



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/23/2023 (EHK 1348)

Mykologická diagnostika

Praha, srpen 2023

Obsah

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

Program zkoušení způsobilosti PT#M/23/2023 byl zaměřen na diagnostiku kvasinek. Návrh a realizace PT#M/23/2023 byly prováděny podle standardního operačního postupu koordinátora programu 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:

Mgr. Radim Dobiáš, Ph.D. (Národní referenční laboratoř pro mykologickou diagnostiku, při Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě, Ostrava)

Zprávu autorizoval:

Mgr. Radim Dobiáš, Ph.D.
Tel: 596 200 239

Dne: 14. 8. 2023

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/23/2023

Identifikace cyklu:	EHK 1348
Název:	Mykologická diagnostika
Koordinátor:	Mgr. Radim Dobiáš, Ph.D.
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3 závěrečné zprávy – 5 lyofilizovaných simulovaných biologických materiálů s kulturami kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů.
Podstata a účel PT:	Druhová identifikace mykotických organismů izolovaných z klinického materiálu a stanovení citlivosti na antimykotika
Kritéria pro účast na PT:	Požadavky na laboratoře: zajištění správné laboratorní praxe
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2 závěrečné zprávy
Počet účastníků:	58
Termín distribuce vzorků:	2. 5. 2023
Informace účastníkům	zasílané spolu se vzorky
Termín pro odeslání výsledků účastníky:	23. 5. 2023
Označení vzorkovnic:	EHK 1348, PT # M/23, č. 1-5, 2. 5. 2023
Zabezpečení jakosti vzorku včetně testu homogenity a stability:	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. Testování homogenity a stability se provádí v den před distribucí vzorků a po termínu jednotného zahájení rozborů všemi účastníky.
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe a pokynů organizátora, záměna vzorků, neživotaschopnost kmene vlivem nedodržení časů re-izolace
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4 závěrečné zprávy
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Vztažnou hodnotou jsou výsledky druhové identifikace kmene v laboratoři koordinátora (NRL pro mykologickou diagnostiku), 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)
Určení maximální směrodatné odchylky:	Aritmetický průměr výsledků účastníků +/-2 směrodatné odchylky od průměru celkově získaných bodů
Termín uveřejnění očekávaných výsledků	1. 6. 2023
Termín uveřejnění závěrečné zprávy	Do 15. 8. 2023

2. Způsob přípravy vzorků

Přípravu a zabezpečení jakosti vzorků zajišťuje Laboratoř klinické mykologie a Národní referenční laboratoř pro mykologickou diagnostiku, 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

Výchozím materiálem pro přípravu vzorků je klinický materiál dodaný do laboratoře a kmen ATCC 90028 *Candida albicans* určeným pro ověření schopnosti laboratoře identifikovat citlivost k flukonazolu a vorikonazolu kvalitativně.

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.

Identifikace kvasinek a kvasinkovitých mikromycetů byla provedena pomocí biochemických metod, metodou kultivační a mikroskopickou a porovnáním s databází MALDI-TOF, je následně ověřena konfirmačním postupem, pomocí sekvence fungální DNA oblasti dlouhé podjednotky 28s rDNA, a identifikována dle validované databáze CBS – KNAW (propojené s taxonomickou databází mycobank.org).

Získané izoláty mykotických organizmů jsou pomnoženy a je provedena kontrola čistoty kultur a kontrola identifikace pomocí alespoň dvou různých identifikačních souprav SOP_12_R04, Auxacolor2 (Bio-Rad), MALDI-TOF (Bruker)). Výchozí materiál je vyočkován do plastových zkumavek, uzavřen, označen a uložen do přepravní krabice a doručen kurýrem Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě z laboratoře Klinické mykologie 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 s koordinátorem (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 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.

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

5 lyofilizovaných simulovaných biologických materiálů s kulturami kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů k identifikaci, z toho jeden vzorek také pro určení citlivosti k vybraným ATM.

Vzorky pro toto kolo EHK z mykologie nebyly simulované, ale odpovídaly skutečným, jak je Laboratoř klinické mykologie zachytila a identifikovala. Vzorek, u kterého se měl provést test citlivosti k ATM flukonazolu a vorikonazolu, obsahoval referenční kmen ATCC 90028, *C. albicans*.

Pro EHK roku 2023 jsme ze získaného biologického materiálu zvolili takové kmeny identifikovaných 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.

4. Způsob 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 pracoviště koordinátora.

Za identifikaci signifikantních patogenů v 5 vzorcích mohou laboratoře získat maximálně 10 bodů, za správné vyhodnocení stanovení citlivosti k ATM další čtyři 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 **2 body** – správné hodnocení, **-2 bod** – chybné hodnocení .

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

Laboratoř úspěšně absolvuje 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).

5. Vyhodnocení

Tabulka č. 1: Úspěšnost laboratoří v EHK 1348

10 bodů za bezchybnou identifikaci a 4 body za provedené citlivosti. To, že dvě laboratoře citlivosti neprovádí a nebyly v této části hodnoceny, na celkovém výsledku včetně výpočtů nic nemění.

Dosažené body	10/14)*
Počet laboratoří	2/56
Procento	100

Poznámka: 10/14) = dvě laboratoře nenabízejí zhotovení citlivostí (tato část u nich nebyla hodnocena)*

Maximálního počtu bodů dosáhlo 58 laboratoří z 58 zúčastněných.

Limit splnilo 58 laboratoří z celkového počtu 58 laboratoří.

Tabulka č. 2: Bodové hodnocení výsledků jednotlivých laboratoří (n=58)

Kód laboratoře								součet
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	FLU	VOR	
11	2	2	2	2	2	2	2	14
16	2	2	2	2	2	2	2	14
17	2	2	2	2	2	2	2	14
18	2	2	2	2	2	2	2	14
23	2	2	2	2	2	2	2	14
26	2	2	2	2	2	2	2	14
28	2	2	2	2	2	2	2	14
31	2	2	2	2	2	2	2	14
32	2	2	2	2	2	2	2	14
35	2	2	2	2	2	2	2	14
37	2	2	2	2	2	2	2	14
39	2	2	2	2	2	2	2	14
40	2	2	2	2	2	2	2	14
48	2	2	2	2	2	2	2	14
50	2	2	2	2	2	2	2	14
51	2	2	2	2	2	2	2	14
53	2	2	2	2	2	-	-	10/14
58	2	2	2	2	2	2	2	14
64	2	2	2	2	2	2	2	14
65	2	2	2	2	2	2	2	14
71	2	2	2	2	2	2	2	14
89	2	2	2	2	2	2	2	14
156	2	2	2	2	2	2	2	14

174	2	2	2	2	2	-	-	10/14
192	2	2	2	2	2	2	2	14
207	2	2	2	2	2	2	2	14
208	2	2	2	2	2	2	2	14
211	2	2	2	2	2	2	2	14
214	2	2	2	2	2	2	2	14
215	2	2	2	2	2	2	2	14
228	2	2	2	2	2	2	2	14
283	2	2	2	2	2	2	2	14
289	2	2	2	2	2	2	2	14
290	2	2	2	2	2	2	2	14
299	2	2	2	2	2	2	2	14
333	2	2	2	2	2	2	2	14
350	2	2	2	2	2	2	2	14
354	2	2	2	2	2	2	2	14
365	2	2	2	2	2	2	2	14
369	2	2	2	2	2	2	2	14
370	2	2	2	2	2	2	2	14
371	2	2	2	2	2	2	2	14
373	2	2	2	2	2	2	2	14
384	2	2	2	2	2	2	2	14
388	2	2	2	2	2	2	2	14
443	2	2	2	2	2	2	2	14
456	2	2	2	2	2	2	2	14
460	2	2	2	2	2	2	2	14
465	2	2	2	2	2	2	2	14
529	2	2	2	2	2	2	2	14
539	2	2	2	2	2	2	2	14
554	2	2	2	2	2	2	2	14
566	2	2	2	2	2	2	2	14
595	2	2	2	2	2	2	2	14
641	2	2	2	2	2	2	2	14
702	2	2	2	2	2	2	2	14
761	2	2	2	2	2	2	2	14
821	2	2	2	2	2	2	2	14

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

Vzorek	Mikroorganismus	Počet laboratoří	Procento
1	<i>Candida parapsilosis</i>	58	100,0
2	<i>Candida tropicalis</i>	58	100,0
3	<i>Candida glabrata</i>	58	100,0
4	<i>Candida krusei (Pichia kudriavzevii)</i>	58	100,0
5	<i>Candida albicans</i>	58	100,0
	- bezchybná citlivost z 56 laboratoří)*	56	96,6

Poznámka:)* 2 laboratoře stanovení citlivosti kvasinek k antimykotikům neprovádí

Žádná laboratoř v tomto cyklu mykologické diagnostiky neměla problém s identifikací kvasinek a kvasinkovitých mikromycetů ve vzorcích č. 1 – *Candida parapsilosis*, č. 2 – *Candida tropicalis*, č. 3 – *Candida glabrata*, č. 4 – *Candida krusei (Pichia kudriavzevii)* a č. 5 – *Candida albicans*.

V letošním EHK neměla s určením citlivostí k ATM problém žádná z laboratoří.

Stejně jako v minulých EHK díky celkově vysoké úspěšnosti laboratoří byla i v roce 2023 vypočtena relativně nízká hodnota směrodatné odchylky.

Techniky identifikace kvasinek a kvasinkovitých mikromycetů, ve většině parametrů nezaznamenaly prakticky žádných velkých změn. Dominuje vysoká vybavenost technikou MALDI-TOF. Více než polovina laboratoří využívá MALDI TOF jako jedinou identifikační metodu, viz Tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Přehled diagnostických postupů (58 laboratoří zapojených do EHK 1348 v r. 2023)

Diagnostický test (identifikace)	Počet laboratoří
MALDI TOF	42
MALDI TOF - monotest	30

6. Závěr

Letošního EHK 1348 se účastnilo 58 laboratoří, uspěly všechny zúčastněné. Lze konstatovat, že EHK 1348 v mykologické diagnostice dopadlo výborně. A to je patrné již delší dobu. Spektrum kvasinek zachycených z tuzemských biologických materiálů nečiní naprostě většině laboratoří problémy s identifikací. Úspěšnost získání potřebného počtu bodů se tím posouvá až na samý vrchol diagnostického úspěchu. Úspěšnost laboratoří byla prakticky absolutní díky nastavení základní obtížnosti populace druhů v zařazených vzorcích, od které se budeme moci v následujících sériích EHK odrazit. V letošním roce byla otestována pilotní série EHK pro testování citlivosti k antimykotikům, která byla rozesílána paralelně s kmeny pro identifikaci. Po akreditaci tohoto nového programu EHK zanikne nutnost dvojího hodnocení u laboratoří, které ATM citlivosti neprovádějí.

V následujících sériích EHK zůstanou součástí programu M/23 pouze identifikace kvasinek a kvasinkovitých mikromycetů a bude obohacen o edukativní položku některých vzácnějších druhů, které se mohou vyskytnout v klinickém materiálu (tzn. 5 bodově hodnocených vzorků + 1 edukativní). Samozřejmostí bude také opětovné zařazení směsných kultur. Zamýšlený způsob by měl přispět k systematickému zlepšování připravenosti mikrobiologických laboratoří v ČR pro identifikaci náročnějších druhů kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů.

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

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY