



Státní zdravotní ústav
Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti
Poskytovatel zkoušení způsobilosti č. 7001 akreditovaný ČIA
podle ČSN EN ISO/IEC 17043: 2010
Šrobárova 49/48, 100 00, Praha 10



Závěrečná zpráva

Zkoušení způsobilosti v lékařské mikrobiologii
(Externí hodnocení kvality)

PT#M/23/2020 (č. 1133)

Mykologická diagnostika

Praha, srpen 2020

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT# M/23/2015	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/23/2020 byl zaměřen na diagnostiku kvasinek. Návrh a realizace PT#M/23/2020 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 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. 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: 27. 8. 2020

Pracoviště 2 ESPT

www.szu.cz/espt

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT# M/23/2020

Identifikace kola/cyклу:	EHK 1133
Název:	Mykologická diagnostika
Poskytovatel:	SZÚ, ESPT, Šrobárova 49/48, Praha 10, 100 00 tel.: + 420 267082258
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 65 laboratoří (a pro ověření homogenity a stability vzorků)
Označení vzorkovnic:	EHK 1133, PT # M/23, č. 1 -5, 5. 5. 2020
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:	5. 5. 2020
Způsob distribuce:	Rozvoz přepravní službou Přílohy: formulář pro zápis výsledků a pokyny účastníkům
Předání výsledků:	písemně do 26. 5. 2020 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 12 bodů, za správné vyhodnocení stanovení citlivosti k ATM další dva body, tedy celkem 14 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 vztahné hodnoty:	Za vztahnou hodnotu je považován výsledek získaný v NRL.
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	srpen 2020

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 (DAA-018-2020-0336-802) dle ČSN EN ISO 15189, ze dne 22. 6. 2020.

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 organizmů 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 organizmů 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 12 bodů, za správné vyhodnocení stanovení citlivosti k ATM další dva body, tedy celkem 14 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.

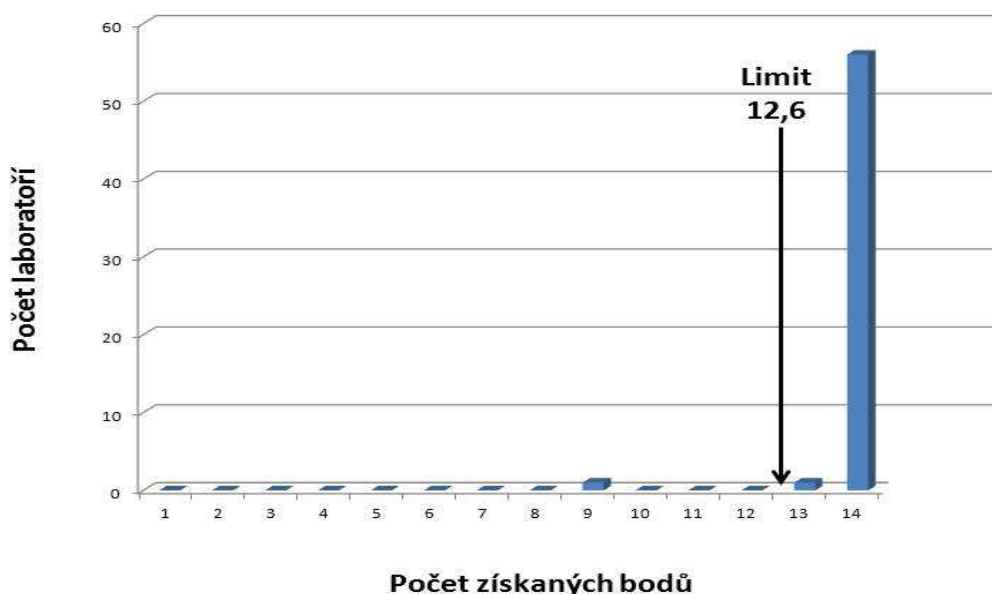
Laboratoř úspěšně absolvuje kolo EHK, pokud dosáhne bodového limitu (za identifikaci signifikantních patogenů pro danou sérii a správné stanovení citlivosti u vybraného agens), který se vypočítává dle vzorce (Limit = aritmetický průměr minus dvě směrodatné odchylky).

Tabulka č.1: Úspěšnost laboratoří v EHK 977

Dosažené body	9	13	14 / 12)*
Počet laboratoří	1	1	56 / 54
Procento	1,7	1,7	96,5

Poznámka: 14/12) = dvě laboratoře nenabízejí zhotovení citlivostí (tato část u nich nehodnocena)*

Celkový výsledek identifikací 2020



Závěr:

Maximálního počtu bodů dosáhlo 56 laboratoří z 58 zúčastněných.

Aritmetický průměr byl 13,9

Směrodatná odchylka byla 0,66

Limit (t.j. průměr -2 směrodatné odchylky) byl 12,58 bodů.

Limit splnilo 55 laboratoří, další 2 laboratoře splnily na hladině 12 bodů s ohledem na neprovádění citlivostí.

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	2	2	2	1	1	14
16	4	2	2	2	2	1	1	14
17	4	2	2	2	2	1	1	14
18	4	2	2	2	2	1	1	14
23	4	2	2	2	2	1	1	14
26	4	2	2	2	2	1	1	14
28	4	2	2	2	2	1	1	14
31	4	2	2	2	2	1	1	14
32	4	2	2	2	2	1	1	14
35	4	2	2	2	2	1	1	14
37	4	2	2	2	2	1	1	14
39	4	2	2	2	2	1	1	14
48	4	2	2	2	2	1	1	14
50	4	2	2	2	2	1	1	14
51	4	2	2	2	2	1	1	14
53	4	2	2	2	2	-	-	12
58	4	2	2	2	2	1	1	14
64	4	2	2	2	2	1	1	14
65	4	2	2	2	2	1	1	14
71	4	2	2	2	2	1	1	14
89	4	2	2	2	2	1	1	14
156	4	2	2	2	2	1	1	14
174	4	2	2	2	2	-	-	12
192	4	2	2	2	2	1	1	14
207	4	2	2	2	2	1	1	14
208	4	2	2	2	2	1	1	14
209	4	2	2	2	2	1	1	14
211	4	2	2	2	2	1	1	14
214	4	2	2	2	2	1	1	14
215	4	2	2	2	2	1	1	14
228	4	2	2	2	2	1	1	14
283	4	2	2	2	2	1	1	14
289	4	2	2	2	2	1	1	14
290	4	2	2	2	2	1	1	14
299	4	2	2	2	2	1	1	14

Kód laboratoře	Bodové hodnocení							součet
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	F	V	
333	4	2	2	2	2	1	1	14
350	4	2	2	2	2	1	1	14
354	4	2	2	2	2	1	1	14
365	4	2	2	2	2	1	1	14
369	4	2	2	2	2	1	1	14
370	4	2	2	2	2	1	1	14
371	4	2	2	2	2	1	1	14
373	4	2	2	2	2	1	1	14
384	4	2	2	2	2	1	1	14
388	4	2	2	2	2	1	1	14
407	4	2	2	2	2	1	1	14
413	4	2	2	2	2	1	1	14
443	4	2	2	2	2	1	1	14
456	4	2	2	2	2	1	1	14
460	4	2	1	2	2	1	1	13
465	4	2	2	2	2	1	1	14
467	4	2	2	2	2	1	1	14
529	4	2	2	2	2	1	1	14
539	4	2	2	2	2	1	1	14
554	4	2	2	2	2	1	1	14
566	-1	2	2	2	2	1	1	9
595	4	2	2	2	2	1	1	14
702	4	2	2	2	2	1	1	14

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

Vzorek	Mikroorganismus	Počet laboratoří	Procento
1	<i>Candida dubliniensis</i> <i>Candida krusei</i>	57	98,3
2	<i>Candida glabrata</i>	58	100
3	<i>Candida lusitanae</i>	57	98,3
4	<i>Candida tropicalis</i>	58	100
5	<i>Candida parapsilosis</i>	58	100
	- bezchybná citlivost	56)*	100)*

Poznámka:)* 2 laboratoře citlivosti kvasinek neprovádí

5. Komentář k identifikovaným vzorkům

Pro rok 2020 byl v sestavě vzorků zařazen pouze jeden směsný, který obsahoval po dva druhy kvasinek. Vzorky pro rok 2020 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.

Také pro toto kolo EHK jsme 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 směsného vzorku. To, že byl letos zařazen pouze jeden směsný vzorek a že bylo spektrum zařazených druhů chudé, nebylo úmyslem, ale důsledkem. Při přípravě kmenů nám těsně před expedicí devitalizovaly dva vzorky a nahradit je již nebylo možné. Hodnocení tak „spadlo“ na hladinu 14 bodů včetně citlivostí. To, že dvě laboratoře citlivosti neprovádí a nebyly v této části hodnoceny na celkovém výsledku včetně výpočtů nic nemění.

Žádná laboratoř v tomto kole mykologické diagnostiky neměla problém se vzorkem č. 2 – *Candida glabrata*, č.4 *Candida tropicalis* a u č.5 – *Candida parapsilosis*. Naprosto všechny laboratoře (ty, které testy citlivosti provádí) uvedly správně hodnocení citlivosti u *C. parapsilosis*. U vzorku č. 1, který obsahoval kmeny *Candida dubliniensis* a *Candida krusei* pochybila jediná laboratoř a u vzorku č. 3 s *Candida lusitanae* také pouze jedna laboratoř. Bohužel, vzhledem k velmi nízké hodnotě směrodatné odchylky v tomto kole EHK, jedna laboratoř neuspěla.

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. 2020)

DIAGNOSTICKÝ TEST PRO IDENTIFIKACE	POČET LABORATOŘÍ	DIAGNOSTICKÝ TEST PRO CITLIVOSTI K ATM	POČET LABORATOŘÍ
CANDISELECT	37	E-TEST BioMérieux	17
MALDI TOF	37	ITEST Plus	10
AUXACOLOR	16	NEOSENSITABS/Bioventor	18
RÝŽOVÝ AGAR	11	E-TEST Liofilchem	19
API ID 20(32)C	5	VITEK2	6
CANDIDATEST	6	SENSITITRE YEASTONE	8
DALŠÍ TESTY	7	DALŠÍ TESTY	5

Pro rok 2020 (EHK-1133) 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. Všechny laboratoře, které testy ATM provádí zde s jistotou uspěly.

6. Slovo na závěr

Dalo by se konstatovat, že kolo EHK-1133/2020 v mykologické diagnostice dopadlo výborně. Nebudeme spekulovat, zda k tomu přispělo běžné spektrum kvasinek. V každém případě je jasné, že se diagnostika kvasinek stala naprostou rutinou a vysoká úspěšnost pak tvoří malou směrodatnou odchylku, takže ztráta dvou bodů již může úspěšnost ohrozit. Protože většina laboratoří v dodatečné anketě uvedla, že je schopna diagnostikovat i aspergily, a také vzhledem k tomu, že se jedná o EHK mykologické diagnostiky, kdy by každá mykologická laboratoř měla být schopna kultivovat a identifikovat také vláknité mikromycety ze sputa, sinusů a externího zvukovodu, zařadíme do sestavy EHK pro rok 2021 edukační vzorek. O jakou mikromycetu se bude jednat se pak dozvíte ze závěrečné zprávy a to včetně odkazů na identifikaci.

Více než polovina laboratoří také uvedla, že provádí diagnostiku dermatofytů a čtvrtina uvedla i identifikaci ostatních rodů a druhů mykotických agens. Protože však jsou tyto identifikace speciálního charakteru, nebude prozatím uvažováno o jejich zařazení do rámce mykologické EHK.

V případě reklamací vyhodnocení série postupujte, prosím, 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