



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/15/2019 (EHK 1070)**

**Detekce CMV-DNA**

**Praha, červenec 2019**

**Obsah**

- |   |         |
|---|---------|
| 1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT (Proficiency Testing) | 3       |
| 2. Celkové vyhodnocení  | 4 - 9   |
| 3. Doplnující informace   | 10 - 13 |
| 4. Příloha – individuální vyhodnocení jednotlivých laboratoří         |         |

Program zkoušení způsobilosti PT#M/15/2019 byl zaměřen na detekci CMV-DNA. Návrh a realizace PT#M/15/2019 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. Vzorky byly připraveny na pracovišti subdodavatele: FN Hradec Králové, ÚKM, 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.

Příloha závěrečné zprávy, t.j. individuální vyhodnocení jednotlivých laboratoří, je rozesílána poštou.

Za správnost výsledků odpovídá koordinátor příslušného cyklu EHK.

**Koordinátor:**

MUDr. Barbora Macková  
Tel: 267 082 101

**Zprávu vypracoval:**

MUDr. Vlasta Štěpánová, Ph.D. (NRL pro CMV)

**Zprávu schválil:**

MUDr. Barbora Macková

**Dne:** 29. 7. 2019

**Pracoviště 2 ESPT (AP CEM - Akreditační pracoviště Centra epidemiologie a mikrobiologie):**

www.szu.cz/espt  
email: [apcem@szu.cz](mailto:apcem@szu.cz)

**1. Souhrnné informace o přípravě a hodnocení PT#M/15/2019**

Identifikace kola/cyklu:	<b>PT#M/15/2019</b>
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, Ph.D.
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 rozmrazen 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 31 laboratoří
Označení vzorkovnic:	EHK 1070, PT#M/15 , č. 1 – 6, 26. 3. 2019
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:	31 laboratoří
Termín distribuce vzorků:	26. 3. 2019
Způsob distribuce vzorků:	Osobní odběr v SZÚ Přílohy: formulář pro zápis výsledků a pokyny účastníkům
Předání výsledků:	písemně do 30. 4. 2019 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 zveřejnění závěrečné zprávy účastníkům:	Do 12 týdnů po obdržení výsledků k hodnocení

## 2. Celkové vyhodnocení EHK 2019 č. 1070 - CMV DNA

Molekulárně biologická diagnostika DNA lidského cytomegaloviru

### Detaily EHK:

počet přihlášených účastníků	31 laboratoří
počet zúčastněných	31 laboratoří
počet hodnocených panelů	31 (100 %)
počet panelů s kvalitativními výsledky	31 (100 %), 10 (32,3 %) pouze s výsledky kvalitativního stanovení
počet panelů s kvantitativními výsledky	21 (67,7 %)

Tab. č. 1: Panel EHK.

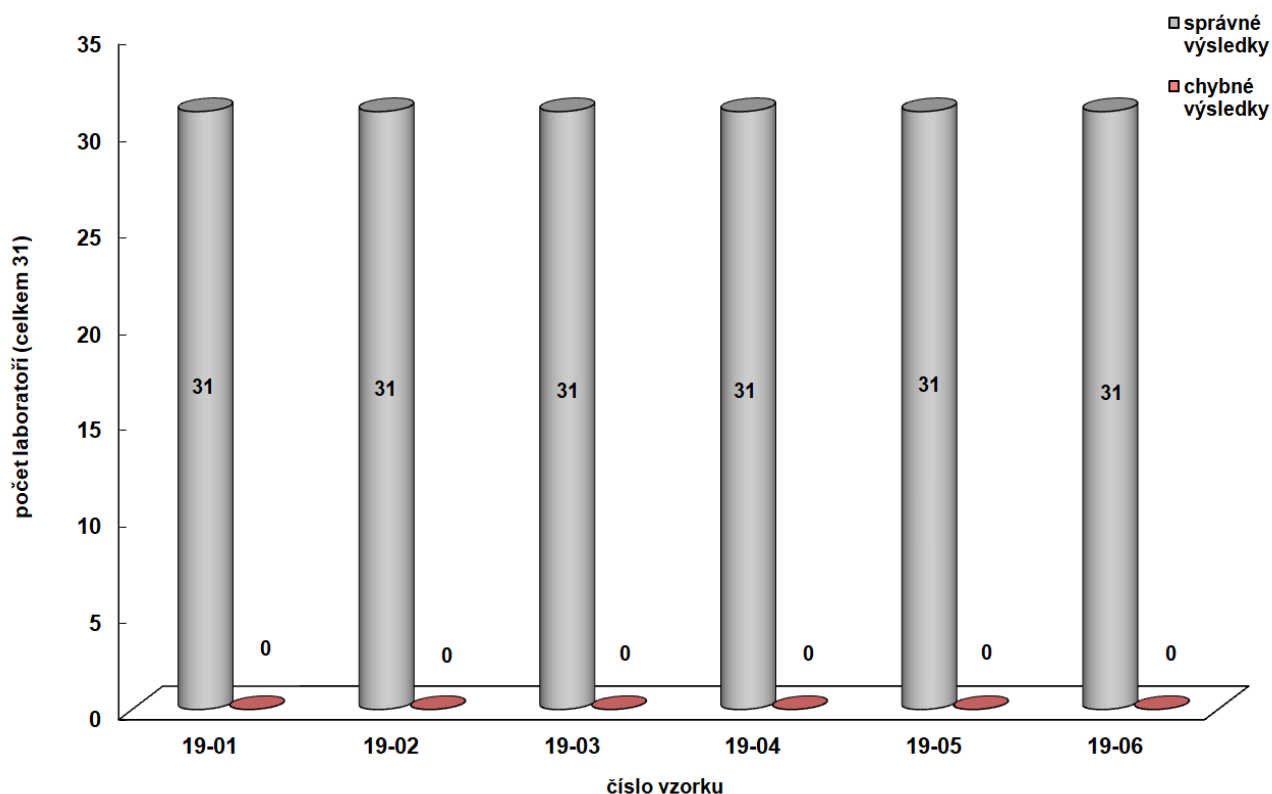
Vzorek	Obsah vzorku <sup>1</sup>	Správný výsledek EHK	
		kvalitativně	kvantitativně (kopie/ml)
NRL CMV 19-01	CMV AD169	pozitivní	6,23.10 <sup>3</sup>
NRL CMV 19-02	CMV AD169	pozitivní	9,11.10 <sup>3</sup>
NRL CMV 19-03	CMV AD169	negativní	0
NRL CMV 19-04	CMV AD169	silně pozitivní	7,26.10 <sup>6</sup>
NRL CMV 19-05	CMV AD169	pozitivní	6,86.10 <sup>3</sup>
NRL CMV 19-06	CMV AD169	pozitivní	6,65.10 <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Jako matrice vzorku byla u vzorků 19-01 až 19-06 použita testovaná negativní plazma.  
Pozn.: Vzorky 19-01, 19-02, 19-05 a 19-06 – jedná se o alikvot stejného vzorku.

### Kvalitativní vyhodnocení – celkem 31 laboratoří

Tab. č. 2: Vyhodnocení kvalitativních výsledků (celkem 31 panelů).

Vzorek	Výsledek EHK	Získaný počet bodů za správný výsledek	Počet výsledků - správných/celkem	Úspěšnost
NRL CMV 19-01	pozitivní	2	31/31	100,0 %
NRL CMV 19-02	pozitivní	2	31/31	100,0 %
NRL CMV 19-03	negativní	3	31/31	100,0 %
NRL CMV 19-04	silně pozitivní	3	31/31	100,0 %
NRL CMV 19-05	pozitivní	2	31/31	100,0 %
NRL CMV 19-06	pozitivní	2	31/31	100,0 %



**Graf č. 1: Vyhodnocení kvalitativních výsledků u jednotlivých vzorků.**

Celkem bylo možné získat **14 bodů**, kterých dosáhlo 31 laboratoří (tj. 100 %), kvalitativní hodnocení všech laboratoří bylo **výborné**.

### **Kvantitativní vyhodnocení – celkem 21 laboratoří**

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 nemělo 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).

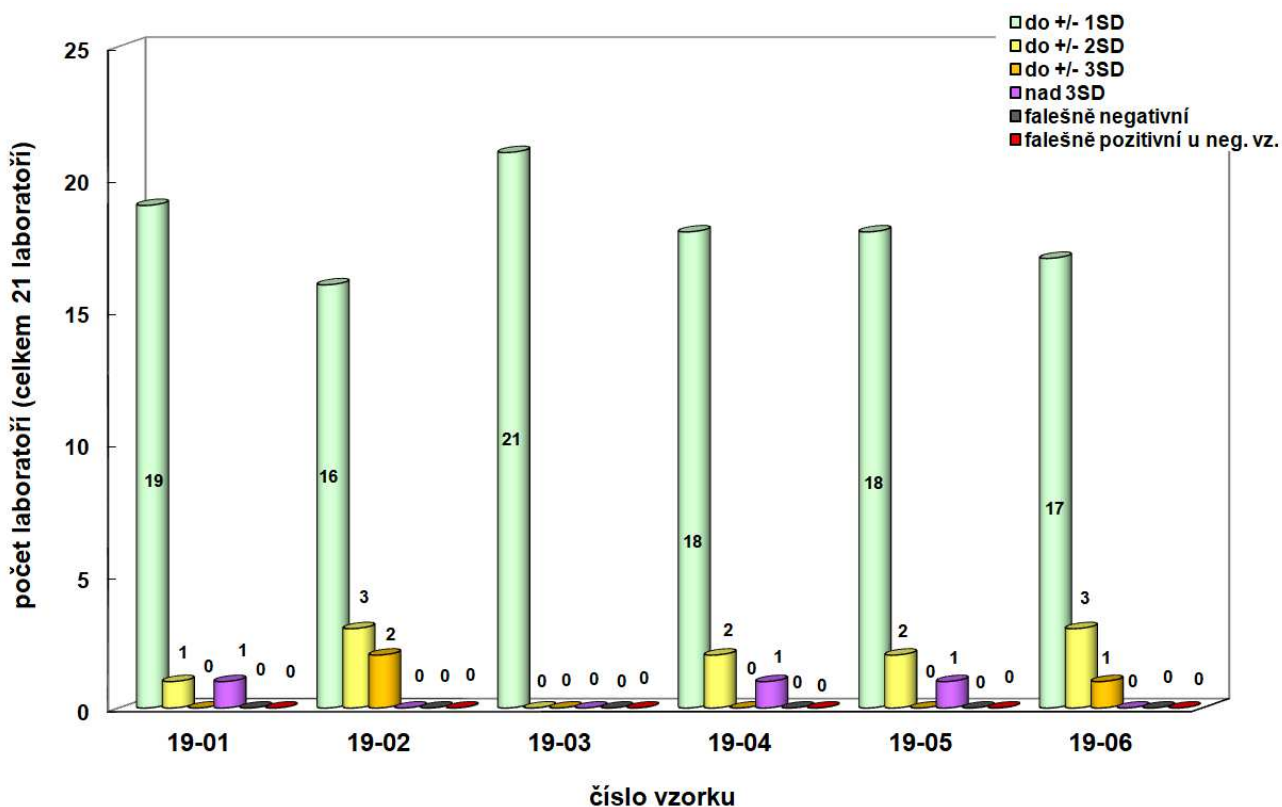
**Tab. č. 3: Kvantitativní výsledky vzorků EHK a jednotlivá rozmezí směrodatných odchylek.**

Vzorek	Výsledek EHK kopie/ml <sup>1</sup>	Rozmezí		
		+/- 1 SD <sup>2</sup> (kopie/ml)	+/- 2 SD <sup>2</sup> (kopie/ml)	+/- 3 SD <sup>2</sup> (kopie/ml)
NRL CMV 19-01	6,23.10 <sup>3</sup>	1,72.10 <sup>3</sup> – 2,25.10 <sup>4</sup>	4,76.10 <sup>2</sup> – 8,16.10 <sup>4</sup>	1,32.10 <sup>2</sup> – 2,95.10 <sup>5</sup>
NRL CMV 19-02	9,11.10 <sup>3</sup>	3,14.10 <sup>3</sup> – 2,64.10 <sup>4</sup>	1,08.10 <sup>3</sup> – 7,65.10 <sup>4</sup>	3,74.10 <sup>2</sup> – 2,22.10 <sup>5</sup>
NRL CMV 19-03	0	0	0	0
NRL CMV 19-04	7,26.10 <sup>6</sup>	2,73.10 <sup>6</sup> – 1,93.10 <sup>7</sup>	1,02.10 <sup>6</sup> – 5,15.10 <sup>7</sup>	3,85.10 <sup>5</sup> – 1,37.10 <sup>8</sup>
NRL CMV 19-05	6,86.10 <sup>3</sup>	2,07.10 <sup>3</sup> – 2,28.10 <sup>4</sup>	6,23.10 <sup>2</sup> – 7,56.10 <sup>4</sup>	1,88.10 <sup>2</sup> – 2,51.10 <sup>5</sup>
NRL CMV 19-06	6,65.10 <sup>3</sup>	2,10.10 <sup>3</sup> – 2,11.10 <sup>4</sup>	6,62.10 <sup>2</sup> – 6,69.10 <sup>4</sup>	2,09.10 <sup>2</sup> – 2,12.10 <sup>5</sup>

<sup>1</sup>Průměr hodnot všech laboratoří u jednotlivých vzorků. <sup>2</sup> pozn. SD – směrodatná odchylka

**Tab. č. 4: Vyhodnocení kvantitativních výsledků (celkem 21 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	falešně pozitivní výsledek u negativ. vzorku
NRL CMV 19-01	19	1	0	1	0	0
NRL CMV 19-02	16	3	2	0	0	0
NRL CMV 19-03	21	0	0	0	0	0
NRL CMV 19-04	18	2	0	1	0	0
NRL CMV 19-05	18	2	0	1	0	0
NRL CMV 19-06	17	3	1	0	0	0
<b>Počet přidělených bodů za výsledek v daném intervalu</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>5</b>



Graf č. 2: Vyhodnocení kvantitativních výsledků u jednotlivých vzorků.

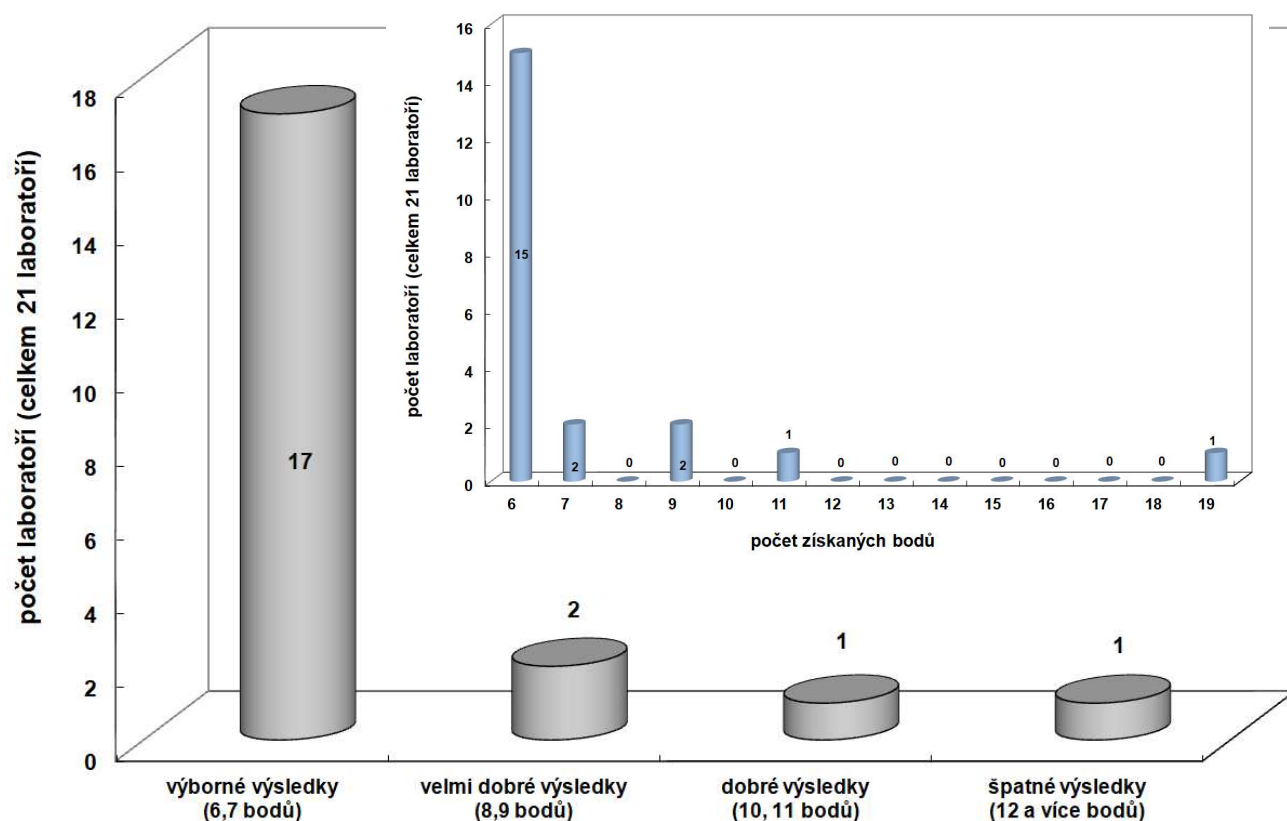
Tab. č. 5: Vyhodnocení laboratoří podle počtu získaných bodů (celkem 21 panelů).

Celkový počet získaných bodů	Počet panelů	Procentuální zastoupení
6 bodů (nejlepší)	15	71,4 %
7 bodů	2	9,5 %
8 bodů	0	--
9 bodů	2	9,5 %
10 bodů	0	--
11 bodů	1	4,8 %
12 bodů	0	--
13 bodů	0	--
14 bodů	0	--
15 bodů	0	--
16 bodů	0	--

17 bodů	0	--
18 bodů	0	--
19 bodů	1	4,8 %

Z celkového počtu 21 hodnocených laboratoří mělo všechny kvantitativní výsledky v rozmezí +/- 1 SD (tj. zisk 6 bodů) 15 laboratoří. Nejhorší skóre (nejvyšší počet získaných bodů) - 19 bodů získala jedna laboratoř (č. laboratoře 748), která systematicky podhodnocuje výsledky z důvodu špatných izolací DNA. Tato laboratoř v EHK 1070 – CMV DNA, 2019 neuspěla.

Celkové zhodnocení kvantitativních výsledků je v grafu č. 3. Laboratoře, které získaly 6 až 11 bodů, mají akceptovatelné kvantitativní výsledky – v letošním roce se jedná o 20 laboratoří. Kvantitativní výsledky neakceptovatelné (špatné) mají laboratoře s 12 a více získanými body, letos se jedná o 1 laboratoř (č. 748) se ziskem 19 bodů.



Graf č. 3: Celkové zhodnocení kvantitativních výsledků všech laboratoří.

### Variabilita laboratoří s kvantitativními výsledky (21 laboratoří)

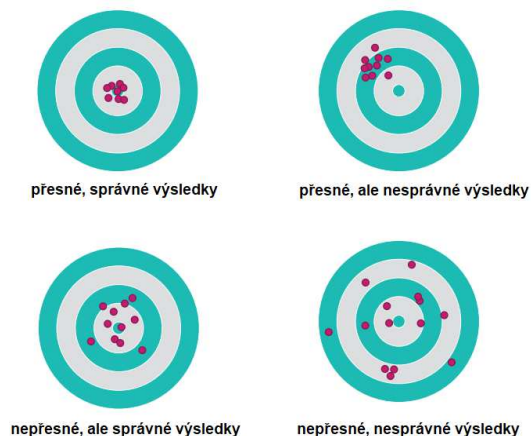
V letošním roce jsme se v rámci tohoto kontrolního cyklu snažili zjistit variabilitu Vašich metod, proto jsme pro vytvoření vzorků 19-01, 19-02, 19-05 a 19-06 použili stejný vzorek o předpokládané koncentraci  $6 \cdot 10^3$  kopií/ml. Pro hodnocení variability jsme vycházeli z předpokladu, že změřené koncentrace CMV DNA u všech těchto vzorků by měly vykazovat co nejnižší variabilitu v rámci jedné laboratoře (CV) a měly by se pohybovat maximálně v rozmezí poloviny řádu (tj. -1/4 řádu od Vašeho průměrného výsledku až +1/4



řádu od Vašeho průměrného výsledku). Výsledky variability pro jednotlivé laboratoře naleznete v individuálním zhodnocení, kde je uvedena variabilita laboratoře (CV) v procentech, a zda je průměrná hodnota těchto čtyř vzorků v rámci poloviny řádu. Jako správnou variabilitu jsme hodnotili CV do 5 % („skvělé a výborné výsledky“).

V individuálním zhodnocení dále naleznete i celkové hodnocení variability, které je na základě současného vyhodnocení celkového zisku bodu v rámci kvantitativního hodnocení, CV a hodnocení poloviny řádu pro danou laboratoř. Závěry celkového hodnocení mohou být následující:

- laboratoř má přesné a správné výsledky
- laboratoř má přesné, ale nesprávné výsledky
- laboratoř má nepřesné, ale správné výsledky
- laboratoř má nepřesné a nesprávné výsledky



Zhodnocení variability laboratoří:

1. CV:

Rozmezí CV	Počet laboratoří	Hodnocení
0 – 2,50 %	10	skvělé výsledky
2,51 – 5,00 %	5	výborné výsledky
5,01 – 7,50 %	2	velmi dobré výsledky
7,51 – 10,00 %	3	dobré výsledky
nad 10,01 %	1	špatné výsledky

2. polovina řádu:

- 14 laboratoří mělo výsledky v rozmezí poloviny řádu
- 3 laboratoře měly jeden výsledek z hodnocených vzorků mimo rozmezí poloviny řádu, ale v rozmezí jednoho řádu
- 2 laboratoře měly dva výsledky mimo rozmezí poloviny řádu, ale v rozmezí jednoho řádu
- 1 laboratoř měla jeden výsledek mimo rozmezí poloviny řádu, ale v rozmezí jednoho řádu, a jeden výsledek mimo rozmezí jednoho řádu
- 1 laboratoř měla dva výsledky mimo rozmezí jednoho řádu!!

celkové hodnocení variability:

- laboratoř má přesné a správné výsledky - 13 laboratoří
- laboratoř má přesné, ale nesprávné výsledky - 2 laboratoře (jedna laboratoř ale s celkovým ziskem 9 bodů v rámci kvantitativního zhodnocení – tj. hraničně nesprávná)
- laboratoř má nepřesné, ale správné výsledky - 4 laboratoře (jedna laboratoř ale pouze hraničně nepřesná (CV 5,14 %))
- laboratoř má nepřesné a nesprávné výsledky - 2 laboratoře (jedna laboratoř ale s celkovým ziskem 9 bodů v rámci kvantitativního zhodnocení - tj. hraničně nesprávná)

Pro ukázkou jsme použili vyhodnocení variability těchto čtyř vzorků v rámci všech laboratoří s kvantitativním zhodnocením, a ta byla následující (uvedeno v logaritmickeém měřítku):

- průměr uvedených vzorků byl 3,8535 a směrodatná odchylka 0,0630, tj. variační koeficient CV byl 1,64 %  $\Rightarrow$  hodnocení: skvělé výsledky (CV do 2,5 %)
- všechny výsledky byly v rozmezí poloviny řádu.

**Celkové hodnocení variability:** Vaše laboratoř má přesné a správné výsledky.

### 3. Doplnující informace:

Dotazník vyplnilo všech 31 laboratoří (10 laboratoří s kvalitativním průkazem a 21 s kvantitativním průkazem).

#### Akreditace ČIA, SAK, SNAS

- ano – 20 laboratoří (7 laboratoří s kvalitativním průkazem, 13 s kvantitativním průkazem) - 18× ČIA, 2× SAK
- ne – 10 laboratoří (3 laboratoře s kvalitativním průkazem, 8 s kvantitativním průkazem)

**Audit NASKL (není akreditace!! – stále v dotaznících považováno za akreditaci, jedná se o dozorový audit)**

- ano – 10 laboratoří (audit NASKL II)
- ne – 20 laboratoří
- nevyplněno – 1 laboratoř

**Izolace**

Typ izolace	Počet laboratoří	Izolační kit od firmy	Název izolačního kitu
<b>kolonky</b>	17 laboratoří	<i>Analytic Jena</i> – 1 laboratoř	innu PREP Blood DNA Mini Kit (1×)
		<i>GeneProof</i> – 7 laboratoří	Pathogen Free DNA Isolat. Kit (6×) <i>GeneProof</i> DNA Isolation Kit (1×)
		<i>QIAGEN</i> – 8 laboratoří	QIAamp DNA Mini Kit (3×)
			QIAamp Blood Mini Kit (1×)
			QIAamp MinElute Virus Spin Kit (1×)
			QIAamp DSP Virus Spin Kit (1×)
		<i>Roche</i> – 1 laboratoř	QIAamp Viral RNA Mini Kit (2×) High Pure Viral NA Kit (1×)
<b>magnetické partikule</b>	14 laboratoří	<i>ELITech group</i> – 1 laboratoř	ELITe InGenius SP200 (1×)
		<i>GeneProof</i> – 3 laboratoř	croBEE 201A Nucleic Acid Extraction Kit (3×)
		<i>Hain Lifescience GmbH</i> – 1 laboratoř	GXT NA Extraction Kit (1×)
		<i>QIAGEN</i> – 1 laboratoř	Biorobot EZ1+EZ1 DSP Virus Kit (1×)
		<i>RBCBioscience</i> – 1 laboratoř	MagCore Viral Nucleic Acid Extraction Kit (1×)
		<i>Roche</i> – 3 laboratoře	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid High Performance Isol. Kit (1×)
			MagNA Pure Isolation Kit (1×)
		<i>Sacace</i> – 3 laboratoře	COBAS AmpliPrep Total Nucleic Acid (1×) SaMag SACACE Viral nucleic acid extraction (3×)
<i>STRATEC MOLECULAR</i> – 1 laboratoř	InviMag Universal Kit (1×)		
<b>jiné</b>	---		

**Metodika**

- kvalitativní vyšetření – 10 laboratoří
- kvantitativní vyšetření – 21 laboratoří

z toho:

konvenční PCR (žádná laboratoř)	komerční	---
	in-house	---
real-time PCR (31 laboratoří)	komerční	29 laboratoří
	in-house	2 laboratoře

Pozn.:

- všechny laboratoře používají pouze real-time PCR
- všech 10 laboratoří, které provádí kvalitativní stanovení, používají komerční kity
- v případě kvantitativního stanovení 19 laboratoří používá komerční kit a 2 laboratoře in-house real-time PCR

***použité komerční kity (29 laboratoří)***

- všech 29 laboratoří používá kity s CE značkou

Firma	Počet laboratoří	Název kitu
Argene	1 laboratoř	CMV, HHV 6,7,8 Rgene
ELITech group	1 laboratoř	CMV Q ELITe Kit
GeneProof	13 laboratoří	Cytomegalovirus PCR Kit
InterLabService	2 laboratoře	AmpliSens CMV-FRT
QIAGEN	4 laboratoře	artus CMV RG PCR Kit (3×)
		artus CMV LC PCR Kit (1×)
Roche	1 laboratoř	COBAS TaqMan CMV Test
Sacace Biotechnologies	7 laboratoří	CMV Real-TM Quant

***použité přístroje***

Firma	Přístroj	Počet laboratoří	Typ přístroje
BioRad	Bio-Rad CFX	2 laboratoře	CFx96 (2×)
Cepheid	SmartCycler	2 laboratoře	Smart Cycler (2×)
ELITech group	ELITe In Genius	1 laboratoř	ELITe In Genius (1×)
GeneProof	croBEE Real-Time PCR System	1 laboratoře	croBEE Real-Time PCR System (1×)
Hangzhou Bioer Technology co., Ltd	Line Gene	1 laboratoř	Line Gene (1×)
QIAGEN	Rotor-Gene	13 laboratoří	3000 (1×)
			6000 (4×)
			Q (8×)
Roche	LightCycler	7 laboratoří	typ 1.5 (1×)
			typ 2.0 (4×)
			480 a 480 II (2×)
	COBAS TaqMan	1 laboratoř	COBAS TaqMan (1×)

Sacace Biotechnologies	Sacycler	1 laboratoř	Sacycler (1×)
Shanghai Hongshi Medical Technology Co., Ltd	SLAN Real-time PCR Detection System	2 laboratoř	SLAN Real-time PCR System (2×)

**Inhibiční kontrola**

- Kontrola inhibice je součástí vyšetření CMV DNA u všech 31 laboratoř (včetně 2 laboratoř, které používají in-house real-time PCR metodu). 3 laboratoře (58,70 a 748) v dotazníku zaškrty, že IC není součástí vyšetření, přestože používané kity dle údajů zveřejněných výrobcem deklarují přítomnost IC jako součást analýzy.
- Inhibice nebyla u žádného vzorku, přesto
  - o laboratoře 35, 68 v dotazníku zaškrty inhibice ANO (obě laboratoře ale inhibici ve výsledkovém a dotazníkovém protokolu inhibici nezmiňují),
  - o laboratoř 710 z důvodu inhibice reanalyzovala vzorky 19-04 a 19-05.

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