



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/5-3/2024 (EHK 1411)
Bakteriologická diagnostika

Praha, prosinec 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	9
	Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/5-3/2024 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-3/2024 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., RNDr. Vladislav Jakubů, Ph.D., Ing. Monika Havlíčková, Ph.D., Mgr. Zuzana Okonji, Mgr. Jana Zavadilová

Zprávu autorizoval:

RNDr. Renáta Šafránková, Ph.D.

Dne: 2. 12. 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/5-3/2024

Identifikace cyklu:	EHK 1411
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:	2. 9. 2024
Informace účastníkům:	viz Informace pro účastníky zaslané spolu se vzorky
Termín pro odeslání výsledků účastníky:	23. 9. 2024
Označení vzorkovnic:	EHK-1411/1-5/2024
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:	2. 10. 2024
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	Do 16. 12. 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-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. *Corynebacterium pseudotuberculosis* (EV)
2. *Neisseria meningitidis*
3. *Yersinia pseudotuberculosis*
4. *Staphylococcus epidermidis*
5. *Escherichia coli*

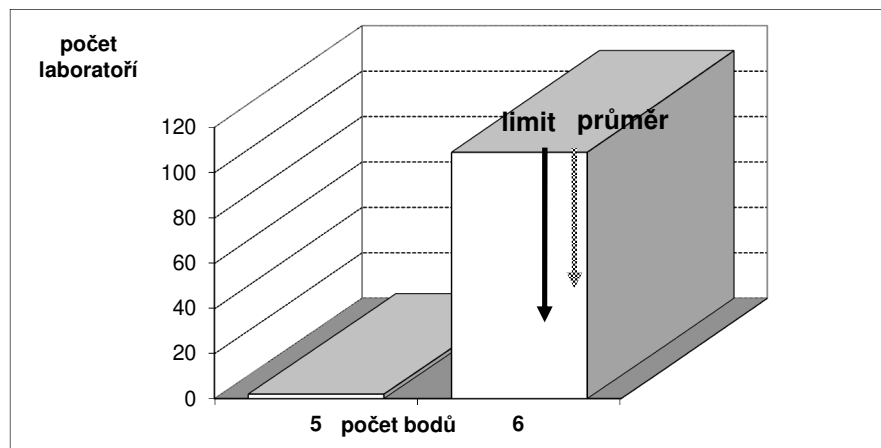
4. Způsob hodnocení

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

Za identifikaci signifikantního patogena ve 3 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 6 bodů, vzorek 1 byl edukativní a nehodnotil se. 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 109 laboratoří, tj. 98,2%. Limit pro úspěšné absolvování byl 5,714 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $5,982 - (2 \times 0,134) = 5,714$). Tohoto limitu dosáhlo 109 laboratoří, 2 laboratoře tento limit nesplnily.

Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Edukativní vzorek (vzorek se nehodnotí).

Izolát od pacienta s hnisavou lymfadenitidou, který udává pobyt na farmě s hospodářskými zvířaty.

ODPOVĚĎ: ***Corynebacterium pseudotuberculosis***

identifikace	frekvence	procento
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	109	98,2%
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	2	1,8%
Celkem	111	100%

Jako edukativní vzorek byl rozeslán kmen *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Většině laboratoří identifikace nečinila obtíže, pouze dvě laboratoře uvedly jiný druh korynebakteria.

Corynebacterium pseudotuberculosis je fylogeneticky blízce příbuzné *C. diphtheriae* a může být producentem difterického toxinu. Je to převážně zvířecí patogen, nejčastěji napadá skot a koně, přenos na člověka bývá popisován v souvislosti s kontaktem s hospodářskými zvířaty.

C. pseudotuberculosis má podobně jako *C. ulcerans* pozitivní test ureasové aktivity a reverzní CAMP test, na rozdíl od *C. ulcerans* má negativní test na fermentaci glykogeny.

VZOREK 2: Izolát z likvoru od pacienta (15 let) s akutním stavem a horečnatými příznaky.

ODPOVĚD: ***Neisseria meningitidis***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Neisseria meningitidis</i>	111	2	100%
Celkem	111		100%

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

Všech 111 laboratoří určilo správně vzorek č. 2 *Neisseria meningitidis*. Některé laboratoře určily správně i séroskupinu B nebo uvedly, že vzorek k typizaci zašlou do NRL, obě varianty jsou v pořádku. Dle platné legislativy připomínáme povinnost zaslání izolátů z invazivních onemocnění do NRL.

Neisseria meningitidis můžeme nejčastěji nalézt ve formě bezpříznakového nosičství v nosohltanu, izolovat při respiračních onemocnění, nebo kultivovat z primárně sterilních materiálů při invazivních meningokokových onemocnění (sepsa, meningitida). Každoročně tyto velmi závažné stavy v ČR zaznamenáváme s maximem výskytu u nejmenších dětí do 4 let věku a adolescentů. Více info: <https://szu.cz/wp-content/uploads/2024/05/IMO-2023.pdf>.

Vyhláškou č. 473/2008 Sb. O systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce, v jejíž příloze č. 6 je uveden Systém epidemiologické bdělosti invazivních meningokokových onemocnění je legislativně podložena povinnost posílání izolátů z invazivního meningokokového onemocnění do NRL pro meningokokové nákazy a hlášení výsledků do informačního systému infekčních nemocí.

NRL provádí nejen identifikaci, ale také určení séroskupin *N. meningitidis* i detailní charakterizaci, až po celogenomovou sekvenaci invazivních kmenů meningokoků. Testování probíhá v rámci národního systému surveillance i mezinárodního monitoringu. Zasílat lze i neinvazivní kmeny pro potvrzení *N. meningitidis* a určení séroskupiny.

VZOREK 3: Stolice od dítěte s bolestmi břicha a horečkou.

ODPOVĚĎ: ***Yersinia pseudotuberculosis***

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	109	2	98,2%
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2	1	1,8%
Celkem	111		100%

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

K infekci *Yersinia pseudotuberculosis* dochází po konzumaci kontaminované vody či potravin a primárně se manifestuje jako mírná gastroenteritida. Rezervoárem tohoto patogena jsou především králíci, hlodavci nebo divocí ptáci. *Y. pseudotuberculosis* může způsobovat mezenteriální lymfadenitidu a terminální ileitidu klinicky imitující apendicitidu; u imunitně oslabených jedinců může mít infekce systémový charakter s klinickými příznaky sepse. Dlouhodobé následky zahrnují erythema nodosum, Reiterův syndrom či nefritidu [1].

Y. pseudotuberculosis roste na většině běžných kultivačních médiích, včetně Columbia, MacConkey a čokoládového agaru, při teplotách 25 a 35 °C za 24–48 hodin. Je dobře identifikovatelná do druhu, jak použitím MALDI TOF MS, tak pomocí komerčních biochemických sestav [1]. Zasláný kmen správně zařadilo do druhu 109 ze 111 laboratoří, které odeslaly výsledek identifikace.

Yersiniózy vyvolané *Y. enterocolitica* a *Y. pseudotuberculosis* podléhají Vyhlášce o systému epidemiologické bdělosti č. 389/2023 Sb. a jsou hlášeny do evropského surveillance systému (TESSy), kde patří k prioritám programu Food-and waterborne diseases.

V roce 2023 bylo v Evropské unii evidováno 188 potvrzených případů *Y. pseudotuberculosis*, nejvíce v Belgii (přes 40 případů), 16 členských zemí (včetně Slovenska) hlásilo nulové výskyty, Česká republika zaznamenala jeden případ podobně jako Norsko či Estonsko [2].

Literatura

[1] Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G, Pfaller MA, Landry ML, Richter SS, Warnock DW. Manual of clinical microbiology 11th Edition. ASM press, Washington, DC 2015. doi:10.1128/9781555817381.

[2] Surveillance Atlas of Infectious Diseases, ECDC.

VZOREK 4: Izolát z krve od imunokompromitovaného pacienta se sepsí.

ODPOVĚĎ: ***Staphylococcus epidermidis***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	111	2	100%
Celkem	111		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: erytromycin (ERY), linezolid (LNZ).

Izolát *Staphylococcus epidermidis* je k erytromycinu i linezolidu rezistentní (R).

Všech 111 zúčastněných laboratoří identifikovalo správně vzorek do druhu. Nepochybily ani v interpretaci citlivosti u linezolidu, u erytromycinu jich však kategorizovalo správně výsledek jen 109.

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

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 4 *Staphylococcus epidermidis*

Antibiotikum	Obsah disku	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky laboratoří			
		breakpoint		rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	Kategorie ² / absolutní počet laboratoří ³			správný výsledek
		C ≥	R <		C ≤	R >		C	I	R	
											%
erytromycin	15 µg	21	21	16 - 17	1	1	>8 - >8	2	0	109	98,2
linezolid	10 µg	21	21	6 - 6	4	4	>16 - >16	0	0	111	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

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

VZOREK 5: ***Escherichia coli***

Požadavek byl vyšetřit citlivost k těmto antibiotikům: meropenem (MER), ciprofloxacin (CIP).

Celkové výsledky vyšetření citlivosti izolátu 5 jsou v tabulce 3, která obsahuje BP 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 *Escherichia coli*.

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	22	16	6 - 6	2	8	>8 - >8	4	13	94	84,7
ciprofloxacin	5 µg	25	22	6 - 6	0,25	0,5	>4 - >4	0	0	111	100

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 difuzní metodou; ** pět měření diluční mikrometodou;

Kmen *Escherichia coli* je rezistentní (R) k meropenemu i k ciprofloxacinu. Všechny laboratoře správně interpretovaly výsledek testování citlivosti u ciprofloxacinu. Meropenem však interpretovali ve všech kategoriích, od citlivého po rezistentní.

Diskuse

Izolát *Escherichia coli* (vzorek 5) je interpretován jako rezistentní k meropenemu i k ciprofloxacinu jak za použití breakpointů (BP) pro meningitidu, tak i při BP pro jiné indikace. Kmen nese dvojici karbapenemáz NDM a OXA-48, což mnoho laboratoří samo detekovalo. V NRL byla rezistence k meropenemu určena dle BP a výsledků testovacích metod. Co bylo příčinou chybné interpretace (C a I) meropenemu u 15 % laboratoří, je nejasné.

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, 111 laboratoří odeslalo výsledek k vyhodnocení. Uspělo 109 laboratoří.

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

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY