



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/5-3/2017 (č.986)
Bakteriologická diagnostika

Praha, prosinec 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/5-3/2017 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-3/2017 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 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 vypracovali:

Mgr. Renáta Šafránková, Ing. Monika Marejková PhD, RNDr. Petr Petráš CSc, RNDr. Pavla Urbášková CSc

Zprávu schválil: Mgr. Renáta Šafránková

Dne: 4. 12. 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/5-3/2017-EHK-986/4. 9. 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. Vibrio vulnificus (EV) 2. Erysipelothrix rhusiopathiae 3. Clostridium difficile 4. Staphylococcus saprophyticus 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-986/1-5/2017
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:	4. 9. 2017 (humánní lab.); 25. 9. 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:	121
Způsob distribuce:	přepravcem se službou přeprava nebezpečného zboží Přílohy: formulář pro zápis výsledků a pokyny účastníkům
Předání výsledků:	písemně do 25. 9. 2017 (hum.lab.) a do 11. 10. 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:	prosinec 2017

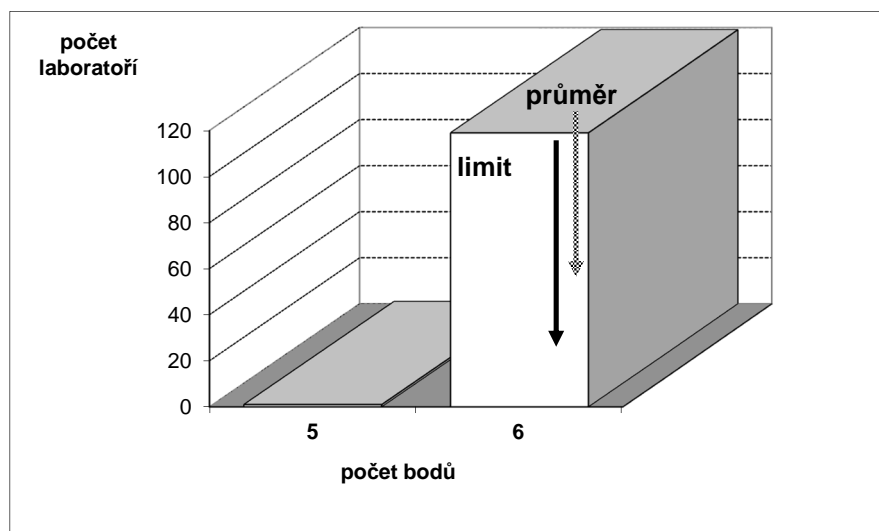
2. Příprava vzorku

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 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 zaslány 121 laboratořím, 120 laboratoří odeslalo výsledek do závěrečného termínu. Za identifikaci signifikantního patogena ve 4 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 6 bodů, jeden vzorek byl edukativní; za vyšetření citlivosti mohly laboratoře obdržet celkem 4 body. 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 119, tj. 99,2% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 5,81 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $5,992 - (2 \times 0,091) = 5,81$). Tohoto limitu dosáhlo 119 laboratoří, 1 laboratoř tento limit nesplnila.

4. Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Edukativní vzorek (vzorek se nehodnotí) Stěr z LDK od 60leté pacientky se sepsí s anamnézou koupání v mořské vodě
ODPOVĚĎ: <i>Vibrio vulnificus</i>
Vzorek dále obsahoval: <i>Staphylococcus epidermidis</i>

identifikace	frekvence	procento
<i>Vibrio vulnificus</i>	108	90,0%
<i>Vibrio vulnificus/Flavobacterium</i> sp.	1	0,8%
<i>Vibrio mimicus</i>	1	0,8%
<i>Vibrio</i> sp.	2	1,7%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	1,7%
patogen nevykultivován	2	1,7%
předpokládané <i>Vibrio</i> neprokázáno ve vzorku	1	0,8%
žádný výsledek	3	2,5%
Celkem	120	100%

Bezchybná druhová identifikace neobvyklého původce závažných infekcí nečinila obtíže 90 % zúčastněných laboratoří. Osm laboratoří (6,7 %) *Vibrio vulnificus* ze vzorku nevykultivovalo - patrně tento druh vibria hůře snáší lyofilizaci a v kombinaci s přítomností doprovodné flóry mohl být potlačen.

V. vulnificus, podobně jako *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus* a *Pseudomonas* sp., nemají typicky schopnost okyselovat sacharózu, proto na selektivní půdě TCZS (thiosíran-citrát-žluč-sacharóza) rostou v zelených koloniích.

V. vulnificus lze identifikovat do druhu metodou MALDI TOF MS. Taktéž komerční sestavy biochemických testů umožňují rozlišit *V. vulnificus* od dalších druhů vibrií či jiných fenotypově podobných oxidáza-pozitivních tyček jako jsou *Aeromonas* sp. nebo *Plesiomonas* sp. Při biochemické identifikaci *V. vulnificus* je pro pozitivitu testu lysin dekarboxyláza vyžadována přítomnost 1% NaCl.

V. vulnificus je halofilní bakterie běžně se vyskytující v teplých, mělkých, pobřežních vodách. Nejčastěji vyvolává ranné infekce po kontaktu s vodním prostředím a dále primární sepse spojené s konzumací syrových ústřic. Predispozici pro septický průběh mají zejména osoby s onemocněním jater a imunokompromitovaní pacienti. Smrtnost se uvádí až do 50 %.

V literatuře jsou popsány případy ranných infekcí *V. vulnificus* po koupání v mořské vodě, včetně letálních na následky sepse [1,2].

Literatura

- [1] Ruppert J, Panzig B, Guertler L et al. Two cases of sever sepsis due to *V. vulnificus* wound infection acquired in the Baltic sea. Eur J Clin Microbiol Infect 2004; 23:912-915.
- [2] Ešnerová A, Klazarová H, Večeř J et al. *Vibrio vulnificus* jako původce letální sepse. Remedia-klinická mikrobiologie 1999; 3(10):335-337.

VZOREK 2: Izolát z excidované tkáně od veterináře s rannou infekcí ruky.

ODPOVĚĎ: ***Erysipelothrix rhusiopathiae***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	120	2	100%
Celkem	120		100%

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

Všechny zúčastněné laboratoře odpověděly správně a získaly po dvou bodech.

VZOREK 3: Stolice od dlouhodobě hospitalizovaného pacienta s akutně vzniklým průjmem, horečkou a leukocytózou.

ODPOVĚĎ: ***Clostridium difficile***

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Clostridium difficile</i>	119	2	99,2%
<i>Clostridium subterminale</i>	1	1	0,8%
Celkem	120		100%

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

Kmen *Clostridium difficile* správně identifikovalo 119 (tj. 99,2%) laboratoří, jedna laboratoř uvedla do výsledku jiný druh klostridia a získala pouze jeden bod.

C. difficile je přítomno ve střevě přibližně u 5% dospělé populace, u kojenců a i větších dětí je jeho výskyt vyšší. Produkuje 2 termolabilní proteinové toxiny – toxin A je typickým enterotoxinem, který má za následek vznik vodnatých, někdy až mírně hemoragických průjmů, toxin B je nekrotizující cytotoxin.

C. difficile produkující toxiny je nejčastějším původcem nozokomiálních střevních infekcí (průjem, kolitida) a primární patogen pseudomembranósní kolitidy. Mezi hlavní rizikové faktory infekce stále patří předchozí nebo současná antibiotická medikace, která navozuje střevní dysmikrobii.

Kromě vyšetření přítomnosti toxinů ve stolici, by měla být rovněž prováděna kultivace, a to z diagnostických (současné testy pro detekci toxinů poskytují i falešně negativní výsledky), ale i epidemiologických důvodů (ribotypizace, genotypizace).

Pozn.: v roce 2016 byl ustanoven nový rod *Clostridioides* a stávající druh *C. difficile* reklasifikován na *Clostridioides difficile* [1]. V jednom z příštích čísel Zpráv CEM bude tomuto tématu věnován samostatný článek.

Literatura

[1] Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL and Finegold SM: Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe* 2016; 40, 95-99.

VZOREK 4: Izolát z moče od pacientky s akutní infekcí močových cest.
ODPOVĚď: <i>Staphylococcus saprophyticus</i>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	110	2	91,7%
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	10	2	8,3%
Celkem	120		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 oxacilinu, kotrimoxazolu a k nitrofurantoinu. Kmen 4 *Staphylococcus saprophyticus* je izolát z moče, rezistentní k oxacilinu a citlivý ke kotrimoxazolu a k nitrofurantoinu.

Tento druh stafylokoka byl popsán jako třetí nejstarší (po *S. aureus* a *S. epidermidis*) již v roce 1940, efektivní publikace je práce Constance Shaw a spoluautorů z roku 1951. Byl prvním, který narušil do té doby panující názor, že koaguláza-negativní stafylokoky nejsou patogenní. Může být původcem onemocnění močových cest, ale byly též publikovány ranné infekce a septikémie. Když byl v roce 1996 popsán prof. Hájkem z Olomouce druhý poddruh – *S. saprophyticus* subsp. *bovis* (vyskytuje se v bovinních nozdrách), byl typový kmen druhu *S. saprophyticus* automaticky reklasifikován jako poddruh *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*.

Kmeny druhu *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* patří spolu s kmeny *S. hominis* subsp. *novobiocin* k nejčastěji izolovaným novobiocin-rezistentním stafylokokům z humánního klinického materiálu a jsou poměrně snadno identifikovatelné. Jsou

oxidáza a xylóza negativní a sacharóza a trehalóza pozitivní. Od druhého bovinního druhu se dají odlišit negativním PYR-testem, neprodukují nitrátreduktázu a neokyselují ribózu. Mají i větší kolonie (i více než 5 mm).

Všech 120 laboratoří mělo správné výsledky identifikace a vyšetření antibiotické citlivosti. 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 *Staphylococcus saprophyticus*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika, a výsledky laboratoří.

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 4 *Staphylococcus saprophyticus*

Antibiotikum	Zdroj	Obsah disku	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	%
cefoxitin	EUCAST [1]	30 µg	≥ 22	17 - 18	nevyšetřuje se		R	120/120	100,0
	CLSI [2]								
oxacilin	EUCAST [1]	nevyšetřuje se			≤ 2	> 8 - > 8	R	120/120	100,0
	CLSI [2]								
kotrimoxazol	EUCAST [1]	25 µg	≥ 17	32 - 32	≤ 2***	≤ 0,125 - ≤ 0,125***	C	120/120	100,0
	CLSI [2]		≥ 16						
nitrofurantoin	EUCAST [1]	100 µg	≥ 13	21 - 22	nevyšetřeno		C	120/120	100,0

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

VZOREK 5: *Escherichia coli*

Kmen 5 je citlivý k ampicilinu a ke kotrimoxazolu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti u kmene 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a MIC ampicilinu a kotrimoxazolu pro Enterobacteriaceae, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a počty laboratoří, které měly správné výsledky.

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

Antibiotikum	Zdroj	Obsah disku	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	%
ampicilin	EUCAST [1]	10 µg	≥ 14	19 - 19	≤ 8	2 - 2	C	119/120	99,2
	CLSI [2]		≥ 17						
kotrimoxazol	EUCAST [1]	25 µg	≥ 14	12 - 15	≤ 2***	2 - 2***	C	27/120	26,7

	CLSI [2]		≥ 16						
--	----------	--	------	--	--	--	--	--	--

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

Závěr

Problém byl s interpretací výsledků kotrimoxazolu u kmene 5, který byl citlivý podle breakpointu MIC a intermediární podle breakpointu pro inhibiční zónu. Příčinou byla rezistence kmene k trimetoprimu (MIC > 16 mg/l) při zachované citlivosti k sulfametoxazolu. Výsledky laboratoří kotrimoxazolu u kmene 5 se body nehodnotí.

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. 27th ed. CLSI supplement M100-S. Wayne, Pa. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

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