



Státní zdravotní ústav
Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti
Poskytovatel zkoušení způsobilosti č. 7001 akreditovaný ČIA
podle ČSN EN ISO/IEC 17043: 2010
Šrobárova 49/48, 100 00, Praha 10



Zkoušení způsobilosti v lékařské mikrobiologii (Externí hodnocení kvality)

PT#M/5-2/2020 (č. 1134) **Bakteriologická diagnostika**

Praha, červenec 2020

Obsah

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing)	3
2. Příprava vzorku	4
3. Hodnocení	4
4. Výsledky zúčastněných laboratoří	5-9
5. Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/5-2/2020 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-2/2020 byly prováděny podle standardního operačního postupu SOP M/5 na pracovišti Expertní skupiny pro zkoušení způsobilosti (ESPT) Státního zdravotního ústavu (SZÚ). Toto pracoviště je akreditováno Českým institutem pro akreditaci, o.p.s. jako poskytovatel zkoušení způsobilosti č. 7001.

S veškerými informacemi dodanými účastníky je zacházeno jako s důvěrnými a nejsou bez souhlasu účastníka poskytovány třetím stranám.

Příloha závěrečné zprávy, tj. ohodnocený výsledkový protokol, je rozesílána poštou

Koordinátor:

Mgr. Renáta Šafránková
Tel: 267 082 124

Zprávu vypracovali:

Mgr. Renáta Šafránková, prof. MUDr. Pavel Dřevínek, PhD., Mgr. Petra Klimešová, RNDr. Pavla Urbášková, CSc.

Zprávu schválil: Mgr. Renáta Šafránková

Dne: 17. 7. 2020

Pracoviště 2 ESPT

www.szu.cz/espt

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT#M/5-2

Identifikace série:	EHK-1134
Název:	Bakteriologická diagnostika
Poskytovatel:	SZÚ, ESPT Šrobárova 49/48, Praha 10, 100 00 tel.: + 420 267082258
Vedoucí ESPT	Ing. Věra Vrbíková
Koordinátor:	Mgr. Renáta Šafránková
Subdodavatel:	není
Charakteristika materiálu:	Simulovaný klinický vzorek 1. Burkholderia cenocepacia 2. Serratia marcescens 3. Escherichia coli O145 4. Corynebacterium minutissimum Salmonella Enteritidis (vet.lab.) 5. Salmonella Paratyphi
Podstata a účel EHK:	identifikace bakteriálních patogenů a stanovení citlivosti k antimikrobním preparátům
Kritéria pro účast na EHK:	Účast není omezena
Způsob přípravy:	viz Protokol o přípravě vzorků
Množství připravovaného test. materiálu:	cca pro 135 laboratoří
Očekávaný počet:	122 laboratoří
Označení vzorkovnic:	EHK-1134/1-5/2020
Zabezpečení kvality vzorku:	U 5 náhodně vybraných lyofilizátů každého vzorku je prováděna 1. Kontrola viability vzorku 2. Kontrola přítomnosti nežádoucí kontaminace Stabilita: zabezpečena vlastní lyofilizací
Metrologická návaznost:	viz Protokol o přípravě vzorků
Termín testu stability:	Nejméně 14 dní před distribucí vzorků
Termín distribuce vzorků:	11. 5. 2020 (humánní lab.); 2. 6. 2020 (veterinární lab. – vzorek 4, 5)
Podmínky distribuce a uchování vzorků:	krátkodobé uchování při 4 – 8°C přeprava při pokojové teplotě v trojitém obalu přepravcem se službou přeprava nebezpečného zboží dle regulí ADR pro silniční přepravu
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe
Počet účastníků:	122
Způsob distribuce:	přepravcem se službou přeprava nebezpečného zboží Přílohy: pokyny účastníkům
Předání výsledků:	elektronicky do 1. 6. 2020 (hum.lab.); písemně na předepsaných formulářích do 16. 6. 2020 (vet.lab.)
Způsob vyhodnocení výsledků:	- kvalitativní (dosažení bodového limitu za identifikaci signifikantních patogenů pro danou sérii se vypočítává dle vzorce (Limit = aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky))
Určení maximální směrodatné odchylky:	Neprovádí
Určení přijaté vztažené hodnoty:	Výsledky NRL
Termín zveřejnění závěrečné zprávy:	Do 12 týdnů po předání výsledků k hodnocení

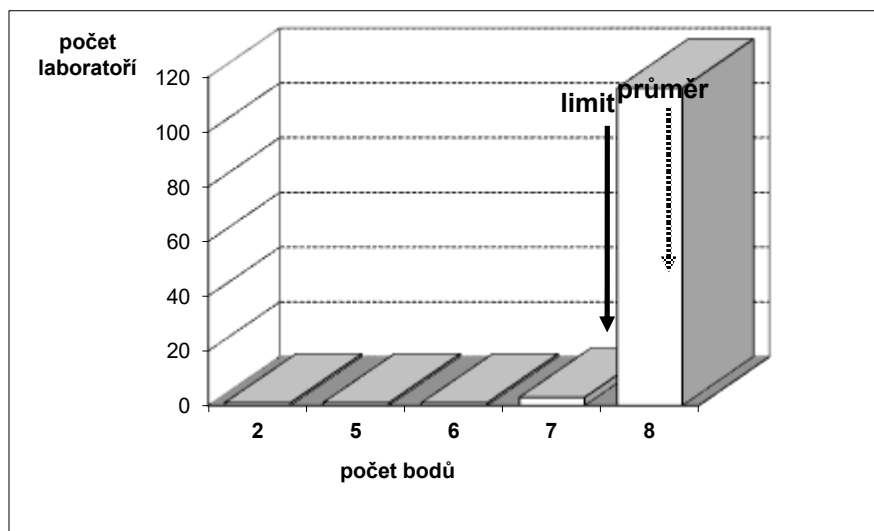
2. Příprava vzorku

Kultury bakterií jsou před použitím rozmrazeny, lyofilizované kultury rehydratovány živným bujónem a poté naočkovány na živná média a inkubovány v termostatu při teplotě 35°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 agaru a resuspendovány ve 4 ml fyziologického roztoku tak, aby denzita výsledného zákalu odpovídala McFarlandovu standardu 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-01 a SOP-NRL/CNCTC-09). Lahvičky jsou skladovány v chladničce při teplotě 4 – 8°C.

3. Hodnocení

Celkem byly vzorky rozeslány 122 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 se z technických důvodů již neprovádí (přechod na elektronické výsledky), k dispozici jsou komentované výsledky (vzorek 4 a 5).

Graf 1: Počet bodů za správnou identifikaci.



Maximálního počtu bodů při identifikaci dosáhlo 116, tj. 95,1% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 6,595 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $7,885 - (2 \times 0,645) = 6,595$). Tohoto limitu dosáhlo 119 laboratoří, 3 laboratoře tento limit nespĺnily.

4. Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: BAL od pacienta z JIP, u kterého se zvažuje zařazení na čekací listinu na transplantaci plic.
ODPOVĚĎ: <i>Burkholderia cenocepacia</i> Vzorek dále obsahoval: <i>Streptococcus oralis</i>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	50	2	41,0%
<i>Burkholderia cepacia</i> komplex	70	2	57,4%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	0	1,6%
Celkem	122		100%

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

Burkholderia cenocepacia je jeden z 22 popsáných druhů komplexu *Burkholderia cepacia*; před získáním druhového názvu v roce 2003 byla vedena pod označením genomvar III. V asociaci s diagnózou cystické fibrózy (CF) se jedná o velmi závažného patogena, který způsobuje chronickou infekci dolních cest dýchacích. Navíc se některé kmeny *B. cenocepacia* mohou mezi pacienty snadno šířit, takže bez zavedených režimových opatření panuje v centrech léčby pacientů s CF nebezpečí vzniku epidemie. Tyto určité kmeny *B. cenocepacia* s sebou také nesou riziko rozvoje absedující pneumonie a sepse, což je perakutně probíhající klinický stav, často končící fatálně. Frekventně se tato fulminantní sepsa objevuje po transplantaci plic, a proto nález *B. cenocepacia*, resp. nález jejích některých kmenů, představuje kontraindikaci k transplantačnímu výkonu. Znalost nejen bakteriálního druhu v rámci komplexu *B. cepacia*, ale i konkrétního kmene je při diagnóze CF zcela zásadní. Protože fenotypové metody nedokáží jednotlivé druhy komplexu *B. cepacia* od sebe odlišit, je pro tento účel potřeba zvolit molekulárně genetické vyšetření ke confirmaci nálezu a pro typizaci. Obě vyšetření zajišťuje referenční pracoviště Ústavu lékařské mikrobiologie FN Motol. Pozn.: aktualizovaná databáze MALDI-TOF MS z r. 2020 zahrnuje druh *B. cenocepacia*, ovšem protože jej nedovede odlišit od druhu *B. contaminans*, který v databázi chybí a který se může také vyskytovat u pacientů s CF, je vhodnější výsledek z MALDI-TOF MS uzavírat jako komplex *B. cepacia*.

Většina laboratoří (98,4%) identifikovala správně druh mikroba a získala plný počet bodů. Dvě laboratoře, které kmen identifikovaly jako *Stenotrophomonas maltophilia*, nezískaly žádný bod.

VZOREK 2: Izolát z moče od pacientky z JIP.

ODPOVĚĎ: ***Serratia marcescens***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Serratia marcescens</i>	122	2	100%
Celkem	122		100%

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

Všechny zúčastněné laboratoře správně identifikovaly signifikantního patogena a získaly po 2 bodech.

VZOREK 3: Stoličice od dětského pacienta (2 roky) s průjmem a bolestí břicha.

ODPOVĚĎ: ***Escherichia coli* O145**

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Escherichia coli</i> O145	115	2	94,3%
<i>Escherichia coli</i> + pozn*	4	2	3,2%
<i>Escherichia coli</i> + pozn**	2	1	1,6%
<i>Escherichia coli</i> (=běžná flóra)	1	0	0,8%
Celkem	122		100%

E. coli O145 patří k původcům průjmu. Tato séro skupina obvykle nese faktory virulence enteropatogenní (EPEC) nebo Shiga toxin-produkující *E. coli* (STEC). EPEC je původcem průjmu především pacientů dětského věku. STEC je závažným původcem průjmů, které mohou být krvavé, a jsou spojené s rizikem rozvoje hemolyticko-uremického syndromu, tzv. HUS (cca u 10 % případů; projevy: trombocytopenie, hemolytická anémie a akutní renální selhání). *E. coli* O145 je v Evropě pátou nejčastější séro skupinou STEC způsobující HUS [1], patří mezi tzv. „top five“ séro skupiny. Suspektní kmeny „top five“ se testují na přítomnost genů pro Shiga toxiny (ke

konfirmaci sérotypu a otestování *stx* se zasílají do NRL; pokud laboratoř testuje na *stx* sama, pak v případě positivity vždy zasílá kmen do NRL) [2].

* aglutinováno v polyvalentu a zasláno do NRL, zajištěno testování genů pro Shiga toxiny

** vyloučeny pouze některé séroskupiny „top five“

Literatura

- [1] EFSA BIOHAZ Panel, Koutsoumanis K, Allende A, Alvarez-Ordóñez A, Bover-Cid S, Chemaly M, Davies R, De Cesare A, Herman L, Hilbert F, Lindqvist R, Nauta M, Peixe L, Ru G, Simmons M, Skandamis P, Suffredini E, Jenkins C, Monteiro Pires S, Morabito S, Niskanen T, Scheutz F, da Silva Felício MT, Messens W and Bolton D. Scientific Opinion on the pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. EFSA Journal 2020; 18(1).
- [2] Vyhláška 473/2008 Sb. „o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce“ ve znění novely č. 275/2010 Sb., Příloha 16

VZOREK 4: Izolát ze stěru z postiženého místa v tříslech pacienta se silně svědící hnědě zbarvenou vyrážkou.
ODPOVĚĎ: <i>Corynebacterium minutissimum</i>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	114	2	93,4%
<i>Corynebacterium</i> spp.	4	2	3,3%
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	1	1	0,8%
<i>Corynebacterium striatum</i>	1	1	0,8%
<i>Serratia marcescens</i> + <i>Corynebacterium</i> spp.	1	0	0,8%
<i>Staphylococcus</i> spp.	1	0	0,8%
Celkem	122		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 (stačilo rodové jméno) a vyšetřit jeho citlivost ke klindamycinu a k tetracyklinu. 114 laboratoří správně identifikovalo kmen 4 jako *Corynebacterium minutissimum*, 4 laboratoře uvedly agens jako *Corynebacterium* spp., ostatní 4 laboratoře uvedly 4 různé výsledky, viz výše. Nebyly hodnoceny výsledky vyšetření citlivosti dvou laboratoří, které uvedly jiné signifikantní patogeny

(*Staphylococcus* spp., resp. *Serratia marcescens* s poznámkou, že vzorek obsahoval ještě *Corynebacterium* spp.).

Corynebacterium minutissimum je grampozitivní, kataláza pozitivní, nepohyblivá, nesporulující kyjovitá tyčka, původce kožního onemocnění, zvaného erythrasma.

Infekce je obvykle lokalizována v místech, kde dochází k výraznému tření kůže a tím ke vzniku intertriga (opruzení) – tj. v tříslech, v podpaží a pod prsy; vznikají ostře ohraničená, mírně se šupící, světle hnědá až červenohnědá svědivá ložiska. Erythrasma se může vyskytovat i na dolních končetinách v meziprstních prostorech, obvykle mezi 4. a 5. prstem.

Většina případů erythrasmy se vyskytuje u zdravých dospělých, v horkém a vlhkém podnebí bývá častější.

Infekci lze potvrdit vyšetřením tzv. Woodovou lampou se zdrojem ultrafialového záření. Kůže postižená erythrasma pod touto lampou korálově červeně fluoreskuje, což je způsobeno produkcí porfyrinů bakterií *C. minutissimum* [2].

Identifikace metodou MALDI-TOF MS je zcela bezproblémová s hodnotou skóre nad 2,3; identifikace pomocí API Coryne je naopak svízelná, s výsledkem *Corynebacterium striatum/amycolatum* na 96,7% ID, proto byla zvolena možnost identifikace pouze do rodu.

Kmen byl rezistentní ke klindamycinu a citlivý k tetracyklinu (kategorie I pro tato antibiotika u *Corynebacterium* spp. neexistuje). Celkové výsledky vyšetření citlivosti kmene ze vzorku 4 jsou v tabulce 1, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro citlivé izoláty *Corynebacterium* spp., hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 4 *Corynebacterium minutissimum*.

Antibiotikum	Obsah disku μg	Průměry IZ (mm)		MIC (mg/l)		Správné výsledky		
		breakpoint pro citlivé ² kmene	rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint pro citlivé ² kmene	rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie	počet laboratoří	%
klindamycin	2 μg	≥ 20	15 - 16	≤ 0,5	2 - 2	R	103/120	85,8
tetracyklin	30 μg	≥ 24	27 - 29	≤ 2	0,25 - ≤ 0,25	C	120/120	100,0

¹ metoda vyšetření a interpretace výsledků podle EUCAST 2020 [1]

² citlivé při standardním dávkování

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

VZOREK 5: VZOREK 5: ***Salmonella Paratyphi***

Kmen 5 je citlivý (C) při standardním dávkování k cefotaximu a k ciprofloxacinu je rezistentní (R) i při zvýšené expozici. Všechny laboratoře udaly správné výsledky u cefotaximu, u ciprofloxacinu chybovaly 2 laboratoře.

Celkové výsledky vyšetření citlivosti u kmene 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a MIC cefotaximu a ciprofloxacinu pro izolát *S. Paratyphi*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 5 *Salmonella Paratyphi*.

Antibiotikum	Obsah disku μg	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky ³			
		breakpoint ²		rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint ²		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie/ absolutní počet laboratoří			správné %
		C	R		C	R		C	I	R	
cefotaxim	5 μg	≥ 20	< 17	24 - 25	≤ 1	> 2	0,125 - 0,25	122	0	0	100,0
ciprofloxacin	5 μg	≥ 25	< 22	20 - 21	≤ 0,06	> 0,06	0,5 - 1	1	1	120	98,4 %
pefloxacin ⁴	5 μg	≥ 24	< 24	12 - 13	NA	NA	NT	-	-	-	-

¹ metoda vyšetření a interpretace výsledků podle EUCAST 2020 [1]

² hodnoty mezi breakpointy pro kategorie C a R jsou hodnoty pro kategorii I (citlivý, zvýšená expozice)

³ správné výsledky jsou zvýrazněny

⁴ screening pro zjištění klinické rezistence k fluorochinolonům u *Salmonella* spp.; výsledky NRL jsou uvedeny pro informaci IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; * 5 měření diskovou difúzní metodou, ** 5 měření diluční mikrometodou; C: citlivý, I: citlivý při zvýšené expozici, R: rezistentní i při zvýšené expozici; NA: není dostupné, NT: netestováno.

Závěr

Corynebacterium minutissimum je původcem kožní infekce erythrasma, léčené obvykle keratolytickými přípravky nebo lokálními antibiotiky. Extrakutánní infekce tímto původcem jsou vzácné, nicméně u osob s predispozičními faktory (např. s HIV/AIDS) může infekce generalizovat. Vyšetření citlivosti má význam i v případě, že se podávají antibiotika lokálně, neboť kmen 4 byl rezistentní ke klindamycinu, jednomu z antibiotik doporučených pro lokální léčbu erythrasma. Vyšetření citlivosti k tomuto antibiotiku činilo potíže 15 % ze 120 hodnocených laboratoří, zatímco výsledky u tetracyklinu měly všechny laboratoře správně. Uspokojivé byly také výsledky laboratoří týkající se vyšetření antibiotické citlivosti u kmene 5.

Literatura

[1] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, valid from 2020-01-01 [on-line]. Dostupný z WWW: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/, český překlad <http://www.szu.cz/klinicke-breakpointy>

[2] Groves JB, Freeman AM. Erythrasma. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513352/>

V případě reklamaci vyhodnocení série postupujte, prosím, dle reklamačního řádu.