



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/37/2021 (EHK 1302)**

**Detekce RNA SARS-CoV-2**

**Opravná série**

**Praha, únor 2022**

## Obsah

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

Program zkoušení způsobilosti PT#M/37/2021 byl zaměřen na detekci RNA SARS-CoV-2. Návrh a realizace PT#M/37/2021 byly prováděny podle standardního operačního postupu SOP M/37 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:**

RNDr. Helena Jiřincová, NRL pro chřipku a nechřipková respirační virová onemocnění

**Zprávu autorizoval:**

RNDr. Helena Jiřincová

Tel: 267082421

Dne: 17. 2. 2022

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/37/2021**

Identifikace cyklu:	EHK 1302
Název:	Detekce RNA SARS-CoV-2
Koordinátor:	RNDr. Helena Jiřincová
Charakteristika materiálu:	Identifikované kmeny SARS-CoV-2 izolované na buněčné kultuře naředěné na koncentraci odpovídající klinickému materiálu.
Podstata a účel PT:	Ověření schopnosti detekovat vRNA SARS-CoV-2 a prioritních mutací
Kritéria pro účast na PT:	Požadavky na laboratoře – zajištění bezpečnosti práce při manipulaci s infekčním materiálem obsahujícím živý virus SARS-CoV-2, povolení pro práci se SARS-CoV-2
Způsob přípravy:	Viz kapitola 2.
Množství připravovaného test. materiálu:	pro 26 laboratoří + 6 aliquot pro NRL
Označení vzorkovnic:	EHK 1302, PT # M/37, č. 1-6, 17.01.2022
Zabezpečení kvality vzorku:	Zabezpečení homogenity: Homogenita je zajištěna promícháním vzorků před zahájením alikvotování do vzorkovnic a rovněž v jejím průběhu.  Zabezpečení stability vzorků: Stabilita je zajištěna manipulacemi 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 zamražením na teplotu nižší než - 60 °C.
Test homogenity a stability:	Kvalita, homogenita a stabilita je posuzována na základě trojitého opakovaného testování: po rozplnění (3 aliquoty) a rozdělení do UN3373, před distribucí a v termínu blízkém dni odeslání výsledků zpět k vyhodnocení. Na každé testování se použijí nové aliquoty, průkazem homogenity a stability vzorků je dosažení totožných výsledků v čase. Vzorky jsou skladovány při teplotě nižší než - 60 °C. Identita je kontrolována diskriminační PCR bez nutnosti alikvotace.
Podmínky distribuce a uchování vzorků:	Distribuce v předepsaném obalu UN3373. Do prvního testování uchovávejte při teplotě nižší než 60 °C nebo co nejdříve zpracujte jako běžný klinický materiál. Vzorky lze uchovávat až 5 dnů zamražené při teplotě nižší než -15 °C nebo v chladničkové teplotě (+2 až +8 °C). Zbytek vzorků neuchovávejte déle než týden, doporučujeme vyizolovat RNA a tu uchovávat pro vlastní potřebu.
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe a pokynů organizátora, záměna vzorků
Počet účastníků:	17

Termín distribuce:	17. 1. 2022
Způsob distribuce:	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 minus 2 směrodatné odchylky. Laboratoř úspěšně absolvuje kolo EHK, pokud dosáhne bodového limitu, který se vypočítává podle 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.  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.
Určení vztažné hodnoty:	Vztažnou hodnotou jsou výsledky NRL, které byly získané trojitým testováním vzorků (= očekávané výsledky).

## 2. Způsob přípravy vzorků

Infikace tkáňové kultury VERO E6, nebo VERO E6-TMPRSS2 aktuálními variantami viru SARS-CoV-2 v režimu BL-3 (3 až 4 pasáže), množení viru v CO2 termostatu (5% CO2, 35 – 37°C), ověření přítomnosti RNA viru pomocí PCR, ověření sterility tkáňové tekutiny s pomnoženými viry v hovězím bujónu. Experimentální určení nevhodnějšího ředění vzorků ve virologickém odběrovém mediu pomocí PCR tak, aby virová nálož odpovídala běžnému klinickému vzorku (CT 19 - 35±1). Rozplnění po 0,5 ml do vzorkovnic a zamražení na teplotu nižší než – 60 °C.

Identifikace jednotlivých variant pomnožených na tkáňové kultuře VERO E6:

Varianta	Jméno kmene	Accession code GISAID	Pasáž
B.1.617.2 delta	hCoV-19/Czech Republic/NRL_7102/2021	EPI_ISL_2357738	P4

### 3. Charakteristika materiálu

Zásilka obsahovala 6 x 0,5 ml simulovaných lidských klinických vzorků s obsahem SARS-CoV-2 viru ve virologickém odběrovém médiu. Vzorky neobsahovaly lidský genetický materiál, neboť se jednalo o viry pomnožené v tkáňové kultuře. Koncentrace viru v jednotlivých vzorcích nepřekročila běžnou koncentraci viru v klinickém materiálu, tj. CT 19 - 35±1. Vzorky byly připraveny jako infekční neinaktivované, do expedice byly uloženy při teplotě nižší než - 60 °C a byly distribuovány na suchém ledu.

