



Státní zdravotní ústav  
Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti  
Šrobárova 49/48, 100 00, Praha 10

# **Závěrečná zpráva**

Zkoušení způsobilosti v lékařské mikrobiologii  
(Externí hodnocení kvality)

**PT#M/0/2022 (EHK 1255)**

**Kultivace a identifikace vláknitých  
mikroskopických hub**

**Praha, červen 2022**

## Obsah

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing)	3
2. Způsob přípravy vzorků	4
3. Charakteristika materiálu	4
4. Způsob hodnocení	5
5. Vyhodnocení	6
6. Závěr	9
Příloha – výsledkový protokol jednotlivých laboratoří	

Pilotní série programu zkoušen způsobilosti PT#M/0/2022 byla zaměřena na kultivaci a identifikaci vláknitých mikroskopických hub. Návrh a realizace PT#M/0/2022 byly prováděny podle standardního operačního postupu SOP M/38 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.

Příloha závěrečné zprávy, tj. výsledkový protokol, je rozesílána poštou.

### **Zprávu vypracoval:**

Mgr. Radim Dobiáš, Ph.D. (Odd. BaM, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Ostrava)

### **Zprávu autorizoval:**

Mgr. Radim Dobiáš, Ph.D.

Tel: 596 200 239

**Dne:** 3. 5. 2022

### **Pracoviště 2 ESPT**

<http://www.szu.cz/programy-zpusobilosti-pro-mikrobiologicke-laboratore>

e-mail: ehk@szu.cz

**1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT# M/0/2022**

Identifikace cyklu:	<b>EHK 1255</b>
Název:	Kultivace a identifikace vláknitých mikroskopických hub
Koordinátor:	Mgr. Radim Dobiáš, Ph.D.
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3 – Identifikované kmeny hyfomycetů izolované na Sabouraudově agaru s vitamínem.
Podstata a účel PT/EHK:	Ověření schopnosti identifikovat klinicky významné druhy vláknitých mikromycetů
Kritéria pro účast na PT/EHK:	Požadavky na laboratoře: zajištění správné laboratorní praxe dle normy ČSN 15189/2013
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2
Množství připravovaného testovaného materiálu:	Identifikace kmene č. 1 pro 32 a č. 2 (metoda uchovávání A) pro 32 laboratoří + 3 kontroly + 3 rezervní vzorky = 70 vzorků Identifikace kmene č. 1 pro 32 a č. 2 (metoda uchovávání B) pro 32 laboratoří + 6 kontrol + 20 rezervních vzorků = 90 vzorků
Označení vzorkovnic:	EHK 1255, PT # M/0, č. 1-2, 22. 2. 2022
Zabezpečení kvality vzorku:	Zabezpečení stability vzorků: Stabilita je zajištěna manipulacemi za sterilních podmínek, vhodným skladováním, rychlým transportem ke zpracování a určením termínu, do kterého musí být odeslán výsledek zpět k vyhodnocení.
Test homogenity a stability:	Kvalita, homogenita a stabilita je posuzována na základě trojitého opakovaného testování namátkou vybraných vzorků připraveného cyklu: po výběru jsou vzorky kultivovány za běžných laboratorních podmínek v souladu s normou ČSN 15189 a je ověřena schopnost růstu testovaného kmene před distribucí a v termínu blízkém dni odeslání výsledků. Na každé testování se použije nový vzorek, průkazem homogenity a stability vzorků je dosažení totožných výsledků v čase. Byla provedena makromorfologická pohledová kontrola růstu všech rozesílaných naočkovaných kmenů a identifikace kontrolní kmenů, pro vyloučení možné kontaminace.
Podmínky distribuce a uchovávání vzorků:	Distribuce v předepsaném obalu nasmlouvaným dopravcem. Přeprava a krátkodobé uchovávání vzorků při pokojové teplotě
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe a pokynů organizátora, záměna vzorků, neživotaschopnost kmene vlivem nedodržení časů re-izolace
Počet účastníků:	32
Termín distribuce:	22. 2. 2022
Způsob distribuce:	Přepravní službou (zajišťuje Koordinační pracoviště)
Předání výsledků:	Poštou na přiloženém výsledkovém formuláři
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4
Určení maximální směrodatné odchylky:	Aritmetický průměr všech hodnocených laboratoří mínus 2 směrodatné odchylky. Laboratoř úspěšně absolvuje kolo EHK, pokud dosáhne bodového limitu, který se vypočítává podle vzorce: Limit = aritmetický průměr výsledků všech hodnocených laboratoří minus dvě směrodatné odchylky. Pokud se v hodnocené skupině vyskytne pracoviště s extrémně nízkým bodovým ziskem (<50 % maximálního bodového zisku), je vyloučeno z výpočtu limitu. Takové pracoviště je automaticky hodnoceno jako neúspěšné.

	Jestliže stejný typ atypického výsledku vykáže větší počet účastníků, může být přihlédnuto k tomu, zda neexistuje statisticky významná souvislost mezi typem použitého testu a zmíněnou odchylkou. V takovém případě koordinátor provede hodnocení po odborné konzultaci s poradní skupinou.
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Vtažnou hodnotou jsou výsledky druhové identifikace kmene v laboratoři koordinátora, které byly získány identifikací původního vybraného kmene z klinického materiálu potvrzeného sekvencí DNA narostlé kultury a porovnáním s typovou sekvencí DNA dle databáze CBS-KNAW (= očekávané výsledky)
Termín uveřejnění očekávaných výsledků	25. 3. 2022
Termín uveřejnění závěrečné zprávy	Do 7. 6. 2022

## 2. Způsob přípravy vzorků

Přípravu a zabezpečení jakosti vzorků zajišťuje Laboratoř klinické mykologie, Oddělení bakteriologie a mykologie, Centra klinických laboratoří Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě, Partyzánské nám. 7, 702 00, Ostrava, akreditované u ČIA (č. 551/2020) dle ČSN EN ISO 15189. Koordinátor: Mgr. Radim Dobiáš, Ph.D. (ZUOVA)

### Zpracování a rozplnění výchozího materiálu

Klinické vzorky jsou zpracovány standardním způsobem používaným v laboratoři klinické mykologie subdodavatele, čisté kultury jsou izolovány, identifikovány do druhu.

Získané izoláty mykotických organismů jsou pomnoženy a je provedena kontrola čistoty kultur a kontrola správnosti identifikace. Identifikace vláknitých hub pomocí fenotypových (makro a mikromorfologie) metod, metodou kultivační a mikroskopickou je následně ověřena konfirmačním postupem, pomocí sekvence fungální DNA oblastí dlouhé podjednotky 28s rDNA, ITS 1-4, D1-2,  $\beta$ -tubulin a identifikována dle validované databáze CBS – KNAW (propojené s taxonomickou databází mycobank.org). Výchozí materiál je vyočkován do skleněných lahvíček se šikmým agarem, uzavřen, označen a uložen do přepravní krabice a doručen kurýrem (pravidelným svozem ZÚ Ostrava) z laboratoře klinické mykologie ZÚ Ostrava do SZÚ Praha. V SZÚ Praha v Národní referenční laboratoři/Česká národní sbírka typových kultur (CNCTC) je na základě dohody se subdodavatelem u vybraných vzorků vytvořena směsná kultura a následně je u vzorků provedena lyofilizace.

Pro každý vzorek je vystaven protokol o přípravě vzorků, ve kterém jsou uvedeny veškeré manipulace prováděné s připravovaným vzorkem.

### 3. Charakteristika materiálu

#### Typ a uskladnění výchozího materiálu

Výchozím materiálem pro přípravu vzorků jsou identifikované kmeny mikroskopických vláknitých hub izolované z klinického materiálu dodaného do laboratoře subdodavatele. Izoláty pocházejí přímo z klinického materiálu, který není předtím nijak skladován, pouze po dobu nezbytně nutnou k transportu odebraného vzorku pacienta do laboratoře subdodavatele.

Název série EHK	Počet vzorků v sérii	vzorky jsou určeny k testování těchto cílových markerů
Kultivace a identifikace vláknitých mikroskopických hub	2	Vybrané izoláty vláknitých mikromycetů z klinického materiálu izolované v transportní kultuře

Jednotlivé vzorky představují simulovaný humánní klinický materiál s obsahem cílových druhů mikromycetů.

č. vzorku	kmen	poznámka
1.	<i>Aspergillus fumigatus</i>	
2.	<i>Trichophyton interdigitale/mentagrophytes</i>	komplex

### 4. Způsob hodnocení

Výsledkové formuláře účastníků předává k vyhodnocení koordináční pracoviště ESPT 2 uvedené v SOP-M Činnost koordináčního pracoviště ESPT2 (viz bod 5.2).

Bodové hodnocení účastníků vychází z očekávaných výsledků získaných opakovaným vyšetřením vzorků na pracovišti subdodavatele (koordinátor) a je nastaveno tak, že **dvěma body** je hodnocena shoda s očekávaným výsledkem, **jedním bodem** je hodnocena částečná shoda a bez bodového ohodnocení jsou výsledky, které se s očekávaným výsledkem neshodují. **Způsob přidělování bodů je nastaven pouze pro toto zkušební kolo a v budoucím akreditovaném EHK se může změnit.**

Volba metody pro testování vzorků závisí na rutinní praxi účastníka, pokud jsou vzorky vyšetřeny více metodami, body se nenásobí a hodnotí se laboratorní závěr účastníka. Za identifikaci mykotického agens ve 2 vzorcích mohou laboratoře získat maximálně 4 body. Laboratoř úspěšně absolvuje kolo EHK, pokud dosáhne bodového limitu, který se vypočítává podle vzorce (Limit = aritmetický průměr výsledků všech laboratoří minus dvě směrodatné odchylky). Pokud se v hodnocené skupině vyskytne pracoviště s extrémně nízkým bodovým ziskem (<50 % maximálního bodového zisku), je vyloučeno z výpočtu limitu. Takové pracoviště je automaticky hodnoceno jako neúspěšné.

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

Jestliže stejný typ atypického výsledku vykáže větší počet účastníků, může být přihlédnuto k tomu, zda neexistuje statisticky významná souvislost mezi typem použitého testu a zmíněnou odchylkou. V takovém případě koordinátor provede hodnocení po odborné konzultaci s poradní skupinou.

## 5. Vyhodnocení

### Tabulka č. 1: Úspěšnost laboratoří v pilotní sérii EHK 1255

4 body za bezchybnou identifikaci (rod/druh).

Dosažené body	2	3	4
Počet laboratoří	15	2	15
Procento	46,9	6,3	46,9

### Maximálního počtu bodů dosáhlo 15 laboratoří z 32 zúčastněných.

Aritmetický průměr byl 3,00

Směrodatná odchylka byla 0,82

Limit (t. j. průměr -2 směrodatné odchylky) byl 1,36 bodů.

Limit splnilo 32 laboratoří, z toho 15 laboratoří jen díky odečtení dvou směrodatných odchylek od průměru.

**Tabulka č. 2: Bodové hodnocení výsledků jednotlivých laboratoří (n=32)**

Kód laboratoře			součet
	vzorek 1	vzorek 2	
17	2	2	4
28	2	0	2
32	2	0	2
50	2	2	4
51	2	0	2
53	2	0	2
58	2	2	4
65	2	2	4
89	2	0	2
156	2	2	4
207	2	0	2
208	2	1	3
211	2	2	4
215	2	2	4
283	2	2	4
289	2	2	4
350	2	2	4
354	2	0	2
369	2	0	2
821	2	0	2
371	2	0	2
384	2	0	2
443	2	2	4
459	2	0	2
465	2	0	2
467	2	2	4
702	2	2	4
633	2	2	4
641	2	1	3
595	2	2	4
539	2	0	2
554	2	0	2

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

Vzorek	Mikroorganismus	Počet laboratoří	Procento
1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	32	100,0
2	<i>Trichophyton interdigitale/mentagrophytes</i> komplex	14	43,8

Žádná laboratoř v pilotní sérii EHK Kultivace a identifikace vláknitých mikroskopických hub neměla problém s identifikací vzorku č. 1 (*Aspergillus fumigatus*). U vzorku č. 2, který obsahoval kmen *Trichophyton interdigitale/mentagrophytes* komplex, přičemž byly uznávány jak výsledky identifikace *T. interdigitale* tak *T. mentagrophytes*, mělo problém s identifikací 14 laboratoří, došlo k záměně za *T. tonsurans* a v případě dvou laboratoří byl přidělen alespoň jeden bod za správnou rodovou identifikaci *Trichophyton* sp.

Vypočtená směrodatná odchylka, která byla odečtena dvakrát od průměru, se stala příčinou toho, že 15 laboratoří, které dosáhly v celkovém součtu 2 bodů, „uniklo neúspěšnosti“ o 0,64 bodu. Vzhledem k tomu, že celková úspěšnost laboratoří je příliš vysoká, a to i s ohledem na pouhou 50% úspěšnost („sensu stricto“) v případě 15 laboratoří, bude pro budoucnost nutné upravit způsob hodnocení, navýšit budoucí EHK minimálně o jeden další vzorek vláknité mikromycety, případně upravit parametry výstupu jednotlivých diagnostických postupů.

Pokud jde o informace o používaných technikách identifikace vláknitých hub a vztahu k úspěšnosti identifikace samotné, je vidět významně se blížící číslo nesprávných identifikací vzorku č. 2 (jako *T. tonsurans*) k číslu celkově provedených identifikací pomocí MS MALDI-TOF (Bruker). Je dost pravděpodobné, že uživatelé této technologie (a databáze) nezohledňují význam výše skóre, které může být v některých případech identifikací nízké nebo ne-validní. Příprava vzorku/kmene narostlé kultury anebo kultivace pro extrakci proteinových struktur a následnou detekci pomocí MS MALDI-TOF je klíčová, vzniklá chyba je multifaktoriální (a těžko odhalitelná) a proto může být jistota ve výši výsledného identifikačního skóre velmi důležitá pro správnou identifikaci. Nižší skóre je upozorněním pro nutnost využití dalších identifikačních metod, což bylo vidět u malého počtu laboratoří, které se stoprocentně nespolehaly na výsledkový protokol MS MALDI-TOF. Výsledky vedoucí k tomuto zjištění jsou shrnuty v **Tabulce 4** níže.

Navíc lze říci, že data pro validaci identifikace vláknitých hyfomycetů ověřovaná výrobcem by měla být ověřena také v podmínkách uživatele. Podobné dílčí výsledky studií (jako například identifikace a validita skóre některých druhů rodu *Candida* [1,2]), které by vedly k přesnější informaci o validitě daného výsledkového skóre MS MALDI-TOF pro konkrétní druhy vláknitých hub v České republice buď chybí, nebo nejsou brány na zřetel.



**Tabulka č. 4: Přehled diagnostických postupů (laboratoře zapojené do pilotní série EHK 1255 v r. 2022)**

Diagnostický test (identifikace)	Počet laboratoří	Počet laboratoří s nesprávnou identifikací vzorku č. 2
Makro-morfologie	29	14
Mikro-morfologie	24	12
MS MALDI-TOF (Bruker)	17	<b>13*</b>
MS MALDI-TOF (Biomerieux)	1	0

\*v případě 12 ze 13 vzorků č. 2 s využitím MS MALDI-TOF (Bruker) v sérii identifikačních testů byl identifikován *Trichophyton tonsurans*

## 6. Závěr

Lze konstatovat, že pilotní série EHK 1255 „Kultivace a identifikace vláknitých mikroskopických hub“ proběhla úspěšně, a úspěšně také ukázala nedostatky v přesnosti druhové identifikace vláknitých hub některých laboratoří. Nemalá směrodatná odchylka ukázala na větší rozptyl správných výsledků, což bylo zmírněno nastavenou metodikou výpočtu pro limit splnění EHK.

Na základě průzkumu využití diagnostických testů pro identifikaci kmenů ve vzorcích byly ukázány možné rezervy v budoucí přesné druhové identifikaci vláknitých hub pomocí některých hojně dostupných moderních metod identifikace, což může vést ke zlepšení v příštím EHK. Edukační význam této pilotní série byl splněn, ale zároveň je vysoká úspěšnost znakem pro možnou úpravu výpočtu limitu pro splnění budoucího EHK.

V případě reklamací vyhodnocení série, prosím, postupujte dle reklamačního řádu. Pro zadání reklamace použijte webovou aplikaci SZÚ (viz informace o změnách v objednávání opravných sérií a zadávání reklamací na webových stránkách SZÚ: <http://www.szu.cz/programy-zpusobilosti-pro-mikrobiologicke-laboratore>).

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY

**Literatura**

1. Svobodova, L.; Bednarova, D.; Ruzicka, F.; Chrenkova, V.; Dobias, R.; Mallatova, N.; Buchta, V.; Kocmanova, I.; Olisarova, P.; Stromerova, N., et al. High frequency of *Candida fabianii* among clinical isolates biochemically identified as *Candida pelliculosa* and *Candida utilis*. *Mycoses* **2016**, 10.1111/myc.12454, doi:10.1111/myc.12454.
2. Mahelova, M.; Ruzicka, F. Methods of *Candida dubliniensis* identification and its occurrence in human clinical material. *Folia microbiologica* **2017**, 62, 401-408, doi:10.1007/s12223-017-0510-2.