



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/5-2/2018 (č. 1024)**  
**Bakteriologická diagnostika**

**Praha, srpen 2018**

## Obsah

- |   |      |
|---|------|
| 1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing) | 3    |
| 2. Příprava vzorku  | 4    |
| 3. Hodnocení  | 4    |
| 4. Výsledky zúčastněných laboratoří                                   | 5-10 |
| 5. Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře                |      |

Program zkoušení způsobilosti PT#M/5-2/2018 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-2/2018 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 vypracovaly:**

Mgr. Renáta Šafránková, Ing. Monika Marejková PhD, RNDr. Pavla Urbášková CSc, Mgr. Jana Zavadilová

**Zprávu schválil:** Mgr. Renáta Šafránková

**Dne:** 16. 8. 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/5-2/2018-EHK-1024/15. 5. 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. Corynebacterium diphtheriae 2. Enterococcus faecium 3. Vibrio cholerae non O1/non O139 4. Staphylococcus aureus 5. Salmonella Senftenberg
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-1024/1-5/2018
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:	15. 5. 2018 (humánní lab.); 5. 6. 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 5. 6. 2018 (hum.lab.) a do 19. 6. 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 zveřejnění závěrečné zprávy účastníkům:	srpen 2018

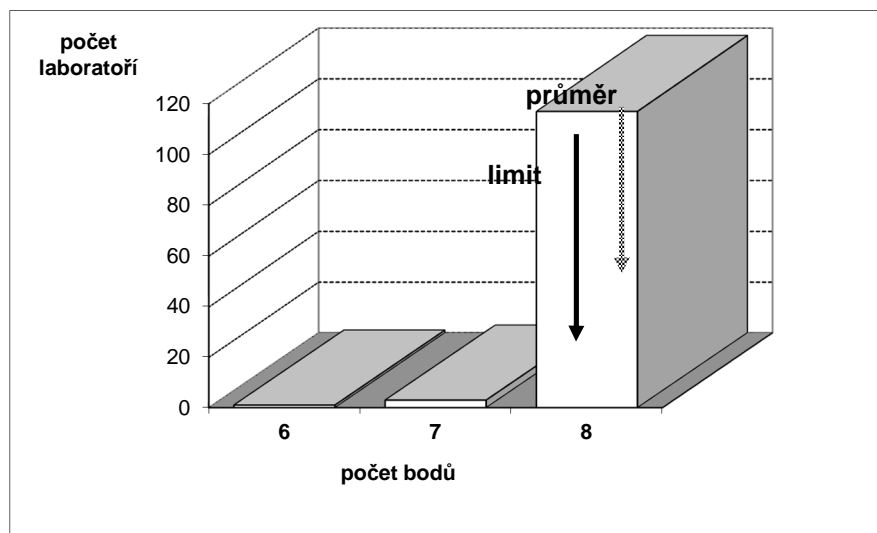
## 2. Příprava vzorku

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 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 patogena ve 4 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 8 bodů; za vyšetření citlivosti mohly laboratoře obdržet celkem 3 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 117, tj. 96,7% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,483 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj.  $7,959 - (2 \times 0,238) = 7,483$ ). Tohoto limitu dosáhlo 112 laboratoří, 9 laboratoří tento limit nesplnilo.

#### 4. Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Výtěr z krku od pacienta s povlakovou angínou.
ODPOVĚĎ: <b><i>Corynebacterium diphtheriae</i></b> Vzorek dále obsahoval: <i>Streptococcus oralis</i> , <i>Neisseria lactamica</i>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	120	2	99,2%
<i>Corynebacterium</i> sp.	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.

Celkem 120 laboratoří určilo správně signifikantního patogena. Většina laboratoří (116, tj. 95,87%) identifikovala kmen bez určení biotypu jako *Corynebacterium diphtheriae*. 1 laboratoř určila i správný biotyp a kmen identifikovala jako *Corynebacterium diphtheriae* biotyp *mitis*. Pouze 1 laboratoř kmen identifikovala jako *Corynebacterium* sp.

Na úroveň biotypu určily kmen pouze 4 laboratoře. 1 laboratoř určila biotyp správně jako *mitis*. 1 laboratoř určila biotyp *gravis*. Biotypy *mitis* a *gravis* se od sebe liší produkcí glykogenu. Dvě laboratoře jako biotyp uvedly séroskupinu non O1, což u korynebaktérií není správné určení biotypu!

38 laboratoří správně napsalo, že by kmen poslali do NRL pro pertusi a difterii k ověření produkce difterického toxinu.

Toxigenní formy *C. diphtheriae* v současnosti v naší populaci necirkulují. V případě, že by došlo k importu toxigenního kmene a jeho náhodnému setkání s našimi kmeny, mohl by jim předat gen kódující produkci toxinu. To bylo v minulosti opakovaně prokázáno. Je tedy třeba věnovat nálezům *C. diphtheriae* pozornost a každý izolovaný kmen *C. diphtheriae* poslat do NRL pro pertusi a difterii ke confirmaci a stanovení toxigenicity.

Pozn.: Poměrně velký počet laboratoří chyboval u toho vzorku ve správném druhovém jménu bakterie; název původně pochází z řeckého „diphthera“, což je kousek kůže, „diphtheria“ = onemocnění, při kterém se v krku tvoří kožovitá blána.

VZOREK 2: Izolát z hemokultury od pacienta z JIP.
ODPOVĚĎ: <b><i>Enterococcus faecium</i></b>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Enterococcus faecium</i>	120	2	99,2%
<i>Enterococcus</i> sp.	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.

Všechny laboratoře vyjma jedné odpověděly správně a získaly po dvou bodech. Laboratoř, která uvedla pouze rodovou identifikaci, získala jeden bod.

VZOREK 3: Stolicе od pacienta s vodnatým průjmем po návratu z Thajska.
ODPOVĚĎ: <b><i>Vibrio cholerae non O1/non O139</i></b> Vzorek dále obsahoval: <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Vibrio cholerae</i>	59	2	48,8%
<i>Vibrio cholerae non O1</i>	37	2	30,6%
<i>Vibrio cholerae non O1/non O139</i>	16	2	13,2%
<i>Vibrio cholerae non O1 (V. albensis)</i>	4	2	3,3%
<i>Vibrio cholerae</i> biovar <i>albensis</i>	2	2	1,7%
<i>Vibrio cholerae</i> dtto <i>V. albensis</i>	1	2	0,8%
<i>Vibrio</i> sp.	1	1	0,8%
<i>Vibrio albensis</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.

*V. cholerae* je Gram-negativní, oxidáza pozitivní tyčka vyvolávající akutní průjmová onemocnění. Existuje více než 200 séro skupin *V. cholerae*, pouze séro skupiny O1 a

O139 jsou, podle definice WHO, označovány jako původci cholery (nebo-li epidemické či pandemické cholery). Cholera postihuje zejména oblasti jižní Asie a je endemo-epidemická v několika zemích Afriky [1]. *Vibrio cholerae* se vyskytuje v mořském prostředí i sladkovodních řekách, a k přenosu nákazy dochází kontaminovanou vodou nebo konzumací tepelně neupravených jídel z mořských plodů.

Z klinického materiálu byly izolovány vibria druhů *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*.

Selektivním médiem pro izolaci vibrií je TCŽS (thiosíran-citrát-žluč-sacharóza) agar, který umožňuje i předběžné rozlišení druhů na základě schopnosti okyselovat sacharózu. Sacharóza-pozitivní vibria (*V. cholerae* a další častěji se vyskytující jako *V. alginolyticus* a *V. fluvialis*), rostou na TCŽS ve žlutých koloniích. (Při testování oxidázy přímo z TCŽS může docházet k nespolehlivým výsledkům, pro tento účel je vhodná neselektivní půda, např. krevní či nutrient agar). Pakliže je nutné pomnožení vzorku stolice k průkazu *V. cholerae*, doporučuje se použití alkalické peptonové vody. V případě importu do zemí, kde se cholera endemicky nevyskytuje, má být klinickými laboratořemi prováděna identifikace fenotypovými testy, a izoláty *V. cholerae* následně zaslány k sérotypizaci či konfirmaci séroskupiny O1/O139 a další charakterizaci do referenčních laboratoří. Sekvence 16S rRNA není, vzhledem k nízké rozlišovací schopnosti na úroveň druhu, ideálním nástrojem identifikace *Vibrionaceae* [2]. Komerční biochemické soupravy typu ENTEROtest 24 (Erba Lachema) umožňují rozlišení *V. cholerae* od jiných druhů. MALDI-TOF MS, pokud nemá dostupnou zvláštní databázi Security Relevant Library (obsahující vysoce riziková agens jako *V. cholerae* a další), identifikuje izolát *V. cholerae* vzhledem k podobnosti spekter jako *Vibrio albensis* [3]. *V. albensis* nepatří k původcům humánních střevních infekcí, t.j. takto identifikovaný kmen metodou MALDI-TOF MS, izolovaný v souvislosti s průjmovým onemocněním (a importem), nelze interpretovat jako *V. albensis*. *Vibrio albensis* (někdy uváděno jako biovar *V. cholerae*), světélkující bakterie, je samostatný druh vibria popsán již v roce 1896, který není uváděn jako patogen pro člověka [3].

Laboratoři, která určila patogena pouze na úroveň rodu (v poznámce doplnila zaslání k dourčení do NRL), bude odebrán jeden bod, stejně tak jako laboratoři, která do výsledku identifikace uvedla pouze *V. albensis*. Všem laboratořím, které kmen identifikovaly jako *V. cholerae*, nebo *V. albensis* s doplněním (třeba jen v poznámce), že se jedná o *V. cholerae*, budou uznány oba body.

## Literatura

- [1] Rapid Risk Assessment ze dne 2017-05-19 (zdroj ECDC): Risk for EU/EEA citizens related to the cholera situation in the Horn of Africa and the Gulf of Aden.
- [2] Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G, Pfaller MA, Landry ML, Richter SS, Warnock DW. Manual of clinical microbiology 11th Edition. ASM press, Washington, DC 2015. doi:10.1128/9781555817381.
- [3] Kolínská R, Petráš P, Urbášková P: EHK-774, Bakteriologická diagnostika. Zprávy CEM (SZÚ, PRAHA) 2013; 22(1): 21–24.

VZOREK 4: Izolát z hnisu u ženy s osteomyelitidou.

ODPOVĚĎ: ***Staphylococcus aureus***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Staphylococcus aureus</i>	76	2	62,8%
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	44	2	36,4%
MRSA	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 erytromycinu a ke klindamycinu. Správnou identifikaci uvedlo celkem 120 laboratoří, jedna laboratoř kmen označila pouze jako MRSA, což není správný výsledek identifikace, viz komentář ke vzorku 4 EHK-933 [3].

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 *S. aureus*, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

**Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 4 *Staphylococcus aureus***

Antibiotikum	Zdroj	Obsah disku μg	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	%
erytromycin	EUCAST [1]	15 μg	≥ 21	25 - 26	≤ 1	0,5 - 0,5	C	119/121	98,4
	CLSI [2]		≥ 23		≤ 0,5				
klindamycin	EUCAST [1]	2 μg	≥ 22	8 - 9	≤ 0,25	> 4 - > 4	R	121/121	100,0
	CLSI [2]		≥ 21		≤ 0,5				

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



VZOREK 5: **Salmonella Senftenberg**

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

**Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 5 Salmonella Senftenberg.**

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	%
gentamicin	EUCAST [1]	10 µg	≥ 17	6 - 6	≤ 2	>16 - > 16	R	121/121	100,0
	CLSI [2]		≥ 15		≤ 4				
meropenem	EUCAST [1]	10 µg	≥ 22	18 - 20	≤ 2	0,5 - 1	I (R)***	109/121	90,1
	CLSI [2]		≥ 23		≤ 1				

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; \* 5 měření diskovou difuzní metodou, \*\* 5 měření diluční mikrometodou; R: rezistentní, I: intermediární; R: rezistentní; \*\*\* jedna laboratoř označila kmen jako C, ale v poznámce uvedla MIC 4 mg/l a kategorii I

**Tabulka 3. Rozmezí průměrů inhibičních zón pro citlivé, intermediární a rezistentní kmeny podle EUCAST (1) a CLSI (2).**

Meropenem obsah disku 10 µg	Rozmezí inhibičních zón			Hodnoty naměřené u kmene 5 v NRL pro antibiotika
	Citlivý	Intermediární	Rezistentní	
EUCAST [1]	≥ 22	16 - 21	< 16	18 - 20 mm
CLSI [2]	≥ 23	20 - 22	≤ 19	

## Závěr

Podle kritérií EUCAST [1] i CLSI [1] byl výsledek vyšetření citlivosti kmene 5 k meropenemu diskovou difuzní metodou v intermediární kategorii (tabulka 3), zatímco MIC meropenemu byla v kategorii citlivé (tabulka 2). Nízká MIC meropenemu mohla být způsobena produkcí malého množství karbapenemázy NDM (která byla prokázána pomocí MALDI-TOF MS a PCR). Vzhledem k tomu, že léčebné použití meropenemu u infekce způsobené intermediárním kmenem by vyžadovalo použití maximální dávky meropenemu, lze jako správné uznat i výsledky vyšetření laboratoří, které kmen označily jako rezistentní; nicméně díky diskrepanci mezi výsledky vyšetření MIC a diskové difuzní metody nebudou výsledky vyšetření citlivosti u meropenemu hodnoceny.

**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.
- [3] Šafránková R, Marejková M, Petráš P, Urbášková P: EHK-933, Bakteriologická diagnostika. Zprávy CEM (SZÚ, PRAHA) 2016; 25(8): 270–272

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