



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 – Vinohrady



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

**PT#M/5-3/2019 (č. 1087)**  
**Bakteriologická diagnostika**

**Praha, prosinec 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/5-3/2019 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-3/2019 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: 267 082 124

### **Zprávu vypracovaly:**

Mgr. Renáta Šafránková, Mgr. Petra Klimešová, RNDr. Pavla Urbášková CSC

**Zprávu schválil:** Mgr. Renáta Šafránková

**Dne:** 5. 12. 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/5-3/2019-EHK-1087/2. 9. 2019
Název:	EHK-Bakteriologická diagnostika
Poskytovatel:	SZÚ – Centrum epidemiologie a mikrobiologie – AP CEM Šrobárova 48, Praha 10, 100 42 tel.: + 420 267082258
Vedoucí ESPT	Ing. Věra Vrbíková
Koordinátor:	Mgr. Renáta Šafránková
Subdodavatel:	není
Charakteristika materiálu:	Simulovaný klinický vzorek 1. Actinomyces israelii 2. Legionella pneumophila 3. Escherichia coli O111 4. Aeromonas spp./hydrophila 5. Escherichia coli
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:	120 laboratoří
Označení vzorkovnic:	EHK-1087/1-5/2019
Zabezpečení kvality vzorku:	U 5 náhodně vybraných lyofilizátů každého vzorku je prováděna 1. Kontrola viability vzorku 2. Kontrola přítomnosti nežádoucí kontaminace Stabilita: zabezpečena vlastní lyofilizací
Metrologická návaznost:	viz Protokol o přípravě vzorků
Termín testu stability:	Nejméně 14 dní před distribucí vzorků
Termín distribuce vzorků:	2. 9. 2019 (humánní lab.); 24. 9. 2019 (veterinární lab. – vzorek 4, 5)
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:	120
Způsob distribuce:	přepravcem se službou přeprava nebezpečného zboží Přílohy: formulář pro zápis výsledků a pokyny účastníkům
Předání výsledků:	elektronicky do 23. 9. 2019 (hum.lab.); písemně na předepsaných formulářích do 8. 10. 2019 (vet.lab.)
Způsob vyhodnocení výsledků:	- kvalitativní (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 vztažené hodnoty:	Výsledky NRL
Termín zveřejnění závěrečné zprávy:	Do 12 týdnů po předání výsledků k hodnocení

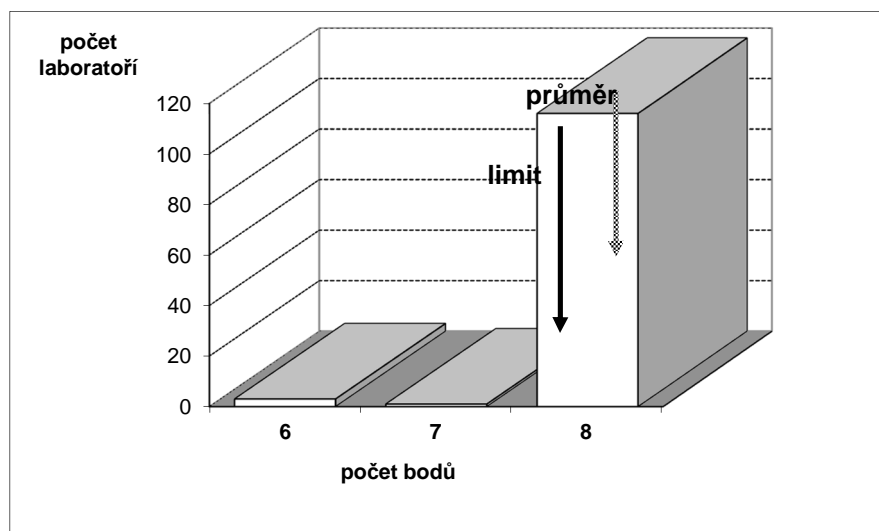
## 2. Příprava vzorku

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 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. Hodnocení

Celkem byly vzorky rozeslány 120 laboratořím, všechny laboratoře odeslaly 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, které bylo v předchozích sériích pouze orientační, se z technických důvodů již neprovádí (přechod na elektronické výsledky), k dispozici budou pouze komentované výsledky (vzorek 4 a 5).

Graf 1: Počet bodů za správnou identifikaci.



Maximálního počtu bodů při identifikaci dosáhlo 116, tj. 96,7% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,292 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj.  $7,942 - (2 \times 0,325) = 7,292$ ). Tohoto limitu dosáhlo 116 laboratoří, 4 laboratoře tento limit nesplnily.

#### 4. Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Izolát z hnisu z krční píštěle.
ODPOVĚĎ: <b><i>Actinomyces israelii</i></b>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Actinomyces israelii</i>	117	2	97,5%
<i>Actinomyces</i> spp.	3	2	2,5%
Celkem	120		100%

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

V této sérii EHK všechny zúčastněné laboratoře dosáhly plného počtu bodů, 117 laboratoří uvedlo správně i druhovou identifikaci.

VZOREK 2: Sputum od 60 letého pacienta – kuřáka s respirační insuficiencí, bolestmi hlavy a stavem zmatenosti.
ODPOVĚĎ: <b><i>Legionella pneumophila</i></b> Vzorek dále obsahoval: <i>Streptococcus mutans</i>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Legionella pneumophila</i>	119	2	99,2%
<i>Legionella pneumophila</i> + <i>Streptococcus mitis</i>	1	1	0,8%
Celkem	120		100%

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

Plného počtu bodů dosáhlo 99,2% všech laboratoří, jedna laboratoř připsala do výsledku identifikace komenzální bakterii, která nebyla ve vzorku přítomna (ve vzorku byl přítomen *S. mutans*) a získala pouze bod. Druhová identifikace legionel bývá obtížná, pro bližší identifikaci (i pro epidemiologické došetření případné legionelózy) je vhodné zaslat kmen do NRL pro legionely.

VZOREK 3: Stolice od dětského pacienta (2 roky) s vodnatým průjmem a subfebriliemi.

ODPOVĚĎ: ***Escherichia coli* O111**

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Escherichia coli</i> O111	115	2	95,8%
<i>Escherichia coli</i> (aglutinuje v polyvalentu, obsahující O111)	1	2	0,8%
<i>Escherichia coli</i> O157	1	1	0,8%
<i>Escherichia coli</i> O111 + <i>Enterococcus faecalis</i>	1	1	0,8%
<i>Escherichia coli</i>	2	0	1,7%
Celkem	120		100%

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

*E. coli* séroskupiny O111 patří k původcům průjmu. Z hlediska patoskupiny se nejčastěji jedná o enteropatogenní *E. coli* (EPEC), enteroagregativní *E. coli* (EAEC) nebo enterohemoragické *E. coli* (EHEC). Zejména EHEC působí závažné infekce – zhruba u 10 % pacientů, především dětí do 5 let, je totiž průjem komplikovaný rozvojem hemolyticko-uremického syndromu. Hlavními faktory virulence EHEC zodpovědnými za rozvoj hemolyticko-uremického syndromu jsou Shiga toxiny [1, 2]. *E. coli* O111 patří do pětice séroskupin (spolu s *E. coli* O26, O103, O145 a O157), pro které je ve Vyhlášce 473/2008 Sb. „o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce“ stanovena povinnost zasílání do NRL pro *E. coli* a shigely k průkazu/konfirmaci Shiga toxinu.

Z celkem oslovených 120 laboratoří zaslalo 115 správný výsledek, často s poznámkou, že by kmen zaslaly do NRL ke konfirmaci a průkazu Shiga toxinů. 3 laboratoře určily kmen jako *E. coli*, z nich jedna uvedla do poznámky, že by kmen poslala do NRL, protože aglutinuje v polyvalentu obsahující O111. Těto laboratoři byly uděleny 2 body, ostatní 2 laboratoře, které uvedly pouze druhovou identifikaci bez dalšího komentáře, nezískaly žádný bod.

Laboratoř, která uvedla do výsledku komensální bakterii, získala po bodu, stejně jako laboratoř, která uvedla nesprávnou séroskupinu.

## Literatura

[1] Marejková M, Bláhová K, Janda J, Fruth A, Petráš P. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* as causes of hemolytic uremic syndrome in the Czech Republic. PLoS One 2013; 8(9):e73927.

[2] Marejková M, Petráš P. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* as the cause of diarrhea in the Czech Republic, 1965-2013. Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 2014;63(3):173-183.(Czech).

VZOREK 4: Izolát ze stěru z hnisající rány vzniklé po zranění.

ODPOVĚĎ: ***Aeromonas spp./hydrophila***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Aeromonas hydrophila</i>	74	2	61,7%
<i>Aeromonas spp.</i>	46	2	38,3%
Celkem	120		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 izolovaného ze stěru z hnisající rány vzniklé po zranění, a vyšetřit jeho citlivost ke cefotaximu a ke kotrimoxazolu. Izolát byl k oběma antibiotikům citlivý. Vzhledem k tomu, že EUCAST u *Aeromonas spp.* neuvádí breakpointy pro kategorizaci citlivosti k cefotaximu však výsledky laboratoří nebyly hodnoceny. U kotrimoxazolu měly všechny laboratoře správné výsledky.

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 a rezistentní izoláty *Aeromonas spp.*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

**Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 4 *Aeromonas hydrophila* z hnisající rány pacienta podle metody a breakpointů EUCAST [1].**

Antibiotikum	Obsah disku μg	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky		
		breakpoint		rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie/abs.počet laboratoří		správné %
		C	R		C	R		C	R	
cefotaxim	5 μg	ND	ND	30 - 32	ND	ND	0,06 - 0,125	NH	NH	
kotrimoxazol***	25 μg	≥ 19	< 16	23 - 24	≤ 2	> 4	0,125 - 0,125	120	0	100,0

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; \* 5 měření diskovou difuzní metodou EUCAST, \*\* 5 měření diluční mikrometodou EUCAST; \*\*\* výsledky vztaheny na trimetoprim; ND: neudáno; NH: nehodnoceno; C: citlivost; R: rezistence; správné výsledky jsou šedě zvýrazněny.

VZOREK 5: *Escherichia coli*

Kmen 5 je citlivý k cefotaximu i k meropenemu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti u kmene 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a MIC pro citlivé a rezistentní izoláty *E. coli*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

**Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 5 *Escherichia coli* podle metody a breakpointů EUCAST [1].**

Antibiotikum	Obsah disku μg	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky		
		breakpoint		rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie/abs.počet laboratoří		správné
		C	R		C	R		C	R	
cefotaxim	5 μg	≥ 20	< 17	25 - 27	≤ 1	> 2	0,5 - 0,5	120	0	100,0
meropenem	10 μg	≥ 22	< 16	30 - 32	≤ 2	> 8	≤ 0,06 - ≤ 0,06	120	0	100,0

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; \* 5 měření diskovou difuzní metodou EUCAST, \*\* 5 měření diluční mikrometodou EUCAST; C: citlivost; R: rezistence; správné výsledky jsou šedě zvýrazněny.

## Závěr

Všechny laboratoře měly správné výsledky vyšetření citlivosti u kmenů 4 a 5 s tím, že u kmene 4 *Aeromonas hydrophila* nebyly hodnoceny výsledky cefotaximu, pro který nemá EUCAST stanoveny klinické breakpointy. Při nezbytnosti lze výsledky cefotaximu interpretovat podle breakpointů PK-PD (breakpoint MIC pro citlivost ≤ 1 mg/l), viz What to do when there are no breakpoints, dostupné na [http://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/guidance\\_documents/](http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/guidance_documents/), český překlad Jak postupovat nejsou-li k dispozici breakpointy, dostupné na <http://www.szu.cz/dalsi-dokumenty-s-pokyny-pri-testovani-citlivosti-eucast>.

Po delší době opět upozorňujeme na problematiku komenzálních bakterií. V této sérii jsme u jedné laboratoře opět přikročili ke srážce jednoho bodu (vzorek 2 i 3) z toho důvodu, že do výsledku identifikace uvedla i komenzální bakterie. Je-li úkolem určit signifikantního patogena (viz legenda u každého vzorku), není možné uznávat jako správné ty odpovědi, které zahrnují ve výsledku dohromady patogena i komenzála (resp. komenzály). Nejlépe je neuvádět komenzály vůbec, příp. pokud by chtěla laboratoř komenzála z nějakého důvodu zmínit, je možné ho připsat do komentáře a jasně označit, že se jedná o komenzála.

## Literatura

- [1] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019-01-01. Dostupný z WWW: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/), český překlad <http://www.szu.cz/eucast-dokumenty?highlightWords=dokumenty+EUCAST>

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