#### Očekávané výsledky

Vzorek	Očekávaná hodnota Ct	Výsledek	Sestava mutací*(spike) -
1	28,51	pozitivní	L452R, P681R,T478K, D950N
2	25,03	pozitivní	L452R, P681R,T478K, D950N
3	20,65	pozitivní	L452R, P681R,T478K, D950N
4	N/A	negativní	N/A
5	N/A	negativní	N/A
6	32,15	pozitivní	L452R, P681R,T478K, D950N

### 4. Způsob hodnocení

#### a) Hodnocení výsledků obecně

Vztažnou hodnotou jsou výsledky NRL, které byly získané trojitým testováním vzorků v termínu blízkém dni odeslání výsledků zpět k vyhodnocení (= očekávané výsledky).

Výstupy laboratoří se očekávají v podobě pozitivní/hraniční/negativní hodnota Ct. Určení počtu kopií vRNA/ml v případě použití kvantitativních metod je dobrovolné a výsledek zapište do poznámky.

Bodové hodnocení účastníků vychází z očekávaných výsledků NRL a je nastaveno tak, že:

- dvěma body je hodnocena shoda s očekávaným výsledkem s odchylkou max. Ct < 3
- jedním bodem je hodnocena částečná shoda (tedy odchylka očekávaného Ct  $\geq 3$  a < 4)
- bez bodového ohodnocení jsou výsledky, které se s očekávaným výsledkem neshodují. Za neshodné výsledky je považována neshoda v závěrečném hodnocení (např. místo pozitivního hraniční) nebo odchylka hodnoty očekávaného Ct o více než 4 ( $\geq 4$ ).

Za průkaz virové RNA v 6 vzorcích mohou laboratoře získat maximálně 12 bodů. Laboratoř úspěšně absolvuje kolo EHK, pokud dosáhne bodového limitu, který se vypočítává podle

následujícího vzorce: Limit = aritmetický průměr výsledků všech 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. Hodnocen je pouze 1 PCR úsek s Ct, které je bližší očekávané hodnotě.

**b) Hodnocení dle Ct hodnoty (tab. 1):**

Vzorky s odchylkou Ct hodnoty do 2,99 jsou bodovány dvěma body, s odchylkou Ct od 3 do 4 včetně jedním bodem. U vzorku 4 je bodováno dvěma body správně určený negativní výsledek.

**c) Informativní hodnocení dle slovně vyjádřeného závěru pozitivní/hraniční/negativní (tab. 2):**

Shoda v očekávaném hodnocení a hodnocení laboratoří byla ohodnocena 2 body.

Vzorek pozitivní určený laboratoří jako hraniční anebo negativní byl hodnocen nulovým bodovým ohodnocením, vyjma vzorku č. 1, kde bylo kvůli nižší koncentraci tolerováno hraniční hodnocení, které bylo ohodnoceno jedním bodem.

Vzorek negativní určen jako pozitivní nebo hraničně pozitivní by byl hodnocen nulovým počtem bodů, takovéto hodnocení nezaslala žádná z laboratoří.

**d) Hodnocení úspěšnosti při porovnání jednotlivých vzorků/variant (tab. 3):**

Detekce mutací nebyla předmětem opravné série.

## 5. Vyhodnocení

**Hodnocení dle Ct hodnoty - zásadní pro posouzení úspěšnosti (tab. 1):**

Tabulka 1: Hodnocení dle Ct veličin

Průměr	12				
SD	0				
SD * 2	0				
Prahová hodnota=limit	12				
Uspělo na 100 %	12 bodů	17	laboratoří	100 %	Ze 17

**Vyhodnocení dle slovně vyjádřeného závěru pozitivní/hraniční/negativní (tab. 2):**

Tabulka 2: Hodnocení dle slovního závěru (pozitivní/hraniční/negativní)

Průměr		11,88		
SD		0,5		
SD * 2		1		
Prahová hodnota=limit		11		
Uspělo na 100 %	12 bodů	16	laboratoří	94 %
Uspělo	11 bodů	1	laboratoř	6 %

Celkem 17 (100 %) laboratoří bylo stoprocentně úspěšných a získalo 12 bodů z možných 12,

Tabulka 3: Sumární přehled výsledků pro jednotlivé laboratoře

Kód I	Skóre Ct	Skóre slovní hodnocení			Izolace RNA	PCR
			Uspěl Ct	Uspěl slovní	Souprava /Výrobce	Souprava /Výrobce
66	12	12	ANO	ANO		
68	12	12	ANO	ANO		
192	12	12	ANO	ANO		
313	12	12	ANO	ANO		
317	12	12	ANO	ANO		
351	12	12	ANO	ANO		
352	11	12	ANO	ANO		
370	12	12	ANO	ANO		
376	12	12	ANO	ANO		
379	12	12	ANO	ANO		
614	12	12	ANO	ANO		
696	12	12	ANO	ANO		
759	12	12	ANO	ANO		
761	12	12	ANO	ANO		
775	12	12	ANO	ANO		
783	12	12	ANO	ANO		
784	12	12	ANO	ANO		

## 6. Závěr

Do opravné série EHK 1302 se přihlásilo 17 laboratoří, 17 laboratoří zaslalo v termínu výsledky, ve všech případech správně jak v hodnocení dle Ct hodnot tak ve slovním hodnocení.

Pro úspěšné absolvování by nutno získat bodový limit 12. Absolutní bodový zisk obdrželo 16 (94 %) laboratoří, viz tabulka 3.

**Hodnocení úspěšnosti vycházelo z výsledků Ct hodnot.** Slovní hodnocení v podobě pozitivní/hraniční/negativní bylo pouze pomocné.

KONEC ZÁVĚREČNÉ ZPRÁVY