



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 – Vínohrady



Zkoušení způsobilosti v lékařské mikrobiologii
(Externí hodnocení kvality)

PT#M/5-4/2017 (č.999)
Bakteriologická diagnostika

Praha, leden 2018

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/5-4/2017 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-4/2017 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 vypracovaly:

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

Zprávu schválil: Mgr. Renáta Šafránková

Dne: 17. 1. 2018

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/5-4/2017-EHK-999/30. 10. 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. Morganella morganii 2. Klebsiella pneumoniae + Escherichia coli 3. Yersinia enterocolitica 4. Pseudomonas aeruginosa 5. Klebsiella pneumoniae
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:	121 laboratoří
Označení vzorkovnic:	EHK-999/1-5/2017
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:	30. 10. 2017 (humánní lab.); 13. 11. 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 21. 11. 2017 (hum.lab.) a do 28. 11. 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:	leden 2018

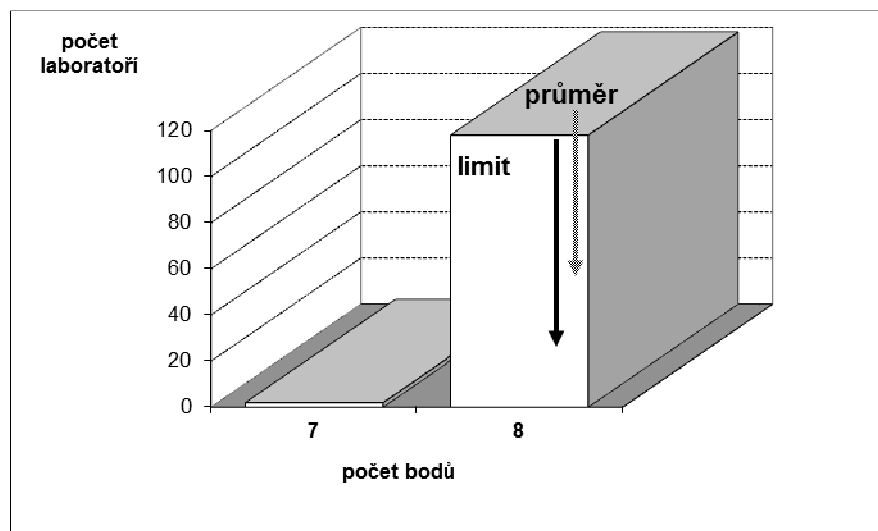
2. Příprava vzorku

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 laboratorím, 120 laboratorů odeslalo výsledek do závěrečného termínu. Za identifikaci signifikantního patogena ve 4 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 8 bodů; za vyšetření citlivosti mohly laboratoře obdržet celkem 2 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 118, tj. 98,3% laboratorů. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,725 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $7,983 - (2 \times 0,129) = 7,725$). Tohoto limitu dosáhlo 118 laboratorů, 2 laboratoře tento limit nesplnily.

4. Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Izolát z moče (signifikantní bakteriurie).

ODPOVĚĎ: ***Morganella morganii***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Morganella morganii</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 2: Hemokultura od pacientky s pyelonefritidou.

ODPOVĚĎ: ***Klebsiella pneumoniae + Escherichia coli***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Klebsiella pneumoniae + Escherichia coli</i>	119	2	99,2%
<i>Escherichia coli</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.

Vzorek obsahující obě agens správně vyšetřilo 119 laboratoří, 1 laboratoř uvedla jako vyvolávající agens pouze *E. coli* a získala 1 bod.

VZOREK 3: Stoolice od dospělého muže s podezřením na apendicitidu.

ODPOVĚĎ: ***Yersinia enterocolitica***

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Yersinia enterocolitica</i>	49	2	40,8%
<i>Yersinia enterocolitica</i> O9	65	2	54,2%
<i>Yersinia enterocolitica</i> non O3	5	2	4,2%
<i>Yersinia rohdei</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.

Y. enterocolitica je gramnegativní tyčka rostoucí při teplotách od 4 do 43 °C. Virulenční faktory zahrnují termostabilní toxin (Yst), adhezin invA, dále yersiniabactin a na plasmidu kódované faktory virulence.

Y. enterocolitica byla nalezena v gastrointestinálním traktu prasat, hlodavců a psů [1]. K přenosu nákazy dochází primárně fekálně-orální cestou; vehikulem může být kontaminované vepřové maso [2].

Biochemicky se *Y. enterocolitica* rozlišuje do 6 biotypů. Biotyp 1A (indol, eskulin a salicin pozitivní) je považován za nepatogenní, biotyp 1B (indol pozitivní, eskulin a salicin negativní) za nejvirulentnější. Biotypy 2 až 5 jsou indol negativní. K bio/sérotypům nejčastěji spojovaným s humánním onemocněním patří 1B/O8; 2/O5, O27, O9; 3/O3 a 4/O3, přičemž poslední je dominující v Evropě a USA [1, 3].

V roce 2016 bylo v ČR hlášeno přes 600 případů yersinióz, nejvíce ve věkové skupině 0–4 a 5–14 let [4].

Klinické formy yersinióz zahrnují gastroenteritidu, mezenteriální lymfadenitidu, erythema nodosum, septikemie, infekční artritidy.

Izolace kmene *Y. enterocolitica* byla popsána v EHK-761. Při vyšetření kontaktů a u kontrolních odběrů je nutné pomnožení vzorku stolice ve fyziologickém roztoku s fosfátovým pufrům po dobu 4–5 týdnů při 4 °C [3].

Izolát *Y. enterocolitica* lze identifikovat do druhu, vedle bioch. testů, i metodou MALDI-TOF MS nebo použitím molekulárních technik.

Pozn.: Při sérotypizaci je možné se případné spontánní aglutinace zbavit pasáží přes obyčejný agar.

Zaslaný kmen *Y. enterocolitica* O9 biotyp 4 bezchybně identifikovalo do druhu 119 ze 120 zúčastněných laboratoří. Laboratoři, která nesprávně zařadila kmen do druhu *Y. rohdei*, bude odebrán jeden bod.

Literatura

[1] Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G, Pfaller MA, Landry ML, Richter SS, Warnock DW. Manual of clinical microbiology 11th Edition. ASM press, Washington, DC 2015. doi:10.1128/9781555817381.

[2] Moravcová R. Epidemie gastroenteritidy, vyvolaná kmenem *Yersinia enterocolitica* v Dětské psychiatrické léčebně Opařany. Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2012; 21(10): 342–345.

[3] AHEM, příloha č. 6/1981. Standardní metody laboratorní diagnostiky nálezů vyvolaných druhem *Yersinia enterocolitica*.

[4] <https://ecdc.europa.eu/en/yersiniosis/surveillance-and-disease-data/atlas>

VZOREK 4: Izolát z krve od pacientky se zhoubným onemocněním konečnicku.

ODPOVĚĎ: ***Pseudomonas aeruginosa***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Pseudomonas aeruginosa</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.

Požadavek byl určit signifikantního patogena a vyšetřit jeho citlivost k piperacilinu/tazobaktamu a k meropenemu. Všechny 120 laboratoří správně identifikovaly kmen 4 jako *Pseudomonas aeruginosa*. V NRL pro antibiotika při standardním vyšetření bylo k oběma antibiotikům citlivých všech 5 testovaných lyofilizátů *Pseudomonas aeruginosa*.

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 *Pseudomonas aeruginosa*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika, a počet laboratoří které uvedly výsledek v kategorii "citlivý".

Dvě laboratoře hlásily přítomnost rezistentních variant u obou vyšetřovaných antibiotik, jedna laboratoř neuvedla kategorii citlivosti, přidala však komentář, dvě laboratoře zhodnotily kmen jako rezistentní k oběma antibiotikům; k samotnému meropenemu uvedla jedna laboratoř kmen jako intermediární a pět jako rezistentní. Výsledek kmene 4 se pro nejednoznačnost nehodnotí (viz Závěr).

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 4 *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiotikum	Zdroj	Obsah disku μg	Průměry IZ (mm)		MIC (mg/l)		Kategorie "citlivý"	
			breakpoint pro citlivé kmene	rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint pro citlivé kmene	rozmezí hodnot naměřených v NRL**	počet laboratoří	%
piperacilin/ tazobaktam	EUCAST [1]	30/6	≥ 16	26 - 26	≤ 16	4 - 4	115/120	95,8
	CLSI [2]	100/10	≥ 21	31 - 32				
meropenem	EUCAST [1]	10	≥ 24	33 - 35	≤ 2	0,25 - 0,25	109/120	90,8
	CLSI [2]		≥ 19					

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

VZOREK 5: *Klebsiella pneumoniae*

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

Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 5 *Klebsiella pneumoniae*.

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/sulbaktam	EUCAST [1]	10/10	≥ 14	18 - 18	≤ 8	1 - 1	C	120/120	100,0
	CLSI [2]		≥ 15						
kotrimoxazol	EUCAST [1]	25 µg	≥ 14	24 - 25	≤ 2***	0,125 - 0,125***	C	120/120	100,0
	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.

Závěr

Po upozornění některých laboratoří účastnících se EHK na (hetero)rezistenci u kmene 4 bylo v NRL přetestováno dalších pět lyofilizátů kmene 4/EHK 999. V jednom případě byly zachyceny dvě kolonie v inhibiční zóně meropenemu. Vyšetřením jejich citlivosti byly zjištěny redukované zóny inhibice kolem meropenemu (24 mm, resp. 18 mm) ve srovnání s inhibičními zónami původní kultury (rozmezí 33 - 35 mm, viz tab. 1). Průměry inhibičních zón kolem piperacilinu/tazobaktamu vytvářené kulturou z kolonií rostoucích v inhibiční zóně zůstaly stejné jako u původní kultury.

Jako heterorezistence se označuje přítomnost subpopulací buněk bakterií s rozdílnými úrovněmi citlivosti vůči antibiotikům ve stejné kultuře. Je popsána u mnoha gramnegativních i grampozitivních bakterií a týká se především tzv. baktericidních antibiotik. Stabilita stupně rezistence jednotlivých subpopulací se liší, typicky se po několika pasážích v půdě bez antibiotik některé vysoce rezistentní subpopulace vrací k heterorezistenci, některé si však zachovávají vysokou úroveň rezistence. Na vzniku heterorezistentních populací se uplatňují genetické i negenetické faktory. V současné době neexistuje standardní metoda k prokázání heterorezistence populace. Používaná populační analýza je velmi pracná a její výsledky ovlivňují technické podmínky. Doposud chybějící standardní definice heterorezistence může vést k chybné identifikaci homogenních kmenů jako heterorezistentní (význam má i pečlivé dodržování standardních podmínek vyšetření citlivosti, zejména koncentrace inokula)

a znemožňuje tak řádné posouzení klinického významu tohoto fenoménu. Předpokládá se, že heterorezistence se může uplatnit u opakujících se nebo chronických infekcí a u život ohrožujících infekcí, u nichž podávaná antibiotika mohou vyselektovat rezistentní populace [3].

Literatura

- [1] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, valid from 2018-01-01 [on-line]. Dostupný z WWW: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
- [2] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed. CLSI supplement M100-S. Wayne, Pa. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.
- [3] El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. Clin Microbiol Rev 2015; 28:191–207. doi:10.1128/CMR.00058-14.

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