



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/5-3/2020 (č. 1143)
Bakteriologická diagnostika

Praha, listopad 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/5-3/2020 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-3/2020 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, RNDr. Petr Petráš CSc., PhD., RNDr. Pavla Urbášková, CSc.

Zprávu schválil: Mgr. Renáta Šafránková

Dne: 20. 11. 2020

Pracoviště 2 ESPT

<http://www.szu.cz/programy-zpusobilosti-pro-mikrobiologicke-laboratore>
ehk@szu.cz

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT#M/5-3

Identifikace série:	EHK-1143
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. Streptococcus sk. G (β -hemolytický) 2. Staphylococcus argenteus (edukativní vzorek) 3. Campylobacter jejuni 4. Enterobacter cloacae 5. Proteus mirabilis
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-1143/1-5/2020
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:	7. 9. 2020 (humánní lab.); 29. 9. 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:	121
Způsob distribuce:	přepravcem se službou přeprava nebezpečného zboží Přílohy: pokyny účastníkům
Předání výsledků:	elektronicky do 29. 9. 2020 (hum.lab.); písemně na předepsaných formulářích do 13. 10. 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

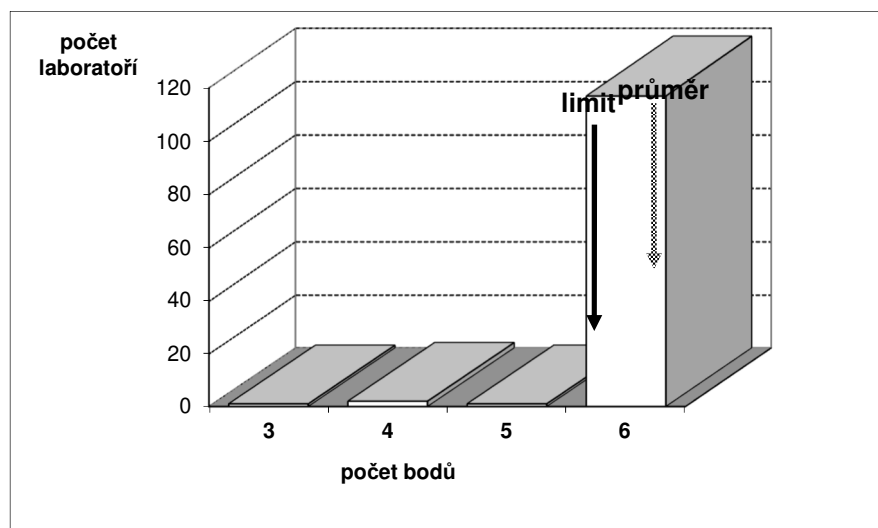
2. Příprava vzorku

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 121 laboratořím, všechny laboratoře odeslaly výsledek do závěrečného termínu. Za identifikaci signifikantního patogena ve 3 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 6 bodů, jeden vzorek byl edukativní. 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 117, tj. 96,7% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 5,17 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $5,934 - (2 \times 0,382) = 5,17$). Tohoto limitu dosáhlo 117 laboratoří, 4 laboratoře tento limit nesplnily.

4. Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Výtěr z krku od pacienta s bolestí v krku a horečkou.
ODPOVĚĎ: <i>Streptococcus</i> sk. G (β hemolytický) / <i>Streptococcus dysgalactiae</i> ssp. <i>equisimilis</i> Vzorek dále obsahoval: <i>Streptococcus oralis</i> , <i>Neisseria lactamica</i>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Streptococcus</i> sk. G	72	2	59,5%
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	47	2	38,8%
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	1	0,8%
<i>Streptococcus</i> spp.	1	1	0,8%
Celkem	121		100%

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

Většina laboratoří v této sérii vyhověla zadání a získala po 2 bodech. Laboratoře, které označily jako patogena *S. pyogenes* (sk. A), resp. nepřiradily správné druhové jméno ani skupinu, získaly pouze po jednom bodu.

VZOREK 2: Edukativní vzorek (vzorek se nehodnotí) Izolát ze sputa 75 letého muže s akutním respiračním selháním.
ODPOVĚĎ: <i>Staphylococcus argenteus</i>

identifikace	frekvence	procento
<i>Staphylococcus argenteus</i>	84	69,4%
<i>Staphylococcus aureus</i>	27	22,3%
<i>Staphylococcus intermedius</i>	1	0,8%
<i>Staphylococcus</i> spp.	8	6,6%
žádný výsledek	1	0,8%
Celkem	121	100%

Staphylococcus argenteus je koaguláza pozitivní stafylokok, který je považován za „emerging“ původce vážných lidských infekcí. Může být vybaven stejnými faktory virulence, jako kmeny *S. aureus*. Byl popsán v r. 2015 v Austrálii, kde vyvolal onemocnění u domorodých obyvatel, Aboriginců [1]. Charakteristickou vlastností kmenů tohoto druhu je, že neprodukuje karotenoidní pigment, který je zodpovědný za barvu typických kolonií *S. aureus*. (Proto i název *argenteus* = stříbrný.) V literatuře existuje řada publikací, kde je uveden jako příčina onemocnění, včetně pneumonií vyvolaných Pantonovým-Valentinovým leukocidinem [2], nebo stafylokokových enterotoxikóz [3]. I v naší republice bylo již několik kmenů prokázáno [4,5]. Výsledky prakticky všech diskriminujících testů jsou shodné s druhem *S. aureus*: kmeny produkují volnou i vázanou (clumping-faktor) koagulázu, hyaluronidázu, termorezistentní nukleázu, takže fenotypově je nelze od *S. aureus* odlišit. Kmeny *S. argenteus* lze dobře identifikovat MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií.

Literatura

[1] Tong SY, Schaumburg F, Ellington MJ, *et al.* Novel staphylococcal species that form part of a *Staphylococcus aureus*-related complex: the non-pigmented *Staphylococcus argenteus* sp. nov. and the non-human primate-associated *Staphylococcus schweitzeri* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015; 65(Pt1):15–22.

[2] Dupieux C, Blonde R, Bouchiat C, *et al.* Community-acquired infections due to *Staphylococcus argenteus* lineage isolates harbouring the Panton-Valentine leucocidin, France. 2014. *Eurosurveillance.* 2015; 20: 6–8.

[3] Suzuki Y, Kubota H, Ono HK, *et al.* Food poisoning outbreak in Tokyo, Japan caused by *Staphylococcus argenteus*. *Int J Food Microbiol.* 2017; 262: 31–37.

[4] Petráš P, Kekláková J, Hutníková R. *Staphylococcus argenteus* – nový druh koaguláza pozitivního stafylokoků. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha).* 2019; 28(7): 262–263.

[5] Kukla R, Neradová K, Petráš P, Kekláková J, Ryšková L, Helena Žemličková. První potvrzený záchyt kmene *Staphylococcus argenteus* v České republice. *EMI 2020;* 69(1): 48–52.

VZOREK 3: Stolice od 40 letého pacienta s akutním průjmem vzniklým po požití kuřecího masa.

ODPOVĚĎ: ***Campylobacter jejuni***

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Campylobacter jejuni</i>	110	2	90,9%
<i>Campylobacter</i> spp.	8	2	6,6%
(signifikantní) patogen nenalezen	3	0	2,5%
Celkem	121		100%

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

Signifikantního patogena správně určilo 118 laboratoří, což je 97,5%. K získání plného počtu bodů postačovalo rodové jméno. Biochemické testy na určení *C. jejuni* nejsou spolehlivé, např. test hydrolýzy hippurátu, který se používá na rozlišení *C. jejuni* a *C. coli*, může někdy poskytovat falešně negativní výsledky (některé kmeny *C. jejuni* hippurát nehydrolyzují). Spolehlivé rozlišení obou druhů poskytuje pouze PCR a metoda MALDI-TOF MS, založená na analýze hmotových spekter druhově specifických proteinů [1].

Literatura

- [1] Kolínská R, Dřevínek M, Jakubů V, Žemličková H: Species identification of *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* and *C. coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and PCR. *Folia Microbiol.* 2008; 53:403-411.

VZOREK 4: Izolát z krve pacienta se sepsí, dlouhodobě hospitalizovaného pro pneumokoniózu uhlokopů.

ODPOVĚD: ***Enterobacter cloacae***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Enterobacter cloacae</i>	121	2	100%
Celkem	121		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 a vyšetřit jeho citlivost k cefotaximu a k meropenemu. Všechny zúčastněné laboratoře správně identifikovaly kmen 4 jako *Enterobacter cloacae*.

Kmen je i při zvýšené expozici rezistentní (R) k cefotaximu a při zvýšené expozici citlivý (I) k meropenemu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti kmene ze vzorku 4 jsou v tabulce 1, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro Enterobacterales, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 4 *Enterobacter cloacae*.

Antibiotikum	Obsah disku μg	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky			
		breakpoint ²		rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint ²		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie ³ / absolutní počet laboratoří ⁴			správné %
		C	R		C	R		C	I	R	
		≥ 20	< 17	6 - 6	≤ 1	> 2	> 4 - > 4	0	0	121	100,0
cefotaxim	5 μg	≥ 20	< 17	6 - 6	≤ 1	> 2	> 4 - > 4	0	0	121	100,0
meropenem	10 μg	≥ 22	< 16	19 - 20	≤ 2	> 8	2 - 4	7	7	107	5,8

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 při zvýšené expozici)

³ kategorie C: citlivý při standardním dávkování, I: citlivý při zvýšené expozici; R: rezistentní i při zvýšené expozici

⁴ správné výsledky jsou zvýrazněny

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace

* 5 měření diskovou difuzní metodou, ** 5 měření diluční mikrometodou

VZOREK 5: VZOREK 5: *Proteus mirabilis*

Kmen 5 je citlivý (C) při standardním dávkování k meropenemu a k ciprofloxacinu je rezistentní (R) i při zvýšené expozici. Všechny laboratoře udaly správné výsledky u ciprofloxacinu, u meropenemu chybovala 1 laboratoř.

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

Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 5 *Proteus mirabilis*.

Antibiotikum	Obsah disku μg	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky			
		breakpoint ²		rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint ²		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie ³ / absolutní počet laboratoří ⁴			správné %
		C	R		C	R		C	I	R	
		≥ 22	< 16	29 - 30	≤ 2	> 8	≤ 0,06 - 0,125	120	0	1	99,9
meropenem	10 μg	≥ 22	< 16	29 - 30	≤ 2	> 8	≤ 0,06 - 0,125	120	0	1	99,9
ciprofloxacin	5 μg	≥ 25	< 22	6 - 6	≤ 0,25	> 0,5	> 4 - > 4	0	0	121	100,0

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 kategorie C: citlivý při standardním dávkování, I: citlivý při zvýšené expozici; R: rezistentní i při zvýšené expozici

⁴ správné výsledky jsou zvýrazněny

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace

* 5 měření diskovou difuzní metodou, ** 5 měření diluční mikrometodou

Závěr

Správné výsledky interpretace kategorie klinické citlivosti k meropenemu u kmene 4 *Enterobacter cloacae* uvedlo pouze 7 ze 121 laboratoří. Pokud laboratoře vyšetřovaly citlivost diluční metodou, pak příčinou mohl být výsledek MIC v citlivé kategorii. Diskrepance mezi výsledky vyšetření MIC a difuzní diskové metody jsou časté u kmenů s citlivostí k meropenemu sníženou v důsledku produkce karbapenemázy, přičemž disková difuzní metoda se pro rutinní záchyt takových kmenů jeví jako dostatečně robustní [2].

Otázka EHK 1143 se týkala vyšetření (fenotypové) citlivosti kmene 4 k meropenemu rutinními metodami, nikoli vyšetření mechanismu rezistence. Není-li jiná volba a při respektování lokální epidemiologické situace může sloužit výsledek vyšetření citlivosti v kategorii C nebo I jako podklad k léčebnému použití daného antibiotika bez ohledu na to, zda je původce infekce producentem destruuujícího enzymu, neboť některé mechanismy rezistence neudělují vždy rezistenci fenotypu, a detekce širokospektrých β -laktamáz a karbapenemáz gramnegativních tyčků nevede sama o sobě k označení klinické rezistence [3].

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] Haldorsen B, Giske CG, Hansen DS, et al. Performance of the EUCAST disc diffusion method and two MIC methods in detection of Enterobacteriaceae with reduced susceptibility to meropenem: the NordiCAST CPE study. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73(10):2738–2747.
- [3] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.1, July 2017 [on-line]. Dostupný z WWW: http://www.eucast.org/resistance_mechanisms/, český překlad <http://www.szu.cz/detekce-mechanismu-rezistence-eucast>

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