



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/32/2021 (EHK 1217)
Identifikace herpetických virů

Praha, prosinec 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	5
5.	Vyhodnocení	5
6.	Závěr	6
	Příloha 1 – přehled výsledků jednotlivých laboratoří v EHK 1217	
	Příloha 2 – výsledkový protokol jednotlivé laboratoře	

Program zkoušení způsobilosti PT#M/32/2021 (EHK 1217) byl zaměřen na průkaz všech lidských herpetických virů kultivovatelných na přisedlých tkáňových kulturách.

Návrh a realizace PT#M/32/2021 (EHK 1217) 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 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 pro každou zúčastněnou laboratoř k dispozici ve webové aplikaci SZÚ v odkazu: <https://ehk.szu.cz/EHK10/> po přihlášení kódem laboratoře a heslem

Zprávu vypracoval:

Ing. Michaela Růžková, Ph.D. a Mgr. Markéta Pumánová, NRL pro herpetické viry, SZÚ Praha

Zprávu autorizoval:

Ing. Michaela Růžková, Ph.D.

Tel. 267 082 247 (476)

Dne: 7. 12. 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/32/2021

Identifikace kola/cyklu:	EHK 1217
Název:	Identifikace herpetických virů
Koordinátor:	Ing. Michaela Růžková, Ph.D.
Charakteristika materiálu:	Viz kapitola 3
Podstata a účel PT/EHK:	Kultivace a identifikace herpetických virů na tkáňových kulturách
Kritéria pro účast na PT/EHK:	Přihláška a odeslání výsledků v daném termínu Požadavky na laboratoře: zajištění laboratorních procesů podle ČSN EN ISO 15189:2013
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2
Množství připravovaného testovaného materiálu:	17 sad (1 sada á 5 vzorků)
Označení vzorkovnic:	EHK 1217, PT # M/32, č. 1-5, 5. 10. 2021
Zabezpečení kvality vzorku:	Lyofilizované vzorky v zapertlovaných lyofilizačních lahvičkách jsou testovány kultivací na tkáňové kultuře a následně vyšetřeny metodou PCR. Testování opakováno 3x: při primární přípravě materiálu, před distribucí účastníkům a před uzávěrkou série
Test homogenity a stability:	1. Test homogenity a stability před distribucí účastníkům 2. Test homogenity a stability před uzávěrkou série
Podmínky distribuce a uchování vzorků:	Distribuce v předepsaném obalu. Vzorky uložit při teplotě 2-8°C, před inokulací rozpustit v 1 ml sterilní vody pro tkáňové kultury. Po rozpuštění uchovávat vzorky při teplotě 2-8°C max. 24 hod, dále již při teplotě -70°C.
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe, lidský faktor
Počet účastníků:	4
Termín distribuce:	5. 10. 2021
Způsob distribuce:	Přepravní službou (zajišťuje Koordinační pracoviště)
Předání výsledků:	V elektronické podobě za použití aplikace EHK10
Způsob vyhodnocení výsledků:	Viz kapitola 4
Určení maximální směrodatné odchylky:	Neprovádí se
Určení přijaté vztažné hodnoty:	Výsledky získané v NRL
Termín uveřejnění očekávaných výsledků	15. 11. 2021
Termín uveřejnění závěrečné zprávy	Do 1. 2. 2022

1. Způsob přípravy vzorků

Výchozím materiálem pro přípravu vzorků byla tkáňová kultura LEP zainfikovaná následujícími virovými kmeny

HSV1 – kmen NRL-HV 2007

HSV2 – kmen NRL-HV 2011

CMV – kmen AD 169

Po dosažení cytopatického efektu (CPE) na tkáňové kultuře (za 2 až 9 dní) byly odebrané vzorky naředěny kultivačním médiem (RPMI + 10% FBS) a rozplněny po 1 ml do lyofilizačních lahvíček. Stabilita vzorků byla zajištěna lyofilizací. Sestava vzorků byla lyofilizována na pracovišti Národní referenční laboratoře - Česká národní sbírka typových kultur (CNCTC). Každý virus byl lyofilizován samostatně (jednotlivé vzorky obsahovaly vždy pouze jeden virus). Přítomnost viru ve vzorku a absence ostatních kultivovatelných herpetických virů byla ověřena metodou PCR dle SOP-NRL/HV-06 a 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 2 – 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-06 a SOP-NRL/HV-07.

2. Charakteristika materiálu

Vzorek 1. obsahoval virus HSV2, laboratorní kmen NRL-HV 2011; ředěný 1:10

Vzorek 2 obsahoval virus CMV, laboratorní kmen AD 169; ředěný 1:10

Vzorek 3 obsahoval virus HSV 1, laboratorní kmen NRL-HV 2007; ředěný 1:300

Vzorek 4. obsahoval sterilní tkáňovou kulturu LEP

Vzorek 5 obsahoval virus CMV, laboratorní kmen AD 169; ředěný 1:100

Správné výsledky jsou uvedeny v *Tabulce 1*.

Tabulka 1: Správné výsledky

Označení	HSV1	HSV2	CMV	VZV
Vzorek 1	negativní	+	negativní	negativní
Vzorek 2	negativní	negativní	+	negativní
Vzorek 3	+	negativní	negativní	negativní
Vzorek 4	negativní	negativní	negativní	negativní
Vzorek 5	negativní	negativní	+	negativní

3. 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 součty získaných bodů a stanovena hranice úspěšnosti v procentuálním vyjádření. Hranice úspěšnosti pro sérii EHK 1217 byla stanovena na 80 %.

4. Vyhodnocení

Většina laboratoří správně kultivačně prokázala přítomnost herpetických virů ve všech vzorcích a následně správně identifikovala. Použité buněčné linie jsou uvedeny v *Tabulce 2*.

K identifikaci kultivovaného viru všechny laboratoře použily metodu PCR - viz *Tabulka 3*.

Cytopatický efekt byl u jednotlivých vzorků pozorován v časovém rozmezí - viz *Tabulka 4*.

Tabulka 2: Použité buněčné linie

Buněčná linie	Počet lab., které použily tuto linii	Vykultivovaný virus (počet pozitivních záchytů viru /počet max. možných záchytů viru)
LEP	2	HSV1 (2/2), HSV2 (2/2), CMV (4/4), VZV (0/0)
MRC-5	2	HSV1 (2/2), HSV2 (2/2), CMV (4/4), VZV (0/0)
VERO	2	HSV1 (2/2), HSV2 (2/2), CMV (0/4)*, VZV (0/0)
CV-1	1	HSV1 (2/1), HSV2 (1/1), CMV (0/2)*, VZV (0/0)

**Nejde o chybu - CMV je kultivovatelný pouze na buněčných liniích lidského původu, či na zvířecích liniích s genetickou modifikací*

Tabulka 3: Použité soupravy k identifikaci kultivovaného viru

Virus	PCR souprava
HSV1	HSV1/2 Typing Real-TM Real Time PCR kit (Sacace Biotechnologies) (1x) GeneProof Herpes Simplex Virus (HSV-1/2) PCR kit (GeneProof) (1x) Seplex Meningitis-V1 ACE Detection kit (V2.0) (Seegene) (1x) In house (1x)
HSV2	HSV1/2 Typing Real-TM Real Time PCR kit (Sacace Biotechnologies) (1x) GeneProof Herpes Simplex Virus (HSV-1/2) PCR kit (GeneProof) (1x) Seplex Meningitis-V1 ACE Detection kit (V2.0) (Seegene) (1x) In house (1x)
CMV	CMV Real-TM Quant (Sacace Biotechnologies) (1x) GeneProof Cytomegalovirus (CMV) PCR kit (GeneProof) (1x) Seplex Meningitis-V1 ACE Detection kit (V2.0) (Seegene) (1x) In house (1x)
VZV	VZV Real-TM (Sacace Biotechnologies) (1x) GeneProof Varicella-Zoster Virus (VZV) PCR kit (GeneProof) (1x) Seplex Meningitis-V1 ACE Detection kit (V2.0) (Seegene) (1x) In house (1x)

Tabulka 4: Čas nástupu cytopatického efektu dle použitých virových kmenů

Vzorek (virus)	Median (dny)	Minimální doba kultivace (dny)	Maximální doba kultivace (dny)
Vzorek 1 (HSV2)	3	2	3
Vzorek 2 (CMV)	5	4	6
Vzorek 3 (HSV1)	3	2	5
Vzorek 5 (CMV)	8,5	7	10

5. Závěr

Cyklu EHK 1217 - Identifikace herpetických virů se zúčastnily 4 laboratoře.

Uspěly všechny laboratoře, z toho 1 s bodovou ztrátou.

Metodou identifikace v tomto cyklu byla již pouze polymerázová řetězová reakce (PCR).

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

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY