



Státní zdravotní ústav
Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti
Poskytovatel 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/32/2017 (č. 991)
Identifikace herpetických virů

Praha, prosinec 2017

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/32/2017 byl zaměřen na průkaz všech lidských herpetických virů kultivovatelných na přisedlých tkáňových kulturách. Návrh a realizace PT#M/32/2017 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. Markéta Pumánová

Dne: 27. 12. 2017

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/32/2017

Identifikace kola/cyklu:	PT#M/32/2017 EHK-991
Název:	Identifikace herpetických virů
Poskytovatel:	SZÚ – Centrum laboratorních činností - 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 kulturací 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, HSV2, CMV AD169, VZV OKA
Množství připravovaného test. Materiálu:	Nejméně 12ml suspenze pro každý vzorek 10 sad/ 8 účastníků
Označení vzorkovnic:	ESPT SZÚ PT # M/32/2017 EHK-991
Zabezpečení kvality vzorku:	Lyofilizace
Termín testu homogenity a stability:	1. Lyofilizát je opakovaně testován kulturací na viabilitu viru 2. Přítomnost viru je ověřena metodou PCR
Podmínky distribuce a uchování vzorků:	Distribuce v předepsaném obalu. Převážka a uchování vzorků v chladničce při teplotě 2-8°C, chránit před světlem.
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe, lidský faktor
Počet účastníků:	8
Termín distribuce:	3.10.2017
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 dle celkových výsledků v této sérii.
Určení maximální směrodatné odchylky:	Neprovádí se
Určení přijaté vztahné hodnoty:	Výsledky získané v NRL
Termín semináře, rozeslání zprávy účastníkům:	3 měsíce po uzávěrci kola (12/2017)

2. Příprava vzorků

Výchozím materiálem pro přípravu vzorků byla tkáňová kultura LEP zainfikovaná následujícími virovými kmeny HSV1 – kmen X504 (izolát z pacienta, 3.pasáž na TK)

HSV2 – kmen 591/12 (izolát z pacienta, pasáž na TK nižší než 10.)

VZV – kmen OKA

CMV – kmen AD 169

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 2, kmen 591/12; neřaděný .

Vzorek 2 obsahoval virus CMV, laboratorní kmen AD 169; neřaděný

Vzorek 3 obsahoval virus HSV1, kmen X504; řadění 1:10.

Vzorek 4 obsahoval sterilní tkáňovou kulturu LEP.

Vzorek 5 obsahoval virus VZV, laboratorní kmen OKA; neřaděný

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. Hranice úspěšnosti pro tuto sérii byla stanovena na 80 %.

5. Hodnocení

Všech 6 laboratoří správně kultivačně prokázalo přítomnost herpetických virů ve všech vzorcích a následně je správně identifikovalo.

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	3	HSV1 (3/3), HSV2 (3/3), VZV (3/3), CMV (3/3)
CV-1	3	HSV1 (1/1), HSV2 (1/1), VZV (0/1), CMV 1x nezapsáno
MRC 5		HSV1 (3/3), HSV2 (3/3), VZV (3/3), CMV (3/3)
VERO		HSV1 (3/3), HSV2 (3/3), VZV ** (2/3, 1x nezapsáno), *CMV (1/3)

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

*** VZV kmen OKA je velmi dobře adaptován na replikaci na tkáňových kulturách, proto může vyrůst i na VERO linii.*

Tabulka 3: Použité soupravy k identifikaci vykultivovaného viru

	IF	PCR
HSV 1	HSV type 1 and 2 Pathfinder, BioRAD (2x) In house (1x)	HSV1 PCR kit GeneProof (2x) Seeplex meningitis, Seegene (1x) PCR nespecifikované (1x)
HSV 2	HSV type 1 and 2 Pathfinder, BioRAD (2x) In house (1x)	HSV2 PCR kit GeneProof (2x) Seeplex meningitis, Seegene (1x) PCR nespecifikované (1x)
VZV	In house (2x)	VZV PCR kit GeneProof (1x) Seeplex meningitis, Seegene (1x) In house (1x) PCR nespecifikované (2x)
CMV	IF Monofluokit CMV, BioRAD (2x) In house 1x	CMV PCR kit GeneProof (2x) Seeplex meningitis, Seegene (1x) PCR nespecifikované (1x)

6. Závěr

V sérii 991 Identifikace herpetických virů všechny zúčastněné laboratoře uspěly bez ztráty bodu. Zvláštní byl kultivační záchyt CMV na VERO buňkách, virus by se zde neměl replikovat. Záchyt VZV na VERO je možný, protože se jednalo o kmen OKA. Ke kultivačnímu záchytu divokých kmenů VZV jsou ovšem vhodnější buněčné linie odvozené od lidských fibroblastů. Všem zúčastněným děkuji za spolupráci a včasné dodání výsledků.

V případě reklamací vyhodnocení série postupujte dle reklamačního řádu.

Klára Labská
NRL pro herpetické viry
koordinátor série EHK 991