



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/5-2/2021 (EHK 1199)**

**Bakteriologická diagnostika**

**Praha, srpen 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	4-8
6.	Závěr	9
	Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/5-2/2021 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-2/2021 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, RNDr. Pavla Urbášková, CSc.

### Zprávu autorizoval:

Mgr. Renáta Šafránková

Dne: 10. 8. 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/5-2**

Identifikace série:	EHK 1199
Název:	Bakteriologická diagnostika
Koordinátor:	Mgr. Renáta Šafránková
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-1199/1-5/2021
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:	10. 5. 2021 (humánní lab.)
Způsob distribuce:	Přepravní službou (zajišťuje Koordinační pracoviště ESPT 2)
Předání výsledků:	Elektronicky do 31. 5. 2021
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4
Určení maximální směrodatné odchylky:	Neprovádí
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Výsledky získané v NRL
Termín uveřejnění očekávaných výsledků:	3. 6. 2021
Termín zveřejnění závěrečné zprávy:	Do 31. 8. 2021

## 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. *Streptococcus* sk. C
2. *Listeria monocytogenes*
3. Signifikantní bakteriální patogen nepřítomen
4. *Acinetobacter baumannii*
5. *Streptococcus pneumoniae*

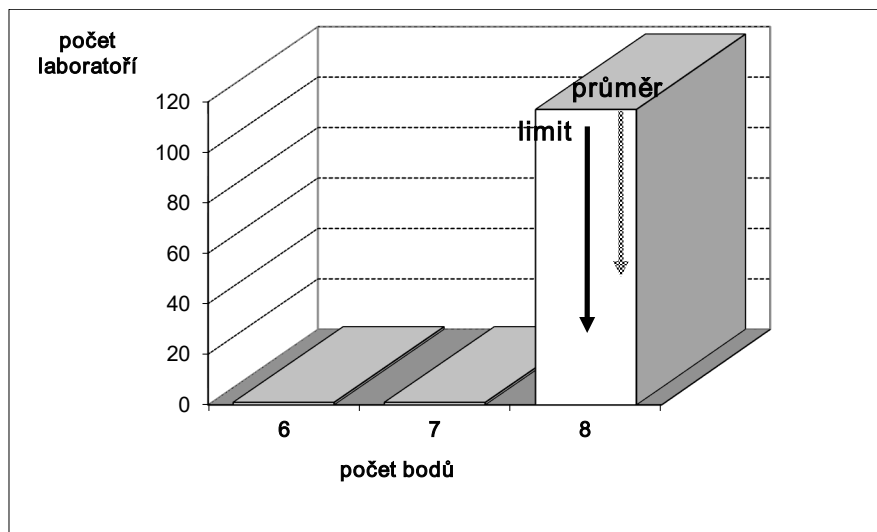
## 4. Způsob hodnocení

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, 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 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 117, tj. 98,3% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,567 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj.  $7,975 - (2 \times 0,204) = 7,567$ ). Tohoto limitu dosáhlo 117 laboratoří, 2 laboratoře tento limit nesplnily.

### Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Výtěr z krku od pacientky s bolestmi v krku a horečkou.

ODPOVĚĎ: ***Streptococcus sk. C* ( $\beta$  hemolytický streptokok)**

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Streptococcus sk. C</i>	64	2	53,8%
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	54	2	45,4%
<i>Streptococcus sk. G</i>	1	1	0,8%
Celkem	119		100%

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

Všechny laboratoře kromě jedné vyhověly zadání a získaly po 2 bodech. Laboratoř, která uvedla jinou skupinu, získala bod.

VZOREK 2: Izolát z likvoru od 70-leté pacientky s hnisavou meningitidou.

ODPOVĚĎ: *Listeria monocytogenes*

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Listeria monocytogenes</i>	119	2	100%
Celkem	119		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 zúčastněným laboratořím potíže, všechny laboratoře odpověděly správně a získaly po 2 bodech.

Tento mikrob byl izolován ze zvířat v roce 1926 a popsán původně jako *Bacterium monocytogenes*, druhové jméno odkazovalo na monocytózu (zvýšený počet monocytů v krvi) [1].

Ke změně rodového jména došlo v roce 1940, bakterie byla nazvána po lordu Listerovi, anglickém chirurgovi a průkopníkovi asepse a antisepse [2].

V současnosti je validně popsáno již 26 druhů listerií, z toho třetina byla popsána v posledních pěti letech v souvislosti s masivním rozvojem především molekulárně biologických metod.

Nejčastějším projevem listeriové infekce je febrilní gastroenteritida, méně časté je postižení CNS (zejména hnisavá meningitida u osob starších 60 let), vzácně mohou být listerie příčinou abscesu (játra, slezina); nebezpečná může být infekce plodu (abortus, narození mrtvého plodu, neonatální seps) [3].

### Literatura

- [1] Murray EGD, Webb AA, Swann MBR. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* n. sp. *Journal of Pathology and Bacteriology* 1926; 29:407-439.
- [2] Pirie JHH. The genus *Listerella* Pirie. *Science (Washington)* 1940; 91:383.
- [3] Beneš J. *Infekční lékařství*, Galen, 2009

VZOREK 3: Stolicе od 50 letého pacienta s nauzeou, dyspepsií a řídkou stolicí.

ODPOVĚĎ: **Signifikantní bakteriální patogen nepřítomen**

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

identifikace	frekvence	body	procento
Signifikantní patogen nepřítomen	118	2	99,2%
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0,8%
Celkem	119		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 *K. oxytoca* a *E. faecalis* obsažena i *E. coli*, nejednalo se však o enteropatogenní kmen. Většina laboratoří (99,2%) odpověděla správně a získala po dvou bodech.

VZOREK 4: Izolát z hemokultury od pacienta se závažným průběhem COVID-19.

ODPOVĚĎ: *Acinetobacter baumannii*

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Acinetobacter baumannii</i>	119	2	100%
Celkem	119		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 ke kotrimoxazolu a k meropenemu. Druh správně identifikovalo všech 119 zúčastněných laboratoří. Kmen je při standardním dávkování citlivý ke kotrimoxazolu a i při zvýšené expozici rezistentní k meropenemu.

Správný výsledek u kotrimoxazolu mělo 107 laboratoří (89,9 %) a všechny laboratoře správně označily kmen 4 jako rezistentní k meropenemu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti kmene ze vzorku 4 jsou v tabulce 1, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) kotrimoxazolu a meropenemu pro *Acinetobacter* spp., hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

**Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti<sup>1</sup> kmene 4 *Acinetobacter baumannii*.**

Antibiotikum	Obsah disku µg	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky			
		breakpoint <sup>2</sup>		rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint <sup>2</sup>		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie <sup>3</sup> / absolutní počet laboratoří <sup>4</sup>			správné %
		C	R		C	R		C	I	R	
kotrimoxazol <sup>5</sup>	25 µg	≥ 14	< 11	12 - 13	≤ 2	> 4	0,5 - 1	107	10	2	89,9
meropenem	10 µg	≥ 21	< 15	6 - 6	≤ 2	> 8	> 16 - > 16	0	0	119	100,0

<sup>1</sup> metoda vyšetření a interpretace výsledků podle EUCAST 2021 [1]

<sup>2</sup> hodnoty mezi breakpointy pro kategorie C a R jsou hodnoty pro kategorii I (citlivý při zvýšené expozici)

<sup>3</sup> kategorie C: citlivý při standardním dávkování, I: citlivý při zvýšené expozici; R: rezistentní i při zvýšené expozici

<sup>4</sup> správné výsledky jsou zvýrazněny

<sup>5</sup> výsledky MIC jsou vztaženy na obsah trimetoprimu

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace

\* 5 měření diskovou difuzní metodou, \*\* 5 měření diluční mikrometodou

### VZOREK 5: *Streptococcus pneumoniae*

Kmen 5 je necitlivý k penicilinu a při standardním dávkování je citlivý k cefotaximu. Dvě laboratoře chybovaly u penicilinu, výsledky u cefotaximu měly správně všechny laboratoře. Celkové výsledky vyšetření citlivosti kmene ze vzorku 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) oxacilinu a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) penicilinu a cefotaximu pro *Streptococcus pneumoniae*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

**Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti<sup>1</sup> kmene 5 *Streptococcus pneumoniae*.**

Antibiotikum	Obsah disku µg	Průměry IZ (mm)			MIC (mg/l)			Výsledky			
		breakpoint <sup>2</sup>		rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint <sup>2</sup>		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	kategorie <sup>3</sup> / absolutní počet laboratoří <sup>4</sup>			správné %
		C	I/R		C	R		C	I	R	
oxacilin	1 µg	≥ 20	< 20	21 - 22	netestováno			2	117	0	98,3
penicilin	netestováno			0,06	0,06 <sup>5</sup> 2 <sup>6</sup>	0,25 - 0,25					
cefotaxim	netestováno			≤ 0,25	> 0,5	0,125 - 0,125	119	0	0	100,0	

<sup>1</sup> metoda vyšetření a interpretace výsledků podle EUCAST 2021 [1]

<sup>2</sup> hodnoty mezi breakpointy pro kategorie C a R jsou hodnoty pro kategorii I (citlivý při zvýšené expozici)

<sup>3</sup> kategorie C: citlivý při standardním dávkování, I: citlivý při zvýšené expozici; R: rezistentní i při zvýšené expozici

<sup>4</sup> správné výsledky jsou zvýrazněny

<sup>5</sup> meningitida

<sup>6</sup> infekce jiné než meningitida

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace

\* 5 měření diskovou difuzní metodou, \*\* 5 měření diluční mikrometodou



## 6. Závěr

Všechny laboratoře měly správné výsledky u kmene 4 *Acinetobacter baumannii* a meropenemu a u kmene 5 *Streptococcus pneumoniae* a cefotaximu.

Výsledky vyšetření citlivosti ke kotrimoxazolu diskovou difúzní metodou může u některých bakterií výrazně ovlivnit složení půdy a zejména koncentrace inokula, zatímco na výsledky vyšetření MIC mají tyto podmínky malý nebo zanedbatelný vliv. To potvrzují i výsledky diskové difúzní metody získané NRL pro antibiotika u kmene 4, které kotrimoxazol řadí do kategorie I, zatímco vyšetření MIC poskytlo jednoznačný výsledek v kategorii C. Vzhledem k tomu, že pro léčbu infekcí způsobených *Acinetobacter* spp. existuje jen málo antibiotik s klinicky ověřenou účinností (kotrimoxazol, fluorochinolony a karbapenemy), je vhodné kmeny, u nichž je výsledek diskové metody pro kotrimoxazol v kategorii I nebo R, dále ověřit vyšetřením MIC standardní diluční mikrometodou (nikoli gradientním testem, který může mít stejná omezení jako disková difúzní metoda).

U kmene 5, necitlivého k penicilinu, by k podrobnější interpretaci výsledku vyšetření citlivosti k penicilinu byla potřebná diagnóza, která se však v EHK u kmene 5 neuvádí. Laboratoře v komentáři ve svých výsledcích vesměs na potřebu uvedení diagnózy poukázaly, pouze dvě laboratoře kmen označily chybně jako citlivý.

## Literatura

- [1] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 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/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/), český překlad <http://www.szu.cz/klinicke-breakpointy>

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

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY