



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/5-1/2017 (č.959)
Bakteriologická diagnostika

Praha, květen 2017

Obsah

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing)	3
2. Příprava vzorku	4
3. Hodnocení	4
4. Výsledky zúčastněných laboratoří	5-9
5. Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/5-1/2017 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-1/2017 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 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. Daniela Dědičová CSc., RNDr. Pavla Urbášková CSc

Zprávu schválil: Mgr. Renáta Šafránková

Dne: 17. 5. 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/5-1/2017-EHK-959/21. 2. 2017
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. Burkholderia cepacia komplex 2. Enterococcus casseliflavus 3. Salmonella Manhattan (edukativní vzorek) 4. Acinetobacter baumannii komplex 5. Staphylococcus aureus
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-959/1-5/2017
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:	21. 2. 2017 (humánní lab.); 6. 3. 2017 (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:	120
Způsob distribuce:	přepravcem se službou přeprava nebezpečného zboží Přílohy: formulář pro zápis výsledků a pokyny účastníkům
Předání výsledků:	písemně do 14. 3. 2017 (hum.lab.) a do 20. 3. 2017 (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:	květen 2017

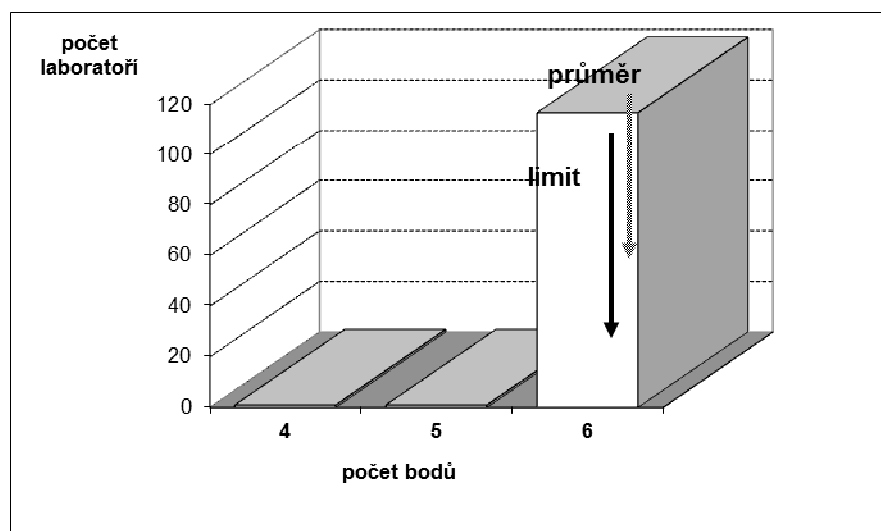
2. Příprava vzorku

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-01 a SOP-NRL/CNCTC-09). Lahvičky jsou skladovány v chladničce při teplotě 4 – 8°C.

3. Hodnocení

Celkem byly vzorky rozeslány 120 laboratořím, 119 laboratoří odeslalo výsledek do závěrečného termínu. Za identifikaci signifikantního patogena ve 3 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 6 bodů, jeden vzorek byl edukativní; 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 117, tj. 98,3% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 5,891 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $5,975 - (2 \times 0,042) = 5,891$). Tohoto limitu dosáhlo 117 laboratoří, 2 laboratoře tento limit nesplnily.

4. Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Sputum pacienta s cystickou fibrózou s podezřením na pneumonii.

ODPOVĚĎ: ***Burkholderia cepacia* komplex**

Vzorek dále obsahoval: *Streptococcus oralis*

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Burkholderia cepacia</i> komplex	30	2	25,2%
<i>Burkholderia cepacia</i>	19	2	16,0%
<i>Burkholderia</i> sp./spp.	66	2	55,5%
<i>Burkholderia</i> sp. (<i>Burkholderia vietnamiensis</i>)	2	2	1,7%
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	1	2	0,8%
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	1	2	0,8%
Celkem	119		100%

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

B. cepacia komplex (BCC) je skupina úzce příbuzných druhů, které jsou v přírodě všudypřítomné, nachází se zejména v půdě a ve vodě. Klinický význam BCC souvisí především s chronickou plicní infekcí u pacientů s cystickou fibrózou, mohou však také způsobit infekce u imunokompromitovaných jedinců včetně pacientů s chronickým granulomatózním onemocněním. [1]

Ve vzorku 1 byl - dle výsledků sekvenční analýzy - druh *B. vietnamiensis*, který patří do komplexu *B. cepacia*. Všechny laboratoře zařadily kmen do rodu, jak bylo i v zadání, a získaly tak po 2 bodech. *B. cenocepacia* je druh náležející též do komplexu *B. cepacia*, nicméně pokud si nejsme jisti druhem, je vždy lepší agens označit pouze *B. cepacia* komplex.

