



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/5-4/2022 (EHK 1299)

Bakteriologická diagnostika

Praha, prosinec 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	4-8
6.	Závěr	8
	Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/5-4/2022 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-4/2022 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:

RNDr. Renáta Šafránková, Ph.D., RNDr. Vladislav Jakubů, Ph.D., RNDr. Pavla Urbášková, CSc.

Zprávu autorizoval:

RNDr. Renáta Šafránková, Ph.D.

Dne: 13. 12. 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/5-4

Identifikace série:	EHK 1299
Název:	Bakteriologická diagnostika
Koordinátor:	RNDr. 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:	Dodržení správné laboratorní praxe
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2
Množství připravovaného test. materiálu:	Cca pro 135 laboratoří
Označení vzorkovnic:	EHK-1299/1-5/2022
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:	31. 10. 2022
Způsob distribuce:	Přepravní službou (zajišťuje Koordinační pracoviště ESPT 2)
Předání výsledků:	Elektronicky do 21. 11. 2022
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4
Určení maximální směrodatné odchylky:	Neprovádí
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Výsledky získané v NRL
Termín uveřejnění očekávaných výsledků:	1. 12. 2022
Termín zveřejnění závěrečné zprávy:	Do 13. 2. 2023

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 zmrazení 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. *Vibrio vulnificus*
2. *Kingella kingae*
3. Signifikantní bakteriální patogen nepřítomen
4. *Pasteurella multocida*
5. *Klebsiella pneumoniae*

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 rozeslány 117 laboratořím, 117 laboratoří odeslalo výsledek do závěrečného termínu. 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).

Maximálního počtu bodů při identifikaci dosáhlo všech 117 laboratoří, tj. 100%.

Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Stěr z PDK od 55letého pacienta se sepsí s anamnézou koupání v mořské vodě.

ODPOVĚĎ: ***Vibrio vulnificus***

Vzorek dále obsahoval: *Staphylococcus epidermidis*

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Vibrio vulnificus</i>	117	2	100%
Celkem	117		100%

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

Druhová identifikace neobvyklého původce závažných infekcí nečinila obtíže a všechny laboratoře získaly po dvou bodech.

Podrobnější popis *V. vulnificus* byl publikován ve Zprávách CEM 11-12/2017 [1].

Literatura

[1] Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2017; 26(11-12):413-416

VZOREK 2: Izolát z krve od pacienta s podezřením na endokarditidu.

ODPOVĚĎ: ***Kingella kingae***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Kingella kingae</i>	117	2	100%
Celkem	117		100%

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

Všechny zúčastněné laboratoře identifikovaly signifikantního patogena správně a získaly po 2 bodech.

Kingella kingae patří do skupiny HACEK. Další agens, která řadíme do této skupiny, jsou *Aggregatibacter aphrophilus* (dříve *Haemophilus aphrophilus* a *H. paraphrophilus*), *Haemophilus parainfluenzae*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (dříve *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Eikenella corrodens* a *Cardiobacterium hominis* [1].

Kingella kingae byla identifikována jako významný původce invazivních infekcí zejména u malých dětí, tj. septické artritidy, osteomyelitidy, spondylodiscitidy, bakteriémie a

endokarditidy, méně často infekcí dolních cest dýchacích a meningitidy. *K. kingae* je součástí faryngeální mikrobioty malých dětí, mezi nimiž se šíří [2].

Kromě *K. kingae*, popsané již v 60. letech minulého století, patří do rodu *Kingella* ještě další 4 druhy: *K. denitrificans* – vzácný původce endokarditidy vyskytující se u pacientů s protetikými chlopněmi [3], *K. oralis* – nalézána při periodontitidě [4], *K. potus* – druh izolovaný z rány způsobené kousnutím malé stromové šelmy kynkažu (angl. kinkajou) [5] a *K. negevensis* – izolována z orofaryngu zdravých dětí v Izraeli a Švýcarsku [6].

Literatura

- [1] Nørskov-Lauritsen N and Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. Int J Syst Evol Microbiol 2006; 56: 2135-2146
- [2] Yagupsky P. *Kingella kingae*: from medical rarity to an emerging paediatric pathogen. Lancet Infect Dis 2004; 4:358-367
- [3] Khan JA, Sharp S, Mann KR, Brewer J. *Kingella denitrificans* prosthetic endocarditis. Am J Med Sci. 1986 Mar; 291(3):187-9
- [4] Chen C. Distribution of a newly described species, *Kingella oralis*, in the human oral cavity. Oral Microbiol Immunol. 1996 Dec; 11(6):425-7
- [5] Lawson PA, Malnick H, Collins MD, Shah JJ, Chattaway MA, Bendall R, Hartley JW. Description of *Kingella potus* sp. nov., an organism isolated from a wound caused by an animal bite. J Clin Microbiol. 2005 Jul; 43(7):3526-9
- [6] El Houmami N, Bakour S, Bzdrenga J, Rathored J, Seligmann H, Robert C, Armstrong N, Schrenzel J, Raoult D, Yagupsky P, Fournier PE. Isolation and characterization of *Kingella negevensis* sp. nov., a novel *Kingella* species detected in a healthy paediatric population. Int J Syst Evol Microbiol. 2017 Jul;67(7):2370-2376

VZOREK 3: Stolica od 45leté pacientky s dyspepsií, nauzeou a řídkou stolicí.

ODPOVĚĎ: **Signifikantní bakteriální patogen nepřítomen**

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

identifikace	frekvence	body	procento
Signifikantní bakteriální patogen nepřítomen	117	2	100%
Celkem	117		100%

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

Ve vzorku byla, spolu s *E. faecalis* a *K. oxytoca*, obsažena i *E. coli*, nejednalo se však o enteropatogenní kmen. Všechny 117 laboratoří odpovědělo správně a získalo po 2 bodech.

VZOREK 4: Izolát z mozkomíšního moku.

ODPOVĚĎ: ***Pasteurella multocida***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Pasteurella multocida</i>	117	2	100%
Celkem	117		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 k ciprofloxacinu. Izolát *Pasteurella multocida* je při standardním dávkování citlivý (C) k oběma požadovaným antibiotikům. Dvě laboratoře chybovaly u fluorochinolonů, všechny ostatní laboratoře uvedly citlivost u obou antibiotik ve správné kategorii. Celkové výsledky vyšetření citlivosti izolátu 4 jsou v tabulce 1, která obsahuje breakpointy průměrů inhibičních zón a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) penicilinu, ciprofloxacinu a nalidixové kyseliny u *Pasteurella multocida*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 4 *Pasteurella multocida*.

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			správné %
		C ≥	R <		C ≤	R >		C	I	R	
penicilin	1 J	17	17	20 -21	0,5	0,5	0,125 -0,125	117	0	0	100,0
ciprofloxacín	5 µg	27	27	23 - 25	0,06	0,06	0,016 - 0,016	115	0	2	98,3
nalidixová kyselina	30 µg	23***	ND	24 - 25	ND	ND	NT				

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

² kategorie C: citlivý při standardním dávkování; I (hodnoty mezi C a R): citlivý při zvýšené expozici; R: rezistentní i při zvýšené expozici;

³ správné výsledky podle kategorie jsou zvýrazněny;

* 5 měření diskovou difuzní metodou; ** 5 měření diluční mikrometodou; *** screening;

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; ND: neudáno; NT: nevyšetřeno.

VZOREK 5: ***Klebsiella pneumoniae***

Izolát 5 z moči je citlivý (C) při standardním dávkování k cefotaximu i ke gentamicinu. Všechny laboratoře správně vyhodnotily citlivost izolátu k cefotaximu, u gentamicinu chybovala jedna laboratoř. Celkové výsledky vyšetření citlivosti izolátu 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a MIC u *Enterobacterales* pro

cefotaxim (izoláty z jiných vzorků než je meningitida) a pro gentamicin (izoláty z moči), hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 5 z moči *Klebsiella pneumoniae*.

Antibiotikum	Obsah disku	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	
cefotaxim	5 µg	20	17	27 - 27	1	2	0,06 - 0,06	117	0	0	100,0
gentamicin	10 µg	17	17	19 - 19	2	2	0,5 - 0,5	116	1	0	99,2

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 měření diskovou difúzní metodou, ** 5 měření diluční mikrometodou

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace

6. Závěr

Pro vyšetření citlivosti k fluorochinolonům u *Pasteurella multocida* doporučuje EUCAST screening s diskem nalidixové kyseliny [1], neboť výsledek s diskem ciprofloxacinu může být nespolehlivý. Tento předpoklad potvrzují hodnoty inhibičních zón kolem disku s 5 mg ciprofloxacinu naměřené v NRL pro antibiotika, které jsou nižší než je limit pro citlivé kmeny, zatímco hodnoty MIC ciprofloxacinu a screeningu s nalidixovou kyselinou potvrzují citlivost k fluorochinolonům. Jediná laboratoř chybně hodnotila izolat *Klebsiella pneumoniae* z moči jako citlivý až při zvýšené expozici gentamicinu (I).

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>)

V případě reklamaci vyhodnocení série postupujte, prosím, dle reklamačního řádu. Pro zadání reklamacie použijte 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