



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/35/2023 (EHK 1336)

Identifikace enterovirů

Praha, duben 2023

Obsah

1.	Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing)	3
2.	Způsob přípravy vzorků	4-5
3.	Charakteristika materiálu	5
4.	Způsob hodnocení	5-6
5.	Vyhodnocení	6-8
6.	Závěr	8
	Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/35/2023 (EHK 1336) byl zaměřen na identifikaci enterovirů. Návrh a realizace PT#M/35/2023 (EHK 1336) 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 ve webové aplikaci SZÚ v odkazu: <http://ehk.szu.cz/EHK10/> po přihlášení kódem laboratoře a heslem.

Zprávu vypracoval:

MUDr. Petra Rainetová, NRL pro enteroviry, SZÚ Praha

Zprávu autorizoval:

MUDr. Petra Rainetová

Tel: 267 082 221 (333)

Dne 14. 4. 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/35/2023

Identifikace cyklu:	EHK 1336
Název:	Identifikace enterovirů
Koordinátor:	MUDr. Petra Rainetová
Podstata a účel PT/EHK:	Schopnost účastníků identifikovat přítomnost enterovirů v simulovaném klinickém materiálu
Kritéria pro účast na PT/EHK:	Požadavky na laboratoře – zajištění správné laboratorní praxe dle ČSN EN ISO 15189:2013
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3 závěrečné zprávy
Hodnocené ukazatele	Pozitivita, negativita vzorku
Způsob přípravy	Viz kapitola 2 závěrečné zprávy
Počet účastníků:	14
Termín distribuce vzorků:	14. 3. 2023
Informace účastníkům:	Viz Informace pro účastníky zaslané spolu se vzorky
Termín pro odeslání výsledků účastníky:	4. 4. 2023
Označení vzorkovnic:	EHK 1336, PT # M/35, č. 1-3, 14. 3. 2023
Zabezpečení kvality vzorku:	Zabezpečení homogenity: Homogenita je zajištěna promícháním vzorků před zahájením alikvotování do vzorkovnic. Zabezpečení stability vzorků: Stabilita je zajištěna manipulacemi za sterilních podmínek, vhodným skladováním, rychlým transportem ke zpracování a určením termínu, do kterého musí být odeslán výsledek zpět k vyhodnocení. Dlouhodobá stabilita vzorků je zajištěna zmražením při -70°C .
Test homogenity a stability:	Kvalita, homogenita a stabilita je posuzována na základě opakovaného testování všech tří vzorků pomocí virus neutralizačního testu (VNT) a RT-qPCR: po naředění, před distribucí a v termínu blízkém dni odeslání výsledků zpět k vyhodnocení (viz protokol o přípravě vzorků pro PT#M/35/2022 EHK-1261). Na každé testování se použije nový vzorek, průkazem homogenity a stability vzorků je dosažení totožných výsledků v čase. Vzorky jsou skladovány při teplotě -70°C .
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe, lidský faktor
Způsob hodnocení výsledků:	Viz kapitola 4 závěrečné zprávy
Určení přijaté vztažené hodnoty:	Výsledky NRL, získané trojitým opakovaným testováním vzorků
Určení maximální směrodatné odchylky:	Aritmetický průměr všech hodnocených laboratoří minus 2 směrodatné odchylky
Termín uveřejnění očekávaných výsledků:	14. 4. 2023
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	do 27. 6. 2023

2. Způsob přípravy vzorků

2.1 Postup přípravy výchozího materiálu

Ze sbírky vybereme libovolné dva kmeny pomnožené na tkáňových kulturách RD. Třetím vzorkem je médium.

Tekutinu z označených zkumavek po rozmrazení testujeme pomocí metody PCR a titrací. Pokud charakter materiálu souhlasí se stavem, při kterém byl uložen do sbírky kmenů, tak kmeny virů pomnožíme.

Množení virů se provádí v tkáňových kultivačních lahvích. Po infekci jsou tkáňové kultury inkubovány v termostatu. V průběhu kultivace je mikroskopicky ověřen růst virů na tkáňových kulturách podle výskytu cytopatického projevu. Po ukončení

inkubace se kultivační lahve třikrát zmrazí při teplotě $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ a rozmrazí do tekutého stavu, aby se z buněk uvolnil pomnožený virus.

Objem materiálu odpovídá očekávanému množství účastníků.

Přítomnost viru v tkáňové kultuře po pomnožení do potřebného objemu se prokazuje opět pomocí metody PCR a titrací.

V případě vysoké koncentrace virového antigenu v připravovaném vzorku je možné jeho doředění kultivačním médiem tak, aby virová nálož ve vzorku odpovídala virové náloži běžného klinického materiálu.

2.2 Zabezpečení kvality výchozího materiálu, homogenita a stabilita

Zabezpečení kvality: Připravený výchozí materiál je množen a následně testován na přítomnost virové nukleové kyseliny enterovirů v akreditované národní referenční laboratoři pro enteroviry pomocí metody PCR a titrací.

Kultivační tkáňová média obsahují antibiotika pro zábranu bakteriální kontaminace. Čistota neinfikované tkáňové kultury i tkáňové kultury s pomnoženým virem je ověřena zkouškou sterility v hovězím bujónu.

Zabezpečení homogenity: Homogenita je zajištěna promícháním vzorků před zahájením alikvotování do lahvíček. Rozplněné vzorky jsou před expedicí skladovány při mrazničkové teplotě (-20°C). V den distribuce vzorků jsou testovány libovolné tři vzorky třikrát na přítomnost virové nukleové kyseliny enterovirů.

Zabezpečení stability vzorků: Stabilita je zajištěna manipulacemi za sterilních podmínek, vhodným skladováním a testováním libovolných tří vzorků třikrát na přítomnost virové nukleové kyseliny enterovirů po skončení příslušného kola.

2.3 Rozplnění výchozího materiálu

Vhodně naředěné vzorky jsou postupně rozplněny po 1,5 ml.

Jednotlivé vzorky se uloží do umělohmotných krabiček označených podle počtu zasílaných vzorků 1 – 3, do předání koordináčnímu pracovišti ESPT2 se vzorky se skladují při teplotě – 20° C.

3. Charakteristika materiálu

Výchozím materiálem je simulovaný klinický materiál, což jsou virové kmeny enterovirů E30 zaslané z RRL WHO Helsinky.

Pro přípravu vzorků jsou použity tkáňové kultury infikované identifikovanými virovými kmeny E30 zaslanými z RRL WHO v Helsinkách, které jsou rozplněny do zkumavek po 1,5 ml a uloženy v mrazícím pultu při teplotě - 65° C a nižší.

Vzorek 1 pozitivní (E30)

Vzorek 2 negativní

Vzorek 3 pozitivní (E30)

4. Způsob hodnocení

Výsledky se zadávají elektronicky do webového formuláře, přístup do formuláře se uzavře v termínu ukončení cyklu. Výstupy z laboratoří se očekávají v podobě pozitivní či negativní výsledku. Hodnocení výsledků účastníků elektronicky zadaných probíhá za použití aplikace EHK2.

Bodové hodnocení účastníků vychází ze vztažné hodnoty, kterou tvoří očekávané výsledky získané opakovaným testováním vzorků v NRL. Dvěma body je hodnocena shoda s očekávaným výsledkem a bez bodového ohodnocení jsou výsledky, které se s očekávaným výsledkem neshodují.

Metodou pro testování vzorků je určena PCR za použití správné laboratorní praxe.

Za identifikaci přítomnosti/nepřítomnosti virového agens ve 3 vzorcích mohou laboratoře získat maximálně 6 bodů. Laboratoř úspěšně absolvuje kolo EHK, pokud dosáhne bodového limitu, který se vypočítává podle vzorce (Limit = aritmetický průměr výsledků všech laboratoří minus dvě směrodatné odchylky $L = P - 2 * s$

$$P = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

kde je aritmetický průměr dosaženého bodového hodnocení x všech n zúčastněných laboratoří

$$s = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - P)^2}$$

je směrodatná odchylka vypočítaná jako druhá odmocnina rozptylu hodnot bodového hodnocení x jednotlivých laboratoří). Výpočet provede po zadání správných výsledků aplikace EHK2. 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.

Způsob hodnocení v případě nižšího počtu účastníků, než je limit pro statistické vyhodnocení (tj. pro případ, že by se zkoušky účastnilo méně než 10 laboratoří), nelze použít statistické hodnocení

pro výpočet bodového limitu. V tomto případě se použije limit odpovídající 80 % bodové úspěšnosti.

V případě hrubé chyby (která by v praxi mohla vést k závažnému poškození zdraví nebo ohrožení života pacienta), lze vyhodnotit výsledek účastníka celkově jako neúspěšný i při dosažení dostatečného počtu bodů.

Pokud se v hodnocené skupině vyskytne pracoviště s extrémně nízkým bodovým ziskem (<50% maximálního bodového zisku), je vyloučeno z výpočtu limitu, aby nedošlo k ovlivnění celkového hodnocení série EHK. Takové pracoviště je automaticky hodnoceno jako neúspěšné.

5. Vyhodnocení

Hodnoceno bylo 14 laboratoří.

Každý vzorek byl hodnocen v rozmezí 0 – 2 body, maximální počet bodů byl 6. 13 laboratoří získalo maximální počet bodů. 1 laboratoř získala 4 body.

Očekávaný výsledek a souhrn zaslaných výsledků

vzorek	virové agens	shoda	neshoda*)	nevyšetřeno
1	Enterovirus (E30)	14	0	0
2	Negativní	13	1	0
3	Enterovirus (E30)	14	0	0

Bodové hodnocení jednotlivých pracovišť

Kód laboratoře	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Dosažený počet bodů/max. bodů
20	2	2	2	6 / 6
28	2	2	2	6 / 6
34	2	2	2	6 / 6
37	2	0	2	4 / 6
51	2	2	2	6 / 6
65	2	2	2	6 / 6
70	2	2	2	6 / 6
115	2	2	2	6 / 6
208	2	2	2	6 / 6
211	2	2	2	6 / 6
333	2	2	2	6 / 6
344	2	2	2	6 / 6
369	2	2	2	6 / 6
595	2	2	2	6 / 6
Očekávaný výsledek	Enterovirus (E30)	Negativní	Enterovirus (E30)	

Bodové hodnocení a stanovení limitu

Počet vyšetřených vzorků	3
Max. počet bodů	6
Získané body	82
Počet laboratoří	14
Aritmetický průměr	5,857
Směrodatná odchylka	0,515
2 směrodatné odchylky	1,03
Hranice úspěšnosti	4,83

Pokud v dané skupině nebyl dostatečný počet účastníků pro výpočet limitu za pomoci směrodatné odchylky, byl limit stanoven procentuálně (80 % bodového maxima).

Přehled použitých metod

Kód laboratoře	PCR			Použitá souprava
	1	2	3	
20	+	-	+	ENTEROVI RUS REAL- TM SACACE
28	+	-	+	IN HOUSE
34	+	-	+	ENTEROVI RUS REAL- TM SACACE
37	+	+	+	CEPHEID GENEXPER T ENTEROVI RUS
51	+	-	+	ENTEROVI RUS REAL- TM SACACE
65	+	-	+	CEPHEID GENEXPER T ENTEROVI RUS
70	+	-	+	BIOFIRE BIOMERIE UX PANEL
115	+	-	+	CEPHEID GENEXPER

				T ENTEROVI RUS
208	+	-	+	ENTEROVI RUS REAL- TM SACACE
211	+	-	+	ALLPLEX MENINGIT IS-V2 ASSAY SEEGENE
333	+	-	+	CEPHEID GENEXPER T ENTEROVI RUS
344	+	-	+	CEPHEID GENEXPER T ENTEROVI RUS
369	+	-	+	ELIGENE ENTEROVI RUS LC
595	+	-	+	IN HOUSE

6. Závěr

EHK 1336 – Identifikace enterovirů se zúčastnilo 14 laboratoří. Všechny laboratoře odevzdaly výsledky v řádném termínu k vyhodnocení. 13 laboratoří úspěšně absolvovalo EHK 1336. Jen 1 laboratoř (37) nedosáhla hranice úspěšnosti.

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