



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/5-3/2021 (EHK 1206)

Bakteriologická diagnostika

Praha, listopad 2021

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	4-9
6.	Závěr	10
	Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/5-3/2021 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-3/2021 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:

Mgr. Renáta Šafránková, Ph.D., RNDr. Andrea Mančíková, Ph.D., RNDr. Pavla Urbášková, CSc.

Zprávu autorizoval:

Mgr. Renáta Šafránková, Ph.D.

Dne: 30. 11. 2021

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 1206
Název:	Bakteriologická diagnostika
Koordinátor:	Mgr. 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:	Zajištění laboratorních procesů podle ČSN EN ISO 15189:2013
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2
Množství připravovaného test. materiálu:	Cca pro 135 laboratoří
Označení vzorkovnic:	EHK-1206/1-5/2021
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:	119
Termín distribuce vzorků:	6. 9. 2021 (humánní lab.)
Způsob distribuce:	Přepravní službou (zajišťuje Koordinační pracoviště ESPT 2)
Předání výsledků:	Elektronicky do 27. 9. 2021
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4
Určení maximální směrodatné odchylky:	Neprovádí
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Výsledky získané v NRL
Termín uveřejnění očekávaných výsledků:	6. 10. 2021
Termín zveřejnění závěrečné zprávy:	Do 20. 12. 2021

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 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. Charakteristika materiálu

Simulované klinické vzorky obsahující:

1. *Cutibacterium acnes*
2. *Enterococcus durans*
3. *Salmonella* Infantis (edukativní vzorek)
4. *Streptococcus pneumoniae*
5. *Escherichia coli*

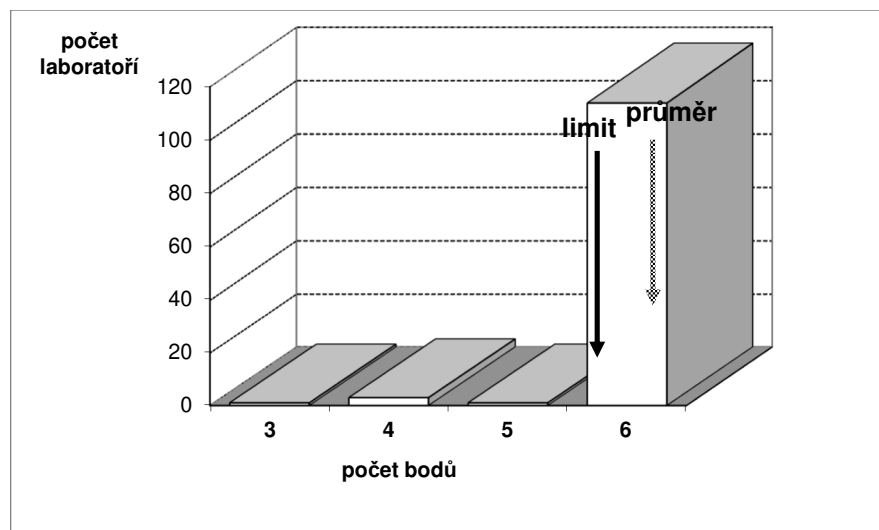
4. Způsob hodnocení

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 rozeslány 119 laboratořím, všechny laboratoře odeslaly výsledek do závěrečného termínu. Za identifikaci signifikantního patogena ve 3 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 6 bodů, jeden vzorek byl edukativní. 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. 95,8% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 5,068 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $5,916 - (2 \times 0,424) = 5,068$). Tohoto limitu dosáhlo 114 laboratoří, 5 laboratoří tento limit nesplnilo.

Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Hnis z oka od pacienta s endoftalmitidou po operaci katarakty.

ODPOVĚď: ***Cutibacterium (Propionibacterium) acnes***
(+*Staphylococcus epidermidis*)

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Cutibacterium (Propionibacterium) acnes</i> + <i>Staphylococcus epidermidis</i>	101	2	84,9%
<i>Cutibacterium (Propionibacterium) acnes</i>	15	2	12,6%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	1,7%
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>	1	0	0,8%
Celkem	119		100%

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

116 laboratoří prokázalo ve vzorku *Cutibacterium (Propionibacterium) acnes*. 101 laboratoří uvedlo současně i druh *S. epidermidis*, který by u oslabeného pacienta mohl být spolupříčinou infekce, nicméně i doprovodnou flórou. Dvě laboratoře, které ve vzorku prokázaly pouze *S. epidermidis*, nezískaly žádný bod, stejně tak laboratoř, která do výsledku identifikace uvedla dvě agens, která ve vzorku nebyla přítomna.

V roce 2016 došlo k reklasifikaci rodu *Propionibacterium* [1] a správný název druhu je dnes *Cutibacterium acnes*.

Literatura

[1] Scholz CF, Kilian M. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2016; 66:4422-4432

VZOREK 2: Izolát z hemokultury od imunokompromitovaného pacienta se sepsí.

ODPOVĚĎ: ***Enterococcus durans***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Enterococcus durans</i>	117	2	98,3%
<i>Enterococcus faecium</i>	1	1	0,8%
<i>Enterococcus</i> spp.	1	1	0,8%
Celkem	119		100%

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

Většina laboratoří odpověděla správně a získala po dvou bodech; 2 laboratoře, které identifikovaly jiný druh nebo určily kmen pouze do rodu, získaly po jednom bodu.

Identifikace metodou MALDI-TOF MS je zcela bezproblémová s hodnotou skóre nad 2,3. Též identifikace pomocí API STREP nečiní obtíže s výsledkem 99,8% ID.

Enterococcus durans je původcem velmi vzácných infekcí jako je endokarditida nebo sepse u imunokompromitovaného pacienta [1,2].

Literatura

[1] Vijayakrishnan R, Rapose A. Fatal *Enterococcus durans* aortic valve endocarditis: a case report and review of the literature. BMJ Case Rep. 2012 Jun 8; 2012

[2] Kenzaka T, Takamura N, Kumabe A, Takeda K. A case of subacute infective endocarditis and blood access infection caused by *Enterococcus durans*. BMC Infect Dis. 2013 Dec 17;13:594.

VZOREK 3: Edukativní vzorek (vzorek se nehodnotí) Stolice od pacienta 65 let s průjmem vzniklým po konzumaci kuřecího salátu.
ODPOVĚĎ: <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérovar <i>Infantis</i> 6,7:y:1,5
Vzorek obsahoval: <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>

Identifikace	četnost	četnost (%)		
<i>Salmonella Infantis</i>	32	28%		
<i>Salmonella</i> sk. O:7, H:5, H:r	1			
<i>Salmonella</i> spp. O:6,7 H:5	3	3%		
<i>Salmonella</i> sk. C1 O:6,7 H:5	2	2%		
<i>Salmonella</i> Bareilly	4	3%		
<i>Salmonella</i> sk. C1	43	36%		
<i>Salmonella</i> sk. O:7	15	13%		
<i>Salmonella</i> spp. O:7	3	3%		
<i>Salmonella</i> spp. OMB	1	1%		
<i>Salmonella</i> spp. O:6,7,8	1	1%		
<i>Salmonella</i> Enteritidis	1	1%		
<i>Salmonella</i> spp.	12	10%		
neurčeno	1	1%		
celkem	119	100%		

somatický a alespoň jeden bičíkový antigen určený správně - celkem	32%
somatický antigen určený správně - celkem	88%

Jako edukativní vzorek byl rozeslán kmen *Salmonella* Infantis antigenní struktury 6,7 : r : 1,5.

Jedná se o třetí nejčastěji se vyskytující sérotyp na území ČR v roce 2020.

Úplnou antigenní strukturu *Salmonella* Infantis 6,7 : r : 1,5 dokázalo určit 33 laboratoří z celkového počtu 119, což je méně než každá třetí ze zúčastněných laboratoří – 28 %.

Alespoň dvě antigenní determinanty určilo správně 9 laboratoří, zde jsou započítány i výsledky „*Salmonella* Bareilly“, která se vyznačuje shodným somatickým antigenem O:7 a shodným bičíkovým antigenem H:1,5 jako sérotyp Infantis. Od sebe se liší v bičíkovém antigenu druhé fáze H:r / H:y.

63 laboratoří (tj. 53 % ze všech zúčastněných) určily pouze somatický antigen a vyhodnotily správně kmen salmonely jako zástupce skupiny C1, případně O:7, ve dvou případech OMB respektive O:6,7,8.

Nesprávně (jak somatické, tak bičíkové antigeny) určila kmen jedna laboratoř a to jako *S. Enteritidis*.

Pouze jediná laboratoř nezařadila kmen do rodu *Salmonella*.

Je třeba zmínit, že se u zasláního kmene nejednalo o typický fenotyp a určení všech antigenních struktur bylo obtížnější.

Pro ilustraci uvádíme přehled nejčastěji hlášených sérotypů za rok 2020. Stejně jako v předchozích letech největší podíl připadá na *S. Enteritidis* (88 %), *S. Typhimurium* (5 %), monofázickou *S. Typhimurium* (1%) a *S. Infantis* (1 %).

Zastoupení sérotypů hlášených v roce 2020 na území ČR (data k 19. 08. 2020, zdroj TESSy):			
		počet	zastoupení z celkového počtu hlášených salmonel
1.	<i>S. Enteritidis</i>	9 343	88,03 %
2.	<i>S. Typhimurium</i>	533	5,02 %
3.	monofázická <i>S. Typhimurium</i>	116	1,09 %
4.	<i>S. Infantis</i>	116	1,09 %
5.	<i>S. Coeln</i>	55	0,52 %
6.	<i>S. Kentucky</i>	49	0,46 %
7.	<i>S. Newport</i>	25	0,24 %
8.	<i>S. Bareilly</i>	21	0,20 %
9.	<i>S. Hadar</i>	16	0,15 %
10.	<i>S. Muenchen</i>	15	0,14 %
	celkem tyto sérotypy	10 289	96,94 %

Nadále platí, že vhodným postupem k úplnému určení antigenního vzorce *Salmonella* sp. v případě nedostupnosti polyvalentních, monovalentních a faktorových antisér či nemožnosti úplného určení, je její zaslání do NRL pro salmonely s informací o alespoň částečně určené antigenní struktuře, pokud byla stanovena. Taktéž doporučujeme v případě nejistoty u některého z antigenních determinant sérotyp neuvádět a vzorek zaslat k dourčení do NRL. Výsledná přesná typizace, může přispět při šetření epidemií jak na národní, tak nadnárodní úrovni.

Děkujeme všem zúčastněným laboratořím, které se zapojily do určení patogenního kmene i přesto, že se jednalo o vzorek edukativní, nikoliv o vzorek v rámci externího hodnocení kvality.

VZOREK 4: Izolát ze sputa od pacienta s akutní exacerbací CHOPN.
ODPOVĚď: <i>Streptococcus pneumoniae</i>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	118	2	99,2%
žádný výsledek	1	0	0,8%
Celkem	119		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 u pacienta s CHOPN a vyšetřit jeho citlivost k penicilinu a cefotaximu. Vzhledem k diagnóze je kmen rezistentní (R) k penicilinu a citlivý, zvýšená expozice (I) 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.

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 4 *Streptococcus pneumoniae*.

Antibiotikum	Obsah disku μg	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky laboratoří (n=119)			
		breakpoint ²		rozmezí hodnot naměřených v NRL [*]	breakpoint ²		rozmezí hodnot naměřených v NRL ^{**}	kategorie ³ /absolutní počet ⁴			správné %
		C	I/R		C	R		C	I	R	
		≥ 20	< 20	6 - 6	ND			0	93	25	21,2
oxacilin	1 μg	≥ 20	< 20	6 - 6	ND			0	93	25	21,2
penicilin ^{***}		ND			≤ 0,06	> 2	4 - 4				
cefotaxim		ND			≤ 0,5	> 2	2 - 2	18	101	0	84,9

¹ metoda vyšetření a interpretace výsledků podle EUCAST 2021 [1]

² hodnoty mezi breakpointy pro kategorie C a R jsou hodnoty pro kategorii I (citlivý při zvýšené expozici)

³ kategorie pro indikace jiné než meningitida: C: citlivý při standardním dávkování, I: citlivý při zvýšené expozici; R: rezistentní i při zvýšené expozici

⁴ správné výsledky podle kategorie jsou zvýrazněny

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace

ND: Breakpoint nedefinován, v NRL neprováděno

* 5 měření diskovou difuzní metodou, ** 5 měření diluční mikrometodou; *** jedna laboratoř penicilin nevyšetřila (resp. pouze zapsala dva rozdílné výsledky do poznámky)

VZOREK 5: *Escherichia coli*

Kmen 5 je citlivý při standardním dávkování (C) k ampicilinu i k cefotaximu. Všechny laboratoře udaly správné výsledky u cefotaximu, u ampicilinu chybovaly dvě laboratoře. Celkové výsledky vyšetření citlivosti u kmene 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a MIC ampicilinu a cefotaximu pro *Enterobacterales*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 5 *Escherichia coli*.

Antibiotikum	Obsah disku μg	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	
		≥ 14	< 14	16 - 17	≤ 8	> 8	4 - 8	117	1	1	98,3
ampicilin	10 μg	≥ 14	< 14	16 - 17	≤ 8	> 8	4 - 8	117	1	1	98,3
cefotaxim	5 μg	≥ 20	< 17 ⁵ < 20 ⁶	26 - 26	≤ 1	> 2 ⁵ > 1 ⁶	0,125 - 0,125	119	0	0	100,0

¹ metoda vyšetření a interpretace výsledků podle EUCAST 2020 [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 infekce jiné než meningitida

⁶ meningitida

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace

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

6. Závěr

Streptococcus pneumoniae EHK-1206/kmen 4 byl poslán již po druhé laboratořím ke kontrole kvality vyšetření citlivosti k penicilinu a k cefotaximu, s udáním identické diagnózy (exacerbace CHOPN) i vzorku (sputum). Poprvé to bylo v roce 2019 v rámci EHK-1100/kmen 4, kdy byl zaznamenán nízký počet správných výsledků u penicilinu (26,7 %) i u cefotaximu (83,3 %). Přes podrobný rozbor chyb u EHK-1100/kmen 4 [2] s uvedením jejich příčiny spočívající v používání nespolehlivé metody gradientních testů k vyšetření MIC místo standardní bujónové mikrodiluční metody [3] jsou výsledky EHK-1206/kmen 4 u penicilinu ještě méně uspokojivé: správně vyšetřilo toto antibiotikum pouze 21,2 % laboratoří (zhoršení o 5,5 %) zatímco u cefotaximu se výsledky zlepšily nepatrně (o 1,6 %). Výsledky MIC penicilinu u kmene EHK- 1206/kmen 4, vyšetřené v NRL pro antibiotika gradientními testy dvou výrobců nepřesáhly MIC 1,5 mg/l a potvrdily tak, že v souladu s varováním EUCAST [3], nejsou gradientní testy vhodné pro vyšetření MIC penicilinu u pneumokoků.

Literatura

- [1] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0, valid from 2021-01-01 [on-line]. Dostupný z WWW: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/, český překlad <http://www.szu.cz/klinicke-breakpointy>
- [2] EHK-1100 Bakteriologická diagnostika. Zprávy Centra mikrobiologie a epidemiologie 2020; 3:129-131. Dostupné z WWW: <http://www.szu.cz/publikace/zpravy-epidemiologie-a-mikrobiologie/zpravy-cem-03-brezen-2020>
- [3] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Warning against the use of gradient tests for benzylpenicillin MIC in *Streptococcus pneumoniae*. 21st of November 2019. Dostupné z WWW: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Warnings/Warnings_docs/Warning_-_gradient_for_benzyl_and_pnc_21nov2019.pdf

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

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY