



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/23/2024 (EHK 1402)

Identifikace kvasinek a kvasinkovitých hub

Praha, srpen 2024

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/23/2024 byl zaměřen na diagnostiku kvasinek. Návrh a realizace PT#M/23/2024 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: <http://ehk.szu.cz/EHK10/> po přihlášení kódem laboratoře a heslem.

Zprávu vypracoval:

Mgr. Radim Dobiáš, Ph.D. (Národní referenční laboratoř pro mykologickou diagnostiku, při Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě, Ostrava)

Zprávu autorizoval:

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

Dne: 6. 8. 2024

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/23/2024

Identifikace cyklu:	EHK 1402
Název:	Identifikace kvasinek a kvasinkovitých hub
Koordinátor:	Mgr. Radim Dobiáš, Ph.D.
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3 závěrečné zprávy – 5 + 1 lyofilizovaných simulovaných biologických materiálů s kulturami kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů.
Podstata a účel PT:	Druhová identifikace mykotických organismů izolovaných z klinického materiálu a stanovení citlivosti na antimykotika
Kritéria pro účast na PT:	Požadavky na laboratoře: zajištění správné laboratorní praxe
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2 závěrečné zprávy
Počet účastníků:	61
Termín distribuce vzorků:	30. 4. 2024
Informace účastníkům	zasílané spolu se vzorky
Termín pro odeslání výsledků účastníky:	21. 5. 2024
Označení vzorkovnic:	EHK 1402, PT # M/23, č. 1-6, 30. 4. 2024
Zabezpečení jakosti vzorku včetně testu homogenity a stability:	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. Kvalita, homogenita a stabilita je posuzována na základě trojitého opakovaného testování namátkou vybraných vzorků připraveného cyklu: po výběru jsou vzorky kultivovány za běžných laboratorních podmínek v souladu s normou ČSN 15189 a je ověřena schopnost růstu testovaného kmene před distribucí a v termínu blízkém dni odeslání výsledků. Na každé testování se použije nový vzorek, průkazem homogenity a stability vzorků je dosažení totožných výsledků v čase.
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe a pokynů organizátora, záměna vzorků, neživotaschopnost kmene vlivem nedodržení časů re-izolace
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4 závěrečné zprávy
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)
Určení maximální směrodatné odchylky:	Aritmetický průměr výsledků účastníků +/-2 směrodatné odchylky od průměru celkově získaných bodů
Termín uveřejnění očekávaných výsledků	10 dní od uzávěrky série, tj. do 31. 5. 2024
Termín uveřejnění závěrečné zprávy	Max. do 12 týdnů od předání výsledků k vyhodnocení, tj. do 13. 8. 2024

2. Způsob přípravy vzorků

Přípravu a zabezpečení jakosti vzorků zajišťuje Laboratoř klinické mykologie a Národní referenční laboratoř pro mykologickou diagnostiku (NRL pro mykologickou diagnostiku), Oddělení bakteriologie a mykologie, Centra klinických laboratoří 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)

2.1 Zpracování a rozplnění výchozího materiálu

Výchozím materiálem pro přípravu vzorků je klinický materiál dodaný do laboratoře. Klinické vzorky jsou zpracovány standardním způsobem používaným v NRL pro mykologickou diagnostiku, 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 organismů 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 směšná 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 přepravním 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

6 lyofilizovaných simulovaných biologických materiálů s kulturami kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů k identifikaci, z toho jeden vzorek je čistě edukativním (č. 6).

Vzorky pro toto kolo EHK z mykologie nebyly simulované, ale odpovídaly skutečným, jak je Laboratoř klinické mykologie zachytila a identifikovala.

Pro EHK roku 2024 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.

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.

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.

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 odchylky).

5. Vyhodnocení

Tabulka č. 1: Úspěšnost laboratoří v EHK 1402

14 bodů za bezchybnou identifikaci.

Dosažené body	14
Počet laboratoří	55
Procento	90,2

Maximálního počtu bodů dosáhlo 55 laboratoří z 61 zúčastněných.

Limit splnilo 60 laboratoří z celkového počtu 61 laboratoří.

Tabulka č. 2: Bodové hodnocení výsledků jednotlivých laboratoří (n=61)

Kód laboratoře						Součet
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	
11	4	2	4	2	2	14
16	4	2	4	2	2	14
17	4	2	4	2	2	14
18	4	2	4	2	2	14
23	4	2	4	2	2	14
26	4	2	4	2	2	14
28	4	2	4	2	2	14
31	4	2	4	2	2	14
32	4	2	4	2	2	14
35	4	2	4	2	2	14
37	4	2	4	2	2	14
39	4	2	4	2	0	12
40	4	2	4	2	2	14
48	4	2	4	2	2	14
50	4	2	4	2	2	14
51	4	2	4	2	2	14
53	4	2	4	2	2	14
55	4	2	4	2	2	14
58	4	2	4	2	2	14
64	4	2	4	2	2	14
65	4	2	4	2	2	14
71	4	2	4	2	2	14
89	4	2	4	2	2	14
156	4	2	4	2	2	14
174	4	2	4	2	2	14
192	4	2	4	2	2	14

207	4	2	4	2	2	14
208	4	2	2	2	2	12
211	4	2	4	2	2	14
214	4	2	4	2	2	14
215	4	2	4	2	2	14
228	4	2	4	2	2	14
283	4	2	4	2	2	14
289	4	2	4	2	2	14
290	4	2	4	2	2	14
299	4	2	4	2	2	14
333	4	2	4	2	2	14
350	4	2	4	2	2	14
354	4	2	4	2	2	14
365	4	2	4	2	2	14
369	4	2	2	2	2	12
370	4	2	4	2	2	14
371	4	2	4	2	2	14
373	4	2	4	2	2	14
384	4	2	4	2	2	14
388	4	2	2	2	2	12
407	4	2	4	2	2	14
443	4	2	4	2	2	14
456	4	2	4	2	2	14
460	4	2	4	2	2	14
465	4	2	4	2	2	14
529	4	2	4	2	2	14
539	4	2	4	2	2	14
554	4	2	4	2	2	14
566	2	2	2	2	2	10
595	4	2	2	2	2	12
641	4	2	4	2	2	14
702	4	2	4	2	2	14
761	4	2	4	2	2	14
809	4	2	4	2	2	14
821	4	2	4	2	2	14

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

Vzorek	Mikroorganismus	Počet laboratoří	Procento
1	<i>Candida albicans/Candida krusei (Pichia kudriavzevii)</i>	60	98,4
2	<i>Candida tropicalis</i>	61	100,0
3	<i>Candida parapsilosis/Candida glabrata</i>	56	91,8
4	<i>Cryptococcus neoformans</i>	61	100,0
5	<i>Candida lusitanae</i>	60	98,4

Žádná laboratoř v tomto cyklu mykologické diagnostiky neměla problém s identifikací kvasinek a kvasinkovitých mikromycetů ve vzorcích č. 2 – *Candida tropicalis* a č. 4 – *Cryptococcus neoformans*.

V letošním EHK nebyly identifikovány směsné vzorky, které obsahovaly dva druhy *Candida* sp., v pěti případech. Konkrétně šlo o neodhalení *Candida glabrata* ve vzorku č. 3. V jednom případě laboratoř chybně identifikovala *Candida krusei (Pichia kudriavzevii)* – záměna za *Candida lipolytica* ve směsi s *Candida albicans* vzorku č. 1.

Stejně jako v minulých EHK díky celkově vysoké úspěšnosti laboratoří byla i v roce 2024 vypočtena relativně nízká hodnota směrodatné odchylky.

Techniky identifikace kvasinek a kvasinkovitých mikromycetů, ve většině parametrů nezaznamenaly prakticky žádné velké změny. Dominuje vysoká vybavenost technikou MALDI-TOF. Více než polovina laboratoří využívá MALDI TOF jako jedinou identifikační metodu, viz Tabulka č. 4.

Edukativní vzorek č. 6 *Candida auris* správně identifikovalo 59 laboratoří.

Tabulka č. 4: Přehled diagnostických postupů finální identifikace (61 laboratoří zapojených do EHK 1402 v r. 2024)

Diagnostický test (identifikace)	Počet laboratoří
MALDI TOF v kombinaci	19
MALDI TOF - monotest	40
VITEK	2

6. Závěr

Letošního EHK 1402 se účastnilo 61 laboratoří, z toho 60 laboratoří uspělo a 1 laboratoř nesplnila bodový limit.

Lze konstatovat, že EHK 1402 v mykologické diagnostice dopadla výborně. A to je patrné již delší dobu. Spektrum kvasinek zachycených z tuzemských biologických materiálů nečiní naprosté většině laboratoří problémy spojené s přesnou identifikací. Úspěšnost získání potřebného počtu bodů se blíží vrcholu diagnostického úspěchu.

Program M/23 „Identifikace kvasinek a kvasinkovitých hub“ byl v sérii 1402 obohacen o edukativní položku významného druhu *Candida auris*, který se může vyskytnout v klinickém materiálu a vzhledem k vysokému počtu správných identifikací v letošním EHK lze říci, že laboratoře na území ČR jsou velmi dobře připraveny na eventuální záchyt tohoto rizikového oportunního patogenu. Opětovné zařazení směsných kultur upozornilo na důležitost správné izolace kmenů z klinického materiálu. Tento způsob koncepce se zdá být efektivní a měl by přispět k systematickému zlepšování připravenosti mikrobiologických laboratoří v ČR pro identifikaci náročnějších druhů kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů. V následujících sériích koncepci měnit nebudeme a bude kladen důraz na výše uvedené skutečnosti tak, aby se zlepšila nejen dovednost správné identifikace, ale také efektivita v odhalování počtu různých taxonů ve směsné kultuře.

Laboratoře, které neuspěly, si mohou objednat edukativní vzorky prostřednictvím webové aplikace SZÚ, a to do 30 dnů po obdržení svých výsledků. Výsledky edukativních vzorků nebudou mít vliv na opravu předchozího neúspěšného výsledku v rámci EHK a slouží pouze jako podklad pro vyřešení případné neshodné práce v laboratoři. Edukativní vzorky laboratoř obdrží obvyklou cestou v co nejkratším termínu po objednání.

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

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY