



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/15/2017 (č.969)

Detekce CMV-DNA

Praha, červenec 2017

Obsah

1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing) 3
2. Celkové vyhodnocení 4-10
3. Příloha 1 – individuální vyhodnocení jednotlivých laboratoří
4. Příloha 2 - výsledkový protokol jednotlivých laboratoří

Program zkoušení způsobilosti PT#M/15/2017 byl zaměřen na detekci CMV-DNA. Návrh a realizace PT#M/15/2017 byly prováděny podle standardního operačního postupu SOP M/15 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. Vzorokly byly připraveny na pracovišti subdodavatele: FN Hradec Králové, ÚKIA, NRL pro CMV, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové.

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.

Za správnost výsledků ručí koordinátor příslušného cyklu EHK.

Koordinátor:

MUDr. Barbora Macková

Tel: 267 082 101

Zprávu vypracoval:

MUDr. Barbora Macková (ESPT SZÚ Praha)

MUDr. Vlasta Štěpánová, PhD. (NRL pro CMV)

Zprávu schválil: MUDr. Barbora Macková

Dne: 19.7.2017

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/15/2017

Identifikace kola/cyklu:	PT#M/15/2017
Název:	Detekce CMV DNA
Poskytovatel:	SZÚ – Centrum epidemiologie a mikrobiologie - ESPT Šrobárova 48, Praha 10, 100 42
Vedoucí ESPT	Ing. Věra Vrbíková
Koordinátor:	MUDr. Barbora Macková
Subdodavatel:	FN Hradec Králové, ÚKM, NRL pro CMV, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, MUDr. Vlasta Štěpánová, PhD.
Charakteristika materiálu:	6 vzorků s 1 ml plazmy pro stanovení CMV DNA
Podstata a účel PT/EHK:	Kvalitativní a kvantitativní průkaz CMV DNA
Kritéria pro účast na PT/EHK:	Znalost a technické vybavení pro vyšetření CMV DNA
Způsob přípravy:	Výchozím materiálem pro přípravu kontrolních vzorků byl kmen CMV AD169, uskladněný dlouhodobě při -80°C. Kmen CMV AD169 byl před použitím rozmražen a opakovaně pasážován na buněčné kultuře lidských embryonálních fibroblastů, poté byl z infikovaných buněk uvolněn opakovaným krátkodobým zmražením (-20° C), rozmražením a sonikací ultrazvukem. Následně byla provedena orientační kvantifikace CMV DNA. Pak byl kmen poolován do lidské testované plazmy tak, aby vznikly požadované cílové kvantitativní CMV DNA jednotlivých kontrolních vzorků.
Množství připravovaného test. materiálu:	pro 30 laboratoří
Označení vzorkovnic:	ESPT SZÚ PT # M/15/2017, EHK 969 Detekce CMV DNA
Zabezpečení kvality vzorku:	Zjištění stability a homogenity se provádí na pracovišti subdodavatele v rámci předtestování, 3 x u náhodně vybraných vzorků 1-6, a to v den přípravy, v den před distribucí a v termínu po distribuci vzorků.
Metrologická návaznost:	viz Protokol o přípravě vzorků
Termín testu homogenity a stability:	den před distribucí vzorků a po termínu jednotného zahájení rozborů všemi účastníky
Podmínky distribuce a uchování vzorků:	přeprava autem z Hradce Králové v označené polystyrénové krabici se suchým ledem, v SZÚ v Praze jsou vzorky uskladněny při teplotě -70 ° C do distribuce
Možné zdroje chyb:	Nedodržení správné laboratorní praxe
Počet účastníků:	32 laboratoří
Termín distribuce vzorků:	28.3.2017
Způsob distribuce vzorků:	Osobní odběr v SZÚ Přílohy: formulář pro zápis výsledků a pokyny účastníkům
Předání výsledků:	písemně do 28.4.2017 na předepsaných formulářích
Způsob vyhodnocení výsledků:	Kvalitativní výsledky silně pozitivní (3 body), pozitivní (2 body), slabě pozitivní (1 bod), negativní (3 body). Kvantitativní výsledky – hodnoceny pouze pozitivní vzorky (do +/- 1SD 1 bod, do +/- 2 SD 2 body, do +/- 3 SD 3 body, nad 3 SD 4 body, falešně negativní vzorek 5 bodů a falešně negativní u slabě pozitivního vzorku 3 body
Určení přijaté vztažené hodnoty:	Za správnou hodnotu (kopie/ml) je považován výsledek, získaný jako průměr ze všech hodnot získaných ze zúčastněných laboratoří
Termín semináře, rozeslání zprávy účastníkům:	Do 12 týdnů

2. Celkové vyhodnocení EHK 2017 – 969 CMV DNA

Detaily EHK:

počet přihlášených účastníků	32 laboratoří
počet zúčastněných	32 laboratoří
počet hodnocených panelů	32 (100 %)
počet panelů s kvalitativními výsledky	32 (100 %), 12 (37,5 %) pouze s výsledky kvalitativního stanovení
počet panelů s kvantitativními výsledky	20 (62,5 %)

Tab. č. 1: Panel EHK 969

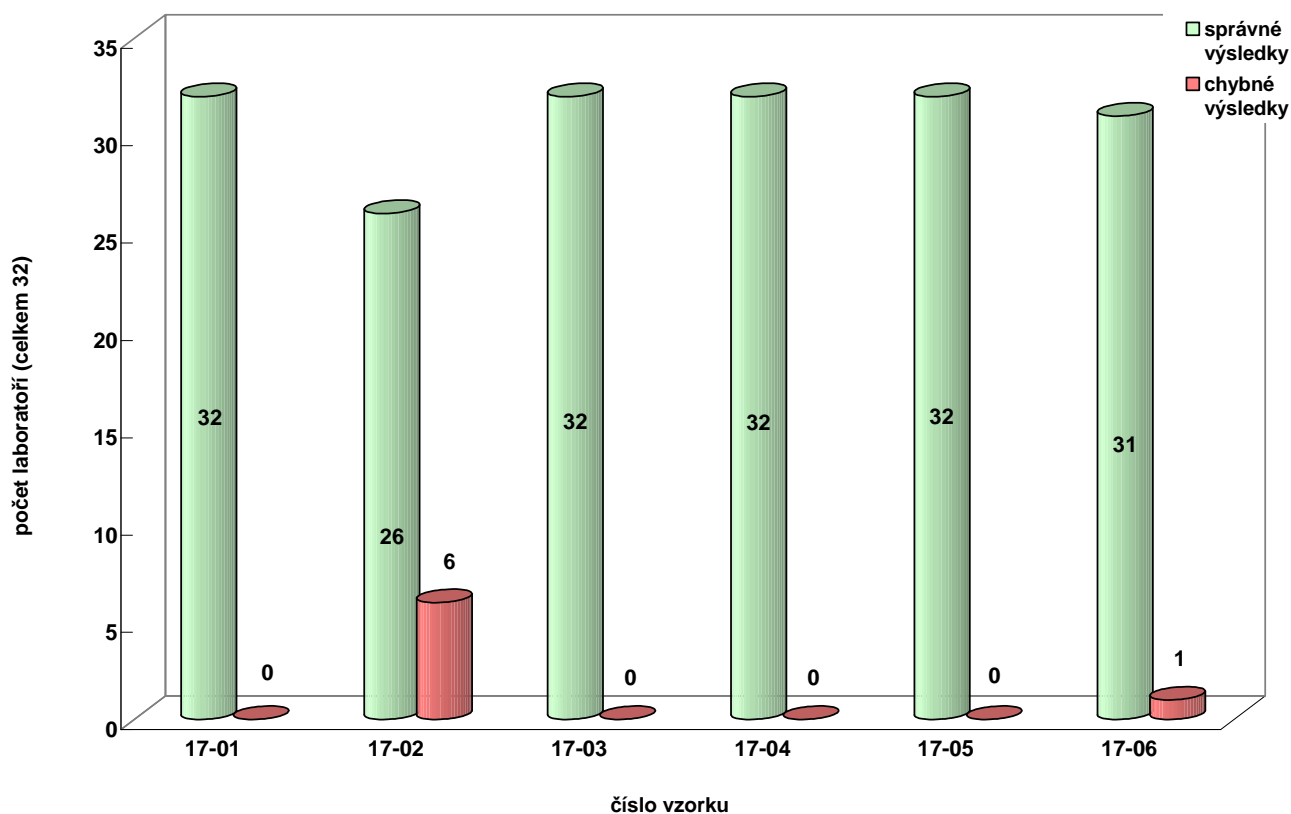
Vzorek	Obsah vzorku ¹	Správný výsledek EHK	
		kvalitativně	kvantitativně (kopie/ml)
NRL CMV <i>17-01</i>	CMV AD169	negativní	0
NRL CMV <i>17-02</i>	CMV AD169	slabě pozitivní	$2,67 \cdot 10^2$
NRL CMV <i>17-03</i>	CMV AD169	pozitivní	$1,58 \cdot 10^3$
NRL CMV <i>17-04</i>	CMV AD169	silně pozitivní	$2,55 \cdot 10^5$
NRL CMV <i>17-05</i>	CMV AD169	pozitivní	$1,87 \cdot 10^3$
NRL CMV <i>17-06</i>	CMV AD169	pozitivní	$1,65 \cdot 10^3$

¹Jako matrice vzorku byla u vzorků 17-01 až 17-06 použita testovaná negativní plazma.

Kvalitativní vyhodnocení

Tab. č. 2: Vyhodnocení kvalitativních výsledků (celkem 32 panelů)

Vzorek	Výsledek EHK	Získaný počet bodů za správný výsledek	Počet výsledků - správných/celkem	Úspěšnost
NRL CMV 17-01	negativní	3	32/32	100,0 %
NRL CMV 17-02	slabě pozitivní	1	26/32	81,3 %
NRL CMV 17-03	pozitivní	2	32/32	100,0 %
NRL CMV 17-04	silně pozitivní	3	32/32	100,0 %
NRL CMV 17-05	pozitivní	2	32/32	100,0 %
NRL CMV 17-06	pozitivní	2	31/32	96,9 %



Graf č. 1: Vyhodnocení kvalitativních výsledků u jednotlivých vzorků

Celkem bylo možné získat **13 bodů**, kterých dosáhlo 25 laboratoří (tj. 78,1 %), ztrátu jednoho bodu (tj. 12 bodů) mělo 6 laboratoří (18,8 %). Kvalitativní hodnocení těchto laboratoří bylo **výborné**. Jedna laboratoř získala ztrátu dvou bodů (3,1 %) a její kvalitativní zhodnocení bylo **velmi dobré**. Žádná laboratoř nevydala falešnou pozitivitu u negativního vzorku (NRL CMV 17-01).

Kvantitativní vyhodnocení

Všechny kvantitativní výsledky byly převedeny do dekadického logaritmu, spočítán jejich průměr a směrodatná odchylka, pomocí kterých byly vytvořeny intervaly správnosti: +/- 1 směrodatná odchylka (SD), resp. +/- 2 a +/- 3 směrodatné odchylky. Kvantitativní výsledky jednotlivých vzorků (resp. jejich logaritmy) byly následně zařazeny do daných intervalů. Rozmezí +/- 2 SD přibližně odpovídá 95% intervalu dle Gaussova rozložení logaritmických hodnot a neměly by přesáhnout přibližně 2 řády.

Výsledky, které jsou v rozmezí intervalu +/- 1SD a +/- 2 SD, jsou hodnoceny jako správné. Kvantitativní výsledky v rozmezí +/- 3 SD a více jsou hodnoceny jako chybné (mimo 95% interval Gaussova rozložení).

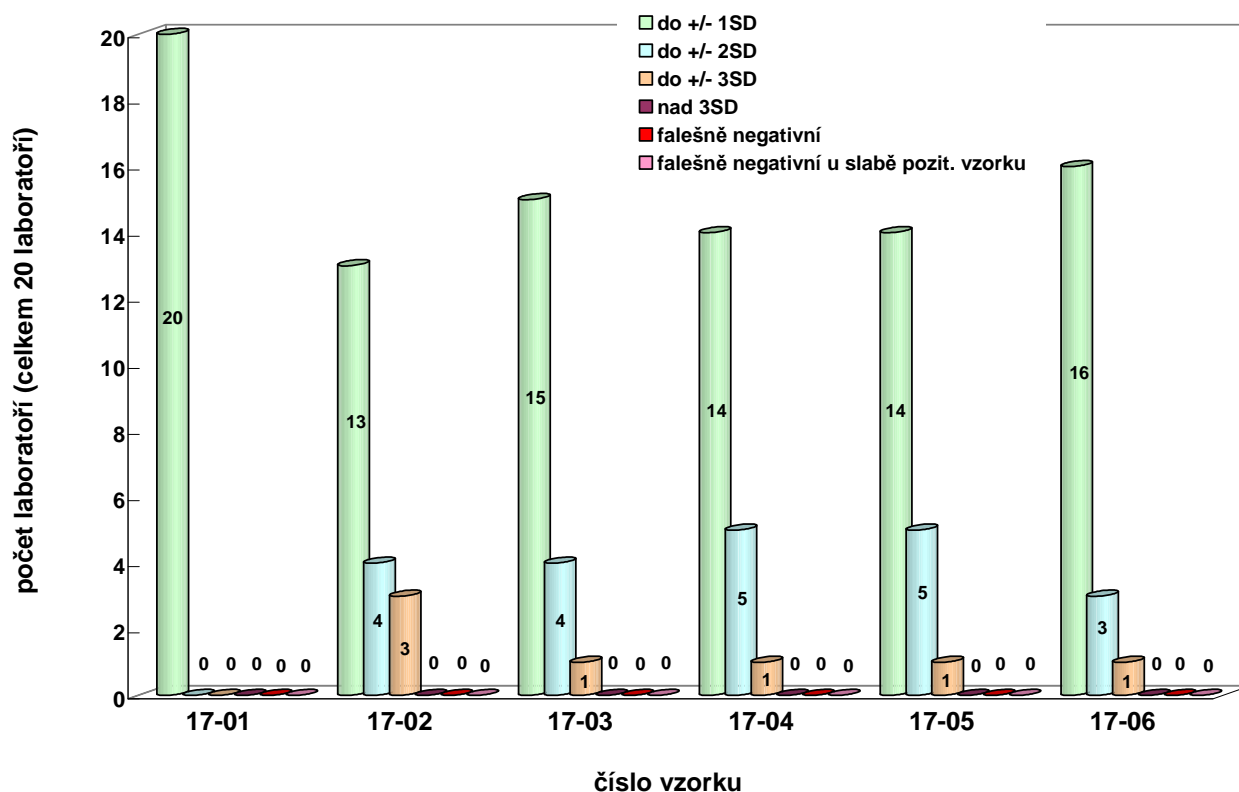
Tab. č. 3: Kvantitativní výsledky vzorků EHK 969 a jednotlivá rozmezí směrodatných odchylek

Vzorek	Výsledek EHK kopie/ml ¹	Rozmezí		
		+/- 1 SD ² (kopie/ml)	+/- 2 SD ² (kopie/ml)	+/- 3 SD ² (kopie/ml)
NRL CMV 17-01	negativní	0	0	0
NRL CMV 17-02	2,67.10 ²	9,25.10 ¹ – 7,69.10 ²	3,21.10 ¹ – 2,22.10 ³	1,11.10 ¹ – 6,39.10 ³
NRL CMV 17-03	1,58.10 ³	7,82.10 ² – 3,20.10 ³	3,86.10 ² – 6,47.10 ³	1,91.10 ² – 1,31.10 ⁴
NRL CMV 17-04	2,55.10 ⁵	1,15.10 ⁵ – 5,69.10 ⁵	5,14.10 ⁴ – 1,27.10 ⁶	2,31.10 ⁴ – 2,82.10 ⁶
NRL CMV 17-05	1,87.10 ³	7,98.10 ² – 4,40.10 ³	3,40.10 ² – 1,03.10 ⁴	1,45.10 ² – 2,42.10 ⁴
NRL CMV 17-06	1,65.10 ³	8,04.10 ² – 3,40.10 ³	3,91.10 ² – 6,98.10 ³	1,90.10 ² – 1,44.10 ⁴

¹Průměr hodnot všech laboratoří u jednotlivých vzorků. ² pozn. SD – směrodatná odchylka

Tab. č. 4: Vyhodnocení kvantitativních výsledků (celkem 20 hodnocených panelů)

Vzorek	Počet výsledků jednotlivých metod v daném rozmezí				
	+/- 1 SD	+/- 2 SD	+/- 3 SD	mimo 3 SD	falešně negativní výsledek u pozitiv. vzorku
NRL CMV 17-01	20	0	0	0	0
NRL CMV 17-02	13	4	3	0	0
NRL CMV 17-03	15	4	1	0	0
NRL CMV 17-04	14	5	1	0	0
NRL CMV 17-05	14	5	1	0	0
NRL CMV 17-06	16	3	1	0	0
Počet přidělených bodů za výsledek v daném intervalu	1	2	3	4	5



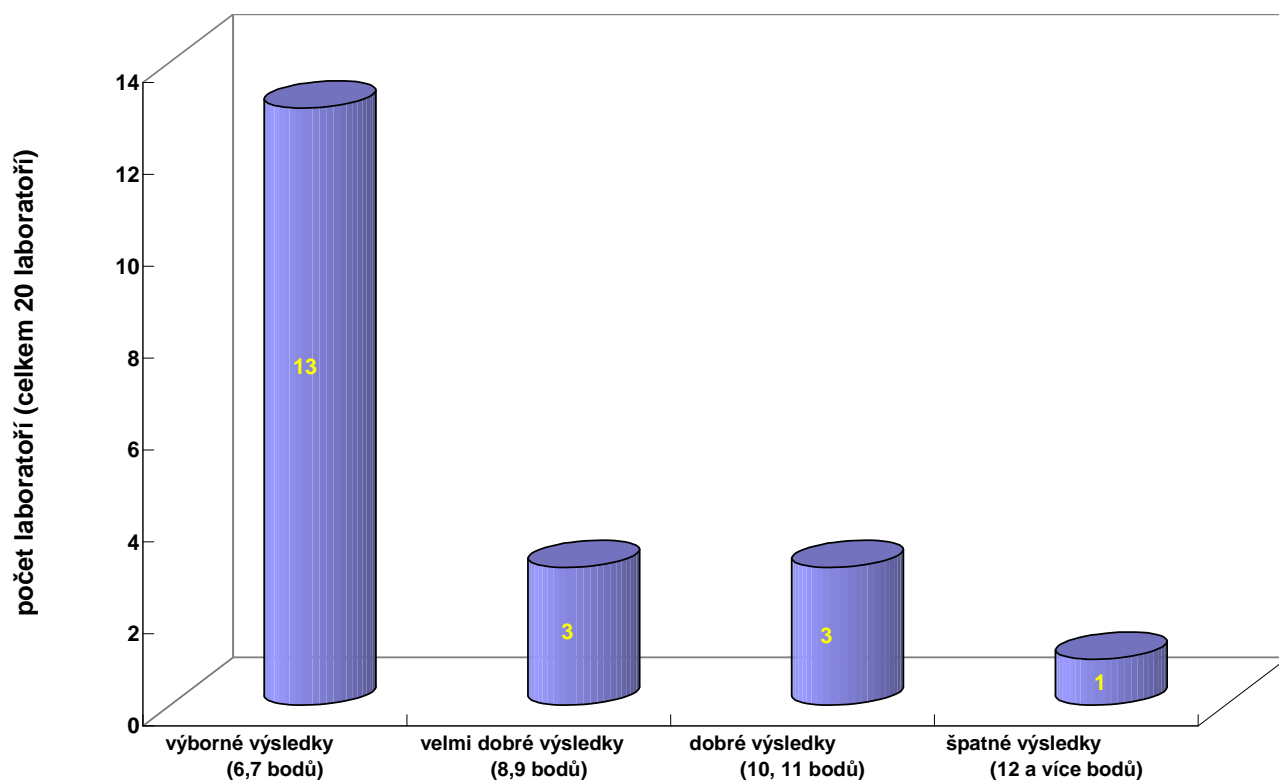
Graf č. 2: Vyhodnocení kvantitativních výsledků u jednotlivých vzorků

Tab. č. 5: Vyhodnocení laboratoří podle počtu získaných bodů (celkem 20 panelů)

Celkový počet získaných bodů	Počet panelů	Procentuální zastoupení
6 bodů (nejlepší)	7	35 %
7 bodů	6	30 %
8 bodů	1	5 %
9 bodů	2	10 %
10 bodů	2	10 %
11 bodů	1	5 %
14 bodů	1	5 %

Z celkového počtu 20 hodnocených laboratoří mělo všechny kvantitativní výsledky v rozmezí +/- 1 SD (tj. zisk 6 bodů) 7 laboratoří. Nejhorší skóre (nejvyšší počet získaných bodů) - 14 bodů získala jedna laboratoř. Žádná laboratoř neměla výsledek mimo rozmezí tří směrodatných odchylek a falešně negativní výsledek u pozitivního vzorku.

Celkové zhodnocení kvantitativních výsledků je na grafu č. 3. Laboratoře, které získaly 6 až 11 bodů, mají akceptovatelné kvantitativní výsledky – v letošním roce se jedná o 19 laboratoří. Kvantitativní výsledky neakceptovatelné (špatné) mají laboratoře s 12 a více získanými body, tj. letos pouze 1 laboratoř se ziskem 14 bodů.



Graf č. 3: Celkové zhodnocení kvantitativních výsledků všech laboratoří

Doplňující informace:

Dotazník vyplnilo všech 32 laboratoří (12 laboratoří s kvalitativním průkazem a 20 s kvantitativním průkazem). Některé laboratoře nevyplnily dotazník kompletně!!

Akreditace ČIA, SAK, SNAS

- ano – 22 laboratoří (8 laboratoří s kvalitativním průkazem, 14 s kvantitativním průkazem)
- ne – 10 laboratoří (4 laboratoří s kvalitativním průkazem, 6 s kvantitativním průkazem)

Audit NASKL

- ano – 10 laboratoří
- ne – 17 laboratoří
- nevyplněno – 5 laboratoří

Izolace

kolonky	19 laboratoří	<i>QIAGEN</i> – 8 laboratoří	QIAamp DNA Mini Kit (3×)
			QIAamp Blood Mini Kit (2×)
			QIAamp MinElute Virus Spin Kit (2×)
			QIAamp RNA Viral Mini Kit (1×) ???
		<i>GeneProof</i> – 5 laboratoří	Pathogen Free DNA Isol. Kit (2×)
			<i>GeneProof</i> DNA Isolation Kit (3×)
		<i>Macherey-Nagel</i> – 2 laboratoře	NucleoSpin Blood neuvědno
		<i>Roche</i> – 2 laboratoře	High Pure Viral NA Kit
<i>TAIGEN Bioscience Corporation</i> – 1 laboratoř	LabTurbo Genomic DNA Mini Kit		
<i>GeneriBiotech</i> – 1 laboratoř	Body Fluid Isolation Kit		
magnetické partikule	12 laboratoří	<i>Roche</i> – 4 laboratoře	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid High Performance Isol. Kit (1×)
			MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isol. Kit (1×)
			MagNA Pure Isolation Kit (1×)
			COBAS AmpliPrep Total Nucleic Acid (1×)
		<i>GeneProof</i> – 1 laboratoř	croBEE 201A Nucleic Acid Extraction Kit
		<i>QIAGEN</i> – 1 laboratoř	Biorobot EZ1+EZ1 DSP Virus Kit
		<i>RBCBioscience</i> – 2 laboratoře	MagCore Viral Nucleic Acid Extraction Kit
		<i>Perkin Elmer</i> – 1 laboratoř	PREPITO kit
<i>Duplica</i> – 1 laboratoř	Duplica Prep		
<i>Sacace</i> – 2 laboratoře	SaMag SACACE Viral nucleic acid extraction		
jiné	1 laboratoř	<i>Sacace</i> – 1 laboratoř	DNA-Sorb-B

Metodika

- kvalitativní vyšetření – 12 laboratoří
- kvantitativní vyšetření – 20 laboratoří
z toho:

konvenční PCR (1 laboratoř)	komerční	---
	in-house	1 laboratoř
real-time PCR (31 laboratoří)	komerční	30 laboratoří
	in-house	1 laboratoře

Použité komerční kity (30 laboratoří)

- 29 laboratoří používá kity s CE značkou,
- 1 laboratoř používá „kit“ bez CE značky – jedná se o LightMix Kit human cytomegalovirus od TIB MOLBIOL (metoda musí být plně validována, poté je možné použití)

kity s CE značkou		
GeneProof	14 laboratoří	Cytomegalovirus PCR Kit
QIAGEN	3 laboratoří	artus CMV RG PCR Kit (1×)
		artus CMV LC PCR Kit (2×)
Sacace Biotechnologies	7 laboratoří	CMV Real-TM Quant
InterLabService	2 laboratoře	AmpliSens CMV-FRT
Roche	1 laboratoř	COBAS TaqMan CMV Test
Diagenode	1 laboratoř	Quntitative cytomegalovirus Real-Time PCR
Argene	1 laboratoř	CMV, HHV 6,7,8 Rgene
kity bez CE značky		
TIB MOLBIOL	1 laboratoř	LightMix Kit human cytomegalovirus

použité přístroje -

Rotor-Gene	11 laboratoří	3000 (1×)
		6000 (4×)
		Q (5×)
		5plex s HRM (1×)
LightCycler	8 laboratoří	typ 1.5 (1×)
		typ 2.0 (5×)
		480 a 480 II (2×)
SLAN Real-time PCR Detection System (Shanghai Hongshi Medical Technology Co., Ltd)	2 laboratoře	---
SmartCycler (Cepheid)	3 laboratoř	---
BioRad	3 laboratoře	CFx96 (2x)
		CFx384 (1x)
croBEE Real-Time PCR System (GeneProof)	1 laboratoř	---
COBAS TaqMan (Roche)	1 laboratoř	---
Light Scanner 32 (Idaho)	1 laboratoř	---
Professional Trio Thermocycler (Biometra)	1 laboratoř	---
Sacycler (Sacace Biotechnologies)	1 laboratoř	---

Inhibiční kontrola

- kontrola inhibice je součástí vyšetření CMV DNA u 31 metod, 1 laboratoř používá in house metodu, kde není součástí vyšetření IC
- inhibice nebyla u žádného vzorku:
 - o 1 laboratoř (708) uvedla pravděpodobnost inhibice u vzorku NRL CMV 17-06, z tohoto důvodu vzorek nehodnotila (chybný výsledek)
 - o laboratoře 35, 539, 574, 598 v dotazníku zaškrtnuly inhibice ANO, ale kvalitativní nebo kvantitativní výsledky vydaly

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