



Státní zdravotní ústav
Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti
Poskytovatel zkoušení způsobilosti akreditovaný ČIA
podle ČSN EN ISO/IEC 17043, reg. č. 7001
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10 – Vinohrady



Závěrečná zpráva

Zkoušení způsobilosti v lékařské mikrobiologii
(Externí hodnocení kvality)

PT#M/23/2017 (č.977)

Mykologická diagnostika

Praha, srpen 2017

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT# M/23/2017	2
2. Příprava vzorků	4
3. Hodnocení	5
4. Souhrn výsledků	7
5. Komentář k identifikovaným vzorkům	9
6. Slovo na závěr	10

7. Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře

Program zkoušení způsobilosti PT#M/23/2017 byl zaměřen na diagnostiku kvasinek. Návrh a realizace PT#M/23/2017 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 programů 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.

Nedílnou součástí závěrečné zprávy je výsledkový protokol jednotlivé laboratoře.

Koordinátor:

MUDr. Barbora Macková

Tel: 267 082 101

Zprávu vypracoval:

MUDr. Barbora Macková (ESPT SZÚ Praha)

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

Zprávu schválil: MUDr. Barbora Macková

Dne: 28.8.2017

Pracoviště 2 ESPT (AP CEM – Akreditační pracoviště Centra epidemiologie a mikrobiologie):

www.szu.cz/espt email: apcem@szu.cz

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT# M/23/2017

Identifikace kola/cyklu:	PT#M/23/2017
Název:	Mykologická diagnostika
Poskytovatel:	SZÚ – Centrum epidemiologie a mikrobiologie - ESPT Šrobárova 48, Praha 10, 100 42 tel.: + 420 267082575, fax.: + 420 267082271
Vedoucí ESPT	Ing. Věra Vrbíková
Koordinátor:	MUDr. Barbora Macková
Subdodavatel:	Laboratoř lékařské mykologie, Pardubická nemocnice, Kyjevská 44, 532 03 Pardubice, MUDr. Karel Mencl, CSc.
Charakteristika materiálu:	5 lyofilizovaných simulovaných biologických materiálů s kvasinkovými mikroorganismy k identifikaci, z toho jeden vzorek také pro určení citlivosti k ATM.
Podstata a účel PT/EHK:	druhá identifikace mykotických organismů izolovaných z klinického materiálu a stanovení citlivosti na antimykotika
Kritéria pro účast na PT/EHK:	Znalost a technické vybavení pro identifikaci mykotických organismů
Způsob přípravy:	viz Protokol o přípravě vzorků
Množství připravovaného test. materiálu:	cca pro 60 laboratoří (a pro ověření homogenity a stability vzorků)
Označení vzorkovnic:	ESPT SZÚ PT # M/23/2017 – EHK 977 Mykologická diagnostika
Zabezpečení kvality vzorku:	manipulace za sterilních podmínek, vhodné skladování
Metrologická návaznost:	klinický materiál
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:	58 laboratoří
Termín distribuce:	9. 5. 2017
Způsob distribuce:	Rozvoz přepravní službou Přílohy: formulář pro zápis výsledků a pokyny účastníkům
Předání výsledků:	písemně do 30. 5. 2017 na předepsaných formulářích
Způsob vyhodnocení výsledků:	Každý rok je na základě výsledků za uplynulý rok vybráno 20 laboratoří s nejvyšším počtem dosažených bodů. Vzorek je hodnocen pouze v případě, že nejméně 16 z těchto 20 laboratoří dosáhne výsledku shodného s výsledky testování výchozího materiálu v NRL. Za identifikaci signifikantního patogenu 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 provedeno ve stupnici 2, 1, 0 a –2 bodů
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 semináře, rozeslání zprávy účastníkům:	srpen 2017

2. Příprava 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 (DAB-007-2016-0336-802) dle ČSN EN ISO 15189, ze dne 16.5.2016.

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. Hodnocení

Princip 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.

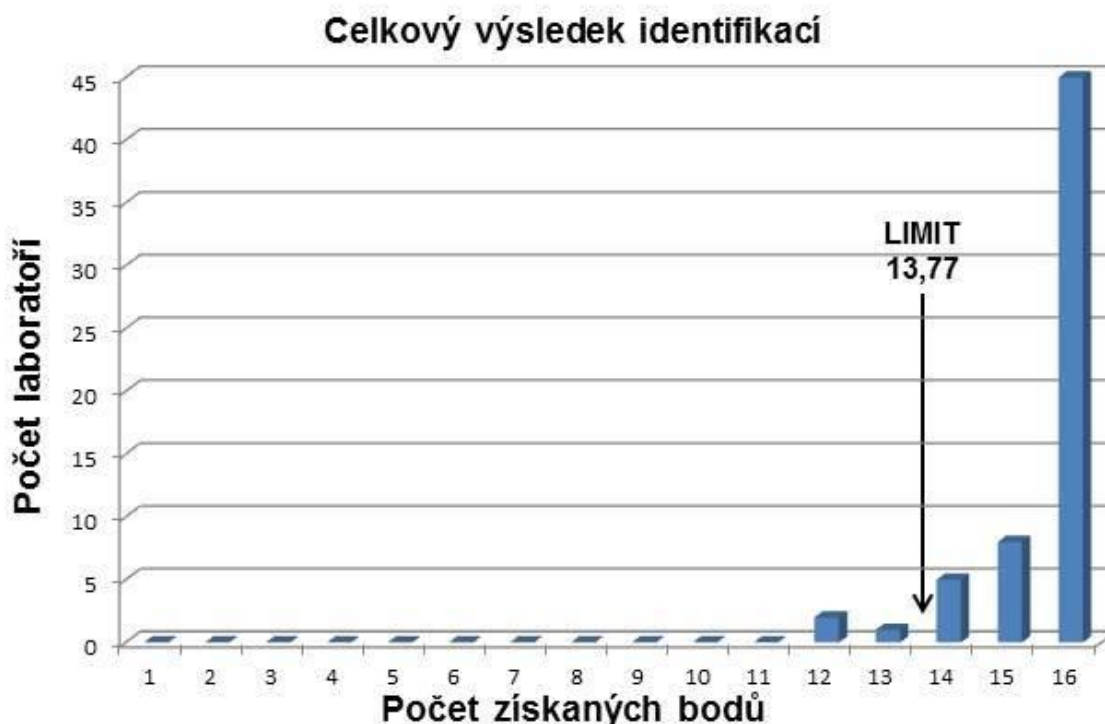
Bodování pro identifikaci je prováděno ve stupnici **2 body** - správná rodová i druhová identifikace, **1 bod** – správná rodová identifikace, **0** – neidentifikováno, **-2 body** – chybná identifikace.

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).

Tabulka č.1: Úspěšnost laboratoří v EHK 977

Dosažené body	12	13	14	15	16
Počet laboratoří	2	1	5	8	45
Procento	3,3	1,6	8,2	13,1	73,8



Závěr:

Maximálního počtu 16 bodů dosáhlo 45 laboratoří z 61 zúčastněných.

Aritmetický průměr byl 15,59

Směrodatná odchylka byla 0,91

Limit (t.j. průměr –2 směrodatné odchylky) byl 13,77 bodů.

Limit splnilo 58 laboratoří, 3 laboratoře neuspěly.

Výsledky jednotlivých laboratoří jsou uvedeny v kapitole 4 (Souhrn výsledků)

4. Souhrn výsledků

Tabulka č.2 : Bodové hodnocení výsledků jednotlivých laboratoří

Kód laboratoře	Bodové hodnocení					
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	součet
11	4	2	4	2	4	16
16	4	2	4	2	4	16
17	4	2	4	2	4	16
18	4	2	4	2	4	16
23	4	2	4	2	4	16
28	4	2	4	2	4	16
31	4	2	4	2	4	16
32	4	2	4	2	4	16
37	4	2	4	2	4	16
39	4	2	4	2	4	16
48	4	2	4	2	4	16
50	4	2	4	2	4	16
51	4	2	3	2	4	15
53	4	2	4	2	4	16
58	4	2	4	2	4	16
63	2	2	4	2	4	14
64	3	2	1	2	4	12
65	4	2	4	2	4	16
70	4	2	3	2	4	15
71	4	2	4	2	4	16
88	4	2	4	2	4	16
89	4	2	4	2	4	16
156	4	2	4	2	4	16
174	4	2	4	2	4	16
192	4	2	4	2	4	16
207	4	2	4	2	4	16
208	4	2	4	2	4	16
209	3	2	4	2	4	15
211	4	2	4	2	4	16
214	4	2	4	2	4	16
215	4	2	4	2	4	16
228	4	2	4	1	3	14
283	4	2	4	2	4	16
289	4	2	4	2	4	16
290	4	2	3	2	4	15
299	4	2	4	2	4	16

Kód laboratoře	Bodové hodnocení					
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	součet
302	4	2	4	2	4	16
333	4	2	4	2	4	16
350	4	2	4	2	4	16
354	4	2	4	2	4	16
365	4	2	4	2	4	16
369	4	2	4	2	4	16
370	4	2	4	2	4	16
371	4	2	4	2	4	16
373	4	2	3	2	4	15
384	4	2	4	2	4	16
388	4	2	4	2	4	16
407	4	2	3	2	4	15
413	4	2	3	2	4	15
443	4	2	4	2	4	16
460	3	2	4	2	2	13
465	2	2	4	2	4	14
467	4	2	4	2	4	16
472	4	2	4	2	4	16
539	4	2	4	2	4	16
554	4	2	4	2	4	16
566	4	2	4	2	4	16
595	4	2	4	2	4	16
641	2	2	2	2	4	12
702	4	2	4	2	4	16
763	4	2	3	2	4	15
775	4	2	4	2	4	16

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

Vzorek	Mikroorganismus	Počet laboratoří	Procento
1	<i>Candida dubliniensis</i> <i>Candida glabrata</i>	55	90,2
2	<i>Candida kefyr</i>	61	100
3	<i>Trichosporon mucoides</i> <i>Candida parapsilosis</i>	52	85,2
4	<i>Candida lusitaniae</i>	60	98,4
5	<i>Candida tropicalis</i>	61	100
	- bezchybná citlivost	57 / 59	93,4 / 96,7

5. Komentář k identifikovaným vzorkům

Pro rok 2017 byly v sestavě vzorků zařazeny dva směsné, které obsahovaly po dvou druhích kvasinek. Tomuto stavu odpovídalo i zadání, které nebylo popisováno jako kmeny, ale jako „vzorky materiálů“. Tyto vzorky pro rok 2017 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. tropicalis*, který vykazoval jasnou citlivost k oběma antimykotikům, citlivost byla ověřena několika nezávislými testy.

Stejně jako v minulých letech jsme i pro toto kolo EHK volili takové kmeny 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 směsných vzorků. Všechny vzorky byly před i po lyofilizaci podrobeny přísnému hodnocení.

Všechny laboratoře v tomto kole mykologické diagnostiky neměly žádný problém se vzorkem č. 2 – *Candida kefyr* a č.5 – *Candida tropicalis*, u vzorku č. 4 s *Candida lusitaniae* pochybila pouze jediná laboratoř. U vzorku č. 1, který obsahoval kmen *Candida dubliniensis* a *Candida glabrata* pochybilo 6 laboratoří – 2 laboratoře diagnostikovaly pouze *C.glabrata*, další 4 laboratoře identifikovaly *C. dubliniensis* jako *C. albicans*. V případě vzorku č. 3 se směsí *Candida parapsilosis* a *Trichosporon mucoides* bylo plně úspěšných 52 laboratoří. Většina zbývajících 9 laboratoří identifikovala *Trichosporon mucoides* jako *Trichosporon sp.*, 1 laboratoř tuto kvasinku neobjevila a 1 k této směsi přidala chybně diagnostikovaný *Cryptococcus albidus*.

Pokud jde o informace o používaných technikách identifikace kvasinek, ve většině parametrů nedošlo prakticky k žádným změnám. V případě používání MALDI-TOF systému se zvýšil počet laboratoří s tímto přístrojem pouze o 1.

Pro rok 2017 (EHK-977) bylo do sestavy hodnocení opět zařazeno kromě identifikace kmene také zhodnocení jeho citlivostního spektra a to opět k flukonazolu a vorikonazolu. Použitý referenční kmen *C. tropicalis* vykazoval v laboratorních testech (kvalitativně i kvantitativně) velmi dobrou citlivost k oběma antimykotikům. Pochybení bylo zaznamenáno pouze u 2 laboratoří, kdy jedna u flukonazolu vykazovala rezistenci, druhá u vorikonazolu intermediální citlivost. Další dvě laboratoře uvedly, že testy citlivosti nenabízejí a tudíž neprovádějí.

6. Slovo na závěr

Závěrem je opět možné konstatovat, že i kolo EHK-977/2017 v mykologické diagnostice dopadlo velmi dobře. Z 61 zúčastněných laboratoří neuspěly pouze tři, kdy hlavní příčinou byla chybná identifikace ve směsných vzorcích a rezistence u jednoho ATM.

V tomto kole EHK byl malý rozptyl bodů získaných jednotlivými laboratořemi, proto směrodatná odchylka byla dost neúprosná.

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