



Státní zdravotní ústav
Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti
Odborně způsobilý poskytovatel zkoušení způsobilosti č. 7001TC
posouzený 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/38/2025 (EHK 1458)

**Kultivace a identifikace vláknitých
mikroskopických hub**

Praha, květen 2025

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	6
6. Závěr	8
Příloha – výsledkový protokol jednotlivých laboratoří	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/38/2025 byl zaměřen na kultivaci a identifikaci vláknitých mikroskopických hub.

Návrh a realizace PT#M/38/2025 byly prováděny podle standardního operačního postupu koordinátora programu na pracovišti Expertní skupiny pro zkoušení způsobilosti (ESPT) Státního zdravotního ústavu (SZÚ).

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: 25. 5. 2025

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/38/2025

Identifikace cyklu:	EHK 1458
Název PT:	Kultivace a identifikace vláknitých mikroskopických hub
Koordinátor:	Mgr. Radim Dobiáš, Ph.D.
Podstata a účel PT/EHK:	Ověření schopnosti identifikovat klinicky významné druhy vláknitých mikromycetů
Kritéria pro účast na PT/EHK:	Požadavky na laboratoře: zajištění správné laboratorní praxe a znalost postupů vedoucí ke správné identifikaci vláknitých mikroskopických hub
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3 závěrečné zprávy – Identifikované kmeny hyfomycetů izolované na Sabouraudově agaru s vitamínem.
Hodnocené ukazatele:	Správná rodová a druhová identifikace izolátů
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2 závěrečné zprávy
Počet účastníků:	31
Termín distribuce vzorků:	4. 2. 2025
Informace účastníkům	zasílané spolu se vzorky
Termín pro odeslání výsledků účastníky:	5 týdnů od odeslání série EHK, tj. do 11. 3. 2025
Označení vzorkovnic:	EHK-1458, PT#M/38, č. 1-5, 4. 2. 2025
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. Provedena makro-morfologická pohledová kontrola růstu kmenů všech rozesílaných naočkovaných kmenů a identifikace kontrolní kmenů, pro vyloučení možné kontaminace.
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:	Vtažnou hodnotou jsou výsledky druhové identifikace kmene v 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 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.

	Jestliže stejný typ atypického výsledku vykáže větší počet účastníků, může být přihlédnuto k tomu, zda neexistuje statisticky významná souvislost mezi typem použitého testu a zmíněnou odchylkou. V takovém případě koordinátor provede hodnocení po odborné konzultaci s poradní skupinou.
Termín uveřejnění očekávaných výsledků	12. 3. 2025
Termín uveřejnění závěrečné zprávy	Max. do 12 týdnů od předání výsledků k vyhodnocení, tj. do 3. 6. 2025

2. Způsob přípravy vzorků

Přípravu a zabezpečení jakosti vzorků zajišťuje NRL pro mykologickou diagnostiku, Laboratoř klinické mykologie, 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)

Zpracování a rozplnění výchozího materiálu

Klinické vzorky byly zpracovány standardním způsobem používaným v laboratoři klinické mykologie subdodavatele, čisté kultury byly izolovány a identifikovány do druhu. Získané izoláty mykotických organismů byly pomnoženy a byla provedena kontrola čistoty kultur a kontrola správnosti identifikace. Identifikace vláknitých hub pomocí fenotypových (makro a mikromorfologie) metod, metodou kultivační a mikroskopickou byla následně ověřena konfirmačním postupem, pomocí sekvence fungální DNA oblastí dlouhé podjednotky 28s rDNA, ITS 1-4, D1-2, β -tubulin a identifikována dle validované databáze CBS – KNAW (propojené s taxonomickou databází mycobank.org). Výchozí materiál byl vyočkován do plastových lahviček s agarem, uzavřen, označen a uložen do přepravní krabice a doručen kurýrem (pravidelným svozem ZÚ Ostrava) z NRL pro mykologickou diagnostiku ZÚ Ostrava do SZÚ Praha. 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

Výchozím materiálem pro přípravu vzorků jsou identifikované kmeny mikroskopických vláknitých hub izolované z klinického materiálu dodaného do laboratoře subdodavatele. Izoláty pocházejí přímo z klinického materiálu, který není předtím nijak skladován, pouze po dobu nezbytně nutnou k transportu odebraného vzorku pacienta do laboratoře subdodavatele.

Název série EHK	Počet vzorků v sérii	vzorky jsou určeny k testování těchto cílových markerů
Kultivace a identifikace vláknitých mikroskopických hub	4 + 1 edukativní vzorek	Vybrané izoláty vláknitých mikromycetů z klinického materiálu izolované do transportní kultury

Jednotlivé vzorky představují simulovaný humánní klinický materiál s obsahem cílových druhů mikromycetů.

č. vzorku	kmen	poznámka
1.	<i>Aspergillus niger</i>	
2.	<i>Aspergillus flavus</i>	
3.	<i>Trichophyton interdigitale/mentagrophytes</i>	
4.	<i>Trichophyton tonsurans</i>	
5.	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	

4. Způsob hodnocení

Bodové hodnocení účastníků vychází z očekávaných výsledků získaných opakovaným vyšetřením vzorků na pracovišti subdodavatele (koordinátor) a je nastaveno tak, že **dvěma body** je hodnocena shoda s očekávaným výsledkem a bez bodového ohodnocení jsou výsledky, které se s očekávaným výsledkem neshodují. Volba metody pro testování vzorků závisí na rutinní praxi účastníka, pokud jsou vzorky vyšetřeny více metodami, body se nenásobí a hodnotí se laboratorní závěr účastníka.

Za identifikaci mykotického agens ve 4 vzorcích (4 izolátech) mohou laboratoře získat maximálně 8 bodů, protože vzorek číslo 5 má edukativní charakter a body se za něj neudělují. Laboratoř úspěšně absolvuje kolo EHK, pokud dosáhne bodového limitu, který se vypočítává podle vzorce (Limit = aritmetický průměr výsledků všech 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.

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

Jestliže stejný typ atypického výsledku vykáže větší počet účastníků, může být přihlédnuto k tomu, zda neexistuje statisticky významná souvislost mezi typem použitého testu a zmíněnou odchylkou. V takovém případě koordinátor provede hodnocení po odborné konzultaci s poradní skupinou.

5. Vyhodnocení

Tabulka č. 1: Úspěšnost laboratoří v sérii EHK 1458

8 bodů za bezchybnou identifikaci (rod/druh).

Dosažené body	4	6	8
Počet laboratoří	1	4	25
Procento	3,33	13,33	83,33

Maximálního počtu bodů dosáhlo 25 laboratoří z 31 zúčastněných, jedna laboratoř výsledky nedodala.

Aritmetický průměr byl 7,6 bodů

Směrodatná odchylka byla 1,0

Hranice úspěšnosti (t. j. průměr -2 směrodatné odchylky) byl 5,6 bodů.

Limit splnilo 29 laboratoří.

Tabulka č. 2: Bodové hodnocení výsledků jednotlivých laboratoří (n=33)

Kód laboratoře					součet	Edukativní
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	Vzorek 4		
17	2	2	2	2	8	Shoda
28	2	2	2	2	8	Shoda
39	2	2	2	2	8	Shoda
50	2	2	2	2	8	Shoda
51	2	2	0	0	4	Shoda
53	2	2	2	2	8	Shoda
58	2	2	2	2	8	Neshoda
65	2	2	2	2	8	Shoda
89	2	2	2	2	8	Shoda
156	2	2	2	2	8	Shoda
207	2	2	2	2	8	Shoda

211	2	2	2	2	8	Shoda
214	2	2	2	2	8	Shoda
215	2	2	2	2	8	Shoda
283	2	2	2	2	8	Shoda
289	2	2	2	2	8	Shoda
350	2	2	2	2	8	Shoda rod
354	2	2	2	2	8	Shoda
369	2	2	0	2	6	Shoda
370	2	2	2	2	8	Shoda
371	2	2	2	2	8	Shoda
384	2	2	2	2	8	Shoda
443	2	2	2	2	8	Shoda
456	2	2	2	2	8	Shoda
465	2	2	2	2	8	Shoda
539	2	2	2	2	8	Shoda
554	2	2	2	2	8	Shoda
641	2	2	0	2	6	Shoda
702	2	2	2	2	8	Shoda
821	2	2	2	2	8	Shoda

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

Vzorek	Mikroorganismus	Počet laboratoří	Procento
1	<i>Aspergillus niger</i>	30	100,0
2	<i>Aspergillus flavus</i>	30	100,0
3	<i>Trichophyton interdigitale/mentagrophytes</i>	27	90,0
4	<i>Trichophyton tonsurans</i>	29	96,7
5	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	28	93,3

Žádná laboratoř v sérii EHK Kultivace a identifikace vláknitých mikroskopických hub neměla problém s identifikací vzorku č. 1 a 2 (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*). U vzorku č. 3, který obsahoval kmen *Trichophyton interdigitale/mentagrophytes*, měly problém s identifikací 3 laboratoře, ve dvou případech nebyl identifikován druh, pouze rod *Trichophyton* sp. a v jednom případě zřejmě došlo k záměně vzorku 3 a 4 při vyplňování výsledků.

6. Závěr

EHK 1458 – Kultivace a identifikace vláknitých mikroskopických hub se zúčastnilo 31 laboratoří, výsledky k hodnocení dodalo 30 laboratoří.

Uspělo 29 laboratoří.

Lze konstatovat, že série EHK 1458 „Kultivace a identifikace vláknitých mikroskopických hub“ proběhla úspěšně.

Význam edukačního vzorku hodnotíme jako přínosný a vzhledem k vysoké úspěšnosti identifikací (93,3 %) bude druh *Lichtheimia corymbifera* běžně řazen mezi bodově hodnocené vzorky v následujících sériích EHK. Předpokládáme, že v dalších sériích EHK již nebude nutné zvyšovat počet bodovaných pozic ze současných 4 na větší počet. Tento ustálený počet je dostačující pro bodový rozptyl nutný pro výpočet směrodatné odchylky.

Laboratoř, která neuspěla, si může 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 reklamace použijte také webovou aplikaci SZÚ.

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY