



Státní zdravotní ústav
Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti
Odborně způsobilý poskytovatel zkoušení způsobilosti č. 7001TC posouzený ČIA
podle ČSN EN ISO/IEC 17043:2023
Šrobárova 49/48, 100 00, Praha 10

Závěrečná zpráva

Zkoušení způsobilosti v lékařské mikrobiologii
(Externí hodnocení kvality)

PT#M/40/2025 (EHK 1481)

Testování citlivosti na antimykotika

Praha, květen 2025

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/40/2025 je zaměřen na ověření laboratoře správně otestovat a interpretovat výsledek testování citlivosti antifungálních látek u mykotických původců infekcí.

Návrh a realizace PT#M/40/2025 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: 27. 5. 2025

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/40/2025

Identifikace cyklu:	EHK 1481
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 (citlivý zvýšená expozice) nebo SDD (Susceptible Dose Dependent)
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2 závěrečné zprávy
Počet účastníků:	44
Termín distribuce vzorků:	28. 4. 2025
Informace účastníkům	Se vzorky je distribuována "Informace pro účastníky", kde jsou podrobné informace a pokyny k cyklu EHK
Termín odeslání výsledků účastníky:	19. 5. 2025
Označení vzorkovnic:	EHK-1481/1-2/2025
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 správnou identifikaci a správné hodnocení čtyř antimykotik (amfotericin B, anidulafungin, flukonazol, vorikonazol) u 2 kmenů je možno získat maximálně 12 bodů. Bodování je prováděno ve stupnici 2 body za správnou identifikaci kvasinky (správné uvedení rodového a druhového názvu) a 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 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:	22. 5. 2025
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	Do 11. 8. 2025

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.

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 koordinačnímu 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 hlubokomrazicím 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 identifikaci a k otestování 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.	<u>C. dubliniensis (CADU)</u> Amfotericin B (AMB) - citlivý Anidulafungin (AND) - citlivý Flukonazol (FLU) - citlivý Vorikonazol (VOR) - citlivý	
2.	<u>C. albicans (CAAL)</u> Amfotericin B - citlivý Anidulafungin - citlivý Flukonazol - rezistentní Vorikonazol - citlivý nebo citlivý, zvýšená expozice ("I")	

Očekávané výsledky (mg/l)

Druh/ATM	AMB	AND	FLU	VOR
<i>C. dubliniensis</i>	0,064	0,008	0,125	0,008
<i>C. albicans</i>	0,125	0,008	16	0,25

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 správnou identifikaci je možné získat celkem 4 body a za správné hodnocení čtyř antimykotik u 2 kmenů je možno získat maximálně 8 bodů, tzn. celkově maximálně 12 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 1481

Výsledek citlivosti vorikonazolu nebyl hodnocen a nebyl zahrnut do konečného hodnocení. Proto bylo možno za správné hodnocení výsledků získat celkem maximálně 11 bodů.

Dosažené body	9	10	11
Počet laboratoří	2	9	33
Procento	4,5	20,5	75

Maximálního počtu 11 bodů dosáhlo 33 laboratoří ze 44 zúčastněných.

Aritmetický průměr byl 10,7 bodu

Směrodatná odchylka byla 0,6

Limit (t. j. průměr -2 směrodatné odchylky) byl 9,5 bodů.

Limit splnilo 42 laboratoří (95,5 %).

2 laboratoře neuspěly (4,5 %).

Tabulka č. 2: Bodové hodnocení výsledků jednotlivých laboratoří (n=44)

číslo lab.	vzorek 1 (CADU)					vzorek 2 (CAAL)					součet
	ID	AMB	AND	FLU	VOR	ID	AMB	AND	FLU	VOR	
11	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
17	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
18	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
26	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
28	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
31	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
32	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
35	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
37	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
39	2	1	1	1	1	2	1	0	1	N	10
40	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
48	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
50	2	1	0	1	1	2	1	1	1	N	10
51	2	1	1	1	1	2	1	0	1	N	10
58	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
64	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
65	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
71	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
77	2	1	0	1	1	2	1	0	1	N	9
89	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
156	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
207	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
208	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
211	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
214	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
228	2	1	0	1	1	2	1	1	1	N	10
283	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
289	2	1	1	1	1	2	1	0	1	N	10
299	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
350	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
369	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
370	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
373	2	1	0	1	1	2	1	0	1	N	9
388	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
443	2	1	0	1	1	2	1	1	1	N	10
456	2	1	1	1	1	2	1	0	1	N	10
465	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
467	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
529	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
539	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
554	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11
595	2	1	1	1	1	2	1	1	1	N	11

641	2	1	0	1	1	2	1	1	1	N	10
702	2	1	1	1	1	2	1	0	1	N	10

Plný počet bodů (11) získalo 33 laboratoří (75 %), 9 laboratoří získalo 10 bodů (20,5 %) a dvě laboratoře získaly 9 bodů (4,5 %). Izolát *C. dubliniensis* (CADU) byl citlivý ke všem testovaným antimykotikům (ATM). Kmen *C. albicans* (CAAL) byl rezistentní k flukonazolu, vykazoval variabilní citlivost k vorikonazolu (proto byl tento výsledek nakonec vyřazen z hodnocení) a ke zbylým testovaným preparátům byl citlivý.

Všechny laboratoře správně identifikovaly oba druhy kvasinek a správně odhalily rezistenci CAAL k FLU. Vorikonazol byl vzhledem k variabilním výsledkům vyřazen z hodnocení (převážná většina účastníků reportovala VOR jako rezistentní. Šest laboratoří označilo anidulafungin jako rezistentní u obou testovaných druhů a jedna jako intermediárně citlivý u *C. albicans*. V těchto případech byla použita různá diagnostika [Sensititre YeastOne (Thermo Scientific), MIC YST (Diagnostics), Etest (BioMérieux) a MIC Test Strip (MTS, Liofilchem)]. Částečně by to mohlo být vysvětleno aplikací BP EUCAST pro metody odvozené od CLSI (YO, Etest a MTS).

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

6. Závěr

EHK 1481 – Testování citlivosti na antimykotika se zúčastnilo 44 laboratoří, všechny laboratoře vrátili výsledky k hodnocení.

Uspělo 42 laboratoří, neuspěly 2 laboratoře.

Hodnocení jednoho výsledku bylo vyřazeno z hodnocení - VOR u CAAL, který pro variabilní výsledky nebyl bodován.

Pro vyzkoušení způsobilosti laboratoří v ČR provádět a interpretovat výsledky testování citlivosti kvasinek *in vitro* byly vybrány dva druhy, které na chromogenním médiu vypadají stejně *C. albicans* (CAAL) a *C. dubliniensis* (CADU), a proto může dojít k nesprávné identifikaci (zejm. záměně CAAL za CADU. Oba druhy obvykle mívají „dobrou citlivost“ a nízké hodnoty MIC. Kmen CADU představoval citlivý, divoký kmen (tzv. wild type) bez získaného mechanismu rezistence. V druhém případě se jednalo o kmen CAAL s rezistencí k flukonazolu a se zvýšenou hodnotou MIC k vorikonazolu. Kmen původně testovaný metodikou podle CLSI vyšel citlivý, avšak v naší laboratoři mikrodiluční metodikou EUCAST opakovaně vychází hodnota, která odpovídá interpretaci „I - citlivý, zvýšená expozice“. Vezmeme-li však v úvahu, že výsledky vyšetření se mohou obvykle lišit v rámci ± 2 ředění, pak je logické, že výsledky mohou přepadat také do kategorie rezistentní, jak reportovala většina laboratoří.

EUCAST hodnotí pro CADU jako citlivé hodnoty MIC $AMB \leq 1$; $AND \leq 0,03$; $FLU \leq 2$ a $VOR \leq 0,06$ mg/l. CLSI nemá stanovená interpretační kritéria.

EUCAST hodnotí pro CAAL jako citlivé hodnoty MIC $AMB \leq 1$; $AND \leq 0,016$; $FLU \leq 2$ 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.

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

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