



Státní zdravotní ústav  
Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti  
Poskytovatel 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/5-1/2018 (č.1004)** **Bakteriologická diagnostika**

**Praha, květen 2018**

## Obsah

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing)	3
2. Příprava vzorku	4
3. Hodnocení	4
4. Výsledky zúčastněných laboratoří	5-9
5. Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/5-1/2018 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-1/2018 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, MUDr. Daniela Dědičová CSc, RNDr. Petr Petráš CSc, RNDr. Pavla Urbášková CSc, Mgr. Jana Zavadilová

**Zprávu schválil:** Mgr. Renáta Šafránková

**Dne:** 11. 5. 2018

### **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/5-1/2018-EHK-1004/20. 2. 2018
Název:	EHK-Bakteriologická diagnostika
Poskytovatel:	SZÚ – Centrum epidemiologie a mikrobiologie – AP CEM Šrobárova 48, Praha 10, 100 42 tel.: + 420 267082250, fax.: + 420 267082427
Vedoucí ESPT	Ing. Věra Vrbíková
Koordinátor:	Mgr. Renáta Šafránková
Subdodavatel:	není
Charakteristika materiálu:	Simulovaný klinický vzorek 1. Bordetella parapertussis 2. Kocuria varians 3. Salmonella Infantis 4. Kingella kingae 5. Plesiomonas shigelloides
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-1004/1-5/2018
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:	20. 2. 2018 (humánní lab.); 6. 3. 2018 (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:	121
Způsob distribuce:	přepravcem se službou přeprava nebezpečného zboží Přílohy: formulář pro zápis výsledků a pokyny účastníkům
Předání výsledků:	písemně do 13. 3. 2018 (hum.lab.) a do 20. 3. 2018 (vet.lab.) na předepsaných formulářích
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 rozeslání výsledků účastníkům:	květen 2018

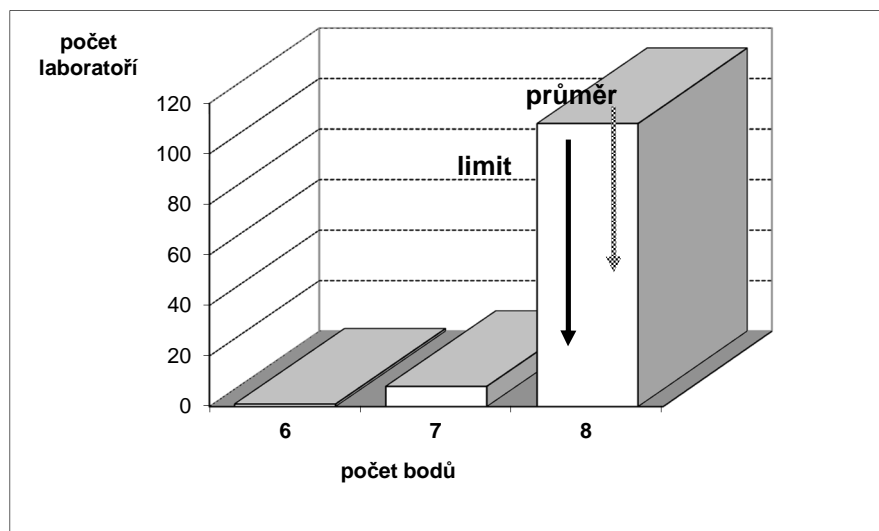
## 2. Příprava vzorku

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 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. Hodnocení

Celkem byly vzorky rozeslány 121 laboratořím, všechny laboratoře odeslaly výsledek do závěrečného termínu. Za identifikaci signifikantního patogena 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 112, tj. 92,6% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,307 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj.  $7,917 - (2 \times 0,305) = 7,307$ ). Tohoto limitu dosáhlo 112 laboratoří, 9 laboratoří tento limit nesplnilo.

#### 4. Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Výtěr z nasopharyngu od 4-letého dítěte s dlouhotrvajícím kašlem.
ODPOVĚĎ: <b><i>Bordetella parapertussis</i></b> Vzorek dále obsahoval: <i>Streptococcus oralis</i>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Bordetella parapertussis</i>	120	2	99,2%
<i>Bordetella</i> spp.	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.

Většina laboratoří (120 ze 121, tj. 99,2%) identifikovala kmen správně jako *Bordetella parapertussis*. Pouze 1 laboratoř kmen nedourčila a označila vzorek jako *Bordetella* spp.

Pokud se jedná o nedourčení kmene (*Bordetella* spp.), lze předpokládat, že laboratoř neměla k dispozici diagnostická séra (aglutinační séra *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*; Oxoid), případně hmotnostní spektrometr MALDI TOF.

Pouze 2 laboratoře doplnily, že by kmen poslaly do NRL. Obracíme se proto na všechny diagnostikující mikrobiology, aby izoláty *Bordetella* spp. posílaly do NRL ke konfirmaci.

VZOREK 2: Izolát z hemokultury od nezralého novorozence s infekcí krevního řečiště.
ODPOVĚĎ: <b><i>Kocuria varians</i></b>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Kocuria varians</i>	119	2	98,4%
<i>Kocuria rhizophila</i>	1	1	0,8%
<i>Kocuria</i> sp.	1	1	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.

*Kocuria varians* byla známa již od roku 1900 pod jménem *Micrococcus varians* a byla jedním z 9 známých druhů mikrokoků. Rod *Micrococcus* byl v r. 1995 na základě výsledků celkové fylogenetické a chemotaxonomické analýzy taxonomicky rozčleněn do pěti odlišných rodů, *Kocuria*, *Nesterenkonia*, *Kytococcus*, *Dermacoccus* a původní *Micrococcus*, v kterém zůstaly jen druhy *M. luteus* a *M. lylae*. Druhy *M. rosea*, *M. kristinae* a *M. varians* byly zařazeny do rodu *Kocuria* [1]. Rod byl pojmenován po doc. Miroslavovi Kocurovi, dlouholetém vedoucím brněnské sbírky CCM, který se těmito gram-pozitivními bakteriím hodně věnoval. V současnosti má rod 24 druhů, včetně velice zajímavých: např. *Kocuria polaris* byla izolována z prostředí v Antarktidě, *Kocuria oceani* z hlubokých mořských hydrotermálních vývěrů [2].

*Kocuria varians*, podobně jako ostatní kocurie, je považována za nepatogenní druh a jako ostatní bývalé i současné mikrokoky osidluje pokožku a sliznice. Může však vyvolat i závažná onemocnění – shodně jako jiné podmíněně patogenní bakterie – u imunitně, nebo jinak oslabených jedinců. Je popsán např. mozkový absces u 52letého muže – diabetika s hypertenzí, který prokazatelně způsobila [3].

Biochemicky jdou kocurie odlišit od koaguláza-negativních stafylokoků (často jsou kolonie výrazně pigmentovány, většinou různými odstíny žluti) jednoduše pomocí dvou testů rezistence: k bacitracinu (jsou citlivé) a k furantoinu (rezistentní) – u stafylokoků je to obráceně. Dobře jdou identifikovat metodou MALDI-TOF MS.

## Literatura

[1] Stackebrandt E, Koch C, Gvozdiak O, Schumann P.: Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen.nov., *Nesterenkonia* gen.nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen.nov. and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *Int J Syst Bacteriol* 1995; 45(4): 682–692.

[2] List of prokaryotic names with standing in nomenclature: <http://www.bacterio.net/>

[3] Cheng-Yu T, Shouh-sin S, Cheng-Yu, et al. *Kocuria varians* infection associated with brain abscess. *BMC Infect Dis.* 2010; 10: 102. doi: 10.1186/1471-2334-10-102.

VZOREK 3: Stoličice od pacienta s průjmem vzniklým po konzumaci salátu.

ODPOVĚď: ***Salmonella* Infantis 6,7 : r : 1,5**

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Salmonella</i> Infantis	114	2	94,2%
<i>Salmonella</i> sk. C1 O7, r	1	1	0,8%
<i>Salmonella</i> species 7:r	1	1	0,8%
<i>Salmonella enterica</i> sk. C1	1	1	0,8%
<i>Salmonella</i> sk. C1	3	1	2,5%
<i>Salmonella</i> sk. C	1	1	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.

Sérovar *Salmonella* Infantis 6,7 : r : 1,5 byl vybrán jako reprezentant "Top 5" sérovarů salmonel, který se v prevalenci ČR dlouhodobě vyskytoval na třetím místě (více jak 20 let). Pouze v roce 2017 byl odsunut na čtvrté místo v důsledku nadnárodní epidemie *S. Bareilly*, probíhající ve druhé polovině roku.

Spolehlivě jej identifikovalo 114 (94%) zúčastněných laboratoří.

V dalších šesti případech se jednalo o správné určení somatické O antigenní skupiny C1 (O:7) – přidělen 1 bod, a to i při bezchybném uvedení H antigenu 1.fáze. Není-li totiž antigenní schéma komplexní, nelze stanovit konkrétní sérovar, což bylo požadováno v zadání. Jedna laboratoř dospěla jen k obecnému (nicméně správnému) zařazení do skupiny C (O:6,7,8).

Celkový výsledek svědčí o dobré úrovni typizace běžných salmonel klinickými laboratořemi. Přesto bylo v loňském roce s požadavkem o dotypování zasláno 85 izolátů *S. Infantis* do NRL.

Pětici nejčastějších salmonel za tříleté období 2015 až 2017 doplňují ještě *S. Virchow* a případně *S. Newport*. Vzhledem k antigenní podobnosti sérovarů Infantis, Bareilly a Virchow lze klinickým laboratořím doporučit doplnění příslušných antisér do rutinní praxe s téměř zaručenou efektivitou diagnostiky.

VZOREK 4: Izolát ze synoviální tekutiny od 12ti měsíčního dítěte se septickou artritidou.

ODPOVĚď: ***Kingella kingae***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Kingella kingae</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.

Požadavek byl určit signifikantního patogena a vyšetřit jeho citlivost k penicilinu a k cefotaximu. Všech 121 laboratoří správně identifikovalo kmen 4 jako *Kingella kingae*. 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 *Kingella kingae*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

**Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 4 *Kingella kingae***

Antibiotikum	Zdroj	Obsah disku $\mu\text{g}$	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	%
penicilin	EUCAST [1]	1 J	$\geq 25$	31 - 32	$\leq 0,03$	0,016 - 0,016	C	120/121	99,2
	CLSI [2]	neudáno		$\leq 1$					
cefotaxim	EUCAST [1]	5 $\mu\text{g}$	$\geq 27$	34 - 35	0,125	0,06 - 0,06	C	120/121	99,2
	CLSI [2]	neudáno		$\leq 2$					

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; \* 5 měření diskovou difuzní metodou, \*\* 5 měření diluční mikrometodou; C: citlivý.

VZOREK 5: ***Plesiomonas shigelloides***

Kmen 5 je citlivý k ampicilinu/sulbaktamu a k ciprofloxacinu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti u kmene 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) a MIC ampicilinu/sulbaktamu a ciprofloxacinu pro Enterobacterales, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.



**Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 5 *Plesiomonas shigelloides*.**

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	%
ampicilin/sulbaktam	EUCAST [1]	10/10	≥ 14	23 - 23	≤ 8	≤ 0,5 - ≤ 0,5	C	121/121	100,0
	CLSI [3]		≥ 15						
ciprofloxacin	EUCAST [1]	5 µg	≥ 25	32 - 33	≤ 0,25	≤ 0,03 - ≤ 0,03	C	121/121	100,0
	CLSI [3]		≥ 21		≤ 1				

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; \* 5 měření diskovou difuzní metodou, \*\* 5 měření diluční mikrometodou; C: citlivý.

## Závěr

V této sérii EHK chybovala jen jedna laboratoř u obou antibiotik, vyšetřovaných u druhu *Kingella kingae*.

## 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. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated of fastidious bacteria. 3rd ed. CLSI guideline M45. Wayne, Pa. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- [3] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed. CLSI supplement M100-S. Wayne, Pa. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

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