



Státní zdravotní ústav
Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti
Šrobárova 49/48, 100 00, Praha 10

Závěrečná zpráva

Zkoušení způsobilosti v lékařské mikrobiologii
(Externí hodnocení kvality)

PT#M/40*/2023 (EHK 1349)

**Pilotní série
Testování citlivosti na antimykotika**

Praha, červenec 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	5
5.	Vyhodnocení	6
6.	Závěr	7
	Příloha 1 – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/40*/2023 je zaměřen na ověření laboratoře správně otestovat a interpretovat výsledek testování citlivosti antifungálních látek u mykotických původců infekcí.

Návrh a realizace PT#M/40*/2023 byly prováděny podle standardního operačního postupu koordinátora programu (RNDr. Pavlína Lysková PhD.) 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 rozesílána poštou.

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

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

Dne: 14. 7. 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/40*/2023

Identifikace cyklu:	EHK 1349
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:	Ověření schopnosti stanovení citlivosti mykotických organismů k antifungálním látkám vč. interpretace výsledků
Kritéria pro účast na PT:	Znalost a technické vybavení pro testování citlivosti na antimykotika.
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3 závěrečné zprávy
Hodnocené ukazatele:	Citlivý/Rezistentní popř. intermediární
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2 závěrečné zprávy
Počet účastníků:	34
Termín distribuce vzorků:	2. 5. 2023
Informace účastníkům:	viz Informace pro účastníky zaslané spolu se vzorky
Termín pro odeslání výsledků účastníky (stop termín):	23. 5. 2023
Označení vzorkovnic:	EHK-1349/1-2/2023
Zabezpečení jakosti vzorku včetně testu homogenity a stability:	Zabezpečení stability vzorků: Stabilita je zajištěna manipulací se vzorky 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 je posuzováno na základě testování vybraných vzorků před/po ukončení cyklu EHK. Vzorky jsou kultivovány za běžných laboratorních podmínek v souladu s normou ČSN 15189 a je ověřena schopnost růstu testovaných kmenů. Zároveň je ověřena citlivost k antimykotikům u těchto kontrolních kmenů.
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe, nesprávné vyhodnocení testů, chybný zápis do elektronického formuláře
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4 závěrečné zprávy
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Za vztažnou hodnotu je považován výsledek získaný v NRL.
Určení maximální směrodatné odchylky:	Aritmetický průměr všech hodnocených laboratoří minus 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:	30. 5. 2023
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	Do 15. 8. 2023

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.

2.2 Zabezpečení kvality výchozího materiálu, homogenita a stabilita

Zabezpečení kvality výchozího materiálu je zajištěno manipulací za aseptických podmínek. Pro zabezpečení homogenity jsou vzorky před použitím pro účely kontroly kvality zkontrolovány vyočkováním a otestováním citlivosti. Zkontrolovaný materiál je předán do SZÚ Praha k dalšímu zpracování. V SZÚ Praha je výchozí materiál předán koordináčnímu pracovišti ESPT2, které provede distribuci vzorků účastníkům EHK. Pro každý vzorek je vystaven protokol o přípravě vzorků, ve kterém jsou uvedeny veškeré manipulace prováděné s připravovaným vzorkem. Ze série vzorků jsou při zahájení cyklu EHK náhodně vybrány čtyři narostlé kultury (po jedné z každého testovaného kmene). Stabilita výchozího materiálu je zabezpečena lyofilizací kultur a vhodným skladováním (při +5°C). Stabilita vzorků je ověřena po ukončení série EHK.

2.3 Rozplnění výchozího materiálu

Lyofilní médium obsahující příslušné kultury kvasinek je rozplněno do jednotlivých lahvíček (vzorků) o objemu 0,5 ml. Vzorky jsou označeny pořadovým číslem 1 – 2, číslem EHK a datem rozeslání.

Po lyofilizaci je materiál testován na přítomnost sledovaných kultur. Od každého vzorku jsou náhodně vybrány 4 lyofilizáty. Do ampule se nakape několik kapek fyziologického roztoku. Pomocí Pasteurovy pipety je homogenizován obsah ampule, následně vyočkován na připravená media a je provedena kontrola identifikace. Poté jsou lahvičky opatřeny pertlí, 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

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. albicans</i> Amfotericin B - citlivý Anidulafungin - citlivý Flukonazol - citlivý Vorikonazol - citlivý	
2.	<i>C. parapsilosis</i> Amfotericin B - citlivý Anidulafungin - citlivý Flukonazol - citlivý Vorikonazol - citlivý	

4. Způsob hodnocení

Vztažnou hodnotou jsou výsledky získané v NRL pro antimykotika.

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 1349

8 bodů za správné hodnocení výsledku.

Dosažené body	6	7	8
Počet laboratoří	3	9	22
Procento	8,8	26,5	64,7

Maximálního počtu bodů dosáhlo 22 laboratoří z 34 zúčastněných.

Aritmetický průměr byl 7,56

Směrodatná odchylka byla 0,65

Limit (t. j. průměr -2 směrodatné odchylky) byl 6,26 bodů.

Limit splnilo všech 34 laboratoří.

Tabulka č. 2: Bodové hodnocení výsledků jednotlivých laboratoří (n=34)

Kód laboratoře	vzorek 1 (CAAL)				vzorek 2 (CAPA)				součet
	AMB	AND	FLU	VOR	AMB	AND	FLU	VOR	
11	1	1	1	1	1	1	1	1	8
16	0	1	1	1	1	1	1	1	7
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	0	1	1	6
28	1	1	1	1	1	1	1	1	8
32	1	1	1	1	1	1	0	1	7
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	1	1	1	1	1	1	8
64	1	1	1	1	1	1	0	1	7
71	1	1	1	1	1	0	1	1	7
89	1	0	1	1	1	1	1	1	7
156	1	1	1	1	1	1	1	1	8
207	1	1	1	1	1	1	0	1	7

208	1	0	1	1	1	0	1	1	6
211	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
299	1	1	1	1	1	1	1	1	8
350	1	0	1	1	1	1	1	1	7
369	1	1	1	1	1	1	1	1	8
456	1	1	1	1	1	0	1	1	7
465	1	1	1	1	1	1	1	1	8
554	1	1	1	1	1	1	1	1	8
539	1	0	1	1	1	1	1	1	7
595	1	1	1	1	1	1	1	1	8
641	1	0	1	1	1	0	1	1	6
702	1	1	1	1	1	1	1	1	8

Plný počet (8 bodů) získalo 22 laboratoří (64,7 %), devět laboratoří získalo 7 bodů a tři laboratoře získaly 6 bodů. Oba kmeny byly citlivé ke všem testovaným antimykotikům (ATM).

Tři laboratoře uvedly, že netestují anidulafungin (AND). Jedna laboratoř označila amfotericin B (AMB) jako intermediárně citlivý (I) u *C. albicans*. Tři laboratoře označily AND u *C. albicans* jako rezistentní a zajímavé je, že všechny tyto laboratoře použily MIC YST (bude rozvedeno v dále). Dvě laboratoře vyhodnotily AND u *C. parapsilosis* jako „I“. Třem laboratořím vyšel flukonazol (FLU) u *C. parapsilosis* vyšší (4 mg/l; „I“).

Čtyři laboratoře použily pro stanovení citlivosti diskovou difúzní metodu. Ostatní laboratoře použily metodu stanovení MIC (mikrodiluční, Etesty, VITEK) popř. kombinaci metod.

6. Závěr

Pilotní série EHK 1349 – Testování citlivosti na antimykotika se zúčastnilo 34 laboratoří, všechny laboratoře vrátily výsledky k hodnocení.

Uspělo všech 34 laboratoří.

Pro vyzkoušení způsobilosti laboratoří v ČR provádět a interpretovat výsledky testování citlivosti kvasinek *in vitro* byly vybrány dva z nejčastějších druhů původců invazivních infekcí krevního řečiště *C. albicans* (CAAL) a *C. parapsilosis* (CAPA). 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 a zástupce skupiny – anidulafungin – je považován za marker *in vitro* rezistence pro ostatní echinokandiny (mutace v genu *fks* jsou obvykle zodpovědné za zkříženou rezistenci ke všem ATM z této skupiny). Oba kmeny (CAAL a CAPA) představovaly citlivé divoké kmeny (tzv. wild type) bez získaného mechanismu rezistence. Zástupci *C. parapsilosis* komplexu mají obecně horší citlivost k echinokandinům díky přirozené alteraci aminokyselin v genu *Fks1p*, což se projevuje vyššími hodnotami MIC získanými *in vitro*.

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 stanovená interpretační kritéria pro hodnocení AMB.

EUCAST hodnotí pro CAPA jako citlivé hodnoty MIC AMB \leq 1; AND \leq 4; FLU \leq 2 a VOR \leq 0,125 mg/l. CLSI hodnotí jako citlivé AND \leq 2; FLU \leq 2 a VOR \leq 0,125 mg/l a nemá stanovená interpretační kritéria pro hodnocení AMB.

Testování citlivosti kvasinek a vláknitých hub zaznamenalo v posledních letech značný progres, přesto je i nadále v některých případech poměrně problematické. CLSI má, kromě mikrodiluční metodiky, rozpracovanou metodiku také pro **diskovou difúzní metodu** a pro některá ATM má stanoveny velikosti zón v návaznosti na druhově specifické breakpointy (BP). Testování je však v poslední době značně komplikováno výpadky tablet Neo-Sensitabs, navíc u některých tablet bude výroba ukončena. Ostatní dodávané disky (od jiných výrobců) by měly zohledňovat druhově specifické BP. Disk pro AND není k dispozici. Společnost EUCAST-AFST na diskové difúzní metodice v minulosti pracovala, podle informací prof. M. C. Arendrup však společnost od této aktivity upustila z důvodu problémů s dodávkami substancí a problematickým odečítáním velikostí zón, a v současné době nemá v plánu na rozvoji metodiky pracovat – bohužel.

Obě společnosti (CLSI a EUCAST) mají rozpracovanou **mikrodiluční metodiku** a pro nejčastější druhy kvasinek jsou BP stanoveny. U klinicky významných izolátů je vhodné MIC stanovovat, protože stanovení MIC je přesnější. I v ambulantní péči může nastat potřeba systémové terapie u chronických, refrakterních, rekurentních infekcí nebo tam, kde v důsledku dlouhodobé terapie azolovými preparáty dojde rozvoji rezistence.

Na závěr ještě **důležitá poznámka k používání MIC YST** (Diagnostics; viz zmínka výše). Díky MUDr. Skružné, která zaznamenala, že citlivé kmeny kvasinek v MIC YST poměrně často vycházely „rezistentní“ (a po ověření vyšly citlivé), byla provedena revize předepsané doby odečtu v návodu. **Stanovená doba odečtu je 16-24 hod a destička by měla být odečtena ve chvíli, kdy je 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>. O nové metodě odvozené od EUCAST byla informována komise EUCAST-AFST.

Výběr testovaných ATM zůstane s největší pravděpodobností stejný i v příštím kole.

V případě reklamací vyhodnocení série, prosím, postupujte dle reklamačního řádu. Pro zadání reklamace použijte mailový nebo telefonický kontakt na koordinační pracoviště ESPT 2: ehk@szu.cz, tel. 267 082 258

Konec závěrečné zprávy