



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 1224)

Bakteriologická diagnostika

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	4-9
6.	Závěr	9
	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., MVDr. Zuzana Ileninová, Ph.D., RNDr. Pavla Urbášková, CSc.

Zprávu autorizoval:

Mgr. Renáta Šafránková, Ph.D.

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 1224
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-1224/1-5/2021
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:	119
Termín distribuce vzorků:	1. 11. 2021 (humánní lab.)
Způsob distribuce:	Přepravní službou (zajišťuje Koordinační pracoviště ESPT 2)
Předání výsledků:	Elektronicky do 22. 11. 2021
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4
Určení maximální směrodatné odchylky:	Neprovádí
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Výsledky získané v NRL
Termín uveřejnění očekávaných výsledků:	2. 12. 2021
Termín zveřejnění závěrečné zprávy:	Do 14. 2. 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. Signifikantní bakteriální patogen nepřítomen
2. *Morganella morganii*
3. *Plesiomonas shigelloides*
4. *Pseudomonas aeruginosa*
5. *Klebsiella pneumoniae*

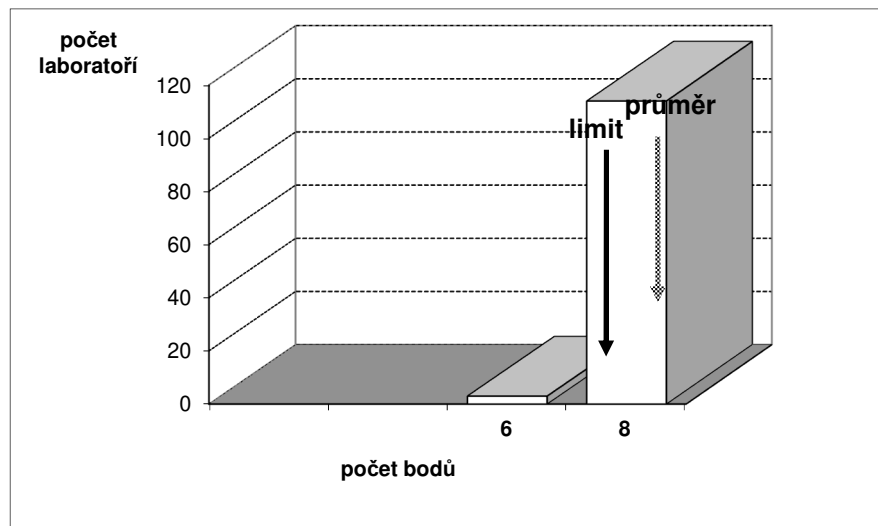
4. Způsob hodnocení

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 119 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).

Graf 1: **Počet bodů za správnou identifikaci.**



Maximálního počtu bodů při identifikaci dosáhlo 114, tj. 97,4% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,313 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $7,949 - (2 \times 0,318) = 7,313$). Tohoto limitu dosáhlo 114 laboratoří, 3 laboratoře tento limit nesplnily.

Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Výtěr z krku od 11-letého dítěte s bolestmi v krku.

ODPOVĚĎ: **Signifikantní bakteriální patogen nepřítomen**

Vzorek dále obsahoval: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Neisseria lactamica*

identifikace	frekvence	body	procento
Signifikantní (bakteriální) patogen nepřítomen	114	2	97,4%
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	3	0	2,6%
Celkem	117		100%

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

Správný výsledek, tj. signifikantní patogen nepřítomen, uvedlo celkem 114 laboratoří (97,4 %).

Rutiní mikrobiologické vyšetření výtěru z krku slouží k detekci *Streptococcus pyogenes*, jako nejčastějšího původce vyvolávajícího bakteriální tonzilofaryngitidu. Méně často se uplatňují streptokoky skupiny C a G, další vzácnou příčinou

tonzilofaryngitidy může být *Arcanobacterium haemolyticum*, *Corynebacterium diphtheriae* a *Neisseria gonorrhoeae*.

Bez bodového hodnocení zůstaly tři laboratoře, které jako signifikantního patogena určily *Arcanobacterium haemolyticum*, které ve vzorku nebylo přítomno.

Běžnou součástí orální mikroflóry jsou i tzv. patogenní bakterie, např. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, které jsou příčinou závažných onemocnění, avšak v této lokalizaci jsou nalézány pouze jako komenzální bakterie a nemají kauzální vztah k základnímu onemocnění (tonzilofaryngitida), pro které je výtěr z krku prováděn.

VZOREK 2: Izolát z moče (signifikantní bakteriurie).

ODPOVĚĎ: ***Morganella morganii***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Morganella morganii</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.

Identifikace signifikantního patogena u vzorku 2 nečinila obtíže a všechny zúčastněné laboratoře získaly po dvou bodech.

VZOREK 3: Stolica od 40 letého pacienta s dyspepsií a vodnatým průjmem.

ODPOVĚĎ: ***Plesiomonas shigelloides***

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Plesiomonas shigelloides</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.

Plesiomonas shigelloides je oxidáza-pozitivní tyčka patřící do řádu *Enterobacterales* a představuje jediný druh rodu *Plesiomonas*. U lidí je původcem gastroenteritid, vzácněji i mimostřevních infekcí (septikémie, meningitidy, infekce ran), a to zejména u imunitně oslabených osob [1,2]. *P. shigelloides* se přirozeně vyskytuje ve sladké a brakické vodě s nižší salinitou, proto infekce lidí se nejčastěji vyskytují po ingesci kontaminované vody [2]. Dalším rizikovým faktorem je konzumace syrových nebo nedostatečně tepelně upravených ryb a mořských plodů, a to zejména syrových ústřic [1, 2]. Mezi další rizikové faktory patří cestování do tropických a subtropických krajín, protože *P. shigelloides* se lépe množí v teplých vodách [2].

Na nutrient agaru tvoří *P. shigelloides* kolonie se "shigelovým pachem", je pozitivní na dekarboxylázy, inozitol a oxidázu, jinými biochemickými znaky připomíná *Shigella dysenteriae* 2. Je dobře identifikovatelný jak pomocí komerčních a konvenčních biochemických testů, tak i použitím MALDI-TOF MS.

Všechny účastněné laboratoře správně určily *P. shigelloides* jako signifikantního patogena.

Literatura

[1] Forsyth SJ, Pitout J, Charnot-Katsikas C, Alby K., Frank KM: *Klebsiella* and Selected *Enterobacterales*, In: Manual of Clinical Microbiology, KC Carroll and MA Pfaller, Editors. Washington: ASM Press; 2019. ISBN: 978-1-555-81983-5.

[2] Lawley R, Curtis L, Davis J: The Food Safety Hazard Guidebook, 2nd Edition, 2012.

VZOREK 4: Izolát z krve od pacienta s akutní intersticiální nefritidou.

ODPOVĚĎ: ***Pseudomonas aeruginosa***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Pseudomonas aeruginosa</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 piperacilinu/tazobaktamu a k ciprofloxacinu. Izolát je citlivý k oběma antibiotikům při zvýšené expozici (I). Všechny 117 zúčastněných laboratoří identifikovalo správně druh patogena, 111 z nich dosáhlo správný výsledek vyšetření citlivosti u piperacilinu/tazobaktamu a 112 u ciprofloxacinu. Izolát 4 označilo chybně jako rezistentní k piperacilinu/tazobaktamu nebo k ciprofloxacinu 6, respektive 5 laboratoří. Celkové výsledky vyšetření citlivosti izolátu ze vzorku 4 jsou v tabulce 1, která obsahuje breakpointy minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro citlivé a rezistentní izoláty *P. aeruginosa*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 4 *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiotikum	Obsah disku μg	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky laboratoří (n=117)			
		breakpoint ²		rozsah hodnot naměřených v NRL*	breakpoint ²		rozsah hodnot naměřených v NRL**	kategorie ³ / absolutní počet ⁴			správné %
		C ≥	R <		C ≤	R >		C	I	R	
piperacilin/ tazobaktam	30/6	50	18	27 - 27	0,001	16	4 - 4	0	111	6	94,5
ciprofloxacín	5	50	26	38 - 38	0,001	0,5	0,125 - 0,125	0	112	5	95,7

¹ metoda vyšetření a interpretace výsledků podle EUCAST 2021 [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: *Klebsiella pneumoniae*

Izolát č. 5 od pacienta s jinou dg. než meningitida je citlivý při standardním dávkování (C) k cefotaximu a ke kolistinu je rezistentní (R). Výsledky vyšetření k cefotaximu poskytlo všech 117 laboratoří a chybovala jen jedna laboratoř, která izolát označila jako rezistentní. Kolistin vyšetřilo 116 ze 117 laboratoří, správný výsledek udalo jen 65 laboratoří. Padesát laboratoří označilo kmen ke kolistinu chybně jako citlivý a jedna jako citlivý při zvýšené expozici. Celkové výsledky vyšetření citlivosti izolátu 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) cefotaximu a MIC cefotaximu a kolistinu pro *Enterobacterales*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

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

Antibiotikum	Obsah disku μg	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky laboratoří			
		breakpoint ²		rozsah hodnot naměřených v NRL*	breakpoint ²		rozsah hodnot naměřených v NRL**	kategorie ³ / absolutní počet laboratoří ⁴			správné %
		C	R		C	R		C	I	R	
cefotaxim ⁵	5 μg	≥ 20	< 17	24 - 25	≤ 1	> 2	0,125 - 0,125	116	0	1	99,2
kolistin	ND	nevyšetřuje se			≤ 2	2	> 8 - > 8	50	1	65	56,0

¹ metoda vyšetření a interpretace výsledků podle EUCAST 2020 [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 infekce jiné než meningitida

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace

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

6. Závěr

Zhruba 5 % laboratoří chybovalo při vyšetření citlivosti kmene 4 *Pseudomonas aeruginosa* k piperacilinu/tazobaktamu resp. k ciprofloxacinu, a pouze jedna laboratoř chybovala při vyšetření citlivosti k cefotaximu u kmene 5 *Klebsiella pneumoniae*. U tohoto kmene však byly zjištěny neuspokojivé výsledky vyšetření citlivosti ke kolistinu: správně vyšetřila toto antibiotikum o něco více než polovina laboratoří. Příčinou mohlo být použití disku nebo gradientního testu s kolistinem; obě tyto metody jsou pro vyšetření citlivosti ke kolistinu nespolehlivé [2,3].

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/klinicke-breakpointy>
- [2] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working. Dostupné z WWW: [https://www.eucast.org/eucastguidancedocuments/Recommendations_for_colistin_\(polymyxin_E\)_MIC_testing](https://www.eucast.org/eucastguidancedocuments/Recommendations_for_colistin_(polymyxin_E)_MIC_testing), český překlad [Stanovení MIC kolistinu \(polymyxinu E\)](#)
- [3] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST warnings concerning antimicrobial susceptibility testing products or procedures (May 2020). Dostupné z WWW: https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/warnings/#c13111
[Problems with colistin susceptibility testing and several commercially available products](#)

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

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY