



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/5-2/2019 (č. 1079) **Bakteriologická diagnostika**

Praha, srpen 2019

Obsah

| | |
|---|------|
| 1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing) | 3 |
| 2. Příprava vzorku | 4 |
| 3. Hodnocení | 4 |
| 4. Výsledky zúčastněných laboratoří | 5-10 |
| 5. Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře | |

Program zkoušení způsobilosti PT#M/5-2/2019 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-2/2019 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: 267 082 124

Zprávu vypracovaly:

Mgr. Renáta Šafránková, Mgr. Ondřej Daniel, RNDr. Petr Petráš CSc, RNDr. Pavla Urbášková CSc, Mgr. Jana Zavadilová

Zprávu schválil: Mgr. Renáta Šafránková

Dne: 16. 8. 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/5-2/2019-EHK-1079/13. 5. 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. Bordetella pertussis 2. Pasteurella multocida + Staphylococcus pseudintermedius 3. Salmonella Typhimurium monofázická 4. Enterococcus faecalis 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 |
| Očekávaný počet: | 120 laboratoří |
| Označení vzorkovnic: | EHK-1079/1-5/2019 |
| 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: | 13. 5. 2019 (humánní lab.); 4. 6. 2019 (veterinární lab. – vzorek 4, 5) |
| Podmínky distribuce a uchování vzorků: | krátkodobé uchování při 4 – 8°C přeprava při pokojové teplotě v trojitěm 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 3. 6. 2019 (hum.lab.); písemně do 18. 6. 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 |

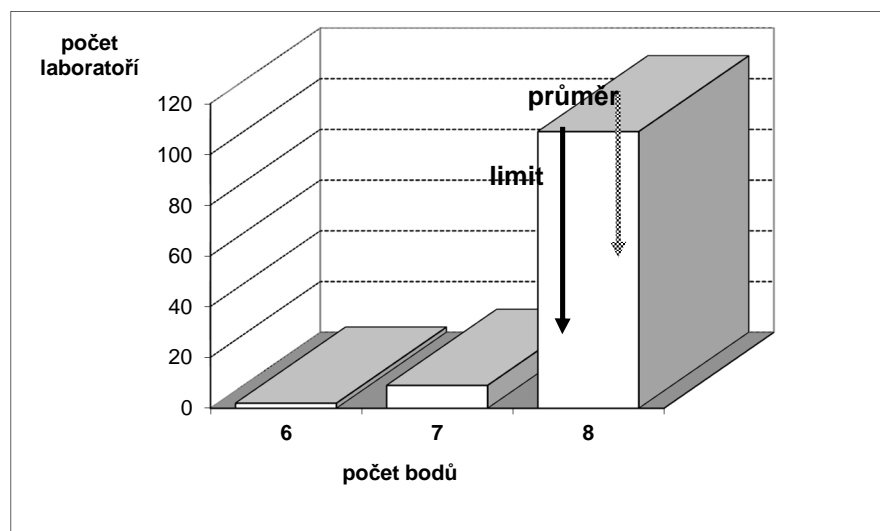
2. Příprava vzorku

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 již 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 109, tj. 90,8% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,168 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $7,892 - (2 \times 0,362) = 7,168$). Tohoto limitu dosáhlo 109 laboratoří, 11 laboratoří tento limit nesplnilo.

4. Výsledky zúčastněných laboratoří

| |
|---|
| VZOREK 1: Nasofaryngeální výtěr od 4 letého dítěte s dlouhotrvajícím kašlem. |
| ODPOVĚď: <i>Bordetella pertussis</i> Vzorek dále obsahoval: <i>Streptococcus oralis</i> |

| identifikace | frekvence | body | procento |
|---|-----------|------|----------|
| <i>Bordetella pertussis</i> | 118 | 2 | 98,3% |
| <i>Bordetella pertussis</i> + <i>Pasteurella multocida</i> | 1 | 1 | 0,8% |
| žádný výsledek (v komentáři <i>S. oralis</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.

Většina laboratoří (118 ze 120, tj. 98,3%) identifikovala kmen správně jako *Bordetella pertussis*. Pouze 1 laboratoř vzorek neurčila – nenašla ve vzorku patogena, hlásila pouze záchyt *Streptococcus oralis*. Jedna laboratoř u vzorku č. 1 uvedla, kromě *Bordetella pertussis* i záchyt *Pasteurella multocida*. Pravděpodobně zde došlo k přehození agens ze vzorku č. 2. Pouze 1 laboratoř doplnila, že by izolát *B. pertussis* poslala k ověření do NRL pro pertusi a difterii. Obracíme se proto na všechny diagnostikující mikrobiology, aby izoláty *Bordetella* spp. posílaly do NRL ke confirmaci.

| |
|---|
| VZOREK 2: Stěr z rány po pokousání psem. |
| ODPOVĚď: <i>Pasteurella multocida</i> + <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> |

| identifikace | frekvence | body | procento |
|--|-----------|------|----------|
| <i>Pasteurella multocida</i> + <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> | 87 | 2 | 72,5% |
| <i>Pasteurella multocida</i> + <i>Staphylococcus intermedius</i> | 27 | 2 | 22,5% |
| <i>Pasteurella multocida</i> | 5 | 1 | 4,2% |
| <i>Staphylococcus intermedius</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.

Pasteurella multocida je gramnegativní pleomorfní „kokotyčinka“, fakultativně anaerobní, kataláza i oxidáza-pozitivní. Patří mezi komenzály nasofaryngu především u koček a psů, u kterých není patogenní. Po zvířecím kousnutí vyvolává lokální infekce ran, které mohou být komplikovány i abscesy.

Staphylococcus pseudintermedius byl popsán teprve v roce 2005 [1] a je fenotypově i hmotnostní spektrometrií neodlišitelný od původního druhu *S. intermedius*, který popsal v roce 1976 prof. V. Hájek z Olomouce jako druhého koaguláza-pozitivního stafylokoka [2]. Obvykle se uvádí oba druhy ve dvojici *S. pseudintermedius/S. intermedius* (SPS/SIN). Kmeny se vyskytují na kůži a sliznicích zdravých zvířat. V případě poranění způsobují ranné infekce. Mohou být izolovány z humánního klinického materiálu – nejčastěji právě ze zhnisaných ran po kousnutí psem.

Oba druhy patří do skupiny koaguláza-pozitivních stafylokoků. Od nejdůležitějšího druhu *S. aureus* jdou fenotypově nejsnáze oddělit negativním testem na průkaz hyaluronidázy. Latexový test na clumping-faktor je obvykle negativní. Výhodným morfologickým znakem je produkce beta-hemolyzinu, která se projevuje částečnou hemolýzou po prvním dnu kultivace v 36 °C. Po přechovávání při 4 °C přejde do 1-2 dnů v hemolýzu úplnou.

Oba druhy lze odlišit pouze pomocí genetických metod, jako jsou repetitivní PCR s primerem (GTG)₅ a PCR-RFLP. Ve spolupráci s brněnskou sbírkou CCM [3] a naší sbírkou CNCTC [4] byla provedena genotypizace téměř stovky kmenů SPS/SIN. Identifikace *S. intermedius* byla potvrzena pouze u 6 kmenů, z těch byl pouze jediný z humánního materiálu.

Literatura

- [1] Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M, et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp.nov., a coagulase-positive species from animals. Int J Syst Evol Microbiol. 2005; 55: 1569-1573.
- [2] Hájek V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. Int J Syst Bacteriol. 1976; 26: 401-408.
- [3] Petráš P, Švec P, Machová I. První záchyt *Staphylococcus pseudintermedius* z humánního klinického materiálu v České republice. Zprávy EM (SZÚ, Praha) 2010; 19(3): 65-67.
- [4] Mališová L, Šafránková R, Kekláková J, Petráš P, Žemličková H, Jakubů V. Correct species identification (reclassification in CNCTC) of strains of *Staphylococcus intermedius* - group can improve an insight into their evolutionary history. Fol. Microbiol. 008; doi.org/10.1007/s12223-018-0647-7.

VZOREK 3: Stolice od 45 letého pacienta s horečkou, průjmem a bolestmi břicha.

ODPOVĚĎ: ***Salmonella enterica* susp. *enterica* serovar Typhimurium monofázická 1,4,[5],12:i:-**

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

| identifikace | frekvence | body | procento |
|---|-----------|------|----------|
| <i>Salmonella</i> Typhimurium | 79 | 2 | 65,8% |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium monofázická | 34 | 2 | 28,3% |
| <i>Salmonella</i> sp. sk. B 4,5 : i : - | 1 | 2 | 0,8% |
| <i>Salmonella</i> 4,5 : i : - | 1 | 2 | 0,8% |
| <i>Salmonella</i> group O:4 (B) tz. 4,5,12 : i | 1 | 2 | 0,8% |
| <i>Salmonella</i> sp. sk. B (4, 12: i : ?) | 1 | 2 | 0,8% |
| <i>Salmonella</i> sp. | 3 | 1 | 2,5% |
| Celkem | 120 | | 100% |

Z 20 laboratoří s nejvyšším dosaženým počtem bodů za minulý rok uvedlo správný výsledek 19 laboratoří. Vzorek je možno hodnotit.

K sérotypizaci byla zvolena monofázická varianta *Salmonella* Typhimurium [antigenní struktura 1,4,[5],12:i:-].

Za období 2011-2017 je evidován významný vzestup této monofázické varianty. V roce 2017 byla třetím nejčastěji hlášeným sérotypem v EU [1]. V ČR na základě analýzy laboratorních dat odhadujeme četnost této monofázické varianty mezi 10 – 20 % ročně, což odpovídá 3. – 4. místu v pořadí nejčetnějších sérotypů.

Pro tuto monofázickou variantu je typické, že postrádá druhou fázi flagelárního antigenu. Tato monofázická varianta vyvolala v posledních letech i několik významných epidemií (např. Francie, Itálie, Španělsko). Z tohoto důvodu je důležité rozlišovat mezi *Salmonella* Typhimurium a její monofázickou variantou a hlásit je odděleně.

Mimo to, kmeny monofázické varianty vykazují multirezistenci, kdy v ČR se nejčastěji vyskytuje rezistence k ampicilinu, sulfametoxazolu a tetracyklinu [2].

Dourčení antigenní struktury monofázické varianty *Salmonella* Typhimurium, lze úspěšně dosáhnout precizní sérotypizací. V případě, kdy se narazí na kmen postrádající druhou fázi flagelárního antigenu, je potřeba opakovaně ověřit (optimálně třikrát) nepřítomnost výše zmíněného flagelárního antigenu a následně striktně uplatňovat zjištěnou antigenní strukturu.

Další možnou variantou je provést pouze jedno testování flagelárního antigenu druhé fáze, a pokud je výsledek negativní, následně využít možnosti dourčení v Národní referenční laboratoři pro salmonely nebo sami provést PCR pro průkaz genu kódujícího

druhou fází flagelárního antigenu a mezigenové oblasti v rámci flagelinového genového klastru.

Z výsledků tohoto kola je patrné, že přesné dourčení monofázické varianty *Salmonella* Typhimurium je stále problematické.

Literatura

[1] FSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA Journal 2018;16(12):5500, 262 pp.

[2] Zemličková a kol. Antibiotická rezistence u netyfových sérovarů *Salmonella* spp. v České republice, Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie 2013; 62 (2):43, 7 pp.

| |
|---|
| VZOREK 4: Izolát z krve od pacienta s endokarditidou. |
| ODPOVĚď: <i>Enterococcus faecalis</i> |

| identifikace | frekvence | body | procento |
|------------------------------|-----------|------|----------|
| <i>Enterococcus faecalis</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.

Požadavek byl určit signifikantního patogena izolovaného z krve od pacienta s endokarditidou, a vyšetřit jeho citlivost ke gentamicinu a k vankomycinu. Všechny laboratoře měly správné výsledky u vankomycinu a 103 laboratoří u gentamicinu; 14 laboratoří chybně uvedlo výsledek v kategorii "R" a tři v kategorii "I".

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 enterokoků hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 4 *Enterococcus faecalis* z krve od pacienta s endokarditidou podle metody a breakpointů EUCAST [1].

| Antibiotikum | Obsah disku μg | Průměry IZ (mm) | | | MIC (mg/l) | | | Výsledky | | |
|---------------|-------------------|-----------------|------|--|------------|-------|---|---------------------------------------|-----|--------------|
| | | | | | | | | kategorie/ abs.počet laboratoří | | správné % |
| | | breakpoint | | rozmezí hodnot naměřených v NRL* | breakpoint | | rozmezí hodnot naměřených v NRL** | C | R | |
| | | C | R | | C | R | | | | |
| gentamicin*** | 30 μg | ≥ 8 | < 8 | 12 - 13 | ≤ 128 | > 128 | ≤ 128 - ≤ 128 | 103 | 14 | 85,8 |
| vankomycin | 5 μg | ≥ 12 | < 12 | 6 - 6 | ≤ 4 | > 4 | > 32 - > 32 | 0 | 120 | 100,0 |

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; * 5 měření diskovou difuzní metodou EUCAST, ** 5 měření diluční mikrometodou EUCAST; C: citlivost; R: rezistence; *** u gentamicinu se C a R se vztahuje k vysokým koncentracím; tři další laboratoře uvedly chybně kategorii "I"; správné výsledky jsou šedě zvýrazněny.

VZOREK 5: *Staphylococcus aureus*

Kmen 5 je rezistentní k erytromycinu a podle výsledku D-testu má indukovanou rezistenci ke klindamycinu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti u kmene 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a MIC pro citlivé a rezistentní izoláty *S. aureus*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 5 *Staphylococcus aureus* podle metody a breakpointů EUCAST [1].

| Antibiotikum | Obsah disku μg | Průměry IZ (mm) | | | MIC (mg/l) | | | Výsledky | | |
|--------------|-------------------|-----------------|------|--|------------|-------|---|---------------------------------------|-----|--------------|
| | | | | | | | | kategorie/ abs.počet laboratoří | | správné % |
| | | breakpoint | | rozmezí hodnot naměřených v NRL* | breakpoint | | rozmezí hodnot naměřených v NRL** | C | R | |
| | | C | R | | C | R | | | | |
| erytromycin | 15 μg | ≥ 21 | < 18 | 6 - 6 | ≤ 1 | > 2 | > 8 - > 8 | 0 | 120 | 100,0 |
| klindamycin | 2 μg | ≥ 22 | < 19 | 26 - 28 | ≤ 0,25 | > 0,5 | 0,25 - 0,25 | 3 | 117 | 97,5 |

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; * 5 měření diskovou difuzní metodou EUCAST, ** 5 měření diluční mikrometodou EUCAST; C: citlivost; R: rezistence; správné výsledky jsou šedě zvýrazněny.

Závěr

Vzorek 4 obsahoval *Enterococcus faecalis* z krve od pacienta s endokarditidou. Předpokládalo se tudíž vyšetření přítomnosti vysoké rezistence ke gentamicinu, která inaktivuje synergickou aktivitu tohoto antibiotika s beta-laktamy nebo s vankomycinem používanou k léčbě enterokokových endokarditid. Příčinou poměrně značného počtu chybných výsledků vyšetření citlivosti u gentamicinu bylo pravděpodobně přehlédnutí uvedené diagnózy, která jednoznačně určuje metodu vyšetření citlivosti ke gentamicinu.

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>

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