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/5-4/2025 (EHK 1503)

Bakteriologická diagnostika

Praha, únor 2026

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	5-10
6.	Závěr	10
	Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/5-4/2025 byl zaměřen na bakteriologickou diagnostiku. Návrh a realizace PT#M/5-4/2025 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., Ing. Monika Havlíčková, Ph.D., RNDr. Vladislav Jakubů, Ph.D., prof. MUDr. Helena Žemličková, Ph.D.

Zprávu autorizoval:
RNDr. Renáta Šafránková, Ph.D.
Dne: 2. 2. 2026

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/5-4/2025

Identifikace cyklu:	EHK 1503
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:	3. 11. 2025
Informace účastníkům:	viz Informace pro účastníky zaslané spolu se vzorky
Termín pro odeslání výsledků účastníky:	24. 11. 2025
Označení vzorkovnic:	EHK-1503/1-5/2025
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 mínus 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:	2. 12. 2025
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	Do 16. 2. 2026

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 rozmraženy, 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 agaru 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. *Moraxella catarrhalis*
2. *Streptococcus agalactiae*
3. *Shigella sonnei*
4. *Klebsiella pneumoniae*
5. *Haemophilus influenzae*

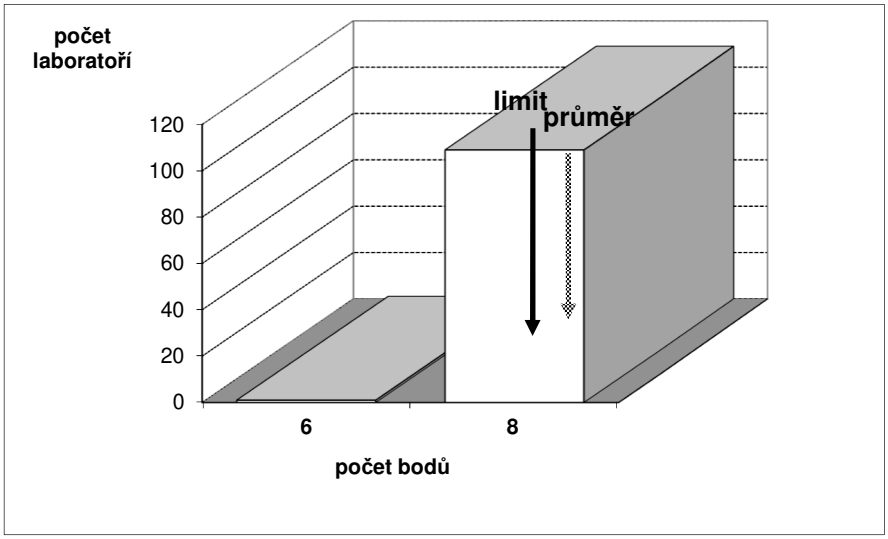
4. Způsob hodnocení

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 7,6 bodů, (aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky, tj. 7,982 – (2x0,191) = 7,6). Tohoto limitu dosáhlo 109 laboratoří, 1 laboratoř tento limit nesplnila.

Výsledky zúčastněných laboratoří

VZOREK 1: Hnis od 4letého dítěte po paracentéze.
ODPOVĚĎ: ***Moraxella catarrhalis*** Vzorek dále obsahoval: *Streptococcus oralis*

identifikace	frekvence	body	procento
Moraxella catarrhalis	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 identifikovaly signifikantního patogena a získaly po 2 bodech.

VZOREK 2: Izolát z likvoru od novorozence se sepsí a meningitidou.
ODPOVĚĎ: ***Streptococcus agalactiae***

identifikace	frekvence	body	procento
Streptococcus agalactiae	108	2	98,2%
β hemolytický streptokok sk. B	2	2	1,8%
Celkem	110		100%

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

Identifikace signifikantního patogena ve vzorku 2 nečinila obtíže a všechny zúčastněné laboratoře získaly po dvou bodech.

VZOREK 3: Stolice od pacienta 35 let s průjmem, křečemi v břiše a horečkou.
ODPOVĚĎ: ***Shigella sonnei*** Vzorek dále obsahoval: *Escherichia coli, Enterococcus faecalis*

identifikace	frekvence	body	procento
Shigella sonnei	109	2	99,1%
Escherichia coli + *Shigella dysenteriae*	1	0	0,9%
Celkem	110		100%

