



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/8/2023 (EHK 1331)

Sérologie leptospirózy

Praha, květen 2023

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	6
Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/8/2023 je zaměřen na sérologii leptospirózy. Návrh a realizace PT#M/8/2023 byly prováděny podle standardního operačního postupu koordinátora programu EHK 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 na webových stránkách SZÚ v odkazu: <http://ehk.szu.cz/EHK10/> po přihlášení kódem laboratoře a heslem.

Zprávu vypracoval:

Mgr. Eliška Zadrobílková, Ph.D., NRL pro leptospiry, SZÚ Praha

Zprávu autorizoval:

RNDr. Petr Kodym, CSc.

Tel: 267 082 105

Dne: 16. 5. 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/8/2023

Identifikace kola/cyklu:	EHK 1331
Název:	Sérologie leptospirózy
Koordinátor:	RNDr. Petr Kodym, CSc., Šrobárova 49/48, 100 00 Praha 10
Podstata a účel PT:	Identifikace původce a stanovení titerů specifických protilátek
Kritéria pro účast na PT:	Znalost a technické vybavení pro vyšetření protilátek metodou MAT
Charakteristika materiálu:	Simulace klinického materiálu: směsné vzorky lidských sér, séra imunizovaných králíků
Hodnocené ukazatele:	Pozitivita, negativita vzorku
Způsob přípravy:	Séra imunizovaných králíků a pacientská séra, byla skladována v mrazicím boxu v NRL pro leptospiry při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byly vzorky rozmrazeny a slity tak, aby byly smíšeny vždy vzorky, které mají stejnou kategorii kvalitativního a semikvantitativního obsahu stanovovaných markerů. Objem každého vzorku EHK byl směsí sér příslušné kategorie upraven na 6 ml. Vzorky byly stabilizovány přidáním 0,06 ml 0,1% roztoku azidu sodného na vzorek (finální koncentrace: 0,001%). Každý vzorek byl rozplněn do lahviček – objem 300 μl (18 od každého vzorku). Vzorky byly označeny a předány k zabalení a rozeslání. Skladovány byly v chladničce při $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$.
Počet účastníků	13
Termín distribuce:	21. 2. 2023
Informace účastníkům	Informace pro účastníky zasílané spolu se vzorky
Termín pro odeslání výsledků účastníky (stop termín):	14. 3. 2023
Označení vzorkovnic:	EHK 1331, PT # M/8, č. 1-5, 21. 2. 2023
Zabezpečení jakosti vzorku včetně testu homogenity a stability:	Garance adekvátního obsahu specifických protilátek: Příprava podle standardních metod na akreditovaném pracovišti, vyšetření vzorků na testované markery akreditovanými metodami dle schválených SOP. Zabezpečení homogenity: Homogenita je zajištěna promícháním vzorků před zahájením alikvotování do vzorkovnic a je průběžně kontrolována. Stabilita vzorku: průběžná kontrola, adekvátní skladování, stabilizace 0,001% azidu sodného Test homogenity a stability: 22.2., 28.2., 8.3. 2023
Možné zdroje analytických chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe, lidský faktor.
Způsob vyhodnocení výsledků:	Kvalitativní a semikvantitativní výsledky a jejich interpretace jsou ohodnoceny 0-2 body/vzorek. Laboratoře mohou získat maximálně 10 bodů (za správné určení všech 5 kontrolních vzorků). 2 body za správný výsledek kvalitativní i kvantitativní, 1 bod za správné určení sérovaru, ale odlišně udanou titraci (v subjektivní toleranci +/- 2 titry oproti NRL), 0 bodů za celkově chybný výsledek jednoho vzorku.

Určení přijaté vztažné hodnoty:	Vztažnou hodnotou jsou výsledky NRL, které byly získané trojitým opakovaným testováním vzorků.
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. 3. 2023
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	Do 6. 6. 2023

2. Způsob přípravy vzorků

2.1 Postup přípravy výchozího materiálu

Ze zamražených patientských sér nebo imunizovaných králíčích sér vybereme libovolných pět vzorků. Po rozmražení vzorky podle potřeby slijeme nebo doplníme fyziologickým roztokem tak, aby objem materiálu odpovídal očekávanému množství účastníků. Takto připravený výchozí materiál je testován na přítomnost protilátek uvedených cílových markerů v Národní referenční laboratoři pro leptospiry SZÚ pomocí Mikroskopického aglutinačního testu (MAT) pro průkaz antileptospirových protilátek. Pokud charakter materiálu opakovaně kvantitativně i kvalitativně souhlasí se stavem před zamražením, vybrané vzorky jsou následně použity pro EHK.

2.2 Zabezpečení kvality výchozího materiálu, homogenita a stabilita

Kvalita výchozího materiálu je zabezpečena standardní metodikou výroby hyperimunních sér (Šebek Z. Standardní metoda laboratorní diagnostiky leptospirózy. Praha: AHEM. IHE, 1979.) a mikroskopickou kontrolou kvantitativního výsledku pomocí Mikroskopického aglutinačního testu (MAT) pro průkaz antileptospirových protilátek.

Homogenita je zajištěna důkladným promícháním vzorků před zahájením alikvotování do zkumavek.

Pro zajištění stability je do výchozího materiálu přidáván roztok azidu sodného s antibakteriálními účinky v koncentraci 0,001%. Do dne distribuce jsou takto připravené vzorky skladované v lednici při teplotě 2 – 8 °C.

Testy homogenity a stability se provádí a) v den před distribucí vzorků, b) v den zahájení rozborů všemi účastníky, c) v době stop termínu.

2.3 Rozplnění výchozího materiálu

Výchozí materiál je rozplněn do jednotlivých zkumavek o objemu minimálně 0,3 ml. Jednotlivé vzorky se uloží do umělohmotných krabiček označených podle počtu zasílaných vzorků 1 – 5, do předání koordináčnímu pracovišti ESPT2 se vzorky se skladují při teplotě 2 – 8° C.

3. Charakteristika materiálu

Simulace klinického materiálu: směsné vzorky lidských sér a hyperimunní králičí séra, odpovídající svým kvalitativním i semikvantitativním obsahem antileptospirových protilátek skutečným vzorkům zasílaným k diagnostice leptospirózy. Výsledky vyšetření vzorků v NRL LEPT shrnuje tabulka 1.

Tab. 1: Výsledky vyšetření vzorků EHK 1331 v NRL LEP

Kategorie vzorku	MAT- Ag Pozit +	Anti-LEPTO titr Ig
A	negativní	-
B	Leptospira sorex	1:6400
C	negativní	-
D	Leptospira tarassovi	1:1600
E	negativní	-

4. Způsob hodnocení

V zaslaných vzorcích séra měla každá diagnostická laboratoř zjistit sérologickou metodou MAT (mikroskopický aglutinační test) kvalitativně a semikvantitativně přítomnost (nebo nepřítomnost) antileptospirových protilátek. MAT je (nejen) u nás „zlatým standardem“ sérologické diagnostiky leptospiróz. Tento vysoce specifický a senzitivní test byl vyhlášen hlavním hygienikem MZ závazným standardním diagnostickým postupem. Jako antigen používá živé leptospiry, které si kultivuje v požadované standardní škále každá diagnostická laboratoř a které jsou v případě potřeby doplňovány z banky referenčních kmenů v NRL LEP CEM SZÚ.

Ve zkušebních vzorcích byly přítomny protilátky proti leptospirám, které se mohou vyskytovat na území ČR. Jednalo se o sérotypy L. sorex a L. tarassovi (viz tabulka). Tři zkušební vzorky byly negativní.

Vyhodnocení bylo provedeno v NRL pro leptospiry CEM SZÚ vzorek po vzorku podle níže uvedených kritérií:

- **Správnost kvalitativních výsledků stanovení antileptospirových protilátek:** zjištění, zda byly nebo nebyly ve vzorku přítomny protilátky proti leptospirám a v případě séropozitivního vzorku i určení kauzálního sérotypu leptospir.
- **Správnost (semi)kvantitativních výsledků** – titru protilátek v subjektivní toleranci +/- 2 titry oproti NRL.

Plný počet za jeden vzorek, **2 body**, byly udělovány za zcela správný kvalitativní i (semi)kvantitativní výsledek. **1 bod** bylo možné získat za správný kvalitativní výsledek, ale s nesprávně udaným titrem mimo interval tolerance. **0 bodů** pak NRL udělila za chybný jak kvalitativní tak kvantitativní výsledek vzorku. **Nejvyšší možné hodnocení** za celou sérii 5 vzorků

bylo **10 bodů**. Hranice úspěšnosti byla vypočtena z aritmetického průměru mínus dvakrát směrodatná odchylka.

5. Vyhodnocení

Vzorek A určily správně jako negativní všechny laboratoře s výjimkou jedné. U **vzorku B** zaznamenalo správný výsledek – reakci na *Leptospira sores* (včetně titru v tolerovaném rozsahu) – 8 laboratoří. Dvě laboratoře uvedly jiný titr, jedna laboratoř uvedla nesprávný sérotyp a jedna laboratoř označila výsledek chybně jako negativní. Většina laboratoří také správně zmínila přítomnost koaglutinací s *L. icterohaemorrhagiae* případně dalšími sérotypy. U **vzorku D** uvedlo správně reakci se sérotypem *L. tarassovi* a s adekvátním titrem 7 laboratoří, 2 laboratoře uvedly správný sérotyp ale chybný titr a 3 laboratoře označily vzorek chybně jako negativní. **Vzorky C a E** označily všechny laboratoře správně jako negativní.

Maximálního počtu 10 bodů dosáhly v sérii EHK 1331 čtyři ze 12 hodnocených laboratoří. Tři laboratoře dosáhly výsledku 9 bodů, kdy dvě laboratoře chybovaly v titru u vzorku D a jedna laboratoř uvedla chybně titr u vzorku B. Celkem 8 bodů získaly tři laboratoře – jedna označila vzorek B chybně jako negativní a dvě laboratoře určily vzorek D chybně jako negativní. Dvě laboratoře dosáhly 7 bodů (jedna laboratoř u vzorku B uvedla chybně titr a vzorek D označila nesprávně jako negativní a druhá laboratoř označila vzorek A nesprávně jako pozitivní a u vzorku B uvedla nesprávný sérotyp).

Tab. 2: Bodové hodnocení laboratoří v EHK 1331

Dosažené body	10	9	8	7
Počet laboratoří	4	3	3	2

Závěrečné hodnocení této kontrolní a edukativní série EHK 1331 laboratoří diagnostikujících leptospirózu v ČR je následující. **Hranice úspěšnosti** vypočtena z aritmetického průměru 8,8 mínus dvakrát směrodatné odchylky 1,1 je **6,6**. V této sérii tak dosáhlo akceptovatelných výsledků 12 diagnostikujících laboratoří, které by měly obdržet certifikát od ESPT.

6. Závěr

EHK 1331 – Sérologie leptospirózy se zúčastnilo 13 laboratoří, výsledky nedodala 1 laboratoř. Uspělo 12 laboratoří.

Obecně můžeme konstatovat, že rutinní diagnostika leptospirózy v ČR je i nadále hodnocena na poměrně vysoké úrovni úspěšnosti. Standardní metoda (MAT) diagnostiky leptospirózy může být v indikovaných případech vhodně doplňována molekulárními metodami, které potvrdí akutní fázi čerstvé infekce u suspektního pacienta. Metody ELISA dlouhodobě nevykazují uspokojivé výsledky v diagnostice leptospiróz.

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