



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/26/2017 (č. 981)

Sérologie HSV

Praha, srpen 2017

Obsah

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

Program zkoušení způsobilosti PT#M/26/2017 byl zaměřen na detekci různých sérologických stavů protilátek proti HSV z krevního séra a krevní plazmy.

Návrh a realizace PT#M/26/2017 byly prováděny podle standardního operačního postupu SOP M/26 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 Pumannová

Dne: 2.8. 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/26/2017

Identifikace kola/cyklu:	PT#M/26/2017 EHK-981
Název:	Sérologie Herpes simplex viru
Poskytovatel:	SZÚ – Centrum epidemiologie a mikrobiologie - ESPT Šrobárova 48, Praha 10, 100 42 tel.: + 420 267082575, fax.: + 420 267082271
Vedoucí ESPT	Ing. Věra Vrbíková
Koordinátor:	Dr. Labská
Subdodavatel:	není
Charakteristika materiálu:	lidské sérum/plazma
Podstata a účel PT/EHK:	Průkaz protilátek třídy IgG a IgM proti antigenům viru Herpes simplex a souhrnná interpretace provedených testů
Kritéria pro účast na PT/EHK:	Vyšetření obou vzorků imunoanalytickými metodami, minimálně 1x IgM a 1xIgG u každého vzorku a odeslání výsledků ve stanoveném termínu
Způsob přípravy:	Výchozím materiálem je lidské sérum/plazma.
Množství připravovaného test. Materiálu:	70 sad (1 sada á 2 vzorky - po 0,25 ml, na požádání po 0,5 ml)
Označení vzorkovnic:	ESPT SZÚ PT # M/26/2017 EHK-981
Zabezpečení kvality vzorku:	<ol style="list-style-type: none"> 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 rozmrazení azid sodný ve výsledné koncentraci 0,02% ve vzorku
Termín testu homogenity a stability:	<ol style="list-style-type: none"> 1. Výchozí materiál je testován na vhodné cílové markery 2. Finální vzorek je testován na všechny cílové markery před a po rozplnění
Podmínky distribuce a uchování vzorků:	Distribuce v předepsaném obalu. Přeprava a krátkodobé uchování vzorků v chladničce při teplotě 2-8°C, dlouhodobé uchování při -18 až -24°C, chránit před světlem, zamezit opakovanému rozmrazování
Možné zdroje chyb:	nedodržení správné laboratorní praxe, lidský faktor
Počet účastníků:	67
Termín distribuce:	30. 5. 2017
Způsob distribuce:	Přepravní službou v termínu určeném AP CEM (zajišťuje AP CEM)
Předání výsledků:	V elektronické podobě za použití on-line formuláře programu EHK Lab
Způsob vyhodnocení výsledků:	Shodný výsledek každého markeru je hodnocen +2 body, částečná neshoda (malá chyba) +1 bod. Interpretace nálezu +2 body/vzorek. Hranice úspěšnosti 65% bodů zvolenou kombinací testů.
Určení maximální směrodatné odchylky:	Neprovádí se
Určení přijaté vztažené hodnoty:	Výsledky získané v NRL
Termín semináře, rozeslání zprávy účastníkům:	3 měsíce po uzávěrce kola (8/2017)

2. Příprava vzorků

Výchozím materiálem pro přípravu vzorků byla defibrinovaná lidská plazma a lidská séra, která byla vyšetřena na přítomnost cílových markerů.

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. Při testování protilátek metodou NIF bylo pro IgM použito ředění 1:10 a 1:20, pro IgG ředící řada od 1:10.

3. Charakteristika série a vzorků

Série 981 obsahovala 2 vzorky k vyšetření protilátek IgM a IgG, a navíc možné doplňkové detekce typově specifických anti HSV IgG protilátek. Vzorky A i B byly poolované.

Vzorek A byl poolem defibrinované plazmy HSV séropozitivního dárce a sér selektovaných na základě přítomnosti anti HSV 2 IgG (pozitivních metodou EIA).

Vzorek B byl vzorek A + pool sér obsahujících revmatoidní faktor (třídy IgM). Výsledný pool byl anti HSV2 IgG pozitivní.

Správné výsledky jsou obsaženy v *Tabulce 1* a výsledky NRL pro herpetické viry jsou dostupné na webových stránkách SZÚ na adrese <http://www.szu.cz/ocekavane-vysledky-ehk-serie-981-serologie-hsv>.

Tabulka 1 : Správné výsledky

	EIA HSV IgG	EIA HSV IgM	EIA HSV IgA	EIA HSV 2 IgG	NIF HSV IgG	NIF HSV IgM
Vzorek A	Pozitivní	Negativní	**Negativní	*Pozitivní	Pozitivní	Negativní
Vzorek B	Pozitivní	Negativní	**Negativní	*Pozitivní	Pozitivní	Negativní

*Pro rozdílné výsledky nebodováno

** Nebodováno, dále viz Vyhodnocení

4. Způsob hodnocení

Vztažnou hodnotou pro vyhodnocení jsou výsledky NRL, ale přihlíží se k výsledkům všech zúčastněných laboratoří jako celku. Ve výsledcích série se hodnotí výsledky kvalitativně (pozitivní, hraniční, negativní).

Metody na principu immunoassay (EIA, CLIA, NIF atd.):

- 2 body/vzorek při shodě markeru (v obou vzorcích 2+2), při částečné neshodě (např. hraniční) pouze +1 bod,
- celková interpretace výsledku +2body/vzorek.

Metody na principu imunoblot:

- hodnotila se pouze celková interpretace výsledku +2 body/vzorek.

Metody na principu KFR

- výsledek má hodnotu mezilaboratorního porovnání a ve výsledku je uvedeno, zda mezi účastníky došlo ke shodě.

Následně jsou porovnány hodnoty získaných součtů bodů a stanovena hranice úspěšnosti v procentuálním vyjádření. Hranice úspěšnosti byla stanovena v této sérii na 65%.

Kvantitativní výsledky, které jste zaslali, slouží k ověření, zda nedošlo k chybě při zápisu výsledku, dále k semikvantitativnímu porovnání výsledků a upřesnění vyhodnocení v souvislosti s konkrétní soupravou nebo šarží.

5. Vyhodnocení

Vzorek A

Vzorek A byl poolovaný a séra byla selektována tak, aby vzorek obsahoval anamnestické protilátky proti HSV1 i HSV2. Vzorek zřejmě obsahoval též revmatoidní faktor (pozitivní imunofluorescence v IgM v testu bez vysycení sorbentem), nebyl však přidán cíleně.

anti HSV IgG (bez stanovení typu)

Všech 37 laboratoří shodně hodnotilo jako pozitivní

typově specifické protilátky proti HSV1 (anti HSV1 IgG)

Marker hodnotilo 13 laboratoří, všechny shodně jako pozitivní.

typově specifické protilátky proti HSV2 (anti HSV2 IgG)

Anti HSV2 IgG se ukázaly jako nejproblematičtější marker tohoto kola EHK. Marker hodnotilo 19 laboratoří a výsledky dle souprav jsou v *Tabulce 2*. Naopak hodnocení metodou imunoblot jednoznačně ukázalo oba vzorky jako anti HSV2 IgG pozitivní – *Tabulka 3*. Pro velké rozdíly byl marker pro toto kolo vyřazen z hodnocení. Výrobci souprav, které nezachytily HSV2 IgG, byli o situaci informováni.

Tabulka 2: Výsledky testů soupravami na typově specifické anti HSV2 IgG

Výrobce	souprava	Typ antigenu	Výsledek vzorek A	Výsledek vzorek B
Orgentec	Alegria Anti HSV2 IgG	Rekombinantní glykoprotein G	1xP; 2xH; 0xN	2xP; 1xH; 0xN
DiaSorin	Liaison HSV2 IgG	Rekombinantní glykoprotein G	0xP;0xH; 8xN	0xP;0xH; 8xN
NovaTec	NovaLisa HSV Type 2 IgG	Rekombinantní glykoprotein G	0xP;0xH; 3xN	0xP;0xH; 3xN
Roche	Cobas HSV-2 IgG	Rekombinantní glykoprotein G	1xP; 0xH; 0xN	1xP; 0xH; 0xN
Euroimmun	EIA HSV2 IgG	Purifikovaný glykoprotein G	0xP;0xH; 1xN	0xP;0xH; 1xN
Vircell	EIA HSV2 IgG	Purifikovaný glykoprotein G	0xP;0xH; 1xN	0xP;0xH; 1xN
Diesse	Chorus Herpes Simplex 2 IgG recombinant	Rekombinantní glykoprotein G	0xP;0xH; 1xN	0xP;0xH; 1xN
Neuvedená souprava			0xP;0xH; 1xN	0xP;0xH; 1xN

P- pozitivní, N-negativní, H - hraniční

Tabulka 3: Výsledky testů soupravami typu imunoblotů

výrobce	souprava	Výsledek vzorek A	Výsledek vzorek B
Euroimmun	EUROLINE-WB: anti HSV IgG	5x P (HSV1 i HSV2), 0xH;0xN	5x P (HSV1 i HSV2); 0xH;0xN
Neuvedená souprava		1x P (HSV1 i HSV2), 0xH;0xN	1x P (HSV1 i HSV2), 0xH;0xN

P- pozitivní, N-negativní, H – hraniční

anti HSV IgM (včetně typově specifických protilátek)

Vzorek všechny laboratoře hodnotily shodně.

Tabulka 4 : Diagnostika anti HSV IgM; oba vzorky a typ ochrany souprav proti revmatoidnímu faktoru

Výrobce	Souprava	Vzorek A	Vzorek B	Typ ochrany proti RF
EIA bez rozlišení typu				
DiaSorin	Liaison	0xP;0xH; 22xN	0xP;0xH; 22xN	*neuveďeno
Diesse	Chorus	0xP;0xH; 12xN	0xP;0xH; 12xN	sorbent
Enzygnost	BEP anti-HSV	0xP;0xH; 1xN	0xP;0xH; 1xN	*neuveďeno
Euroimmun	EIA HSV	0xP;0xH; 7xN	0xP;0xH; 7xN	sorbent
Immunolab GmBH	Herpes1/2 IgM	0xP;0xH; 1xN	0xP; 1xH ; 0xN	Sorbent volitelně
Nova Tec Immunodg. GmBH	NovaLisa HSV type 1+2	0xP;0xH; 2xN	0xP;0xH; 2xN	sorbent
Orgentec	Alegria Anti – HSV1/2 IgM	0xP;0xH; 2xN	0xP;0xH; 2xN	sorbent
Test Line	EIA HSV IgM	0xP;0xH; 10xN	1xP ;0xH; 9xN	*neuveďeno
Vidia	ELISA-VIDITEST anti HSV 1+2 IgM	0xP;0xH; 2xN	0xP;0xH; 2xN	sorbent
EIA HSV1 IgM specifické				
Euroimmun	HSV-1 incl. IgG/RF absorbent native glycoprotein CEIA HSV	0xP;0xH; 1xN	0xP;0xH; 1xN	sorbent
Nova Tec Immunodg. GmBH	NovaLisa HSV type 1	0xP;0xH; 1xN	0xP;0xH; 1xN	sorbent
Orgentec	Alegria Anti – HSV1 IgM	0xP;0xH; 2xN	0xP;0xH; 2xN	sorbent
Vircell	HERPES SIMPLEX 1 ELISA IgG/IgM (gG1 recombinant)	0xP;0xH; 1xN	0xP;0xH; 1xN	sorbent
EIA HSV2 IgM specifické				
Euroimmun	HSV-2 incl. IgG/RF absorbent native glycoprotein CEIA HSV	0xP;0xH; 1xN	0xP;0xH; 1xN	sorbent
Nova Tec Immunodg. GmBH	NovaLisa HSV type 2	0xP;0xH; 1xN	0xP;0xH; 1xN	sorbent
Orgentec	Alegria Anti – HSV2 IgM	0xP;0xH; 2xN	0xP;0xH; 2xN	sorbent
Vircell	HERPES SIMPLEX 2 ELISA IgG/IgM (gG2 purified)	0xP;0xH; 1xN	0xP;0xH; 1xN	sorbent
NIF bez rozlišení typu				
Vidia	IF VIDITEST anti HSV IgM	0xP;0xH; 3xN	1xP ;0xH; 2xN	Sorbent volitelně

*ve volně dostupných informacích nelze dohledat

anti HSV IgM

Diagnostika ve vzorku A nedělala obtíže a všichni hodnotili vzorek jako negativní (viz *Tabulka 4*)

anti HSV IgA

Marker testovalo 5 laboratoří, výsledky viz *Tabulka 5*. Protože vzorek též zřejmě obsahoval revmatoidní faktor, zachytily ho 2 laboratoře soupravou Anti-HSV-1/2-Pool ELISA výrobce Euroimmun jako hraniční (2 ze 2 použití v sérii). Tato souprava nepoužívá ochranu proti revmatoidnímu faktoru.

Vzorek B

Vzorek byl poolován, aby obsahoval anti HSV1 i anti HSV2 IgG a revmatoidní faktor třídy IgM (zřejmě i další třídy, netestováno), jednalo se o vzorek A obohacený o pool sér obsahující RF.

anti HSV IgG (bez stanovení typu)

Všech 37 laboratoří shodně hodnotilo jako pozitivní

typově specifické protilátky proti HSV1 (anti HSV1 IgG)

Marker hodnotilo 13 laboratoří, všechny shodně jako pozitivní.

typově specifické protilátky proti HSV2 (anti HSV2 IgG)

Opět se objevily neshodné výsledky závislé na použité soupravě viz *Tabulka 2*, marker je vyřazen z hodnocení.

anti HSV IgM

Marker dopadl velmi dobře tam, kde byla použita v soupravách ochrana proti RF. Anti HSV IgM bylo zachyceno pouze 1x soupravou EIA HSV IgM firmy TestLine (10 použití v sérii, 9x negativní, 1x pozitivní), 1x soupravou Herpes1/2 IgM výrobce Immunolab GmbH (1x hraniční, nepoužit doporučený sorbent) a 1x soupravou IF VIDITEST anti HSV IgM výrobce Vidia (3 použití v sérii, 2x negativní, 1x pozitivní - nepoužit doporučený sorbent). Kompletní výsledky jsou uvedeny v *Tabulce 4*.

anti HSV IgA

Marker testovalo 5 laboratoří, výsledky viz *Tabulka 5*. Anti HSV IgA byly zachyceny soupravou Anti-HSV-1/2-Pool ELISA výrobce Euroimmun (2 použití v sérii; 2x pozitivní). Tato souprava nepoužívá ochranu proti revmatoidnímu faktoru viz *Tabulka 5*.

Tabulka 5: Diagnostika anti HSV IgA; oba vzorky a typ ochrany souprav proti revmatoidnímu faktoru

Souprava	Výrobce	Vzorek A	Vzorek B	Typ ochrany proti RF
anti-HSV1+2 IgA	Vidia	3xN; 0xH; 0xP	3xN; 0xH; 0xP	sorbent
Anti-HSV-1/2-Pool ELISA	Euroimmun	0xN; 2xH ; 0xP	0xN; 0xH; 2xP	není

P- pozitivní, N-negativní, H – hraniční

6. Závěr

Série 981 – sérologie HSV se zúčastnilo 67 laboratoří, po zrušení bodového hodnocení anti HSV2 IgG protilátek uspělo 63 laboratoří bez bodové ztráty, 3 laboratoře s bodovou ztrátou a 1 laboratoř podmínečně. Přejít na on-line formulář proběhl dobře, pouze opět nefungovala část sloužící k vyplňování jednotlivých antigenů pro metody typu imunoblotů. Formulář bude dále upravován dle vašich námitek.

Série 981 byla zaměřena na ochranu souprav proti revmatoidnímu faktoru (RF), která se ukázala jako dostatečná pro detekci IgM. U souprav, kde je možnost použití ochrany proti RF volitelná, důrazně doporučujeme laboratořím její používání. Důležité je nezapomínat i na existenci RF i dalších tříd než IgM. Izolovaný záchyt anti HSV IgA vedl v rámci tohoto kola EHK k mylné interpretaci, že se jedná o akutní infekci. Proto je důležité vědět o ochraně používaných souprav proti RF.

Nemilým překvapením byla nízká citlivost souprav k anti HSV2 IgG. Při přípravě i po ukončení kola byly oba vzorky (A i B) v NRL pozitivní FDA doporučenou soupravou. Zjištěné výsledky považují za potenciálně nebezpečné zejména pro diagnostiku anti HSV2 IgG s delším časovým intervalem od výsevu, protože dochází k přirozenému poklesu hladiny těchto protilátek.

Všem děkujeme za včasné odeslání výsledků. Ad připomínky k objemu vzorků – standardní objem je 250 µl, o vyšší objem (500 µl), prosím, žádejte rovnou při objednávání EHK, usnadníte situaci oběma stranám..

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

Všem zúčastněným děkuji a těším se na další spolupráci.