



Státní zdravotní ústav
Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti
Poskytovatel programů 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/5-1/2019 (č. 1059) **Bakteriologická diagnostika**

Praha, duben 2019

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/5-1/2019 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-1/2019 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.

Příloha závěrečné zprávy, tj. ohodnocený výsledkový protokol, je rozesílána poštou

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: 29. 4. 2019

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/5-1/2019-EHK-1059/18. 2. 2019
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. Moraxella catarrhalis 2. Enterococcus gallinarum 3. Vibrio parahaemolyticus 4. Salmonella sp. (Typhimurium) 5. Acinetobacter baumannii
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:	120 laboratoří
Označení vzorkovnic:	EHK-1059/1-5/2019
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:	18. 2. 2019 (humánní lab.); 12. 3. 2019 (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:	elektronicky do 11. 3. 2019 (hum.lab.); písemně do 26. 3. 2019 (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 zveřejnění závěrečné zprávy:	Do 12 týdnů po předání výsledků k hodnocení

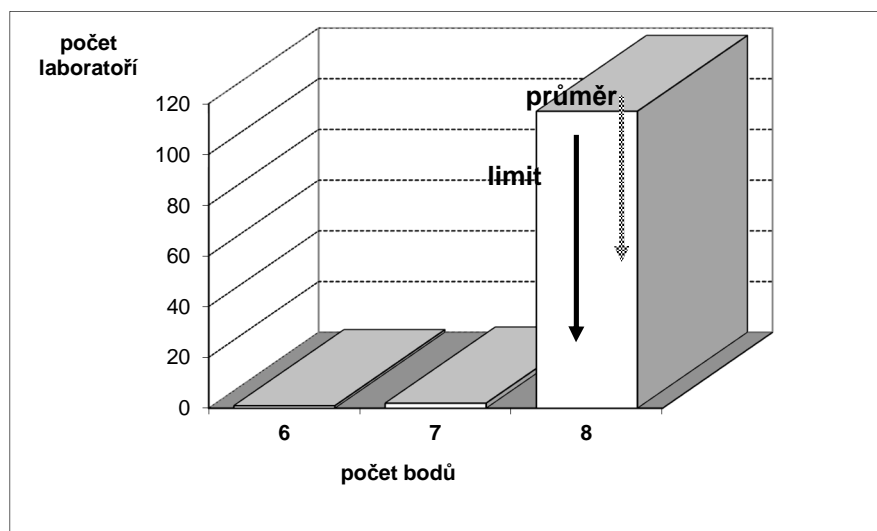
2. Příprava vzorku

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 rozeslány 120 laboratořím, všechny laboratoře odeslaly výsledek do závěrečného termínu. Za identifikaci signifikantního patogena ve 4 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 8 bodů. Bodování pro identifikaci bylo provedeno ve stupnici 2, 1 a 0 bodů. Hodnocení (resp. bodování) vyšetření citlivosti, které bylo v předchozích sériích pouze orientační, se z technických důvodů od tohoto kola neprovádí (přechod na elektronické výsledky), k dispozici budou pouze komentované výsledky (vzorek 4 a 5).

Graf 1: **Počet bodů za správnou identifikaci.**



Maximálního počtu bodů při identifikaci dosáhlo 117, tj. 97, 5% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,523 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $7,967 - (2 \times 0,222) = 7,523$). Tohoto limitu dosáhlo 117 laboratoří, 3 laboratoře tento limit nesplnily.

4. Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Hnis od 4-letého dítěte po paracentéze.
ODPOVĚĎ: <i>Moraxella catarrhalis</i> Vzorek dále obsahoval: <i>Streptococcus oralis</i>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Moraxella catarrhalis</i>	119	2	99,2%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	0	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.

Izolace a identifikace signifikantního patogena nečinila laboratořím obtíže. Všechny laboratoře vyjma jedné odpověděly správně a získaly po dvou bodech.

VZOREK 2: Izolát z krve od pacienta se sepsí.
ODPOVĚĎ: <i>Enterococcus gallinarum</i>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Enterococcus gallinarum</i>	119	2	99,2%
<i>Enterococcus</i> sp.	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.

Většina laboratoří (99,2%) uvedla správné rodové i druhové jméno patogena a získala plný počet bodů. Jedna laboratoř identifikovala kmen pouze jako *Enterococcus* sp. a získala jeden bod. *E. gallinarum* stejně tak jako *E. casseliflavus* jsou pohyblivé a oba se tedy dají poměrně spolehlivě odlišit od ostatních druhů enterokoků. *E. casseliflavus* produkuje navíc žlutý pigment, který je zvláště zřejmý po prodloužené (48 h) kultivaci.

VZOREK 3: Stolicе od 40letého pacienta s gastroenteritidou vzniklou po konzumaci ústřic.

ODPOVĚĎ: ***Vibrio parahaemolyticus***

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Vibrio parahaemolyticus</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.

Vibrio parahaemolyticus je původcem alimentární intoxikace doprovázené vodnatými průjmy a spojené s konzumací syrových mořských plodů. K léčbě pacienta je obvykle nutná jen rehydratace.

Na selektivní půdě thiosíran-citrát-žluč-sacharóza (TCŽS) roste v zelených koloniích v důsledku neokyselování sacharózy, dále se od *V. cholerae* liší typicky negativním testem ONPG [1]. *V. parahaemolyticus* lze dobře identifikovat i metodou MALDI TOF MS [1].

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.

VZOREK 4: Izolát z krve od pacientky s akutní osteomyelitidou.

ODPOVĚĎ: ***Salmonella* spp./Typhimurium**

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Salmonella</i> spp.	82	2	68,3%
<i>Salmonella</i> Typhimurium	37	2	30,8%
<i>Salmonella</i> Enteritidis	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.

Požadavek byl určit signifikantního patogena a vyšetřit jeho citlivost k cefotaximu a k meropenemu. Kmen 4 produkoval karbapenemázu OXA-48, byl rezistentní k cefotaximu a citlivý 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) pro citlivé a rezistentní izoláty salmonel, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 4 *Salmonella Typhimurium* podle metody a breakpointů EUCAST [1].

Antibiotikum	Obsah disku μg	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky			
		breakpoint		rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie/ abs.počet laboratoří			správné
		C	R		C	R		C	I	R	%
cefotaxim	5 μg	≥ 20	< 17	14 - 14	≤ 1	> 2	4 - > 4	1	6	113	94,2
meropenem	10 μg	≥ 22	< 16	19 - 20	≤ 2	> 8	0,25 - 0,5	55	59	6	95,0

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; * 5 měření diskovou difúzní metodou EUCAST, ** 5 měření diluční mikrometodou EUCAST; C: citlivost; I: citlivost při zvýšeném dávkování; R: rezistence; výsledky laboratoří ve správné kategorii citlivosti jsou zvýrazněny šedě.

Tabulka 2. Screeningové předěly pro Enterobacterales produkující karbapenemázy [2].

Antibiotikum	Obsah disku	Průměr inhibiční zóny	
		screeningový předěl	hodnoty naměřené v NRL/ATB *
meropenem	10 μg	< 28 mm	19 - 20 mm
ertapenem	10 μg	< 25 mm	14 - 16 mm
temocilin	30 μg	< 11 mm	6 - 6 mm

* 5 měření diskovou difúzní metodou EUCAST

VZOREK 5: *Acinetobacter baumannii*

Kmen 5 je citlivý k amikacinu i k meropenemu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti u kmene 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a MIC pro citlivé a rezistentní izoláty acinetobakterů, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří

Tabulka 3. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 5 *Acinetobacter baumannii* podle metody a breakpointů EUCAST [1].

Antibiotikum	Obsah disku μg	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky			
		breakpoint		rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie/ abs.počet laboratoří			správné %
		C	R		C	R		C	I	R	
amikacin	30 μg	≥ 19	< 17	19 - 19	≤ 8	> 16	4 - 4	113	5	2	94,2
meropenem	10 μg	≥ 21	< 15	20 - 20	2	> 8	1 - 1	102	15	3	97,5

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; * 5 měření diskovou difuzní metodou EUCAST, ** 5 měření diluční mikrometodou EUCAST; C: citlivost; I: citlivost při zvýšeném dávkování; R: rezistence; výsledky laboratoří ve správné kategorii citlivosti jsou zvýrazněny šedě.

Závěr

Pro interpretaci výsledků vyšetření citlivosti se používají od roku 2019 redefinované breakpointy podle evropských standardů EUCAST [3], které akceptuje i NRL/ATB. V této sérii EHK je nový breakpoint pro kategorii - citlivý při zvýšeném dávkování - použit u kmene 4. Hodnoty MIC meropenemu u tohoto kmene sice byly v citlivé kategorii, ale u producenta karbapenemázy (OXA-48) a uvedené diagnózy (osteomyelitis) je vhodné použití zvýšených dávek meropenemu. U kmene 5 byl průměr inhibiční zóny meropenemu (20 mm) o 1 mm menší než breakpoint pro citlivost (21 mm), MIC meropenemu (1 mg/l) však byla v citlivé kategorii.

Literatura

- [1] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019-01-01. Dostupný z WWW: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/, český překlad <http://www.szu.cz/eucast-dokumenty?highlightWords=dokumenty+EUCAST>
- [2] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Expert rules and intrinsic resistance. Version 3.1, 2016. Dostupný z WWW: http://www.eucast.org/expert_rules_and_intrinsic_resistance/, český: <http://www.szu.cz/expertni-pravidla-eucast-v3-0>.
- [3] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. New definitions of S, I and R. Dostupný z WWW: <http://www.eucast.org/newsiandr/>, český <http://www.szu.cz/nove-definice-c-i-a-r>

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