



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/1-1/2025(EHK 1453)

Mikroskopie a kultivace rodu *Mycobacterium*

Praha, červen 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	4
5.	Vyhodnocení	5
6.	Závěr	5
	Příloha 1 – tabulky	
	Příloha 2 – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/1-1/2025 je zaměřen na ověření schopnosti účastníků provést detekci mykobakterií v simulovaných vzorcích biologického materiálu pomocí mikroskopie a kultivace.

Návrh a realizace PT#M/1-1/2025 byly prováděny podle standardního operačního postupu koordinátora programu EHK (Ing. Věra Dvořáková Ph.D., NRL pro mykobakterie) 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:

Ing. Michaela Hromádková a Ing. Věra Dvořáková, Ph.D. (NRL pro mykobakterie, SZÚ Praha)

Zprávu autorizoval:

Ing. Dvořáková, Ph.D.

Tel: 267 082 424

Dne: 10. 6. 2025

Pracoviště 2 ESPT

<https://szu.cz/sluzby/zkouseni-zpusobilosti/zkouseni-zpusobilosti-pro-lekarskou-mikrobiologii/>

e-mail: ehk@szu.cz

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT#M/1-1/2025

Identifikace cyklu:	EHK 1453
Název PT:	Mikroskopie a kultivace rodu <i>Mycobacterium</i>
Koordinátor:	Ing. Věra Dvořáková, Ph.D.
Podstata a účel PT:	Průkaz (detekce) mykobakterií v simulovaných vzorcích biologického materiálu pomocí mikroskopie a kultivace.
Kritéria pro účast na PT:	Rutinně prováděné vyšetřování vzorků biologického materiálu, zajištění správné laboratorní praxe.
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3 závěrečné zprávy.
Hodnocené ukazatele:	Mikroskopie: pozitivita (přítomnost acidorezistentních tyčinek příslušníků rodu <i>Mycobacterium</i> ve vzorku) x negativita Kultivace: pozitivita (pozitivní kultivace kultury mykobakterií rodu <i>Mycobacterium</i> ve zvoleném médiu) x negativita
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2 závěrečné zprávy
Počet účastníků:	36
Termín distribuce vzorků:	21. 1. 2025
Informace účastníkům:	viz Informace pro účastníky zaslané spolu se vzorky
Termín pro odeslání výsledků účastníky (stop termín):	1. 4. 2025
Označení vzorkovnic:	EHK 1453, PT#M/1-1, č. 1 – 5, 21. 1. 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:	Vztažnou hodnotou je výsledek dosažený při testování vzorků zařazených do EHK v NRL/M, které se provádí (časově) souběžně s probíhajícím EHK v jednotlivých laboratořích.
Určení maximální směrodatné odchylky:	Směrodatná odchylka se vypočítá jako druhá odmocnina rozptylu hodnot bodového hodnocení jednotlivých laboratoří od aritmetického průměru dosažených bodů všech laboratoří.
Termín uveřejnění předběžných výsledků:	7. 4. 2025
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	Do 24. 6. 2025

2. Způsob přípravy vzorků

2.1 Postup přípravy výchozího materiálu

V přípravě půd bylo dne 10. 1. 2025 připraveno 750 ml sterilního 0,3% agaru OXOID se 3,5 ml sterilizované koncentrované Šulovy půdy. Agar byl rozplněn po 1 ml do 5 x 44 sterilních plastových mikrozkušavek / eppendorfek (5 vzorků pro každou z 36 přihlášených laboratoří + 5x rezervní vzorky + 3x vzorky pro testování v NRLM) a uložen v lednici. Zkušavky jsou dodávány Koordináčním pracovištěm (objem 2 ml, šroubovací uzávěr s těsněním). Pro sérii EHK 1453 byla vybrána kultura *M. tuberculosis* a *M. kansasii*, kterou jsme otestovali 9. 1. 2025, 10. 1. 2025 a 29. 1. 2025 metodou GenoType, zda se jedná o čistou kulturu.

2.2 Zabezpečení kvality výchozího materiálu, homogenita a stabilita

- Kontrola čistoty kultury použitých mykobakteriálních species molekulárními metodami založenými na hybridizaci (GenoType) a to celkem 3x - po vybrání kultury pro sérii EHK, před distribucí vzorků a po distribuci vzorků do přihlášených laboratoří.
- Kontrola sterility agaru OXOID
- Testování kontrolních vzorků akreditovanými metodami dle schválených SOP koordinátora EHK (Ing. Věra Dvořáková, Ph.D., NRL pro mykobakterie) před distribucí vzorků do přihlášených laboratoří a po distribuci vzorků do přihlášených laboratoří (časově souběžně s testováním, které provádí přihlášené laboratoře)

2.3 Rozplnění výchozího materiálu

Dne 13. 1. 2025 bylo do jednotlivých eppendorfek s agarem přidáno po 0,1 ml kultury mykobakterií (*M. tuberculosis* evid. č. 825/24, *M. kansasii* evid. č. 768/24) nebo destilované H₂O dle schématu v kapitole 3. Všechny vzorky byly zajištěny parafilmovou fólií, uloženy do krabiček označených A – E a uschovány v lednici. Vzorky byly 21. 1. 2025 předány pracovním koordináčním pracoviště ESPT 2 k rozdělení a distribuci do jednotlivých laboratoří. Jedna sada vzorků byla současně testována v NRL/M pro zabezpečení kvality vzorku.

3. Charakteristika materiálu

A	<i>M. kansasii</i> 50/25(evid. č. 768/24)	10 ⁻³
B	<i>M. tuberculosis</i> 51/25 (evid. č. 825/24)	10 ⁻²
C	Negativní 52/25	čistý agar
D	Negativní 53/25	čistý agar
E	Negativní 54/25	čistý agar

4. Způsob hodnocení

Vzorky se hodnotí kvalitativně. Hodnocení vychází z výsledků testování v NRL/M. Při hodnocení jednotlivých laboratoří se porovnává výsledek dané laboratoře s výsledkem dosaženým při testování vzorků zařazených do EHK v NRL/M, který je vztažnou hodnotou. Testování se v NRL/M provádí (časově) souběžně s probíhajícím EHK v jednotlivých laboratořích.

Přehled bodového hodnocení výsledků:

Maximální možný bodový zisk činil 20 bodů

- Správný výsledek mikroskopie = 2 body
- Falešná negativita mikroskopie = 0 bodů
- Falešná pozitivita mikroskopie = 0 bodů
- Správný výsledek kultivace = 2 body

- Falešná negativita kultivace = 0 bodů
- Falešná pozitivita kultivace = 0 bodů

5. Vyhodnocení

35 zúčastněných laboratoří získalo 20 bodů a jedna laboratoř získala 16 bodů.

Aritmetický průměr dosažených bodů se rovnal 19,9 bodů.

Limit (aritmetický průměr minus 2 směrodatné odchylky) činil 18,57 bodů.

Limit splnilo 35 (97,2 %) laboratoří. Jedna laboratoř neuspěla.

6. Závěr

EHK 1453 - Mikroskopie a kultivace rodu *Mycobacterium* se zúčastnilo 36 laboratoří

Uspělo 35 laboratoří. Laboratoř, která v hodnocení neuspěla, označila negativní vzorek nesprávně jako pozitivní (viz tabulka 2 a 3).

V letošním roce většina laboratoří (19 ze 36, tedy 52,8 %) použila Ziehl-Neelsenovo barvení, zbývající laboratoře (17 z 36, tedy 47,2 %) použily fluorescenční mikroskopii. Přehled metod mikroskopie použitých zúčastněnými laboratořemi a rozložení správných výsledků a chyb lze nalézt v tabulce 4.

Nejčastěji využívanou metodou dekontaminace v zúčastněných laboratořích je metoda PETROFF (23 z 36 přihlášených laboratoří, tj. 63,9 %), další metody dekontaminace a počty laboratoří, které je použily, jsou uvedeny v tabulce 5.

Pro kultivaci používala většina laboratoří kombinaci médií, nejběžnějším používaným médiem pro kultivaci je Löwenstein-Jensenova vaječná půda. Tuto půdu využilo 94,4 % přihlášených laboratoří. Dalšími často používanými médii pro kultivaci byla OGAWA (83,3 % přihlášených laboratoří) a Šulova půda (41,7 % přihlášených laboratoří), více informací lze nalézt v tabulce 6. Nejčastější kombinací médií byla kombinace Löwenstein-Jensenovy vaječné půdy a Ogawy. Tuto kombinaci využilo 28 (tedy 77,8 % přihlášených laboratoří). Tato kombinace byla často doplněna stanovením na Šulově půdě, či v přístroji MGIT. Přehled hlavních metod kultivace používaných v přihlášených laboratořích je uveden v tabulce číslo 6.

Laboratoř, která v hodnocení neuspěla, použila metodu dekontaminace HCl + NaOH, Fluorescenční mikroskopii a pro kultivaci kombinaci Löwenstein-Jensenovy vaječné půdy, Šulovy půdy a stanovení pomocí MGIT.

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 reklamace použijte také webovou aplikaci SZÚ.

Konec závěrečné zprávy

Příloha 1 - Tabulky

Tabulka 1 Výsledky EHK podle počtu dosažených bodů.

Body*	20	16
Počet laboratoří	35	1
(% laboratoří)	97,2	2,8

* limit (hranice úspěšnosti) = 18,57 bodů

Tabulka 2 Souhrnné výsledky

Souhrnné výsledky mikroskopického a kultivačního vyšetření – počet laboratoří se správným výsledkem pro jednotlivé vzorky a jejich podíl z celkového počtu přihlášených laboratoří.

Vzorek	Mikroskopie	Kultivace
A	36 (100 %)	36 (100 %)
B	36 (100 %)	36 (100 %)
C	35 (97,2 %)	35 (97,2 %)
D	36 (100 %)	36 (100 %)
E	36 (100 %)	36 (100 %)

Tabulka 3 Charakter chyb mikroskopie a kultivace

Vzorek	Mikroskopie		Kultivace	
	Falešná pozitivita	Falešná negativita	Falešná pozitivita	Falešná negativita
A	X	X	X	X
B	X	X	X	X
C	1	X	1	X
D	X	X	X	X
E	X	X	X	X

Tabulka 4 Přehled metod mikroskopie použitých zúčastněnými laboratořemi a rozložení správných výsledků a chyb (falešně pozitivních a falešně negativních výsledků) v rámci těchto kategorií v části mikroskopie.

Metoda mikroskopie	Počet laboratoří	Správné určení*	Falešně pozitivní*	Falešně negativní*
Ziehl-Neelsenovo barvení	19 (52,8 %)	19 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Fluorescenční mikroskopie	17 (47,2 %)	16 (94,1 %)	1 (5,9 %)	0 (0 %)
celkem	36 (100 %)	35 (97,2 %)	1 (2,8 %)	0 (0 %)

* procenta udávají podíl počtu laboratoří se správným výsledkem z počtu laboratoří používajících danou metodu

Tabulka 5 Přehled hlavních metod dekontaminace používaných v přihlášených laboratořích a rozložení správných výsledků a chyb (falešně pozitivních a falešně negativních výsledků) v rámci těchto kategorií v části kultivace.

Metoda dekontaminace	Počet laboratoří	Správné určení*	Falešně pozitivní*	Falešně negativní*
PETROFF	23 (63,9 %)	23 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
N-A-L-C	7 (19,4 %)	7 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
HCl + NaOH	3 (8,3 %)	2 (66,7 %)	1 (33,3 %)	0 (0 %)
Lauryl Sulfát	3 (8,3 %)	3 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
celkem	36 (100 %)	35 (97,2 %)	1 (2,8 %)	0 (0 %)

Tabulka 6 Přehled hlavních metod kultivace (typ média) používaných v přihlášených laboratořích a rozložení správných výsledků a chyb (falešně pozitivních a falešně negativních výsledků).

Metoda kultivace	Počet laboratoří	Správné určení*	Falešně pozitivní*	Falešně negativní*
Löwenstein-Jensenova vaječná půda	34 (94,4 %)	33 (97,1 %)	1 (2,9 %)	0 (0 %)
OGAWA	30 (83,3 %)	30 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
MGIT	11 (30,6 %)	11 (100 %)	1 (33,3 %)	0 (0 %)
Šulova půda	15 (41,7 %)	14 (93,3 %)	1 (6,7 %)	0 (0 %)
Middlebrook 7H10	1 (2,8 %)	1 (100%)	0 (0 %)	0 (0 %)

Tabulka 7 Přehled výsledků za jednotlivé laboratoře**EHK 1453 - Mikroskopie a kultivace rodu *Mycobacterium***

odesláno: 21. 1. 2025

uzávěrka: 1. 4. 2025

Očekávané výsledky:**A** – pozitivní **B** – pozitivní **C** – negativní **D** – negativní **E** – negativní

Poř. číslo	Kód	Mikroskopie správné určení	Charakter chyby (fal. poz. / fal. neg.)	Kultivace správné určení	Charakter chyby (fal. poz. / fal. neg.)	Σ BODŮ
1	009	5x		5x		20
2	017	5x		5x		20
3	028	5x		5x		20
4	032	5x		5x		20
5	039	5x		5x		20
6	047	5x		5x		20
7	051	5x		5x		20
8	055	5x		5x		20
9	058	5x		5x		20
10	061	5x		5x		20
11	064	5x		5x		20
12	065	5x		5x		20
13	066	5x		5x		20
14	071	5x		5x		20
15	089	5x		5x		20
16	156	5x		5x		20
17	184	5x		5x		20
18	192	5x		5x		20
19	207	4x	Falešně pozitivní	4x	Falešně pozitivní	16
20	208	5x		5x		20
21	214	5x		5x		20
22	215	5x		5x		20
23	228	5x		5x		20
24	290	5x		5x		20
25	317	5x		5x		20
26	324	5x		5x		20
27	333	5x		5x		20
28	341	5x		5x		20
29	369	5x		5x		20
30	370	5x		5x		20
31	388	5x		5x		20
32	407	5x		5x		20
33	456	5x		5x		20
34	590	5x		5x		20
35	760	5x		5x		20
36	792	5x		5x		20