



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/5-1/2023 (EHK 1328)
Bakteriologická diagnostika

Praha, květen 2023

Obsah

1	Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing)	3
2.	Způsob přípravy vzorků	3-4
3.	Charakteristika materiálu	4
4.	Způsob hodnocení	4
5.	Vyhodnocení	5-10
6.	Závěr	10
	Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/5-1/2023 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-1/2023 byly prováděny podle standardního operačního postupu koordinátora programu 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., Mgr. Ondřej Daniel, RNDr. Vladislav Jakubů, Ph.D.

Zprávu autorizoval:

RNDr. Renáta Šafránková, Ph.D.

Dne: 15. 5. 2023

Pracoviště 2 ESPT

ehk@szu.cz

<https://szu.cz/sluzby/zkouseni-zpusobilosti/zkouseni-zpusobilosti-pro-lekarskou-mikrobiologii/>

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT#M/5-1/2023

Identifikace cyklu:	EHK 1328
Název PT:	Bakteriologická diagnostika
Koordinátor:	RNDr. Renáta Šafránková, Ph.D.
Podstata a účel PT:	Identifikace bakteriálních patogenů a stanovení citlivosti k antimikrobním preparátům
Kritéria pro účast na PT:	Dodržení správné laboratorní praxe
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3 závěrečné zprávy
Hodnocené ukazatele:	Identifikace bakteriálních patogenů
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2 závěrečné zprávy
Počet účastníků:	118
Termín distribuce vzorků:	20. 2. 2023
Informace účastníkům:	viz Informace pro účastníky zaslané spolu se vzorky
Termín pro odeslání výsledků účastníky:	13. 3. 2023
Označení vzorkovnic:	EHK-1328/1-5/2023
Zabezpečení jakosti vzorku včetně testu homogenity a stability:	Viz kapitola 2 závěrečné zprávy
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4 závěrečné zprávy
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Výsledky dosažené v NRL
Určení maximální směrodatné odchylky:	Aritmetický průměr všech hodnocených laboratoří mínus 2 směrodatné odchylky. Laboratoř úspěšně absolvuje kolo EHK, pokud dosáhne bodového limitu, který se vypočítává podle vzorce: Limit = aritmetický průměr výsledků všech hodnocených laboratoří minus dvě směrodatné odchylky. Pokud se v hodnocené skupině vyskytne pracoviště s extrémně nízkým bodovým ziskem (<50 % maximálního bodového zisku), je vyloučeno z výpočtu limitu. Takové pracoviště je automaticky hodnoceno jako neúspěšné.
Termín uveřejnění předběžných výsledků:	22. 3. 2023
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	Do 5. 6. 2023

2. Způsob přípravy vzorku

2.1 Typ a uskladnění výchozího materiálu

Výchozím materiálem pro přípravu vzorků jsou bakteriální kultury získané z České národní sbírky typových kultur, případně z klinického materiálu na pracovištích LCEM SZÚ.

Výchozí materiál je dlouhodobě uskladněn v lyofilizované formě při pokojové teplotě nebo hluboce zamražen při -80°C.

2.2 Zpracování výchozího materiálu

Kultury bakterií jsou před použitím rozmrazeny, lyofilizované kultury rehydratovány živným bujónem a poté naočkovány na živná média a inkubovány v termostatu při teplotě 36°C. Médium se označí datem očkování a identifikací mikroorganismu. Dle

druhu mikroorganismu jsou naočkovány 2 – 4 živné půdy. Kmeny jsou inkubovány v termostatu při 35-36°C ve vhodné atmosféře 24h, pomalu rostoucí mikroorganismy 48h. Po inkubaci je vizuálně hodnocen růst a čistota kultury. Kontaminované misky jsou před lyofilizací vyřazeny.

Narostlé kultury mikroorganismů jsou setřeny sterilním vatovým tamponem z povrchu agaru a resuspendovány ve 4 ml fyziologického roztoku. Densita výsledného zákalu musí odpovídat McFarlandově standardě 6 (přibližně $1,8 \times 10^9$ org. ml⁻¹). Dle požadované výsledné koncentrace bakterií je případně připraveno ředění zákalu ve stupni 10-1-snadná izolace, 10-2-středně obtížná izolace až 10-3-obtížná izolace. Ředění se připraví napipetováním 1ml suspenze bakterií o hustotě McFarland 6 do 9ml fyz. roztoku (ředění 10-1); přenesením 1ml z ředění 10-1 do 9ml fyz. roztoku se připraví ředění 10-2, přenesením 1ml z ředění 10-2 do 9ml fyz. roztoku ředění 10-3. Automatickou pipetou je napipetováno 0,7 ml vzniklé suspenze nebo požadovaného ředění do 70 ml lyofilního média. Suspenze je homogenizována a rozplněna do jednotlivých lahviček (vzorků) o objemu min. 0,5 ml. Vzorky jsou označeny pořadovým číslem 1-5, číslem EHK a datem rozeslání. Před plněním se lahvička vždy sterilizuje nad plamenem. Lahvičky se uzavřou gumovým uzávěrem pomocí pinzety tak, aby byl ponechán prostor pro odpaření. Rozplněné lahvičky jsou umístěny na kovovou snímatelnou plošinu lyofilizátoru rovnoměrně po celé její ploše. Po rozplnění lahviček je 1 kapka ze zbylé suspenze inokulována na živný agar a inkubována pro kontrolu sterility. Kovová plošina s lahvičkami se vloží do mrazicího boxu na -80°C. Po 3 hodinách se plošina s lahvičkami vloží do lyofilizačního přístroje, kde probíhá vlastní lyofilizace (SOP-NRL/CNCTC-03, SOP-NRL/CNCTC-09).

Po kontrole lyofilizátů jsou lahvičky opatřeny pertlí pomocí pertlovacích kleští a označeny nálepkou pro identifikaci lyofilizátu. Takto označené a zapertlované lahvičky jsou vloženy do plastového obalu a skladovány při teplotě 4 – 8°C.

Stabilita výchozího materiálu je zabezpečena lyofilizací kultur.

Homogenita je zajištěna promícháním vzorků před zahájením alikvotování do vzorkovnic.

3. Charakteristika materiálu

Simulované klinické vzorky obsahující:

1. *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*
2. *Enterococcus gallinarum*
3. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Derby (edukativní vzorek)
4. *Haemophilus influenzae*
5. *Streptococcus pyogenes*

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

Za identifikaci signifikantního patogena ve 3 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 6 bodů (jeden vzorek byl edukativní a nehodnotil se). 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).

Maximálního počtu bodů při identifikaci dosáhlo všech 118 laboratoří, tj. 100%.

Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Hnis od 3 letého dítěte po paracentéze.
ODPOVĚĎ: <i>Moraxella catarrhalis</i> Vzorek dále obsahoval: <i>Streptococcus oralis</i>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Moraxella catarrhalis</i>	118	2	100%
Celkem	118		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 odpověděly správně a získaly po dvou bodech.

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Enterococcus gallinarum</i>	118	2	100%
Celkem	118		100%

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

Všechny laboratoře uvedly správné rodové i druhové jméno patogena a získaly plný počet bodů. *E. gallinarum* stejně tak jako *E. casseliflavus* je pohyblivý 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). Identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF je zcela bezproblémová s hodnotou skóre okolo 2,4.

VZOREK 3: Edukativní vzorek (vzorek se nehodnotí) Stolice od 68 leté pacientky s průjemem a horečkou.
ODPOVĚĎ: <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérovar Derby 4,12 : f,g : -
Vzorek dále obsahoval: <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>

Identifikace	četnost	četnost %
<i>Salmonella</i> Derby	21	18 %
<i>Salmonella</i> Agona	2	2 %
<i>Salmonella</i> sk. B	48	41 %
<i>Salmonella</i> sk. O:4	25	21 %
<i>Salmonella</i> Enteritidis	1	1 %
<i>Salmonella</i> Typhimurium	1	1 %
<i>Salmonella</i> spp.	20	17 %
neurčeno	0	0%
Celkem	118	100 %

Jako edukativní vzorek byl rozeslán kmen *Salmonella* Derby antigenní struktury 4,12 : f,g : - .

Plnou sérotypizaci zasláného kmene, *Salmonella* Derby 4,12 : f,g : - , dokázalo určit 21 laboratoří z celkového počtu 118, což je méně než jedna čtvrtina ze zúčastněných laboratoří – 18 %.

Dvě laboratoře ve svých výsledcích uvedly, že se jedná o *Salmonella* Agona 4,12 : f,g,s : - . Pokud laboratoře nevlastní specifické salmonelové antisérum H:s, je těžké tyto dva sérotypy odlišit.

Sedmdesát tři laboratoří (tj. 62 % ze všech zúčastněných) určily pouze somatický antigen a vyhodnotily kmen salmonely jako zástupce skupiny B, případně O:4.

Dvacet laboratoří jako hlavní výsledek uvedlo identifikaci do druhu.

Nesprávně určily kmen dvě laboratoře a to jako *Salmonella* Enteritidis či *Salmonella* Typhimurium.

Dále uvádíme přehled nejčastěji hlášených sérotypů za rok 2022. Z druhé tabulky je patrné, že *Salmonella* Derby je sedmým nejčastějším sérotypem na území ČR. Stejně jako v předchozích letech největší podíl připadá na *Salmonella* Enteritidis (88, 9 %) dále na *Salmonella* Typhimurium (6,6 %) a na třetím místě je *Salmonella* Typhimurium monofázická (1,1 %).

Zastoupení sérotypů hlášených v roce 2021 na území ČR (data k 25. 02. 2023, zdroj ISIN)			
		počet	zastoupení z celkového počtu hlášených salmonel
1.	<i>S. Enteritidis</i>	6348	88,9 %
2.	<i>S. Typhimurium</i>	468	6,6 %
3.	<i>S. Typhimurium</i> monofázická	81	1,1 %
4.	<i>S. Infantis</i>	65	0,9 %
5.	<i>S. Coeln</i>	56	0,8 %
6.	<i>S. Newport</i>	32	0,4 %
7.	<i>S. Derby</i>	24	0,3 %
8.	<i>S. Goldcoast</i>	24	0,3 %
9.	<i>S. Kentucky</i>	23	0,3 %
10.	<i>S. Stanley</i>	17	0,2 %
	celkem tyto sérotypy	7138	93,0 %

Salmonella Derby má nejvyšší prevalenci v chovech prasat a skotu. Není proto zarážející, že se jedná o nejčastější sérovar identifikovaný u dětí a kojenců v Číně, která je celosvětovým lídrem v produkci vepřového masa [1]. V rámci EU byl v roce 2021 tento sérotyp evidován mezi pěti nejčastějšími, které způsobují lidské infekce [2].

Rádi bychom připomněli, že v souvislosti s epidemiologickým šetřením je nutné sérotypy salmonel od sebe důsledně odlišovat. V případě nejasností prosíme o doručení kmene do NRL pro salmonely.

Literatura

- [1] Stanaway JD, Parisi A, Sarkar K, Blacker BF, Reiner RC, Hay SI, et al. The global burden of non-typhoidal salmonella invasive disease: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Infect Dis* 2019; 19:1312–1324. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30418-9
- [2] European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA J.* 2022; 20(12):e07666. doi: 10.2903/j.efsa.2022.7666.

VZOREK 4: Izolát ze sputa od pacienta s chronickou bronchitidou.

ODPOVĚĎ: ***Haemophilus influenzae***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Haemophilus influenzae</i>	118	2	100%
Celkem	118		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 ampicilinu a k cefuroximu. Izolát *Haemophilus influenzae* je k ampicilinu rezistentní (R) a k cefuroximu pro perorální použití je citlivý při zvýšené expozici (I).

Ampicilin uvedla jedna laboratoř jako citlivý, všechny ostatní laboratoře jej uvedly správně jako rezistentní. U cefuroximu jsou výsledky laboratoří velmi různorodé, údaje jsou zobrazeny v Tabulce 1, která obsahuje breakpointy průměrů inhibičních zón a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) ampicilinu i cefuroximu naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 4 *Haemophilus influenzae*.

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	
ampicilin	2 µg	18	18	6 - 6	1	1	>8 - >8	1	0	117	99,2
cefuroxim perorální	30 µg	50	27	27 - 28	0,001	1	1 - 1	12	65	39	55,1 **

¹ metoda vyšetření a interpretace výsledků podle EUCAST 2023 [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 (hodnoty mezi C a R): citlivý při zvýšené expozici; R: rezistentní i při zvýšené expozici;

⁴ správné výsledky podle kategorie jsou zvýrazněny;

* 5 měření diskovou difuzní metodou; ** 5 měření diluční mikrometodou;

** dvě laboratoře neuvedly interpretaci

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace

VZOREK 5: *Streptococcus pyogenes*

Izolát 5 je rezistentní k erytromycinu (R) a kvůli pozitivní inducibilní rezistenci se i klindamycin interpretuje jako rezistentní. Všechny laboratoře správně vyhodnotily obě antibiotika. Celkové výsledky vyšetření citlivosti izolátu 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a MIC pro erytromycin a pro klindamycin, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 5 *Streptococcus pyogenes*.

Antibiotikum	Obsah disku	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky laboratoří			
								Kategorie ³ / absolutní počet laboratoří ⁴		správné	
		breakpoint ²		rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint ²		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	C	I	R	%
		C ≥	R <		C ≤	R >					
erytromycin	15 µg	21	21	13 - 15	0,25	0,25	1 - 2	0	0	118	100
klindamycin	2 µg	17	17	20 - 21	0,5	0,5	0,06 - ≤0,03	0	0	118	100

¹ metoda vyšetření a interpretace výsledků podle EUCAST 2023 [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 difuzní metodou, ** 5 měření diluční mikrometodou

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace

U vyšetření kmene *Haemophilus influenzae* k cefuroximu jsme předpokládali obtížnou kategorizaci citlivosti z několika důvodů: a) kmen obsahuje mutace v PBP3 a v tom případě je dosažení reprodukovatelné kategorizace obtížné u MIC i diskové difuze a korelace mezi MIC a vytvořeným průměrem zóny je problematická; b) u cefuroximu existují dvoje hodnoty breakpointů v závislosti na způsobu podání; c) naměřené hodnoty se pohybovaly v blízkosti ATU (Area of Technical Uncertainty), dalo se předpokládat, že některé laboratoře naměří hodnoty přímo v ATU. Ad a) u kmenů s aminokyselinovými záměnami v PBP3 jsou dle našich zkušeností výsledky diskové difuzní metody nespolehlivé, vyšetření MIC dává konzistentnější výsledky. Ad b) legendou jsme chtěli laboratoře nasměrovat k tomu, aby použily breakpointy vztažené k perorálnímu podání. Mnoho laboratoří ale uvedlo interpretaci pro intravenózní aplikaci. Pokud byly v komentáři uvedeny obě interpretace, byla započítána perorální. Ad c) pokud naměřené hodnoty spadají do ATU, EUCAST [2] dovoluje ATU dokonce ignorovat a interpretace by měla být v souladu se získaným výsledkem. Několik laboratoří interpretaci neuvedlo s tím, že se jedná o hodnoty v ATU. Pokud ale požadujeme výsledek citlivosti, měl by být dodán, ATU totiž nikdy nezasahuje do interpretace.

Účinnost cefuroximu je u infekcí dýchacích cest, jako jsou bronchitida, pneumonie nebo sinusitida, často zpochybňována. V situaci, kdy nejsou na trhu dostupná základní antibiotika (první volby), může být cefuroxim jedinou možnou volbou pro pacienty s infekcemi dýchacích cest.

U izolátu *Streptococcus pyogenes* laboratoře správně určily typ rezistence jako iMLS_B (indukovaná rezistence ke klindamycinu) a klindamycin interpretovali jako rezistentní. Některé laboratoře dodaly i správnou poznámku, že klindamycin lze použít ke krátkodobé léčbě méně závažných infekcí kůže a měkkých tkání, neboť vývoj konstitutivní rezistence není během takové léčby pravděpodobný [1].

Literatura

- [1] EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, valid from 2023-01-01 [on-line]. Dostupný z WWW: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (český překlad <https://szu.cz/odborna-centra-a-pracoviste/centrum-epidemiologie-a-mikrobiologie/oddeleni-bakterialni-rezistence-na-antibiotika-a-sbirka-kultur/nrl-pro-antibiotika/eucast-dokumenty/klinicke-breakpointy-breakpointy-a-navody/>)
- [2] EUCAST. Area of Technical Uncertainty (ATU) in antimicrobial susceptibility testing. [on-line]. Dostupný z WWW: <https://www.eucast.org/eucastguidancedocuments> (český překlad - Oblast technické nejistoty (ATU) při vyšetřování antibiotické citlivosti. https://szu.cz/wp-content/uploads/2023/03/ATU_Oblast_technicke_nejistoty_2020.pdf)

6. Závěr

Celkem byly vzorky rozeslány 118 laboratořím, 118 laboratoří odeslalo výsledek k vyhodnocení. Uspělo všech 118 laboratoří.

V případě reklamací vyhodnocení série, prosím, postupujte dle reklamačního řádu. Pro zadání reklamace použijte webovou aplikaci SZÚ.

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY