



Státní zdravotní ústav
Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti
Odborně způsobilý poskytovatel zkoušení způsobilosti č. 7001TC posouzený ČIA
podle ČSN EN ISO/IEC 17043:2023
Šrobárova 49/48, 100 00, Praha 10

Závěrečná zpráva

Zkoušení způsobilosti v lékařské mikrobiologii
(Externí hodnocení kvality)

PT#M/5-1/2025 (EHK 1461)

Bakteriologická diagnostika

Praha, květen 2025

Obsah

1.	Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing)	3
2.	Způsob přípravy vzorků	3-4
3.	Charakteristika materiálu	4
4.	Způsob hodnocení	4
5.	Vyhodnocení	5-12
6.	Závěr	12
	Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/5-1/2025 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-1/2025 byly prováděny podle standardního operačního postupu koordinátora programu na pracovišti Expertní skupiny pro zkoušení způsobilosti (ESPT) Státního zdravotního ústavu (SZÚ).

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:

RNDr. Renáta Šafránková, Ph.D., Ing. Monika Havlíčková, Ph.D., RNDr. Vladislav Jakubů, Ph.D., Mgr. Jana Zavadilová

Zprávu autorizoval:

RNDr. Renáta Šafránková, Ph.D.

Dne: 28. 5. 2025

Pracoviště 2 ESPT

ehk@szu.cz

<https://szu.cz/sluzby/zkouseni-zpusobilosti/zkouseni-zpusobilosti-pro-lekarskou-mikrobiologii/>

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT#M/5-1/2025

Identifikace cyklu:	EHK 1461
Název PT:	Bakteriologická diagnostika
Koordinátor:	RNDr. Renáta Šafránková, Ph.D.
Podstata a účel PT:	Identifikace bakteriálních patogenů a stanovení citlivosti k antimikrobním preparátům
Kritéria pro účast na PT:	Dodržení správné laboratorní praxe
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3 závěrečné zprávy
Hodnocené ukazatele:	Identifikace bakteriálních patogenů
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2 závěrečné zprávy
Počet účastníků:	111
Termín distribuce vzorků:	17. 2. 2025
Informace účastníkům:	viz Informace pro účastníky zaslané spolu se vzorky
Termín pro odeslání výsledků účastníky:	10. 3. 2025
Označení vzorkovnic:	EHK-1461/1-5/2025
Zabezpečení jakosti vzorku včetně testu homogenity a stability:	Viz kapitola 2 závěrečné zprávy
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4 závěrečné zprávy
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Výsledky dosažené v NRL
Určení maximální směrodatné odchylky:	Aritmetický průměr všech hodnocených laboratoří minus 2 směrodatné odchylky. Laboratoř úspěšně absolvuje kolo EHK, pokud dosáhne bodového limitu, který se vypočítává podle vzorce: Limit = aritmetický průměr výsledků všech hodnocených laboratoří minus dvě směrodatné odchylky. Pokud se v hodnocené skupině vyskytne pracoviště s extrémně nízkým bodovým ziskem (<50 % maximálního bodového zisku), je vyloučeno z výpočtu limitu. Takové pracoviště je automaticky hodnoceno jako neúspěšné.
Termín uveřejnění předběžných výsledků:	18. 3. 2025
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	Do 2. 6. 2025

2. Způsob přípravy vzorku**2.1 Typ a uskladnění výchozího materiálu**

Výchozím materiálem pro přípravu vzorků jsou bakteriální kultury získané z České národní sbírky typových kultur, případně z klinického materiálu na pracovištích LCEM SZÚ.

Výchozí materiál je dlouhodobě uskladněn v lyofilizované formě při pokojové teplotě nebo hluboce zamražen při -80°C.

2.2 Zpracování výchozího materiálu

Kultury bakterií jsou před použitím rozmrazeny, lyofilizované kultury rehydratovány živným bujónem a poté naočkovány na živná média a inkubovány v termostatu při teplotě 36°C. Médium se označí datem očkování a identifikací mikroorganismu. Dle

druhu mikroorganismu jsou naočkovány 2 – 4 živné půdy. Kmeny jsou inkubovány v termostatu při 35-36°C ve vhodné atmosféře 24h, pomalu rostoucí mikroorganismy 48h. Po inkubaci je vizuálně hodnocen růst a čistota kultury. Kontaminované misky jsou před lyofilizací vyřazeny.

Narostlé kultury mikroorganismů jsou setřeny sterilním vatovým tamponem z povrchu agarů a resuspendovány ve 4 ml fyziologického roztoku. Denzita výsledného zákalu musí odpovídat McFarlandově standardě 6 (přibližně $1,8 \times 10^9$ org. ml⁻¹). Dle požadované výsledné koncentrace bakterií je případně připraveno ředění zákalu ve stupni 10^{-1} - snadná izolace, 10^{-2} - středně obtížná izolace až 10^{-3} - obtížná izolace. Ředění se připraví napipetováním 1ml suspenze bakterií o hustotě McFarland 6 do 9ml fyz. roztoku (ředění 10^{-1}); přenesením 1ml z ředění 10^{-1} do 9ml fyz. roztoku se připraví ředění 10^{-2} , přenesením 1ml z ředění 10^{-2} do 9ml fyz. roztoku ředění 10^{-3} . Automatickou pipetou je napipetováno 0,7 ml vzniklé suspenze nebo požadovaného ředění do 70 ml lyofilního média. Suspenze je homogenizována a rozplněna do jednotlivých lahviček (vzorků) o objemu min. 0,5 ml. Vzorky jsou označeny pořadovým číslem 1-5, číslem EHK a datem rozeslání. Před plněním se lahvička vždy sterilizuje nad plamenem. Lahvičky se uzavřou gumovým uzávěrem pomocí pinzety tak, aby byl ponechán prostor pro odpaření. Rozplněné lahvičky jsou umístěny na kovovou snímatelnou plošinu lyofilizátoru rovnoměrně po celé její ploše. Po rozplnění lahviček je 1 kapka ze zbylé suspenze inokulována na živný agar a inkubována pro kontrolu sterility. Kovová plošina s lahvičkami se vloží do mrazicího boxu na -80°C. Po 3 hodinách se plošina s lahvičkami vloží do lyofilizačního přístroje, kde probíhá vlastní lyofilizace.

Po kontrole lyofilizátů jsou lahvičky opatřeny pertlí pomocí pertlovacích kleští a označeny nálepkou pro identifikaci lyofilizátu. Takto označené a zapertlované lahvičky jsou vloženy do plastového obalu a skladovány při teplotě 4 – 8°C.

Stabilita výchozího materiálu je zabezpečena lyofilizací kultur.

Homogenita je zajištěna promícháním vzorků před zahájením alikvotování do vzorkovnic.

3. Charakteristika materiálu

Simulované klinické vzorky obsahující:

1. *Bordetella holmesii* (edukativní vzorek)
2. *Listeria monocytogenes*
3. *Escherichia coli* O145
4. *Enterococcus faecalis*
5. *Streptococcus pneumoniae*

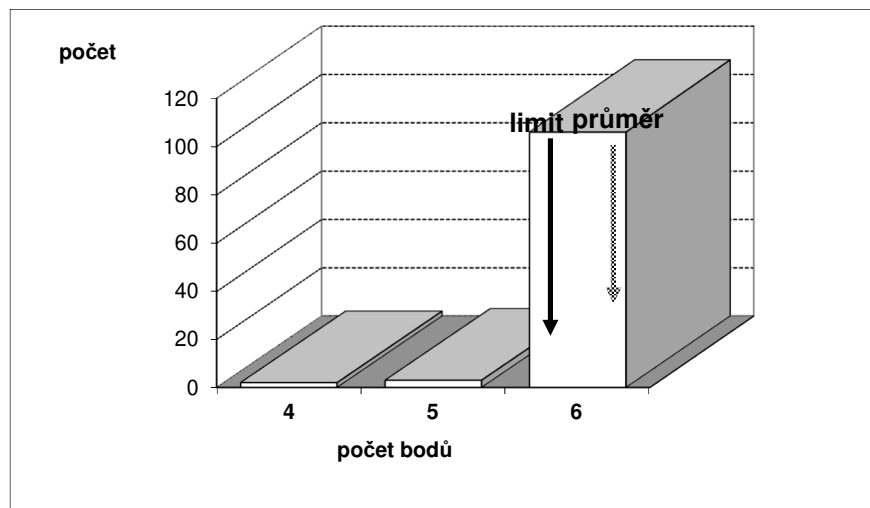
4. Způsob hodnocení

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

Za identifikaci signifikantního patogena ve 3 vzorcích mohly laboratoře získat maximálně 6 bodů, vzorek 1 byl edukativní a nehodnotil se. Bodování pro identifikaci bylo provedeno ve stupnici 2, 1 a 0 bodů. Hodnocení (resp. bodování) vyšetření citlivosti k antibiotikům 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 106 laboratoří, tj. 95,5%. Limit pro úspěšné absolvování byl 5,317 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $5,937 - (2 \times 0,310) = 5,317$). Tohoto limitu dosáhlo 106 laboratoří, 5 laboratoře tento limit nesplnilo.

Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Edukativní vzorek (vzorek se nehodnotí).

Izolát z výtěru z nosohltanu od pacienta s kašlem, který nereaguje na léčbu antitusiky.

ODPOVĚď: ***Bordetella holmesii***

identifikace	frekvence	procento
<i>Bordetella holmesii</i>	101	91%
<i>Bordetella</i> sp.	10	9%
Celkem	111	100%

Vzorek 1 vyšetřilo všech 111 laboratoří, 101 laboratoří (91%) kmen správně určilo jako *Bordetella holmesii*. 10 laboratoří (9%) kmen určilo jako *Bordetella* spp., 8 laboratoří (7,2%) uvedlo, že by kmen poslalo k ověření do NRL pro pertusi a difterii.

Bordetella holmesii je jedním z původců dávivého (černého) kašle, může být i původcem závažných invazivních infekcí jako je sepsa a endokarditida. Klinické příznaky spojené s respiračním onemocněním jsou podobné jako u infekce způsobené *B. pertussis*. Očkování proti pertusi nechrání před infekcemi způsobenými *B. holmesii*. *B. holmesii* je rezistentní k ceftriaxonu, cefotaximu a trimethoprim-sulfamethaxozolu. Makrolidy používané k léčbě pertuse mají nižší účinnost proti *B. holmesii* [1]. Studie in-vitro uvádějí, že nejúčinnějšími antibiotiky k léčbě onemocnění způsobenými *B. holmesii* jsou fluorochinolony a karbapenemy [2,3,4].

Literatura

[1] Clare S, Ahmed T, Singh R, Gough S. *Bordetella holmesii*: a rare cause of bacterial endocarditis in a post-splenectomy patient. *BMJ Case Rep* 2010.

[2] Shepard CW, Daneshvar MI, Kaiser RM, Ashford DA, Lonsway D, Patel JB, Morey RE, Jordan JG, Weyant RS, Fischer M. *Bordetella holmesii* bacteremia: a newly recognized clinical entity among asplenic patients. *Clin Infect Dis* 38:799–804, 2004.

[3] Kanji J, Gee S, Ahmed-Bentley J, Lee MC, Nigrin J, Verity R, Solomon N. *Bordetella holmesii* bacteremia in Northern Alberta: a 5-year case review. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 22:22A, 2011.

[4] Nei T, Hyodo H, Sonobe K, Dan K, Saito R. First report of infectious pericarditis due to *Bordetella holmesii* in an adult patient with malignant lymphoma. *J Clin Microbiol* 50:1815–1817, 2012.

VZOREK 2: Izolát z likvoru od 75leté pacientky s hnisavou meningitidou.

ODPOVĚĎ: ***Listeria monocytogenes***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Listeria monocytogenes</i>	110	2	99,1%
<i>Listeria ivanovii</i>	1	1	0,9%
Celkem	111		100%

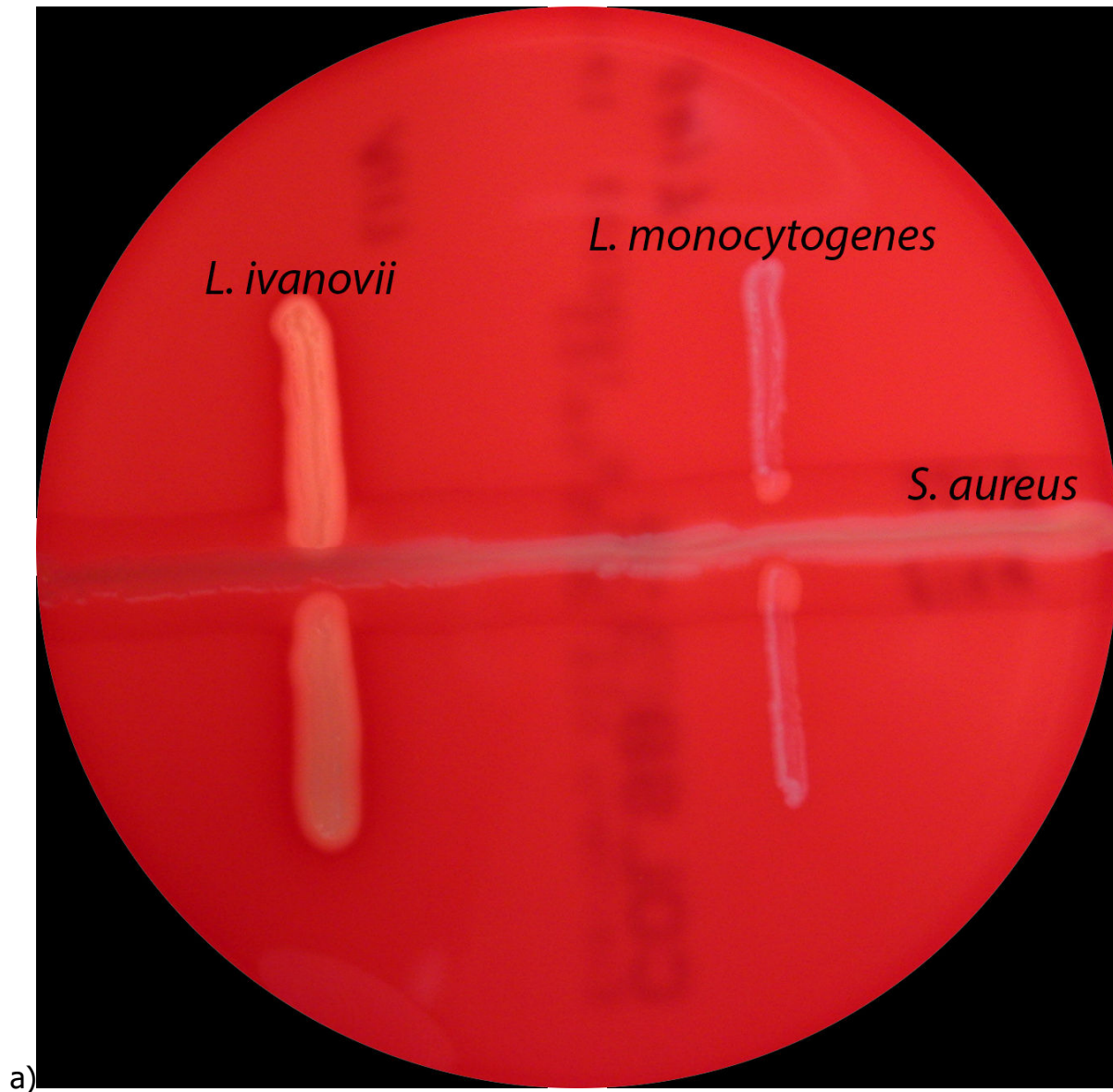
Z 20 laboratoří s nejvyšším dosaženým počtem bodů za minulý rok uvedlo správný výsledek 20 laboratoří. Vzorek je možno hodnotit.

