



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)

**Závěrečná zpráva**  
**PT#M/5-3/2018 (č. 1032)**  
**Bakteriologická diagnostika**

**Praha, prosinec 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/5-3/2018 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-3/2018 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

**Zprávu schválil:** Mgr. Renáta Šafránková

**Dne:** 10. 12. 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/5-3/2018-EHK-1032/4. 9. 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. Signifikantní bakteriální patogen nepřítomen 2. Bacteroides fragilis 3. Plesiomonas shigelloides 4. Klebsiella pneumoniae 5. Campylobacter jejuni
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-1032/1-5/2018
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:	4. 9. 2018 (humánní lab.); 25. 9. 2018 (veterinární lab. – vzorek 4, 5)
Podmínky distribuce a uchování vzorků:	krátkodobé uchování při 4 – 8°C 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 Přílohy: formulář pro zápis výsledků a pokyny účastníkům
Předání výsledků:	písemně do 25. 9. 2018 (hum.lab.) a do 10. 10. 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:	Do 12 týdnů po předání výsledků k hodnocení

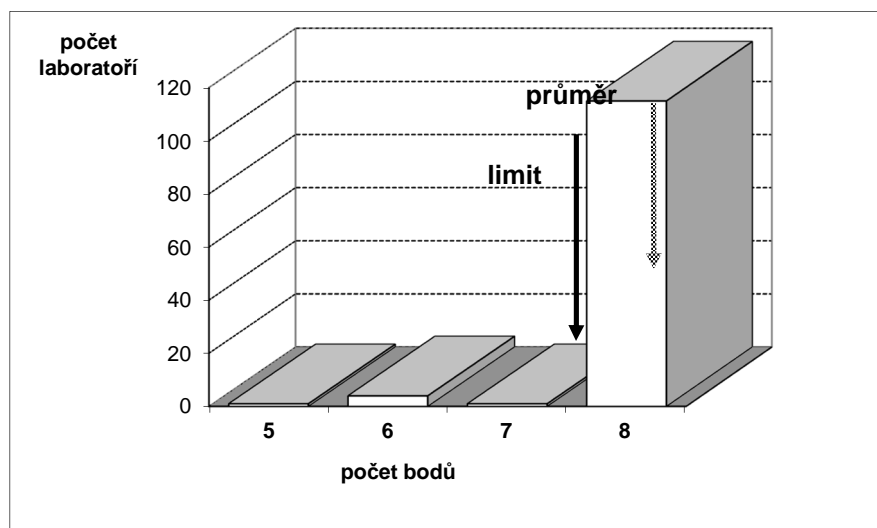
## 2. Příprava vzorku

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 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 5 bodů. 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 115, tj. 95% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 6,991 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj.  $7,901 - (2 \times 0,455) = 6,991$ ). Tohoto limitu dosáhlo 116 laboratoří, 5 laboratoří tento limit nesplnilo.

#### 4. Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Výtěr z krku od 10 letého dítěte s bolestmi v krku.
ODPOVĚĎ: <b>Signifikantní bakteriální patogen nepřítomen</b> Vzorek dále obsahoval: <i>Haemophilus parainfluenzae</i> , <i>Neisseria lactamica</i> , <i>Streptococcus oralis</i>

identifikace	frekvence	body	procento
Signifikantní bakteriální patogen nepřítomen	117	2	96,7%
<i>Haemophilus parainfluenzae</i> .	4	0	3,3%
Celkem	121		100%

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

Správný výsledek, tj. signifikantní patogen nepřítomen, uvedlo celkem 117 laboratoří (96,7 %).

Rutiní mikrobiologické vyšetření výtěru z krku slouží k detekci *Streptococcus pyogenes*, jako nejčastějšího původce vyvolávajícího bakteriální tonzilofaryngitidu. Méně často se uplatňují streptokoky skupiny C a G, průběh onemocnění je mírnější než u *S. pyogenes*, komplikace se vyskytují zřídka a nikdy nedochází ke vzniku revmatické horečky [1]. Další vzácnou příčinou tonzilofaryngitidy může být *Arcanobacterium haemolyticum*, *Corynebacterium diphtheriae* a *Neisseria gonorrhoeae*.

*Haemophilus parainfluenzae*, *Neisseria lactamica* i *Streptococcus oralis*, které byly ve vzorku obsaženy, jsou součástí normální flóry dutiny ústní a horních cest dýchacích, proto byly 4 laboratořím, které určily jako signifikantního patogena *H. parainfluenzae*, odebrány 2 body. Běžnou součástí orální mikroflóry jsou i tzv. patogenní bakterie, např. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, které jsou příčinou závažných onemocnění, avšak v této lokalizaci jsou nalézány pouze jako komenzální bakterie a nemají kauzální vztah k základnímu onemocnění (tonzilofaryngitida), pro které je výtěr z krku prováděn.

#### Literatura

[1] Beneš J. Infekční lékařství, Galen, 2009

VZOREK 2: Izolát z hnisu z nitrobřišního abscesu
ODPOVĚĎ: <b><i>Bacteroides fragilis</i></b>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Bacteroides fragilis</i>	117	2	96,7%
<i>Bacteroides fragilis</i> group	1	2	0,8%
<i>Bacteroides</i> sp.	1	2	0,8%
<i>Bacteroides fragilis</i> + <i>Granulicatella elegans/adiacens</i>	1	1	0,8%
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	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.

119 laboratoří, tj. 98,3%, uvedlo správnou identifikaci (rodová identifikace byla u tohoto vzorku postačující), což je oproti minulé sérii EHK-798 [1], kdy odpověděly správně všechny laboratoře, mírné zhoršení.

V této sérii se jednalo o izolát z hnisu z nitrobřišního abscesu; etiologie nitrobřišních infekcí je zpravidla smíšená, nejčastěji s podílem *B. fragilis*, enterobakterií, anaerobních koků a enterokoků.

### Literatura

[1] Kolínská R, Marejková M., Urbášková P, Zavadilová J.: EHK-798, Bakteriologická diagnostika. Zprávy CEM (SZÚ, PRAHA) 2013; 22(8): 270–272.

VZOREK 3: Stolice od pacienta s vodnatým průjmem.

ODPOVĚď: ***Plesiomonas shigelloides***

Vzorek dále obsahoval: *Escherichia coli*, *Morganella morganii*

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	120	2	99,2%
<i>Plesiomonas shigelloides</i> + <i>Morganella morganii</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.

*Plesiomonas shigelloides* je oxidáza-pozitivní tyčka patřící do řádu Enterobacterales a představuje jediný druh rodu *Plesiomonas*. Na nutrient agaru tvoří kolonie se "shigelovým pachem", je pozitivní na dekarboxylázy a inozitol, jinými biochemickými znaky připomíná *Shigella dysenteriae* 2. Je dobře identifikovatelný jak pomocí komerčních a konvenčních biochemických testů, tak i použitím MALDI-TOF MS.

*P. shigelloides* se vyskytuje ve vodě, u živočichů, ryb a ptáků a obojživelníků. U lidí je původcem gastroenteritid, ale i mimostřevních infekcí (septikémie, meningitidy, cholecystitidy), a to zejména u imunitně oslabených osob [1,2].

Všechny účastněné laboratoře správně určily *P. shigelloides* jako signifikantního patogena, jediné laboratoře, která připsala nesprávně i *Morganella morganii* jako signifikantní nález, bude odebrán jeden bod.

## Literatura

- [1] 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.
- [2] AHEM, příloha č.4/1987. Metodické a informační materiály pro hygienickou službu. E.Aldová, strana 4.

VZOREK 4: Izolát z krve u muže s urosepsí.
ODPOVĚď: <b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	120	2	99,2%
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	1	2	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 cefotaximu, ceftazidimu a k meropenemu. Správnou identifikaci uvedlo všech 121 laboratoří.

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 Enterobacterales, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

**Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 4 *Klebsiella pneumoniae***

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	%
cefotaxim	EUCAST [1]	5 $\mu\text{g}$	$\geq 20$	16 - 17	$\leq 1$	4 - 4	I/R***	114/121	94,2
	CLSI [2]	30 $\mu\text{g}$	$\geq 26$	24 - 26					
ceftazidim	EUCAST [1]	10 $\mu\text{g}$	$\geq 22$	23 - 24	$\leq 1$	1 - 1	C	115/121	95,0
	CLSI [2]	30 $\mu\text{g}$	$\geq 21$	27 - 28	$\leq 4$				
meropenem	EUCAST [1]	10 $\mu\text{g}$	$\geq 22$	26 - 26	$\leq 2$	0,25 - 0,25	C	117/121	96,7
	CLSI [2]		$\geq 23$		$\leq 1$				

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace; \* 5 měření diskovou difúzní metodou EUCAST; \*\* 5 měření diluční mikrometodou EUCAST; C: citlivý, R: rezistentní; \*\*\* intermediární kategorie uvedena na základě výsledků UK NEQAS, blíže viz Závěr

#### VZOREK 5: *Campylobacter jejuni*

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

**Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti kmene 5 *Campylobacter jejuni*.**

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	%
erytromycin	EUCAST [1]	15 $\mu\text{g}$	$\geq 20$	31 - 32	$\leq 4$	0,5 - 1	C	120/121	99,2
	CLSI [3]		$\geq 16$		$\leq 8$				
ciprofloxacín	EUCAST [1]	5 $\mu\text{g}$	$\geq 26$	6 - 6	$\leq 0,5$	> 4 - > 4	R	120/121	99,2
	CLSI [3]		$\geq 24$		$\leq 1$				

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

## Závěr

Kmen 4 byl součástí kontroly kvality, zaslané z UK NEQAS účastníkům EARS-Net pod číslem 4321. Referenční výsledky vyšetření citlivosti UK NEQAS udávají, že kmen k



4321 je k cefotaximu intermediární/rezistentní a k ceftazidimu a meropenemu citlivý. Výsledky NRL pro antibiotika byly v souladu s výsledky UK NEQAS.

Několik laboratoří hlásilo u kmene 4 výskyt morfologicky odlišných kolonií s rozdílnou citlivostí k cefotaximu (a k aminoglykosidům).

V NRL pro antibiotika byla primokultura i subkultura kmene 4 na MH agaru homogenní, disociované kolonie nebyly pozorovány a citlivost byla vyšetřena obvyklým způsobem. Po upozornění některých účastníků EHK 1032 na disociaci kultury ze vzorku 4 byly morfologicky odlišné kolonie pozorovány až po vyočkování na selektivní McConkey agar. U těchto morfologicky rozdílných kolonií potvrdila NRL pro antibiotika malé odchylky v hodnotách MIC a inhibičních zón u cefotaximu, které však neovlivnily kategorii citlivosti. Rozdíl v kategorii byl zaznamenán u gentamicinu (MIC 0,5 mg/l u světlých kolonií a > 16 mg/l u tmavých kolonií), gentamicin však nebyl v EHK 1032 požadován.

Při vyšetření citlivosti z lyofilizátu se po vyočkování na příslušné kultivační, případně selektivní půdy, doporučuje nejvýše jedna pasáž vyrostlých kolonií (viz Průvodní dopis k EKH Bakteriologická diagnostika). Půdy zvolené pro kultivaci musí zahrnovat i neselektivní půdu (agar MH, případně MH-F pro náročné bakterie) pro relevantní vyšetření citlivosti. Nedodržení těchto podmínek (opakované pasáže kultury, vyšetření citlivosti ze selektivní půdy) může mít vliv na stimulaci disociace kultury s rozdílnými vlastnostmi kolonií včetně odlišné antibiotické citlivosti.

U kmene 5 několik laboratoří nahlásilo problémy s růstem kmene, což mohlo být způsobeno kultivací lyofilizovaného kmene na selektivním medium v kombinaci s nižší teplotou než doporučených 42°C. Všem dotčeným laboratořím byl zaslán náhradní vzorek na tamponu.

## 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] CLSI. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. 3rd ed. Wayne, Pa. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

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