



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/5-4/2016 (č.954)
Bakteriologická diagnostika

Praha, leden 2017

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/5-4/2016 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-4/2016 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, Ing. Monika Marejková PhD., RNDr. Pavla Urbášková CSc

Zprávu schválil: Mgr. Renáta Šafránková

Dne: 24. 1. 2017

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/5-4/2016-EHK-954/31. 10. 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. Stenotrophomonas maltophilia 2. Staphylococcus aureus + Streptococcus pyogenes 3. Escherichia coli O157 4. Streptococcus pneumoniae 5. Escherichia coli
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-954/1-5/2016
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:	31. 10. 2016 (humánní lab.); 14. 11. 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 22. 11. 2016 (hum.lab.) a do 30. 11. 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 vztažené hodnoty:	Výsledky NRL
Termín rozeslání zprávy účastníkům:	leden 2017

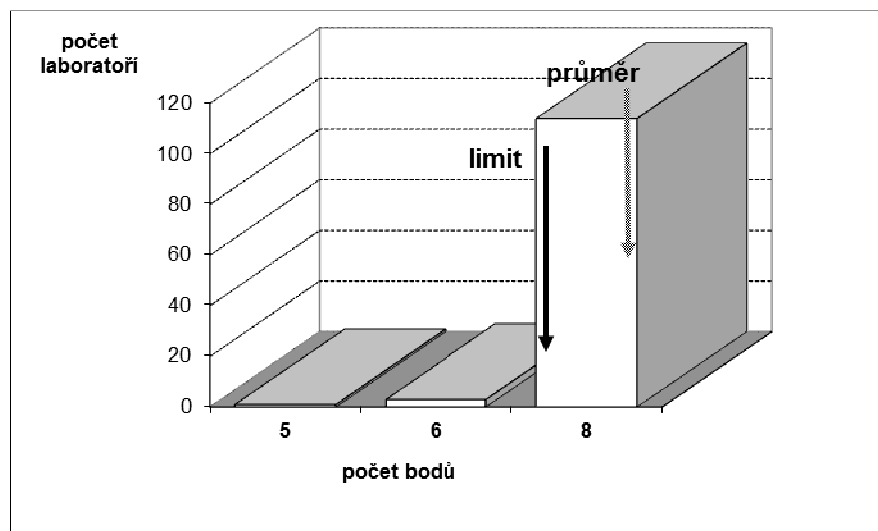
2. Příprava vzorku

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 zmrazení 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 5 bodů (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 114, tj. 96,6% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,086 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $7,92 - (2 \times 0,417) = 7,086$). Tohoto limitu dosáhlo 114 laboratoří, 4 laboratoře tento limit nespĺnily.

4. Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Izolát z krve od pacienta s neutropenií.

ODPOVĚĎ: ***Stenotrophomonas maltophilia***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	117	2	99,2%
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	1	2	0,8%
Celkem	118		100%

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

Všechny laboratoře s výjimkou jedné označily kmen jako *Stenotrophomonas maltophilia*, 1 laboratoř použila starší rodové jméno *Xanthomonas*. Všem laboratořím byly přiznány 2 body.

VZOREK 2: Stěr z kůže od pacienta s bérčovým vředem.

ODPOVĚĎ: ***Staphylococcus aureus + Streptococcus pyogenes***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Staphylococcus aureus + Streptococcus pyogenes</i>	115	2	97,5%
<i>Staphylococcus aureus +</i> β hemolytický streptokok sk. A	2	2	1,7%
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1	0,8%
Celkem	118		100%

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

117 laboratoří označilo správně oba patogeny a získalo plný počet bodů, 1 laboratoř určila jako původce pouze *Staphylococcus aureus* a získala jeden bod. *S. aureus* a pyogenní streptokok jsou obvyklými původci kožních infekcí a bývají často nalézány i ve smíšených kulturách.

VZOREK 3: Stolice od 2-letého dítěte s průjmem

ODPOVĚď: ***Escherichia coli* O157**

Vzorek dále obsahoval: *Enterococcus faecalis*

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Escherichia coli</i> O157	114	2	96,6%
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0,8%
signifikantní patogen neprokázán	3	0	2,5%
Celkem	118		100%

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

E.coli O157 vyvolávají průjmová onemocnění a na základě přítomnosti či nepřítomnosti genů kódujících Shiga toxiny jsou zařazeny do patoskupin Shiga toxin–produkující (STEC) nebo enteropatogenní (EPEC) *E.coli*. STEC O157: H7/H- (sorbitol–nefermentující i SOR–fermentující varianta) jsou původci nekomplikovaných nebo krvavých průjmů a hemolyticko-uremického syndromu [1]. Přibližně třetina infekcí STEC hlášených do ECDC členskými státy je spojena se séroskupinou *E.coli* O157 [2]. EPEC O157 tvoří několik sérotypů podle typu bičíkového (H) antigenu [3], a vedle dalších EPEC séroskupin působí profuzní vodnaté průjmy u malých dětí. K faktorům virulence EPEC patří intimin, kódován *eae* genem, který se rovněž vyskytuje mezi kmeny STEC [4].

Do EHK byl vybrán sorbitol–fermentující kmen *E.coli* O157, Shiga toxiny – negativní. Čtyřem laboratořím, které signifikantního patogena neidentifikovaly nebo neurčily séroskupinu *E.coli*, byly strženy 2 body. Dvě laboratoře uvedly, že u kmene neprokázaly Shiga toxiny a 12 laboratoří doplnilo povinnost odesílat izoláty *E.coli* O157 k zjištění Shiga toxinů do NRL, na základě vyhlášky 473/2008 Sb. „O systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce“. Jedna laboratoř správně uvedla přítomnost *eae* genu, a další laboratoř uvedla pozitivní test na sorbitol.

Dosažená úspěšnost se nezměnila oproti poslednímu EHK v roce 2013, kdy byla *E.coli* O157 správně identifikována 97 % účastněných laboratoří.

Na závěr si opět dovoluujeme upozornit, že uvádět antigenní strukturu včetně „H“ antigenu lze pouze v případě, že typ „H“ antigenu byl skutečně dourčen, ať už genotypově nebo aglutinačně s příslušným „H“ antisérem. Antiséra proti somatickým (O) nejsou specifická i proti bičíkovým antigenům.

Literatura

- [1] Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol.* 2005;295(6-7):405–418.

- [2] European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of seven priority food- and waterborne diseases in the EU/EEA. Stockholm: ECDC; 2015.
- [3] Morabito S. (2014). Pathogenic *E.coli*. Caizer Academic Press.
- [4] Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(4):822–880.

VZOREK 4: Izolát z mozkomíšního moku od pacienta s meningitidou.
ODPOVĚď: <i>Streptococcus pneumoniae</i>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Streptococcus pneumoniae</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 penicilinu a k cefotaximu. Kmen 4 *Streptococcus pneumoniae* je izolát z mozkomíšního moku, rezistentní k penicilinu a citlivý k cefotaximu. Všechny 118 zúčastněných laboratoří identifikovalo správně kmen jako *S. pneumoniae*. S výjimkou dvou měly všechny ostatní laboratoře správné výsledky vyšetření citlivosti k penicilinu a všechny laboratoře označily správně kmen 4 jako citlivý k cefotaximu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti kmene ze vzorku 4 jsou v tabulce 1, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) penicilinu a cefotaximu pro citlivé izoláty *S. pneumoniae* z mozkomíšního moku, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika, a výsledky laboratoří.

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 4 *Streptococcus pneumoniae*

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	%
oxacilin	EUCAST [1]	1 μg	≥ 20	8 - 8	ND	NT	R	116/118	98,3
	CLSI [2]								
penicilin	EUCAST [1]	ND	ND	NT	$\leq 0,06$	0,5 - 0,5			
	CLSI [2]								
cefotaxim	EUCAST [1]	ND	ND	NT	$\leq 0,5$	0,25 - 0,25	C	118/118	100,0
	CLSI [2]								

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; * 5 měření diskovou difúzní metodou, ** 5 měření diluční mikrometodou; NT: nevyšetřeno; ND: neudáno; C: citlivý; R: rezistentní.

VZOREK 5: *Escherichia coli*

Požadavek byl vyšetřit citlivost kmene ze vzorku 5 k cefotaximu, gentamicinu a uvést, zda kmen produkuje ESBL. Kmen je rezistentní k cefotaximu, citlivý ke gentamicinu a produkuje ESBL. Všechny laboratoře odpověděly správně na otázky citlivosti kmene k cefotaximu a na produkci ESBL, dvě laboratoře chybovaly u gentamicinu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti u kmene 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) cefotaximu a gentamicinu, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika, a výsledky laboratoří.

Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 5 *Escherichia coli*

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	%
cefotaxim	EUCAST [1]	10	≥ 20	6 - 6	≤ 1	$> 4 - > 4$	R	118/118	100,0
	CLSI [2]	30	≥ 26	19 - 20					
gentamicin	EUCAST [1]	10	≥ 17	18 - 19	≤ 2	1 - 2	C	116/118	98,3
	CLSI [2]		≥ 15		≤ 4				

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

Závěr

V této sérii EHK poskytly zúčastněné laboratoře 99,4 % správných odpovědí u výsledků vyšetření citlivosti kmenů 4 a 5. Dvě chybné odpovědi byly zaznamenány u kmene 4 a penicilinu a dvě u kmene 5 a gentamicinu.

Laboratoř, která chybovala 2 krát v identifikaci a 2 krát ve vyšetření citlivosti, by měla prověřit své metody a zaměřit se na kontrolu kvality, která je součástí správné laboratorní praxe.

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 reklamací vyhodnocení série postupujte, prosím, dle reklamačního řádu.