



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/30/2017 (č.985)**

**Mikroskopická diagnostika tropických  
tkáňových parazitóz**

**Praha, prosinec 2017**

## Obsah

1.	Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing)	3
2.	Příprava vzorku	4
3.	Hodnocení	4
5.	Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/30/2017 byl zaměřen na mikroskopickou diagnostiku tropických tkáňových parazitóz. Návrh a realizace PT#M/30/2017 byly prováděny podle standardního operačního postupu SOP M/30 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.

Nedílnou součástí závěrečné zprávy je výsledkový protokol jednotlivé laboratoře.

Za správnost výsledků ručí koordinátor příslušného cyklu EHK.



**Koordinátor:** MUDr. Barbora Macková

ESPT SZÚ Praha

**Zprávu vypracoval:**

RNDr. Lenka Richterová (Oddělení klinické mikrobiologie - Parazitologie, NNB)

Tel: 266 084 303

**Zprávu schválil:** MUDr. Barbora Macková

Dne: 18. prosince 2017

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

[www.szu.cz/espt](http://www.szu.cz/espt)

email: [apcem@szu.cz](mailto:apcem@szu.cz)

**1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT# M/30/2017**

Identifikace kola/cyklus:	<b>PT#M/30/2017</b>
Název:	<b>Mikroskopická diagnostika tropických tkáňových parazitóz</b>
Poskytovatel:	SZÚ - ESPT Šrobárova 48, Praha 10, 100 42
Vedoucí ESPT	Ing. Věra Vrbíková
Koordinátor:	MUDr. Barbora Macková
Subdodavatel:	Oddělení klinické mikrobiologie - Parazitologie, NNB, Budínova 67/2, 180 81 Praha 8, RNDr. Lenka Richterová
Charakteristika materiálu:	8 mikroskopických preparátů (5 vzorků)
Podstata a účel PT/EHK:	Nalézt a identifikovat původce tropických tkáňových parazitóz, zejména malárie a leishmánie, na mikroskopických preparátech zhotovených z klinického materiálu a interpretovat výsledek.
Kritéria pro účast na PT/EHK:	Znalost a technické vybavení pro identifikaci původců tropických tkáňových parazitóz na mikroskopických preparátech
Způsob přípravy:	Výchozím materiálem je krev pro průkaz malarických plasmodií. Z krve jsou připraveny krevní roztěry, tenký nátěr a tlustá kapka. Vzorek představuje jeden až dva mikroskopické preparáty (podle popisu v legendách ke každému vzorku). Výchozím materiálem u leishmánie je kostní dřev, vzorek představuje barvený roztěr.
Množství připravovaného test. materiálu:	pro 35 laboratoří
Označení vzorkovnic:	ESPT SZÚ PT # M/30/2017 – EHK 985 Mikroskopická diagnostika tropických tkáňových parazitóz
Zabezpečení kvality vzorku:	Je zajištěna příprava vzorků za aseptických podmínek. Materiál je zpracován tj. preparáty jsou zhotoveny a dále zpracovány (fixace, barvení) okamžitě po odběru. Kromě tlusté kapky jsou po zaschnutí všechny preparáty fixovány metanolem. Všechny preparáty rozesílané v dané sérii jsou mikroskopicky zkontrolovány, zda obsahují cílový marker a zda je identifikovatelný v odpovídající kvalitě.
Návaznost metody:	klinický materiál
Termín testu homogenity a stability:	Všechny preparáty před distribucí vzorků a náhodně vybrané preparáty po termínu jednotného zahájení odečítání všemi účastníky.
Podmínky distribuce a uchování vzorků:	Přeprava a uchování trvalých mikroskopických preparátů dlouhodobě při pokojové teplotě.
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe
Počet účastníků:	24 laboratoří
Termín distribuce:	6. 9. 2016
Způsob distribuce:	Rozvoz přepravní službou Přílohy: formulář pro zápis výsledků a pokyny účastníkům
Předání výsledků:	písemně do 28. 9. 2014 na předepsaných formulářích
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Za vztažnou hodnotu je považován výsledek získaný NNB – OKM - Parazitologie
Způsob vyhodnocení výsledků:	Bodování pro identifikaci je provedeno ve stupnici 3, 2, 1 a 0 bodů.
Určení maximální směrodatné odchylky:	Aritmetický průměr výsledků účastníků +/-2 směrodatné odchylky od průměru celkově získaných bodů
Termín rozeslání zprávy účastníkům:	Říjen 2017

## 2. Příprava vzorků

Vzorky byly připraveny na pracovišti subdodavatele - Oddělení klinické mikrobiologie - Parazitologie, NNB, Budínova 67/2, 180 81 Praha 8, RNDr. Lenka Richterová. Vzorky jsou připravovány průběžně dle SOP M/30. Vzorky byly rozeslány do 24 laboratoří, výsledky odevzdalo 23 laboratoří.

Simulované klinické vzorky malárie pro EHK byly připraveny z žilní krve pacientů. Žilní krev odebraná do EDTA nebo do citrátu byla zpracována do dvou hodin po odběru dle rutinního postupu přípravy nátěrů pro vyšetření krevních parazitů. Simulované klinické vzorky leishmánie pro EHK byly připraveny z punktátu kostní dřeně.

Každý vzorek tvoří vždy 1-2 podložní skla (jeden fixovaný a barvený tenký nátěr z 5  $\mu$ l žilní krve a jedna nefixovaná a barvená tlustá kapka). V případě vzorku kostní dřeně na leishmánie jde o jedno podložní sklo s barveným tenkým nátěrem.

Kromě tlusté kapky byly po zaschnutí všechny preparáty fixovány metanolem (5 minut). Všechny preparáty vč. tlusté kapky byly následně barveny roztokem Giemsa-Romanowski.

Každý preparát dané série byl mikroskopicky vyšetřen a zkontrolován, zda obsahuje cílový marker a zda je identifikovatelný v odpovídající kvalitě.

Trvalé mikroskopické preparáty jsou uchovávány dlouhodobě při pokojové teplotě.

Vzorky (podložní skla s mikroskopickými preparáty) byly označeny a uloženy do přepravní krabice a pracovníky OKM NNB přepraveny z OKM NNB do SZÚ.

Vzorky (podložní skla s mikroskopickými preparáty) jsou označeny pořadovým číslem 1 – 5, číslem EHK a datem rozeslání a umístěny do přepravního umělohmotného boxu na podložní skla. Až do distribuce účastníkům EHK následující den byly uskladněny při pokojové teplotě. Přeprava vzorků je zajišťována přepravcem.

**3. Hodnocení****Maximálně dosažitelný počet bodů: 15****Vzorek č. 1: *Plasmodium falciparum***

parazitémie: 11%

maximální počet bodů = 3

odečítají se: 3 body za nenalezení plasmodií; 2 body za chybné určení druhu;  
1 bod za každý další falešně pozitivní nález plasmodií, 2 body  
za falešně pozitivní nález jiného původce

Vzorek č.1/ výsledky	<i>P. falciparum</i>
Počet laboratoří	23

**Vzorek č. 2: NEGATIVNÍ**

maximální počet bodů = 3

odečítají se: 3 body za každý falešně pozitivní nález

Vzorek č.2/ výsledky	NEGATIVNÍ
Počet laboratoří	23

**Vzorek č. 3: *Plasmodium ovale***

parazitémie: 0,21%

maximální počet bodů = 3

odečítají se: 3 body za nenalezení plasmodií; 2 body za chybné určení druhu;  
1 bod za každý další falešně pozitivní nález plasmodií, 2 body  
za falešně pozitivní nález jiného původce

Vzorek č.3/výsledky	<i>P. ovale</i>	<i>P. vivax</i>
Počet laboratoří	8	15

**Vzorek č. 4: *Leishmania infantum***

maximální počet bodů = 3

odečítají se: 3 body za nenalezení leishmání; 2 body za falešně pozitivní  
nález jiného původce

Vzorek č.4/ výsledky	<i>Leishmania sp.</i>	<i>P. falciparum</i>	NEGATIVNÍ
Počet laboratoří	21	1	1

**Vzorek č. 5: *Plasmodium malariae***

parazitémie: 0,8%

maximální počet bodů = 3

odečítají se: 3 body za nenalezení plasmodií; 2 body za chybné určení druhu;  
1 bod za každý další falešně pozitivní nález plasmodií, 2 body  
za falešně pozitivní nález jiného původce

Vzorek č.5/výsledky	<i>P. malariae</i>	NEGATIVNÍ
Počet laboratoří	21	2

**Parazitémie u vzorků pozitivních na malárii:**

Vzorek č.	1	3	5
Parazitémie (%)	11	0,21	0,08
Rozptyl správných výsledků (%)	7 – 15	0,1 – 0,42	0,04 – 0,16
Chybné výsledky (%)	1 – 6,5	0,01; 0,095; 0,5	0,005 – 0,0375

**KOMENTÁŘ**

Tři vzorky v této sérii byly od pacientů s malárií, jeden od pacientky s malárií s toho času nedetekovatelnou parazitémií a jeden od pacienta s viscerální leishmaniózou. Všechny vzorky byly před zařazením do série EHK určeny mikroskopicky a potvrzeny za pomoci PCR. Tímto kolem neprošla jedna zúčastněná laboratoř.

**Vzorek č. 1**

Všechny zúčastněné laboratoře u pacienta prokázaly malárii s původcem *P. falciparum*. 15 z 23 laboratoří správně určilo parazitémii v širokém limitu tolerance daném variabilitou kvality nátěru. Jednalo se o typického pacienta s těžkou malárií způsobenou *P. falciparum* po návratu ze subsaharské Afriky. Vstupní informace o čtyři dny trvajícím febrilním stavu s průjmy a zvracením opět koresponduje s typickým nálezem u pacienta s rozvinutou tropickou malárií. Vstupní parazitémie u tohoto pacienta byla 24%, po nasazení chininu na JIP ustoupily febrilie, ustaly průjmy, ale rozvinul se obraz polyorgánového selhání- především renální a respirační insuficience. Nicméně orgánová postižení se během několika dní zlepšila na konzervativní léčbě (oxygenoterapie, infuzní terapie, transfúze). Pacient byl dimitován afebrilní, KP kompenzovaný, s mírnou polyurií v dobrém stavu 11 dnů od příjmu.

**Vzorek č. 2**

Vzorek č. 2 byl na malárii, jak správně určily všechny laboratoře, negativní. Pocházel od pacientky, která pobývala 1 měsíc v Zambii, kde je nejčastějším původcem malárie *P. falciparum*, nebrala žádnou profylaxi a po obtížích při letu (zvracení, průjem s příměsí krve) byla zajištěna antibiotiky v Dubaji. Pacientka byla při příjmu, přes typický krevní obraz, negativní na malárii a to mikroskopicky, Ag i pomocí PCR. Pacientka byla hospitalizována a pravidelně byly prováděny nátěry na malárii a PCR, po týdenní hospitalizaci se vrací 13. den od prvního odběru s febrilním stavem a je zachycena malárie *P. falciparum* parazitémie 0,16%. Tento případ důrazně připomíná nutnost opakování vyšetření na malárii přes prvotní negativní výsledek u pacientů s přetrvávajícím podezřením na tuto nákazu.

**Vzorek č. 3**

Jednalo se o pacientku s malárií způsobenou *P. ovale*, která byla léčena perorálně kombinací artemeter-lumefantrine a posléze po vyloučení G-6-PHD deficiencie přeléčena antirelapsovou terapií primaquinem. Parazitémie byla přibližně 0,21% a v tolerančním limitu ji určilo 18 z 23 laboratoří správně. Tento vzorek se však ukázal problematickým při určování druhu plasmodia. 15 z 23 laboratoří ho určilo chybně jako *P. vivax*. V některých případech si mohou být tyto dva druhy plasmodií relativně podobné, k správnému určení druhu mohlo posloužit proměření erytrocytů, které nejsou u *P. ovale* zvětšeny tak jako u *P. vivax*, a při důkladném prohlédnutí tenkého nátěru byly přítomny i pro *P. ovale* typicky protažené erytrocyty. Co je u tohoto případu důležité k povšimnutí, je negativita RDT při příjmu, se kterou se u nízkých parazitemií *P. ovale* a *P. malariae* musí počítat. Tímto poukazují na nezbytnost mikroskopického vyšetření u všech pacientů screanovaných na malárii za pomoci RDT.

**Vzorek č. 4**

Tento vzorek kostní dřene obsahoval amastigoty *Leishmania infantum*, správně ho určilo 21 z 23 laboratoří. Jedna laboratoř označila vzorek za negativní a v jedné laboratoři byl určen jako *P. falciparum*. Tento pacient byl několik měsíců testován jak sérologicky, tak mikroskopicky na viscerální leishmaniózu a k záhytu amastigotů došlo až v rámci opakovaného vyšetření kostní dřene. Starší biotické materiály byly zpětně určeny jako pozitivní až za použití PCR detekce. Sérologicky zůstal, z důvodu imunoprese u onkologické diagnózy, negativní po celou dobu léčby (Amfotericin-B). Tento případ ilustruje nutnost zapojení všech diagnostických možností u pacientů mikroskopicky či sérologicky negativních při přetrvávajícím podezření na viscerální leishmaniózu.

**Vzorek č. 5**

Tento vzorek byl od pacientky s nákazou *Plasmodium malariae*. Pacientka byla ugandská žena a malárie jí byla diagnostikována v rámci pravidelné těhotenské prohlídky, aniž by trpěla nějakými závažnějšími obtížemi. Zásadní byla v tomto případě mikroskopie, jelikož v mnoha zemích subsaharské Afriky, stejně jako v této nemocnici se ke screeningu používá RDT obsahující pouze Ag k detekci *P. falciparum*. 21 z 23 laboratoří plasmodia našla a i správně určila. Toto je dobrý výsledek v určení druhu, vezmeme-li v úvahu, že malárie způsobená *P. malariae* je do ČR importována ojediněle a většina z Vás se tak s ní v diagnostické praxi nejspíše neseťkala. 13 z 23 laboratoří pak i naměřilo parazitémii v limitech tolerance.

Číslo vzorku	Druh parazita	Vývojové stádium	Parazitémie
1	<i>Plasmodium falciparum</i>	C	11%
2	NEGATIVNÍ		
3	<i>Plasmodium ovale</i>	C, D, E	0,21%
4	<i>Leishmania infantum</i>	A	
5	<i>Plasmodium malariae</i>	C, D, E	0,08%

## PŘEDBĚŽNÉ VÝSLEDKY HODNOCENÍ 23 ZÚČASTNĚNÝCH LABORATOŘÍ

Počet bodů	15	13	12	10	8
Počet laboratoří	7	12	1	2	1

Průměr = 13,09

Standardní odchylka = 3,54

**Limit nesplnila jedna laboratoř.**

(Pokud by byla hodnocena chybná parazitémie ztrátou bodu, výsledky by byly následující:)

Počet bodů	15	14	13	12	11	9	8	5
Počet laboratoří	2	3	8	5	2	1	1	1

Průměr = 12,17

Standardní odchylka = 4,44

(Limit by nesplnila jedna laboratoř.)

***Důležité upozornění !!!***

Pokud je některá laboratoř přesvědčena a může doložit, že byla hodnocením poškozena, může adresovat svou žádost o revizi výsledku písemně AP CEM SZÚ nejpozději do 15.1.2018. Na žádosti, označené pouze kódem laboratoře, nikoliv jménem či adresou pracoviště, stručně uveďte podstatu vašeho problému. Případy, kdy bude nutno mikroskopicky konzultovat sporné vzorky, budou jednotlivě řešeny během ledna 2018 nezávislými externími konzultanty.

Vypracovala: RNDr. Lenka Richterová