



Státní zdravotní ústav
Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti
Poskytovatel zkoušení způsobilosti č. 7001 akreditovaný 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/5-3/2025 (EHK 1489)
Bakteriologická diagnostika

Praha, listopad 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	5
5.	Vyhodnocení	5-9
6.	Závěr	9
	Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/5-3/2025 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-3/2025 byly prováděny podle standardního operačního postupu koordinátora programu 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 ve webové aplikaci SZÚ v odkazu: <https://ehk.szu.cz/EHK10/> po přihlášení kódem laboratoře a heslem.

Zprávu vypracoval:

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

Zprávu autorizoval:

RNDr. Renáta Šafránková, Ph.D.

Dne: 18. 11. 2025

Pracoviště 2 ESPT

ehk@szu.gov.cz

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

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT#M/5-3/2025

Identifikace cyklu:	EHK 1489
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:	110
Termín distribuce vzorků:	1. 9. 2025
Informace účastníkům:	viz Informace pro účastníky zaslané spolu se vzorky
Termín pro odeslání výsledků účastníky:	22. 9. 2025
Označení vzorkovnic:	EHK-1489/1-5/2025
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:	1. 10. 2025
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	Do 15. 12. 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. *Corynebacterium ulcerans*
2. *Serratia marcescens*
3. *Plesiomonas shigelloides*
4. *Streptococcus dysgalactiae*
5. *Salmonella* Enteritidis

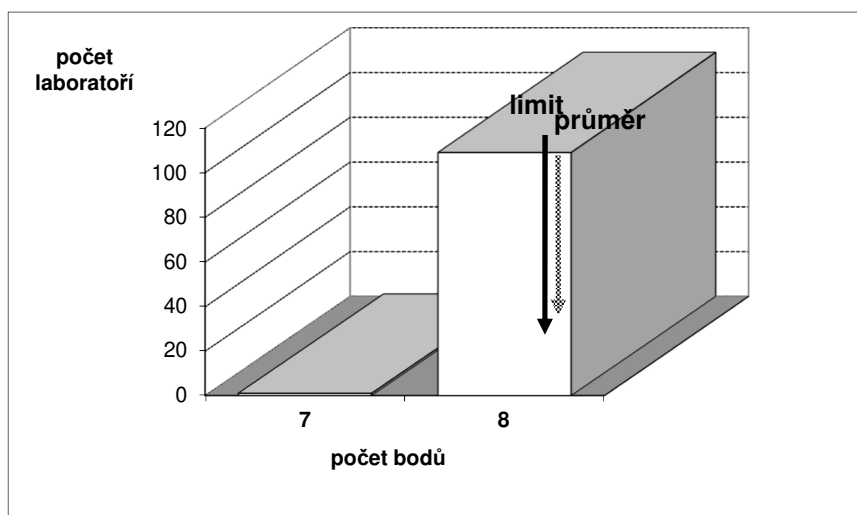
4. Způsob hodnocení

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 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 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 109 laboratoří, tj. 99,1%. Limit pro úspěšné absolvování byl 7,801 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. $7,991 - (2 \times 0,095) = 7,801$). Tohoto limitu dosáhlo 109 laboratoří, 1 laboratoř tento limit nesplnila.

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 lactamica*

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	109	2	99,1%
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	1	1	0,9%
Celkem	110		100%

Z 20 laboratoří s nejvyšším dosaženým počtem bodů za minulý rok uvedlo správný výsledek 19 laboratoří. Vzorek je možno hodnotit.

Většina laboratoří (109 ze 110) kmen určila správně jako *Corynebacterium ulcerans*. Pouze 1 laboratoř kmen identifikovala jako *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 55 laboratoří (tj. 50%) 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. Cesta přenosu onemocnění je ze zvířete na člověka. Toxigenní kmeny *C. ulcerans* jsou původci onemocnění připomínající klasickou difterii (faryngeální či kožní formu). Kmeny neprodukující toxin se podílí na patogenezi různých zánětů, především kožních. Záchyt kmenů *C. ulcerans* se objevuje nejčastěji ve spojení s cestovatelskou anamnézou nebo chovem zvířat.

Při biochemickém rozlišení *C. ulcerans* a *C. pseudotuberculosis* testem API Coryne nám pomůže test fermentace glykogenu, který je u *C. ulcerans* pozitivní a u *C. pseudotuberculosis* negativní.

C. ulcerans roste na krevním agaru a na agaru obohaceném teluričitanem draselným (suché, našedlé, neprůhledné kolonie).

VZOREK 2: Izolát z moče od pacienta z JIP.

ODPOVĚď: ***Serratia marcescens***

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Serratia marcescens</i>	110	2	100%
Celkem	110		100%

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

Všechny zúčastněné laboratoře identifikovaly signifikantního patogena správně a získaly po 2 bodech.

VZOREK 3: Stolicе od pacienta 45 let s vodnatým průjmем a dyspepsií.

ODPOVĚĎ: ***Plesiomonas shigelloides***

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

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	110	2	100%
Celkem	110		100%

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

Všechny zúčastněné laboratoře správně určily *P. shigelloides* jako signifikantního patogena a získaly po 2 bodech.

VZOREK 4: Izolát z výtěru z krku od pacienta s bolestí v krku a horečkou.

ODPOVĚĎ: ***Streptococcus dysgalactiae*/ β hemolytický streptokok sk. G**

identifikace	frekvence	body	procento
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	66	2	60%
β hemolytický streptokok sk. G	44	2	40%
Celkem	110		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: penicilin (PEN) a klindamycin (CLI).

Kmen je rezistentní (R) k penicilinu i ke klindamycinu [1].

Všechny laboratoře identifikovaly signifikantního patogena správně a získaly po dvou bodech.

Klindamycin reportovaly správně jako rezistentní všechny laboratoře. Pouze 47,7 % účastníků interpretovalo penicilin správně jako rezistentní.

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

Tabulka 1. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 4 *Streptococcus dysgalactiae*.

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 >					%
penicilin	1 J	23	23	19-20	0,03	0,03	0,06	52	3	54	47,7
klindamycin	2 µg	17	17	6	0,5	0,5	>4	0	0	110	100

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 difuzní metodou; ** pět měření diluční mikrometodou

VZOREK 5: *Salmonella Enteritidis*

Požadavek byl vyšetřit citlivost k těmto antibiotikům: ampicilin (AMP), ciprofloxacin (CIP).

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

Tabulka 2. Výsledky vyšetření citlivosti¹ kmene 5 *Salmonella Enteritidis*.

Antibiotikum	Obsah disku	Průměry IZ (mm) ¹			MIC (mg/l) ¹			Výsledky laboratoří			
								Kategorie ² / absolutní počet laboratoří ³			správný výsledek
		breakpoint ⁴		rozmezí hodnot naměřených v NRL*	breakpoint ⁴		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	C	I	R	
		C ≥	R <		C ≤	R >					%
ampicilin	10 µg	14	14	24-26	8	8	1-2	110	0	0	100
ciprofloxacin					0,06	0,06	0,125	4	1	105	95,5
pefloxacin	5 µg	24	24	18-20							

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

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

Kmen je citlivý (C) k ampicilinu a rezistentní (R) k ciprofloxacinu (pefloxacin screen) [1].

Všechny laboratoře správně určily kmen jako citlivý k ampicilinu. Velmi vážná chyba byla zaznamenána u pěti laboratoří, které nezjistily rezistenci k ciprofloxacinu.

Diskuse

Pět laboratoří interpretovalo ciprofloxacin u vzorku 5 chybně jako citlivý (4x C, 1x I). Problémy s interpretací jsou zřejmě způsobeny tím, že laboratoře nemají pro *Salmonella* spp. nastaveny správné breakpointy, které se právě u tohoto rodu specificky odlišují od celé skupiny *Enterobacterales*.

U vzorku č. 4, identifikovaného jako *Streptococcus dysgalactiae*, se objevily komplikace při interpretaci citlivosti k penicilinu. Lze uvažovat o dvou nejpravděpodobnějších vysvětleních tohoto jevu:

1. **Inherentní biologická variabilita**
2. **Revize breakpointů EUCAST:** Od roku 2025 došlo k zásadní aktualizaci interpretace penicilinu u *S. dysgalactiae*. EUCAST posunul hranici pro diskovou difuzní metodu z 18 mm na 23 mm a pro bujonovou mikrodiluční metodu z 0,25 mg/l na 0,03 mg/l. Podle Tabulky breakpointů verze 14 [2] by tak byl tento kmen hodnocen konzistentně jako citlivý, a to bez ohledu na použitou metodu. Změna z 0,25 mg/l na 0,03 mg/l je poměrně dramatická a ukazuje na přehodnocení farmakodynamických dat i klinických zkušeností.

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/
- [2] EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.

6. Závěr

Celkem byly vzorky rozeslány 110 laboratořím, 110 laboratoří odeslalo výsledek k vyhodnocení. Uspělo 109 laboratoří.

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

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY