



Státní zdravotní ústav  
Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti  
Poskytovatel programů zkoušení způsobilosti akreditovaný ČIA  
podle ČSN EN ISO/IEC 17043, reg. č. 7001  
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10 – Vínohrady



## Zkoušení způsobilosti v lékařské mikrobiologii (Externí hodnocení kvality)

### **PT#M/5-4/2018 (č. 1045)** **Bakteriologická diagnostika**

**Praha, leden 2019**

## Obsah

|   |     |
|---|-----|
| 1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing) | 3   |
| 2. Příprava vzorku  | 4   |
| 3. Hodnocení  | 4   |
| 4. Výsledky zúčastněných laboratoří                                   | 5-8 |
| 5. Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře                |     |

Program zkoušení způsobilosti PT#M/5-4/2018 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-4/2018 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 programů 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 rozesílána poštou

### **Koordinátor:**

Mgr. Renáta Šafránková  
Tel: 267 082 428

### **Zprávu vypracovali:**

Mgr. Renáta Šafránková, Ing. Monika Marejková PhD, RNDr. Petr Petráš CSc, RNDr. Pavla Urbášková CSc

**Zprávu schválil:** Mgr. Renáta Šafránková

**Dne:** 22. 1. 2019

### **Pracoviště 2 ESPT (AP CEM - Akreditační pracoviště Centra epidemiologie a mikrobiologie):**

www.szu.cz/espt  
email: [apcem@szu.cz](mailto:apcem@szu.cz)

**1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT**

|  |  |
|--|--|
| Identifikace kola/cyklu:                 | PT#M/5-4/2018-EHK-1045/30. 10. 2018  |
| Název:                                   | EHK-Bakteriologická diagnostika  |
| Poskytovatel:                            | SZÚ – Centrum epidemiologie a mikrobiologie – AP CEM<br>Šrobárova 48, Praha 10, 100 42<br>tel.: + 420 267082250, fax.: + 420 267082427   |
| Vedoucí ESPT                             | Ing. Věra Vrbíková   |
| Koordinátor:                             | Mgr. Renáta Šafránková   |
| Subdodavatel:                            | není   |
| Charakteristika materiálu:               | Simulovaný klinický vzorek<br>1. Streptococcus pyogenes<br>2. Staphylococcus lugdunensis<br>3. Signifikanční bakteriální patogen nepřítomen (ST)<br>4. Haemophilus influenzae (humánní lab.)<br>Klebsiella pneumoniae (veterinární lab.)<br>5. Staphylococcus aureus |
| Podstata a účel EHK:                     | identifikace bakteriálních patogenů a stanovení citlivosti k antimikrobním preparátům  |
| Kritéria pro účast na EHK:               | Účast není omezena   |
| Způsob přípravy:                         | viz Protokol o přípravě vzorků   |
| Množství připravovaného test. materiálu: | cca pro 135 laboratoří   |
| Očekávaný počet:                         | 121 laboratoří   |
| Označení vzorkovnic:                     | EHK-1045/1-5/2018  |
| Zabezpečení kvality vzorku:              | U 5 náhodně vybraných lyofilizátů každého vzorku je prováděna<br>1. Kontrola viability vzorku<br>2. Kontrola přítomnosti nežádoucí kontaminace<br>Stabilita: zabezpečena vlastní lyofilizací   |
| Metrologická návaznost:                  | viz Protokol o přípravě vzorků   |
| Termín testu stability:                  | Nejméně 14 dní před distribucí vzorků  |
| Termín distribuce vzorků:                | 30. 10. 2018 (humánní lab.); 13. 11. 2018 (veterinární lab. – vzorek 4, 5)   |
| Podmínky distribuce a uchování vzorků:   | krátkodobé uchování při 4 – 8°C<br>přeprava při pokojové teplotě v trojitém obalu přepravním se službou přeprava nebezpečného zboží dle regulí ADR pro silniční přepravu   |
| Možné zdroje chyb:                       | Nedodržení správné laboratorní praxe   |
| Počet účastníků:                         | 121  |
| Způsob distribuce:                       | přepravním se službou přeprava nebezpečného zboží<br>Přílohy: formulář pro zápis výsledků a pokyny účastníkům  |
| Předání výsledků:                        | písemně do 20. 11. 2018 (hum.lab.) a do 27. 11. 2018 (vet.lab.) na předepsaných formulářích  |
| Způsob vyhodnocení výsledků:             | - kvalitativní<br>(dosažení bodového limitu za identifikaci signifikantních patogenů pro danou sérii se vypočítává dle vzorce (Limit = aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky))  |
| Určení maximální směrodatné odchylky:    | Neprovádí  |
| Určení přijaté vztahné hodnoty:          | Výsledky NRL   |
| Termín zveřejnění závěrečné zprávy:      | Do 12 týdnů od předání výsledků k hodnocení  |

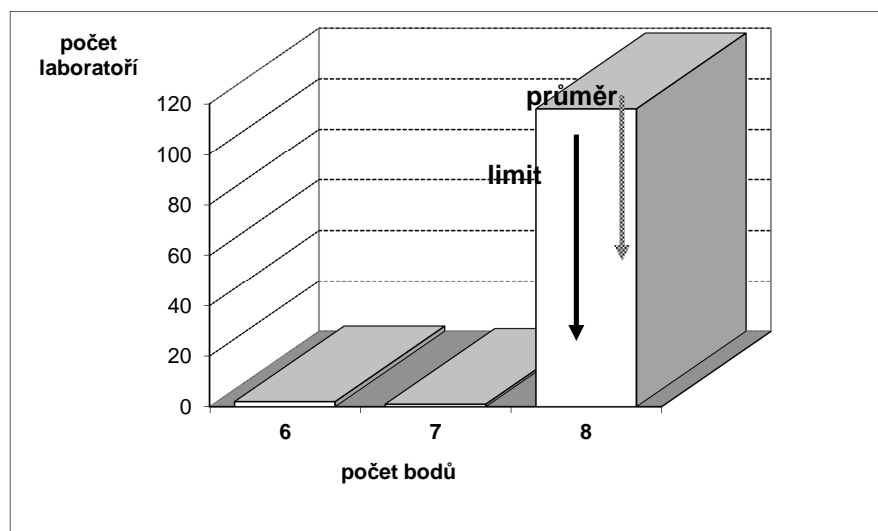
## 2. Příprava vzorku

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 agarů 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. Hodnocení

Celkem byly vzorky rozeslány 121 laboratořím, všechny laboratoře odeslaly výsledek do závěrečného termínu. Za identifikaci signifikantního patogenu ve 4 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 8 bodů; za vyšetření citlivosti mohly laboratoře obdržet celkem 4 body. Hodnocení vyšetření citlivosti je pouze orientační a toto bodové ohodnocení se nezapočítává do limitu nutného pro úspěšné absolvování série EHK. Bodování pro identifikaci bylo provedeno ve stupnici 2, 1, 0 a –1 bodů.

Graf 1: Počet bodů za správnou identifikaci.



Maximálního počtu bodů při identifikaci dosáhlo 118, tj. 97, 5% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,417 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné

odchylky, tj.  $7,959 - (2 \times 0,271) = 7,417$ ). Tohoto limitu dosáhlo 118 laboratoří, 3 laboratoře tento limit nesplnily.

#### 4. Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Výtěr z krku od 10 letého dítěte s bolestí v krku a horečkou.

ODPOVĚĎ: ***Streptococcus pyogenes***

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

| identifikace                  | frekvence | body | procento |
|-------------------------------|-----------|------|----------|
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | 121       | 2    | 100%     |
| Celkem                        | 121       |      | 100%     |

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

Izolace a identifikace signifikantního patogena nečinila laboratořím obtíže. Všechny laboratoře správně identifikovaly jako původce onemocnění *Streptococcus pyogenes* a získaly po 2 bodech.

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

ODPOVĚĎ: ***Staphylococcus lugdunensis***

| identifikace                      | frekvence | body | procento |
|-----------------------------------|-----------|------|----------|
| <i>Staphylococcus lugdunensis</i> | 121       | 2    | 100%     |
| Celkem                            | 121       |      | 100%     |

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

*S. lugdunensis* (lat. Lugdunum = dnešní Lyon) byl popsán v r. 1988. Náleží k novobiocin citlivým, koaguláza negativním stafylokokům, nicméně může mít (asi ze 60 %) pozitivní test na clumping-faktor. Z tohoto důvodu může být zaměněn za druh *S. aureus*. Další diskriminující fenotypové testy (volná koaguláza, hyaluronidáza, termonukleáza) jsou negativní. Dobře jde identifikovat metodou MALDI-TOF MS.

Je podmíněným patogenem, který u imunitně oslabených osob, intravenózních narkomanů a dlouhodobě hospitalizovaných pacientů může být příčinou vážných onemocnění. Především závažné jsou infekce krevního řečiště. Podle výsledků NRL/ST patří *S. lugdunensis* mezi 10 nejčastějších koaguláza negativních druhů, které jsou z humánního klinického materiálu k identifikaci zasílány.

Jednoduchou reakcí, která tento druh snadno potvrdí, je pozitivní reakce na ornitin-dekarboxylázu. Tento enzym produkují kmeny *S. lugdunensis* (s výjimkou asi 10 % kmenů *S. epidermidis*) jako jediný druh stafylokoka. Všechny 121 laboratoří odpovědělo správně.

VZOREK 3: Stolicí od pacienta s nauzeou, dyspepsií a řídkou stolicí.

ODPOVĚĎ: **Signifikanční bakteriální patogen nepřítomen**

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

| identifikace   | frekvence | body | procento |
|--|-----------|------|----------|
| Signifikanční patogen nepřítomen                           | 119       | 2    | 98,4%    |
| <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> | 1         | 0    | 0,8%     |
| <i>Escherichia coli</i> O111                               | 1         | 0    | 0,8%     |
| Celkem   | 121       |      | 100%     |

Z 20 laboratoří s nejvyšším dosaženým počtem bodů za minulý rok uvedlo správný výsledek 19 laboratoří. Vzorek je možno hodnotit.

Vzorek kromě komensálních bakterií *E. faecalis* a *E. cloacae* obsahoval kmen *E. coli* také patřící k běžné střevní flóře, u kterého byly vyloučeny jak faktory virulence enteropatogenní (EPEC) a Shiga toxin- produkující *E. coli* (STEC), tak i nejčastější séroskupiny, které se na tyto patotypy vážou, včetně O111.

Správně odpovědělo 119 laboratoří, 2 laboratoře zadání nesplnily a byly jim odebrány 2 body.

VZOREK 4: Aspirát z paranazální dutiny od pacienta s akutní sinusitidou.

ODPOVĚĎ: ***Haemophilus influenzae***

| identifikace                        | frekvence | body | procento |
|-------------------------------------|-----------|------|----------|
| <i>Haemophilus influenzae</i>       | 118       | 2    | 97,5%    |
| <i>Haemophilus influenzae</i> non b | 2         | 2    | 1,7%     |
| <i>Haemophilus influenzae</i>       | 1         | 1    | 0,8%     |

|        |     |  |      |
|--------|-----|--|------|
| Celkem | 121 |  | 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 ampicilinu a ke kotrimoxazolu. Kmen 4 byl k oběma antibiotikům citlivý. Správnou identifikaci uvedlo 120 laboratoří, jedna laboratoř chybovala v rodovém i druhovém jméně, všechny laboratoře správně vyhodnotily citlivost k oběma požadovaným antibiotikům.

Celkové výsledky vyšetření citlivosti kmene ze vzorku 4 jsou v tabulce 1, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro citlivé izoláty hemofilů, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

**Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 4 *Haemophilus influenzae***

| Antibiotikum    | Zdroj      | Obsah disku<br>μg | Průměry IZ (mm)                    |   | MIC (mg/l)                         |  | Správné výsledky |                     |       |
|-----------------|------------|-------------------|------------------------------------|---|------------------------------------|--|------------------|---------------------|-------|
|                 |            |                   | breakpoint<br>pro citlivé<br>kmeny | rozmezí<br>hodnot<br>naměřených<br>v NRL* | breakpoint<br>pro citlivé<br>kmeny | rozmezí<br>hodnot<br>naměřených<br>v NRL** | kate-<br>gorie   | počet<br>laboratoří | %     |
| penicilin       | EUCAST [1] | 1J                | ≥ 12                               | 6 - 6                                     | ND                                 | NT   | R                | 121/121             | 100,0 |
| ampicilin       | EUCAST [1] | 2 μg              | ≥ 16                               | 6 - 6                                     | ≤ 1                                | > 8 - > 8                                  |                  |                     |       |
|                 | CLSI [2]   | 10 μg             | ≥ 22                               | 11 - 12                                   |                                    |  |                  |                     |       |
| kotrimoxazol*** | EUCAST [1] | 25 μg             | ≥ 23                               | 37 - 39                                   | ≤ 0,5                              | ≤ 0,06 -<br>≤ 0,06                         | C                | 121/121             | 100,0 |
|                 | CLSI [2]   |                   | ≥ 16                               |   |                                    |  |                  |                     |       |

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; \* 5 měření diskovou difúzní metodou EUCAST, \*\* 5 měření diluční mikrometodou EUCAST; C: citlivý, \*\*\* hodnoty jsou vztaženy na obsah trimetoprimu.

#### VZOREK 5: *Staphylococcus aureus*

Kmen 5 je rezistentní k oxacilinu a citlivý ke gentamicinu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti u kmene 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a MIC pro citlivé izoláty *S. aureus*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

**Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 5 *Staphylococcus aureus***

| Antibiotikum | Zdroj      | Obsah disku | Průměry IZ (mm)              |                                  | MIC (mg/l)                   |                                   | Správné výsledky |                  |       |
|--------------|------------|-------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|------------------|------------------|-------|
|              |            |             | breakpoint pro citlivé kmeny | rozmezí hodnot naměřených v NRL* | breakpoint pro citlivé kmeny | rozmezí hodnot naměřených v NRL** | kategorie        | počet laboratoří | %     |
| oxacilin     | EUCAST [1] | ND          | ND                           | NT                               | ≤ 2                          | > 8 -> 8                          | R                | 121/121          | 100,0 |
|              | CLSI [2]   |             |                              |                                  |                              |                                   |                  |                  |       |
| cefoxitin    | EUCAST [1] | 30 µg       | ≥ 22                         | 16 - 17                          | ND                           | NT                                |                  |                  |       |
|              | CLSI [3]   |             |                              |                                  |                              |                                   |                  |                  |       |
| gentamicin   | EUCAST [1] | 10 µg       | ≥ 18                         | 23 - 23                          | ≤ 1                          | 0,5 - 1                           | C                | 121/121          | 100,0 |
|              | CLSI [2]   |             | ≥ 15                         |                                  | ≤ 4                          |                                   |                  |                  |       |

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; \* 5 měření diskovou difuzní metodou EUCAST, \*\* 5 měření diluční mikrometodou EUCAST; ND: neudáno; NT: netestováno; R: rezistentní, C: citlivý.

## Závěr

Všechny laboratoře správně vyšetřily citlivosti k požadovaným antibiotikům u obou kmenů v EHK 1045.

## Literatura

- [1] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1, valid from 2018-01-01 [on-line]. Dostupný z WWW: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
- [2] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28th ed. CLSI supplement M100-S. Wayne, Pa. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

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