



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/5-4/2021 (EHK 1226)

**Bakteriologická diagnostika-
-veterináři**

Praha, prosinec 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	4-5
6.	Závěr	6
	Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/5-4/2021 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-4/2021 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. Pavla Urbášková, CSc.

Zprávu autorizoval:

Mgr. Renáta Šafránková, Ph.D.

Tel.: 267 082 124

Dne: 15. 12. 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/5-4

Identifikace série:	EHK 1226
Název:	Bakteriologická diagnostika
Koordinátor:	Mgr. Renáta Šafránková, Ph.D.
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3
Podstata a účel EHK:	Stanovení citlivosti k antimikrobním preparátům
Kritéria pro účast na EHK:	Dodržení správné laboratorní praxe
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2
Množství připravovaného test. materiálu:	Cca pro 15 laboratoří
Označení vzorkovnic:	EHK-1226/1-2/2021
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:	10
Termín distribuce vzorků:	23. 11. 2021 (veterinární lab.)
Způsob distribuce:	Přepravní službou (zajišťuje Koordinační pracoviště ESPT 2)
Předání výsledků:	elektronicky do 7. 12. 2021
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4
Určení maximální směrodatné odchylky:	Neprovádí
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Výsledky získané v NRL
Termín uveřejnění očekávaných výsledků:	Neuveřejňuje se
Termín zveřejnění závěrečné zprávy:	Do 1. 3. 2022

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 komenzálních 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. *Pseudomonas aeruginosa*
2. *Klebsiella pneumoniae*

4. Způsob hodnocení

Kvalitativní; dosažení bodového limitu (2 body za 1 antibiotikum) za stanovení citlivosti.

5. Vyhodnocení

Celkem byly vzorky rozeslány 10 laboratořím, všechny laboratoře odeslaly výsledek do závěrečného termínu. Za vyšetření citlivosti mohly laboratoře obdržet celkem 8 bodů.

KMEN 1: *Pseudomonas aeruginosa*

Požadavek byl vyšetřit citlivost kmene 1 ke gentamicinu a k amikacinu. Jedna laboratoř neudala výsledek u amikacinu, neboť toto antibiotikum nevyšetřuje, jiná laboratoř sice vyšetřila gentamicin správně (MIC 2 mg/l) ale výsledek neinterpretovala. V tabulce 1 jsou uvedeny breakpointy inhibičních zón a MIC gentamicinu pro *P. aeruginosa*, které uvádí EUCAST [1] a CLSI-VET8 [2]. Tabulka dále obsahuje hodnoty průměrů zón a MIC u kmene 1 naměřené v NRL pro antibiotika, výsledky kategorizace citlivosti zúčastněných laboratoří a NRL pro antibiotika SZÚ Praha.

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 1 *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiotikum	Zdroj	Obsah disku µg	Průměry IZ mm			MIC mg/l			Výsledky kategorizace citlivosti ⁴			
			breakpointy ¹		rozmezí hodnot v NRL ²	breakpointy ¹		rozmezí hodnot v NRL ³	laboratoří (n=10)			NRL/ATB
			C	R		C	R		C	I	R	
gentamicin	EUCAST[1]	10	ND	ND	20 - 21	ND	ND	1 - 2	9	0	0	C ⁷
	CLSI-V [2]		≥ 16	≤ 12		≤ 2	≥ 8					
amikacin	EUCAST[1]	30	≥ 15	< 15	23 - 23	≤ 16	> 16	2 - 2	9	0	0	C ^{6,7}
	CLSI-V [2]		≥ 17 ⁵	≤ 14 ⁵		≤ 4	≥ 16					

¹⁾ rozdíl hodnot mezi breakpointy C a R je kategorie I; ²⁾ 5 měření diskovou difúzní metodou EUCAST; ³⁾ 5 měření diluční mikrometodou EUCAST; ⁴⁾ kategorie C: citlivý při standardním dávkování; I: citlivý při zvýšené expozici antibiotiku [1] / intermediární [2]; R: rezistentní (rozdílná interpretace kategorií citlivosti EUCAST a CLSI-VET je uvedena v závěru); ⁵⁾ CLSI-V uvádí průměry zón amikacinu jen pro humánní izoláty; ND: neudáno; ⁶⁾ interpretace podle EUCAST [1]; ⁷⁾ interpretace podle CLSI-VET [2]; správné výsledky laboratoří jsou barevně zvýrazněny.

KMEN 2: *Klebsiella pneumoniae*

Požadavek byl vyšetřit citlivost kmene 2 k chloramfenikolu a k tetracyklinu. Všech 10 zúčastněných laboratoří vyšetřilo citlivost k chloramfenikolu, jedna laboratoř (stejná jako u kmene 1) sice vyšetřila tetracyklin správně (MIC 2 mg/l) ale výsledek neinterpretovala. V tabulce 2 jsou uvedeny breakpointy inhibičních zón a MIC vyšetřovaných antibiotik pro *Enterobacterales*, které uvádí EUCAST [1] a CLSI-VET8 [2]. Tabulka dále obsahuje hodnoty průměrů zón a MIC u kmene 2 naměřené v NRL pro antibiotika, výsledky kategorizace citlivosti zúčastněných laboratoří a NRL pro antibiotika SZU Praha.

Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 2 *Klebsiella pneumoniae*.

Antibiotikum	Zdroj	Obsah disku µg	Průměry IZ mm			MIC mg/l			Výsledky kategorizace citlivosti ⁴			
			breakpointy ¹		rozmezí hodnot v NRL ²	breakpointy ¹		rozmezí hodnot v NRL ³	laboratoří (n=10)			NRL/ATB
			C	R		C	R		C	I	R	
chloramfenikol	EUCAST[1]	30	≥ 17	< 17	6 - 6	≤ 8	> 8	> 128 - > 128	0	0	10	R ^{6,7}
	CLSI-V [2] ⁵		≥ 18	≤ 12		≤ 8	≥ 32					
tetracyklin	EUCAST[1]	30	ND	ND	22 - 23	ND	ND	2 - 2	9	0	0	C ⁷
	CLSI-V [2] ⁵		≥ 15	≤ 11		≤ 4	≥ 16					

¹⁾ rozdíl hodnot mezi breakpointy C a R je kategorie I; ²⁾ 5 měření diskovou difúzní metodou EUCAST; ³⁾ 5 měření diluční mikrometodou EUCAST; ⁴⁾ kategorie C: citlivý při standardním dávkování; I: citlivý při zvýšené expozici antibiotiku [1] / intermediární [2]; kategorie R: rezistentní (rozdílná interpretace kategorií citlivosti EUCAST a CLSI-VET je uvedena v závěru); ⁵⁾ CLSI-V uvádí u chloramfenikolu i tetracyklinu průměry zón a MIC jen pro humánní izoláty; ND: neudáno; ⁶⁾ interpretace podle EUCAST [1]; ⁷⁾ interpretace podle CLSI-VET [2]; správné výsledky laboratoří jsou barevně zvýrazněny.

6. Závěr

V EHK 1226 dosáhly téměř všechny zúčastněné laboratoře správné výsledky u obou vyšetřovaných kmenů. Jedna laboratoř nevyšetřila amikacin a další laboratoř sice dosáhla správné hodnoty u gentamicinu a tetracyklinu, které však neinterpretovala.

Pro EHK je snahou vybírat izoláty bakterií, které lze podle výsledku vyšetření jednoznačně zařadit do kategorií citlivosti bez ohledu na to, zda se k interpretaci používají kritéria institucí EUCAST nebo CLSI-VET. Omezený počet shodných antibiotik používaných v humánní a veterinární oblasti vede v některých případech k tomu, že interpretační kritéria některé z institucí chybí.

V takovém případě lze pro interpretaci použít metodický pokyn EUCAST [3] podle kterého lze kategorizovat citlivost bakterií, u nichž nejsou k dispozici breakpointy.

Kategorie C, I a R podle EUCAST [1] a CLSI-VET [2] :

V důsledku změn v interpretaci kategorií citlivosti EUCAST rozšířila NRL pro antibiotika od roku 2020 kategorizaci citlivosti kromě EUCAST [1] také podle dokumentu CLSI-VET [2] určeného pro veterinární oblast.

Kromě rozdílných breakpointů pro jednotlivé kategorie citlivosti se oba dokumenty liší v definici kategorií. Podle kategorií EUCAST je kmen citlivý - C při standardním dávkování antibiotika, citlivý při zvýšené expozici antibiotiku - I a rezistentní - R i při zvýšené expozici antibiotiku. Podle kategorií CLSI je kmen k danému antibiotiku citlivý - C nebo rezistentní - R, a do kategorie intermediární - I je zařazen tehdy, pokud je inhibován v oblastech v nichž se antibiotikum koncentruje, nebo pokud existuje nejistota ohledně kategorie citlivosti.

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/tabulky-breakpointu-eucast>
- [2] CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 4th ed. CLSI Supplement VET08. Clinical Laboratory Standard Institute; 2018.
- [3] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial susceptibility tests on groups of organisms or agents for which there are no EUCAST breakpoints. [on-line]. Dostupný z WWW: <http://www.eucast.org/eucastguidancedocuments/> (český překlad <http://www.szu.cz/dalsi-dokumenty-s-pokyny-pri-testovani-citlivosti-eucast>)

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

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY