



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/8/2025 (EHK 1462)

Sérologie leptospirózy

Praha, červen 2025

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/8/2025 je zaměřen na sérologii leptospirózy. Návrh a realizace PT#M/8/2025 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 na webových stránkách SZÚ v odkazu: <http://ehk.szu.cz/EHK10/> po přihlášení kódem laboratoře a heslem.

Zprávu vypracoval a autorizoval:

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

Tel: 267 082 272

Dne: 3. 6. 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/8/2025

Identifikace kola/cyklu:	EHK 1462
Název:	Sérologie leptospirózy
Koordinátor:	Mgr. Eliška Zadrobílková, Ph.D., 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:	Viz kapitola 2. závěrečné zprávy
Počet účastníků:	13
Termín distribuce:	18. 2. 2025
Informace účastníkům:	Viz Informace pro účastníky zaslané spolu se vzorky
Termín odeslání výsledků účastníkům:	11. 3. 2025
Označení vzorkovnic:	EHK 1462, PT # M/8, č. 1-5, 18. 2. 2025
Zabezpečení kvality vzorku (včetně termínů testů 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 pečlivým promícháním vzorků před zahájením alikvotování do vzorkovnic. Následně je náhodně vybráno 3 – 5 již rozaliquetovaných vzorků, které jsou následně zkontrolovány. Stabilita vzorku: kontrola vzorků v den odeslání a v den stop termínu, adekvátní skladování, stabilizace 0,001% azidu sodného (viz Protokol o přípravě vzorků). Termíny testů homogenity: 18.2.2025 a stability: 18.2. a 11.3.2025
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:	13. 3. 2025
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	Do 3. 6. 2025

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 leptospirovy 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 skladovány 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 králíčí 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 1462 v NRL LEP

Kategorie vzorku	MAT- Ag Pozit +	Anti-LEPTO titr Ig
A	negativní	-
B	Leptospira tarassovi	1:800
C	Leptospira pomona	1:6400
D	Leptospira icterohaemorrhagiae	1:3200
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 leptospiroz. 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. tarassovi* a *L. pomona* (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, nebo za správný kvantitativní výsledek. **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

Největší problém představoval pro laboratoře **vzorek B**, kdy byla v jednom případě zaznamenána reakce s nesprávným sérotypem a dvě laboratoře vzorek dokonce určily jako negativní. Dále jedna laboratoř chybovala v určení sérotypu u **vzorku C**. **Vzorky A a E** označily všechny laboratoře správně jako negativní a **vzorek D** určily také všechny laboratoře správně jako *L. icterohaemorrhagiae* (včetně titru v tolerovaném rozsahu).

Maximálního počtu 10 bodů dosáhlo v sérii EHK 1462 devět ze 12 hodnocených laboratoří. Jedna laboratoř dosáhla výsledku 9 bodů, kdy chybovala ve vzorku B ve správném určení sérotypu, jedna laboratoř dosáhla výsledku 8 bodů, kdy vzorek B označila chybně jako negativní, a jedna laboratoř dosáhla 7 bodů a v EHK neuspěla. Vzorek B chybně označila jako negativní a u vzorku C chybovala ve správném určení sérotypu. Jedna laboratoř výsledky neodevzdala.

Tab. 2: Bodové hodnocení laboratoří v EHK 1462

Laboratoř	A	B	C	D	E	celkem
020	2	2	2	2	2	10
028	2	2	2	2	2	10
032	2	2	2	2	2	10
037	2	1	2	2	2	9
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	0	1	2	2	7

Závěrečné hodnocení EHK 1462 laboratoří diagnostikujících leptospirózu v ČR je následující. **Hranice úspěšnosti** vypočtena z aritmetického průměru 9,5 minus dvakrát směrodatné odchylky 1 je **7,5**. V této sérii tak dosáhlo akceptovatelných výsledků 11 diagnostikujících laboratoří.

6. Závěr

EHK 1462 – Sérologie leptospirózy se zúčastnilo 13 laboratoří. Jedna laboratoř nevrátila 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 reklamáce použijte také webovou aplikaci SZÚ.

Konec závěrečné zprávy