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/1-1/2023(EHK 1323)

Mikroskopie a kultivace rodu *Mycobacterium*

Praha, červen 2023

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	5
6.	Závěr	5
	Příloha 1 – tabulky Příloha 2 – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/1-1/2023 je zaměřen na ověření schopnosti účastníků provést detekci mykobakterií v simulovaných vzorcích biologického materiálu pomocí mikroskopie a kultivace.

Návrh a realizace PT#M/1-1/2023 byly prováděny podle standardního operačního postupu koordinátora programu EHK (Ing. Věra Dvořáková Ph.D., NRL pro mykobakterie) 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: 26. 6. 2023

Pracoviště 2 ESPT
https://szu.cz/sluzby/zkouseni-zpusobilosti/zkouseni-zpusobilosti-pro-lekarskou-mikrobiologii/
e-mail: ehk@szu.cz

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT#M/1-1/2023

Identifikace cyklu:	EHK 1323
Název PT:	Mikroskopie a kultivace rodu *Mycobacterium*
Koordinátor:	Ing. Věra Dvořáková, Ph.D.
Podstata a účel PT:	Průkaz (detekce) mykobakterií v simulovaných vzorcích biologického materiálu pomocí mikroskopie a kultivace.
Kritéria pro účast na PT:	Rutinně prováděné vyšetřování vzorků biologického materiálu, zajištění správné laboratorní praxe.
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3 závěrečné zprávy.
Hodnocené ukazatele:	Mikroskopie: pozitivita (přítomnost acidorezistentních tyčinek příslušníků rodu *Mycobacterium* ve vzorku) x negativita Kultivace: pozitivita (pozitivní kultivace kultury mykobakterií rodu *Mycobacterium* ve zvoleném médiu) x negativita
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2 závěrečné zprávy
Počet účastníků:	37
Termín distribuce vzorků:	24. 1. 2023
Informace účastníkům:	viz Informace pro účastníky zaslané spolu se vzorky
Termín pro odeslání výsledků účastníky (stop termín):	4. 4. 2023
Označení vzorkovnic:	EHK 1323, PT#M/1-1, č. 1 – 5,
Zabezpečení jakosti vzorku včetně testu homogenity a stability:	Viz kapitola 2 závěrečné zprávy
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe.
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4 závěrečné zprávy
Určení přijaté vztažné 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.
Určení maximální směrodatné odchylky:	Směrodatná odchylka se vypočítá jako druhá odmocnina rozptylu hodnot bodového hodnocení jednotlivých laboratoří od aritmetického průměru dosažených bodů všech laboratoří.
Termín uveřejnění předběžných výsledků:	19. 4. 2023
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	Do 27. 6. 2023

2. Způsob přípravy vzorků

2.1 Postup přípravy výchozího materiálu

V přípravně půd bylo dne 18. 1. 2023 připraveno 750 ml sterilního 0,3% agaru OXOID se 3,5 ml sterilizované koncentrované Šulovy půdy. Agar byl rozplněn po 1 ml do 5 x 43 sterilních plastových mikrozkumavek / eppendorfek (5 vzorků pro každou z 37 přihlášených laboratoří + 3x rezervní vzorky + 3x vzorky pro testování v NRLM) a uložen v lednici. Zkumavky jsou dodávány Koordinačním pracovištěm (objem 2 ml, šroubovací uzávěr s těsněním). Pro sérii EHK 1323 byla vybrána kultura *M. tuberculosis,* kterou jsme otestovali 19. 1. 2023, 20. 1. 2023 a 27. 1. 2023 metodou GenoType, zda se jedná o čistou kulturu.

2.2 Zabezpečení kvality výchozího materiálu, homogenita a stabilita

- Kontrola čistoty kultury použitých mykobakteriálních species molekulárními metodami založenými na hybridizaci (GenoType) a to celkem 3x - po vybrání kultury pro sérii EHK, před distribucí vzorků a po distribuci vzorků do přihlášených laboratoří.
- Kontrola sterility agaru OXOID
- Testování kontrolních vzorků akreditovanými metodami dle schválených SOP koordinátora EHK (Ing. Věra Dvořáková, Ph.D., NRL pro mykobakterie) před distribucí vzorků do přihlášených laboratoří a po distribuci vzorků do přihlášených laboratoří (časově souběžně s testováním, které provádí přihlášené laboratoře)

2.3 Rozplnění výchozího materiálu

Dne 20. 1. 2023 bylo do jednotlivých eppendorfek s agarem přidáno po 0,1 ml kultury mykobakterií (*M. tuberculosis* evid. Č. 430/22) nebo destilované H_2O dle schématu v kapitole 3. Všechny vzorky byly zajištěny parafilmovou fólií, uloženy do krabiček označených A – E a uschovány v lednici. Vzorky byly 23. 1. 2023 předány pracovnicím koordinačního pracoviště ESPT 2 k rozdělení a distribuci do jednotlivých laboratoří. Jedna sada vzorků byla současně testována v NRL/M pro zabezpečení kvality vzorku.

3. Charakteristika materiálu

A	*M. tuberculosis* 41/23 (430/22 evid.č.)	10^{-2}
B	negativní 42/23	destilovaná H_2O
C	*M. tuberculosis* 43/23 (430/22 evid.č.)	10^{-2}
D	*M. tuberculosis* 44/23 (430/22 evid.č.)	10^{-2}
E	negativní 45/23	destilovaná H_2O

4. Způsob hodnocení

Vzorky se hodnotí kvalitativně. Hodnocení vychází z výsledků testování v NRL/M. 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 20 bodů

- Správný výsledek mikroskopie, nebo kultivace = 2 body
- Falešná negativita mikroskopie, nebo kultivace = 0 bodů
- Falešná pozitivita mikroskopie, nebo kultivace = 0 bodů

5. Vyhodnocení

35 laboratoří získalo 20 bodů, 2 laboratoře získaly 18 bodů.
Aritmetický průměr dosažených bodů se rovnal 19,9 bodů.
Limit (aritmetický průměr minus 2 směrodatné odchylky) činil 18,9 bodů.

Limit splnilo 35 (94,6 %) laboratoří.

6. Závěr

EHK 1323 - Mikroskopie a kultivace rodu *Mycobacterium* se zúčastnilo 37 laboratoří, výsledky dodaly všechny laboratoře.
Uspělo 35 laboratoří, neuspěly 2 laboratoře.

V letošním roce většina laboratoří (20 ze 37, tedy 54 %) použila fluorescenční mikroskopii, zbývající laboratoře použily Ziehl-Neelsenovo barvení. Jedna laboratoř využívající Ziehl-Neelsenovo barvení v části mikroskopie neuspěla.

Nejčastěji využívanou metodou dekontaminace v zúčastněných laboratořích je metoda PETROFF (24 z 37 přihlášených laboratoří, tj. 64,8 %), nejběžnějším používaným médiem pro kultivaci je pak Löwenstein-Jensenova vaječná půda. Tuto půdu využilo 64,8 % přihlášených laboratoří a dalších více než 20 % laboratoří využívá Löwenstein-Jensenovu půdu v kombinaci s dalšími metodami kultivace. Jedna laboratoř v části kultivace neuspěla.

Laboratoře, které neuspěly, si mohou objednat edukativní vzorky prostřednictvím webové aplikace SZÚ, a to do 30 dnů po obdržení svých výsledků. Výsledky edukativních vzorků nebudou mít vliv na opravu předchozího neúspěšného výsledku v rámci EHK a slouží pouze jako podklad pro vyřešení případné neshodné práce v laboratoři.
Edukativní vzorky laboratoř obdrží obvyklou cestou v co nejkratším termínu po objednání.

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

Konec závěrečné zprávy

Příloha 1 - Tabulky

Tabulka 1. Výsledky EHK podle počtu dosažených bodů.

Body*	**20**	**18**
Počet laboratoří	35	2
(% laboratoří)	**94.6**	**6.4**

***** limit (hranice úspěšnosti) = 18.9 bodu

Tabulka 2. Souhrny výsledků

Souhrnné výsledky mikroskopického a kultivačního vyšetření – počet laboratoří se správným výsledkem pro jednotlivé vzorky a jejich podíl z celkového počtu přihlášených laboratoří.

Vzorek	Mikroskopie	Kultivace
A	37 (100 %)	37 (100 %)
B	37 (100 %)	37 (100 %)
C	37 (100 %)	37 (100 %)
D	37 (100 %)	36 (97,3 %)
E	36 (97,3 %)	37 (100 %)

Tabulka 3. Charakter chyb mikroskopie a kultivace

	Mikroskopie		Kultivace	
Vzorek	Falešná pozitivita	Falešná negativita	Falešná pozitivita	Falešná negativita
A	X	X	X	X
B	X	X	X	X
C	X	X	X	X
D	X	X	X	**1**
E	**1**	X	X	X

Tabulka 4. Přehled metod mikroskopie použitých zúčastněnými laboratořemi a rozložení správných výsledků a chyb (falešně pozitivních a falešně negativních výsledků) v rámci těchto kategorií v části mikroskopie.

Metoda mikroskopie	Počet laboratoří	**Správné určení***	Falešně pozitivní*	Falešně negativní*
Ziehl-Neelsenovo barvení	17 (46 %)	**16 (94 %)**	1 (6 %)	0 (0 %)
Fluorescenční mikroskopie	20 (54 %)	**20 (100 %)**	0 (0 %)	0 (0 %)
celkem	37 (100 %)	**36 (97,3 %)**	1 (2,7 %)	0 (0 %)

***** procenta udávají podíl počtu laboratoří se správným výsledkem z počtu laboratoří používajících danou metodu

Tabulka 5. Přehled hlavních metod dekontaminace a kultivace (typ média) používaných v přihlášených laboratořích a rozložení správných výsledků a chyb (falešně pozitivních a falešně negativních výsledků) v rámci těchto kategorií v části kultivace.

Metoda dekontaminace / Metoda kultivace	PETROFF	N-A-L-C	HCl + NaOH	Lauryl sulfát	celkem
Löwenstein-Jensen	16 (43,2 %)	4 (10,8 %)	3 (8,1 %)	1 (2,7 %)	24 (64,8 %)
správné určení	**16 (100 %)***	**4 (100 %)***	**2 (66,7 %)***	**1 (100 %)***	**23 (95,8 %)***
falešně pozitivní	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*
falešně negativní	0 (0 %)*	0 (0 %)*	1 (33,3 %)*	0 (0 %)*	1 (4,2 %)*
Ogawa	2 (5,4 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (2,7 %)	3 (8,1 %)
správné určení	**2 (100 %)***	0 (0 %)*	0 (0 %)*	**1 (100 %)***	**3 (100 %)***
falešně pozitivní	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*
falešně negativní	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*
Middlebrook 7h10	1 (2,7 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (2,7 %)
správné určení	**1 (100 %)***	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*	**1 (100 %)***
falešně pozitivní	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*
falešně negativní	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*
MGIT	1 (2,7 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (2,7 %)
správné určení	**1 (100 %)***	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*	**1 (100 %)***
falešně pozitivní	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*
falešně negativní	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*
Kombinace metod**	4 (10,8 %)	3 (8,1 %)	0 (0 %)	1 (2,7 %)	8 (21,6 %)
správné určení	**4 (100 %)***	**3 (100 %)***	0 (0 %)*	**1 (100 %)***	**8 (100 %)***
falešně pozitivní	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*
falešně negativní	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*	0 (0 %)*
celkem	24 (64,8 %)	7 (18,9 %)	3 (8,1 %)	3 (8,1 %)	37 (100%)

***** procenta udávají podíl počtu laboratoří se správným / chybným výsledkem z počtu laboratoří používajících danou metodu

****** některé laboratoře výslovně uvedly, že pro kultivaci využívají kombinaci několika metod, nejčastěji se jednalo o kombiaci L-J půdy, půdy Ogawovy a Šulovy půdy, případně půdy Middlebrook 7h10 nebo také kultivace v systému Bactec MGIT

Tabulka 6. Přehled výsledků jednotlivých laboratoří.

EHK 1323 - Mikroskopie a kultivace rodu *Mycobacterium*
odesláno: 24. 1. 2023
uzávěrka: 4. 4. 2022

Očekávané výsledky:
A – pozitivní **B** – negativní **C** – pozitivní **D –** pozitivní **E** – negativní

Poř. číslo	Kód	Mikroskopie správné určení	Charakter chyby (fal. poz. / fal. neg.)	Kultivace správné určení	Charakter chyby (fal. poz. / fal. neg.)	Σ BODŮ
1	9	5x		5x		20
2	17	5x		5x		20
3	28	5x		5x		20
4	32	5x		5x		20
5	39	5x		5x		20
6	47	5x		5x		20
7	51	5x		5x		20
8	55	5x		4x	falešná negativita	18
9	58	5x		5x		20
10	61	5x		5x		20
11	64	5x		5x		20
12	65	5x		5x		20
13	66	5x		5x		20
14	71	5x		5x		20
15	89	5x		5x		20
16	156	5x		5x		20
17	184	4x	falešná pozitivita	5x		18
18	192	5x		5x		20
19	207	5x		5x		20
20	208	5x		5x		20
21	214	5x		5x		20
22	215	5x		5x		20
23	228	5x		5x		20
24	290	5x		5x		20
25	317	5x		5x		20
26	324	5x		5x		20
27	333	5x		5x		20
28	341	5x		5x		20
29	345	5x		5x		20
30	369	5x		5x		20
31	370	5x		5x		20
32	388	5x		5x		20
33	407	5x		5x		20
34	456	5x		5x		20
35	590	5x		5x		20
36	760	5x		5x		20
37	792	5x		5x		20