



Státní zdravotní ústav
Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti
Organizátor programů zkoušení způsobilosti akreditovaný ČIA
Podle ČSN EN ISO/IEC 17043, reg. č. 7001
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10 – Vinohrady



Závěrečná zpráva

Zkoušení způsobilosti v lékařské mikrobiologii
(Externí hodnocení kvality)

PT#M/32/2016 (č. 946)
Identifikace herpetických virů

Praha, prosinec 2016

Obsah

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing)	3
2. Příprava vzorků	4
3. Charakteristika vzorků	4
4. Způsob hodnocení	4
5. Hodnocení	4
6. Závěr	5
7. Příloha – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/32/2016 byl zaměřen na průkaz všech lidských herpetických virů kultivovatelných na přisedlých tkáňových kulturách. Návrh a realizace PT#M/32/2016 byly prováděny podle standardního operačního postupu SOP M/32 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 programů zkoušení způsobilosti č. 7001.

S veškerými informacemi dodanými účastníky je zacházeno jako s důvěrnými a nejsou bez souhlasu účastníka poskytovány třetím stranám.

Nedílnou součástí závěrečné zprávy je výsledkový protokol jednotlivé laboratoře.

Koordinátor:

MUDr. Klára Labská
Tel: 267 082 247(2476)

Zprávu vypracoval:

MUDr. Klára Labská, NRL pro herpetické viry, SZÚ Praha

Zprávu schválil: Mgr. Hana Plodková

Dne: 28. 12. 2016

Pracoviště 2 ESPT (AP CEM - Akreditační pracoviště Centra epidemiologie a mikrobiologie):

www.szu.cz/espt

email: apcem@szu.cz

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT# M/32/2016

Identifikace kola/cyklu:	PT#M/32/2016 EHK-946
Název:	Identifikace herpetických virů
Poskytovatel:	SZÚ – Centrum epidemiologie a mikrobiologie - ESPT Šrobárova 48, Praha 10, 100 42 tel.: + 420 267082575, fax.: + 420 267082271
Vedoucí ESPT	Ing. Věra Vrbíková
Koordinátor:	Dr. Klára Labská
Subdodavatel:	Není
Charakteristika materiálu:	Lyofilizát tkáňové kultury infikované lidskými herpetickými viry HSV1, HSV2, VZV a CMV.
Podstata a účel PT/EHK:	Průkaz virů kultivací na tkáňové kultuře a jejich následná identifikace.
Kritéria pro účast na PT/EHK:	Kultivace všech vzorků na tkáňové kultuře s následnou identifikací viru a odeslání výsledků ve stanoveném termínu.
Způsob přípravy:	Výchozím materiálem je tkáňová kultura lidských embryonálních fibroblastů infikovaná laboratorními kmeny lidských herpetických virů HSV1 Praha, HSV2 601, CMV AD169, VZV „Právník“.
Množství připravovaného test. Materiálu:	10 sad/7 účastníků
Označení vzorkovnic:	ESPT SZÚ PT # M/32/2016 EHK-946
Zabezpečení kvality vzorku:	Lyofilizace
Termín testu homogenity a stability:	1. Lyofilizát je opakovaně testován kultivací na viabilitu viru. 2. Přítomnost viru je ověřena metodou PCR.
Podmínky distribuce a uchování vzorků:	Distribuce v předepsaném obalu. Přeprava a uchování vzorků v chladničce při teplotě 2-8°C, chránit před světlem.
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe, lidský faktor.
Počet účastníků:	6
Termín distribuce:	4. 10. 2016
Způsob distribuce:	Přepravní službou v termínu určeném AP CEM (zajišťuje AP CEM).
Předání výsledků:	Písemně na zaslaném formuláři na adresu AP CEM.
Způsob vyhodnocení výsledků:	Shodný výsledek každého markeru je hodnocen +2 body, částečná neshoda (malá chyba) +1 bod. Hranice úspěšnosti v této sérii 80 %.
Určení maximální směrodatné odchylky:	Neprovádí se
Určení přijaté vztahné hodnoty:	Výsledky získané v NRL
Termín semináře, rozeslání zprávy účastníkům:	3 měsíce po uzávěrci kola (12/2016)

2. Příprava vzorků

Výchozím materiálem pro přípravu vzorků byla tkáňová kultura LEP zainfikovaná laboratorními kmeny virů HSV1 Praha, HSV2 601, CMV AD 169 a VZV „Právník“.

Po dosažení CPE na TK (za 2 až 8 dní) byla kultura resuspendována, naředěna kultivačním médiem (RPMI + 10% FBS) a rozplněna po 1 ml do lyofilizačních lahvíček.

Stabilita vzorku byla zajištěna lyofilizací. Sestava vzorků byla lyofilizována postupně, každý virus samostatně na pracovišti Národní referenční laboratoř - Česká národní sbírka typových kultur (CNCTC). Jeden vzorek obsahoval vždy pouze jeden virus. Přítomnost viru ve vzorku a absence ostatních kultivovatelných herpetických virů byla ověřena metodou PCR dle SOP-NRL/HV-07.

Po kontrole lyofilizátů byly lahvičky opatřeny pertlí pomocí pertlovacích kleští a označeny nálepkou pro identifikaci lyofilizátu (pořadové číslo 1-5, číslo EHK a datum rozeslání). Takto označené a zapertlované lahvičky byly vloženy do plastového obalu a skladovány při teplotě 4 – 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“.

Lyofilizát byl opakovaně testován na přítomnost životaschopných virů v Národní referenční laboratoři pro herpetické viry dle SOP-NRL/HV-04 s následnou identifikací dle SOP-NRL/HV-07

3. Charakteristika vzorků

Vzorek 1 obsahoval virus HSV 1, laboratorní kmen Praha v ředění 1:20.

Vzorek 2 obsahoval virus HSV 2, laboratorní kmen 601 v ředění 1:200.

Vzorek 3 obsahoval virus CMV, laboratorní kmen AD 169 v ředění 1:20.

Vzorek 4 obsahoval sterilní tkáňovou kulturu LEP.

Vzorek 5 obsahoval virus VZV, laboratorní kmen „Právník“ neředěný. Vzorek vykazoval opakovaně pouze slabý cytopatický efekt. Kmen „Právník“ je kmen zachycený v roce 2015 z VZV primoinfekce, pro potřeby EHK byla požitá 18. pasáž tohoto kmene.

Správné výsledky jsou uvedeny v *Tabulce 1: Správné výsledky*

Tabulka 1: Správné výsledky

Označení	HSV1	HSV2	CMV	VZV
EHK 1	+	neg.	neg	neg
EHK 2	neg	+	neg	neg
EHK 3	neg	neg	+	neg
EHK 4	neg	neg	neg	neg
EHK 5	neg	neg	neg	+

4. Způsob hodnocení

Výsledky zúčastněných laboratoří se porovnávají s výsledky získanými v NRL pro herpetické viry. Zároveň se přihlíží k výsledkům účastníků jako celku. Shodný výsledek každého vzorku je hodnocen +2 body, částečná shoda +1 bodem. Následně jsou porovnány hodnoty získaných součtů bodů a stanovena hranice úspěšnosti v procentuálním vyjádření. V této sérii byla bodová ztráta za vzorek č.5 vzhledem ke špatné kultivovatelnosti a atypickému cytopatickému efektu stanovena na 1 bod. Hranice úspěšnosti pro tuto sérii byla stanovena na 80 %.

5. Hodnocení

5 laboratoří správně kultivačně prokázalo přítomnost herpetických virů ve všech vzorcích a následně je správně identifikovalo, 1 laboratoř kultivačně nezachytila VZV.

Laboratoře, které VZV vykultivovaly, shodně popsaly atypický cytopatický efekt (CPE) u kmene VZV „Právník“, interval do CPE a popis jsou v *Tabulce 4*.

Použité kultivační systémy jsou uvedeny v *Tabulce 2*.

K identifikaci kultivovaného viru použily laboratoře metodu imunofluorescence s monoklonální protilátkou (3/6), PCR (4/6) a elektronovou mikroskopií (1/6). Přehled použitých souprav je v *Tabulce 3*.

Tabulka 2: Použité buněčné linie

Buněčná linie	Počet použití v sérii	Vykultivovaný virus
LEP	4x	HSV1,2 (4/4), VZV (3/4), CMV (4/4)
CV-1	1x	HSV 1,2 (1/1), VZV (0/1) *CMV (0/1)
MRC 5	3x	HSV1,2 (2/2), VZV (1/2), CMV (3/3)
VERO	3x	HSV1,2 (3/3), VZV (1/3) *CMV (0/2)

* CMV je kultivovatelný pouze na buněčných liniích lidského původu (zvířecí linie pouze s genetickou modifikací)

Tabulka 3: Použité soupravy k identifikaci vykultivovaného viru

	IF	PCR
HSV 1	HSV type 1 and 2 Pathfinder, BioRAD In house	HSV1 PCR kit GeneProof Artus HSV1/2 LC PCR kit LC Roche –HSV type 1
HSV 2	HSV type 1 and 2 Pathfinder, BioRAD In house	HSV2 PCR kit GeneProof Artus HSV1/2 LC PCR kit LC Roche –HSV type 2
VZV	IF-VZV-FA Denka-Seiken 1x In house	VZV PCR kit GeneProof VZV Light mix TMB In house
CMV	IF Monofluokit CMV, BioRAD 2x In house 1x	CMV PCR kit GeneProof Argene CMV, HHV6,7,8 Artus CMV

Tabulka 4 : Výsledky kultivace vzorku č.5 - VZV kmen "Právník"

Použitá buněčná linie	Počet pasáží	CPE ve dnech od inokulace	Popis CPE	
MRC5	1	11	ojedinělý	
VERO	2	8	atypický	<i>MRC5-2 pasáže neg</i>
LEP	1	17	Ojedinělá drobná ložiska	<i>VERO neg</i>
LEP	2	13	-	<i>CV-1 -2 pasáže neg</i>
LEP	1	neuvedeno	Shell vial	<i>Klasická kultivace LEP i VERO neg</i>
<i>LEP</i>	<i>2</i>	<i>nenastal</i>		

6. Závěr

Série 946 Identifikace herpetických virů v roce 2016 poukázala na obtížnost přípravy viabilního kmene VZV v lyofilizované formě. Všechny zúčastněné laboratoře uspěly, 1 laboratoř se ztratou 1 bodu. Všem zúčastněným děkuji za spolupráci a včasné dodání výsledků.

Klára Labská
NRL pro herpetické viry
koordinátor série EHK 946