



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/23/2021 (EHK 1198)

Mykologická diagnostika

Praha, srpen 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	5
5. Vyhodnocení	5
6. Závěr	10
Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/23/2021 byl zaměřen na diagnostiku kvasinek. Návrh a realizace PT#M/23/2021 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.

Za správnost výsledků ručí koordinátor příslušného cyklu EHK.

Příloha závěrečné zprávy, tj. výsledkový protokol, je rozesílána poštou.

Zprávu vypracoval:

MUDr. Karel Mencl, CSc. (OKM, Pardubická nemocnice, Pardubice)

Zprávu autorizoval:

MUDr. Jana Kozáková (zástupce vedoucí pracoviště 2 ESPT)

Tel. 267 082 260

Dne: 17. 8. 2021

Pracoviště 2 ESPT

ehk@szu.cz

<http://www.szu.cz/programy-zpusobilosti-pro-mikrobiologicke-laboratore>

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT# M/23/2021

Identifikace cyklu:	EHK 1198
Název:	Mykologická diagnostika
Koordinátor:	MUDr. Jana Kozáková
Subdodavatel:	Laboratoř lékařské mykologie, Pardubická nemocnice, Kyjevská 44, 532 03 Pardubice, MUDr. Karel Mencl, CSc.
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3
Podstata a účel PT/EHK:	druhá identifikace mykotických organizmů izolovaných z klinického materiálu a stanovení citlivosti na antimykotika
Kritéria pro účast na PT/EHK:	Znalost a technické vybavení pro identifikaci mykotických organizmů
Způsob přípravy:	viz kapitola 2
Množství připravovaného test. materiálu:	cca pro 65 laboratoří (a pro ověření homogenity a stability vzorků)
Označení vzorkovnic:	EHK 1198, PT # M/23, č. 1 -5, 4. 5. 2021
Zabezpečení kvality vzorku:	manipulace za sterilních podmínek, vhodné skladování
Termín testu homogenity a stability:	den před distribucí vzorků a po termínu jednotného zahájení rozborů všemi účastníky
Podmínky distribuce a uchování vzorků:	přeprava a krátkodobé uchování při 4 – 8 ° C chránit před světlem
Možné zdroje chyb:	nedodržení správné laboratorní praxe
Počet účastníků:	60 laboratoří
Termín distribuce:	4. 5. 2021
Způsob distribuce:	Rozvoz přepravní službou (zajišťuje Koordinační pracoviště ESPT 2) Přílohy: formulář pro zápis výsledků a pokyny účastníkům
Předání výsledků:	písemně do 25. 5. 2021 na předepsaných formulářích
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:	Za vztažnou hodnotu je považován výsledek získaný v NRL.
Termín uveřejnění očekávaných výsledků:	4. 6. 2021
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	Do 17. 8. 2021

2. Způsob přípravy vzorků

Vzorky byly připraveny na pracovišti subdodavatele – OKM-Laboratoř lékařské mykologie, Pardubická nemocnice, Kyjevská 44, 532 03, Pardubice. Garant: MUDr. Karel Mencl, CSc. Laboratoř je akreditovaná u NASKL (DAA-018-2020-0336-802) dle ČSN EN ISO 15189, ze dne 22. 6. 2021.

Výchozím materiálem pro přípravu vzorků je klinický materiál dodaný do laboratoře.

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.

Získané izoláty mykotických organismů jsou pomnoženy a je provedena kontrola čistoty kultur a kontrola identifikace pomocí alespoň dvou různých identifikačních souprav SOPV_12_12_PKN_53_2, CandidaTest21 (Pliva-Lachema), Auxacolor2 (Bio-Rad), MALDI-TOF (Bruker)). Výchozí materiál je vyočkován do plastových zkumavek, uzavřen, označen a uložen do přepravní krabice a doručen kurýrem osobně z laboratoře lékařské mykologie OKM Pardubické nemocnice 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 se subdodavatelem (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 organismů 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.

3. Charakteristika materiálu

5 lyofilizovaných simulovaných biologických materiálů s kvasinkovými mikroorganismy k identifikaci, z toho jeden vzorek také pro určení citlivosti k ATM.

Pro rok 2021 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 lékařské mykologie zachytila a identifikovala. Vzorek, u kterého

se měl provést test citlivosti k ATM flukonazolu a vorikonazolu, obsahoval referenční kmen *C. albicans*, který vykazoval jasnou citlivost k oběma antimykotikům. Tato citlivost byla ověřena několika nezávislými testy.

Také pro EHK roku 2021 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. Protože jsme letos získali nezvykle „širokou“ škálu původců mykotických infekcí, mohli jsme otestovat pozornost účastníků EHK na trochu vyšší úrovni, než tomu bylo v minulých kolech.

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 v SZÚ.

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 kolo 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 odchylky).

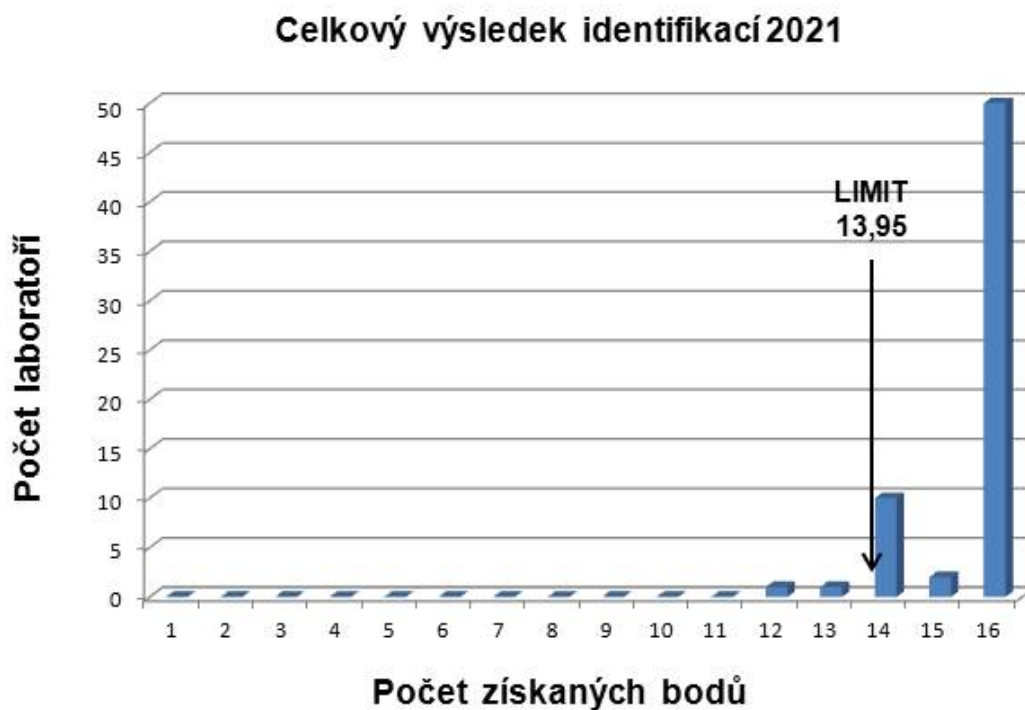
5. Vyhodnocení

Tabulka č. 1: Úspěšnost laboratoří v EHK 1198

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	13	14	15	16 / 14)*
Počet laboratoří	1	1	6	2	50 / 48
Procento	1,7	1,7	10	3,3	83,3

Poznámka: 14/12)* = dvě laboratoře nenabízejí zhotovení citlivostí (tato část u nich nehodnocena)



Maximálního počtu bodů dosáhlo 50 laboratoří z 60 zúčastněných.

Aritmetický průměr byl 15,65

Směrodatná odchylka byla 0,85

Limit (t. j. průměr -2 směrodatné odchylky) byl 13,95 bodů.

Limit splnilo 56 laboratoří, další 2 laboratoře splnily na hladině 14 bodů s ohledem na neprovádění citlivostí.

Tabulka č. 2: Bodové hodnocení výsledků jednotlivých laboratoří
Označeny laboratoře, které neprovádí citlivosti k ATM, nebo omezeně.

Kód laboratoře	Bodové hodnocení							součet
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	F	V	
11	4	4	2	2	2	1	1	16
16	4	4	2	2	2	1	1	16
17	4	4	2	2	2	1	1	16
18	4	4	2	2	2	1	1	16
23	4	4	2	2	2	1	1	16
26	4	4	2	2	2	1	1	16
28	4	4	2	2	2	1	1	16
31	4	4	2	2	2	1	1	16
32	4	4	2	2	2	1	1	16
35	4	4	2	2	2	1	1	16
37	4	4	2	2	2	1	1	16
39	4	2	2	2	2	1	1	14
48	4	4	2	2	2	1	1	16
50	4	4	2	2	2	1	1	16
51	4	4	2	2	2	1	1	16
53	4	4	2	2	2	-	-	14/14
58	4	4	2	2	2	1	1	16
64	4	3	2	2	2	1	1	15
65	4	4	2	2	2	1	1	16
71	4	4	2	2	2	-1	1	14
89	4	4	2	2	2	1	1	16
156	4	4	2	2	2	1	1	16
174	4	4	2	2	2	-	-	14/14
192	4	4	2	2	2	1	1	16
207	4	4	2	2	2	1	1	16
208	3	3	2	2	2	1	1	14
209	4	4	2	2	2	1	1	16
211	4	4	2	2	2	1	1	16
214	4	4	2	2	2	1	1	16

Kód laboratoře	Bodové hodnocení							součet
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	F	V	
215	4	4	2	2	2	1	1	16
228	4	4	2	2	2	1	1	16
283	4	4	2	2	2	1	1	16
289	4	4	2	2	2	1	1	16
290	4	4	2	2	2	1	1	16
299	4	4	2	2	2	1	1	16
333	4	4	2	2	2	1	1	16
350	4	4	2	2	2	1	1	16
354	4	4	2	2	2	1	1	16
365	4	4	2	2	2	1	1	16
369	4	4	2	2	2	1	1	16
370	4	4	2	2	2	1	1	16
371	4	4	2	2	2	1	1	16
373	4	4	2	2	2	1	1	16
384	4	4	2	2	2	1	1	16
388	4	4	2	2	2	1	1	16
407	2	3	2	2	2	1	1	13
443	4	4	2	2	2	1	1	16
456	4	4	2	2	2	1	1	16
460	0	4	2	2	2	1	1	12
465	4	4	2	2	2	1	1	16
467	4	4	2	2	2	1	1	16
529	4	4	2	2	2	1	0	15
539	4	4	2	2	2	1	1	16
554	4	4	2	2	2	1	1	16
566	4	4	2	2	2	1	1	16
595	4	4	2	2	2	1	1	16
641	4	4	2	2	2	1	1	16
702	4	4	2	2	2	1	1	16
761	4	4	2	2	2	1	1	16
763	4	4	2	2	2	-1	1	14

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

Vzorek	Mikroorganismus	Počet laboratoří	Procento
1	<i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Geotrichum capitatum</i>	57	95,0
2	<i>Candida tropicalis</i> <i>Trichosporon asahii</i>	56	93,3
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60	100
4	<i>Candida guilliermandii</i>	60	100
5	<i>Candida albicans</i>	60	100
	- bezchybná citlivost z 58 laboratoří)*	55)*	94,8)*

Poznámka:)* 2 laboratoře citlivosti kvasinek neprovádí

Žádná laboratoř v tomto kole mykologické diagnostiky neměla problém se vzorky č. 3 – *Saccharomyces cerevisiae*, č.4 – *Candida guilliermandii* a u č.5 – *Candida albicans*.

