



Státní zdravotní ústav
Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti
Poskytovatel zkoušení způsobilosti akreditovaný ČIA
podle ČSN EN ISO/IEC 17043, reg. č. 7001
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10 – Vinohrady



Zkoušení způsobilosti v lékařské mikrobiologii
(Externí hodnocení kvality)

PT#M/5-3/2016 (č.941)
Bakteriologická diagnostika

Praha, listopad 2016

Obsah

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing)	3
2. Příprava vzorku	4
3. Hodnocení	4
4. Výsledky zúčastněných laboratoří	5-8
5. Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/5-3/2016 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-3/2016 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 programů zkoušení způsobilosti č. 7001.

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

Nedílnou součástí závěrečné zprávy je výsledkový protokol jednotlivé laboratoře.

Koordinátor:

Mgr. Renáta Šafránková
Tel: 267 082 428

Zprávu vypracovaly:

Mgr. Renáta Šafránková, MUDr. Věra Lebedová, RNDr. Pavla Urbášková CSc, Mgr. Jana Zavadilová

Zprávu schválil: Mgr. Renáta Šafránková

Dne: 21. 11. 2016

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/5-3/2016-EHK-941/5. 9. 2016
Název:	EHK-Bakteriologická diagnostika
Poskytovatel:	SZÚ – Centrum epidemiologie a mikrobiologie – AP CEM Šrobárova 48, Praha 10, 100 42 tel.: + 420 267082250, fax.: + 420 267082427
Vedoucí ESPT	Ing. Věra Vrbíková
Koordinátor:	Mgr. Renáta Šafránková
Subdodavatel:	není
Charakteristika materiálu:	Simulovaný klinický vzorek 1. Bordetella pertussis 2. Haemophilus influenzae 3. Campylobacter jejuni 4. Enterococcus faecalis 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
Označení vzorkovnic:	EHK-941/1-5/2016
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:	5. 9. 2016 (humánní lab.); 26. 9. 2016 (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:	118
Způsob distribuce:	přepravcem se službou přeprava nebezpečného zboží Přílohy: formulář pro zápis výsledků a pokyny účastníkům
Předání výsledků:	písemně do 26. 9. 2016 (hum.lab.) a do 11. 10. 2016 (vet.lab.) na předepsaných formulářích
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 rozeslání zprávy účastníkům:	listopad 2016

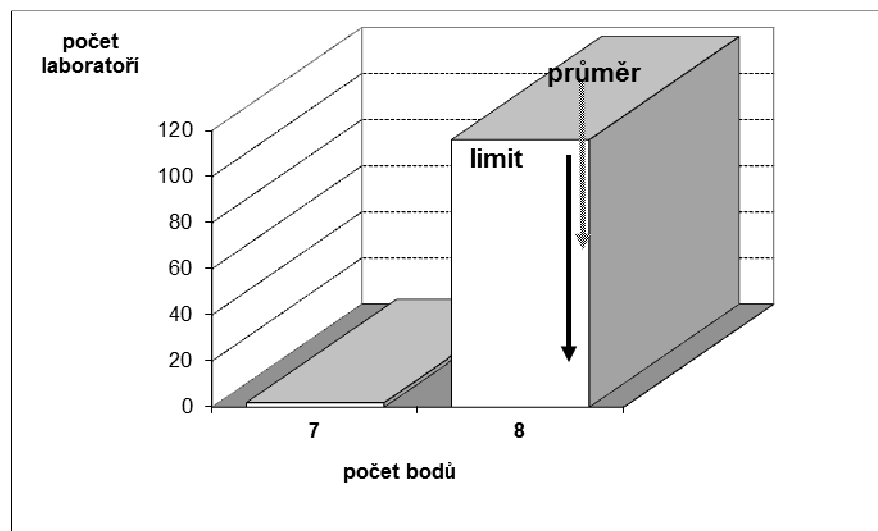
2. Příprava vzorku

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-03 a SOP-NRL/CNCTC-09). Lahvičky jsou skladovány v chladničce při teplotě 4 – 8°C.

3. Hodnocení

Celkem byly vzorky rozeslány 118 laboratořím, všechny laboratoře odeslaly výsledek do závěrečného termínu. Za identifikaci signifikantního patogena ve 4 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 8 bodů; za vyšetření citlivosti mohly laboratoře obdržet celkem 4 body (vzorek 4 a 5). Hodnocení vyšetření citlivosti je pouze orientační a toto bodové ohodnocení se nezapočítává do limitu nutného pro úspěšné absolvování série EHK. Bodování pro identifikaci bylo provedeno ve stupnici 2, 1, 0 a –1 bodů.

Graf 1: Počet bodů za správnou identifikaci.



Maximálního počtu bodů při identifikaci dosáhlo 116, tj. 98,3% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,72 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $7,98 - (2 \times 0,13) = 7,72$). Tohoto limitu dosáhlo 116 laboratoří, 2 laboratoře tento limit nesplnily.

4. Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Nasofaryngeální výtěr od dítěte s dlouhotrvajícím kašlem.
ODPOVĚď: <i>Bordetella pertussis</i> Vzorek dále obsahoval: <i>Streptococcus oralis</i>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Bordetella pertussis</i>	116	2	98,3%
<i>Bordetella</i> spp.	2	1	1,7%
Celkem	118		100%

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

Bordetella pertussis roste na Charcoal agaru nebo Bordet-Gengou agaru. K médiu se přidává cefalexin (40 mg/l), který inhibuje růst běžné flóry nosohltanu. Kultivovat je třeba vždy jak na médiu s cefalexinem, tak i na médiu bez cefalexinu z důvodu možné inhibice růstu některých kmenů *B. pertussis* na médiu s cefalexinem, v normální atmosféře při teplotě 35 - 36°C po dobu 7 dnů.

B. pertussis vyrůstá za 48 až 72 hodin, vytváří drobné stříbřité polokulovité kolonie, při doteku kličkou se rozetřou (nepohybují se), po 3 - 4 dnech inkubace jsou kolonie větší a lesklé, připomínají „kapky rosy“, na Bordet-Gengou agaru je viditelná zóna hemolýzy. Je identifikovatelná do druhu, jak použitím MALDI-TOF MS, tak pomocí diagnostického séra (aglutinační séra *B. pertussis*/parapertussis; Remel).

Většina laboratoří (98,3%) identifikovala kmen správně a získala plný počet bodů, 2 laboratoře kmen nedourčily a získaly po jednom bodu.

VZOREK 2: Izolát z krve od pacienta s chronickým zánětem průdušek.
ODPOVĚď: <i>Haemophilus influenzae</i>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Haemophilus influenzae</i>	118	2	100%
Celkem	118		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, pět laboratoří dále doplnilo identifikaci tím, že vyloučilo typ „b“. Všechny zúčastněné laboratoře získaly po 2 bodech.

Pro EHK byl vybrán neopouzdrěný (= netytovatelný) kmen *H. influenzae* (HiNT). Tyto kmeny bývají součástí normální mikroflóry nosohltanu. Příležitostně mohou vyvolat lokální infekci (otitida, sinusitida, konjunktivitida či bronchitida) a výjimečně i závažné onemocnění (sepsa nebo meningitida). V současné době patří HiNT k hlavním původcům hemofilových invazivních onemocnění v České republice.

Chtěli bychom připomenout, že po rozšíření programu surveillance *H. influenzae* b (Hib) invazivního onemocnění koncem roku 2008 se od roku 2009 začala sledovat závažná onemocnění způsobená kromě Hib i ostatními opouzdrěnými kmeny *H. influenzae* (sérotypy a, c, d, e, f) a neopouzdrěnými kmeny *H. influenzae*. Izoláty *H. influenzae* z těchto invazivních onemocnění mají být předány do NRL pro hemofilové nákazy k ověření identifikace (viz. Vyhláška MZ ČR č. 473/2008 Sb. o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce, Příloha č. 7).

VZOREK 3: Stolicе od pacienta s akutním průjmem vzniklým po požití drůbežího masa.

ODPOVĚĎ: ***Campylobacter jejuni***

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Campylobacter jejuni</i>	113	2	95,8%
<i>Campylobacter</i> sp.	5	2	4,2%
Celkem	118		100%

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

Signifikantního patogena správně identifikovaly všechny zúčastněné laboratoře a získaly po dvou bodech. Spolehlivé rozlišení obou druhů poskytuje pouze PCR a metoda MALDI-TOF, 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.* 53:403-411 (2008).

VZOREK 4: Izolát z krve septického pacienta léčeného pro malignitu.

ODPOVĚĎ: ***Enterococcus faecalis***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Enterococcus faecalis</i>	118	2	100%
Celkem	118		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 vankomycinu. Kmen 4 *Enterococcus faecalis* je citlivý k ampicilinu a rezistentní k vankomycinu. Všech 118 zúčastněných laboratoří identifikovalo správně kmen jako *E. faecalis*. Všechny laboratoře měly správné výsledky vyšetření citlivosti k vankomycinu a jedna chybovala u ampicilinu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti kmene ze vzorku 4 jsou v tabulce 1, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) ampicilinu a vankomycinu pro citlivé kmene *E. faecalis*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika, a výsledky laboratoří.

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 4 *Enterococcus faecalis*

Antibiotikum	Zdroj CLSI [2]	Obsah disku µg	Průměry IZ (mm)		MIC (mg/l)		Správné výsledky		
			breakpoint pro citlivé kmene	rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint pro citlivé kmene	rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie	počet laboratoří	%
ampicilin	EUCAST [1]	2	≥ 10	15 - 16	≤ 4	2 - 4	C	117/118	99,2
	CLSI [2]	10	≥ 17	21 - 22	≤ 8				
vankomycin	EUCAST [1]	5	≥ 12	9 - 10	≤ 4	16 - 16	R	118/118	100,0
	CLSI [2]	30	≥ 17	12 - 12					

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

VZOREK 5: ***Pseudomonas aeruginosa***

Požadavek byl vyšetřit citlivost kmene ze vzorku 5 k piperacilinu/tazobaktamu a ke karbapenemům. Kmen byl v obou případech rezistentní. Všechny laboratoře měly správné výsledky vyšetření citlivosti ke karbapenemům, jedna laboratoř chybovala u piperacilinu/tazobaktamu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti u kmene 5 jsou

v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) piperacilinu/tazobaktamu, meropenemu a imipenemu, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika, a výsledky laboratoří.

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

Antibiotikum	Zdroj	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	%
piperacilin/tazobaktam	EUCAST [1]	30-6	≥ 18	11 - 11	≤ 16	64 - 64	R	117/118	99,2
	CLSI [2]	100-10	≥ 21	19 - 20					
meropenem	EUCAST [1]	10	≥ 24	9 - 10	≤ 2	16 - 16	R	118/118	100,0
	CLSI [2]		≥ 19						
imipenem	EUCAST [1]	10	≥ 20	9 - 10	≤ 4	$> 32^{***}$	R	118/118	100,0
	CLSI [2]		≥ 19		≤ 2				

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

Závěr

V této sérii EHK se vyskytly chybné výsledky vyšetření citlivosti celkem v 0,4 %, respektive jen ve 2 případech z celkového počtu 472 měření (dvě vyšetřovaná antibiotika ve 118 laboratořích). Tento velmi uspokojivý výsledek lze přičíst dobré práci laboratoří.

Literatura

- [1] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, valid from 2016-01-01 [on-line]. Dostupný z WWW: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/, český překlad dostupný z WWW: <http://www.szu.cz/tabulky-breakpointu-eucast>.
- [2] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 26th ed. CLSI supplement M100-S. Wayne, Pa. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.

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