



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/5-4/2023 (EHK 1374)

Bakteriologická diagnostika

Praha, prosinec 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	5-9
6.	Závěr	9
	Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/5-4/2023 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-4/2023 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., RNDr. Petr Petráš, CSc, RNDr. Vladislav Jakubů, Ph.D.

Zprávu autorizoval:

RNDr. Renáta Šafránková, Ph.D.

Dne: 13. 12. 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/5-4/2023

Identifikace cyklu:	EHK 1374
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:	117
Termín distribuce vzorků:	30. 10. 2023
Informace účastníkům:	viz Informace pro účastníky zaslané spolu se vzorky
Termín pro odeslání výsledků účastníky:	20. 11. 2023
Označení vzorkovnic:	EHK-1374/1-5/2023
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:	30. 11. 2023
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	Do 12. 2. 2024

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. *Arcanobacterium haemolyticum*
2. Signifikantní bakteriální patogen nepřítomen
3. *Aeromonas hydrophila*
4. *Corynebacterium diphtheriae*
5. *Acinetobacter baumannii*

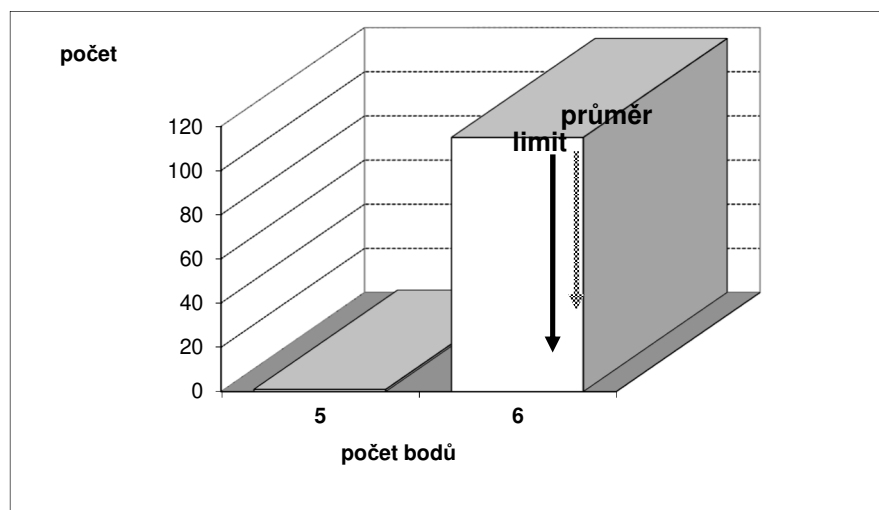
4. Způsob hodnocení

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 4 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 6 bodů, jeden vzorek se nehodnotil. Bodování pro identifikaci bylo provedeno ve stupnici 2, 1 a 0 bodů. Hodnocení (resp. bodování) vyšetření citlivosti k antibiotikům 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 115 laboratoří, tj. 99,1%. Limit pro úspěšné absolvování byl 5,805 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $5,991 - (2 \times 0,093) = 5,805$). Tohoto limitu dosáhlo 115 laboratoří, 1 laboratoř tento limit nesplnila.

Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Výtěr z krku od 18leté pacientky s tonzilofaryngitidou .

ODPOVĚĎ: ***Arcanobacterium haemolyticum***

Vzorek dále obsahoval: *Streptococcus oralis*

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	116	2	100%
Celkem	116		100%

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

Identifikace signifikantního patogena ve vzorku 1 nečinila obtíže a všechny zúčastněné laboratoře získaly po dvou bodech.

VZOREK 2: Izolát ze stěru zhnisané rány na LDK hospitalizovaného 70letého pacienta.

ODPOVĚĎ: **Signifikantní bakteriální patogen nepřítomen**

Vzorek dále obsahoval: *Staphylococcus haemolyticus*

identifikace	frekvence	procento
Signifikantní bakteriální patogen nepřítomen	26	22,4%
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	89	76,7%
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0,9%
Celkem	116	100%

Z 20 laboratoří s nejvyšším dosaženým počtem bodů za minulý rok uvedlo správný výsledek 6 laboratoří. **Vzorek se nehodnotí.**

Koaguláza-negativní stafylokoky (CoNS), jsou skupinou bakterií, které jsou často izolovány z klinických vzorků. Hlavním problémem při hlášení izolátu CoNS je vyloučit možnost kolonizace nebo kontaminace a potvrdit jej jako skutečný patogen. To je možné pouze ve spolupráci infektologa a mikrobiologa při posouzení u každého jednotlivého případu. Pokud jsou podávány falešně pozitivní zprávy o CoNS, může to vést ke zbytečné léčbě a nákladům a také zvyšovat antimikrobiální rezistenci [1].

Staphylococcus haemolyticus je členem skupiny CoNS a je součástí normální kožní mikrobioty u lidí. *S. haemolyticus* je také známý jako oportunní patogen a je druhým nejčastěji izolovaným CoNS (prvním je *S. epidermidis*). Infekce mohou být lokalizované nebo systémové a často jsou spojeny s cizorodým materiálem. Častá rezistence na antibiotika a schopnost tvořit biofilmy znesnadňují léčbu.

Obecně kmeny CoNS nemají tak velký potenciál virulence jako kmeny *S. aureus*, který je hlavním patogenem rodu. V současnosti existují stovky článků, kdy jsou uznávanými oportunními patogeny především u imunitně kompromitovaných pacientů, u dlouhodobě hospitalizovaných [2,3]. Časté jsou infekce krevního řečiště – u infekčních endokarditid při použití umělých chlopní jsou CoNS jejich nejčastějším původcem.

S. aureus a *S. haemolyticus* mají celou řadu odlišných biochemických testů a jdou velice dobře rozlišit i pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

Vzorek se nehodnotí, nicméně při dalším EHK by se špatná identifikace (záměna *S. haemolyticus* za *S. aureus*) považovala za závažnou chybu a vedla by ke ztrátě 2 bodů.

Literatura

- [1] Bora P, Datta P, Gupta V, Singhal L, Chander J. Characterization and antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples. J Lab Physicians. 2018 Oct-Dec;10(4):414-419.
- [2] Bryce AN, Doocey R, Handy R. *S. haemolyticus* meningitis and bacteremia in an allogenic cell transplantant patient. Science Direct Cases 2021; 26 e01259

[3] Becker K, Both A, Weisselberg S, Heilmann Ch, Rohde H. Emergence of coagulase-negative staphylococci. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2020; 18(4): 349-366

VZOREK 3: Stolice od 50leté ženy s diabetem a vodnatým průjmem vzniklým po konzumaci mořských plodů.

ODPOVĚĎ: ***Aeromonas hydrophila***

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Aeromonas hydrophila</i>	110	2	94,8%
<i>Aeromonas</i> spp.	5	2	4,3%
<i>Aeromonas caviae</i>	1	1	0,9%
Celkem	116		100%

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

Všechny zúčastněné laboratoře identifikovaly ve vzorku správně jako původce onemocnění rod *Aeromonas*, 1 laboratoř určila nesprávně druh a získala pouze jeden bod. *A. caviae* má (na rozdíl od zaslání kmene *A. hydrophila*) pozitivní test okyselování celobiózy, negativní VP test, neprodukuje plyn při okyselování glukózy, nemá beta-hemolýzu při kultivaci na krevním agaru (ačkoliv byl obecně zaznamenán nárůst beta-hemolytických kmenů *A. caviae*).

VZOREK 4: Izolát ze stěru z bérčového vředu.

ODPOVĚĎ: ***Corynebacterium diphtheriae***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	116	2	100%
Celkem	116		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 penicilinu a klindamycinu. Izolát *Corynebacterium diphtheriae* je k penicilinu citlivý při zvýšené expozici a ke klindamycinu je rezistentní.

Všech 116 zúčastněných laboratoří identifikovalo správně vzorek do druhu.

U penicilinu určilo správnou interpretaci pouze 90,5 % laboratoří, klindamycin byl určen všemi laboratořemi správně.

Tabulka 1 obsahuje breakpointy průměrů inhibičních zón a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) penicilinu a klindamycinu naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 4 *Corynebacterium diphtheriae*.

Antibiotikum	Obsah disku	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky laboratoří			
								Kategorie ² / absolutní počet laboratoří ³			správný výsledek
		breakpoint		rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	C	I	R	%
		C ≥	R <		C ≤	R >					
penicilin	1 U	50	12	21 - 22	0,001	1	0,25 – 0,25	5	105	6	90,5
klindamycin	10 µg	15	15	6 - 6	0,5	0,5	>4 - >4	0	0	116	100

¹ IZ - průměr inhibiční zóny; MIC - minimální inhibiční koncentrace. EUCAST v13

² kategorie C: citlivý při standardním dávkování; I: citlivý při zvýšené expozici; R: rezistentní

³ očekávané výsledky jsou zvýrazněny

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

VZOREK 5: *Acinetobacter baumannii*

Požadavek byl vyšetřit citlivost k meropenemu (MER) a gentamicinu (GEN).

Celkové výsledky vyšetření citlivosti izolátu 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a MIC pro meropenem a ciprofloxacin, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 5 *Acinetobacter baumannii*.

Antibiotikum	Obsah disku	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky laboratoří			
								Kategorie ³ / absolutní počet laboratoří ⁴			správný výsledek
		breakpoint ²		rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint ²		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	C	I	R	%
		C ≥	R <		C ≤	R >					
meropenem	10 µg	21	15 (21)	7 - 8	2	8 (2)	>16 - >16	1	0	115	99,1
gentamicin	10 µg	17	17	6 - 6	4	4	>16 - >16	1	0	115	99,1

¹ IZ - průměr inhibiční zóny; MIC - minimální inhibiční koncentrace. EUCAST v13

² hodnoty v závorkách platí pro interpretace u meningitidy

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

⁴ očekávané výsledky jsou zvýrazněny

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

Kmen *Acinetobacter baumannii* je rezistentní k meropenemu i ke gentamicinu. Jedna laboratoř interpretovala výsledky obou antibiotik jako citlivé, 99 % laboratoří určilo správně obě antibiotika jako rezistentní.

Diskuse

U penicilinu u *Corynebacterium diphtheriae* se opět u pěti laboratoří vyskytly problémy s interpretací, kdy kmen interpretovaly jako citlivý při standardním dávkování, přestože breakpointy EUCAST [1] u této kombinace kategorií „C“ neudávají (podrobněji o interpretačních kritériích v závěrečné zprávě EHK-1350). Šest laboratoří dále interpretovalo penicilin chybně jako rezistentní.

Klinické breakpointy EUCAST pro meropenem u acinetobakterů rozlišují interpretaci pro izoláty z meningitidy a ostatních indikací. Hodnota MIC meropenemu se u testovaného kmene pohybovala nad 16 mg/l, klinická interpretace je v obou případech shodná.

Kmen *Acinetobacter baumannii* je rezistentní k meropenemu díky přítomnosti genů pro karbapenemázy blaOXA-23 a blaOXA-58. Obě tyto karbapenemázy způsobují rezistenci ke karbapenemům. Ke gentamicinu je kmen rezistentní díky přítomnosti genu *armA*. Kmeny s touto genetickou výbavou kolují v českých zdravotnických zařízeních již několik let a jsou dominantními MDR (XDR) kmeny acinetobakterů [2].

Literatura

- [1] EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.1, valid from 2023-06-29 [on-line]. Dostupný z WWW: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
- [2] Lenka Radolfová-Křížová, Martina Maixnerová, Vladislav Jakubů, Alexandr Nemeč. Extenzivně rezistentní kmeny *Acinetobacter baumannii* nesoucí geny pro karbapenemázu OXA-23 a metylázu ArmA v nemocnicích České republiky. ZPRÁVY CENTRA EPIDEMIOLOGIE A MIKROBIOLOGIE (SZÚ, PRAHA) 2016; 25(6-7)

6. Závěr

Celkem byly vzorky rozeslány 117 laboratořím, 116 laboratoří odeslalo výsledek k vyhodnocení. Uspělo 115 laboratoří.

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

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY