



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/11/2021 (EHK 1184)
Identifikace respiračních virů

Praha, květen 2021

Obsah

1.	Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing)	3
2.	Způsob přípravy vzorků	4
3.	Charakteristika materiálu	4
4.	Způsob hodnocení	4
5.	Vyhodnocení	5
6.	Závěr	6
7.	Příloha 1 - Tabulky	7
8.	Příloha 2 – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/11/2021 byl zaměřen na identifikaci respiračních virů. Návrh a realizace PT#M/11/2021 byly prováděny podle standardního operačního postupu SOP M/11 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. výsledkový protokol, je pro každou zúčastněnou laboratoř k dispozici na webových stránkách SZÚ (<http://www.szu.cz/programy-zpusobilosti-pro-mikrobiologicke-laboratore>) po přihlášení kódem a heslem v záložce „Hodnocení sérií“.

Zprávu vypracoval:

MUDr. Radomíra Limberková, NRL pro chřipku a nechřipková respirační virová onemocnění a NRL pro zarděnky, spalničky, parotitidu a parvovirus B19, SZÚ Praha

Zprávu autorizoval:

MUDr. Radomíra Limberková
Tel: 267082412
Dne: 15. 5. 2021

Pracoviště 2 ESPT

<http://www.szu.cz/programy-zpusobilosti-pro-mikrobiologicke-laboratore>

e-mail: ehk@szu.cz

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT# M/11/2021

Identifikace cyklu:	EHK 1184
Název:	Identifikace respiračních virů
Koordinátor:	MUDr. Radomíra Limberková
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3
Podstata a účel PT:	Ověření schopnosti identifikovat respirační viry (chřipka A, chřipka B, adenovirus, RSV)
Kritéria pro účast na PT:	Požadavky na laboratoře – zajištění laboratorních procesů podle ČSN EN ISO 15189
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2
Množství připravovaného test. materiálu:	pro 25 laboratoří
Označení vzorkovnic:	EHK 1184, PT # M/11, č. 1-4, 9. 3. 2021
Zabezpečení kvality vzorku:	Zabezpečení homogenity: Homogenita je zajištěna promícháním vzorků před zahájením alikvotování do lyofilizačních lahviček a rovněž v jejím průběhu. Zabezpečení stability vzorků: Stabilita je zajištěna manipulací za sterilních podmínek, vhodným skladováním, rychlým transportem ke zpracování a určením termínu, do kterého musí být odeslán výsledek zpět k vyhodnocení. Dlouhodobá stabilita vzorků je zajištěna jejich lyofilizací.
Test homogenity a stability:	Kvalita, homogenita a stabilita je posuzována na základě trojitého opakovaného testování: po lyofilizaci, před distribucí a v termínu blízkém dni odeslání výsledků zpět k vyhodnocení. Na každé testování se použije nový lyofilizát, průkazem homogenity a stability vzorků je dosažení totožných výsledků v čase. Lyofilizované vzorky jsou skladovány při teplotě 2 – 8° C.
Podmínky distribuce a uchování vzorků:	Distribuce v předepsaném obalu. Do rozpuštění uchovávejte lyofilizované vzorky při chladničkové teplotě (2 – 8°C). Rozpuštění lyofilizátů provádějte v den vyšetření a zbytek vzorků po otestování uchovejte při teplotě vhodné pro dlouhodobé skladování klinického materiálu tohoto typu (-18°C a nižší).
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe a pokynů organizátora, záměna vzorků
Počet účastníků:	25
Termín distribuce:	9. 3. 2021
Způsob distribuce:	Přepravní službou (zajišťuje Koordinační pracoviště ESPT 2)
Předání výsledků:	V elektronické podobě za použití aplikace EHK10
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4
Určení maximální směrodatné odchylky:	Aritmetický průměr všech hodnocených laboratoří mínus 2 směrodatné odchylky. Laboratoř úspěšně absolvuje kolo EHK, pokud dosáhne bodového limitu, který se vypočítává podle

	<p>vzorce: Limit = aritmetický průměr výsledků všech hodnocených laboratoří minus dvě směrodatné odchylky. Pokud se v hodnocené skupině vyskytne pracoviště s extrémně nízkým bodovým ziskem (<50 % maximálního bodového zisku), je vyloučeno z výpočtu limitu. Takové pracoviště je automaticky hodnoceno jako neúspěšné.</p> <p>Jestliže stejný typ atypického výsledku vykáže větší počet účastníků, může být přihlédnuto k tomu, zda neexistuje statisticky významná souvislost mezi typem použitého testu a zmíněnou odchylkou. V takovém případě koordinátor provede hodnocení po odborné konzultaci s poradní skupinou.</p>
Určení vztažné hodnoty:	Vztažnou hodnotou jsou výsledky NRL, které byly získané trojitým opakovaným testováním vzorků (= očekávané výsledky).
Termín uveřejnění očekávaných výsledků:	9. 4. 2021
Termín uveřejnění závěrečné zprávy:	do 22. 6. 2021

2. Způsob přípravy vzorků

Infikace kuřecích embryí aktuálními WHO kmeny virů chřipky, ověření přítomnosti virů v alantoidní tekutině titrací hemaglutininu s morčecími krvinkami, ověření sterility alantoidních tekutin inkubací 0,5 ml alantoidní tekutiny v hovězím bujónu. Naředění jednotlivých vzorků v mediu pro tkáňové kultury v poměru 1:500, rozplnění po 1 ml a lyofilizace.

Experimentální určení nejvhodnějšího ředění lyofilizátů pomocí PCR tak, aby virová nálož odpovídala běžnému klinickému vzorku (CT 20 – 33 ± 1): resuspendace lyofilizátu do 0,2 ml deionizované vody nebo vody pro PCR, následné ředění vzorků vodou pro PCR v poměru 1:10 (uvedeno v průvodním dopise účastníkům).

3. Charakteristika materiálu

Jednalo se o aktuální WHO kmeny virů chřipky pomnožené na kuřecích embryích (virus chřipky A/H1N1, virus chřipky A/H3N2, virus chřipky B), alantoidní tekutiny byly naředěny v mediu pro tkáňové kultury tak, aby virová nálož odpovídala běžnému klinickému vzorku. Zařazen byl i na výše jmenovaná agens negativní vzorek (kontrolní antigen PIV-1).

Zásilka obsahovala 4 vzorky k určení virového agens metodou PCR či méně vhodnými orientačními metodami rychlého průkazu virového antigenu, které nelze používat jako jediné diagnostikum používané laboratoří. Všechny vzorky (kromě vzorku 4) byly v NRL pozitivní při testování pomocí RT-PCR a negativní imunochromatografickými rychlotesty.

4. Způsob hodnocení

Každý vzorek byl hodnocen v rozmezí 0 - 2 body:

Očekávaný výsledek 2 body

Částečně správný výsledek 1 bod

Nesprávný výsledek 0 bodů (negativní výsledek u pozitivního vzorku nebo naopak)

Výstupy z laboratoří se očekávají v podobě pozitivní či negativní s uvedením hodnoty CT, pokud to diagnostikum umožňuje. Za vyhovující jsou považovány výsledky, které jsou ve shodě s očekávanými výsledky. Dvěma body je hodnocena shoda, jedním bodem je hodnocena částečná shoda a bez bodového ohodnocení jsou výsledky, které se s očekávaným výsledkem neshodují. Volba metody pro testování vzorků závisí na rutinní praxi účastníka

Za identifikaci čtyř virových agens ve 4 vzorcích mohou laboratoře získat maximálně 32 bodů a maximálně 24 bodů za vyšetření tří agens (bez adenoviru) metodou PCR a 32 bodů při diagnostice pomocí „rychltestů“. Pokud jsou vzorky vyšetřeny více metodami, body se nescítají a hodnotí se každá metoda zvlášť.

Limit požadovaných bodů byl stanoven výpočtem (limitem je aritmetický průměr z hodnot získaných bodů účastníků dané skupiny minus dvě směrodatné odchylky). Pokud se v hodnocené skupině vyskytuje pracoviště s extrémně nízkým bodovým ziskem (< 50 % maximálního bodového zisku), je vyloučeno z výpočtu limitu. Takové pracoviště je automaticky hodnoceno jako neúspěšné.

Jestliže stejný typ atypického výsledku vykáže větší počet účastníků, může být přihlédnuto k tomu, zda neexistuje statisticky významná souvislost mezi typem použitého testu a zmíněnou odchylkou. V takovém případě koordinátor provede hodnocení po odborné konzultaci s poradní skupinou.

5. Vyhodnocení

5.1 Očekávané výsledky PCR

Vzorek	Influenza A	Influenza B	Adenovirus	RSV
1	pozitivní	negativní	negativní	negativní
2	pozitivní	negativní	negativní	negativní
3	negativní	pozitivní	negativní	negativní
4	negativní	negativní	negativní	negativní

Pozn.: vzorek 1 = A/H1N1 a vzorek 2 = A/H3N2

5.2 Očekávané výsledky „rychltesty“

Vzorek	Influenza A	Influenza B	Adenovirus	RSV
1	negativní	negativní	negativní	negativní
2	negativní	negativní	negativní	negativní
3	negativní	negativní	negativní	negativní
4	negativní	negativní	negativní	negativní

5.3 Dosažené výsledky PCR - výpočet limitu

32 bodů (13 laboratoří) – influenza A, influenza B, RSV, AV

Aritmetický průměr	32
Směrodatná odchylka	0
2 směrodatné odchylky	0

Limit	32 bodů
Uspělo	13
Neuspělo	0

24 bodů (10 laboratoří) - influenza A, influenza B, RSV

Aritmetický průměr	23,2
Směrodatná odchylka	1,6
2 směrodatné odchylky	3,2
Limit	20 bodů
Uspělo	10
Neuspělo	0

5.4 Dosažené výsledky „rychltesty“ - výpočet limitu

Aritmetický průměr	30
Směrodatná odchylka	3,46
2 směrodatné odchylky	6,92
Limit	23,08
Uspělo	4
Neuspělo	0

6. Závěr

Vzorky byly rozeslány do 25 laboratoří, všechna pracoviště kromě jednoho zaslala své protokoly zpět k vyhodnocení. 23 laboratoří testovalo vzorky za použití PCR (3 z nich současně vyšetřily vzorky i „rychltesty“), jedno pracoviště používá k diagnostice výhradně rychlotesty. **Uspělo všech 24 hodnocených laboratoří.**

Metoda PCR

Všechny čtyři antigeny ve vzorcích testovalo 13 laboratoří, maximální bodový zisk byl 32 bodů, všechny laboratoře dosáhly 100% bodů.

Tři antigeny (bez adenoviru) ve vzorcích testovalo 10 laboratoří, maximální bodový zisk byl 24 bodů, osm laboratoří dosáhlo 100% bodový zisk.

Rychlotesty

Rychlotesty použily 4 laboratoře. Tři z nich se 100% bodovým ziskem. Jedna laboratoř, která používá rychlotesty jako jediné diagnostikum, nezískala 100% bodový zisk díky nespecifické pozitivitě všech vzorků v rychlotestu Viditest RSV+Adeno Resp. Card.

Diagnostickým limitem rychlotestů v porovnání s metodou PCR je dosažení negativních výsledků u jednoznačně pozitivních vzorků. Používání rychlotestů jako jediné diagnostické metody v laboratoři není vhodné kvůli jejich nízké citlivosti a specifitě.

Upozornění: od roku 2022 bude M/11 určena výhradně pro metody průkazu NA, současně dojde k přejmenování programu zkoušení způsobilosti na Detekce NA respiračních virů (chřipka A/B, ADV, RSV).

V případě reklamací vyhodnocení série, prosím, postupujte dle reklamačního řádu.

Tab. 1 Bodové hodnocení jednotlivých pracovišť

RT = imunochromatografický rychlotest

Lab.	A	B	C	D	Max.bodů PCR/RT	Dosaženo b. PCR/RT	Hodn.sest.
20	8	8	8	8	32	32	100%
26	6	6	6	6	24	24	100%
28	16	16	16	16	32/32	32/32	100%
34	8	8	8	8	32	32	100%
48	6	6	6	2	24	20	uspěl
51	6	6	6	6	24	24	100%
55	6	6	6	6	24	24	100%
65	6	6	6	6	24	24	100%
70	8	8	8	8	32	32	100%
71	8	8	8	8	32	32	100%
115	16	16	16	16	32/32	32/32	100%
184	6	6	6	6	0/32	0/24	uspěl
211	8	8	8	8	32	32	100%
214	8	8	8	8	32	32	100%
317	8	8	8	8	32	32	100%
333	6	6	6	2	24	20	uspěl
344	8	8	8	8	32	32	100%
365	8	8	8	8	32	32	100%
369	6	6	6	6	24	24	100%
532	8	8	8	8	32	32	100%
552	14	14	14	14	24/32	24/32	100%
595	8	8	8	8	32	32	100%
737	6	6	6	6	24	24	100%
759	6	6	6	6	24	24	100%

Tab. 2 Přehled použitých diagnostik – PCR

	PCR adenovirus	
211	Seegene	Allplex RP2
214	Seegene	Allplex RP2
344	Seegene	Allplex RP1
532	Geneproof	Adenovirus PCR kit
20	PathoFinder	Adenovirus
34	Sacace Biotechnologies	Adenovirus
28	In house	In house
70	neuveveno	
71	neuveveno	
115	neuveveno	
317	neuveveno	
365	neuveveno	
595	neuveveno	

PCR chřipka A, chřipka B, RSV		
26	Cepheid	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
28	Cepheid	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
34	Cepheid	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
48	Cepheid	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
51	Cepheid	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
55	Cepheid	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
65	Cepheid	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
115	Cepheid	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
211	Cepheid	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
317	Cepheid	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
333	Cepheid	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
369	Cepheid	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
737	Cepheid	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
759	Cepheid	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
214	Seegene	Allplex RP1
344	Seegene	Allplex RP1
20	Vitassay	Vitassay A+B+RSV
70	jiný	jiný
71	jiný	jiný
365	jiný	jiný
532	jiný	jiný
552	jiný	jiný
595	jiný	jiný

Tab. 3 Přehled použitých diagnostik – „Rychlotesty“

Rychlotesty adenovirus		
28	Coris	Adeno Respi K-Set
115	Vidia	Rapid-VIDITEST Adenovirus Resp. Card
184	Vidia	Rapid-VIDITEST RSV+Adeno Resp. Card
552	Vidia	Rapid-VIDITEST RSV+Adeno Resp. Card

Rychlotest RSV		
28	Abott	RSV ALERE BINAXNOW® RSV CARD
115	Abott	RSV ALERE BINAXNOW® RSV CARD
184	Vidia	Rapid-VIDITEST RSV+Adeno Resp. Card
552	Vidia	Rapid-VIDITEST RSV+Adeno Resp. Card

Rychlotest chřipka A a B		
28	SD Bioline	SD BIOLINE INFLUENZA ULTRA
115	Abott	Alere BinaxNow A+B
184	Vidia	Rapid-VIDITEST Influenza A+B Card
552	Vidia	Rapid-VIDITEST Influenza A+B Card

Tab. 4 Výsledky PCR – hodnoty CT**Chřipka A**

Laboratoř	V 1 - CT	V 2 - CT	V 3 - CT	V 4 - CT	Souprava
26	23,8	23,8	0	0	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
28	25,4	25,6	0	0	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
34	24	23	0	0	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
48	22,8	23,3	0	39,2	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
51	23	23,5	0	0	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
55	22,7	23,5	0	0	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
65	22	23	0	0	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
115	22,3	22,9	0	0	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
211	22,7	22	0	0	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
317	25	25	0	0	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
333	24	24	0	39	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
369	22,2	23,3	0	0	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
737	22,5	23,5	0	0	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
759	24	25	0	0	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
214	25,29	23,47	0	0	Allplex RP1
344	34	33	0	0	Allplex RP1
20	25	27,58	0	0	Vitassay A+B+RSV
70	N/A	N/A	0	0	jiný
71	N/A	N/A	0	0	jiný
365	23,8	23,76	0	0	jiný
532	30	29,3	0	0	jiný
552	20,31	22,73	0	0	jiný
595	18,28	18,85	0	0	jiný

Chřipka B

Laboratoř	V 1 - CT	V 2 - CT	V 3 - CT	V 4 - CT	Souprava
26			23,2		Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
28			27,4		Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
34			23		Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
48			22,2	39,6	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
51	0	0	22,4	0	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
55			22,2		Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
65			22		Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
115			21,7		Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
211	0	0	22,5	0	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
317			22		Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
333			22	37	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
369	0	0	22,1	0	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
737			23,2		Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV

759	0	0	23	0	Genexpert Xpert Xpress Flu/RSV
214			23,48		Allplex RP1
344			31		Allplex RP1
20			25,93		Vitassay A+B+RSV
70	N/A	N/A			jiný
71	N/A	N/A			jiný
365			21,16		jiný
532	0	0	29,8	0	jiný
552			21,76		jiný
595			15,9		jiný

KONEC ZÁVĚREČNĚ ZPRÁVY