



Státní zdravotní ústav
Expertní skupina pro zkoušení způsobilosti
Poskytovatel 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/6/2018 (č. 1005)
Sérologie Epstein-Barróvé viru

Praha, květen 2018

Obsah

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

Program zkoušení způsobilosti PT#M/6/2018 je zaměřen na sérologická vyšetření viru EBV, jejich citlivost, specifitu a vyhodnocení. Porovnává způsobilost a dovednosti jednotlivých laboratoří ve vyšetřování a interpretacích sérologických výsledků, ukazuje celkovou úroveň diagnostiky EBV v ČR.

Návrh a realizace PT#M/6/2018 byly prováděny podle standardního operačního postupu SOP M/6 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.

Příloha závěrečné zprávy, tj. ohodnocený výsledkový protokol, je rozesílána poštou.

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:** 29. 5. 2018**Pracoviště 2 ESPT (AP CEM - Akreditační pracoviště Centra epidemiologie a mikrobiologie):** www.szu.cz/esptEmail: apcem@szu.cz

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT# M/6/2018

Identifikace kola/cyklu:	PT#M/6/2018 EHK-1005
Název:	Sérologie Epstein - Barrové viru
Organizátor:	SZÚ – Centrum laboratorních činností - ESPT Šrobárova 48, Praha 10, 100 42 tel.: + 420 267082575, fax.: + 420 267082271
Vedoucí ESPT	Ing. Věra Vrbíková
Koordinátor:	MUDr. Labská
Subdodavatel:	Není
Charakteristika materiálu:	Lidské sérum/plazma
Podstata a účel PT/EHK:	průkaz protilátek třídy IgG a IgM proti různým antigenům viru Epstein – Barrové a souhrnná interpretace provedených testů
Kritéria pro účast na PT/EHK:	Vyšetření obou vzorků imunoanalytickými metodami, minimálně 1x IgM a 1xIgG u každého vzorku, ale doporučeny jsou alespoň 3 markery a odeslání výsledků ve stanoveném termínu
Způsob přípravy:	Výchozím materiálem je lidské sérum/plazma.
Množství připravovaného test. Materiálu:	142 sad (1 sada á 2 vzorky po 0,3 ml)
Označení vzorkovnic:	EHK-1005 PT # M/6/2018 Č. 1 - 2 28. 2. 2018
Zabezpečení kvality vzorku:	1. Obsahuje-li výchozí materiál po rozmrazení viditelné částice organického materiálu (bílkoviny, tuky), je zcentrifugován. 2. Pro zajištění stability je do výchozího materiálu přidáván po rozmražení azid sodný ve výsledné koncentraci 0,02% ve vzorku
Termín testu homogenity a stability:	1. Výchozí materiál je testován na vhodné cílové markery 2. Finální vzorek je testován na všechny cílové markery před a po rozplněním
Podmínky distribuce a uchovávání vzorků:	Distribuce v předepsaném obalu. Přeprava a krátkodobé uchovávání vzorků v chladničce při teplotě 2-8°C, dlouhodobé uchovávání při -18 až -24°C, chránit před světlem, zamezit opakovanému rozmrazování
Možné zdroje chyb:	nedodržení správné laboratorní praxe, lidský faktor
Počet účastníků:	121
Termín distribuce:	28.2.2018
Způsob distribuce:	Přepravní službou v termínu určeném AP CEM (zajišťuje AP CEM)
Předání výsledků:	V elektronické podobě za použití programu EHK Lab
Způsob vyhodnocení výsledků:	<ul style="list-style-type: none"> shodný výsledek markerů anti EBNA 1 IgG, anti VCA IgG a anti VCA IgM je hodnocen +2 body/vzorek, částečná neshoda (malá chyba) +1 bod. Ostatní markery při shodě +1 bod správná interpretace výsledku + 4 body (celkem 8 za sérii). Hranice úspěšnosti v této sérii je 80%.
Určení maximální směrodatné odchylky:	Neprovádí se
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Výsledky získané v NRL
Termín semináře, zveřejnění závěrečné zprávy účastníkům:	3 měsíce po uzávěrce kola (6/2018)

2. Příprava vzorků

Výchozím materiálem pro přípravu vzorků byla lidská séra a defibrinovaná plazma, které byly vyšetřeny na přítomnost cílových markerů. Vzorek A byl poolovaný a vzorek B byla plazma jediného dárce.

Pro zajištění stability byl do výchozího materiálu přidán po rozmražení azid sodný v koncentraci 0,02%.

Finální (rozplněné) vzorky byly testovány na přítomnost cílových markerů metodami EIA a NIF dle SOP-NRL/HV-01 a -03.

3. Charakteristika vzorků

Série 1005 obsahovala 2 vzorky (á 0,3 ml) k vyšetření sérologických markerů EBV infekce. Výběr konkrétních markerů nebyl stanoven. Požadováno bylo minimálně 1x IgM a 1x IgG, ale jsou doporučeny alespoň 3 markery, protože tři výsledky představují minimum nutné pro interpretaci stádií EBV infekce a stavů organismu s nimi spojených. Suboptimální výběr sledovaných markerů může také vést k nesouhlasné interpretaci charakteru vyšetřovaného vzorku, což se může v EHK projevit sníženým hodnocením. Obvykle jsou používány metody immunoassay a/nebo NIF, informaci navíc může poskytnout také immunoblot.

První vzorek (A) byl připraven z poolu sér selektovaných na základě anti VCA IgM positivity a anti EBNA1 IgG negativity. Ostatní markery byly testovány až po zpoolování sér.. Následným testováním v NRL pro herpetické viry byly stanoveny tyto hodnoty: EBNA1 IgG negativní, VCA IgG pozitivní, VCA IgG avidita – nízkoavidní (18%), VCA IgM pozitivní, VCA IgA pozitivní, EA IgG pozitivní (typ imunofluorescence D), EA IgM pozitivní, EBNA IgM pozitivní.

Jako druhý vzorek (B) byla použita defibrinovaná plazma EBV séronegativního zdravého dárce. Vzorky byly kódovány, vaše individuální kódování je uvedeno na výsledkovém protokolu.

Tabulka 1: Správné výsledky:

	A	B
EBNA IgG	negativní	negativní
EBNA IgM	pozitivní	negativní
VCA IgG	pozitivní	negativní
VCA avidita	nízkoavidní	negativní
VCA IgM	pozitivní	negativní
VCA IgA	pozitivní	negativní
EA IgG	pozitivní	negativní
EA IgM	pozitivní	negativní

4. Způsob hodnocení

Metody na bázi immunoassay (EIA, CLIA, NIF a další)

Výsledky zúčastněných laboratoří se porovnávají s výsledky získanými v NRL pro herpetické viry a přihlíží se i k výsledkům ostatních účastníků jako celku. Každý otestovaný marker má hodnotu POZITIVNÍ nebo NEGATIVNÍ, přípustná je také hodnota HRANIČNÍ.

Hodnocení je založeno na ohodnocení každého shodného výsledku sledovaných markerů anti-EBNA IgG, anti-VCA IgG a anti-VCA IgM v každém vzorku přidělením dvou bodů. V případě částečné neshody v těchto markerech (obvykle hraniční výsledek) je přidělen jeden bod.

Ostatní markery (např. anti-EA IgG, anti-EA IgM, anti-VCA IgA, anti-EBNA-1 IgM, anti-ZEBRA IgM a IgG, anti-BZLF-1 IgM a IgG a další) jsou hodnoceny v případě shody získáním 1 bodu za 1 vzorek.

Celková interpretace vzorku je hodnocena 4 body za vzorek. Interpretace musí odpovídat dosaženým výsledkům, pokud jsou výsledky některých testů v rozporu s interpretací, laboratoř musí hodnocení zdůvodnit komentářem. Pro usnadnění komunikace jsou navrženy tyto předdefinované interpretace:

1. séronegativní,
2. stav po primoinfekci proběhlé v minulosti – anamnestické protilátky,
3. stav po primoinfekci proběhlé v minulosti – sérologické známky reaktivace,
4. stav po primoinfekci proběhlé v minulosti (pokud laboratoř nekomentuje reaktivaci)
5. primoinfekce.

Zúčastněné laboratoře mají prostor interpretaci rozšířit v rámci formuláře v poli „Komentář“.

Metody na bázi immunoblot

Zúčastněný do výsledkového formuláře vyplňuje, zda byly přítomny protilátky proti jednotlivým antigenům, ale test se hodnotí jako celek interpretací (viz předdefinované interpretace).

Hranice úspěšnosti se stanovuje v procentech dosažených bodů/maximální bodový zisk při zvolené kombinaci testů. Hranici úspěšnosti pro jednotlivé kolo dané série nelze stanovit předem, neboť záleží na míře shody hodnocené laboratoře s NRL a zároveň na míře shody mezi zúčastněnými laboratořemi dohromady. Proto není ani stanoveno rozmezí, ve kterém je laboratoř úspěšná. Pokud se však výsledky liší od výsledků většiny laboratoř i výsledků stanovených koordinátorem, vyhrazuje si koordinátor právo při hodnocení úspěšnosti laboratoře rozhodnout direktivně. Koordinátor si vyhrazuje právo v případě rozporuplných výsledků určitého testu tento test vyřadit z hodnocení. Koordinátor určí direktivně limit (%), který musí laboratoř dosáhnout. Limit pro sérii 1005 byl stanoven na 80% bodů dosažitelných zvolenou kombinací metod.

5. Vyhodnocení

Vzorek A: EBV primoinfekce

Marker EBNA 1 IgG – negativní

Marker vyšetřilo 120 laboratoř, 116x negativní, 2x hraniční a 1x pozitivní + 1x záměna vzorků s jiným okruhem EHK

Neshodné výsledky: souprava Siemens Immulite 2000 EBV-EBNA IgG (1x pozitivní, 1x hraniční - 2 ze 2 použít v sérii), souprava Test Line EIA-EBV EBNA1 IgG (1x hraniční, 1 ze 33 použít v sérii)

Marker VCA IgG – pozitivní, nízkoavidní

Metody na bázi EIA: 118x pozitivní, 1x negativní + 1x záměna vzorků s jiným okruhem EHK

Neshodný výsledek byl získán soupravou Test Line EIA-EBV VCA IgG (1 ze 31 použít v sérii)

Metody na bázi NIF: 6x pozitivní.

Anti-VCA IgG avidita – všech 10 testujících laboratoř shodně hodnotilo vzorek jako nízkoavidní.

Použité soupravy: Euroimmun – EBV CA avidity determination; Test Line – EIA VCA IgG; Vidia – ELISA VIDItest anti-VCA EBV IgG a avidita IgG.

Marker VCA IgM – pozitivní

Metody na bázi EIA: 117x pozitivní+ 1x záměna vzorků s jiným okruhem EHK

Metody na bázi NIF: 5x pozitivní

Marker VCA IgA – pozitivní

Marker vyšetřilo 5 laboratoř, všichni použili metody na bázi EIA, shodně 5x pozitivní

Marker EA IgG – pozitivní

Metody na bázi EIA: 79x pozitivní, 1x negativní + 1x záměna vzorků s jiným okruhem EHK.

Metody na bázi NIF: 5x pozitivní

Marker EA IgM – pozitivní

Metody na bázi EIA: 21x pozitivní

Marker EBNA 1 IgM – pozitivní

Marker vyšetřilo 25 laboratoří, neshodný výsledek měla 1 laboratoř soupravou Test Line EIA-EBV EBNA1 IgM (1x negativní, 1 z 18 použití v sérii)

Vzorek B: EBV séronegativní

Vzorek nečinil obtíže a výsledky všech markerů u všech 119 testujících laboratoří byly negativní kromě laboratoře se zaměněnými vzorky (+1 laboratoř pouze immunoblot)

Výsledky metodou imunoblot (western blot)

Metodu použilo 9 laboratoří, celkové hodnocení vzorků se shodovalo. Výsledky protilátek proti jednotlivým antigenům se lišily i v rámci použití jednotlivých souprav a laboratoře dodaly nekompletní data (pro shodnou soupravu vyplněny odlišné antigeny). Výsledky jsou podány v *Tabulce 2*; pro přehlednost souhrnně dle použitých souprav.

Tabulka 2: Výsledky metod na bázi imunoblot vzorek A- primoinfekce

souprava	Výrobce	EBNA IgM	VCA IgM	EA IgM	EBNA IgG	VCA IgG	EA IgG
recomLine	Microgen	nt	1x Poz 2x Neg	Poz 3/3	Neg 1/1 2xnt	Poz 3/3	Poz 3/3
Anti-EBV Westernblot	Euroimmun	Poz 1/1	Poz 1/1	Neg 1/1	Neg 1/1	Poz 1/1	Neg 1/1
EUROLINE: EBV Profile 2	Euroimmun	Neg 2/3 1x nt	Poz 3/3	Neg 1/1 2xnt	Neg 3/3	Poz 3/3	Poz 3/3
ViraChip	Viramed	nt	Poz 1/1	Neg 1/1	Neg 1/1	Poz 1/1	Neg 1/1
neuveдена	neuveден	Poz 1/1	Poz 1/1	Poz 1/1	nt	Poz 1/1	Poz 1/1

nt- netestováno/ neuveden výsledek.

Jako pozitivní výsledek je brán záchyt protilátek proti kterékoliv části výše uvedených antigenů

6. Závěr

Letošní série „Sérologie EBV“ se zúčastnilo 121 laboratoří, z toho 114 laboratoří uspělo bez srážky bodu, 4 laboratoře se srážkou 1 bodu, 1 se ztrátou 2 bodů, 1 laboratoř uspěla podmíněně (musí doložit výsledky), 1 laboratoř neuspěla kvůli záměně vzorků se souběžným kolem EHK.

Ze závažnějších laboratorních chyb se opět objevila negativita anti-VCA IgG a pozitivní anti EBNA IgG u vzorku primoinfekce.

Opravné kolo série proběhne dne 9. 10. 2018. O opravné vzorky můžete požádat **do 14 dnů** od doručení závěrečné zprávy. V případě reklamací vyhodnocení série postupujte, prosím, dle reklamačního řádu.

Děkuji všem za účast v EHK „Sérologie EBV“ v roce 2018 a těším se na další spolupráci.

S pozdravem
MUDr. Klára Labská
NRL pro herpetické viry
koordinátor série 1005