



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/40/2024 (EHK 1403)

Testování citlivosti na antimykotika

Praha, srpen 2024

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	8
	Příloha 1 – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/40/2024 je zaměřen na ověření laboratoře správně otestovat a interpretovat výsledek testování citlivosti antifungálních látek u mykotických původců infekcí.

Návrh a realizace PT#M/40/2024 byly prováděny podle standardního operačního postupu koordinátora programu EHK na pracovišti Expertní skupiny pro zkoušení způsobilosti (ESPT) Státního zdravotního ústavu (SZÚ).

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: RNDr. Pavlína Lysková PhD., NRL pro antimykotika, ZÚ Ústí nad Labem

Zprávu autorizoval: RNDr. Pavlína Lysková PhD.
Tel. 234 118 506

Dne: 05. 08. 2024

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/40/2024

Identifikace cyklu:	EHK 1403
Název PT:	Testování citlivosti na antimykotika
Koordinátor:	RNDr. Pavlína Lysková, PhD., ZÚ se sídlem v Praze, Sokolovská 60, 186 00 Praha 8
Podstata a účel PT:	Stanovení citlivosti mykotických organismů k antifungálním látkám vč. interpretace výsledků
Kritéria pro účast na PT:	Požadavky na laboratoře: zajištění správné laboratorní praxe
Charakteristika materiálu:	Izolát mikromycetů, viz kapitola 3 závěrečné zprávy
Hodnocené ukazatele:	Testovaná antimykotika: anidulafungin, amfotericin B, flukonazol a vorikonazol. Hodnocení: Citlivý/Rezistentní popř. Intermediární nebo SDD (Susceptible Dose Dependent)
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2 závěrečné zprávy
Počet účastníků:	43
Termín distribuce vzorků:	30. 4. 2024
Informace účastníkům	Se vzorky je distribuována informace pro účastníky, kde jsou podrobné informace a pokyny k cyklu EHK
Termín odeslání výsledků účastníkům:	21. 5. 2024
Označení vzorkovnic:	EHK-1403/1-2/2024
Zabezpečení jakosti vzorku (včetně termínů testů homogenity a stability):	Kvalita je zajištěna manipulací za sterilních podmínek, vhodným skladováním, rychlým transportem ke zpracování. Test homogenity viz kapitola 2 závěrečné zprávy
Možné zdroje analytických chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe, nesprávné vyhodnocení testů, chybný zápis do elektronického formuláře
Způsob vyhodnocení výsledků:	Za správné hodnocení čtyř antimykotik u 2 kmenů je možno získat maximálně 8 bodů. Bodování je prováděno ve stupnici 1 bod za správnou interpretaci získaného výsledku, 0 bodů neuvedeno/nesprávná interpretace výsledku. Laboratoř úspěšně absolvuje kolo EHK, pokud dosáhne bodového limitu, který se vypočítává podle vzorce.
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Za vztažnou hodnotu je považován výsledek získaný v NRL.
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.
Termín uveřejnění předběžných výsledků:	31.5.2024
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	Do 13. 8. 2024

2. Způsob přípravy vzorků

2.1 Postup přípravy výchozího materiálu

Klinické vzorky jsou zpracovány standardním způsobem používaným v laboratoři mykologie, čisté kultury jsou izolovány, identifikovány a je u nich stanovena citlivost k ATM (dle příslušných SOP). Získané izoláty mykotických organismů jsou pomnoženy, je provedena kontrola čistoty kultur, kontrola správnosti identifikace a kontrola citlivosti k ATM dle příslušných SOP. Výchozí materiál je vyočkován na plotny se Sabouraudovým agarem, které jsou ovinuté parafilmem, označeny a uloženy do přepravní krabice a doručeny kurýrem popř. osobně předány pracovníkovi SZÚ Praha. V případě osobního předání je o tomto úkonu veden záznam.

V SZÚ Praha v Národní referenční laboratoři/Česká národní sbírka typových kultur (CNCTC) je pak na základě dohody u zaslaných kmenů provedena lyofilizace.

Kultury mykotických organismů z NRL/ATM jsou naočkovány na vhodná kultivační média, dle druhu mikroorganismu jsou naočkovány na 2 – 4 Petriho misky. Kmeny jsou inkubovány v termostatu při 35-36°C ve vhodné atmosféře 24h, pomalu rostoucí mikroorganismy 48h. Po inkubaci je vizuálně hodnocen růst a čistota kultury. Kontaminované misky jsou před lyofilizací vyřazeny.

Narostlé kultury jsou setřeny sterilním vatovým tamponem z povrchu agaru a resuspendovány ve 4 ml fyziologického roztoku. Denzita výsledného zákalu musí odpovídat McFarlandově standardě 6 (přibližně $1,8 \times 10^9$ org. ml⁻¹). Automatickou pipetou je napipetováno 0,2 ml vzniklé suspenze do 20 ml lyofilního média. Homogenizovaná suspenze je rozplněna do jednotlivých lahviček (vzorků) v objemu 0,5 ml/ 1 lahvička. Lahvičky se uzavřou gumovým uzávěrem pomocí pinzety tak, aby byl ponechán prostor pro odpaření. Po rozplnění lahviček je 1 kapka ze zbylé suspenze inokulována na živný agar a inkubována pro kontrolu sterility. Rozplněné lahvičky jsou umístěny na kovovou snímatelnou plošinu lyofilizátoru rovnoměrně po celé její ploše. Kovová plošina s lahvičkami se vloží do mrazicího boxu na -80°C. Po 3 hodinách se plošina s lahvičkami vloží do lyofilizačního přístroje, kde probíhá vlastní lyofilizace (SOP-NRL/CNCTC-09).

Po lyofilizaci následuje kontrola životnosti vzorků. Po jejím provedení jsou lahvičky opatřeny štítkem s pořadovým číslem vzorku, číslem EHK a datem rozeslání. Následně se lahvičky zapertlují pomocí speciálních pertlovacích kleští a jsou vloženy do plastového obalu. Uskladnění do předání vzorků probíhá v lednici při teplotě 4 – 8°C.

Připravené vzorky jsou předány koordináčnickému pracovišti ESPT 2.

Přeprava vzorků je zajišťována přepravcem se službou přeprava nebezpečného zboží dle regulí ADR pro silniční přepravu.

2.2 Zabezpečení kvality výchozího materiálu, homogenita a stabilita

Zabezpečení kvality: Zabezpečení kvality výchozího materiálu je zajištěno manipulací za aseptických podmínek. Po lyofilizaci je výchozí materiál testován na přítomnost sledovaných kultur a je znovu otestována citlivost. Ze série lyofilizace jsou náhodně vybrány dva lyofilizáty od každého vzorku. Lahvička se zbaví pertle a pomocí sterilní pinzety se opatrně vyjme gumový uzávěr. Do lahvičky se nakape několik kapek fyziologického roztoku. Pomocí Pasteurovy pipety je homogenizován obsah lahvičky a následně vyočkován na připravená media. Izoláty mykotických organismů jsou vykultivovány a provedena kontrola identifikace a citlivosti v termínu před rozesláním nebo v termínu rozeslání vzorků zákazníkům.

Stabilita vzorků je zabezpečena lyofilizací kultur

Homogenita je zajištěna promícháním vzorků před zahájením alikvotování do vzorkovnic.

3. Charakteristika materiálu

Výchozím materiálem pro přípravu vzorků jsou charakterizované kmeny kvasinek popř. vláknitých hub, izolované z klinického materiálu, dodaného do laboratoře koordinátora nebo sbírkové kmeny uchovávané podle předepsaného návodu nebo skladované zamražené v hlubokomrazícím boxu (-80 °C).

Název programu EHK	Počet vzorků v sérii	vzorky jsou určeny k testování těchto cílových markerů
Testování citlivosti na antimykotika	2	Vybrané izoláty kvasinek určené k testování vybraných antimykotik <i>in vitro</i> (amfotericin B, anidulafungin, flukonazol, vorikonazol)

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

č. vzorku	kmen	poznámka
1.	<i>C. tropicalis</i> Amfotericin B (AMB) - citlivý Anidulafungin (AND) - citlivý Flukonazol (FLU) - citlivý Vorikonazol (VOR) - citlivý	
2.	<i>C. albicans</i> Amfotericin B - citlivý Anidulafungin - citlivý Flukonazol - citlivý Vorikonazol - citlivý	

Očekávané výsledky (mg/l)

Druh/ATM	AMB	AND	FLU	VOR
<i>C. tropicalis</i>	0,125	≤0,004	0,5	0,016
<i>C. albicans</i>	0,125	≤0,004	0,25	0,008

4. Způsob hodnocení

Vztažnou hodnotou jsou výsledky získané v NRL pro antimykotika (viz tabulka očekávané výsledky).

Bodové hodnocení účastníků vychází z očekávaných výsledků získaných opakovaným vyšetřením vzorků na pracovišti koordinátora a je nastaveno tak, že jedním bodem je hodnocena úplná shoda s očekávaným výsledkem (správná interpretace výsledku) a bez bodového ohodnocení jsou výsledky, které se s očekávaným výsledkem neshodují (např. „citlivý“ místo „rezistentní“) nebo nejsou uvedeny (s výjimkou případů, kde interpretační kritéria nejsou dána). Volba metody pro testování vzorků závisí na rutinní praxi účastníka.

Za správné hodnocení čtyř antimykotik u 2 kmenů je možno získat maximálně 8 bodů. Postupně bude možno přidat také vzorek edukační, který nebude hodnocen body.

Laboratoř úspěšně absolvuje 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.

Koordinátor si vyhrazuje právo při vysokém výskytu atypických výsledků vyřadit z hodnocení celý vzorek. Koordinátor je oprávněn v případě potřeby jmenovat odbornou poradní skupinu pro řešení konkrétního kola dané série.

V případě, že je počet účastníků menší než 10, nepoužije se výše uvedený postup výpočtu limitu. V tomto případě laboratoř úspěšně absolvuje EHK, pokud dosáhne 80 % maximálního bodového zisku.

5. Vyhodnocení

Tabulka č. 1: Úspěšnost laboratoří v EHK 1403

8 bodů za správné hodnocení výsledku.

Dosažené body	6	7	8
Počet laboratoří	0	2	41
Procento	0	4,7	95,3

Maximálního počtu bodů dosáhlo 41 laboratoří ze 43 zúčastněných.

Aritmetický průměr byl 8

Směrodatná odchylka byla 0,2

Limit (t. j. průměr -2 směrodatné odchylky) byl 7,6 bodů.

Limit splnilo 41 laboratoří.

2 laboratoře neuspěly.

Tabulka č. 2: Bodové hodnocení výsledků jednotlivých laboratoří (n=43)

Kód laboratoře	vzorek A (CATR)				vzorek B (CAAL)				součet
	AMB	AND	FLU	VOR	AMB	AND	FLU	VOR	
11	1	1	1	1	1	1	1	1	8
17	1	1	1	1	1	1	1	1	8
18	1	1	1	1	1	1	1	1	8
26	1	0	1	1	1	1	1	1	7
28	1	1	1	1	1	1	1	1	8
31	1	1	1	1	1	1	1	1	8
32	1	1	1	1	1	1	1	1	8
35	1	1	1	1	1	1	1	1	8
37	1	1	1	1	1	1	1	1	8
39	1	1	1	1	1	1	1	1	8
40	1	1	1	1	1	1	1	1	8
48	1	1	1	1	1	1	1	1	8
50	1	1	1	1	1	1	1	1	8
51	1	1	1	1	1	1	1	1	8
58	1	1	0	1	1	1	1	1	7
64	1	1	1	1	1	1	1	1	8
65	1	1	1	1	1	1	1	1	8
71	1	1	1	1	1	1	1	1	8
89	1	1	1	1	1	1	1	1	8
156	1	1	1	1	1	1	1	1	8
207	1	1	1	1	1	1	1	1	8
208	1	1	1	1	1	1	1	1	8
211	1	1	1	1	1	1	1	1	8
214	1	1	1	1	1	1	1	1	8
228	1	1	1	1	1	1	1	1	8
283	1	1	1	1	1	1	1	1	8
289	1	1	1	1	1	1	1	1	8
299	1	1	1	1	1	1	1	1	8
350	1	1	1	1	1	1	1	1	8
369	1	1	1	1	1	1	1	1	8
370	1	1	1	1	1	1	1	1	8
371	1	1	1	1	1	1	1	1	8
373	1	1	1	1	1	1	1	1	8
443	1	1	1	1	1	1	1	1	8
456	1	1	1	1	1	1	1	1	8
465	1	1	1	1	1	1	1	1	8
467	1	1	1	1	1	1	1	1	8
529	1	1	1	1	1	1	1	1	8
539	1	1	1	1	1	1	1	1	8
554	1	1	1	1	1	1	1	1	8
595	1	1	1	1	1	1	1	1	8
641	1	1	1	1	1	1	1	1	8
702	1	1	1	1	1	1	1	1	8

Plný počet (8 bodů) získalo 41 laboratoří (95,3 %), dvě laboratoře získaly 7 bodů. Oba kmeny byly citlivé ke všem testovaným antimykotikům (ATM).

Jedna laboratoř označila anidulafungin jako rezistentní a jedna flukonazol jako intermediárně citlivý v obou případech u *C. tropicalis*. V prvním případě byl použit MIC YST a v druhém případě MIC Test Strip (MTS, Liofilchem).

Většina laboratoří stanovovala MIC (mikrodiluční, Etesty, VITEK) popř. kombinaci metod.

6. Závěr

EHK 1403 – Testování citlivosti na antimykotika se zúčastnilo 43 laboratoří, všechny laboratoře vrátily výsledky k hodnocení.

Uspělo 41 laboratoří, neuspěly 2 laboratoře.

Z důvodu celkové vysoké úspěšnosti se tentokrát bohužel výrazně projevila i ztráta pouhého jednoho bodu.

Pro vyzkoušení způsobilosti laboratoří v ČR provádět a interpretovat výsledky testování citlivosti kvasinek *in vitro* byly vybrány dva ze čtyř nejčastějších druhů původců invazivních infekcí krevního řečiště v ČR - *C. tropicalis* (CATR) a *C. albicans* (CAAL). Pro otestování byli zvoleni zástupci ze tří skupin systémových ATM dostupných a užívaných v ČR pro terapii invazivních kvasinkových infekcí. Lékem první volby u těchto infekcí jsou echinokandiny. Rezistence bývá obvykle zkřížená (mutace v genu *fks* jsou obvykle zodpovědné za zkříženou rezistenci ke všem ATM z této skupiny), avšak vzhledem tomu, že se vyskytují i případy, kdy toto neplatí, lze doporučit testovat všechny zástupce. Koncem loňského roku EMA (European Medicine Agency) schválila používání nového echinokandinu – rezafunginu – v Evropě.

Oba kmeny (CATR a CAAL) představovaly citlivé divoké kmeny (tzv. wild type) bez získaného mechanismu rezistence.

EUCAST hodnotí pro CATR jako citlivé hodnoty MIC AMB \leq 1; AND \leq 0,06; FLU \leq 2 a VOR \leq 0,125 mg/l. CLSI hodnotí jako citlivé: AND \leq 0,25; FLU \leq 2 a VOR \leq 0,125 mg/l a nemá stanovena interpretační kritéria pro hodnocení AMB.

EUCAST hodnotí pro CAAL jako citlivé hodnoty MIC AMB \leq 1; AND \leq 0,03; FLU \leq 2 a VOR \leq 0,06 mg/l. CLSI hodnotí jako citlivé AND \leq 0,25; FLU \leq 2 a VOR \leq 0,125 mg/l a nemá stanovena interpretační kritéria pro hodnocení AMB.

Protože jedna laboratoř uvedla rezistentní výsledek za použití metody **MIC YST**, ještě jednou bych chtěla připomenout důležitou poznámku k odečtu. **Stanovená doba odečtu je 16-24 hod a destička by měla být odečtena ve chvíli, kdy je dostatečně narostlá (růžová) pozitivní kontrola.** S následnou prodlužující se dobou inkubace mohou hodnoty MIC narůstat (a přepadat do „R“ kategorie). Odkaz na aktualizovaný návod je zde: <http://www.diagnostics.sk/products/mic-kits/mic-yst-216>.

Výběr testovaných ATM zůstane s největší pravděpodobností stejný i v příštím kole. Zároveň se bude v příštím kole bodovat i identifikace kvasinek (tzn., kvasinky nebudou předem určené).

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 reklamáce použijte také webovou aplikaci SZÚ.