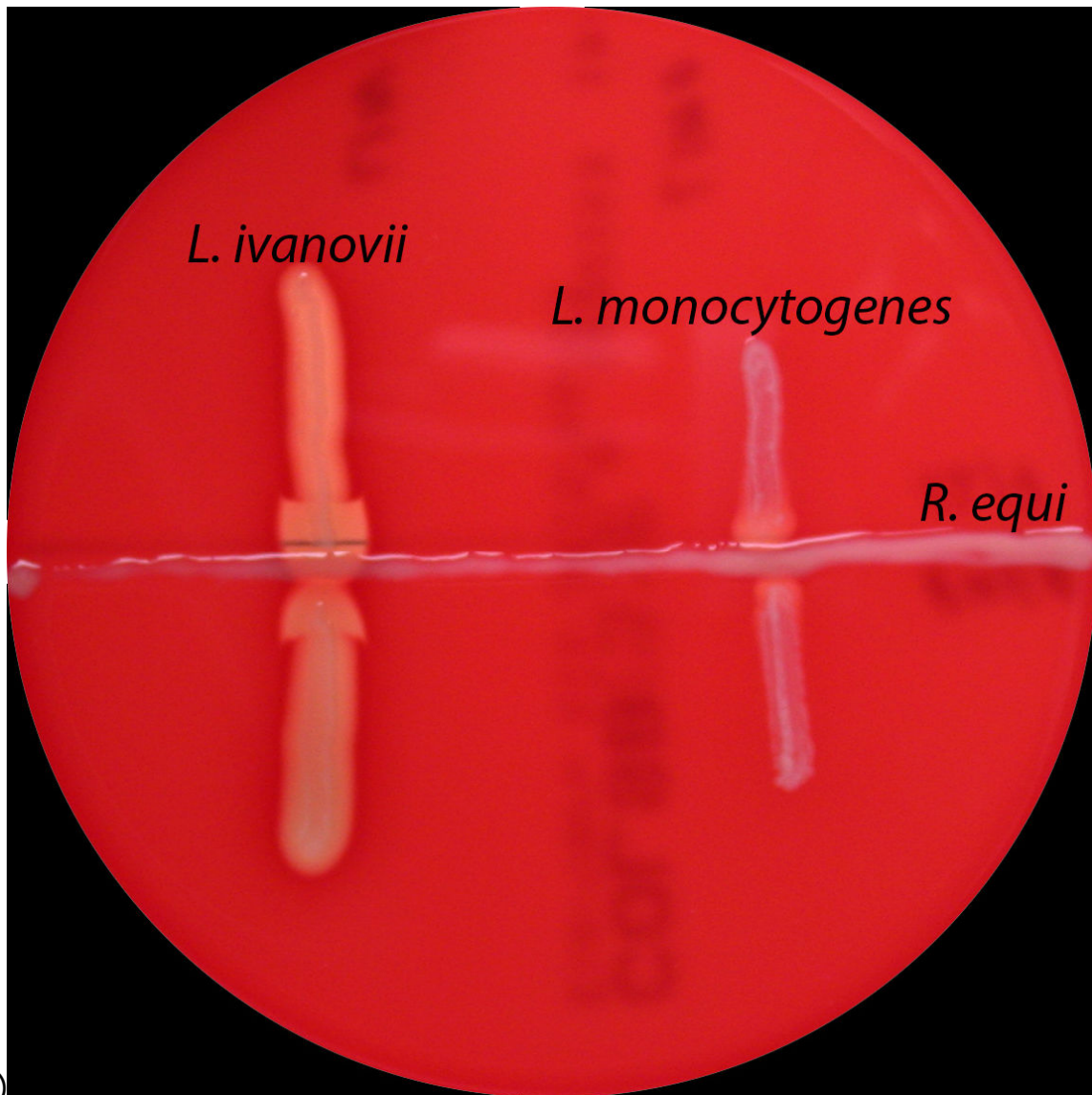
Všechny laboratoře vyjma jedné odpověděly správně a získaly po dvou bodech, laboratoř, která do výsledku uvedla jiný druh listerie, získala jeden bod.

L. ivanovii má oproti *Listeria monocytogenes* zřetelně větší zónu betahemolýzy na krevním agaru; CAMP-test se *Staphylococcus aureus* je u *L. ivanovii* negativní (na rozdíl od *L. monocytogenes*, kde je pozitivní, obr. 1a), naopak pozitivní u *L. ivanovii* je CAMP-

test s *Rhodococcus equi* (obr. 1b). Z dalších testů lze použít test okyselování ramnózy (u *L. ivanovii* negativní, u *L. monocytogenes* pozitivní) a okyselování xylózy (u *L. ivanovii* pozitivní, u *L. monocytogenes* negativní).

Bohužel pomocí MALDI-TOF MS není vždy zcela možné oba druhy od sebe spolehlivě odlišit, což bylo zřejmě příčinou neúspěchu jedné laboratoře.





b)

Obr. č.1. a) CAMP-test se *Staphylococcus aureus* je u *L. ivanovii* negativní, u *L. monocytogenes* je lehce pozitivní; b) pozitivní CAMP test u *L. ivanovii* s *Rhodococcus equi*.

VZOREK 3: Stolica od 2letého dítěte s vodnatým průjmem.

ODPOVĚĎ: ***Escherichia coli* O145**

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Escherichia coli</i> O145	92	2	82,9%
<i>Escherichia coli</i> - susp. STEC/EPEC	11	2	9,9%
Enteropatogenní <i>E. coli</i> /suspektní <i>E. coli</i> *	2	2	1,8%
<i>E. coli</i> EPEC pozitivní	1	2	0,9%
Enteropatogenní <i>E. coli</i> polyvalentní skupina III.	1	2	0,9%
<i>Escherichia coli</i> O26**	1	1	0,9%
<i>Escherichia coli</i> aglutinována séry: Trivalent I -, II-, III-, IV- O:157-***	1	1	0,9%
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0,9%
Signifikanční bakt. patogen nepřítomen	1	0	0,9%
Celkem	111		100%

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

* séro skupina O127

** bez bližšího upřesnění, zda se jedná o STEC/EPEC

*** Při přetrvávajících obtížích bychom odesílali do NRL k dourčení

E. coli O145 patří k celosvětovým původcům průjmu. Může se vyskytovat jako enteropatogenní (EPEC) (charakteristickým znakem EPEC je přítomnost genu *eae* kódujícího adhezenční faktor intimin) nebo Shiga toxin-produkující *E. coli* (STEC) (specifickým markerem a faktorem virulence jsou Shiga toxiny, kódovány geny *stx*) [1].

Některé kmeny *E. coli* O145 mohou být hemolytické na Columbia krevním agaru. Naprostá většina *E. coli* O145, které jsou zasílány do NRL pro *E. coli* a shigely k rozlišení mezi EPEC a STEC, jsou na základě PCR zařazeny do patoskupiny EPEC (nebo-li pozitivní na přítomnost genu *eae* a negativní na geny *stx*), méně než 15 % tvoří STEC [2].

STEC O145 patří k šesti nejfrekventovanějším séro skupinám Shiga toxin-produkujících *E. coli* v rámci EU/EEA [3].

Suspektní a pozitivní kmeny STEC se zasílají na základě vyhlášky 389/2023 Sb. do NRL pro *E. coli* a shigely ke confirmaci a epidemiologickým účelům.

Literatura

[1] Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 2013;26(4):822–880.

[2] Ileninová Z, Klimešová P, Schlosserová K, Kotiš J, et al. Laboratorní diagnostika Shiga toxin-produkujících *E. coli* v Národní referenční laboratoři pro *E. coli* a shigely a metodická doporučení pro klinické laboratoře. Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2022; 31(1):15-22.

[3] European Centre for Disease Prevention and Control. STEC infection. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2022. Stockholm: ECDC; 2024.

VZOREK 4: Izolát z hemokultury od pacienta s onkologickým onemocněním.

ODPOVĚď: ***Enterococcus faecalis***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Enterococcus faecalis</i>	111	2	100%
Celkem	111		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 citlivost k těmto antibiotikům: vankomycin (VAN), tigecyklin (TGC).

Izolát *Enterococcus faecalis* je citlivý (C) k vankomycinu i k tigecyklinu.

Všechny laboratoře identifikovaly správně vzorek do druhu a získaly po dvou bodech. Citlivost k vankomycinu správně interpretovaly téměř všechny laboratoře, u tigecyklinu všechny, které dodaly výsledek.

Tabulka 1 obsahuje breakpointy (BP) průměrů inhibičních zón a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) vankomycinu a tigecyklinu naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 4 *Enterococcus faecalis*

Antibiotikum	Obsah disku	Průměry IZ (mm) ¹			MIC (mg/l) ¹			Výsledky laboratoří			
								Kategorie ² / absolutní počet laboratoří ³			správný výsledek
		breakpoint		rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	C	I	R	%
		C ≥	R <		C ≤	R >					
vankomycin	5 µg	12	12	14-15	4	4	0,5-1	110	1	0	99,1
tigecyklin	15 µg	20	20	21-22	0,5	0,5	0,06-0,06	110	0	0	99,1°

¹ IZ - průměr inhibiční zóny; MIC - minimální inhibiční koncentrace. EUCAST v14

² kategorie C: citlivý při standardním dávkování, I: citlivý při zvýšené expozici; R: rezistentní

³ očekávané výsledky jsou zvýrazněny

* pět měření diskovou difúzní metodou; ** pět měření diluční mikrometodou

° jedna laboratoř výsledek nedodala

VZOREK 5: *Streptococcus pneumoniae*

Požadavek byl vyšetřit citlivost k těmto antibiotikům: penicilin (PEN), levofloxacin (LEV).

Celkové výsledky vyšetření citlivosti izolátu 5 jsou v tabulce 2, která obsahuje BP inhibičních zón (IZ) a MIC pro penicilin a levofloxacin, hodnoty naměřené v NRL pro antibiotika a výsledky laboratoří.

Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 5 *Streptococcus pneumoniae*.

Antibiotikum	Obsah disku	Průměry IZ (mm) ¹			MIC (mg/l) ¹			Výsledky laboratoří			
								Kategorie ^{2/} absolutní počet laboratoří ³			správný výsledek
		breakpoint		rozmezí hodnot naměřených v NRL *	breakpoint ⁴		rozmezí hodnot naměřených v NRL **	C	I	R	
		C ≥	R <		C ≤	R >					%
oxacilin	1 µg	20	20	6-6	-	-	-	0	6	105	94,6
penicilin ⁵	-	-	-	-	0,06	1	2-2				
norfloxacin screen	10 µg	10	10	14-16	-	-	-	6	103	0	94,5 °
levofloxacin	-	-	-	-	0,001	2	1-1				

¹ IZ - průměr inhibiční zóny; MIC - minimální inhibiční koncentrace. EUCAST v14

² kategorie C: citlivý při standardním dávkování, I: citlivý při zvýšené expozici; R: rezistentní

³ očekávané výsledky jsou zvýrazněny

⁴ hodnoty mezi C a R jsou I

⁵ uvedeny breakpointy pro infekce jiné než meningitida a endokarditida

* pět měření diskovou difuzní metodou; ** pět měření diluční mikrometodou

° dvě laboratoře výsledek nedodaly

Kmen *Streptococcus pneumoniae* je rezistentní k penicilinu (R) a při zvýšené expozici citlivý k levofloxacinu (I). U obou antibiotik interpretovalo výsledky správně téměř 95 % laboratoří.

Diskuse

Toto kolo EHK se u vzorků 4 a 5 mimo jiné zaměřilo na antibiotika, u kterých došlo od ledna 2025 ke změně klinických breakpointů. Tento fakt možná některé laboratoře nezaznamenaly a mohl být tak příčinou několika chybných interpretací penicilinu u vzorku *Streptococcus pneumoniae*. EUCAST od roku 2025 totiž snížil breakpoint pro rezistenci u penicilinu z 2 mg/l na 1mg/l (u infekcí jiných než meningitida a endokarditida)! U enterokoků pak EUCAST naopak zvýšil breakpoint u tigecyklinu z 0,25 mg/l na 0,5 mg/l. Šest laboratoří interpretovalo dále levofloxacin jako citlivý, přestože EUCAST u této kombinace kategorii „Citlivý“ nepřipouští. Obdobně u vankomycinu není platná kategorie „I“, kterou uvedla jedna laboratoř.

Literatura

- [1] EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 15, valid from 2025-01-01 [on-line]. Dostupný z WWW: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/

6. Závěr

Celkem byly vzorky rozeslány 111 laboratořím, 111 laboratoří odeslalo výsledek k vyhodnocení. Uspělo 106 laboratoří.

V případě reklamací vyhodnocení série, prosím, postupujte dle reklamačního řádu. Pro zadání reklamace použijte webovou aplikaci SZÚ.

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY