



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/5-1/2022 (EHK 1252)
Bakteriologická diagnostika

Praha, květen 2022

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	4-9
6.	Závěr	9
	Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/5-1/2022 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-1/2022 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., Mgr. Ondřej Daniel, RNDr. Andrea Mančíková, Ph.D., RNDr. Petr Petráš, CSc., RNDr. Pavla Urbášková, CSc.

Zprávu autorizoval:

Mgr. Renáta Šafránková, Ph.D.

Dne: 9. 5. 2022

Pracoviště 2 ESPT

<http://www.szu.cz/programy-zpusobilosti-pro-mikrobiologicke-laboratore>

ehk@szu.cz

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT#M/5-1/2022

Identifikace série:	EHK 1252
Název:	Bakteriologická diagnostika
Koordinátor:	Mgr. Renáta Šafránková, Ph.D.
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3
Podstata a účel EHK:	Identifikace bakteriálních patogenů a stanovení citlivosti k antimikrobním preparátům
Kritéria pro účast na EHK:	Zajištění laboratorních procesů podle ČSN EN ISO 15189:2013
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2
Množství připravovaného test. materiálu:	Cca pro 135 laboratoří
Označení vzorkovnic:	EHK-1252/1-5/2022
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:	117
Termín distribuce vzorků:	7. 2. 2022 (humánní lab.)
Způsob distribuce:	Přepravní službou (zajišťuje Koordinační pracoviště ESPT 2)
Předání výsledků:	Elektronicky do 28. 2. 2022
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4
Určení maximální směrodatné odchylky:	Neprovádí
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Výsledky získané v NRL
Termín uveřejnění očekávaných výsledků:	8. 3. 2022
Termín zveřejnění závěrečné zprávy:	Do 23. 5. 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 komezálních 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. *Bordetella parapertussis*
2. *Staphylococcus lugdunensis*
3. *Salmonella* Typhimurium
4. *Streptococcus suis*
5. *Citrobacter freundii*

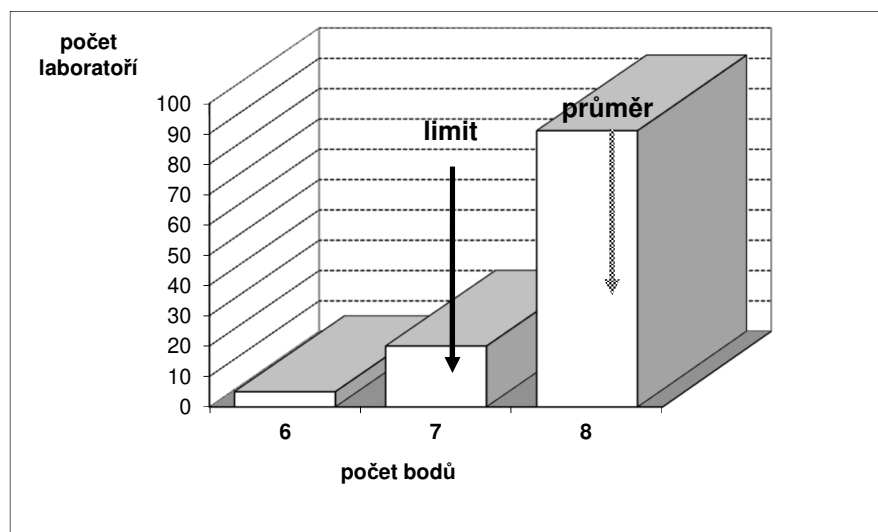
4. Způsob hodnocení

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

Celkem byly vzorky zaslány 117 laboratořím, 116 laboratoří odeslalo výsledek do závěrečného termínu, 1 laboratoř se odhlásila. Za identifikaci signifikantního patogena ve 4 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 8 bodů. 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).

Graf 1: Počet bodů za správnou identifikaci.



Maximálního počtu bodů při identifikaci dosáhlo 91, tj. 78,5% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 6,681 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $7,741 - (2 \times 0,530) = 6,681$). Tohoto limitu dosáhlo 111 laboratoří, 5 laboratoří tento limit nesplnilo.

Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Výtěr z nosohltanu od 3 letého dítěte s dlouhotrvajícím kašlem.

ODPOVĚĎ: ***Bordetella parapertussis***

Vzorek dále obsahoval: *Streptococcus oralis*

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Bordetella parapertussis</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 patogenu u vzorku 1 nečinila obtíže a všechny zúčastněné laboratoře získaly po dvou bodech.

VZOREK 2: Izolát z prsní žlázy od 34 leté pacientky s mastitidou.

ODPOVĚĎ: ***Staphylococcus lugdunensis***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Staphylococcus lugdunensis</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.

Staphylococcus lugdunensis je typickým podmíněným patogenem z koaguláza negativních stafylokoků (KNS), který může být u imunitně oslabených osob, intravenózních narkomanů a dlouhodobě hospitalizovaných pacientů příčinou vážných onemocnění. Podle výsledků NRL pro stafylokoky je jeho výskyt poměrně častý. Z přibližně 2 500 kmenů KNS, které byly do NRL/St v letech 2000 – 2020 k identifikaci zaslány, je na páté pozici s 6 % záchytů (po *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* a dvou poddruhů *S. hominis*). Z 516 kmenů izolovaných z hnisu, byl dokonce na 3. místě po *S. haemolyticus* a *S. epidermidis* [1].

S. lugdunensis byl popsán v r. 1988 francouzskými bakteriology a pojmenován podle původního latinského názvu Lyonu (Lugdunum). Je uváděn i jako příčina infekcí krevního řečiště u nemocí spojených s lékařskou péčí.

Testovaný kmen má pozitivní test na clumping faktor, který je v laboratořích stále často používán ke skrínigové identifikaci kmenů *S. aureus*. Tato latexová reakce může být tedy zavádějící. *S. lugdunensis* lze velice snadno odlišit negativním testem na hyaluronidázu a pozitivní reakcí dekarboxylace ornitinu. Také hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF ho umí velice dobře určit.

Všechny laboratoře oznámily správný výsledek.

Literatura

[1] Petráš P, Měřinská T, Hutníková R. Identifikace koaguláza negativních stafylokoků z klinického materiálu v NRL pro stafylokoky v letech 2000–2020. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2021; 30(2): 61–67

VZOREK 3: Stolica od 15 leté pacientky s průjmem a horečkou.

ODPOVĚĎ: ***Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*
4,12 : i : 1,2**

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Salmonella</i> Typhimurium	93	2	80,2%
<i>Salmonella</i> Typhimurium monofázická	12	1	10,3%
<i>Salmonella</i> sk. B*, <i>Salmonella</i> spp.*	5	1	4,3%
<i>Salmonella</i> O4*	1	1	0,9%
<i>Salmonella</i> Enteritidis	1	0	0,9%
<i>Salmonella</i> sk. B	3	0	2,6%
<i>Salmonella</i> spp.	1	0	0,9%
Celkem	116		100%

Z 20 laboratoří s nejvyšším dosaženým počtem bodů za minulý rok uvedlo správný výsledek 18 laboratoří. Vzorek je možno hodnotit.

*pozn. – tyto laboratoře uvedly v komentáři částečnou antigenní strukturu, příp. zasláno na ověření do NRL

Jako vzorek byl rozeslán kmen *Salmonella* Typhimurium antigenní struktury 4,12 : i : 1,2. Úplnou antigenní strukturu *Salmonella* Typhimurium 4,12 : i : 1,2 dokázalo určit 93 laboratoří (jedna laboratoř uvedla identifikaci do komentáře) z celkového počtu 116, což je více než tři čtvrtiny ze zúčastněných laboratoří – 80,2 %. Alespoň dvě antigenní determinanty určilo správně 12 laboratoří, viz výsledek *Salmonella* Typhimurium monofázická.

Několik laboratoří určilo pouze somatický antigen a vyhodnotily kmen salmonely jako zástupce skupiny B, případně O:4, případně provedly pouze druhovou identifikaci bez bližší specifikace.

Nesprávně (jak somatické, tak bičkové antigeny) určila kmen jedna laboratoř a to jako *S. Enteritidis*.

V následující tabulce je uveden přehled nejčastěji hlášených sérotypů za rok 2021. Z tabulky je patrné, že *Salmonella* Typhimurium je druhým nejčastějším sérotypem na území ČR. Stejně jako v předchozích letech největší podíl připadá na *S. Enteritidis* (88 %) a na třetím místě je *S. Typhimurium* monofázická (1 %).

V souvislosti s epidemiologickým šetřením je nutné sérotypy salmonel od sebe důsledně odlišovat. Biochemickými testy je možné rozlišit kmeny na úrovni druhu *S. enterica* nebo *S. bongori*. Druh *S. enterica* je možné dále biochemicky rozdělit do šesti poddruhů [1].

Literatura

[1] Grimont PAD and Weill FX: Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 9th ed. Institute Pasteur, Paris, 2007. [dostupné též on-line: https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf]

Zastoupení sérotypů hlášených v roce 2021 na území ČR (data k 23. 03. 2022, zdroj ISIN):

		počet	zastoupení z celkového počtu hlášených salmonel
1.	<i>S. Enteritidis</i>	9034	88,36 %
2.	<i>S. Typhimurium</i>	508	4,97 %
3.	<i>S. Typhimurium monofázická</i>	94	0,92 %
4.	<i>S. Infantis</i>	74	0,72 %
5.	<i>S. Coeln</i>	57	0,56 %
6.	<i>S. Newport</i>	19	0,19 %
7.	<i>S. Oranienburg</i>	18	0,18 %
8.	<i>S. Hadar</i>	15	0,15 %
9.	<i>S. Kentucky</i>	13	0,13 %
10.	<i>S. Stanley</i>	13	0,13 %
	celkem tyto sérotypy	9845	96,29 %

VZOREK 4: Izolát z kloubu od pacienta se septickou artritidou.

ODPOVĚĎ: ***Streptococcus suis***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Streptococcus suis</i>	114	2	98,3%
<i>Streptococcus bovis</i>	1	1	0,9%
<i>Streptococcus spp.</i>	1	1	0,9%
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 ke klindamycinu. Izolát je citlivý k oběma antibiotikům při standardním dávkování (C). Ze 116 zúčastněných laboratoří dvě chybovaly v druhovém určení izolátu, jedna z nich identifikovala *S. bovis* a druhá uvedla pouze rodové jméno. Všechny laboratoře správně vyhodnotily citlivost izolátu k oběma požadovaným antibiotikům. Celkové výsledky vyšetření citlivosti izolátu ze vzorku 4 jsou v tabulce 1, která obsahuje breakpointy minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro citlivé a rezistentní izoláty skupiny viridujících streptokoků, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 4 *Streptococcus suis*.

Antibiotikum	Obsah disku	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky laboratoří (n=116)			
		breakpoint ²		rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint ²		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie ³ / absolutní počet ⁴			správné %
		C ≥	R <		C ≤	R >		C	I	R	
penicilin	1 J	18	12	20 - 21	0,25	2	0,03 - 0,03	116	0	0	100,0
klindamycin	2 µg	19	19	16 - 18	0,5	0,5	0,06 - 0,125	116	0	0	100,0

¹ metoda vyšetření a interpretace výsledků podle EUCAST 2022 [1]

² hodnoty mezi breakpointy pro kategorie C a R jsou hodnoty pro kategorii I (citlivý při zvýšené expozici)

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

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace

* 5 měření diskovou difúzní metodou, ** 5 měření diluční mikrometodou

VZOREK 5: *Citrobacter freundii* (izolát z moči)

Izolát z moči č. 5 je při standardním dávkování citlivý (C) ke gentamicinu a při zvýšené expozici je citlivý (I) k meropenemu. Všechny laboratoře správně vyhodnotily citlivost kmene ke gentamicinu avšak pouze dvě pětiny laboratoří správně označily u tohoto kmene citlivost k meropenemu při zvýšené expozici (I). Celkové výsledky vyšetření citlivosti izolátu 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a MIC gentamicinu a meropenemu pro *Enterobacterales*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 5 *Citrobacter freundii*.

Antibiotikum	Obsah disku µg	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	
gentamicin ⁵	10 µg	≥ 17	< 17	17 - 19	≤ 2	> 2	1 - 1	116	0	0	100,0
meropenem	10 µg	≥ 22	< 16	18 - 19	≤ 2	> 8	8 - 8	7	40	69	40,5

¹ metoda vyšetření a interpretace výsledků podle EUCAST 2022 [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 izoláty z moči

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace

* 5 měření diskovou difúzní metodou, ** 5 měření diluční mikrometodou

6. Závěr

Všechny laboratoře vyhodnotily správně citlivost při standardním dávkování (C) u izolátu ze vzorku 4 *Streptococcus suis* k penicilinu a ke klindamycinu a u izolátu ze

vzorku 5 *Citrobacter freundii* z moči ke gentamicinu. U toho izolátu však byly zjištěny neuspokojivé výsledky vyšetření citlivosti k meropenemu: správně vyšetřily toto antibiotikum pouze dvě pětiny laboratoří (40,5 %). Fenotyp citlivosti k meropenemu u tohoto kmene byl vyhodnocen podle diskové metody i vyšetření MIC jako citlivý při zvýšené expozici (I), přestože produkoval karbapenemázu. Výsledek je v souladu s doporučeními EUCAST, podle nichž **"samotná přítomnost nebo absence karbapenemáz nemá vliv na kategorizaci citlivosti"**, doporučuje se však provádět detekci a analýzu vlastností karbapenemáz pro účely veřejného zdravotnictví a kontrolu infekcí" [1,2].

Literatura

- [1] EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, valid from 2022-01-01 [on-line]. Dostupný z WWW: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (český překlad <http://www.szu.cz/klinicke-breakpointy>)
- [2] EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. The EUCAST guideline on detection of resistance mechanisms v 2.0. Dostupný z WWW: https://www.eucast.org/resistance_mechanisms/ (český překlad <http://www.szu.cz/detekce-mechanismu-rezistence-eucast>)

V případě reklamací vyhodnocení série, prosím, postupujte dle reklamačního řádu. Pro zadání reklamace použijte prosím také webovou aplikaci SZÚ: <http://ehk.szu.cz/EHK10/>
Informace o změnách v objednávání opravných sérií a zadávání reklamací naleznete na webových stránkách SZÚ: <http://www.szu.cz/programy-zpusobilosti-pro-mikrobiologicke-laboratore>)

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY