



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/23/2018 (č. 1023)

Mykologická diagnostika

Praha, srpen 2018

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT# M/23/2018.....	3
2. Příprava vzorků.....	4
3. Hodnocení.....	4
4. Souhrn výsledků	6
5. Komentář k identifikovaným vzorkům	8
6. Slovo na závěr	9

Program zkoušení způsobilosti PT#M/23/2018 byl zaměřen na diagnostiku kvasinek. Návrh a realizace PT#M/23/2018 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.
Příloha závěrečné zprávy, tj. ohodnocený výsledkový protokol, je rozesílána poštou.

Koordinátor:
MUDr. Barbora Macková
Tel: 267 082 258

Zprávu vypracoval:
MUDr. Barbora Macková (ESPT SZÚ Praha)
MUDr. Karel Mencl, CSc. (OKM, Pardubická nemocnice, Pardubice)

Zprávu schválil: MUDr. Barbora Macková

Dne: 28. 8. 2018

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/23/2018

Identifikace kola/cyklu:	PT#M/23/2018
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:	druhová 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 65 laboratoří (a pro ověření homogenity a stability vzorků)
Označení vzorkovnic:	EHK 1023, PT#M/23, č. 1 – 5, 9. 5. 2018
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:	62 laboratoří
Termín distribuce:	9. 5. 2018
Způsob distribuce:	Rozvoz přepravní službou Přílohy: formulář pro zápis výsledků a pokyny účastníkům
Předání výsledků:	písemně do 30. 5. 2018 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, u citlivosti +1 a -1 bod
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, uveřejnění zprávy účastníkům:	srpen 2018

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 (AII-034-2018-0336-802) dle ČSN EN ISO 15189, ze dne 28. 6. 2018.

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. 1206.4 dle ČSN EN ISO/IEC 17025 – 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. U citlivosti **1 bod** – správné hodnocení, **-1 bod** – chybné hodnocení.

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	1	0	6	1	54
Procento	1,6	0,0	9,7	1,6	87,1

Celkový výsledek identifikací



Závěr:

Maximálního počtu 16 bodů dosáhlo 54 laboratoří z 62 zúčastněných.

Aritmetický průměr byl 15,73

Směrodatná odchylka byla 0,77

Limit (t. j. průměr -2 směrodatné odchylky) byl 14,19 bodů.

Limit splnilo 55 laboratoří, 2 laboratoře splnily na hladině 14 bodů s ohledem na neprovádění citlivostí, jedna s 15 body při provádění omezeném (viz označení v kap. 4).

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

4. Souhrn výsledků

Tabulka č. 2: Bodové hodnocení výsledků jednotlivých laboratoří
 Označeny laboratoře, které neprovádí citlivosti k ATM, nebo omezeně.

Kód laboratoře	Bodové hodnocení							součet
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	F	V	
11	4	4	2	2	2	1	1	16
16	4	4	2	2	2	1	1	16
17	4	4	2	2	2	1	1	16
18	4	4	2	2	2	1	1	16
23	4	4	2	2	2	1	1	16
28	4	4	2	2	2	1	1	16
31	4	4	2	2	2	1	1	16
32	4	4	2	2	2	1	1	16
35	4	4	2	2	2	1	1	16
37	4	4	2	2	2	1	1	16
39	4	4	2	2	2	1	1	16
48	4	4	2	2	2	1	1	16
50	4	4	2	2	2	1	1	16
51	4	4	2	2	2	1	-	15
53	4	4	2	2	2	-	-	14
58	4	4	2	2	2	1	1	16
63	4	4	2	2	2	1	1	16
64	4	4	2	2	2	1	1	16
65	4	4	2	2	2	1	1	16
70	4	4	1	2	2	-1	1	14
71	4	4	2	2	2	1	1	16
88	4	4	2	2	2	1	1	16
89	4	2	2	2	2	1	1	14
156	4	4	2	2	2	1	1	16
174	4	4	2	2	2	-	-	14
192	4	4	2	2	2	1	1	16
207	4	4	2	2	2	1	1	16
208	4	4	2	2	2	1	1	16
209	4	4	2	2	2	1	1	16
211	4	4	2	2	2	1	1	16
214	4	4	2	2	2	1	1	16
215	4	4	2	2	2	1	1	16
228	4	4	2	2	2	1	1	16
283	4	4	2	2	2	1	1	16
289	4	4	2	2	2	1	1	16
290	4	4	2	2	2	1	1	16
299	4	4	2	2	2	1	1	16

Kód laboratoře	Bodové hodnocení							součet
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	F	V	
302	4	4	2	2	2	1	1	16
333	4	4	2	2	2	1	1	16
350	4	2	2	2	2	1	1	14
354	4	4	2	2	2	1	1	16
365	4	4	2	2	2	1	1	16
369	4	4	2	2	2	1	1	16
370	4	4	2	2	2	1	1	16
371	4	4	2	2	2	1	1	16
373	4	4	2	2	2	1	1	16
384	4	4	2	2	2	1	1	16
388	2	4	2	2	2	1	1	14
407	4	4	2	2	2	1	1	16
413	4	4	2	2	2	1	1	16
443	4	4	2	2	2	1	1	16
456	4	4	2	2	2	1	1	16
460	4	4	2	2	2	1	1	16
465	4	4	2	2	2	1	1	16
467	4	4	2	2	2	1	1	16
539	4	4	2	2	2	1	1	16
554	4	4	2	2	2	1	1	16
566	4	0	2	2	2	1	1	12
595	4	4	2	2	2	1	1	16
641	4	4	2	2	2	1	1	16
702	4	4	2	2	2	1	1	16
763	4	4	2	2	2	1	1	16

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

Vzorek	Mikroorganismus	Počet laboratoří	Procento
1	<i>Candida tropicalis</i> <i>Candida lusitanae</i> (<i>Cyberlindera lusitanae</i>)	61	98,4
2	<i>Candida glabrata</i> <i>Candida krusei</i> (<i>Issatschenkia orientalis</i>)	59	95,2
3	<i>Candida dubliniensis</i>	61	98,4
4	<i>Candida albicans</i>	62	100
5	<i>Candida parapsilosis</i>	62	100
	- bezchybná citlivost	58 z 59	98,3

5. Komentář k identifikovaným vzorkům

Pro rok 2018 byly v sestavě vzorků zařazeny dva směsné, které obsahovaly po dvou druzích kvasinek. Tomuto stavu odpovídalo i zadání, které nebylo popisováno jako kmeny, ale jako „vzorky materiálů“. Tyto vzorky pro rok 2018 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. parapsilosis*, 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. Tato naše snaha se však pravděpodobně vymstila 5 laboratořím, které doslova o chlup nespĺnily limit tohoto kola. „Na vině“ je celkově vysoké hodnocení většiny laboratořím, což zvyšuje aritmetický průměr a zvyšuje i směrodatnou odchylku. Ani přepočítání na původních 14 bodů za celkové hodnocení pouze identifikací by na hodnocení nic nezměnilo, kromě jediné laboratoře, ale protože se přihlásila k provedení citlivosti, bylo by nutné pro splnění jejího limitu anulovat tuto část testů u všech laboratořím.

Všechny laboratoře v tomto kole mykologické diagnostiky neměly žádný problém se vzorkem č. 4 – *Candida albicans* a č.5 – *Candida parapsilosis*, u vzorku č. 3 s *Candida dubliniensis* pochybila pouze jediná laboratoř. U vzorku č. 1, který obsahoval kmeny *Candida tropicalis* a *Candida lusitanae* pochybila rovněž jediná laboratoř a u směsného vzorku č. 2 s *Candida glabrata* a *Candida krusei* tři laboratoře. Bohužel, v tomto kole ztráta i pouhých dvou bodů znamenala hodnocení pod limitem.

Pokud jde o informace o používaných technikách identifikace kvasinek, ve většině parametrů nedošlo prakticky k žádným velkým změnám. Zde můžete nahlédnout do údajů v Tab. 4.

Tab. 4 Přehled diagnostických postupů (laboratoře zapojené do EHK z mykologie v r. 2018)

DIAGNOSTICKÝ TEST PRO IDENTIFIKACI	POČET LABORATOŘÍ	DIAGNOSTICKÝ TEST PRO CITLIVOSTI K ATM	POČET LABORATOŘÍ
CANDISELECT	40	E-TEST BioMérieux	17
MALDI TOF	34	ITEST Plus	16
AUXACOLOR	31	NEOSENSITABS/Biovendor	13
RÝŽOVÝ AGAR	14	E-TEST Liofilchem	9
API ID 20(32)C	7	VITEK2	6
CANDIDATEST	5	SENSITITRE YEASTONE	6
DALŠÍ TESTY	9	DALŠÍ TESTY	4

Pro rok 2018 (EHK-1023) bylo do sestavy hodnocení opět zařazeno kromě identifikace kmene také zhodnocení jeho citlivostního spektra a to opět, již standardně, k flukonazolu a vorikonazolu. Použitý referenční kmen *C. parapsilosis* vykazoval v laboratorních testech (kvalitativně i kvantitativně) velmi dobrou citlivost k oběma antimykotikům. Pochybení bylo zaznamenáno pouze u jediné laboratoře v hodnocení flukonazolu. Dvě laboratoře uvedly, že testy citlivosti nenabízejí a tudíž neprovádějí, jedna laboratoř uvedla, že nabízí citlivost pouze k flukonazolu.

6. Slovo na závěr

Závěrem by sice bylo opět možné konstatovat, že i kolo EHK-1023/2018 v mykologické diagnostice dopadlo velmi dobře. Z 62 zúčastněných laboratoří neuspělo pouze pět. Z těchto pěti laboratoří u čtyř chybělo ke splnění limitu pouze 0,19 bodu, což je velmi málo, bohužel je statistika neúprosná. Malý rozptyl bodů získaných zúčastněnými laboratořemi velmi přitvrdil v hodnocení jednotlivců.

Opravné kolo série proběhne 9. 10. 2018. O opravné vzorky můžete zažádat **do 14 dnů** od doručení výsledků cestou AP CEM. V případě reklamací vyhodnocení série, prosím postupujte dle reklamačního řádu.

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