Literatura

- [1] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial susceptibility testing of *Burkholderia cepacia* complex (BCC). Valid from 2013-07-19, [on-line]. Dostupný z WWW: http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/guidance_documents/, český překlad dostupný z WWW: <http://www.szu.cz/dalsi-dokumenty-s-pokyny-pri-testovani-citlivosti-eucast>

VZOREK 2: Izolát z hemokultury od pacienta s hemoblastózou.

ODPOVĚĎ: ***Enterococcus casseliflavus***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	118	2	99,2%
žádný výsledek	1	0	0,8%
Celkem	119		100%

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

Všechny laboratoře vyjma jedné odpověděly správně a získaly po dvou bodech. Laboratoř, která do výsledku identifikace neuvedla žádný výsledek, zůstala bez bodů.

VZOREK 3: Edukativní vzorek (vzorek se nehodnotí)

Salmonella sp., určete antigenní strukturu, event. též název sérovaru

ODPOVĚĎ: ***Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Manhattan
6,8 : d : 1,5**

identifikace	frekvence	celkem	procento	celkem%
<i>Salmonella</i> Manhattan 6,8 : d : 1,5	55	65	46,0%	55,0%
<i>Salmonella</i> 6,8 : - : 1,5	7		6,0%	
<i>Salmonella</i> 6,8 : d : -	3		2,5%	
<i>Salmonella</i> 6,7,8 : - : 1,5	2	14	1,5%	12,0%
<i>Salmonella</i> Muenchen 6,8 : d : 1,2	5			
<i>Salmonella</i> Utah 6,8 : c : 1,5	1			
<i>Salmonella</i> Virginia (8 : d : 1,2)*	1			
<i>Salmonella</i> 8 : d : 7	1			
<i>Salmonella</i> 8 : eh : 1,5 (Ferruch)*	1			
<i>Salmonella</i> 6,8 : - : 1,2	1			
<i>Salmonella</i> 6,8 : w	1			
<i>Salmonella</i> 6,8 : i	1			
<i>Salmonella</i> Virchow 6,7 : r : 1,2	1			
<i>Salmonella</i> sk. B	1	33	22,0%	28,0%
<i>Salmonella</i> sk. O8 (C2-C3)	26		6,0%	
<i>Salmonella</i> sk. O6,7,8 (C)	7		4,0%	
žádný výsledek	5		100,0%	
Celkem	119			

* poznámka NRL

Jako edukativní vzorek byl rozeslán kmen *Salmonella* Manhattan 6,8 : d : 1,5 se zadáním stanovit antigenní strukturu, případně také název sérovaru podle zařazení ve White-Kauffmann-Le Minor schématu antigenních formulí. Tento sérovar nebývá notifikován často, ale výhodou je jeho antigenní struktura, kterou je možné typovat běžnými antiséry, která si laboratoře pořizují pro identifikaci *S. Typhi* či nejfrekventovanějších sérovarů netyfoidních salmonel.

Požadavky zadání splnilo 55 (46%) zúčastněných laboratoří. Uvedly název sérovaru, jehož nedílnou součástí byla ve většině případů antigenní struktura, přičemž byly tolerovány i nevhodné formy zápisu: (6,8:d:5), (6,8;d;1,5), (8:d:5) atd. Pětkrát byl uveden jen název *S. Manhattan* bez antigenní struktury.

Naší snahou bylo vybrat kmen s vyváženými oběma H antigenními komplexy, přesto byl antigen Hd exprimován slaběji a první bičíková fáze se obtížněji dařila identifikovat laboratořím, které rutinně neprovádějí anti-H fázovou inverzi (Sven-Gardova metoda). Následně tedy 7 laboratoří uzavřelo s výsledkem *S. 6,8 : - : 1,5* a dvě laboratoře *S. 6,7,8 : - : 1,5*. Proti očekávání 3 laboratoře typizovaly s výsledkem *S. 6,8 : d : -*. V identifikaci bičíkových antigenů jsme pozorovali poměrně značnou diverzitu. 14 laboratoří dospělo plně či částečně k nesprávnému antigennímu vzorci (*S. Muenchen*, *Utah*, *Virginia*, *Virchow* a další monofázické varianty - viz tabulka). Kdybychom jako kritérium úspěšnosti zvolili dourčení alespoň dvou antigenních komplexů, penzum by splnilo 60% účastníků (71 pracovišť).

V dalších 26 případech se klinické laboratoře spokojily se zařazením do skupiny O8 (C2-C3) nebo více obecně do skupiny O6,7,8 (C) - 7 laboratoří. Jeden krát byla chybně stanovena skupina B.

Upozorňujeme na význam přesného rozlišení skupiny O 6,8 (C2) a O 8,20 (C3), od nichž se odvíjí název sérovaru: *Manhattan 6,8 : d : 1,5* nebo *Yovokome 8,20 : d : 1,5*. Z našich zkušeností se k detailní typizaci somatického antigenu jeví jako optimální - kromě O8 a O20 – užití monofázického séra 6,14,24 BioRad (pozitivní aglutinace jen v případě *Manhattan*). Je zajímavé, že zatímco v roce 2014, kdy byla předmětem EHK *S. Newport 6,8 : e,h : 1,2*, určilo O antigen 6,8 více než 99% účastníků, v této sérii přesáhl podíl chybných či nedourčených O antigenů 8%.

VZOREK 4: Izolát z moči od pacienta s nozokomiální infekcí močových cest.

ODPOVĚď: ***Acinetobacter baumannii* komplex**

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Acinetobacter baumannii</i>	102	2	85,7%
<i>Acinetobacter baumannii</i> komplex	8	2	6,7%
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	4	2	3,4%
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> komplex	4	2	3,4%
<i>Acinetobacter</i> spp.	1	1	0,8%
Celkem	119		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 amikacinu a k meropenemu. Kmen 4 *Acinetobacter baumannii* komplex je izolát z moči, citlivý k oběma vyšetřovaným antibiotikům. 118 zúčastněných laboratoří uvedlo druhové jméno kmene 4 a bylo ohodnoceno dvěma body, jedna získala jen jeden bod za rodové jméno. S výjimkou jedné označily ostatní laboratoře kmen správně jako citlivý k amikacinu, čtyři laboratoře kmen chybně označily jako rezistentní 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) amikacinu a meropenemu pro citlivé izoláty *A. baumannii* komplex, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika, a výsledky laboratoří.

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 4 *Acinetobacter baumannii* komplex

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	%
amikacin	EUCAST [1]	30 μg	≥ 19	19 - 19	≤ 8	8 - 8	C	118/119	99,2
	CLSI [2]		≥ 17		≤ 16				
meropenem	EUCAST [1]	10 μg	≥ 21	21 - 21	≤ 2	1 - 1	C	115/119	96,6
	CLSI [2]		≥ 18						

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

VZOREK 5: *Staphylococcus aureus*

Požadavek byl vyšetřit citlivost kmene ze vzorku 5 k oxacilinu a ke klindamycinu. Kmen je rezistentní k oxacilinu a citlivý ke klindamycinu. Všechny laboratoře odpověděly správně na otázku o citlivosti kmene ke klindamycinu, čtyři chybovaly u oxacilinu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti u kmene 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) oxacilinu a klindamycinu pro *S. aureus*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika, a výsledky laboratoří.

Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 5 *Staphylococcus aureus*

Antibiotikum	Zdroj	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**	kate- gorie	počet laborato ří	%
cefoxitin	EUCAST [1]	30	≥ 22	14 - 16	nevyšetřuje se		R	115/119	96,6
	CLSI [2]								
oxacilin	EUCAST [1]	nevyšetřuje se			≤ 2	2 - 4	R	115/119	96,6
	CLSI [2]								
klindamycin	EUCAST [1]	2	≥ 22	25 - 26	≤ 0,25	0,125 - 0,125	C	119/119	100,0
	CLSI [2]		≥ 21		≤ 0,5				

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

Závěr

V současnosti se pro označení skupiny kmenů acinetobakterů s podobnými vlastnostmi používá název *Acinetobacter baumannii* komplex (podobně tomu je u *Burkholderia cepacia* komplex). U tohoto kmene, stejně jako u kmene 5, dosáhly laboratoře velmi dobrých výsledků vyšetření citlivosti (> 96 % správných výsledků). Rezistence k oxacilinu u kmene 5 *Staphylococcus aureus* byla způsobena genem *mecC* (homolog genu *mecA*) a spolehlivější než vyšetření MIC oxacilinu je vyšetření disku s cefoxitemem.

Literatura

- [1] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, valid from 2017-03-10 [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.