



Státní zdravotní ústav
Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti
Poskytovatel programů 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/23/2019 (č. 1078)
Mykologická diagnostika

Praha, srpen 2019

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT# M/23/2019	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/23/2019 byl zaměřen na diagnostiku kvasinek. Návrh a realizace PT#M/23/2019 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: 267 082 101

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

Zprávu schválil: MUDr. Barbora Macková
Dne: 28. 8. 2019

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/23/2019

Identifikace kola/cyklu:	PT#M/23/2019
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 1078 ,PT # M/23, č. 1 – 5, 7. 5. 2019
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 uchovávání vzorků:	přeprava a krátkodobé uchovávání při 4 – 8 ° C chránit před světlem
Možné zdroje chyb:	nedodržení správné laboratorní praxe
Počet účastníků:	60 laboratoří
Termín distribuce:	7. 5. 2019
Způsob distribuce:	Rozvoz přepravní službou Přílohy: formulář pro zápis výsledků a pokyny účastníkům
Předání výsledků:	písemně do 28. 5. 2019 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 uveřejnění závěrečné zprávy:	Do 12 týdnů po předání výsledků k hodnocení

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 (AI-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. 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 lahviček (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.

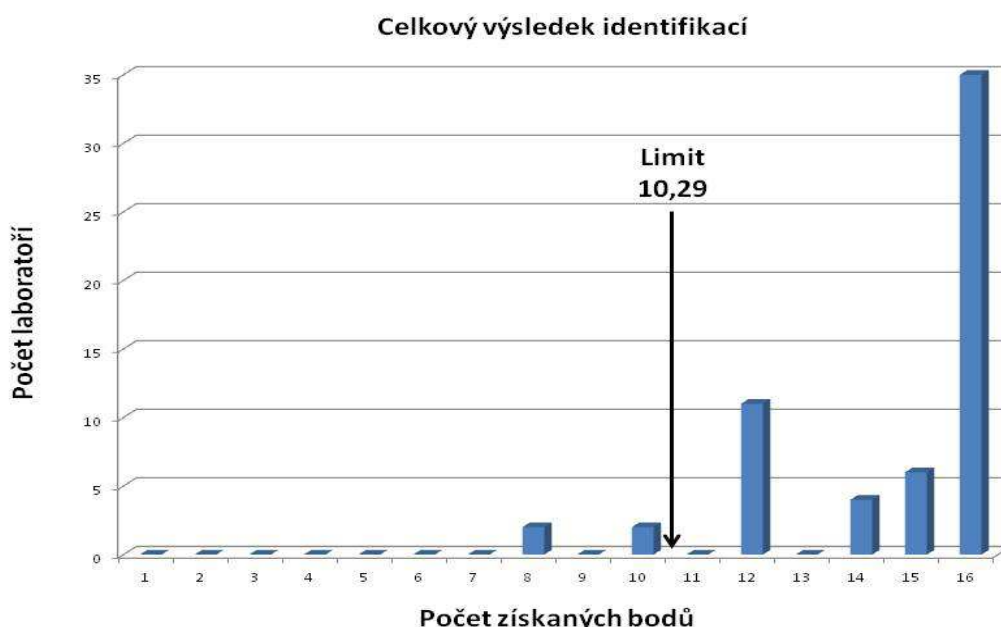
Bodování pro identifikaci je prováděno ve stupnici **2 body** - správná rodová i druhová identifikace, **1 bod** – správná rodová identifikace, **0** – neidentifikováno, **-2 body** – chybná identifikace. U citlivosti **1 bod** – správné hodnocení, **-1 bod** – chybné hodnocení .

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 1078

Dosažené body	8	10	12	14	15	16
Počet laboratoří	2	2	11	4	6	35
Procento	3,3	3,3	18,3	6,7	10,0	58,3



Závěr:

Maximálního počtu 16 bodů dosáhlo 35 laboratoří z 60 zúčastněných.

Aritmetický průměr byl 14,57

Směrodatná odchylka byla 2,14

Limit (t.j. průměr -2 směrodatné odchylky) byl 10,29 bodů.

Limit splnilo 56 laboratoří, 2 laboratoře splnily na hladině 14 bodů s ohledem na neprovádění citlivostí (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	2	4	2	2	1	1	16
16	4	2	2	2	2	1	1	14
17	4	2	4	2	2	1	1	16
18	4	2	4	2	2	1	1	16
23	4	2	4	2	2	1	1	16
28	4	2	2	2	2	1	1	14
31	4	2	4	2	2	-1	-1	12
32	4	2	4	2	2	1	1	16
35	4	2	4	2	2	1	1	16
37	4	2	4	-2	2	1	1	14+1
39	4	2	4	2	2	1	1	16
48	4	2	4	2	2	-1	-1	12
50	4	2	4	2	2	1	1	16
51	4	2	4	2	2	-1	-1	12
53	4	2	4	-2	2	-	-	10
58	4	2	4	2	2	1	1	16
64	4	2	4	-2	2	1	1	12
65	4	2	4	-2	2	1	1	12
71	4	2	4	-2	2	1	1	12
88	4	2	4	2	2	1	1	16
89	2	2	4	-2	2	1	1	10+1
156	4	2	4	2	2	1	1	16
174	4	2	4	2	2	-	-	14
192	4	2	4	2	2	1	1	16
207	4	2	4	2	2	1	1	16
208	4	2	4	2	2	1	1	16
209	4	2	4	1	2	1	1	15
211	2	2	4	2	2	1	1	14
214	4	2	4	2	2	1	1	16
215	4	2	4	2	2	1	1	16
228	4	2	4	2	2	1	1	16
283	4	2	4	2	2	1	1	16
289	4	2	4	2	2	1	1	16
290	4	2	4	-2	2	1	1	12
299	4	2	4	2	2	1	1	16

Kód laboratoře	Bodové hodnocení							součet
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	F	V	
302	4	2	4	2	2	1	1	16
333	4	2	4	2	2	1	1	16
350	4	2	4	2	2	1	1	16
354	4	2	4	2	2	1	1	16
365	4	2	4	2	2	1	1	16
369	4	2	4	2	2	1	1	16
370	4	2	4	2	2	1	1	16
371	4	2	4	2	2	1	1	16
373	4	2	4	-2	2	1	1	12
384	4	2	4	2	2	1	1	16
388	2	2	2	1	2	1	1	15
407	4	2	4	-2	2	1	1	12
413	4	2	4	2	2	1	1	16
443	4	2	4	2	2	1	1	16
456	4	2	4	2	2	1	1	16
460	4	2	4	-2	2	1	1	12
465	4	2	4	2	2	1	1	16
467	4	2	4	1	2	1	1	15
527	4	2	0	-2	2	1	1	8
539	4	2	4	2	2	1	1	16
554	4	2	4	2	2	1	1	16
566	0	2	4	-2	2	1	1	8
595	4	2	4	1	2	1	1	15
641	4	2	1	1	2	1	1	15
702	4	2	4	1	2	1	1	15
763	4	2	4	-2	2	1	1	12

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

Vzorek	Mikroorganismus	Počet laboratoří	Procento
1	<i>Candida krusei</i> (<i>Issatschenkia orientalis</i> <i>Candida lusitanae</i> (<i>Cyberlindera lusitanae</i>))	56	93,3
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60	100
3	<i>Candida parapsilosis</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> (<i>C.pseudotropicalis</i>)	57	95
4	<i>Cyberlindera</i> (<i>Hansenula</i>) <i>fabiani</i>	42	70
5	<i>Candida tropicalis</i>	60	100
	- bezchybná citlivost	55 z 58	94,8

5. Komentář k identifikovaným vzorkům

Pro rok 2019 byly v sestavě vzorků opět 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 2019 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 a nezávislou laboratoří. 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.

Vzhledem k výsledkům v předchozích letech jsme do sestavy zařadili vzorky s méně frekventovanými kvasinkami, nicméně určitelnými i běžnými postupy, nejen hmotnostním spektrofotometrem. Tento náš manévr způsobil větší variabilitu výsledků, a ačkoli necítíme žádné uspokojení nad tímto drobným „úskokem“, umožnil dosažení větší směrodatné odchylky.

Žádná laboratoř v tomto kole mykologické diagnostiky neměla problém se vzorkem č. 2 – *Saccharomyces cerevisiae* a č.5 – *Candida tropicalis*. U vzorku č. 1 s *Candida krusei* a *Cyberlindera lusitaniae* pochybily čtyři laboratoře, u směsného vzorku č. 3, který obsahoval kmeny *Candida parapsilosis* a *Kluyveromyces marxianus* pochybily laboratoře tři. Nejvíce problémů přinesl vzorek č. 4 – *Cyberlindera fabiani* (původně *Hansenula*), kterou se někteří systematikové snaží „přeškolit“ na *Pichia*. U dvou laboratořích jsme jedním bodem ocenili informaci, že vzhledem k problémům s identifikací zaslali kmen na vyšší etapu.

Vyšetření citlivosti kmene *C. tropicalis* zvládlo bez problému 55 laboratořích, 2 laboratoře toto vyšetření neprovádí a ve třech případech byly výsledky chybné. Vzhledem k tomu, že tyto laboratoře uvedly jako techniku Sensititre YeastOne, domníváme se, že se mohlo jednat o technickou chybu.

Pokud jde o informace o používaných technikách identifikace kvasinek, ve většině parametrů nedošlo prakticky k žádným velkým změnám až na to, že se nám o pět míst rozrostl stav laboratořích vlastních hmotnostní spektrofotometr (MALDI). Zde můžete nahlédnout do údajů v Tab. 4.

Tab. 4 Přehled diagnostických postupů (laboratoře zapojené do EHK z mykologie v r. 2019)

DIAGNOSTICKÝ TEST PRO IDENTIFIKACE	POČET LABORATOŘÍ	DIAGNOSTICKÝ TEST PRO CITLIVOSTI K ATM	POČET LABORATOŘÍ
CANDISELECT	43	E-TEST BioMérieux	19
MALDI TOF	39	ITEST Plus	15
AUXACOLOR	22	NEOSENSITABS/Bioventor	12
RÝŽOVÝ AGAR	17	E-TEST Liofilchem	12
API ID 20(32)C	4	VITEK2	5
CANDIDATEST	8	SENSITITRE YEASTONE	7
DALŠÍ TESTY	4	DALŠÍ TESTY	4

6. Slovo na závěr

Závěrem je možné konstatovat, že kolo EHK-1078/2019 v mykologické diagnostice dopadlo velmi dobře. Z 60 zúčastněných laboratoří neuspěly pouze dvě. Svým způsobem je možné za tento výborný stav poděkovat větší směrodatné odchylce, která vznikla větší variabilitou výsledků.

Do budoucna bychom rádi zpestřili mykologickou diagnostiku i o identifikaci některých základních vláknitých mikromycet. Za tímto účelem však bude nutné přepracovat SOP pro toto EHK. Pokud se nám to podaří, budeme Vás všechny včas informovat.

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