



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/5-4/2019 (č. 1100)
Bakteriologická diagnostika

Praha, leden 2020

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/5-4/2019 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-4/2019 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. Petra Klimešová, doc. MUDr. Helena Žemličková, PhD.

Zprávu schválil: Mgr. Renáta Šafránková

Dne: 25. 1. 2020

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/5-4/2019-EHK-1100/29. 10. 2019
Název:	EHK-Bakteriologická diagnostika
Poskytovatel:	SZÚ – Centrum epidemiologie a mikrobiologie – AP CEM Šrobárova 48, Praha 10, 100 42 tel.: + 420 267082258
Vedoucí ESPT	Ing. Věra Vrbíková
Koordinátor:	Mgr. Renáta Šafránková
Subdodavatel:	není
Charakteristika materiálu:	Simulovaný klinický vzorek 1. Klebsiella oxytoca 2. Rhodococcus hoagii (=R.equi) 3. Shigella sonnei 4. Streptococcus pneumoniae Staphylococcus pseudintermedius (vet.lab.) 5. Streptococcus pneumoniae Klebsiella pneumoniae (vet.lab.)
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-1100/1-5/2019
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:	29. 10. 2019 (humánní lab.); 19. 11. 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 19. 11. 2019 (hum.lab.); písemně na předepsaných formulářích do 3. 12. 2019 (vet.lab.)
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

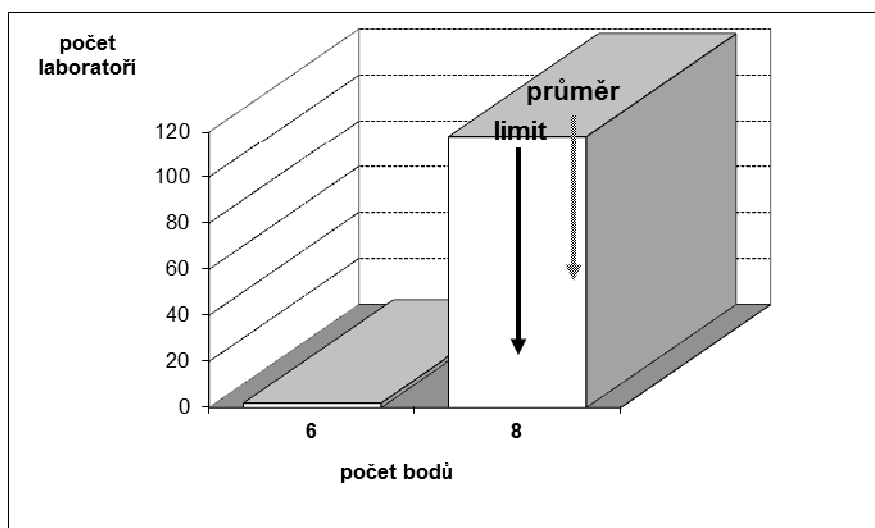
2. Příprava vzorku

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 patogenu 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 118, tj. 98,3% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,453 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $7,967 - (2 \times 0,257) = 7,453$). Tohoto limitu dosáhlo 118 laboratoří, 2 laboratoře tento limit nesplnily.

4. Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Izolát z krve od pacientky s urosepsí.

ODPOVĚĎ: ***Klebsiella oxytoca***

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

Všechny zúčastněné laboratoře s výjimkou jedné identifikovaly signifikantního patogena správně a získaly po 2 bodech.

VZOREK 2: Sputum HIV pozitivního pacienta s kašlem a horečkou.

ODPOVĚĎ: ***Rhodococcus equi***

Vzorek dále obsahoval: *Streptococcus oralis*

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Rhodococcus equi</i>	119	2	99,2%
<i>Rhodococcus equi</i> + <i>Streptococcus oralis</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.

Plného počtu bodů dosáhlo 99,2% všech laboratoří, jedna laboratoř připsala do výsledku identifikace komenzální bakterii a získala pouze bod.

Dle aktuální taxonomie je od roku 2014 validní jméno *Rhodococcus hoagii* a jméno *R. equi* zůstává jako synonymum [1].

Literatura

[1] Kämpfer P., Dott W, Martin K, Glaeser SP. *Rhodococcus defluvi* sp. nov., isolated from wastewater of a bioreactor and formal proposal to reclassify [*Corynebacterium hoagii*] and

Rhodococcus equi as *Rhodococcus hoagii* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol, 2014, 64, 755-761.

VZOREK 3: Stolicе od 40 letého pacienta s průjmем, křečemi v břіše a horečkou.

ODPOVĚD: ***Shigella sonnei***

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Shigella sonnei</i>	118	2	98,3%
<i>Shigella sonnei</i> + <i>Escherichia coli</i>	2	1	1,7%
Celkem	120		100%

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

Bakterie rodu *Shigella* jsou původci bacilární úplavice. Jedná se o striktně humánní patogeny s typicky nízkou infekční dávkou (již 10-100 bakterií). Přenos se děje fekálně-orální cestou (vzhledem k nízké infekční dávce často kontaminovanými rukama), v rozvojových zemích je významnou cestou přenosu kontaminovaná voda. V rozvinutých zemích je nejčastěji izolována *Shigella sonnei* (70-84 % infekcí), zatímco *S. flexneri*, *S. boydii* a *S. dysenteriae* jsou vzácné a většinou importované [1].

Shigella sonnei se při růstu na pevných půdách obvykle vyskytuje v koloniích dvojí morfologie – plazivých s vlnitým okrajem (R fáze) a malých vypouklých (S fáze), vyskytuje se tedy ve dvou fázích. Pro shigely je typická inaktivní biochemie (negativní lysin, arginin, laktóza, produkce plynu) a nepohyblivost. U *S. sonnei* oproti ostatním shigelám většinou odečítáme pozitivní ornitin, β galaktosidázu, maltózu a často i rhamnózu (u 75 % kmenů).

Základní rozdíl mezi shigelami a většinou kmenů *E. coli* je schopnost intracelulární invaze, přežívání a množení shigel dané především virulencním plazmidem pINV. Ten se ale vyskytuje i u tzv. enteroinvazivních *E. coli*, které, na rozdíl od ostatních kmenů *E. coli*, mají též schopnost intracelulární invaze a sdílejí se shigelami také nepohyblivost a inaktivní biochemii. Tato podobnost odráží fakt, že ačkoli pro klinické a epidemiologické účely rozlišujeme *E. coli* a jednotlivé shigely, z hlediska taxonomického se vlastně jedná o jeden druh, *Escherichia coli* [2].

Celkem 118 laboratoří (tj. 98,3 %) správně určilo jako patogena *S. sonnei*. Dvě laboratoře uvedly *S. sonnei* společně s *E. coli*, za což jim byl 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.

[2] Sedláček I. *Escherichia* a *Shigella* – pro klinickou bakteriologii dva dlouho známé rody, přesto taxonomicky stále problematické. Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2011; 20(3): 100-103.

VZOREK 4: Izolát ze sputa od pacienta s akutní exacerbací chronické obstrukční bronchopulmonální nemoci.

ODPOVĚĎ: ***Streptococcus pneumoniae***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Streptococcus pneumoniae</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 izolovaného ze sputa a vyšetřit jeho citlivost k penicilinu a cefotaximu. Kmen je rezistentní k penicilinu a citlivý, zvýšená expozice k cefotaximu.

Celkové výsledky vyšetření citlivosti kmene ze vzorku 4 jsou v tabulce 1, která obsahuje breakpointy minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro citlivé a rezistentní izoláty *S. pneumoniae*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří. Správné výsledky jsou označeny šedou barvou

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 4 *Streptococcus pneumoniae* ze sputa od pacienta s akutní exacerbací chronické obstrukční bronchopulmonální nemoci podle metody a breakpointů EUCAST [1].

Antibiotikum	MIC (mg/l)			Výsledky			
				kategorie/ abs. počet laboratoří (%)			
	Breakpoint*		rozsah hodnot naměřených v NRL**	C	I	R	ND
	C ≤	> R					
penicilin***	0,06	2	4 - 8	4 (3,3)	84 (70)	32 (26,7)	0
cefotaxim	0,5	2	2 - 2	8 (6,7)	100 (83,3)	10 (8,3)	2 (1,7)

MIC: minimální inhibiční koncentrace; *breakpoint pro indikace jiné než meningitida; ** 5 měření bujónovou diluční mikrometodou EUCAST; *** pro screeningové vyšetření citlivosti k betalaktámům použit disk s oxacilinem (1 µg disk); C: citlivý; I: Citlivý, zvýšená expozice, R: rezistentní, ND: neudáno; správné výsledky jsou šedě zvýrazněny.

VZOREK 5: ***Streptococcus pneumoniae***

Kmen 5 je citlivý, zvýšená expozice k penicilinu a citlivý k cefotaximu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti u kmene 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy MIC pro citlivé a rezistentní izoláty *S. pneumoniae*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří. Správné výsledky jsou označeny šedou barvou.

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

Antibiotikum	MIC (mg/l)			Výsledky			
	Breakpoint*		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie/ abs. počet laboratoří			
	C ≤	> R		C	I	R	ND
penicilin***	0,06	2	0,25 – 0,25	9 (7,5)	98 (81,7)	3 (2,5)	10 (8,3)
cefotaxim	0,5	2	0,125 – 0,125	117 (97,5)	0	0	3 (2,5)

MIC: minimální inhibiční koncentrace; *breakpoint pro indikace jiné než meningitida; ** 5 měření bujónovou diluční mikrometodou EUCAST; *** pro skriningové vyšetření citlivosti k betalaktamům použit disk s oxacilinem (1 µg disk); C: citlivý; I: Citlivý, zvýšená expozice, R: rezistentní, ND: neudáno; správné výsledky jsou šedě zvýrazněny.

Závěr

Breakpointy EUCAST pro benzylpenicilin u *S. pneumoniae* jsou C ≤ 0,06 mg/l; R > 2 mg/l pro indikace jiné než meningitida. Kmeny, které mají pozitivní skriningový test na rezistenci vůči betalaktamům (diskový difúzní test za použití 1µg disku s oxacilinem) mají hodnoty MIC benzylpenicilinu nad 0,06 mg/l a jsou kategorizovány buď „citlivé, zvýšená expozice“, v tomto případě mohou být pacienti léčeni benzylpenicilinem, pokud je dávkování upraveno podle MIC (viz breakpointy EUCAST) nebo rezistentní (MIC > 2 mg/l), kdy nelze benzylpenicilin v terapii použít. S ohledem na správné dávkování a vlastní použití penicilinu v terapii pneumokokových infekcí musí být laboratoře schopny provést správné stanovení MIC penicilinu.

U penicilin-rezistentního pneumokoka (vzorek 4) označilo správně kmen jako rezistentní pouze 26,7 % laboratoří, u vzorku č. 5 uvedlo správný výsledek 81,7 % laboratoří. Chybný výsledek byl zapříčiněn zejména nesprávným výsledkem testování MIC, některé laboratoře ovšem chybovaly i v interpretaci výsledku vyšetření, (kategorie C je vyhrazena pouze pro kmeny s MIC ≤ 0,06 mg/l; hodnoty v rozmezí 0,125 – 2 mg/l jsou v indikacích jiných než meningitida označovány jako I, tj. citlivý, zvýšená expozice).

Celkem 105 laboratoří uvedlo hodnotu MIC penicilinu u obou vzorků. U hodnot naměřených gradientovým testem, které se pohybují mimo klasickou geometrickou řadu, je třeba výsledek vždy zaokrouhlit směrem k nejbližší hodnotě MIC (tedy např. hodnota MIC 1,5 mg/l bude uváděna jako 2 mg/l). U vzorku č. 4 se rozmezí MIC penicilinu pohybovalo od 0,5 – 8 mg/l, nadpoloviční většina laboratoří naměřila MIC o řád (MIC 2 mg/l; 56 laboratoří; 53,3 %) až dva nižší (MIC 1 mg/l; 23 laboratoří; 21,9 %), než byla hodnota zjištěná v NRL pro ATB (4 – 8 mg/l). U vzorku č. 5 byly naměřené hodnoty v rozmezí 0,125 – 2 mg/l. Ve srovnání se vzorkem č. 4 byl rozptyl hodnot MIC nižší, pouze 2 laboratoře uvedly hodnotu MIC vyšší o dvě řadění, než byla hodnota zjištěná v NRL pro ATB (0,25 mg/l). Většina (102) laboratoří také uvedla použitou metodu testování, 80 laboratoří i výrobce testu. Laboratoře nejvíce použily gradientový test (BioMérieux [30], Liofilchem [22], Oxoid CZ/Thermo Fisher

Scientific [13]), dále pak automatizovaný systém Vitek (11) a bujónovou mikrodiluční metodu (4). Zatímco při použití standardní diluční metody byla u vzorku 4 shoda testování nejvyšší (50 %), u ostatních metod byla shoda nižší (Vitek – 27,3 %; gradientové testy – 20,7 %).

Opakované problémy s výsledky stanovení citlivosti pneumokoků v externím hodnocení kvality v rámci EARS-Net byly podkladem pro ověření přesnosti stanovení MIC pomocí gradientových testů, které se k vyšetření MIC penicilinu u pneumokoků nejvíce používají. Testování probíhalo ve vývojové laboratoři EUCAST, jeho výsledky jsou dostupné na webových stránkách EUCAST. Výsledky testování dvou výrobků (BioMérieux, Liofilchem) prokázaly opakovanou neshodu ve vyšetření MIC, směrem ke stanovení nižších hodnot v řádu až dvou ředění v porovnání se standardní bujónovou diluční metodou, hodnoty byly rovněž ovlivněny použitými kultivačními médii. Výsledky EHK-1100 ukazují, že problém činí zejména průkaz vyšších MIC penicilinu. Je vhodné, aby laboratoře, které používají pro stanovení MIC k penicilinu gradientové testy, konfirmovaly hodnotu MIC standardní bujónovou mikrodiluční metodou.

Literatura

- [1] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019-01-01. Dostupné na: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/; český překlad <http://www.szu.cz/eucast-dokumenty>
- [2] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Warning against the use of gradient tests for benzylpenicillin MIC in *Streptococcus pneumoniae*. 21st of November 2019. Dostupné na: http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/warnings/

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