



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/34/2021 (EHK 1225)

Průkaz DNA HSV, VZV

Praha, leden 2022

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	5
6.	Závěr	8
	Příloha 1 – přehled výsledků jednotlivých laboratoří v EHK 1225	
	Příloha 2 – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/34/2021 (EHK 1225) byl zaměřen na průkaz DNA virů Herpes simplex virus (HSV) a Varicella zoster virus (VZV).

Návrh a realizace PT#M/34/2021 (EHK 1225) byly prováděny podle standardního operačního postupu SOP M/34 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: <https://ehk.szu.cz/EHK10/> po přihlášení kódem laboratoře a heslem.

Zprávu vypracoval:

Ing. Michaela Růžková, Ph.D. a Mgr. Markéta Pumánová, NRL pro herpetické viry, SZÚ Praha

Zprávu autorizoval:

Ing. Michaela Růžková, Ph.D.

Tel. 267 082 247 (476)

Dne: 7. 1. 2022

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/34/2021

Identifikace kola/cyklu:	EHK 1225
Název:	Průkaz DNA HSV, VZV
Koordinátor:	Ing. Michaela Růžková, Ph.D.
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3
Podstata a účel PT/EHK:	Kvalitativní a kvantitativní průkaz DNA virů HSV1, HSV2 a VZV
Kritéria pro účast na PT/EHK:	Přihláška a odeslání výsledků v daném termínu Požadavky na laboratoře: zajištění laboratorních procesů podle ČSN EN ISO 15189:2013
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2
Množství připravovaného testovaného materiálu:	45 sad (1 sada á 7 vzorků)
Označení vzorkovnic:	EHK 1225, PT # M/34, č. 1-7, 2. 11. 2021
Zabezpečení kvality vzorku:	Homogenita je zajištěna promícháním vzorků před zahájením alikvotování do lyofilizačních lahviček a rovněž v jejím průběhu. Stabilita je zajištěna manipulací za sterilních podmínek a vhodným skladováním. Dlouhodobá stabilita vzorků je zajištěna jejich lyofilizací.
Test homogenity a stability:	1. Test homogenity a stability před distribucí účastníkům 2. Test homogenity a stability před uzávěrkou série Jedná se vždy o 3 náhodně vybrané vzorky z každé varianty.
Podmínky distribuce a uchování vzorků:	Distribuce v předepsaném obalu. Do rozpuštění uchovávat lyofilizované vzorky při teplotě 2-8°C. Rozpuštění lyofilizátů provádět v den vyšetření (vzorky rozpustit v 1ml sterilní PCR vody nebo vody pro tkáňové kultury). Zbytek vzorků po otestování uchovávejte při teplotě vhodné pro dlouhodobé skladování tohoto materiálu (-18°C a nižší).
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe, lidský faktor
Počet účastníků:	31
Termín distribuce:	2.11. 2021
Způsob distribuce:	Přepravní službou (zajišťuje Koordinační pracoviště ESPT2)
Předání výsledků:	V elektronické podobě za použití aplikace EHK10
Způsob vyhodnocení výsledků:	Kvalitativní vyhodnocení: 2 body/1 vzorek (za identifikaci viru nebo správné určení negativy) Celkově mohou laboratoře získat 14 bodů (za 7 vzorků v sadě). Zvlášť se hodnotí detekce HSV DNA a detekce VZV DNA. Kvantitativní vyhodnocení: 2 body/1 vzorek (hodnoty do 1 dekadického logaritmu od vztažné hodnoty) 1 bod/1 vzorek (hodnoty do 2 dekadických logaritmů od vztažné hodnoty) Zvlášť se hodnotí detekce HSV DNA a detekce VZV DNA.
Určení maximální směrodatné odchylky:	Neprovádí se
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Kvalitativní hodnocení: Výsledky získané v NRL. Kvantitativní hodnocení: Medián hodnot získaný od účastníků a NRL (po vyloučení nejvyšší a nejnižší odlehlé hodnoty)
Termín uveřejnění očekávaných výsledků	8. 12. 2021
Termín uveřejnění závěrečné zprávy	Do 1. 3. 2022

2. Způsob přípravy vzorků

Výchozím materiálem pro přípravu vzorků byla tkáňová kultura lidských embryonálních fibroblastů (LEP) zainfikovaná následujícími virovými kmeny:

HSV1 – kmen NRL-HV 2007

HSV2 – kmen NRL-HV 2011

VZV – kmen OKA

Po dosažení cytopatického efektu (CPE) na tkáňové kultuře (za 2 až 9 dní) byly odebrané vzorky naředěny kultivačním médiem (RPMI + 10% FBS) a rozplněny po 1 ml do lyofilizačních lahvíček. Stabilita vzorků byla zajištěna lyofilizací. Sestava vzorků byla lyofilizována na pracovišti Národní referenční laboratoře - Česká národní sbírka typových kultur (CNCTC). Každý virus byl lyofilizován samostatně (jednotlivé vzorky obsahovaly vždy pouze jeden virus).

Přítomnost viru ve vzorku a jeho kvantita byla ověřena metodou PCR dle SOP-NRL/HV-06 a SOP-NRL/HV-07. Test homogenity a stability byl proveden před distribucí účastníkům a před uzávěrkou série (3 náhodně vybrané vzorky od každého vzorku panelu EHK).

Po kontrole lyofilizátů byly lahvičky opatřeny pertlí pomocí pertlovacích kleští a označeny nálepkou pro identifikaci lyofilizátu (pořadové číslo 1-7, číslo EHK a datum rozeslání). Takto označené a zapertlované lahvičky byly skladovány při teplotě 2 – 8 °C.

Výchozí materiál spadá dle klasifikace IATA, týkající se nebezpečného zboží, do kategorie Infekční materiál 6.2 kategorie B. Infekční látky zařazené v kategorii B jsou pro přepravu označeny UN kódem - UN3373 Biologická látka, kategorie B.

Přeprava vzorků je zajišťována přepravcem se službou „Přeprava biologického materiálu“.

3. Charakteristika materiálu

Zásilka obsahovala 7 lyofilizovaných vzorků k určení virového agens (HSV1, HSV2 nebo VZV) metodou PCR.

Jeden vzorek obsahoval vždy jen 1 kmen viru:

Vzorek 1 - obsahoval virus HSV1, laboratorní kmen NRL/HV 2007; ředěný 1:1000

Vzorek 2 - obsahoval virus HSV2, laboratorní kmen NRL/HV 2011; ředěný 1:100

Vzorek 3 - obsahoval virus VZV, laboratorní kmen OKA; ředěný 1:10

Vzorek 4 - obsahoval virus HSV1, laboratorní kmen NRL/HV 2007; ředěný 1:10

Vzorek 5 - obsahoval virus HSV2, laboratorní kmen NRL/HV 2011; ředěný 1:10

Vzorek 6 - obsahoval sterilní tkáňovou kulturu LEP; ředěný 1:2

Vzorek 7 - obsahoval virus VZV, laboratorní kmen OKA; ředěný 1:100

Tabulka č.1: Panel EHK 1225

Vzorek	HSV1	HSV2	VZV
1/2021	pozitivní +	negativní	negativní
2/2021	negativní	pozitivní +	negativní
3/2021	negativní	negativní	pozitivní ++
4/2021	pozitivní ++	negativní	negativní
5/2021	negativní	pozitivní ++	negativní
6/2021	negativní	negativní	negativní
7/2021	negativní	negativní	pozitivní +

4. Způsob hodnocení

U každé laboratoře je vypočtena procentuální úspěšnost, definovaná jako podíl maximálního dosažitelného počtu bodů a skutečně dosaženého počtu bodů (maximální dosažitelný počet bodů při 7 vzorcích v sadě je 14 bodů). Následně jsou tyto hodnoty porovnány a je stanovena hranice úspěšnosti v procentuálním vyjádření. Hranice úspěšnosti pro sérii EHK 1225 byla stanovena na 80%.

Zvlášť se hodnotí detekce HSV DNA a detekce VZV DNA.

Kvalitativní hodnocení

Vztažnou hodnotou je výsledek získaný v NRL pro herpetické viry.

Shodný výsledek každého vzorku je hodnocen 2 body.

Negativní výsledek u vzorku obsahujícího méně než 1000 kopií/ml je hodnocen 1 bodem.

Bez bodového ohodnocení jsou výsledky, které se s očekávaným výsledkem neshodují.

Kvantitativní hodnocení

Výsledky jsou porovnávány s mediánem hodnot získaných od všech účastníků včetně výsledků NRL pro herpetické viry (po vyloučení nejvyšší a nejnižší odlehlé hodnoty).

Odchyłka do 1 dekadického logaritmu od vztažné hodnoty je hodnocena 2 body.

Odchyłka do 2 dekadických logaritmů od vztažné hodnoty je hodnocena 1 bodem.

Odchyłka větší než 2 dekadické logaritmy je za 0 bodů.

Do hodnocení je zahrnuto všech 7 vzorků v sadě.

5. Vyhodnocení

5.1. Průkaz HSV DNA

Tabulka č.2: Správné výsledky HSV DNA

Vzorek	HSV Kvalitativní výsledek	HSV Kvantitativní výsledek ¹ (kopie/ml)	HSV Kvantitativní rozsah pro 2 body (kopie/ml)
1/2021	HSV1	6 355	635 – 63 550
2/2021	HSV2	28 000	2 800 – 280 000
3/2021	negativní (VZV)	0	0
4/2021	HSV1	2 905 398	290 539 – 29 053 980
5/2021	HSV2	689 917	68 991 – 6 899 170
6/2021	negativní	0	0
7/2021	negativní (VZV)	0	0

¹ Medián hodnot získaný od účastníků a NRL (po vyloučení nejvyšší a nejnižší odlehlé hodnoty)

5.1.1. Kvalitativní průkaz HSV DNA

Kvalitativního hodnocení HSV DNA se zúčastnilo 30 laboratoří z 31 přihlášených laboratoří (1 laboratoř nedodala výsledky). Souhrnné výsledky laboratoří a typy chyb jsou shrnuty v Tabulce 3. Používané soupravy pro diagnostiku HSV DNA jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka č.3: Souhrnné výsledky laboratoří – kvalitativní průkaz HSV DNA

Vzorek	Výsledek EHK	Počet správných výsledků/celkem	Úspěšnost	Typ chyby
1/2021	HSV1	30/30	100 %	
2/2021	HSV2	30/30	100 %	
3/2021	negativní (VZV)	30/30	100 %	
4/2021	HSV1	30/30	100 %	
5/2021	HSV2	30/30	100 %	
6/2021	negativní	29/30	96,6 %	falešná pozitivita (HSV1)
7/2021	negativní (VZV)	30/30	100 %	

Celkem bylo možné získat za kvalitativní diagnostiku HSV DNA 14 bodů, kterých dosáhlo 29 laboratoří z 30 (tj. 96,6 %). Jedna laboratoř vydala falešnou pozitivitu (HSV1) u negativního vzorku 6/2021.

5.1.2. Kvantitativní průkaz HSV DNA

Kvantitativního hodnocení HSV DNA se zúčastnilo 9 laboratoří. Výsledky kvantitativní diagnostiky HSV DNA jsou shrnuty v Tabulce 4.

Tabulka č.4: Souhrnné výsledky laboratoří – kvantitativní průkaz HSV DNA

Vzorek	Virus	Medián (kopie/ml)	2 body ¹	1 bod ²	0 bodů ³
1/2021	HSV1	6 355	9/9	0/9	0/9
2/2021	HSV2	28 000	9/9	0/9	0/9
3/2021	negativní (VZV)	0	9/9	0/9	0/9
4/2021	HSV1	2 905 398	9/9	0/9	0/9
5/2021	HSV2	689 917	9/9	0/9	0/9
6/2021	negativní	0	9/9	0/9	0/9
7/2021	negativní (VZV)	0	9/9	0/9	0/9

¹ 2 body – při odchylce výsledku laboratoře do 1 dekadického logaritmu od vztažné hodnoty

² 1 bod – při odchylce výsledku laboratoře do 2 dekadických logaritmů od vztažné hodnoty

³ 0 bodů – při odchylce výsledku laboratoře větší než 2 dekadické logaritmy

Celkem bylo možné získat za kvantitativní diagnostiku HSV DNA 14 bodů, kterých dosáhlo všech 9 laboratoří (tj. 100 %).

Používané soupravy pro diagnostiku HSV DNA jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka č.5: Použité soupravy pro průkaz HSV DNA

Výrobce	Souprava	Počet uživatelů
BioMérieux	Argene HSV1 HSV2 VZV R-gene	1 (3 %)
Clonit	Quanty HSV 1-2	1 (3 %)
Elisabeth Pharmacon	EliGene HSV1/HSV2 UNI	1 (3 %)
ELITechGroup	Meningitis Viral 1 ELITe MGB Panel	1 (3 %)
GeneProof	Herpes Simplex Virus (HSV-1/2) PCR Kit	10 (30 %)
GeneProof	HSV-1 PCR Kit, HSV-2 PCR Kit	2 (7 %)
In house	In house	1 (3 %)
Qiagen	Artus HSV-1/2 LC PCR Kit	1 (3 %)
Sacace Biotechnologies	HSV 1/2 Typing Real-TM	8 (27 %)
Seegene	Allplex Genital ulcer Assay	2 (7 %)
Seegene	Allplex Meningitis-V1 Assay	1 (3 %)
neuveđen	neuveđena	1 (3 %)

Celkem: 30

5.2. Průkaz VZV DNA

Tabulka č.6: Správné výsledky VZV DNA

Vzorek	VZV Kvalitativní výsledek	VZV Kvantitativní výsledek ¹ (kopie/ml)	VZV Kvantitativní rozsah pro 2 body (kopie/ml)
1/2021	negativní (HSV1)	0	0
2/2021	negativní (HSV2)	0	0
3/2021	VZV	650 000	65 000 – 6 500 000
4/2021	negativní (HSV1)	0	0
5/2021	negativní (HSV2)	0	0
6/2021	negativní	0	0
7/2021	VZV	43 000	4 300 – 430 000

¹ Medián hodnot získaný od účastníků a NRL (po vyloučení nejvyšší a nejnižší odlehlé hodnoty)

5.2.1. Kvalitativní průkaz VZV DNA

Kvalitativního hodnocení VZV DNA se zúčastnilo 30 laboratoří z 31 přihlášených laboratoří (1 laboratoř nedodala výsledky). Souhrnné výsledky laboratoří jsou shrnuty v Tabulce 7. Používané soupravy pro diagnostiku VZV DNA jsou uvedeny v Tabulce 9.

Tabulka č.7: Souhrnné výsledky laboratoří – kvalitativní průkaz VZV DNA

Vzorek	Výsledek EHK	Počet správných výsledků/celkem	Úspěšnost
1/2021	negativní (HSV1)	30/30	100 %
2/2021	negativní (HSV2)	30/30	100 %
3/2021	VZV	30/30	100 %
4/2021	negativní (HSV1)	30/30	100 %
5/2021	negativní (HSV2)	30/30	100 %
6/2021	negativní	30/30	100 %
7/2021	VZV	30/30	100 %

Celkem bylo možné získat za kvalitativní diagnostiku VZV DNA 14 bodů, kterých dosáhlo všech 30 laboratoří (tj. 100 %).

5.2.2. Kvantitativní průkaz VZV DNA

Kvantitativního hodnocení VZV DNA se zúčastnilo 8 laboratoří. Výsledky kvantitativní diagnostiky VZV DNA jsou shrnuty v Tabulce 8. Používané soupravy pro diagnostiku VZV DNA jsou uvedeny v Tabulce 9.

Tabulka č.8: Souhrnné výsledky laboratoří – kvantitativní průkaz VZV DNA

Vzorek	Virus	Medián (kopie/ml)	2 body ¹	1 bod ²	0 bodů ³
1/2021	negativní (HSV1)	0	8/8	0/8	0/8
2/2021	negativní (HSV2)	0	8/8	0/8	0/8
3/2021	VZV	650 000	8/8	0/8	0/8
4/2021	negativní (HSV1)	0	8/8	0/8	0/8
5/2021	negativní (HSV2)	0	8/8	0/8	0/8
6/2021	negativní	0	8/8	0/8	0/8
7/2021	VZV	43 000	8/8	0/8	0/8

¹ 2 body – při odchylce výsledku laboratoře do 1 dekadického logaritmu od vztažné hodnoty

² 1 bod – při odchylce výsledku laboratoře do 2 dekadických logaritmů od vztažné hodnoty

³ 0 bodů – při odchylce výsledku laboratoře větší než 2 dekadické logaritmy

Celkem bylo možné získat za kvantitativní diagnostiku VZV DNA 14 bodů, kterých dosáhlo všech 8 laboratoří (tj. 100 %).

Tabulka č.9: Použité soupravy pro průkaz VZV DNA

Výrobce	Souprava	Počet uživatelů
BioMérieux	Argene HSV1 HSV2 VZV R-gene	1 (3 %)
Clonit	Quanty VZV	1 (3 %)
Elisabeth Pharmacon	EliGene VZV UNI	1 (3 %)
ELITechGroup	Meningitis Viral 1 ELITe MGB Panel	1 (3 %)
GeneProof	Varicella-Zoster Virus (VZV) PCR Kit	13 (43 %)
In house	In house	1 (3 %)
Qiagen	Artus VZV LC PCR Kit	1 (3 %)
Sacace Biotechnologies	VZV Real-TM	7 (23 %)
Seegene	Allplex Genital ulcer Assay	2 (7 %)
Seegene	Allplex Meningitis-V1 Assay	1 (3 %)
neuveđen	neuveđena	1 (3 %)

Celkem: 30

6. Závěr

Do EHK 1225 - Průkaz DNA HSV, VZV se přihlásilo 31 laboratoří, jedna laboratoř nedodala výsledky zpět k vyhodnocení. Uspěly všechny laboratoře, které dodaly výsledky, z toho jedna s bodovou ztrátou.

Průkaz HSV DNA

Kvalitativního průkazu HSV DNA se zúčastnilo 30 laboratoří, maximálního bodového zisku 14 bodů dosáhlo 29 laboratoří (96,6 %). Jedna laboratoř vydala falešnou pozitivitu (HSV1) u negativního vzorku 6/2021.

Kvantitativního hodnocení HSV DNA se zúčastnilo 9 laboratoří, maximálního bodového zisku 14 bodů dosáhly všechny laboratoře (100 %).

Inhibice nebyla zaznamenána u žádného vzorku.

Průkaz VZV DNA

Kvalitativní průkaz VZV DNA (30 laboratoří) ani kvantitativní průkaz VZV DNA (8 laboratoří) nečinil účastníkům EHK 1225 potíže a všechny získaly maximální počet bodů (tj. 14). Inhibice nebyla zaznamenána u žádného vzorku.

Přehled výsledků jednotlivých laboratoří a celkové bodové hodnocení v EHK 1225 lze nalézt v Příloze 1.

V případě reklamací vyhodnocení série, prosím, postupujte dle reklamačního řádu.

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY