka 3. Minimální požadavky na kultivační postupy

| Typ kultivace | BMD | SMD | Podmínky provedení |
|--|-----|-----|---|
| Průkaz původců dermatomykóz (vzorky z kůže nebo jejich adnex) | ANO | ANO | minimálně 4 půdy/vzorek, z toho minimálně 2 SAA* + 2 SAAC** teplota inkubace: 26±1 °C délka inkubace při negativním výsledku: 3 týdny |
| Průkaz původců slizničních a systémových mykóz (stěry a výtěry ze sliznic, materiál z primárně sterilních lokalit) | ANO | ANO | minimálně 2 půdy/vzorek; možno volit mezi SA***, SAA, CHA**** a SB***** teplota inkubace 36±1 °C, příp. i 26±1 °C délka inkubace při negativním výsledku: 7 dní |
| Identifikace izolátů | ANO | ANO | minimální požadavky pro oba druhy laboratořích viz tabulka 5 |
| Testování citlivosti k antimykotikům | NE | ANO | minimální požadavky pro provádění testů viz tabulka 6 |

*SAA – Sabouraudův glukózový (dextrózový) agar s antibiotiky

**SAAC – Sabouraudův glukózový (dextrózový) agar s antibiotiky a cykloheximidem

***SA – Sabouraudův agar (bez antibiotik a cykloheximidu)

****CHA – komerční chromogenní agar

*****SB – Sabouraudův glukózový (dextrózový) bujón

Poznámka: při kultivaci původců slizničních a systémových mykóz lze na základě doporučených postupů akceptovat jako alternativu i některé jiné půdy (např. agar s mozko-srdcovým výluhem, krevní agar)

Tabulka 4. Minimální požadavky na provádění sérologických metod

| Metoda | BMD | SMD | Poznámky |
|--|---------|-----|---|
| Detekce aspergilového galaktomananu | NE | ANO | Nutno provádět výhradně komerční soupravou Platelia Aspergillus (BioRad Laboratories) |
| Detekce kryptokokového glukuronoxylomananu | NE/ANO* | ANO | Nutno provádět výhradně komerčními soupravami na principu latexové aglutinace |

*ANO pokud laboratoř vyšetřuje mozkomíšni mok

Tabulka 5. Minimální požadavky na identifikaci původců mykóz

| Agens | BMD | SMD | Poznámky |
|--|-----------|------------|--|
| Lékařsky významné kvasinky - na úroveň druhu | ANO | ANO | V rozsahu databází doporučených komerčních biochemických souprav. Možno použít komerční soupravy i validované testy připravené v laboratoři. Nutná je periodická vnitřní kontrola kvality pomocí sbírkových kmenů. Nutno zhodnotit morfologické znaky i biochemické vlastnosti izolátu. Lipofilní kvasinky rodu <i>Malassezia</i> pouze na úroveň rodu a pouze mikroskopicky přímo v kožních šupinách. V případě neobvyklých druhů lze akceptovat spolupráci BMD se SMD, případně NRL. |
| Vláknité houby - původci dermatomykóz - na úroveň rodu | ANO | ANO | Dermatofyta i jiní častější původci dermatomykóz, včetně původců keratitid (<i>Scopulariopsis</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.). V případě non-dermatofyt lze akceptovat spolupráci BMD se SMD, případně NRL. Nutno zhodnotit mikro- i makromorfologické znaky. |
| Aspergily - na úroveň rodu - na úroveň druhu | ANO NE | ANO ANO | SMD musí pomocí morfologických znaků určit na úroveň druhu nejčastější původce aspergilóz: <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. terreus</i> . V případě dalších druhů lze akceptovat spolupráci s NRL. |
| Zygomycety (Mucorales) - na úroveň čeledi - na úroveň rodu | ANO NE | ANO ANO | SMD musí pomocí morfologických znaků určit na úroveň rodu nejčastější původce mukormykóz: <i>Mucor</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp., <i>Rhizomucor</i> spp., <i>Absidia</i> spp. V případě jiných rodů lze akceptovat spolupráci s NRL. |
| Ostatní vláknité houby - na úroveň rodu | NE | ANO | Na základě morfologických znaků. V případě neobvyklých vláknitých hub lze akceptovat spolupráci s NRL. |

Tabulka 6. Minimální požadavky na provádění testování citlivosti k antimykotikům

| Agens | Typ testu | Metodika | Alternativa |
|----------------|-----------------------|--|--|
| Kvasinky | Difúzní kvalitativní | CLSI: M44A2 | |
| | Difúzní kvantitativní | Ettest (BioMérieux) | |
| | Diluční | CLSI: M27A3, M27S3 ESCMID: EUCAST EDef 7.1 | Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic systems) |
| Vláknité houby | Difúzní kvalitativní | CLSI: M51A | |
| | Difúzní kvantitativní | Ettest (BioMérieux) | |
| | Diluční | CLSI: M38A2 | |

Poznámky: U kvasinek jsou definována interpretační kritéria (breakpointy) pro flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, kaspofungin, anidulafungin, mikafungin a flucytosin.

U vláknitých hub nejsou definována interpretační kritéria pro žádné systémové antimykotikum.

Pro testování citlivosti dermatofyt není dosud k dispozici žádný konsenzuální metodický dokument.