



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
Oprava**

Praha, listopad 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.

Opravený výsledkový protokol jednotlivé laboratoře je po zhodnocení vrácen zpět příslušné laboratoři. Opravená závěrečná zpráva je zveřejněna na stránkách SZÚ..

Koordinátor:

MUDr. Barbora Macková

Tel: 267 082 101

Opravu zprávy vypracoval:

MUDr. Barbora Macková (ESPT SZÚ Praha)

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

Zprávu schválil: MUDr. Barbora Macková

Dne: 31.10.2019

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/23/2016

Identifikace kola/cyклу:	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:	ESPT SZÚ PT # M/23/2019 – EHK 1078 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:	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 semináře, rozeslání zprávy účastníkům:	srpen 2019

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 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.

Původně za identifikaci signifikantních patogenů v 5 vzorcích mohly laboratoře v EHK-1078 získat maximálně 14 bodů, za správné vyhodnocení stanovení citlivosti k ATM další dva body, tedy

celkem 16 bodů. Vzhledem k uznání reklamace hodnocení vzorku č.4, a protože k podobnému hodnocení došlo i u dalších laboratoří, není tento vzorek v opravené zprávě součástí hodnocení. Celkový počet dosažitelných bodů je nově, za **hodnocené 4 vzorky**, 14 bodů včetně hodnocení citlivosti.

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.

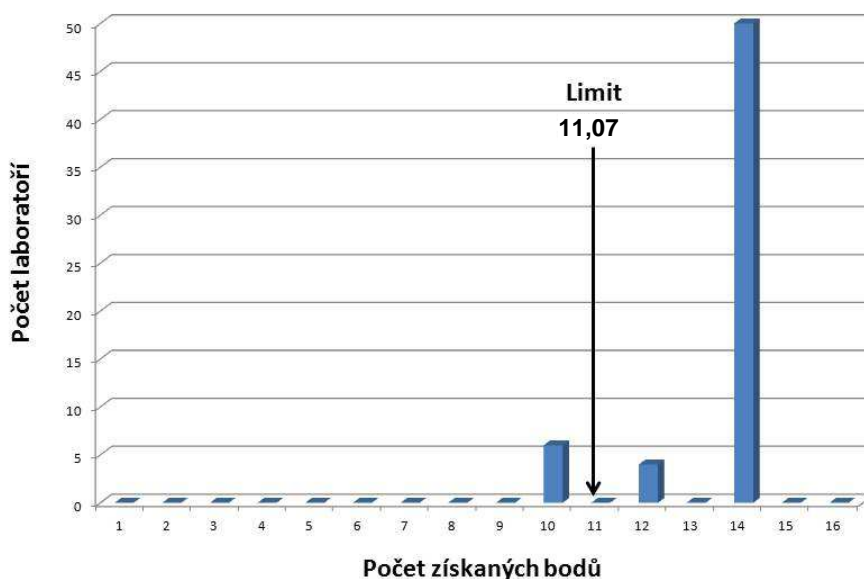
Jako správné jsou hodnoceny odpovědi s názvy anamorfního, případně teleomorfního stádia jednotlivých taxonů.

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 – opravené hodnocení 4 vzorků a 1 chybného zápisu

Dosažené body	10	12	14
Počet laboratoří	5	6	49
Procento	8,33	10	81,67

Celkový výsledek identifikací



Závěr po přepočtení bodů při nehodnocení vzorku č.4:

Maximálního počtu 14 bodů dosáhlo 49 laboratoří z 60 zúčastněných.

Aritmetický průměr byl 13,47

Směrodatná odchylka byla 1,2

Limit (t.j. průměr -2 směrodatné odchylky) byl 11,07 bodů.

Limit splnilo 54 laboratoří, z toho 2 laboratoře splnily na maximálním počtu 12 bodů s ohledem na neprovádění citlivostí (viz označení v kap.4).

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

4. 4. Souhrn výsledků

Tabulka č. 2: Opravené 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	nehodnoceno	2	1	1	14
16	4	2	2	nehodnoceno	2	1	1	12
17	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
18	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
23	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
28	4	2	2	nehodnoceno	2	1	1	12
31	4	2	4	nehodnoceno	2	-1	-1	10
32	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
35	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
37	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
39	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
48	4	2	4	nehodnoceno	2	-1	-1	10
50	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
51	4	2	4	nehodnoceno	2	-1	-1	10
53	4	2	4	nehodnoceno	2	-	-	12
58	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
64	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
65	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
71	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
88	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
89	2	2	4	nehodnoceno	2	1	1	12
156	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
174	4	2	4	nehodnoceno	2	-	-	12
192	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
207	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
208	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
209	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
211	2	2	4	nehodnoceno	2	1	1	12
214	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
215	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
228	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
283	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
289	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14

Kód laboratoře	Bodové hodnocení							Součet
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	F	V	
290	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
299	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
333	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
350	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
354	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
365	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
369	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
370	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
371	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
373	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
384	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
388	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
407	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
413	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
443	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
456	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
460	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
465	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
467	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
527	4	2	0	nehodnoceno	2	1	1	10
539	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
554	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
566	0	2	4	nehodnoceno	2	1	1	10
595	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
641	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
702	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14
763	4	2	4	nehodnoceno	2	1	1	14

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>)	55	91,7
4	<i>Cyberlindera</i> (<i>Hansenula</i>) <i>fabianii</i>	HODNOCENÍ ZRUŠENO	
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 druhích 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 sice způsobil větší variabilitu výsledků, ale bohužel, a za to se účastníkům omlouváme, došlo k pomnutí jednoho rodového označení pro vzorek č.4, na což nás upozornila jedna laboratoř svojí reklamací výsledku hodnocení. Protože mohly být chybným rozhodnutím u tohoto vzorku postiženy další laboratoře, rozhodli jsme se tento vzorek nehodnotit a hodnocení tak probíhalo na hladině 14 bodů za bezchybný výsledek u ostatních vzorků a citlivosti. Toto rozhodnutí však s sebou přineslo nemilou skutečnost, což je snížení hodnoty směrodatné odchylky, takže posun limitu vyřadil z úspěšnosti 6 laboratoří.

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. Vzorek č. 4 byl z hodnocení stažen, neboť jsme v původním hodnocení nezohlednili možnost určení jako *Candida fabianii*.

Vyšetření citlivosti kmene *C. tropicalis* zvládlo bez problému 55 laboratoří, 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 laboratoří 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	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

Vzhledem k tomu, že není ve finální zprávě vzorek č.4 hodnocen, snížila se variabilní odchylka a tím posunul limit pro úspěšné hodnocení na vyšší úroveň. Neuspělo tak celkem 6 laboratoří z 60 zúčastněných. Za tento stav se znovu omlouváme, rozhodně nebylo naším cílem kohokoliv poškodit. Do budoucna bychom rádi zpestřili mykologickou diagnostiku i o identifikace některých základních vláknitých mikromycet. Jak jsme zjistili díky aktuálně vzniklé situaci, bude nutné za tímto účelem upravit SOP pro toto EHK M/23. 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