



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/5-1/2024 (EHK 1387)

Bakteriologická diagnostika

Praha, květen 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/5-1/2024 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-1/2024 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., Ing. Monika Havlíčková, Ph.D., RNDr. Vladislav Jakubů, Ph.D.

Zprávu autorizoval:

RNDr. Renáta Šafránková, Ph.D.

Dne: 24. 5. 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/5-1/2024

Identifikace cyklu:	EHK 1387
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:	113
Termín distribuce vzorků:	19. 2. 2024
Informace účastníkům:	viz Informace pro účastníky zaslané spolu se vzorky
Termín pro odeslání výsledků účastníky:	11. 3. 2024
Označení vzorkovnic:	EHK-1387/1-5/2024
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:	18. 3. 2024
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	Do 3. 6. 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 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. *Bacteroides fragilis*
2. *Klebsiella pneumoniae* + *Escherichia coli*
3. *Shigella flexneri*
4. *Enterococcus faecium*
5. *Haemophilus influenzae*

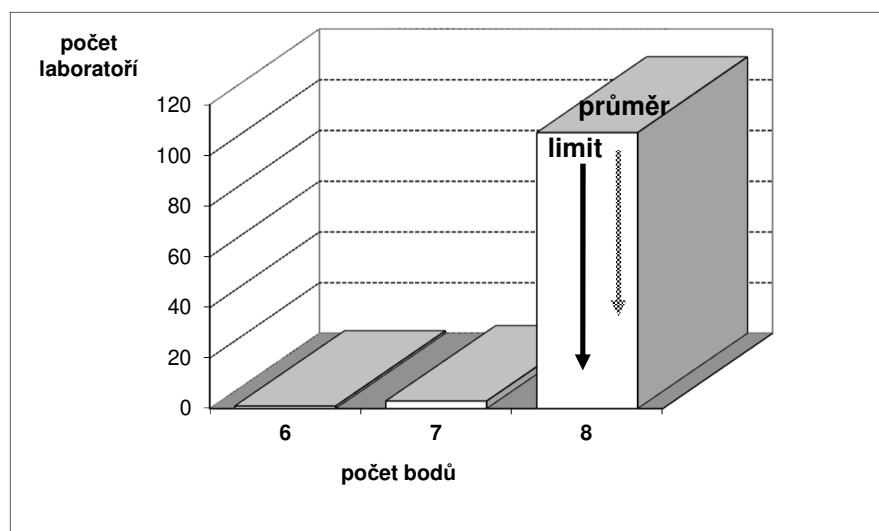
4. Způsob hodnocení

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 8 bodů. 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. 96,5%. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,464 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $7,956 - (2 \times 0,246) = 7,464$). Tohoto limitu dosáhlo 109 laboratoří, 4 laboratoř tento limit nesplnily.

Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Izolát z hnisu z jaterního abscesu.

ODPOVĚď: ***Bacteroides fragilis***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Bacteroides fragilis</i>	113	2	100%
Celkem	113		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: Hemokultura od pacientky s pyelonefritidou.

ODPOVĚĎ: ***Klebsiella pneumoniae + Escherichia coli***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Klebsiella pneumoniae + Escherichia coli</i>	113	2	100%
Celkem	113		100%

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

Vzorek obsahující dva patogeny správně vyšetřilo všech 113 laboratoří.

VZOREK 3: Stoličky od 38letého pacienta s horečkou a krvavým průjmem po návratu z ciziny.

ODPOVĚĎ: ***Shigella flexneri***

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Shigella flexneri</i>	111	2	98,2%
<i>Shigella boydii</i>	2	1	1,8%
Celkem	113		100%

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

Shigelóza je vysoce nakažlivé infekční onemocnění podléhající Vyhláске o systému epidemiologické bdělosti pro vybraná infekční onemocnění 389/2023 Sb. (příloha č. 47). Onemocnění se projevuje úporným průjmem (často s příměsí hlenu a krve), horečkou a tenesmy.

V roce 2023 bylo v ČR hlášeno více než 150 případů shigelózy, nejvíce ve věkových skupinách 5-9 let a 30-34 let [1]. *Shigella flexneri* byla evidována u 20 případů, z nichž polovina byla importovaných [2]. Geograficky se *S. flexneri* nejčastěji vyskytuje v rozvojových zemích, a spolu s *S. sonnei* je zodpovědná za většinu případů shigelózy [3].

Shigella sp. tvoří jeden pathovar s enteroinvazivní *E. coli*, jejich společným virulenčním markerem je invazin IpaH (jehož detekce se využívá v PCR diagnostice). Rozlišování těchto dvou patogenů je však důležité zejména pro účely epidemiologické. Rozlišení na základě biochemických testů, sérologicky či molekulárně je obtížnější. Většina shigel

je laktóza negativní, zatímco u enteroinvazivní *E. coli* je schopnost fermentovat laktózu variabilní [4].

Metodou MALDI TOF MS nelze shigelu rozlišit od *E. coli* z důvodu blízké příbuznosti [5,6]. Základní biochemické vlastnosti shigely a *E. coli* biotypu inactive, které je odlišují od *E. coli*, jsou: lysin*, pohyb, plyn, acetát*, mukát* a laktóza* negativní (*= 25–40 % kmenů *E. coli* inactive může být pozitivních) [5].

98,2 % účastněných laboratoří správně identifikovalo vzorek do druhu *S. flexneri*, dvě laboratoře v druhovém zařazení neuspěly a bude jim odebrán 1 bod. Tři z laboratoří dourčily kmen až do sérotypu *S. flexneri* 2a (antigenní struktura B, II, 3(4)). 19 laboratoří uvedlo odeslání kmene do NRL.

Literatura

- [1] NRC pro analýzu epidemiologických dat. Oddělení biostatistiky SZÚ. Hlášení infekčních nemocí v České republice. Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2024; 33(1): 3.
- [2] Informační systém infekční nemoci (ISIN).
- [3] Anderson M, Sansonetti PJ and Marteyn BS. *Shigella* Diversity and Changing Landscape: Insights for the Twenty-First Century. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2016, 6: 45.
- [4] Løbersli I, Wester AL, Kristiansen A et al. Molecular differentiation of *Shigella* spp. from enteroinvasive *E. coli*. *European Journal of Microbiology and Immunology* 6 (2016) 3: 197–205.
- [5] 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.
- [6] Sedláček I. *Escherichia* a *Shigella* – pro klinickou bakteriologii dva dlouho známé rody, přesto taxonomicky stále problematické. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 2011; 20(3): 100-103.

VZOREK 4: Izolát z hemokultury u pacienta s chlopenní náhradou.

ODPOVĚď: ***Enterococcus faecium***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Enterococcus faecium</i>	111	2	98,2%
<i>Enterococcus gallinarum</i>	1	1	0,9%
žádný výsledek	1	0	0,9%
Celkem	113		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 vankomycinu a linezolidu. Izolát *Enterococcus faecium* je při standardním dávkování citlivý (C) k vankomycinu i k linezolidu.

111 zúčastněných laboratoří identifikovalo správně vzorek do druhu, tj. 98,2 %.

U vankomycinu určily správnou interpretaci všechny laboratoře, linezolid byl určen správně pouze v 75 % případů.

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

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 4 *Enterococcus faecium*.

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 >					
vankomycin	5 µg	12	12	16 - 17	4	4	0,5 – 0,5	113	0	0	100
linezolid	10 µg	20	20	21 - 22	4	4	2 - 2	85	0	28	75,2

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: *Haemophilus influenzae*

Požadavek byl vyšetřit citlivost k ampicilinu (AMP), amoxicilin-klavulanátu (AMC) – intravenózní podání.

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

Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 5 *Haemophilus influenzae*.

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 >					
ampicilin	2 µg	18	18	19 - 22	1	1	0,25 – 0,25	113	0	0	100
amoxicilin- klavulanát	2/1 µg	15	15	16 - 17	2	2	0,5 – 1	112	1	0	99,1

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 *Haemophilus influenzae* je citlivý k ampicilinu i amoxicilin-klavulanátu (iv). Laboratoře velmi dobře interpretovaly citlivosti obou antibiotik, pouze jedna laboratoř interpretovala výsledek amoxicilin-klavulanátu jako citlivý při zvýšené expozici (I) – tato kategorizace je však přípustná pouze při perorální aplikaci, při intravenózním podání není k dispozici.

Diskuse

Interpretace citlivostí kmene *Haemophilus influenzae* nečinila problémy. Kmen neprodukuje beta-laktamázu a dle antibiotického profilu ani neobsahuje mutace v genu pro PBP3.

U izolátu *Enterococcus faecium* bylo překvapivé relativně velké množství chybných interpretací u linezolidu (28 %). Naopak interpretace vankomycinu byla ve 100 % správná. Pro vankomycin EUCAST uvádí, že nesmí být prohlášen za citlivý dříve, než za 24 h inkubace při diskové difuzní metodě a že okraje inhibičních zón jsou u citlivých kmenů ostré.

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 113 laboratořím, 113 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