



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/5-2/2024 (EHK 1404)

Bakteriologická diagnostika

Praha, srpen 2024

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	10
	Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/5-2/2024 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-2/2024 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: 7. 8. 2024

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/5-2/2024

Identifikace cyklu:	EHK 1404
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:	112
Termín distribuce vzorků:	6. 5. 2024
Informace účastníkům:	viz Informace pro účastníky zaslané spolu se vzorky
Termín pro odeslání výsledků účastníky:	27. 5. 2024
Označení vzorkovnic:	EHK-1404/1-5/2024
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:	6. 6. 2024
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	Do 19. 8. 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. Denzita 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 lahvíček (vzorků) o objemu min. 0,5 ml. Vzorky jsou označeny pořadovým číslem 1-5, číslem EHK a datem rozeslání. Před plněním se lahvíčka vždy sterilizuje nad plamenem. Lahvičky se uzavřou gumovým uzávěrem pomocí pinzety tak, aby byl ponechán prostor pro odpaření. Rozplněné lahvíčky jsou umístěny na kovovou snímatelnou plošinu lyofilizátoru rovnoměrně po celé její ploše. Po rozplnění lahvíček je 1 kapka ze zbylé suspenze inokulována na živný agar a inkubována pro kontrolu sterility. Kovová plošina s lahvíčkami se vloží do mrazicího boxu na -80°C. Po 3 hodinách se plošina s lahvíčkami vloží do lyofilizačního přístroje, kde probíhá vlastní lyofilizace (SOP-NRL/CNCTC-09). Po kontrole lyofilizátů jsou lahvíčky opatřeny pertlí pomocí pertlovacích kleští a označeny nálepkou pro identifikaci lyofilizátu. Takto označené a zapertlované lahvíčky 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. *Streptococcus* sk. C (betahemolytický)
2. *Morganella morganii*
3. *Salmonella* Infantis
4. *Streptococcus pneumoniae*
5. *Pseudomonas aeruginosa*

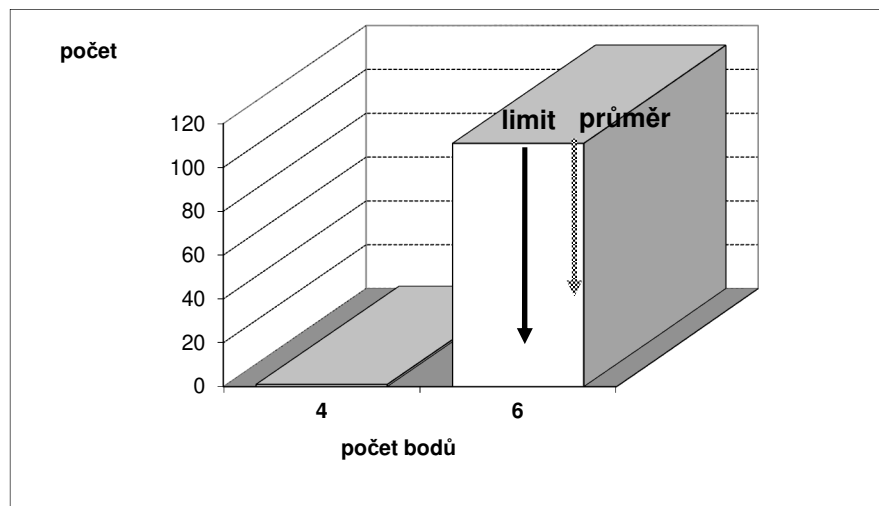
4. Způsob hodnocení

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, vzorek 3 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 111 laboratoří, tj. 99,1%. Limit pro úspěšné absolvování byl 5,604 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $5,982 - (2 \times 0,189) = 5,604$). Tohoto limitu dosáhlo 111 laboratoří, 1 laboratoř tento limit nesplnila.

Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Výtěr z krku od pacienta s bolestmi v krku a horečkou.

ODPOVĚĎ: ***Streptococcus sk. C* (betahemolytický)**

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Streptococcus sk. C</i>	48	2	42,9%
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	63	2	56,2%
Signifikantni bakt. patogen nepřítomen	1	0	0,9%
Celkem	112		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 kromě jedné laboratoře, která do výsledku neuvedla žádné agens, získaly všechny laboratoře po dvou bodech.

VZOREK 2: Izolát z moče (signifikantní bakteriurie).

ODPOVĚĎ: ***Morganella morganii***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Morganella morganii</i>	112	2	100%
Celkem	112		100%

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

Všechny laboratoře odpověděly správně a byly jim uděleny dva body.

VZOREK 3: Stoličky od 30letého pacienta se zvracením a vodnatým průjmem po konzumaci kuřecího masa.

ODPOVĚĎ: ***Salmonella Infantis***

Vzorek dále obsahoval: *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*

identifikace	frekvence	procento
<i>Salmonella</i> Infantis	57	51%
<i>Salmonella</i> sk. C1	31	28%
<i>Salmonella</i> sk. O:7	15	13%
<i>Salmonella</i> spp.	8	7%
<i>Salmonella</i> Bareilly	1	1%
Celkem	112	100%

Z 20 laboratoří s nejvyšším dosaženým počtem bodů za minulý rok uvedlo správný výsledek 12 laboratoří. **Vzorek se nehodnotí.**

Jako vzorek byl rozeslán kmen *Salmonella* Infantis antigenní struktury 6,7 : r : 1,5. Plnou sérotypizaci zasláného kmene, *Salmonella* Infantis 6,7 : r : 1,5, dokázalo určit 57 laboratoří z celkového počtu 112, což je více než jedna polovina ze zúčastněných laboratoří – 51 %.

Jedna laboratoř ve svých výsledcích uvedla, že se jedná o *Salmonella* Bareilly 6,7 : y : 1,5.

Čtyřicet šest laboratoří (tj. 41 % ze všech zúčastněných) správně určilo pouze somatický antigen a vyhodnotily kmen salmonely jako zástupce skupiny C1, případně O:7.

Osm laboratoří jako hlavní výsledek uvedlo identifikaci do rodu.

Dále uvádíme přehled nejčastěji hlášených sérotypů za rok 2023. Z tabulky 1 je patrné, že *Salmonella* Infantis je čtvrtým nejčastějším sérotypem na území ČR. Stejně jako v předchozích letech největší podíl připadá na *Salmonella* Enteritidis (80,2 %) dále na *Salmonella* Typhimurium (5,5 %) a na třetím místě je *Salmonella* Thompson (1,9 %), která vystřídala monofázickou *S. Typhimurium*. Vyšší zastoupení *S. Thompson* bylo způsobeno epidemickým výskytem v Královéhradeckém kraji.

Tabulka 1: Zastoupení sérotypů hlášených v roce 2023 na území ČR (data k 25. 03. 2024, zdroj ISIN)

pořadí	sérotyp	počet	zastoupení z celkového počtu hlášených salmonel
1.	<i>S. Enteritidis</i>	6181	80,2 %
2.	<i>S. Typhimurium</i>	421	5,5 %
3.	<i>S. Thompson</i>	145	1,9 %
4.	<i>S. Infantis</i>	76	1,0 %
5.	<i>S. Typhimurium</i> monofázická	74	1,0 %
celkem tyto sérotypy		6897	89,5 %

Zpráva agentury EFSA (EFSA 2023) uvádí, že *S. Infantis* je striktně vázána na brojlery (myšleno ve smyslu zdroje, až v 95,6%). V rámci EU byl v roce 2022 tento sérotyp evidován taktéž mezi pěti nejčastějšími, které způsobují lidské infekce (EFSA, 2023). 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] European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. EFSA J. 2023;21(12):e8442. Published 2023 Dec 12. doi:10.2903/j.efsa.2023.8442

VZOREK 4: Izolát z hemokultury od pacienta s pneumonií.

ODPOVĚď: ***Streptococcus pneumoniae***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	112	2	100%
Celkem	112		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 citlivost k těmto antibiotikům: penicilin (PEN), erytromycin (ERY). Izolát *Streptococcus pneumoniae* je při standardním dávkování citlivý (C) k penicilinu i k erytromycinu.

Všech 112 zúčastněných laboratoří identifikovalo správně vzorek do druhu. Laboratoře byly 100 % i v interpretaci vyšetření citlivosti, kdy správně určily citlivost jak k penicilinu, tak k erytromycinu.

Tabulka 2 obsahuje breakpointy (BP) průměrů inhibičních zón a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) penicilinu a erytromycinu naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 4 *Streptococcus pneumoniae*.

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	-	-	-	-	0,06	2	0,016 – 0,016	112	0	0	100
oxacilin	1 µg	20	20	22 - 23	-	-	-				
erytromycin	15 µg	22	22	23 - 24	0,25	0,25	≤0,03 – ≤0,03	112	0	0	100

¹ IZ - průměr inhibiční zóny; MIC - minimální inhibiční koncentrace. EUCAST v14

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

³ očekávané výsledky jsou zvýrazněny

- nepoužito pro testování

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

VZOREK 5: *Pseudomonas aeruginosa*

Požadavek byl vyšetřit citlivost k těmto antibiotikům: meropenem (MER), tobramycin (TOB).

Celkové výsledky vyšetření citlivosti izolátu 5 jsou v tabulce 3, která obsahuje BP inhibičních zón (IZ) a MIC pro meropenem a tobramycin, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 3. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 5 *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiotikum	Obsah disku	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky laboratoří			
								Kategorie ³ / absolutní počet laboratoří ⁴			správný výsledek
		breakpoint		rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	C	I	R	%
		C ≥	R <		C ≤	R >					
meropenem	10 µg	20	14	6 - 8	2	8	>16 - >16	0	0	112	100
tobramycin	10 µg	18	18	21 - 22	2	2	0,5 – 1	110	1	0	98,21

¹ IZ - průměr inhibiční zóny; MIC - minimální inhibiční koncentrace. EUCAST v14

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

⁴ očekávané výsledky jsou zvýrazněny

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

Kmen *Pseudomonas aeruginosa* je rezistentní (R) k meropenemu a při standardním dávkování citlivý (C) k tobramycinu. Laboratoře velmi dobře interpretovaly citlivosti obou antibiotik, pouze jedna laboratoř interpretovala výsledek tobramycinu jako citlivý při zvýšené expozici (I) – tuto kategorizaci však EUCAST u kombinace *Pseudomonas aeruginosa*/tobramycin neuvádí. Jedna laboratoř tobramycin nevyšetřila vůbec.

Diskuse

Vyšetření citlivosti a následná interpretace u vzorků číslo 4 a 5 nečinila problémy.

U *Streptococcus pneumoniae* má EUCAST pro stanovení citlivosti na beta-laktamová antibiotika vyvinutý diagram založený na testování disku oxacilinu. Hodnota nad 19 mm vylučuje všechny mechanismy rezistence vůči beta-laktamům a kmen se pak dá hlásit jako citlivý.

Izolát *Pseudomonas aeruginosa* je interpretován jako rezistentní k meropenemu jak za použití breakpointů (BP) pro meningitidu, tak i při BP pro jiné indikace. Kmen nenese žádnou karbapenemázu, obsahuje pouze přirozenou beta-laktamázu blaOXA-486 a získanou cefalosporinázu blaPDC-24. Rezistence k meropenemu je způsobena mutací v genu pro poriny vnější membrány.

U tobramycinu by měl být brán zřetel na to, z jakého materiálu izolát pochází. Klinický BP 2 mg/l je nastavený pro nekomplikované UTI, při systémových infekcích je třeba k výše uvedenému BP přistupovat dle instrukcí uvedených v dokumentu „Breakpointy v závorkách“ (https://szu.cz/wp-content/uploads/2023/06/Breakpointy_v_zavorkach_1_12_2021.pdf).

Literatura

[1] EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.1, valid from 2023-06-29 [on-line]. Dostupný z WWW: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/

6. Závěr

Celkem byly vzorky rozeslány 112 laboratořím, 112 laboratoří odeslalo výsledek k vyhodnocení. Uspělo 111 laboratoří.

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

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY