



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/23/2022 (EHK 1273)

Mykologická diagnostika

Praha, srpen 2022

Obsah

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing)	3
2. Způsob přípravy vzorků	4
3. Charakteristika materiálu	5
4. Způsob hodnocení	5
5. Vyhodnocení	6
6. Závěr	9
Příloha – výsledkový protokol jednotlivých laboratoří	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/23/2022 byl zaměřen na diagnostiku kvasinek. Návrh a realizace PT#M/23/2022 byly prováděny podle standardního operačního postupu SOP M/23 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: <http://ehk.szu.cz/EHK10/> po přihlášení kódem laboratoře a heslem.

Zprávu vypracoval:

Mgr. Radim Dobiáš, Ph.D. (Odd. BaM, NRL pro mykologickou diagnostiku, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Ostrava)

Zprávu autorizoval:

Mgr. Radim Dobiáš, Ph.D.
Tel: 596 200 239

Dne: 2. 8. 2022

Pracoviště 2 ESPT

<http://www.szu.cz/programy-zpusobilosti-pro-mikrobiologicke-laboratore>
e-mail: ehk@szu.cz

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT# M/23/2022

Identifikace cyklu:	EHK 1273
Název:	Mykologická diagnostika
Koordinátor:	Mgr. Radim Dobiáš, Ph.D.
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3 – Identifikované kmeny hyfomycetů izolované na Sabouraudově agaru s vitamínem.
Podstata a účel PT/EHK:	Druhová identifikace mykotických organismů izolovaných z klinického materiálu a stanovení citlivosti na antimykotika
Kritéria pro účast na PT/EHK:	Požadavky na laboratoře: zajištění správné laboratorní praxe dle normy ČSN 15189/2013
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2
Množství připravovaného testovaného materiálu:	Pro 59 laboratoří (a pro ověření homogenity a stability vzorků)
Označení vzorkovnic:	EHK 1273, PT # M/23, č. 1-5, 3. 5. 2022
Zabezpečení kvality vzorku:	Zabezpečení stability vzorků: Stabilita je zajištěna manipulacemi za sterilních podmínek, vhodným skladováním, rychlým transportem ke zpracování a určením termínu, do kterého musí být odeslán výsledek zpět k vyhodnocení.
Test homogenity a stability:	Den před distribucí vzorků a po termínu jednotného zahájení rozborů všemi účastníky
Podmínky distribuce a uchování vzorků:	Distribuce v předepsaném obalu nasmlouvaným dopravcem. Přeprava a krátkodobé uchování vzorků při 4-8 °C, ochrana před světlem.
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe a pokynů organizátora, záměna vzorků, neživotaschopnost kmene vlivem nedodržení časů re-izolace
Počet účastníků:	59
Termín distribuce:	3. 5. 2022
Způsob distribuce:	Přepravní službou (zajišťuje Koordinační pracoviště)
Předání výsledků:	V elektronické podobě do 24. 5. 2022
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4
Určení maximální směrodatné odchylky:	Aritmetický průměr výsledků účastníků +/-2 směrodatné odchylky od průměru celkově získaných bodů
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Vztažnou hodnotou jsou výsledky druhové identifikace kmene v laboratoři koordinátora (NRL pro mykologickou diagnostiku), které byly získány identifikací původního vybraného kmene z klinického materiálu potvrzeného sekvencí DNA narostlé kultury a porovnáním s typovou sekvencí DNA dle databáze CBS-KNAW (= očekávané výsledky)
Termín uveřejnění očekávaných výsledků	3. 6. 2022
Termín uveřejnění závěrečné zprávy	Do 16. 8. 2022

2. Způsob přípravy vzorků

Přípravu a zabezpečení jakosti vzorků zajišťuje Laboratoř klinické mykologie a Národní referenční laboratoř pro mykologickou diagnostiku, Oddělení bakteriologie a mykologie, Centra klinických laboratoř Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě, Partyzánské nám. 7, 702 00, Ostrava, akreditované u ČIA (č. 551/2020) dle ČSN EN ISO 15189. Koordinátor: Mgr. Radim Dobiáš, Ph.D. (ZUOVA)

Zpracování a rozplnění výchozího materiálu

Výchozím materiálem pro přípravu vzorků je klinický materiál dodaný do laboratoře a kmen ATCC 6258 *Candida krusei* (*Pichia kudriavzevii*) určeným pro ověření schopnosti laboratoře identifikovat rezistenci k flukonazolu kvalitativně.

Klinické vzorky jsou zpracovány standardním způsobem používaným v mykologické laboratoři (SOPV_16_12_PKN_53_2, SOPV_17_12_PKN_53_2), čisté kultury jsou izolovány a identifikovány.

Identifikace kvasinek a kvasinkovitých mikromycetů byla provedena pomocí biochemických metod, metodou kultivační a mikroskopickou a porovnáním s databází MALDI-TOF, je následně ověřena konfirmačním postupem, pomocí sekvence fungální DNA oblasti dlouhé podjednotky 28s rDNA, a identifikována dle validované databáze CBS – KNAW (propojené s taxonomickou databází mycobank.org).

Získané izoláty mykotických organizmů jsou pomnoženy a je provedena kontrola čistoty kultur a kontrola identifikace pomocí alespoň dvou různých identifikačních souprav SOP_12_R04, Auxacolor2 (Bio-Rad), MALDI-TOF (Bruker)). Výchozí materiál je vyočkován do plastových zkumavek, uzavřen, označen a uložen do přepravní krabice a doručen kurýrem Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě z laboratoře Klinické mykologie do SZÚ Praha. V SZÚ Praha v Národní referenční laboratoři/Česká národní sbírka typových kultur (CNCTC) - akreditovaná u ČIA pod č. 8002 dle ČSN EN ISO 15189 – je na základě dohody s koordinátorem (hodnotitelem) u vybraných vzorků vytvořena směsná kultura a následně je u vzorků provedena lyofilizace.

Lyofilní médium obsahující příslušné kultury kvasinek je rozplněno do jednotlivých lahvíček (vzorků) o objemu min. 0,5 ml. Vzorky jsou označeny pořadovým číslem 1 – 5, číslem EHK a datem rozeslání.

Po lyofilizaci je výchozí materiál testován na přítomnost sledovaných kultur.

Ze série lyofilizace je náhodně vybráno 5 lyofilizátů. Ampule se zbaví pertle a pomocí sterilní pinzety se opatrně vyjme gumový uzávěr. Do ampule se nakape několik kapek fyziologického roztoku. Pomocí Pasteurovy pipety je homogenizován obsah ampule a následně vyočkován na připravená media. Izoláty mykotických organizmů jsou pomnoženy a provedena kontrola identifikace v termínu před rozesláním nebo v termínu rozeslání vzorků zákazníkům.

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 až do distribuce účastníkům EHK.

Přeprava vzorků je zajišťována přepravcem se službou přeprava nebezpečného zboží dle regulí ADR pro silniční přepravu.

Pro každý vzorek je vystaven protokol o přípravě vzorků, ve kterém jsou uvedeny veškeré manipulace prováděné s připravovaným vzorkem.

3. Charakteristika materiálu

Typ a uskladnění výchozího materiálu

5 lyofilizovaných simulovaných biologických materiálů s kulturami kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů k identifikaci, z toho jeden vzorek také pro určení citlivosti k vybraným ATM.

Pro rok 2022 jsme v sestavě vzorků zařadili opět dva směsné, které obsahovaly každý dva druhy kvasinek. Vzorky pro toto kolo EHK z mykologie nebyly simulované, ale odpovídaly skutečností, jak je Laboratoř klinické mykologie zachytila a identifikovala. Vzorek, u kterého se měl provést test citlivosti k ATM flukonazolu a vorikonazolu, obsahoval referenční kmen ATCC 6258, *C. krusei* – *P. kudriavzevii*.

Pro EHK roku 2022 jsme ze získaného biologického materiálu zvolili takové kmeny identifikovaných kvasinek, které ve všech směrech vyhovovaly identifikačním parametrům tak, aby již při růstu jak na základních, tak i na speciálních diagnostických médiích rostly v typických koloniích a aby tak byla usnadněna zvláště diagnostika směsného vzorku.

4. Způsob hodnocení

Každý rok je na základě výsledků za uplynulý rok vybráno 20 laboratoří s nejvyšším počtem dosažených bodů. Tento výběr je anonymní, identita laboratoří není zveřejňována, ani známa laboratoři připravující vzorky pro EHK. Vzorek je hodnocen pouze v případě, že nejméně 16 z těchto 20 laboratoří dosáhne výsledku shodného s výsledky testování výchozího materiálu pracoviště koordinátora.

Za identifikaci signifikantních patogenů v 5 vzorcích mohou laboratoře získat maximálně 14 bodů, za správné vyhodnocení stanovení citlivosti k ATM další dva body, tedy celkem 16 bodů.

Bodování pro identifikaci je prováděno ve stupnici **2 body** - správná rodová i druhová identifikace,

1 bod – správná rodová identifikace, **0** – neidentifikováno, **-2 body** – chybná identifikace.

U citlivosti **1 bod** – správné hodnocení, **-1 bod** – chybné hodnocení .

Jako správné jsou hodnoceny odpovědi s názvy anamorfního, případně teleomorfního stádia jednotlivých taxonů.

Laboratoř úspěšně absolvuje EHK, pokud dosáhne bodového limitu (za identifikaci signifikantních patogenů pro danou sérii a správné stanovení citlivosti u vybraného agens), který se vypočítává dle vzorce (Limit = aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchytky).

5. Vyhodnocení

Tabulka č. 1: Úspěšnost laboratoří v EHK 1273

14 bodů za bezchybnou identifikaci a 2 body za provedené citlivosti. To, že dvě laboratoře citlivosti neprovádí a nebyly v této části hodnoceny, na celkovém výsledku včetně výpočtů nic nemění.

Dosažené body	12/14)*	14/14)*	16/14)*
Počet laboratoří	1/1	5/2	50/48
Procento	3,4	11,9	84,7

Poznámka: 14/12,2) = tři laboratoře nenabízejí zhotovení citlivostí (tato část u nich nebyla hodnocena)*

Maximálního počtu bodů dosáhlo 15 laboratoří z 32 zúčastněných.

Aritmetický průměr byl 15,6

Směrodatná odchylka byla 0,9

Limit (t. j. průměr -2 směrodatné odchylky) byl 13,8 bodů.

Limit splnilo 57 laboratoří z celkového počtu 59 laboratoří.

Tabulka č. 2: Bodové hodnocení výsledků jednotlivých laboratoří (n=59)

Kód laboratoře								součet
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	FLU	VOR	
11	2	4	4	2	2	1	1	16
16	2	2	4	2	2	1	1	14
17	2	4	4	2	2	1	1	16
18	2	4	4	2	2	1	-1	14
23	2	4	4	2	2	1	1	16
26	2	4	4	2	2	1	1	16
28	2	4	4	2	2	1	1	16
31	2	4	4	2	2	1	1	16
32	2	4	4	2	2	1	1	16
35	2	4	4	2	2	1	1	16
37	2	4	4	2	2	1	1	16
39	2	4	4	2	2	1	-1	14
40	2	4	4	2	2	1	1	16
48	2	4	4	2	2	1	1	16
50	2	4	4	2	2	1	1	16
51	2	4	4	2	2	1	1	16
53	2	4	2	2	2	-	-	12/14
58	2	4	4	2	2	1	1	16
64	2	4	4	2	2	1	1	16
65	2	4	4	2	2	1	1	16

71	2	4	4	2	2	1	1	16
89	2	4	4	2	2	1	1	16
156	2	4	4	2	2	1	1	16
174	2	4	4	2	2	-	-	14/14
192	2	4	4	2	2	1	1	16
207	2	4	4	2	2	1	1	16
208	2	4	4	2	2	1	1	16
211	2	4	4	2	2	1	1	16
214	2	4	4	2	2	1	1	16
215	2	4	4	2	2	1	1	16
228	2	4	4	2	2	1	1	16
283	2	4	4	2	2	1	1	16
289	2	4	4	2	2	1	1	16
290	2	4	4	2	2	1	1	16
299	2	4	4	2	2	1	1	16
333	2	4	4	2	2	1	1	16
350	2	4	4	2	2	1	1	16
354	2	4	4	2	2	1	1	16
365	2	4	4	2	2	1	1	16
369	2	4	4	2	2	1	1	16
370	2	4	4	2	2	1	1	16
371	2	4	4	2	2	1	1	16
373	2	4	4	2	2	1	1	16
384	2	4	4	2	2	1	1	16
388	2	2	4	2	2	1	1	14
443	2	4	4	2	2	1	1	16
456	2	4	4	2	2	1	1	16
460	2	4	4	2	2	1	1	16
465	2	4	4	2	2	1	1	16
467	2	4	4	2	2	1	1	16
529	2	4	4	2	2	1	1	16
539	2	4	4	2	2	1	1	16
554	2	4	4	2	2	1	1	16
566	2	4	4	2	2	1	1	16
595	2	4	2	2	2	1	1	14
641	2	2	4	2	2	1	-1	12
702	2	4	4	2	2	1	1	16
761	2	4	4	2	2	1	1	16
821	2	4	4	2	2	-	-	14/14

Tabulka č. 3: Podíly správných odpovědí v identifikacích jednotlivých vzorků/kmenů

Vzorek	Mikroorganismus	Počet laboratoří	Procento
1	<i>Candida albicans</i>	59	100,0
2	<i>Candida glabrata/Candida tropicalis</i>	56	94,9
3	<i>Candida parapsilosis/Candida lusitanae</i>	57	96,6
4	<i>Cryptococcus neoformans</i>	59	100,0
5	<i>Candida krusei (Pichia kudriavzevii)</i>	59	100,0
	- bezchybná citlivost z 57 laboratoří)*	54	94,7

Poznámka:)* 3 laboratoře stanovení citlivosti kvasinek k antímykotikům neprovádí

Žádná laboratoř v tomto cyklu mykologické diagnostiky neměla problém s identifikací kvasinek a kvasinkovitých mikromycetů ve vzorcích č. 1 – *Candida albicans*, č. 4 – *Cryptococcus neoformans* a č. 5 – *Candida krusei (Pichia kudriavzevii)*.

V případě vzorků se směsnou kulturou dvou druhů oportunních patogenů č. 2, který obsahoval kmeny *Candida glabrata* a *Candida tropicalis* měly problém s odhalením přítomnosti druhého agens tři laboratoře a u směsného vzorku č. 3 se kmeny *Candida parapsilosis* a *Candida lusitanae* to byly laboratoře dvě.

V letošním EHK měly s citlivostí k ATM problém celkem 3 laboratoře. Ve všech těchto případech byl výsledek hodnocen výsledek jako -1.

Stejně jako v minulých EHK díky celkově vysoké úspěšnosti laboratoří byla i v roce 2022 vypočtena relativně nízká hodnota směrodatné odchylky, takže 5 laboratoří, které dosáhly hodnotu 14 bodů, splnilo limit úspěšnosti s rezervou pouhých 0,2 bodu. Dvě laboratoře neuspěly na nižší bodové hladině.

Techniky identifikace kvasinek a kvasinkovitých mikromycetů, ve většině parametrů nezaznamenaly prakticky žádných velkých změn. Počet laboratoří vybavených technikou MALDI-TOF se zvýšil v porovnání s rokem 2021 o 6. Souhrn přehledu o současném vybavení laboratoří naleznete v Tabulce 4.

Tabulka č. 4: Přehled diagnostických postupů (59 laboratoří zapojených do EHK 1273 v r. 2022)

Diagnostický test (identifikace)	Počet laboratoří	Diagnostický test (citlivosti k ATM)	Počet laboratoří
CANDISELECT	35	E-TEST BioMérieux	17
MALDI TOF	46	ITEST Plus	10
AUXACOLOR	15	NEOSENSITABS/Biovendor	13
RÝŽOVÝ AGAR	1	E-TEST Liofilchem	18
API ID 20(32)C	6	VITEK2	6
CANDIDATEST	4	SENSITITRE YEASTONE	9
DALŠÍ TESTY	7	DALŠÍ TESTY	4

6. Závěr

Letošního EHK 1273 se účastnilo 59 laboratoří, dvě laboratoře neuspěly.

Lze konstatovat, že EHK 1273 v mykologické diagnostice dopadlo výborně. A to je patrné již delší dobu. Spektrum kvasinek zachycených z tuzemských biologických materiálů nečiní naprostě většině laboratoří problémy s identifikací. To sebou však nese zásadní problém při výpočtu směrodatné odchylky a od ní se odvíjející výpočet bodového limitu pro splnění EHK. Úspěšnost získání potřebného počtu bodů se tím posouvá až na samý vrchol diagnostického úspěchu. Vzhledem k tomu, že úspěšnost laboratoří stále stoupá, a to i z hlediska vybavení moderní diagnostickou technikou, budeme moci následující série EHK obohatit o položky některých vzácnějších druhů kvasinek a kvasinkovitých mikromycetů, které se mohou vyskytnout v klinickém materiálu a to edukativně (v předpokládaném počtu dvou vzorků navíc). Zamýšlený způsob by měl přispět k systematickému zlepšování připravenosti mikrobiologických laboratoří v ČR pro identifikaci náročnějších druhů.

V letošním roce vznikly dvě nové Národní referenční laboratoře pro oblast lékařské mykologie (NRL pro mykologickou diagnostiku a NRL pro antimykotika) a proto bude v příštím roce otestována pilotní série EHK pro testování citlivosti k antimykotikům a bude rozesílána paralelně s kmeny pro identifikaci. Tím v budoucnu zanikne nutnost dvojího hodnocení u laboratoří, které ATM citlivosti neprovádějí.

Laboratoř, která neuspěla, má možnost objednat si opravnou sérii EHK přes webovou aplikaci SZÚ: <https://ehk.szu.cz/EHK10/>, viz informace o změnách v objednávání opravných sérií a zadávání reklamací na webových stránkách SZÚ: <http://www.szu.cz/programy-zpusobilosti-pro-mikrobiologicke-laboratore>. Opravné série se budou rozesílat dne 11. 10. 2022.

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

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY