



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/8/2024 (EHK 1388)**

**Sérologie leptospirózy**

**Praha, květen 2024**

## 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	6

Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře

Program zkoušení způsobilosti PT#M/8/2024 je zaměřen na sérologii leptospirózy. Návrh a realizace PT#M/8/2024 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:** 31. 5. 2024

### 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/8/2024

Identifikace kola/cyklu:	<b>EHK 1388</b>
Název:	Sérologie leptospirózy
Koordinátor:	RNDr. Petr Kodym, CSc., Šrobárova 49/48, 100 00 Praha 10
Podstata a účel PT:	Identifikace původce a stanovení titrů specifických protilátek
Kritéria pro účast na PT:	Znalost a technické vybavení pro vyšetření protilátek proti leptospirám metodou MAT
Charakteristika materiálu:	Simulace klinického materiálu: směsné vzorky lidských sér, séra imunizovaných králíků
Hodnocené ukazatele:	Pozitivita, negativita vzorku
Způsob přípravy:	Příprava materiálu v protokolu o přípravě vzorků, viz SOP NRL/LEPT-01 (Mikroskopický aglutinační test (MAT) pro průkaz antileptospirových protilátek, SOP M/8 Sérologie leptospirózy
Počet účastníků:	12
Termín distribuce:	20. 2. 2024
Informace účastníkům:	Viz Informace pro účastníky zaslané spolu se vzorky
Termín odeslání výsledků účastníkům:	12. 3. 2024
Označení vzorkovnic:	EHK 1388, PT # M/8, č. 1-5, 20. 2. 2024
Zabezpečení kvality vzorku (včetně termínů testů homogenity a stability):	<p>Garance adekvátního obsahu specifických protilátek: Příprava podle standardních metod na akreditovaném pracovišti, vyšetření vzorků na testované markery akreditovanými metodami dle schválených SOP.</p> <p>Zabezpečení homogenity: Homogenita je zajištěna pečlivým promícháním vzorků před zahájením alikvotování do vzorkovnic. Následně je náhodně vybráno 3 – 5 již rozaliquotovaných vzorků, které jsou následně zkontrolovány.</p> <p>Stabilita vzorku: kontrola vzorků v den odeslání a v den stop termínu, adekvátní skladování, stabilizace 0,001% azidu sodného (viz Protokol o přípravě vzorků).</p> <p>Termíny testů homogenity: 20.2.2024 a stability: 20.2. a 12.3.2024</p>
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 dvojitým opakovaným testováním vzorků (na začátku a na konci kola cyklu).
Určení maximální 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. 2024
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	Do 4. 6. 2024

## 2. Způsob přípravy vzorků

### 2.1 Postup přípravy výchozího materiálu

Ze zamražených patientských sér nebo imunizovaných králičích 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 pečlivým promícháním vzorků před zahájením alikvotování do vzorkovnic. Následně je náhodně vybráno 3 – 5 již rozaliquotovaných vzorků, které jsou následně zkontrolovány.

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 v den odeslání vzorků a 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 koordinačnímu pracovišti ESPT2 se vzorky 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 1388 v NRL LEP**

Kategorie vzorku	MAT- Ag Pozit +	Anti-LEPTO titr Ig
A	Leptospira icterohaemorrhagiae	1:1600
B	Leptospira sejroe	1:1600
C	negativní	-
D	negativní	-
E	Leptospira bratislava	-

## 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 České národní sbírky typových kultur CEM SZÚ.

Ve zkušebních vzorcích byly přítomny protilátky proti leptospirám, které se mohou vyskytovat na území ČR. Jednalo se o sérotypy *L. icterohaemorrhagiae*, která může způsobit velmi vážný průběh onemocnění, *L. sejroae* a *L. bratislava* (viz tabulka). Dva 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 *Leptospira icterohaemorrhagiae* i s odpovídajícím titrem všechny laboratoře. U **vzorku B** zaznamenalo správný výsledek – reakci na *L. sejroae* (včetně titru v tolerovaném rozsahu) – 7 laboratoří. Dvě laboratoře označily výsledek chybně jako negativní a jedna laboratoř uvedla nesprávný sérotyp. **Vzorek C** označilo správně jako negativní 11 laboratoří, jedné laboratoři vzorek chybně reagoval se sérotypem *L. sejroae*. **Vzorek D** označily všechny laboratoře správně jako negativní. **Vzorek E** určilo správně jako *L. bratislava* (včetně titru v tolerovaném rozsahu) 11 laboratoří. Chybovala pouze jedna laboratoř, která označila vzorek jako negativní.

Maximálního počtu 10 bodů dosáhlo v sérii EHK 1388 devět ze 12 hodnocených laboratoří. Dvě laboratoře dosáhly výsledku 8 bodů, kdy u vzorku B označila jedna chybný sérotyp a jedna tento vzorek označila jako negativní. Jedna laboratoř pak získala pouze 4 body, a proto v EHK neuspěla. Vzorky B a E chybně označila jako negativní a vzorek C naopak jako pozitivní.

**Tab. 2: Bodové hodnocení laboratoří v EHK 1388**

Laboratoř	A	B	C	D	E	celkem
020	2	0	2	2	2	8
028	2	2	2	2	2	10
032	2	0	0	2	0	4
037	2	2	2	2	2	10
214	2	2	2	2	2	10
215	2	2	2	2	2	10
283	2	2	2	2	2	10
293	2	0	2	2	2	8
302	2	2	2	2	2	10
603	2	2	2	2	2	10
678	2	2	2	2	2	10
787	2	2	2	2	2	10

**Závěrečné hodnocení** série EHK 1388 laboratoří diagnostikujících leptospirózu v ČR je následující. **Hranice úspěšnosti** vypočtena z aritmetického průměru 9,6 mínus dvakrát směrodatné odchytky 0,8 je **8,0**. V této sérii tak dosáhlo akceptovatelných výsledků 11 diagnostikujících laboratoří.

## 6. Závěr

EHK 1388 – Sérologie leptospirózy se zúčastnilo 12 laboratoří. Všechny laboratoře vrátilly výsledky k hodnocení. Uspělo 11 laboratoří, jedna laboratoř neuspěla.

Obecně můžeme konstatovat, že rutinní diagnostika leptospirózy v ČR je 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 reklamacie použijte také webovou aplikaci SZÚ.

Konec závěrečné zprávy