U vzorku č. 1, který obsahoval kmeny *Cryptococcus neoformans* a *Geotrichum candidum* měly problém s identifikací/směsí tři laboratoře a u směsného vzorku č. 2 se kmeny *Candida tropicalis* a *Trichosporon asahii* to byly laboratoře čtyři.

V letošním kole EHK měly s citlivostí k ATM problém celkem 3 laboratoře, kdy se v jednom případě jednalo pravděpodobně o technickou chybu, neboť byla správně uvedena naměřená hodnota testu ATM, ale chybně interpretována. V tomto případě jsme si dovolili hodnotit výsledek jako 0 bodů, místo -1.

Stejně jako v minulém kole EHK díky celkově vysoké úspěšnosti laboratoří byla i v roce 2021 vypočtena velmi nízká hodnota směrodatné odchylky, takže 6 laboratoří, které dosáhly hodnotu 14 bodů, „uniklo neúspěšnosti“ o pouhých 0,06 bodu. Dvě laboratoře neuspěly na nižší bodové hladině. Vzhledem k tomu, že úspěšnost laboratoří stále stoupá, a to i z hlediska vybavení moderní diagnostickou technikou, bude možná pro budoucnost nutné upravit hodnocení, případně parametry výstupu jednotlivých diagnostických postupů.

Pokud jde o informace o používaných technikách identifikace kvasinek, ve většině parametrů nedošlo prakticky k žádným velkým změnám. Snad jen to, že opět přibylo laboratoří s MALDI technikou. Do výsledků této ankety můžete nahlédnout v Tab. 4.

Tabulka č .4: Přehled diagnostických postupů (laboratoře zapojené do EHK z mykologie v r. 2021)

Diagnostický test (identifikace)	Počet laboratoří	Diagnostický test (citlivosti k ATM)	Počet laboratoří
CANDISELECT	35	E-TEST BioMérieux	17
MALDI TOF	40	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

Lze opět konstatovat, že EHK 1198 v mykologické diagnostice dopadlo výborně. Již delší dobu je patrné, že spektrum kvasinek zachytávaných 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.

Na základě anketních odpovědí ohledně kultivací a identifikací vláknitých mikroskopických hub jsme měli pro rok 2021 představu zařadit do vzorků EHK jeden edukační vzorek. Bohužel se nám to technicky nezdařilo. Snad se to podaří někdy příště. V této souvislosti můžeme uvést, že z 60-ti laboratoří zúčastněných v letošním kole EHK provádí diagnostiku dermatofytů 40 + 2 s výhradou, diagnostiku aspergilů 37 + 2 s výhradou a diagnostiku ostatních mikromycet 18 + 3 s výhradou. Z hlediska množství laboratoří by se tak mohlo uvažovat o vytvoření samostatné „větvi“ mykologického EHK zaměřené pouze na diagnostiku vláknitých hub. V tomto směru je velká škoda, že náš obor – lékařská mykologie – nemá k dispozici služby vlastní NRL.

Opravná série proběhne 12. 10. 2021 a přihlášky lze podávat do 14 dnů po obdržení výsledků cestou Koordinačního pracoviště ESPT 2.

V případě reklamací vyhodnocení série postupujte, prosím, dle reklamačního řádu.

Literatura:

De Hoog, G.S., Guarro J., Gené J., Figueras M.J., 2000: Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures/ Universitat Rovira i Virgili.

<http://www.doctorfungus.org/thefungi/>

Kurtzman, C. P., and J. W. Fell (ed.). 2000. The Yeasts. A Taxonomic Study. Elsevier Scientific B.V., Amsterdam, The Netherlands.

Campbell, C.K., Johnson, E.M., Philpot, C.M., Warnock, D.W.: Identification of Pathogenic Fungi, Public Health Laboratory Service, London, 1996

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY