



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/5-4/2020 (č. 1157)
Bakteriologická diagnostika

Praha, prosinec 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/5-4/2020 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-4/2020 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 vypracovaly:

Mgr. Renáta Šafránková, MUDr. Zuzana Ileninová, PhD., Mgr. Petra Klimešová, RNDr. Pavla Urbášková, CSc.

Zprávu schválil: Mgr. Renáta Šafránková

Dne: 14. 12. 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/5-4

Identifikace série:	EHK-1157
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. Stenotrophomonas maltophilia 2. Staphylococcus aureus + Streptococcus pyogenes 3. Yersinia enterocolitica 4. Salmonella Enteritidis 5. Staphylococcus epidermidis
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:	121 laboratoří
Označení vzorkovnic:	EHK-1157/1-5/2020
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:	2. 11. 2020 (humánní lab.); 24. 11. 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 23. 11. 2020 (hum.lab.); písemně na předepsaných formulářích do 8. 12. 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

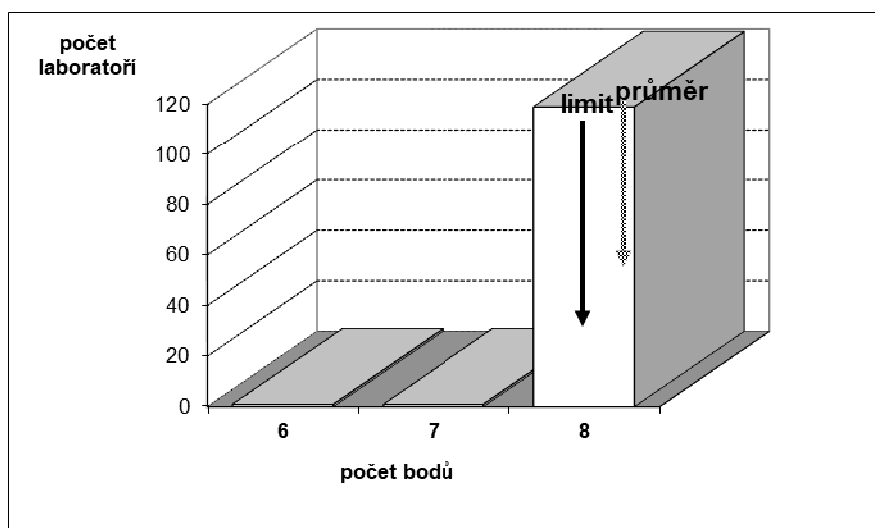
2. Příprava vzorku

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 agarů 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 lahviček 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 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 119, tj. 98,4% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,569 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $7,975 - (2 \times 0,203) = 7,569$). Tohoto limitu dosáhlo 119 laboratoří, 2 laboratoře tento limit nesplnily.

4. Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Izolát z krve od pacienta z ARO.

ODPOVĚď: ***Stenotrophomonas maltophilia***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Stenotrophomonas maltophilia</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.

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

Poprvé byla tato bakterie popsána v 60. letech minulého století jako *Pseudomonas maltophilia*, v roce 1983 byla přearožena do rodu *Xanthomonas*, následně pak v roce 1993 do rodu *Stenotrophomonas* [1].

Stenotrophomonas maltophilia je gramnegativní oxidázanegativní nefermentující pohyblivá multirezistentní bakterie, která je oportunním patogenem [2], zejména u hospitalizovaných pacientů. Infekce *S. maltophilia* bývají spojeny s vysokou morbiditou a mortalitou zejména u imunokompromitovaných a oslabených jedinců.

Literatura

- [1] Palleroni NJ, Bradbury JF. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. Int J Syst Bacteriol 1993; 43:606-609.
- [2] Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. Clin Microbiol Rev 1998; 11:57.

VZOREK 2: Stěr z léze na dolní končetině od pacientky s diabetem.

ODPOVĚď: ***Staphylococcus aureus + Streptococcus pyogenes***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Staphylococcus aureus + Streptococcus pyogenes</i>	119	2	98,4%
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	1	1,6%
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, tj. 98,4%, označila správně oba patogeny a získala plný počet bodů, 2 laboratoře určily jako původce pouze druh *Staphylococcus aureus* a získaly jeden bod.

VZOREK 3: Výtěr z rektu od ročního dítěte s průjmem.
ODPOVĚĎ: <i>Yersinia enterocolitica</i> Vzorek dále obsahoval: <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Yersinia enterocolitica</i>	120	2	99,2%
<i>Yersinia</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.

V posledních letech došlo v případě rodu *Yersinia* k několika taxonomickým změnám. Rod *Yersinia* byl zařazen do nové čeledi *Yersiniaceae*, řád *Enterobacterales* [1]. Také bylo na základě celogenomové sekvenace vytvořeno 6 nových druhů [2].

Infekce *Yersinia enterocolitica* je čtvrtou nejčastěji hlášenou zoonózou v Evropě po salmonelóze, kampylobakterióze a infekci Shiga toxin-produkující *E. coli* (dle dat ECDC, Surveillance Atlas of Infectious Diseases). Incidence za rok 2019 činila v zemích EU/EEA 1,48 případů na 100 000 obyvatel, v České Republice 5,80 případů na 100 000 obyvatel [3]. Typickým klinickým obrazem je gastroenteritida, nejběžnější sekundární komplikací je reaktivní artritida a erythema nodosum. V případě septikémie se může rozvinout i generalizovaná forma.

Pro diagnostiku *Y. enterocolitica* se využívá její schopnost růstu na selektivním médiu CIN (cefsulodin-irgasan-novobiocin) a optimální kultivační teplota 25-29°C. Udává se vyšší biochemická aktivita při 25-29°C než při standardní kultivační teplotě 37°C, podobně se mohou lišit i antigenní vlastnosti (při vyšší teplotě může dojít ke ztrátě aglutinace). V případě spontánní aglutinace je vhodné kmen pasážovat přes obyčejný agar, spontánnost se často vytratí.

Zaslaný kmen *Y. enterocolitica* bezchybně identifikovalo do druhu 120 ze 121 zúčastněných laboratoří. Laboratoři, která kmen určila pouze do druhu, bude odebrán jeden bod.

Literatura

[1] Adeolu M, et al.: Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacterales': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*,

Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2016;66(12):5575-5599.

- [2] Le Guern et al.: *Yersinia artesiensis* sp. nov., *Yersinia proxima* sp. nov., *Yersinia alsatica* sp. nov., *Yersinia vastinensis* sp. nov., *Yersinia thracica* sp. nov. and *Yersinia occitanica* sp. nov., isolated from humans and animals. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020;70:5363–5372.
- [3] ECDC, Surveillance Atlas of Infectious Diseases:
<https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>

VZOREK 4: Izolát ze stolice dvouletého dítěte s horečkou, zvracením a bolestí břicha.
ODPOVĚĎ: <i>Salmonella</i> Enteritidis

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Salmonella</i> Enteritidis	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 ampicilinu a ke kolistinu. Všechny zúčastněné laboratoře správně identifikovaly kmen 4 jako *Salmonella* Enteritidis.

Kmen je rezistentní k ampicilinu a citlivý ke kolistinu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti kmene ze vzorku 4 jsou v tabulce 1, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) ampicilinu a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) ampicilinu a kolistinu pro Enterobacterales, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 4 *Salmonella* Enteritidis.

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	
ampicilin	10 μg	≥ 14	< 14	6 - 6	≤ 8	> 8	> 32 - > 32	0	0	121	100,0
kolistin	ND	ND	ND	NT	≤ 2	> 2	0,5 - 0,5	117	1	2	97,5

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: *Staphylococcus epidermidis*

Kmen 5 je rezistentní k oxacilinu a při standardním dávkování citlivý ke kotrimoxazolu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti u kmene 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) cefoxitinu a kotrimoxazolu a MIC oxacilinu a kotrimoxazolu pro *Staphylococcus epidermidis*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 5 *Staphylococcus epidermidis*.

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	%
cefoxitin	30 μg	≥ 25	< 25	19 - 22	nevyšetřuje se			5	0	116	95,9
oxacilin	nevyšetřuje se			≤ 0,25	> 0,25	4 - 8					
kotrimoxazol	25 μg	≥ 17	< 14	29 - 31	≤ 2	> 4	0,25 - 0,5	121	0	0	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

poznámka: breakpointy kotrimoxazolu jsou vztaženy na obsah trimetoprimu

Závěr

Tři laboratoře chybovaly u kmene 4 *Salmonella* Enteritidis a kolistinu, dvě označily tento kmen jako rezistentní a jedna jako citlivý při zvýšené expozici (I); jedna laboratoř vyšetření citlivosti ke kolistinu neprovedla. Kategorie I u Enterobacterales neexistuje, standardní je dávka 4,5 MIU podávána nitrožilně každých 12 hodin s úvodní dávkou 9 MIU.

Pět laboratoří mělo velmi závažnou chybu u oxacilinu a kmene *Staphylococcus epidermidis*, který označily jako citlivý. EUCAST udává tři breakpointy pro oxacilin v závislosti na druhu vyšetřovaného stafylokoka (tzv. species-specific breakpoint), a podobně je tomu u některých dalších antibiotik ze skupiny beta-laktamů, aminoglykosidů a fluorochinolonů [1].

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>

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