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

Shigelóza je vysoce nakažlivé infekční onemocnění podléhající Vyhlášce o systému epidemiologické bdělosti pro vybraná infekční onemocnění 389/2023 Sb. (příloha č. 47). Onemocnění se projevuje úporným průjmem (často s příměsí hlenu a krve), horečkou a tenesmy.
V roce 2025 bylo v ČR hlášeno 117 případů shigelóz [1].
Shigela je striktně humánní patogen s typicky nízkou infekční dávkou (již 10-100 bakterií). Přenos se děje fekálně-orální cestou, v rozvojových zemích je významnou cestou přenosu kontaminovaná voda. V rozvinutých zemích je nejčastěji izolována *Shigella sonnei* (70-84 % infekcí), zatímco *S. flexneri*, *S. boydii* a *S. dysenteriae* jsou vzácné a většinou importované [2]. *S. sonnei* se dostává do popředí i v rozvojových zemích a představuje globální problém [3].
Shigella sonnei se při růstu na pevné půdě obvykle dělí na kolonie dvojí morfologie – plazivé s vlnitým okrajem a malé vypouklé, vyskytuje se tzv. ve dvou fázích. Pro shigely je typická inaktivní biochemie (negativní lysin, arginin, laktóza, produkce plynu a motilita). U *S. sonnei* oproti ostatním shigelám většinou odečítáme pozitivní ornitin, ß galaktosidázu, maltózu a často i rhamnózu (u 75 % kmenů).
Shigella sp. tvoří jeden pathovar s enteroinvazivní *E. coli*, jejich společným virulenčním markerem je invazin IpaH (jehož detekce se využívá v PCR diagnostice). Rozlišení na základě biochemických testů, sérologicky či molekulárně je obtížnější. Většina shigel je laktóza negativní, zatímco u enteroinvazivní *E. coli* je schopnost fermentovat laktózu variabilní [4]. Metodou MALDI TOF nelze shigelu rozlišit od *E. coli* z důvodu blízké příbuznosti. Ačkoli pro klinické a epidemiologické účely rozlišujeme *E. coli* a jednotlivé shigely, z hlediska taxonomického se jedná o jeden druh [2, 5].
Celkem 109 ze 110 laboratoří správně určilo jako patogena *S. sonnei*.

Literatura

[1] Výskyt vybraných hlášených infekcí v České republice. Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2025; 34(11-12): 341.

[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.

[3] Thompson CN, Duy PT, Baker S. The Rising Dominance of *Shigella sonnei*: An Intercontinental Shift in the Etiology of Bacillary Dysentery. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Jun 11;9(6):e0003708. doi: 10.1371/journal.pntd.0003708. PMID: 26068698; PMCID: PMC4466244.

[4] Løbersli I, Wester AL, Kristiansen A et al. Molecular differentiation of *Shigella* spp. from enteroinvasive *E. coli*. European Journal of Microbiology and Immunology 6 (2016) 3: 197–205.

[5] Sedláček I. *Escherichia* a *Shigella* – pro klinickou bakteriologii dva dlouho známé rody, přesto taxonomicky stále problematické. Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2011; 20(3): 100-103.

VZOREK 4: Izolát z krve u muže s podezřením na nozokomiální pneumonii.
ODPOVĚĎ: ***Klebsiella pneumoniae***

identifikace	**frekvence**	**body**	**procento**
Klebsiella pneumoniae	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.

Požadavek byl určit signifikantního patogena a vyšetřit citlivost k těmto antibiotikům: ceftazidim (CAZ) a cefepim (FEP).
Kmen je rezistentní (R) k ceftazidimu i k cefepimu [1].
Všechny laboratoře identifikovaly signifikantního patogena správně a získaly po dvou bodech. Všechny zaslané výsledky testování citlivost byly bezchybné, jedna laboratoř nedodala výsledek u cefepimu.

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

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		rozmezí hodnot naměřených v NRL**	C	I	R	%
		C ≥	R <		C ≤	R >					
ceftazidim	10 µg	22	19	8-9	1	4	>64	0	0	110	100
cefepim	30 µg	27	24	2-14	1	4	>32	0	0	109	99,1 [5]

[1] IZ - průměr inhibiční zóny; MIC - minimální inhibiční koncentrace. EUCAST v15
[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] jedna laboratoř výsledek nedodala
* pět měření diskovou difuzní metodou; ** pět měření diluční mikrometodou

VZOREK 5: ***Haemophilus influenzae***

Požadavek byl vyšetřit citlivost k těmto antibiotikům: ampicilin (AMP), cefuroxim iv (CRX).
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 citlivosti[1] kmene 5 *Haemophilus influenzae.*

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]		hodnoty naměřené v NRL**	C	I	R	%
		C ≥	R <		C ≤	R >					
ampicilin	2 µg	18	18	19-20	1	1	0,5	109	0	1	99,1
cefuroxim [5]	30 µg	27	25	27-29	1	2	1	102	5	3	92,7
penicilin screen	1 J	12	12	12	-	-	-				

[1] IZ - průměr inhibiční zóny; MIC - minimální inhibiční koncentrace. EUCAST v15
[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] breakpoint pro cefuroxim iv
* pět měření diskovou difuzní metodou; ** pět měření diluční mikrometodou

Kmen je citlivý (C) k ampicilinu i cefuroximu.
Velká většina účastníků interpretovala výsledek vyšetření citlivosti správně pro obě antibiotika, detailní výsledky viz Tabulka 2.

Diskuse

Vyšetření citlivosti na antibiotika bylo bez větších problémů. Pouze u kmene *H. influenzae* se mohla hodnota u diskové difuzní metody u cefuroximu objevit v ATU, na což některé laboratoře poukázaly. Snížení interpretace o jeden stupeň je ale jen jedno z řešení problematiky ATU, více viz sekce „Technická nejistota" v Tabulkách breakpointů [1]. Pro interpretaci u obou antibiotik mohl být také návodný skríningový test s penicilinem, který byl negativní, což vylučuje přítomnost mechanismů rezistence vůči betalaktamům. Výjimku u klinické interpretace negativního skríningového testu tvoří pouze perorální formy konkrétních antibiotik (amoxicilin, amoxicilin/klavulanát a cefuroxim), které jsou hlášeny jako „citlivé, zvýšená expozice" (I). Důvodem je nutnost vyššího dávkování těchto antibiotik při perorálním podání.

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 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