



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/16/2022 (EHK 1266)

Fenotypové stanovení citlivosti u MTB

Praha, srpen 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	4
5.	Vyhodnocení	4
6.	Závěr	7
	Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/16/2022 byl zaměřen na určení citlivosti (C) či rezistence (R) kmenů *M. tuberculosis* k základním antituberkulotikům (izoniazid, rifampicin, etambutol, streptomycin, pyrazinamid).

Návrh a realizace PT#M/16/2022 byly prováděny podle standardního operačního postupu SOP M/16 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. ohodnocený výsledkový protokol, je pro každou zúčastněnou laboratoř k dispozici ve webové aplikaci SZÚ v odkazu: <http://ehk.szu.cz/EHK10/> po přihlášení kódem laboratoře a heslem.

Zprávu vypracoval:

Ing. Michaela Horníková, Ph.D. a Ing. Věra Dvořáková, Ph.D. (NRL pro mykobakterie, SZÚ Praha)

Zprávu autorizoval:

Ing. Dvořáková, Ph.D.
Tel: 267 082 424

Dne: 24. 8. 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/16/2022

Identifikace cyklu:	EHK 1266
Název:	Fenotypové stanovení citlivosti u MTB
Koordinátor:	Ing. Věra Dvořáková, Ph.D.
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3 této závěrečné zprávy.
Podstata a účel PT:	Stanovení citlivosti či rezistence na základní antituberkulotika – INH, STM, PZA, EMB, RIF.
Kritéria pro účast na PT:	Rutině prováděné testy citlivosti.
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2 této závěrečné zprávy.
Množství připravovaného test. materiálu:	Celkově bylo připraveno 5 x 24 vzorků mykobakteriálních kultur: 16 x 5 vzorků po 1,1 ml pro 16 přihlášených laboratoří 5 x 5 vzorků po 1,1 ml - rezerva 3 x 5 vzorků - testování v NRLM
Označení vzorkovnic:	EHK 1266, PT # M/16, Č. 1 – 5, 5. 4. 2022
Zabezpečení kvality:	1. Kontrola čistoty kultury použitých mykobakteriálních species metodou GenoType (termíny kontroly viz kapitola 2) 2. Kontrola sterility L – J půd 3. Testování kontrolních vzorků akreditovanými metodami dle schválených SOP po distribuci do přihlášených laboratoří
Testy homogenity a stability:	při přípravě vzorků, před rozesláním vzorků a v termínu doručení vzorků laboratořím
Podmínky distribuce:	přeprava a krátkodobé uchování při 4 – 8 ° C chránit před světlem
Možné zdroje chyb:	nedodržení správné laboratorní praxe
Počet účastníků:	16 laboratoří
Termín distribuce:	5. 4. 2022
Způsob distribuce:	zasílání kurýrní službou účastnickým laboratořím – zajišťuje koordinační pracoviště ESPT 2 přílohy: informace pro účastníky
Předání výsledků:	V elektronické podobě do 14. 6. 2022
Způsob vyhodnocení:	Hodnotí se správné určení citlivosti či rezistence na zadaná antituberkulotika. Výsledky se hodnotí kvalitativně. Za vyhovující je považováno bodové ohodnocení překračující hodnotu limitu (aritmetický průměr minus 2 směrodatné odchytky) vypočteného z bodového hodnocení jednotlivých účastníků.
Určení maximální směrodatné odchytky	Směrodatná odchytky se vypočítá jako druhá odmocnina rozptylu hodnot bodového hodnocení jednotlivých laboratoří od aritmetického průměru dosažených bodů všech laboratoří.
Určení přijaté vztahné hodnoty:	Vztažnou hodnotou je výsledek dosažený při testování vzorků zařazených do EHK v NRL/M, které se provádí (časově) souběžně s probíhajícím EHK v jednotlivých laboratořích.
Termín uveřejnění očekávaných výsledků	24. 6. 2022
Termín uveřejnění závěrečné zprávy	Do 6. 9. 2022

2. Způsob přípravy vzorků

V přípravně půd bylo dne 20.1.2022 připraveno 200 Löwenstein-Jensenových půd. Bylo vybráno 8 kmenů *M. tuberculosis* (evid. č.: 555/19 – vzorek č. 4, 419/20, 421/20, 422/20, 450/21, 451/21, 452/21, 454/21) se známou citlivostí na antituberkulotika. Dne 7. 2. 2022 byly kmeny rozočkovány na 8 x 24 L-J půd (16 sad vzorků pro přihlášené laboratoře + 5 rezervních sad + 3 sady pro testování v NRLM) a zároveň byla u všech kmenů ověřena čistota kultury metodou GenoType. Naočkované půdy byly uloženy na 4 týdny do termostatu při teplotě 37°C. Po 4 týdnech byla provedena kontrola růstu a bylo vybráno 5 kmenů pro odeslání. Dne 4. 4. 2022 byly zkumavky předány pracovním AP k rozdělení a distribuci do jednotlivých laboratoří. Jedna sada vzorků byla současně testována v NRL/M pro zabezpečení kvality vzorku.

3. Charakteristika materiálu

Vzorek			INH (H)	STM (S)	PZA (Z)	EMB (E)	RIF (R)
A	<i>M. tuberculosis</i>	10 ⁻²	R	C	C	C	C
B	<i>M. tuberculosis</i>	10 ⁻²	C	C	C	C	C
C	<i>M. tuberculosis</i>	10 ⁻²	C	C	R	C	C
D	<i>M. tuberculosis</i>	10 ⁻²	C	C	C	C	C
E	<i>M. tuberculosis</i>	10 ⁻²	R	C	C	C	C

4. Způsob hodnocení

Vzorky se hodnotí kvalitativně. Hodnocení vychází z výsledků testování v NRL/M dle SOP-NRL/M-16. Při hodnocení jednotlivých laboratoří se porovnává výsledek dané laboratoře s výsledkem dosaženým při testování vzorků zařazených do EHK v NRL/M, který je vztažnou hodnotou. Testování se v NRL/M provádí (časově) souběžně s probíhajícím EHK v jednotlivých laboratořích.

Přehled bodového hodnocení výsledků:

Maximální možný bodový zisk činil 50 bodů

- Správné určení citlivosti či rezistence u 1 antibiotika (u 1 kmene) = 2 body (tzn. 2 body za každé správné určení)
- Falešná rezistence u 1 antibiotika (u 1 kmene) = 0 bodů
- Falešná citlivost u 1 antibiotika (u 1 kmene) = 0 bodů

5. Vyhodnocení

Tabulka 1. Charakter chyb stanovení lékové citlivosti. Počet chybných stanovení udává počet laboratoří, u kterých se chyba daného typu u konkrétního vzorku a antibiotika vyskytla.

Vzorek	INH (H)	STM (S)	PZA (Z)	EMB (E)	RIF (R)
A	Falešná C: 2	Falešná R: 1	x	x	x
B	x	x	Falešná R: 1	x	x
C	Falešná R: 1	x	Falešná C: 4	x	x
D	x	x	x	x	x
E	Falešná C: 3	Falešná R: 2	x	Falešná R: 1	x

Výsledky vyšetření:

9 laboratoří stanovilo citlivost bezchybně u všech vzorků a získaly 50 bodů
 3 laboratoře stanovily citlivost s 1 chybou u 1 kmene a získaly 48 bodů
 2 laboratoře stanovily citlivost s 1 chybou u 2 kmenů, tj. celkově se 2 chybami a získaly 46 bodů
 2 laboratoře stanovily citlivost celkově se 4 chybami a získaly 42 bodů

Závěr

Aritmetický průměr byl 48,1 bodu.
 Limit (tj. průměr – 2 směrodatné odchytky) byl 42,5 bodu.
 Limit splnilo 14 laboratoří, 2 laboratoře limit nesplynily.

Tabulka 2. Souhrnné výsledky určení lékové citlivosti – očekávané výsledky pro jednotlivá antibiotika a jednotlivé vzorky, počet laboratoří se správným výsledkem pro jednotlivá antibiotika a jednotlivé vzorky a jejich podíl z celkového počtu přihlášených laboratoří.

Vzorek	INH (H)	STM (S)	PZA (Z)	EMB (E)	RIF (R)
A	R 14 (87,5 %)	C 15 (93,8 %)	C 16 (100 %)	C 16 (100 %)	C 16 (100 %)
B	C 16 (100 %)	C 16 (100 %)	C 15 (93,8 %)	C 16 (100 %)	C 16 (100 %)
C	C 15 (93,8 %)	C 16 (100 %)	R 12 (80,9 %)	C 16 (100 %)	C 16 (100 %)
D	C 16 (100 %)	C 16 (100 %)	C 16 (100 %)	C 16 (100 %)	C 16 (100 %)
E	R 13 (81,3 %)	C 14 (87,5 %)	C 16 (100 %)	C 15 (93,8 %)	C 16 (100 %)

Tabulka 3. Výsledky EHK podle počtu dosažených bodů.

Body*	50	48	46	42
Počet laboratoří	9	3	2	2
(% laboratoří)	56,25	18,75	12,5	12,5

* limit (hranice úspěšnosti) = 42,5 bodu

Tabulka 4. Přehled výsledků stanovení lékové citlivosti v jednotlivých laboratořích pro všechny vzorky a všechna antibiotika. Červeně jsou vyznačena chybná stanovení.

Poř.č.	Lab.č.	H	S	Z	E	R	H	S	Z	E	R	H	S	Z	E	R	H	S	Z	E	R	H	S	Z	E	R	Body
1	9	R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	50
2	28	R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	48
3	32	R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	R	C	48
4	51	R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	50
5	61	R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	50
6	71	R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	50
7	208	C	R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	42
8	214	R	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	46
9	215	R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	50
10	317	R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	48
11	324	R	C	C	C	C	C	C	C	R	C	R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	46
12	345	R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	50
13	369	R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	50
14	456	R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	50
15	760	R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	50
16	792	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	42
		A					B					C					D					E					

Vysvětlivky: H = izoniazid, S = streptomycin, Z = pyrazinamid, E = etambutol, R = rifampicin,
C = citlivost, R = rezistence

Tabulka 5. Přehled metod používaných pro stanovení lékové citlivosti v jednotlivých laboratořích, počet chybných stanovení pro jednotlivá antibiotika v rámci jednotlivých laboratoří a charakter těchto chyb. Počet chyb udává počet chybných stanovení z celkového počtu 5 vzorků stanovovaných na daném antibiotiku.

Poř.č.	Lab.č.	metoda	Počet chyb a jejich charakter				
			INH	STM	PZA	EMB	RIF
1	9	MGIT	0	0	0	0	0
2	28	Šulova půda	0	0	1 falešná C	0	0
3	32	MGIT	0	0	0	1 falešná R	0
4	51	MGIT	0	0	0	0	0
5	61	Šulova půda, MGIT	0	0	0	0	0
6	71	Löwenstein-Jensen	0	0	0	0	0
7	208	Löwenstein-Jensen	2 falešná C	2 falešná R	0	0	0
8	214	Löwenstein-Jensen	0	0	1 falešná R 1 falešná C	0	0
9	215	Löwenstein-Jensen	0	0	0	0	0
10	317	Löwenstein-Jensen	0	0	1 falešná C	0	0
11	324	Löwenstein-Jensen	1 falešná C 1 falešná R	0	0	0	0
12	345	Middleb. 7H9 + PZA MGIT	0	0	0	0	0
13	369	Löwenstein-Jensen, MGIT	0	0	0	0	0
14	456	Löwenstein-Jensen, MGIT	0	0	0	0	0
15	760	Löwenstein-Jensen	0	0	0	0	0
16	792	Löwenstein-Jensen	2 falešná C	1 falešná R	1 falešná C	0	0

6. Závěr

Série EHK 1266 zaměřené na určení citlivosti či rezistence kmenů *M. tuberculosis* k základním antituberkulotikům (izoniazid, rifampicin, etambutol, streptomycin, pyrazinamid) se zúčastnilo 16 laboratoří. Celkem v tomto programu EHK uspělo 14 laboratoří (87,5 %). Celkem 9 laboratoří ze 16 zúčastněných (56,3 %) provedly správné stanovení u všech antibiotik u všech vzorků a uspěly tak na 100 %. Dále 3 laboratoře (22,3 %) stanovilo citlivost a rezistenci pouze s 1 chybou (tj. chybným stanovením u 1 antibiotika u 1 vzorku) a 2 laboratoře (12,5 %) stanovily citlivost se 2 chybami. Ačkoliv obě tyto laboratoře splnily bodový limit pro úspěšné složení EHK, laboratoř číslo 324 stanovila u 2 kmenů chybně citlivost k INH, které je jedním z nejdůležitějších antibiotik první volby. Jedná se o velmi závažnou, hrubou chybu. Přesto certifikát bude laboratoři v tomto kole udělen, ale doporučujeme důkladné přezkoumání možných zdrojů chyb v prováděných stanoveních. **V budoucích sériích u takto závažných, hrubých chyb nebude laboratoři udělen certifikát i v případě dosažení bodového limitu.** Dvě laboratoře stanovily lékovou citlivost celkem se 4 chybami a v EHK tak neuspěly.

Dle uvedených dat polovina laboratoří (8 ze 16, tj. 50 %) používá k určení citlivosti Löwenstein-Jensenovu vaječnou půdu (L-J). Systém Bactec MGIT uvedlo celkem 7 laboratoří (43,8 %), přičemž z poznámek ke stanovením vyplývá, že některé laboratoře pravděpodobně stanovení provádí jak na vaječných půdách, tak v systému Bactec MGIT. Dvě laboratoře citlivosti stanovovaly na Šulově půdě, jedna v kombinaci se systémem Bactec MGIT a jedna laboratoř určovala citlivost na tekutém médiu Middlebrook 7H9 a v případě PZA tato laboratoř využila Bactec MGIT (médiu 7H9).

Pouze u RIF uspěly všechny laboratoře na 100 %. Alarmujícího výsledku dosáhly laboratoře u INH, které je antibiotikem první volby. Správně u všech kmenů citlivost určilo 13 laboratoří z 16 (81,3 %), všechny 3 chybující laboratoře ale navíc určily citlivost špatně hned u dvou různých kmenů. Nejvíce se chybovalo u kmenů A a E. Nejproblematictější antibiotikem bylo stejně jako v loňském roce PZA, u kterého dosáhlo 100% úspěšnosti a určilo citlivost u tohoto antibiotika u všech vzorků správně 12 laboratoří z 16 (tj. 75%). Z výsledků je patrné, že při určování citlivosti pomocí L-J nebo Šulovy půdy se u PZA objevovala nejčastěji falešná citlivost (viz Tabulka 4. a Tabulka 5.). Další chyby se objevily také u streptomycinu a etambutolu.

Laboratoř, která neuspěla, má možnost objednat si opravnou sérii EHK přes webovou aplikaci SZÚ: <https://ehk.szu.cz/EHK10/>, viz informace o změnách v objednávání opravných sérií a zadávání reklamací na webových stránkách SZÚ: <http://www.szu.cz/programy-zpusobilosti-pro-mikrobiologicke-laboratore>. Opravné série se budou rozesílat dne 11. 10. 2022.

V případě reklamací vyhodnocení série, prosím, postupujte dle reklamačního řádu. Pro zadání reklamacie použijte také webovou aplikaci SZÚ.

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY