



Státní zdravotní ústav
Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti
Poskytovatel zkoušení způsobilosti č. 7001 akreditovaný ČIA
podle ČSN EN ISO/IEC 17043: 2010
Šrobárova 49/48, 100 00, Praha 10



Závěrečná zpráva

Zkoušení způsobilosti v lékařské mikrobiologii
(Externí hodnocení kvality)

PT#M/5-3/2022 (EHK 1281)

Bakteriologická diagnostika

Praha, prosinec 2022

Obsah

1	Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing)	3
2.	Způsob přípravy vzorků	4
3.	Charakteristika materiálu	4
4.	Způsob hodnocení	4
5.	Vyhodnocení	4-8
6.	Závěr	9
	Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/5-3/2022 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-3/2022 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 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 pro každou zúčastněnou laboratoř k dispozici ve webové aplikaci SZÚ v odkazu: <https://ehk.szu.cz/EHK10/> po přihlášení kódem laboratoře a heslem.

Zprávu vypracoval:

RNDr. Renáta Šafránková, Ph.D., RNDr. Vladislav Jakubů, Ph.D., RNDr. Petr Petráš, CSc., RNDr. Pavla Urbášková, CSc., Mgr. Jana Zavadilová

Zprávu autorizoval:

RNDr. Renáta Šafránková, Ph.D.

Dne: 2. 12. 2022

Pracoviště 2 ESPT

<http://www.szu.cz/programy-zpusobilosti-pro-mikrobiologicke-laboratore>

ehk@szu.cz

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT#M/5-3

Identifikace série:	EHK 1281
Název:	Bakteriologická diagnostika
Koordinátor:	RNDr. Renáta Šafránková, Ph.D.
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3
Podstata a účel EHK:	Identifikace bakteriálních patogenů a stanovení citlivosti k antimikrobním preparátům
Kritéria pro účast na EHK:	Dodržení správné laboratorní praxe
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2
Množství připravovaného test. materiálu:	Cca pro 135 laboratoří
Označení vzorkovnic:	EHK-1281/1-5/2022
Zabezpečení kvality vzorku:	U 5 náhodně vybraných lyofilizátů každého vzorku je prováděna 1. Kontrola viability vzorku 2. Kontrola přítomnosti nežádoucí kontaminace
Test homogenity a stability:	Nejméně 14 dní před distribucí vzorků; po otevření lyofilizovaných vzorků a jejich inkubaci na agarových plotnách se vizuálně hodnotí růst a nepřítomnost nežádoucích kontaminant. Stabilita výchozího materiálu je zabezpečena lyofilizací kultur.
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:	117
Termín distribuce vzorků:	5. 9. 2022
Způsob distribuce:	Přepravní službou (zajišťuje Koordinační pracoviště ESPT 2)
Předání výsledků:	Elektronicky do 26. 9. 2022
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4
Určení maximální směrodatné odchylky:	Neprovádí
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Výsledky získané v NRL
Termín uveřejnění očekávaných výsledků:	4. 10. 2022
Termín zveřejnění závěrečné zprávy:	Do 19. 12. 2022

2. Způsob přípravy 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 agarů 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. Charakteristika materiálu

Simulované klinické vzorky obsahující:

1. *Corynebacterium diphtheriae*
2. *Enterococcus faecium*
3. *Clostridioides difficile*
4. *Vibrio cholerae* non O1/non O139 (VRAT - povoleno SÚJB 4.8.2022)
5. *Bacillus cereus*

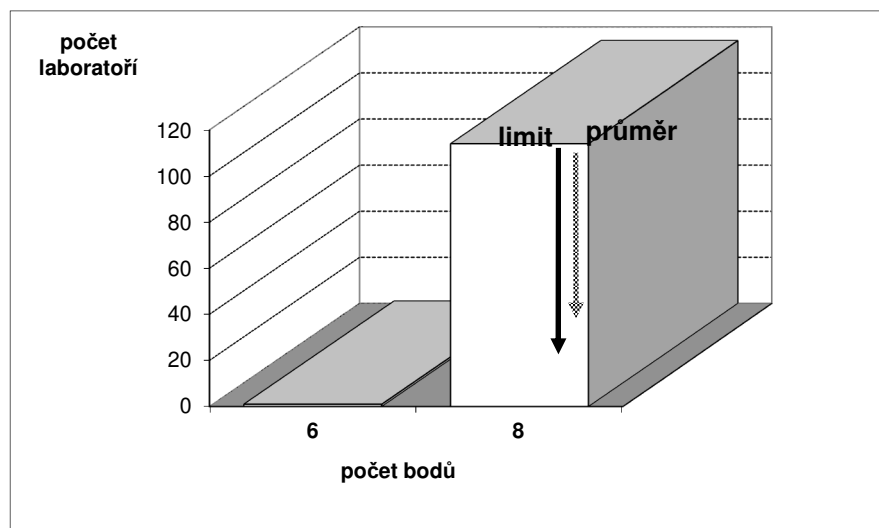
4. Způsob hodnocení

Kvalitativní; dosažení bodového limitu za identifikaci signifikantních patogenů pro danou sérii se vypočítává dle vzorce; u vzorků 1-4 max 2 body za 1 vzorek; limit = aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky.

5. Vyhodnocení

Celkem byly vzorky zaslány 117 laboratořím, 115 laboratoří odeslalo 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 se z technických důvodů již neprovádí, k dispozici jsou komentované výsledky (vzorek 4 a 5).

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



Maximálního počtu bodů při identifikaci dosáhlo 114, tj. 99,1% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,796 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $7,983 - (2 \times 0,187) = 7,796$). Tohoto limitu dosáhlo 114 laboratoří, 1 laboratoř tento limit nesplnila.

Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Výtěr z krku od pacienta s povlakovou angínou.

ODPOVĚĎ: ***Corynebacterium diphtheriae***

Vzorek dále obsahoval: *Neisseria sicca*, *Streptococcus oralis*

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	115	2	100%
Celkem	115		100%

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

Všechny laboratoře identifikovali kmen správně jako *Corynebacterium diphtheriae*. Na úroveň biotypu neurčila kmen žádná laboratoř. Pouze 43 laboratoří správně napsalo, že by kmen odeslalo do NRL pro pertusi a difterii k ověření produkce difterického toxinu.

Úspěšnost laboratoří v identifikaci *C. diphtheriae* je vítanou skutečností vzhledem k nárůstu případů difterie v tomto roce. Od května 2022 NRL pro pertusi a difterii potvrdila v ČR již 5 případů záškrtu. Dva případy jsou způsobené *C. ulcerans*, u tří případů je původcem onemocnění *C. diphtheriae*. Aktuální nárůst hlášení případů záškrtu je pozorován v dalších evropských zemích, jako například v Rakousku, Německu, Velké Británii či Švýcarsku.

Je tedy třeba věnovat nálezům *C. diphtheriae* pozornost a každý izolovaný kmen *C. diphtheriae* poslat do NRL pro pertusi a difterii ke konfirmaci a stanovení toxigenicity.

VZOREK 2: Izolát z hemokultury od pacientky s onkologickým onemocněním.

ODPOVĚĎ: ***Enterococcus faecium***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Enterococcus faecium</i>	115	2	100%
Celkem	115		100%

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

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

Enterokoky jsou podmíněně patogenní bakterie a vyvolávají především infekce nozokomiálního původu u predisponovaných osob (např. hematoonkologičtí pacienti). Nejčastějším druhem zastoupeným v etiologii infekcí člověka je *Enterococcus faecalis* (podíl kolem 80 až 90 %), méně častý je *Enterococcus faecium* (podíl obvykle do 10 %). *E. faecium* je na rozdíl od *E. faecalis* rezistentní k penicilinům (převážná většina kmenů) a je také častěji zasažen rezistencí ke glykopeptidům. Je proto vhodné u enterokoků uvádět správnou druhovou identifikaci nejen z důvodů antibiotické terapie, ale i pro účely mikrobiologické surveillance. Vzestup zastoupení enterokoků v klinickém materiálu a zvýšený podíl *E. faecium* obvykle signalizuje problémy v antibiotické politice.

Literatura

[1] Jindrák V, Hedlová D, Urbášková P a kol: Antibiotická politika a prevence infekcí v nemocnici, Mladá fronta a. s., 2014

VZOREK 3: Stoličky od dlouhodobě hospitalizovaného pacienta (65let) s akutně vzniklým průjmem a horečkou.

ODPOVĚĎ: ***Clostridioides difficile***

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Clostridioides difficile</i>	114	2	99,1%

Signifikantní bakteriální patogen nepřítomen	1	0	0,9%
Celkem	115		100%

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

Většina zúčastněných laboratoří (99,1%) odpověděla správně a získala po dvou bodech. Pouze jedna laboratoř nezjistila signifikantního patogena a zůstala bez bodů. V roce 2016 byl ustanoven nový rod *Clostridioides* a stávající druhy *Clostridium difficile* a blízký příbuzný druh *Clostridium mangenotii* byly přejmenovány na *Clostridioides difficile* a *Clostridioides mangenotii* [1].

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 krve od pacienta se subfebriliemi.
ODPOVĚĎ: <i>Vibrio cholerae</i> non O1/non O139

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Vibrio cholerae</i> non O1/non O139	115	2	100%
Celkem	115		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 erytromycinu. Všechny laboratoře správně identifikovaly druh jako *V. cholerae* a většina v poznámce správně uvedla, že v případě klinického materiálu by byl kmen poslán do Oddělení stafylokokových a bakteriálních střevních infekcí CEM SZÚ ke confirmaci, sérotypizaci a zjištění produkce cholerového enterotoxinu. Při identifikaci metodou MALDI-TOF MS přístrojem Microflex LT (Bruker Daltonics) není v databázi, která se používá v běžné laboratoři, taxon *V. cholerae* obsažen a spektrum takového kmene je přiřazeno druhu *V. albensis*. *V. cholerae* patří mezi vysoce riziková agens a toxiny a je ve zvláštní databázi Biotyper Security Relevant Library. *V. albensis* bylo popsáno již v roce 1896 při studiu izolátů z labské vody (Albis = lat. Labe). Podle výsledků genetického porovnávání typových kmenů se u označení *V. albensis* taxonomicky jedná o pozdější synonymum *V. cholerae*.

Kmen *Vibrio cholerae* non O1/non O139 je citlivý (C) k oběma požadovaným antibiotikům. Dvě laboratoře chybovaly u erytromycinu, všechny ostatní laboratoře uvedly citlivost u obou antibiotik ve správné kategorii. Celkové výsledky vyšetření

citlivosti izolátu 4 jsou v tabulce 1, která obsahuje breakpointy průměrů inhibičních zón a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) cefotaximu a erytromycinu u *Vibrio* spp., hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 4 *Vibrio cholerae*.

Antibiotikum	Obsah disku	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky laboratoří			
		breakpoint ²		rozmezí hodnot naměřených v NRL [*]	breakpoint ²		rozmezí hodnot naměřených v NRL ^{**}	kategorie ³ / absolutní počet ⁴			správné
		C ≥	R <		C ≤	R >		C	I	R	%
cefotaxim	5 µg	21	21	33 - 34	0,25	0,25	≤ 0,03 - ≤ 0,03	115	0	0	100,0
erytromycin	15 µg	12	12	16 - 17	ND	ND	8 - 8	113	0	2	98,3

¹ metoda vyšetření a interpretace výsledků podle EUCAST 2022 [1]

² hodnoty mezi breakpointy pro kategorie C a R jsou hodnoty pro kategorii I (citlivý, zvýšená expozice)

³ kategorie C: citlivý při standardním dávkování, I: citlivý při zvýšené expozici; R: rezistentní i při zvýšené expozici

⁴ správné výsledky podle kategorie jsou zvýrazněny

* 5 měření diskovou difúzní metodou, ** 5 měření diluční mikrometodou

ND: neudáno, IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace

VZOREK 5: *Bacillus cereus*

Izolát 5 je citlivý (C) při standardním dávkování k meropenemu i ke klindamycinu. Všechny laboratoře správně vyhodnotily citlivost izolátu ke klindamycinu, u meropenemu chybovalo 39 laboratoří. Celkové výsledky vyšetření citlivosti izolátu 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a MIC klindamycinu a meropenemu pro *Bacillus* spp., hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 5 *Bacillus cereus*.

Antibiotikum	Obsah disku	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky laboratoří			
		breakpoint ²		rozmezí hodnot naměřených v NRL [*]	breakpoint ²		rozmezí hodnot naměřených v NRL ^{**}	kategorie ³ / absolutní počet laboratoří ⁴			správné
		C ≥	R <		C ≤	R >		C	I	R	%
meropenem	10 µg	25	25	28 - 29	0,25	0,25	0,125 - 0,125	76	0	39	66,1
klindamycin	2 µg	17	17	19 - 20	1	1	0,5 - 0,5	115	0	0	100,0

¹ metoda vyšetření a interpretace výsledků podle EUCAST 2022 [1]

² hodnoty mezi breakpointy pro kategorie C a R jsou hodnoty pro kategorii I (citlivý, zvýšená expozice)

³ kategorie C: citlivý při standardním dávkování, I: citlivý při zvýšené expozici; R: rezistentní i při zvýšené expozici

⁴ správné výsledky podle kategorie jsou zvýrazněny

* 5 měření diskovou difúzní metodou, ** 5 měření diluční mikrometodou

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace

6. Závěr

Vibrio cholerae non O1/non O139 je izolát od subikterického pacienta, hospitalizovaného pro subfebrilie a celkovou slabost ve Strakonické nemocnici. Podrobnosti o tomto prvním záchytu *Vibrio cholerae* z krve pacienta v ČR lze nalézt v časopise Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie [2]. EUCAST u *Vibrio* spp. pro vyšetření citlivosti k erytromycinu uvádí pouze screening s diskem. Rozpor mezi výsledky vyšetření MIC a doporučené diskové difúzní metody (který mohl být příčinou chybného výsledku dvou laboratoří) potvrzují výsledky NRL pro antibiotika, kde byla naměřena MIC erytromycinu 8 mg/l. Třetina chybných výsledků laboratoří u kmene 5 a meropenemu mohla být způsobena příliš koncentrovaným inokulem.

Literatura

- [1] EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, valid from 2022-01-01 [on-line]. Dostupný z WWW: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (český překlad <http://www.szu.cz/klinicke-breakpointy>)
- [2] Zajímavý záchyt *Vibrio cholerae* non O1/non O139 z hemokultury 63letého muže ve Strakonících. Zprávy CEM (SZÚ Praha, 2002;11(9):377-380. Dostupné na <http://www.szu.cz/publikace/zpravy-epidemiologie-a-mikrobiologie/cislo-9-zari-2002>

V případě reklamací vyhodnocení série postupujte, prosím, dle reklamačního řádu. Pro zadání reklamace použijte webovou aplikaci SZÚ: <http://ehk.szu.cz/EHK10/> Informace o změnách v objednávání opravných sérií a zadávání reklamací naleznete na webových stránkách SZÚ: <http://www.szu.cz/programy-zpusobilosti-pro-mikrobiologicke-laboratore>

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY