



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/5-1/2020 (č. 1113)
Bakteriologická diagnostika

Praha, květen 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/5-1/2020 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-1/2020 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, Mgr. Ondřej Daniel, RNDr. Pavla Urbášková, CSc.

Zprávu schválil: Mgr. Renáta Šafránková

Dne: 11. 5. 2020

Pracoviště 2 ESPT (AP CEM - Akreditační pracoviště Centra epidemiologie a mikrobiologie):

www.szu.cz/espt
email: apcem@szu.cz

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT

Identifikace kola/cyklu:	PT#M/5-1/2020-EHK-1113/17. 2. 2020
Název:	EHK-Bakteriologická diagnostika
Poskytovatel:	SZÚ – Centrum epidemiologie a mikrobiologie – AP CEM 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. Arcanobacterium haemolyticum 2. Enterococcus casseliflavus 3. Salmonella Bareilly (edukativní vzorek) 4. Streptococcus pyogenes Staphylococcus aureus (vet.lab.) 5. Pseudomonas aeruginosa
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-1113/1-5/2020
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:	17. 2. 2020 (humánní lab.); 10. 3. 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: formulář pro zápis výsledků a pokyny účastníkům
Předání výsledků:	elektronicky do 9. 3. 2020 (hum.lab.); písemně na předepsaných formulářích do 24. 3. 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 vztažné hodnoty:	Výsledky NRL
Termín zveřejnění závěrečné zprávy:	Do 12 týdnů po předání výsledků k hodnocení

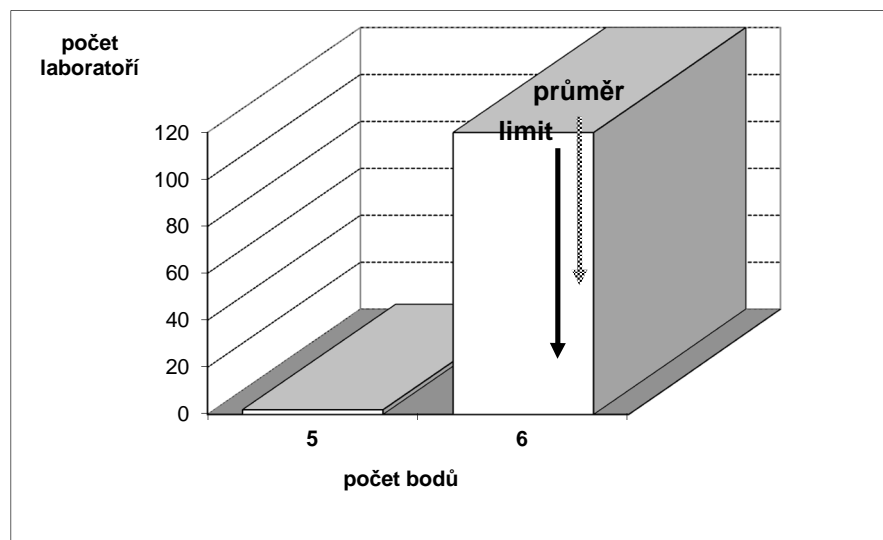
2. Příprava vzorku

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 3 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 6 bodů, 1 vzorek byl edukativní a nehodnotil se. 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 120, tj. 98,4% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 5,728 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $5,984 - (2 \times 0,128) = 5,728$). Tohoto limitu dosáhlo 120 laboratoří, 2 laboratoře tento limit nespĺnily.

4. Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Výtěr z krku od 19 letého pacienta s bolestí v krku a horečkou.
ODPOVĚĎ: <i>Arcanobacterium haemolyticum</i> Vzorek dále obsahoval: <i>Streptococcus oralis</i>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Arcanobacterium haemolyticum</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.

Arcanobacterium haemolyticum (dříve *Corynebacterium haemolyticum*) je nepříliš častým původcem ranných infekcí a faryngitid převážně u mladých lidí; tato bakterie může být vzácně izolována jako příčina endokarditid, osteomyelitid i sepsí [1].

A. haemolyticum je koryneformní, grampozitivní tyčka, na rozdíl od korynebakterií je kataláza negativní a má pozitivní reverzní (inverzní) CAMP test se *Staphylococcus aureus*. Identifikace pomocí API Coryne je spolehlivá stejně jako identifikace metodou MALDI-TOF MS.

Jméno *Arcanobacterium* (z latin. „*arcanus*“ = tajemný, záhadný) znamená „záhadná bakterie“ a váže se ke skutečnosti, že tento mikrob je v laboratořích klinické mikrobiologie často přehlížen, protože je považován za kontaminující nebo běžnou flóru [2].

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

Literatura

[1] Wong V, Turmezei T, Cartmill M, Soo S. Infective endocarditis caused by *Arcanobacterium haemolyticum*: a case report. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2011; 10: 17.

[2] Meyer DK, Reboli AC. In: Principles and Practice of Infectious Diseases. sixth. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editor. Vol. 2. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. Other Coryneform Bacteria and *Rhodococcus*; pp. 2465–2478.

VZOREK 2: Izolát z hemokultury od pacienta z JIP.
ODPOVĚĎ: <i>Enterococcus casseliflavus</i>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	120	2	98,4%
<i>Enterococcus faecium</i>	1	1	0,8%
<i>Enterococcus</i> spp.	1	1	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.

Většina laboratoří (98,4%) identifikovala správně druh mikroba a získala plný počet bodů. Jedna laboratoř kmen identifikovala jako *Enterococcus faecium* a další zařadila kmen pouze do rodu, tyto dvě laboratoře obdržely po jednom bodu. *E. casseliflavus* je na rozdíl od *E. faecium* pohyblivý; k rozlišení od rovněž pohyblivého druhu *E. gallinarum* slouží u *E. casseliflavus* spolehlivě produkce žlutého pigmentu, která je patrná zejména při prodloužené kultivaci (48 h). Spolehlivá je i identifikace metodou MALDI-TOF MS.

VZOREK 3: Edukativní vzorek (vzorek se nehodnotí) Stolice od 55 leté pacientky s průjmem a bolestmi břicha.
ODPOVĚĎ: <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérovar Bareilly 6,7:y:1,5

identifikace	četnost	celkem	frekvence v %	celkem v %
<i>Salmonella</i> Bareilly (6,7:y:1,5)	53		43,4	
<i>Salmonella</i> (6,7:y:-)	6	62	4,9	50,8
<i>Salmonella</i> (7:y:-)	3		2,5	
<i>Salmonella</i> (6,7,8:y:-)	1	1	0,9	0,9
<i>Salmonella</i> Mikawasima (6,7:y:e,n,z ₁₅)	2	2	1,6	1,6
<i>Salmonella</i> Enteritidis (9,12:g,m:-)	1	1	0,9	0,9
<i>Salmonella</i> sk. C1	27	27	22,1	22,1
<i>Salmonella</i> sk. C	16	16	13,1	13,1
<i>Salmonella</i> OMB (C, F, G, H)	2	2	1,6	1,6
<i>Salmonella</i> spp.	11	11	9,0	9,0
Celkem	122	122	100,0	100,0

Jako edukativní vzorek byl rozeslán kmen *Salmonella* Bareilly 6,7:y:1,5 se zadáním určit antigenní vzorec nebo také název sérovaru podle zařazení dle White-Kauffmann-Le Minor schématu. Jedná se o sérovar, který byl v letech 2017 a 2018 evidován jako třetí a šestý nejčastější v České republice. Jeho zvýšený výskyt byl též zaznamenán i

na Slovensku. Důvodem zvýšeného výskytu byla epidemie, jejímž zdrojem byly sušené vaječné hmoty distribuované v obou státech.

Požadavky zadání splnilo 53 (43,4 %) zúčastněných laboratoří, které uvedly název sérovaru či plný antigenní vzorec. Kdybychom jako kritérium úspěšnosti zvolili identifikaci alespoň dvou antigenních struktur, úspěšnost by se zvýšila na 65 (53,3 %) pracovišť.

V identifikaci bičíkových antigenů jsme pozorovali skoro nulovou rozmanitost. Pouze dvě laboratoře dospěly k částečně nesprávnému antigennímu vzorci, nepřesně identifikovaly bičíkové antigeny druhé fáze (*S. Mikawasima*). Jedna laboratoř chybně stanovila somatické i bičíkové antigeny (*S. Enteritidis*).

V dalších 43 případech se klinické laboratoře spokojily se zařazením do skupiny C1 (přítomnost O:6,7 epitopů) nebo více obecně do skupiny C (přítomnost O:6,7; O:6,8 či O:8 epitopů). Právě O somatické antigeny *S. Bareilly* je možné určit antiséry, která si laboratoře pořizují pro identifikaci jednoho z dlouhodobě nejfrekventovanějších sérovarů a to *S. Infantis*. Dvakrát byla stanovena příslušnost prostřednictvím OMB polyvalentního O antiséra.

Závěrem je potřeba zmínit, že vhodným postupem k úplnému určení antigenního vzorce *Salmonella* sp., konkrétně v případech nedostupnosti polyvalentních, monovalentních a faktorových antisér či nemožnosti úplného určení, je její zaslání do NRL pro salmonely. Optimálně alespoň s částečně určenou antigenní strukturou, jak někteří účastníci uvedli. Dále je potěšující, že oproti předešlým cyklům EHK se v letošním roce všechny laboratoře zapojily do identifikace patogena, i když se jednalo o vzorek edukativní.

VZOREK 4: Izolát z výtěru krku od dítěte (9 let) s akutní infekcí HCD.

ODPOVĚĎ: ***Streptococcus pyogenes***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Streptococcus pyogenes</i>	121	2	99,2%
<i>Streptococcus</i> sk. A	1	2	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 a vyšetřit jeho citlivost k erytromycinu a ke klindamycinu. 121 laboratoří správně identifikovalo kmen 4 jako *Streptococcus pyogenes*, jedna laboratoř jako *Streptococcus* sk.A.

Kmen byl rezistentní (R) k oběma antibiotikům. U klindamycinu byly sice výsledky MIC i diskové metody v citlivé kategorii, ale kmen vykazoval rezistenci po indukci erytromycinem.

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 *S. pyogenes*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 4 *Streptococcus pyogenes*.

Antibiotikum	Obsah disku μg	Průměry IZ (mm)		MIC (mg/l)		Správné výsledky		
		breakpoint pro citlivé kmeny	rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint pro citlivé kmeny	rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie	počet laboratoří	%
erytromycin	15 μg	≥ 21	6 - 6	≤ 0,25	> 4 - > 4	R	122/122	100
klindamycin	2 μg	≥ 17	22 - 24	≤ 0,5	≤ 0,03 - ≤ 0,03	R ²	120/122	98,4

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

² indukovaná rezistence

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

VZOREK 5: *Pseudomonas aeruginosa* z moči

Kmen 5 je citlivý (C) k amikacinu a k ceftazidimu je citlivý při zvýšené expozici (I). Jedna laboratoř chybovala u amikacinu, a 15 u ceftazidimu (14 laboratoří označilo kmen jako citlivý a jedna jako rezistentní).

Celkové výsledky vyšetření citlivosti u kmene 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a MIC amikacinu a ceftazidimu pro izolát *P. aeruginosa* z moči, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 5 *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiotikum	Obsah disku μg	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky ⁴			
		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	
amikacin ³	30 μg	≥ 15	< 15	23 - 23	≤ 16	> 16	4 - 8	121	1	0	99,2
ceftazidim	10 μg	≥ 50	< 17	24 - 25	≤ 0,001	> 8	4 - 8	14	107	1	87,7

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 breakpointy pro infekce pocházející z močových cest

⁴ správné výsledky jsou zvýrazněny

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

Závěr

V této sérii EHK chybovaly dvě laboratoře u interpretace výsledků citlivosti ke klindamycinu u *S. pyogenes* (kmen 4) a 15 laboratoří chybovalo u *Pseudomonas aeruginosa* (kmen 5).

Léčba infekcí *P. aeruginosa* vyžaduje vysoké dávky některých antibiotik [1], u aminoglykosidů (s výjimkou močových infekcí) také kombinaci s jinými antibiotiky nebo léčebnými postupy. Podrobnosti ohledně nové kategorizace citlivosti k aminoglykosidům v závislosti na původu vzorků lze nalézt na webové stránce EUCAST (http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/guidance_documents/) nebo v českém překladu tohoto dokumentu ([Pokyny k zavádění a používání revidovaných breakpointů aminoglykosidů](http://www.szu.cz/dalsi-dokumenty-s-pokyny-pri-testovani-citlivosti-eucast)) (<http://www.szu.cz/dalsi-dokumenty-s-pokyny-pri-testovani-citlivosti-eucast>).

Patnáct laboratoří chybovalo u ceftazidimu, 14 z nich označilo kmen jako C, čili citlivý při standardním dávkovacím režimu. Všechny kmeny inhibované koncentrací ≤ 8 mg/l ceftazidimu jsou však řazeny do kategorie I (citlivé při zvýšené expozici), neexistují tudíž kmeny *P. aeruginosa* citlivé při standardním dávkovacím režimu. Nové kategorie citlivosti se týkají také jiných druhů bakterií a antibiotik [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.