



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/5-1/2021 (EHK 1177)**

**Bakteriologická diagnostika**

**Praha, duben 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/5-1/2021 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-1/2021 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 na webových stránkách SZÚ (<http://www.szu.cz/programy-zpusobilosti-pro-mikrobiologicke-laboratore>) po přihlášení kódem a heslem v záložce „Vyhodnocené výsledky“.

### **Zprávu vypracoval:**

Mgr. Renáta Šafránková, MVDr. Zuzana Ileninová, PhD., Mgr. Petra Klimešová, RNDr. Petr Petráš, CSc., RNDr. Pavla Urbášková, CSc., Mgr. Jana Zavadilová

### **Zprávu autorizoval:**

Mgr. Renáta Šafránková  
Dne: 16. 4. 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/5-1**

Identifikace série:	EHK 1177
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-1177/1-5/2021
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.
Termín distribuce vzorků:	8. 2. 2021 (humánní lab.)
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
Způsob distribuce:	Přepravní službou (zajišťuje Koordinační pracoviště ESPT 2)
Předání výsledků:	Elektronicky do 1.3. 2021
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4
Určení maximální směrodatné odchylky:	Neprovádí
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Výsledky získané v NRL
Termín uveřejnění očekávaných výsledků:	11. 3. 2021
Termín zveřejnění závěrečné zprávy:	24. 5. 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. *Corynebacterium ulcerans*
2. *Erysipelothrix rhusiopathiae*
3. *Shigella boydii*
4. *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus*
5. *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus*

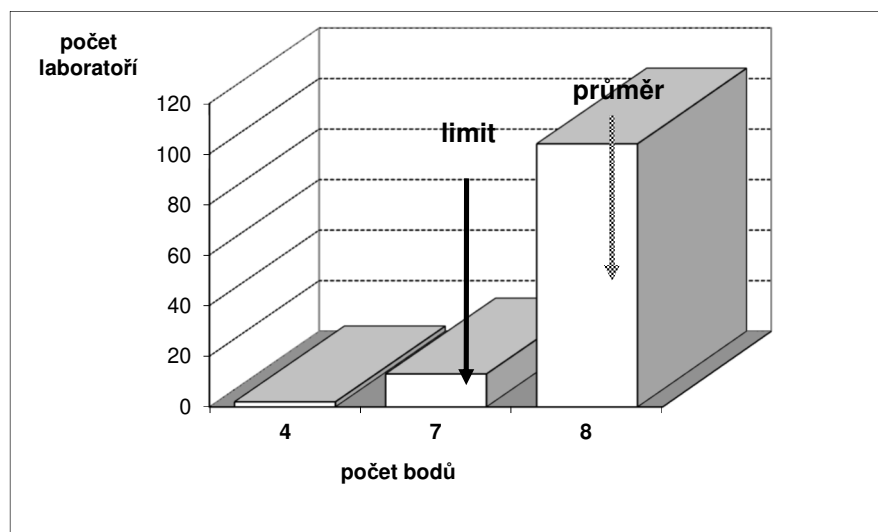
## 4. Způsob hodnocení

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 104, tj. 87,4% laboratoří. Limit pro úspěšné absolvování byl 6,640 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj.  $7,824 - (2 \times 0,592) = 6,640$ ). Tohoto limitu dosáhlo 117 laboratoří, 2 laboratoře tento limit nesplnily.

### Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Výtěr z tonsil u pacienta s bolestí v krku (podezření na záškrt).

ODPOVĚĎ: ***Corynebacterium ulcerans***

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	117	2	98,3%
<i>Corynebacterium sp.</i>	1	1	0,8%
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</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.

Většina laboratoří (117 ze 119) identifikovala kmen správně jako *Corynebacterium ulcerans*, jedna laboratoř kmen určila jako *Corynebacterium species*. Pouze 20 laboratoří (tj. 16,80%) správně poznamenalo, že by kmen odeslali do NRL pro pertusi a difterii ke stanovení produkce difterického toxinu.

*Corynebacterium ulcerans* je fylogeneticky vysoce příbuzné s *Corynebacterium diphtheriae* a může produkovat difterický toxin. Toxigenní kmeny *C. ulcerans* jsou vzácnými původci onemocnění připomínající klasickou diftérii (faryngeální či kožní formu). Kmeny neprodukující toxin se podílí na patogenezi různých zánětů především kožních. Záchyt izolátů se objevuje nejčastěji ve spojení s cestovatelskou anamnézou nebo chovem zvířat.

Roste na krevním agaru (vytváří malou zónu hemolýzy) a na agaru obohaceným teluričitanem draselným (suché, našedlé, neprůhledné kolonie).

VZOREK 2: Izolát z excidované tkáně od veterinárního pracovníka s rannou infekcí.

ODPOVĚĎ: ***Erysipelothrix rhusiopathiae***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	117	2	98,3%
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	1	0	0,8%
<i>Shigella</i> sp.	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.

Většina zúčastněných laboratoří, tj. 98,3%, odpověděla správně a získala po dvou bodech.

VZOREK 3: Stoličky od 31-letého pacienta s krvavým průjmem s cestovatelskou anamnézou.

ODPOVĚĎ: ***Shigella boydii***

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Shigella boydii</i>	96	2	80,7%
<i>Shigella</i> spp.*	8	2	6,7%
<i>Shigella flexneri</i> (susp.)**	2	2	1,7%
<i>Shigella flexneri</i>	11	1	9,2%

<i>Shigella dysenteriae</i>	1	1	0,8%
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	1	0	0,8%
Celkem	119		100%

Z 20 laboratoří s nejvyšším dosaženým počtem bodů za minulý rok uvedlo správný výsledek 18 laboratoří. Vzorek je možno hodnotit.

\* s pozn. „zasláno na ověření do NRL“

\*\* s pozn. „suspektně *S. flexneri*, zasláno na ověření do NRL“

Shigelóza je hlavní příčinou úmrtí dětí na průjmová onemocnění v rozvojových zemích. U nás se vyskytuje vzácně, zejména u osob s nízkou úrovní hygieny anebo jako importovaná nákaza po návratu ze zahraničí. V posledních letech je hlášeno okolo 100 případů za rok (dle dat ISIN, EPIDAT).

Shigelová infekce se typicky manifestuje jako dysenterie, úporný průjem s přítomností krví a hlenu ve stolici. Zdaleka ne vždy ale infekce probíhá takto výrazně, běžná je také přítomnost pouze vodnatého průjmu [1].

*S. boydii* je celosvětově méně častá než *S. sonnei* a *S. flexnerii*. Nejvíce se vyskytuje v oblasti Bangladéše a jihovýchodní Asie [2].

Identifikace *Shigella sp.* je založena na výsledku sérotypizace, který musí být v souladu s biochemickým profilem kmene. V případě nejasných nebo nekonzistentních výsledků vždy doporučujeme zaslat kmen do NRL pro *E. coli* a shigely.

#### Literatura

- [1] Tickell KD *et al.* Identification and management of *Shigella* infection in children with diarrhoea: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2017;5(12):1235-1248.
- [2] Anderson M, Sansonetti PJ and Marteyn BS. *Shigella* Diversity and Changing Landscape: Insights for the Twenty-First Century. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2016, 6:45.

VZOREK 4: Izolát z hemokultury od pacienta s akutní plicní nedostatečností po mimohrudní operaci.

ODPOVĚD: ***Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	64	2	53,8%
<i>Staphylococcus hominis</i>	52	2	43,7%
<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	3	2	2,5%
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 ke klindamycinu. Více než polovina (53,8 %) laboratoří správně identifikovala rod, druh i subspecies kmene ze vzorku 4. Většina ostatních pracovišť zařadila izolát do správného druhu, pouze 3 laboratoře ho identifikovaly jako nepřesný poddruh. Nicméně i těmto pracovištím byly uděleny 2 body. *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* patří k nejčastějším stafylokokům izolovaným z klinického materiálu [1]. Byl popsán v roce 1998 [2] a již v původní práci je konstatováno, že se jedná o významného patogena především infekcí krevního řečiště, spojených se zdravotní péčí. Kmeny jsou velice často multirezistentní [3]. MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie nedokáže oba poddruhy rozlišit, ale stačí provést jednoduchý test rezistence k novobiocinu, který je u subsp. *novobiosepticus* pozitivní (inhibiční zóna je  $\leq 16$  mm). Kvůli této vlastnosti dostal i jméno.

Kmen je při standardním dávkování citlivý ke kotrimoxazolu a ke klindamycinu je rezistentní i při zvýšené expozici.

Dvě laboratoře chybovaly u kotrimoxazolu a dvě u klindamycinu. 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 klindamycinu pro stafylokoky, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

**Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti<sup>1</sup> kmene 4 *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus*.**

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	25 μg	≥ 17	< 14	22 - 23	≤ 2	> 4	0,5 - 1	117	1	1	98,3
klindamycin	2 μg	≥ 22	< 19	6 - 6	≤ 0,25	> 0,5	> 4 - > 4	2	0	117	98,3

<sup>1</sup> metoda vyšetření a interpretace výsledků podle EUCAST 2021 [4]

<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

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace

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

#### VZOREK 5: *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus*

Kmen 5 je při standardním dávkování citlivý ke kotrimoxazolu i ke klindamycinu. Dvě laboratoře chybovaly u kotrimoxazolu a jedna u klindamycinu. Celkové výsledky vyšetření citlivosti kmene ze vzorku 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje breakpointy inhibičních zón (IZ) minimálních inhibičních koncentrací (MIC) kotrimoxazolu a



klindamycinu pro stafylokoky, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

**Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti<sup>1</sup> kmene 5 *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus*.**

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	25 µg	≥ 17	< 14	21 - 22	≤ 2	> 4	1 - 1	117	0	2	98,3
klindamycin	2 µg	≥ 22	< 19	30 - 30	≤ 0,25	> 0,5	0,125 - 0,125	118	0	1	99,2

<sup>1</sup> metoda vyšetření a interpretace výsledků podle EUCAST 2021 [4]

<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

IZ: inhibiční zóna; MIC: minimální inhibiční koncentrace

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

## 6. Závěr

V sérii 1177 humánní EHK dosáhly laboratoře > 98 % správných výsledků vyšetření citlivosti ke kotrimoxazolu i ke klindamycinu u obou vyšetřovaných kmenů *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus*.

Obecně lze v této sérii konstatovat, že zřejmě nepozornost při vkládání výsledků identifikace do elektronického formuláře nebo při manipulaci se vzorky, mohla za konfuční výsledky dvou laboratoří u vzorků 1 až 3.

## Literatura

- [1] Petráš P, Měřinská T, Hutníková R. Identifikace koaguláza negativních stafylokoků z klinického materiálu v NRL pro stafylokoky v letech 2000 – 2020. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2021; 30(2): 61 – 67.
- [2] Kloos WE, Ballard DN, George CG, et al. *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* subsp. nov., a novel trehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and multiple antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures. *Int J Syst Bacteriol*. 1998; 48(3): 799-812.
- [3] Petráš P. *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* - významné agens nozokomiálních infekcí krevního řečiště? *Klin mikrobiol inf lék*. 2000; 6(8): 257-261
- [4] 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 reklamaci vyhodnocení série postupujte, prosím, dle reklamačního řádu.

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY