



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/38/2024 (EHK 1384)

**Kultivace a identifikace vláknitých
mikroskopických hub**

Praha, květen 2024

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	8
Příloha – výsledkový protokol jednotlivých laboratoří	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/38/2024 byl zaměřen na kultivaci a identifikaci vláknitých mikroskopických hub.

Návrh a realizace PT#M/38/2024 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: 3. 6. 2024

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/38/2024

Identifikace cyklu:	EHK 1384
Název PT:	Kultivace a identifikace vláknitých mikroskopických hub
Koordinátor:	Mgr. Radim Dobiáš, Ph.D.
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
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3 závěrečné zprávy – Identifikované kmeny hyfomycetů izolované na Sabouraudově agaru s vitamínem.
Hodnocené ukazatele:	Správná identifikace vláknitých mikroskopických hub
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2 závěrečné zprávy
Počet účastníků:	34
Termín distribuce vzorků:	6. 2. 2024
Informace účastníkům	zasílané spolu se vzorky
Termín pro odeslání výsledků účastníky:	12. 3. 2024
Označení vzorkovnic:	EHK 1384, PT # M/38, č. 1-5, 6. 2. 2024
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 není možno provést vzhledem k tomu, že se jedná o distribuci narostlých kultur na živném médiu. Stabilita je posuzována na základě testování vybraných vzorků po ukončení cyklu EHK: po výběru jsou vzorky kultivovány za běžných laboratorních podmínek v souladu s normou ČSN 15189 a je ověřena schopnost růstu testovaného kmene. V průběhu testu je provedena makro-morfologická pohledová kontrola růstu kmenů všech rozesílaných naočkovaných kmenů a identifikace těchto kontrolních kmenů.
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 vztahné hodnoty:	Vtažnou hodnotou jsou výsledky druhové identifikace kmene v 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 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.
Termín uveřejnění očekávaných výsledků	22. 3. 2024
Termín uveřejnění závěrečné zprávy	Do 4. 6. 2024

2. Způsob přípravy vzorků

Přípravu a zabezpečení jakosti vzorků zajišťuje NRL pro mykologickou diagnostiku, 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 byly zpracovány standardním způsobem používaným v laboratoři klinické mykologie subdodavatele, čisté kultury byly izolovány a identifikovány do druhu. Získané izoláty mykotických organismů byly pomnoženy a byla provedena kontrola čistoty kultur a kontrola správnosti identifikace. Identifikace vláknitých hub pomocí fenotypových (makro a mikromorfologie) metod, metodou kultivační a mikroskopickou byla následně ověřena konfirmačním postupem, pomocí sekvence fungální DNA oblastí dlouhé podjednotky 28s rDNA, ITS 1-4, D1-2, β -tubulin a identifikována dle validované databáze CBS – KNAW (propojené s taxonomickou databází mycobank.org). Výchozí materiál byl vyočkován do plastových lahviček s agarem, uzavřen, označen a uložen do přepravní krabice a doručen kurýrem (pravidelným svozem ZÚ Ostrava) z NRL pro mykologickou diagnostiku ZÚ Ostrava do SZÚ Praha. 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	4 + 1 edukativní vzorek	Vybrané izoláty vláknitých mikromycetů z klinického materiálu izolované do transportní kultury

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

č. vzorku	kmen	poznámka
1.	<i>Aspergillus fumigatus</i>	
2.	<i>Aspergillus flavus</i>	
3.	<i>Aspergillus terreus</i>	
4.	<i>Nannizzia gypsea (Microsporium gypseum)</i>	
5.	<i>Exophiala dermatitidis</i>	

4. Způsob hodnocení

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. 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 4 vzorcích (4 izolátech) mohou laboratoře získat maximálně 8 bodů, protože vzorek číslo 5 má edukativní charakter a body se za něj neudělují. 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 sérii EHK 1384

8 bodů za bezchybnou identifikaci (rod/druh).

Dosažené body	6	7	8
Počet laboratoří	3	2	28
Procento	9,1	6,1	84,8

Maximálního počtu bodů dosáhlo 28 laboratoří z 33 zúčastněných.

Aritmetický průměr byl 7,8

Směrodatná odchylka byla 0,6

Limit (t. j. průměr -2 směrodatné odchylky) byl 6,6 bodů.

Limit splnilo 30 laboratoří.

Tabulka č. 2: Bodové hodnocení výsledků jednotlivých laboratoří (n=33)

Kód laboratoře					součet	Edukativní
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	Vzorek 4		vzorek 5
17	2	2	2	2	8	2
28	2	2	2	2	8	2
50	2	2	2	2	8	2
51	2	2	2	2	8	2
53	2	2	2	2	8	2
58	2	2	2	0	6	2
65	2	2	2	2	8	2
89	2	2	2	2	8	2
156	2	2	2	2	8	2
207	2	2	2	2	8	2
211	2	2	2	2	8	2
214	2	2	2	2	8	2
215	2	2	2	2	8	2

283	2	2	2	2	8	2
289	2	2	2	2	8	2
350	2	2	2	0	6	2
354	2	2	2	2	8	2
369	2	2	2	2	8	2
370	2	2	2	2	8	2
371	2	2	2	2	8	2
384	2	2	2	2	8	2
443	2	2	2	2	8	2
456	2	2	2	2	8	2
465	2	2	2	2	8	2
539	2	2	2	1	7	2
554	2	2	2	2	8	2
595	2	2	2	0	6	2
603	2	2	2	2	8	2
633	2	2	1	2	7	0
641	2	2	2	2	8	2
702	2	2	2	2	8	2
809	2	2	2	2	8	2
821	2	2	2	2	8	2

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

Vzorek	Mikroorganismus	Počet laboratoří	Procento
1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	33	100,0
2	<i>Aspergillus flavus</i>	33	100,0
3	<i>Aspergillus terreus</i>	32	97,0
4	<i>Nannizzia gypsea (Microsporum gypseum)</i>	29	12,1
5	<i>Exophiala dermatitidis</i> – edukativní vzorek	32	97,0

Žádná laboratoř v EHK Kultivace a identifikace vláknitých mikroskopických hub neměla problém s identifikací vzorku č. 1 a 2 (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*). U vzorku č. 3, který obsahoval kmen *Nannizzia gypsea (Microsporum gypseum)*, měly problém s identifikací 4 laboratoře, ve dvou případech došlo k záměně za *Trichophyton mentagrophytes*, v jednom případě za *Microsporum canis* a v jednom případě byl určen pouze rod *Nannizzia*, což bylo hodnoceno jedním bodem.

6. Závěr

EHK 1384 – Kultivace a identifikace vláknitých mikroskopických hub se zúčastnilo 34 laboratoří, výsledky k hodnocení dodalo 33 laboratoří.
Uspělo 30 laboratoří.

Lze konstatovat, že série EHK 1384 „Kultivace a identifikace vláknitých mikroskopických hub“ proběhla úspěšně.

Na základě průzkumu využití diagnostických testů pro identifikaci kmenů ve vzorcích a podnětů účastníků v předešlé sérii EHK 1332 byly zohledněny připomínky, které se týkaly nedostatku času potřebného pro kultivaci a identifikaci vláknitých hub, zvláště dermatofytů. **Doba potřebná pro nezbytné úkony vedoucí ke správné identifikaci byla prodloužena o 14 dní**, což evidentně vedlo ke zvýšení komfortu uživatelů v sériích EHK 1384. Prodloužené doby od odeslání EHK do termínu odeslání výsledků účastníky EHK budeme tedy využívat i nadále. Význam edukačního vzorku hodnotíme jako přínosný a vzhledem k vysoké úspěšnosti identifikací (97 %) bude druh *Exiphiala dermatitidis* běžně řazen mezi bodově hodnocené vzorky v následujících sériích EHK. Předpokládáme, že v dalších sériích EHK již nebude nutné zvyšovat počet bodovaných pozic ze současných 4 na větší počet. Tento ustálený počet je dostačující pro bodový rozptyl nutný pro výpočet směrodatné odchylky.

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

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁV